

**Universidad de Oviedo**

**Departamento de Química Orgánica e Inorgánica**

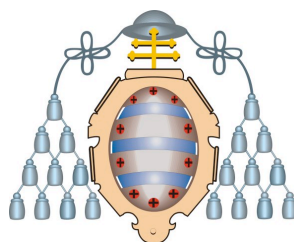
*Programa de Doctorado de Química Organometálica*

**SÍNTESIS DE NUCLEÓSIDOS CON APLICACIONES  
TERAPÉUTICAS: PREPARACIÓN  
QUIMOENZIMÁTICA DE PRECURSORES DE  
OLIGONUCLEÓTIDOS Y AZANUCLEÓSIDOS**

Tesis Doctoral

Saúl Martínez Montero





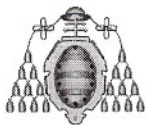
**Universidad de Oviedo**

**Departamento de Química Orgánica e Inorgánica**  
*Programa de Doctorado de Química Organometálica*

**SÍNTESIS DE NUCLEÓSIDOS CON APLICACIONES  
TERAPÉUTICAS: PREPARACIÓN  
QUIMOENZIMÁTICA DE PRECURSORES DE  
OLIGONUCLEÓTIDOS Y AZANUCLEÓSIDOS**

Memoria presentada para optar  
al grado de Doctor en Química  
por Saúl Martínez Montero





## RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Síntesis de nucleósidos con aplicaciones terapéuticas: preparación quimioenzimática de precursores de oligonucleótidos y azanucleósidos	Inglés: Synthesis of nucleosides with therapeutic applications: chemoenzymatic preparation of oligonucleotide precursors and azanucleosides
2.- Autor	
Nombre: Saúl Martínez Montero	
Programa de Doctorado: Química Organometálica (Mención de Calidad)	
Órgano responsable: Departamento de Química Orgánica e Inorgánica, Universidad de Oviedo	

### RESUMEN (en español)

Los análogos de nucleósido están recibiendo gran atención en química médica debido a las propiedades biológicas asociadas a ellos, que los convierten en importantes agentes antivirales y antitumorales. Por otro lado, son las unidades estructurales de los oligonucleótidos *antisense* y siRNA, desarrollados en los últimos años para inhibir la expresión de un gen que causa una determinada enfermedad. En la actualidad, dos oligonucleótidos ya se comercializan como fármacos y alrededor de 50 se encuentran en ensayos clínicos, constituyendo una de las nuevas áreas del desarrollo farmacéutico.

En esta Memoria, estructurada en seis capítulos, se han desarrollado procesos quimioenzimáticos encaminados a la síntesis de monómeros precursores de oligonucleótidos, justificando mediante estudios teóricos de modelización molecular la regioselectividad que ofrecen las lipasas en los procesos de acilación de nucleósidos. Además, se han preparado nuevos derivados de azanucleósidos haciendo uso de diversas estrategias sintéticas, mostrándose la evaluación biológica de estos análogos.

- En el primer capítulo se describe la separación enzimática de los regioisómeros 2'/3'-O-metiladenosina, que se obtienen como mezcla en el proceso de metilación de la adenosina, mediante una reacción de acilación catalizada por la lipasa de *Pseudomonas cepacia*. La modificación 2'-O-Me es ampliamente utilizada en la síntesis de oligonucleótidos con finalidades terapéuticas.

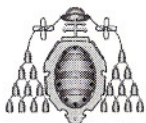
- En el segundo capítulo se desarrolla una estrategia quimioenzimática que permite sintetizar monómeros ortogonalmente protegidos de la 1,2-didesoxi-D-ribosa, precursores claves para la introducción en oligonucleótidos de sitios abásicos.

- En el tercer capítulo se ha diseñado una resolución cinética paralela catalizada por una lipasa para la resolución de mezclas racémicas de  $\beta$ -D/L-nucleósidos haciendo uso de la diferente regioselectividad que presenta la lipasa de *Pseudomonas cepacia* en la acilación de  $\beta$ -D- y  $\beta$ -L-nucleósidos.

- En el cuarto capítulo se ha estudiado mediante modelización molecular la influencia de la conformación del azúcar en la acilación selectiva de nucleósidos catalizada por la lipasa de *Candida antarctica* B. Los derivados 5' acilados obtenidos son precursores muy útiles para la síntesis de oligonucleótidos en disolución.

- En el quinto capítulo se describe una síntesis eficaz de 2',3'-didesoxi-2',2'-difluoro-4'-azanucleósidos y se evalúa su actividad biológica como antivirales.

- En el sexto capítulo se desarrolla una estrategia divergente para la síntesis de diversos azanucleósidos utilizando el mismo azaglicósido como precursor. Los nuevos derivados sintetizados son potenciales inhibidores de las glicosidasas y de la enzima purino nucleósido fosforilasa (PNP).



## RESUMEN (en Inglés)

Modified nucleosides have attracted much attention in Medicinal Chemistry since the discovery of their biological properties as antiviral and anticancer agents. On the other hand, they are the structural units of antisense oligonucleotides and siRNA, molecules able to block disease process by altering the synthesis of a particular protein. At present, two oligonucleotides have achieved market success and around 50 are under clinical trials. Thus, oligonucleotide-based therapeutic products are already playing a major role in the pharmaceutical industry.

In this Doctoral Dissertation, which consists of six chapters, building blocks useful for the preparation of oligonucleotides have been synthesized via effective chemoenzymatic processes. Molecular modeling was also performed to explain the regioselectivity showed by lipases in the acylation of nucleosides. Additionally, the synthesis of new azanucleosides possessing potential biological activity has been achieved through different synthetic pathways.

- In the first chapter, an efficient separation of 2'/3'-O-methyladenosine regioisomers, which are obtained as mixture during the methylation reaction of adenosine, has been developed by selective enzymatic acylation using *Pseudomonas cepacia* lipase. 2'-OMe modification is commonly used in the design of therapeutic oligonucleotides.

- The second chapter describes the preparation of orthogonally protected 1,2-dideoxy-D-ribose monomers through a chemoenzymatic approach. These units are useful building blocks for the insertion of abasic sites in oligonucleotides.

- In the third chapter, a lipase-catalyzed parallel kinetic resolution of  $\beta$ -D/L-nucleoside racemic mixtures was developed taking advantage of the opposite selectivity exhibited by *Pseudomonas cepacia* lipase in the acylation of  $\beta$ -D- and  $\beta$ -L-nucleosides.

- In the fourth chapter, molecular modeling studies were performed to study the role of the sugar conformation during the *Candida antarctica* lipase B catalyzed acylation of nucleosides. The 5'-acylated nucleosides synthesized are useful building blocks for the solution phase synthesis of oligonucleotides.

- The fifth chapter describes a convenient synthesis of novel 2',3'-dideoxy-2',2'-difluoro-4'-azanucleosides and the evaluation of the biological activity as antivirals.

- In the sixth chapter, several azanucleoside analogues as potential inhibitors of glycosydases and purine nucleoside phosphorilase (PNP) have been synthesized through a divergent approach from a common iminosugar precursor.

SR. DIRECTOR DE DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA E INORGÁNICA

SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN QUÍMICA ORGANOMETÁLICA

## **ABREVIATURAS**





---

**Abreviaturas**

[ $\alpha$ ]	Rotación específica
A	Adenina/adenosina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADV	Adefovir
AP	<i>Apurinic site</i>
APCI	Ionización química a presión atmosférica
Ara-C	Arabinocitidina o citarabina
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AZT	3'-Azido-3'-desoxitimidina o Zidovudina
B	Base nitrogenada
Bn	Bencil
Boc	<i>tert</i> -Butiloxicarbonil
BSA	<i>N,O</i> -bistrimetilsililacetamida
Bz	Benzoílo
C	Citosina/citidina
CAL-B	Lipasa de <i>Candida antarctica</i> tipo B
Cbz	Benciloxicarbonilo
CCF	Cromatografía de capa fina
CC <sub>50/90</sub>	Concentración citotóxica que reduce el crecimiento celular en un 50% ó 90%
CEM	Células linfoblastoides primarias
CMV	Citomegalovirus
CSA	Ácido camforsulfónico
dA	2'-Desoxiadenosina
DAST	Trifluoruro de (dietilamino)sulfuro
dC	2'-Desoxicitidina
ddC	2',3'-Didesoxicitosina
ddI	2',3'-Didesoxiinosina
dG	2'-Desosiguanosina
dU	2'-Desoxiuridina

## Abreviaturas

---

DCC	Diciclohexilcarbodiimida
DEAD	Azidodicarboxilato de dietilo
DMP	2,2-Dimetoxipropano
DMAP	<i>N,N</i> -Dimetilaminopiridina
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
DMPD	3,4-dihidroxi-2,5-bis(hidroximetil)pirrolidina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMT	4,4'-Dimetoxitritilo
DNJ	1-desoxinojirimicina
d4T	2',3'-Dideshidro-2',3'-desoxitimidina
δ	Desplazamiento químico
EM	Espectrometría de masas
EMAR	Espectrometría de masas de alta resolución
ESI	Ionización por electrospray
ETV	Entecavir
FANA	<i>2'-Fluoroarabino nucleic acid</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
F-dCC	2',3'-didesoxi-2'-fluorocitidina
FIAC	Fialuridina
FLT	3'-fluoro-3'-desoxi-L-timidina
L-FMAU	Clevudina
FTC	Emcitabina
G	Guanina/guanosina
Gln	Glutamina
HBV	Virus de la Hepatitis B
HCV	Virus de la Hepatitis C
His	Histidina
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
HSV	Virus del herpes simple
Hz	Hertzio

---

## Abreviaturas

Ibu	Isobutirilo
IC <sub>50</sub>	Concentración inhibidora que reduce el crecimiento de la placa viral en un 50%
Ile	Isoleucina
IR	Infrarrojo
IT	Intermedio tetraédrico
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
Leu	Leucina
Lev	Levulinilo
LNA	<i>Locked nucleic acid</i>
M	Molaridad
MOE	2-Metoxietilo
N	Conformación de tipo norte
NBS	<i>N</i> -Bromosuccinimida
NIS	<i>N</i> -Iodosuccinimida
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Spectroscopy</i>
NNRTI	Inhibidor no nucleosídico de la transcriptasa reversa
NRTI	Inhibidor nucleosídico de la transcriptasa reversa
P	Ángulo de pseudorrotación
PBM	Células sanguíneas periféricas mononucleares
Pf	Punto de fusión
PLE	<i>Pig liver esterase</i>
PNA	<i>Peptide nucleic acid</i>
PNP	Purino nucleósido fosforilasa
PSL	Lipasa de <i>Pseudomonas cepacia</i>
PSL-C	Lipasa de <i>Pseudomonas cepacia</i> inmovilizada sobre cerámica
PSL-IM	Lipasa de <i>Pseudomonas cepacia</i> inmovilizada sobre diatomita
PSL-SD	Crudo de <i>Pseudomonas cepacia</i>
Py	Piridina
p/p	Relación en peso

## Abreviaturas

---

Pu	Purina
Rdto.	Rendimiento
Rf	Factor de retención
RISC	<i>RNA Induced silencing complex</i>
siRNA	<i>Short interfering RNA</i>
RNasaH	Ribonucleasa H
RMN	Resonancia magnética nuclear
r.t.	<i>Room temperature</i>
S	Conformación de tipo sur
Ser	Serina
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
T	Timina/timidina
T <sub>m</sub>	<i>Melting temperature</i>
t.a.	Temperatura ambiente
TBAF	Fluoruro de tetrabutilamonio
TBDMS	<i>tert</i> -butildimetilsililo
Tf	Triflato
TFA	Ácido trifluoroacético
Thr	Treonina
TMSOTf	Trifluorometano de trimetilsililo
Tol	Toluido
t <sub>R</sub>	Tiempo de retención
Trp	Triptófano
Ts	Tosilo
U	Uracilo/uridina
UV	Ultravioleta
Val	Valina
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
VZV	Virus de varicela zoster
3TC	Lamivudina

# ÍNDICE



<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>SUMMARY</b> .....	5
<b>PRÓLOGO</b> .....	9
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	13
1. Importancia de los ácidos nucleicos .....	15
2. Nucleósidos modificados como agentes terapéuticos .....	16
2.1. Nucleósidos como antivirales	
2.1.1. Virus de inmunodeficiencia humana (VIH) .....	17
2.1.2. Virus de la hepatitis B .....	20
2.1.3. Virus de la hepatitis C .....	21
2.1.4. Otros virus .....	21
2.2. Nucleósidos como antitumorales .....	22
3. Inhibición de la expresión génica .....	24
4. Preparación de oligonucleótidos con finalidad terapéutica ...	28
4.1. Modificaciones en los oligonucleótidos .....	28
4.2. Métodos de síntesis de oligonucleótidos .....	31
5. Biocatálisis: empleo de enzimas en síntesis orgánica .....	33
5.1. Breve introducción .....	33
5.2. Resoluciones cinéticas .....	35
5.3. Nuevas tendencias de la biocatálisis .....	37
<b>CAPÍTULO 1: SEPARACIÓN QUIMIOENZIMÁTICA DE 2'/3'-O-</b>	
<b>METILADENOSINA MEDIANTE CATÁLISIS ENZIMÁTICA.</b>	
<b>APLICACIÓN A LA SÍNTESIS A GRAN ESCALA</b> .....	39
<b>1.1. ANTECEDENTES</b> .....	41
1.1.1. Síntesis de 2'-O-metilribonucleósidos .....	42
1.1.2. Biotransformaciones en nucleósidos .....	44
1.1.2.1. Acilaciones en $\beta$ -D-nucleósidos .....	44
1.1.2.2. Separación enzimática de anómeros $\alpha/\beta$ en	
nucleósidos .....	46
1.1.3. Importancia de los 3'-O-metilribonucleósidos .....	47

## Índice

---

<b>1.2. OBJETIVOS</b> .....	49
<b>1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	51
1.3.1. Síntesis de derivados monoacilados de 3'-O- metiladenosina .....	52
1.3.1.1. Acilación enzimática de 3'-O-metiladenosina ....	52
1.3.1.2. Síntesis de 2'-O-levulinil-3'-O-metiladenosina ..	53
1.3.2. Separación enzimática de la mezcla de regioisómeros 2'/3'-O-metiladenosina .....	54
1.3.2.1. Optimización de las condiciones del proceso enzimático .....	54
1.3.2.2. Aislamiento de los productos del crudo de reacción.....	57
1.3.3. Escalado del proceso: síntesis quimoenzimática de 2'- O-metiladenosina a partir de adenosina .....	60
<b>1.4. CONCLUSIONES</b> .....	63
<b>1.5. PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	65
1.5.1. Disolventes y reactivos generales .....	65
1.5.2. Técnicas de análisis .....	66
1.5.3. Procedimientos experimentales .....	68
1.5.4. Datos experimentales.....	70
<b>CAPÍTULO 2: SÍNTESIS BIOCATALÍTICA DE MONÓMEROS ABÁSICOS PARA SU INTRODUCCIÓN EN OLIGONUCLEÓTIDOS</b> .....	79
<b>2.1. ANTECEDENTES</b> .....	81
2.1.1. Mutaciones .....	81
2.1.1.1. Fuentes de mutabilidad .....	82
2.1.1.2. Mecanismos de reparación del ADN.....	82



2.1.2. Formación de sitios AP en el ADN y su introducción en oligonucleótidos sintéticos: aplicaciones.....	84
2.1.2.1. Formación de sitios AP en el ADN.....	84
2.1.2.2. Introducción de sitios AP en oligonucleótidos sintéticos.....	86
2.1.2.3. Síntesis del monómero 1,2-didesoxirribosa.....	87
2.1.2.4. Otras aplicaciones de la introducción de sitios AP en oligonucleótidos.....	88
<b>2.2. OBJETIVOS.....</b>	<b>91</b>
<b>2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>93</b>
2.3.1. Hidrólisis enzimática de 3,5-di- <i>O-p</i> -toluyl-1,2-didesoxi-D-ribosa.....	94
2.3.2. Acilación enzimática de 1,2-didesoxi-D-ribosa.....	95
2.3.3. Escalado del proceso de acilación enzimática. Reciclado de la PSL-C.....	100
2.3.4. Acilación enzimática de 1,2-didesoxi-D-ribosa con líquidos iónicos catalizada por PSL-C.....	101
2.3.5. Síntesis quimioenzimática de 3- <i>O</i> -DMT y 5- <i>O</i> -DMT-1,2-didesoxi-D-ribosa.....	102
<b>2.4. CONCLUSIONES.....</b>	<b>105</b>
<b>2.5. PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>107</b>
2.5.1. Disolventes, reactivos generales y técnicas de análisis.....	107
2.5.2. Procedimientos experimentales.....	108
2.5.3. Datos experimentales.....	110
<b>CAPÍTULO 3: RESOLUCIÓN CINÉTICA PARALELA ENZIMÁTICA DE MEZCLAS RACÉMICAS DE <math>\beta</math>-D/L-NUCLEÓSIDOS. UN MÉTODO PARA EL AISLAMIENTO DE <math>\beta</math>-L-NUCLEÓSIDOS.....</b>	<b>127</b>
<b>3.1. ANTECEDENTES.....</b>	<b>129</b>

## Índice

---

3.1.1. L-Nucleósidos como antivirales .....	130
3.1.2. L-Nucleósidos como antitumorales .....	132
3.1.3. L-Nucleótidos como componentes del ADN.....	132
3.1.4. Procesos biocatalíticos en $\beta$ -L-nucleósidos .....	133
3.1.5. Resoluciones enzimáticas de D/L-nucleósidos .....	135
3.1.6. Modelización molecular de la catálisis enzimática ...	136
3.1.6.1. Mecanismo de acción de las lipasas.....	137
3.1.6.2. Breve introducción a la modelización molecular .....	138
<b>3.2. OBJETIVOS .....</b>	<b>141</b>
<b>3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>143</b>
3.3.1. Resolución enzimática de mezclas racémicas de $\beta$ -D/L- 2'-desoxinucleósidos .....	143
3.3.1.1. Resolución de la mezcla racémica <i>N</i> -benzoil- $\beta$ - D/L-2'-desoxicitidina.....	143
3.3.1.2. Resolución de la mezcla racémica <i>N</i> -benzoil- $\beta$ - D/L-2'-desoxiadenosina .....	147
3.3.1.3. Resolución de la mezcla racémica <i>N</i> -isobutiril- $\beta$ - D/L-2'-desoxiguanosina .....	150
3.3.2. Acilaciones enzimáticas en $\beta$ -D y $\beta$ -L-ribonucleósidos .....	153
3.3.2.1. Acilaciones enzimáticas en $\beta$ -D-ribonucleósidos .....	154
3.3.2.2. Acilaciones enzimáticas en $\beta$ -L-ribonucleósidos.....	156
3.3.3. Resolución enzimática de $\beta$ -D/L-uridina .....	157
3.3.4. Estudio de la acilación enzimática de $\beta$ -D/L-nucleósidos mediante modelización molecular .....	160
<b>3.4. CONCLUSIONES .....</b>	<b>167</b>
<b>3.5. PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>169</b>
3.5.1. Disolventes y reactivos generales .....	169

3.5.2. Técnicas de análisis.....	169
3.5.3. Modelización molecular.....	170
3.5.4. Procedimientos experimentales.....	171
3.5.5. Datos experimentales.....	173

**CAPÍTULO 4: INFLUENCIA DE LA CONFORMACIÓN DEL AZÚCAR EN LA ACILACIÓN DE NUCLEÓSIDOS CATALIZADA POR CAL-B. ....** 177

**4.1. ANTECEDENTES.....** 179

4.1.1. Análisis conformacional de los ácidos nucleicos..... 179

4.1.2. Factores que determinan la conformación de los nucleósidos ..... 182

4.1.3. Influencia de la conformación en la actividad biológica de nucleósidos y oligonucleótidos ..... 184

**4.2. OBJETIVOS.....** 187

**4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....** 189

4.3.1. Acilación catalizada por CAL-B de nucleósidos 2'-sustituidos..... 189

4.3.2. Modelización molecular para la acilación de nucleósidos 2'-sustituidos catalizada por CAL-B. Influencia de la conformación ..... 194

**4.4. CONCLUSIONES.....** 201

**4.5. PARTE EXPERIMENTAL.....** 203

4.5.1. Disolventes y reactivos generales ..... 203

4.5.2. Técnicas de análisis..... 203

4.5.3. Modelización molecular..... 205

4.5.4. Procedimientos experimentales ..... 206

4.5.5. Datos experimentales..... 206

## Índice

---

### **CAPÍTULO 5: SÍNTESIS DE 2',3'-DIDESOXI-2',2'-DIFLUORO-4'-AZANUCLEÓSIDOS. EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD BIOLÓGICA**..... 217

#### **5.1. ANTECEDENTES**..... 219

5.1.1. Actividad biológica de los nucleósidos fluorados..... 220

5.1.2. Nucleósidos heterocíclicos ..... 221

5.1.3. Síntesis de fluoro-4'-azanucleósidos..... 223

#### **5.2. OBJETIVOS** ..... 227

#### **5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN** ..... 229

5.3.1. Síntesis del precursor del azúcar para la glicosilación ..... 229

5.3.2. Síntesis de 2',2'-difluoro-4'-azanucleósidos pirimidínicos..... 231

5.3.3. Síntesis de 2',2'-difluoro-4'-azanucleósidos púricos ..... 235

5.3.4. Ensayos biológicos de los 2',2'-difluoro-4'-azanucleósidos sintetizados..... 240

#### **5.4. CONCLUSIONES** ..... 243

#### **5.5. PARTE EXPERIMENTAL**..... 245

5.5.1. Disolventes y reactivos generales ..... 245

5.5.2. Técnicas de análisis ..... 245

5.5.3. Procedimientos experimentales ..... 246

5.5.4. Datos experimentales ..... 250

### **CHAPTER 6: DESIGN AND DIVERGENT SYNTHESIS OF NOVEL AZANUCLEOSIDES FROM AN IMINOSUGAR: POTENTIAL INHIBITORS OF GLYCOSIDASES AND PURINE NUCLEOSIDE PHOSPHORYLASE** ..... 269

#### **6.1. BACKGROUND** ..... 271

6.1.1. Biochemical functions of glycosidases ..... 272

6.1.2. Iminosugars as glycosidase inhibitors ..... 273

6.1.2.1. Therapeutic applications of iminosugars .....	273
6.1.2.2. Polyhydroxylated pyrrolidines as potent glycosidase inhibitors.....	274
6.1.3. Another target metabolic enzyme: purine nucleoside phosphorilase .....	277
6.1.4. Development of powerful PNP inhibitors.....	278
6.1.4.1. Rational design .....	278
6.1.4.2. Chemical synthesis of second generation of PNP inhibitors.....	280
<b>6.2. OBJECTIVES .....</b>	<b>283</b>
<b>6.3. RESULTS AND DISCUSSION.....</b>	<b>285</b>
6.3.1. Selection of a versatile iminosugar for the divergent synthesis of nucleosides .....	285
6.3.2. Synthesis of C-linked nucleosides .....	286
6.3.3. Synthesis of N-linked nucleosides .....	291
<b>6.4. CONCLUSIONS .....</b>	<b>297</b>
<b>6.5. EXPERIMENTAL SECTION .....</b>	<b>299</b>
6.5.1. General .....	299
6.5.2. Synthetic procedures for reported compounds.....	299
6.5.3. Synthetic procedures and experimental data for new compounds .....	301



## **RESUMEN**





Los análogos de nucleósido están recibiendo gran atención en química médica debido a las propiedades biológicas asociadas a ellos, que los convierten en importantes agentes antivirales y antitumorales. Por otro lado, son las unidades estructurales de los oligonucleótidos *antisense* y siRNA, desarrollados en los últimos años para inhibir la expresión de un gen que causa una determinada enfermedad. En la actualidad, dos oligonucleótidos ya se comercializan como fármacos y alrededor de 50 se encuentran en ensayos clínicos, constituyendo una de las nuevas áreas del desarrollo farmacéutico.

En esta Memoria, estructurada en seis capítulos, se han desarrollado procesos quimioenzimáticos encaminados a la síntesis de monómeros precursores de oligonucleótidos, justificando mediante estudios teóricos de modelización molecular la regioselectividad que ofrecen las lipasas en los procesos de acilación de nucleósidos. Además, se han preparado nuevos derivados de azanucleósidos haciendo uso de diversas estrategias sintéticas, mostrándose la evaluación biológica de estos análogos.

- En el primer capítulo se describe la separación enzimática de los regioisómeros 2'/3'-*O*-metiladenosina, que se obtienen como mezcla en el proceso de metilación de la adenosina, mediante una reacción de acilación catalizada por la lipasa de *Pseudomonas cepacia*. La modificación 2'-*O*-Me es ampliamente utilizada en la síntesis de oligonucleótidos con finalidades terapéuticas. Los resultados se encuentran publicados en:

"Improved synthesis and isolation of 2'-*O*-methyladenosine: effective and scalable enzymatic separation of 2'/3'-*O*-methyladenosine regioisomers". Martínez-Montero, S.; Fernández, S.; Rodríguez-Pérez, T.; Sanghvi, Y. S.; Wen, K.; Gotor, V.; Ferrero, M. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 3265-3271.

- En el segundo capítulo se desarrolla una estrategia quimioenzimática que permite sintetizar monómeros ortogonalmente protegidos de la 1,2-didesoxi-D-ribosa, precursores claves para la introducción en oligonucleótidos de sitios abásicos. Los resultados se encuentran recogidos en la siguiente publicación:

"An expedient biocatalytic procedure for abasic site precursors useful in oligonucleotide synthesis". Martínez-Montero, S.; Fernández, S.; Sanghvi, Y. S.; Gotor, V.; Ferrero, M. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, 9, 5960-5966.

## Resumen

---

• En el tercer capítulo se ha diseñado una resolución cinética paralela catalizada por una lipasa para la resolución de mezclas racémicas de  $\beta$ -D/L-nucleósidos haciendo uso de la diferente regioselectividad que presenta la lipasa de *Pseudomonas cepacia* en la acilación de  $\beta$ -D- y  $\beta$ -L-nucleósidos. Los resultados se encuentran publicados en:

"Enzymatic parallel kinetic resolution of mixtures of D/L-2'-deoxy and Ribonucleosides: an approach for the isolation of  $\beta$ -L-Nucleosides". Martínez-Montero, S.; Fernández, S.; Sanghvi, Y. S.; Gotor, V.; Ferrero, M. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 6605-6613.

• En el cuarto capítulo se ha estudiado mediante modelización molecular la influencia de la conformación del azúcar en la acilación selectiva de nucleósidos catalizada por la lipasa de *Candida antarctica* B. Los derivados 5' acilados obtenidos son precursores muy útiles para la síntesis de oligonucleótidos en disolución. Los resultados obtenidos se recogen en:

"CAL-B Catalyzed Acylation of Nucleosides and Role of the Sugar Conformation: An Improved Understanding for the Enzyme-Substrate Recognition". Martínez-Montero, S.; Fernández, S.; Sanghvi, Y. S.; Gotor, V.; Ferrero, M. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, doi: 10.1002/ejoc.201200609.

• En el quinto capítulo se describe una síntesis eficaz de 2',3'-dideoxi-2',2'-difluoro-4'-azanucleósidos y se evalúa su actividad biológica como antivirales. Los resultados obtenidos se han recopilado en:

"Synthesis, anti-HIV-1 and anti-HCV activity of novel 2',3'-dideoxy-2',2'-difluoro-4'-azanucleosides". Martínez-Montero, S.; Fernández, S.; Sanghvi, Y. S.; Theodorakis, E. A.; Detorio, M.; McBrayer, T. R.; Whitaker, T.; Schinazi, R. F.; Gotor, V.; Ferrero, M. Enviado para su publicación.

• En el sexto capítulo se desarrolla una estrategia divergente para la síntesis de diversos azanucleósidos utilizando el mismo azaglicósido como precursor. Los nuevos derivados sintetizados son potenciales inhibidores de las glicosidasas y de la enzima purino nucleosido fosforilasa (PNP). Los resultados se encuentran publicados en:

"Design and Divergent Synthesis of Aza Nucleosides from a Chiral Imino Sugar". Martínez-Montero, S.; Fernández, S.; Ramesh, N. G.; Chattopadhyaya, J.; Sanghvi, Y. S.; Gotor, V.; Ferrero, M. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 4671-4678.

## **SUMMARY**



Modified nucleosides have attracted much attention in Medicinal Chemistry since the discovery of their biological properties as antiviral and anticancer agents. On the other hand, they are the structural units of antisense oligonucleotides and siRNA, molecules able to block disease process by altering the synthesis of a particular protein. At present, two oligonucleotides have achieved market success and around 50 are under clinical trials. Thus, oligonucleotide-based therapeutic products are already playing a major role in the pharmaceutical industry.

In this Doctoral Dissertation, which consists of six chapters, building blocks useful for the preparation of oligonucleotides have been synthesized via effective chemoenzymatic processes. Molecular modeling was also performed to explain the regioselectivity showed by lipases in the acylation of nucleosides. Additionally, the synthesis of new azanucleosides possessing potential biological activity has been achieved through different synthetic pathways.

- In the first chapter, an efficient separation of 2'/3'-*O*-methyladenosine regioisomers, which are obtained as mixture during the methylation reaction of adenosine, has been developed by selective enzymatic acylation using *Pseudomonas cepacia* lipase. 2'-OMe modification is commonly used in the design of therapeutic oligonucleotides. The results obtained were published in:

"Improved synthesis and isolation of 2'-*O*-methyladenosine: effective and scalable enzymatic separation of 2'/3'-*O*-methyladenosine regioisomers". Martínez-Montero, S.; Fernández, S.; Rodríguez-Pérez, T.; Sanghvi, Y. S.; Wen, K.; Gotor, V.; Ferrero, M. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 3265-3271.

- The second chapter describes the preparation of orthogonally protected 1,2-dideoxy-D-ribose monomers through a chemoenzymatic approach. These units are useful building blocks for the insertion of abasic sites in oligonucleotides. The results have been published in:

"An expedient biocatalytic procedure for abasic site precursors useful in oligonucleotide synthesis". Martínez-Montero, S.; Fernández, S.; Sanghvi, Y. S.; Gotor, V.; Ferrero, M. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, 9, 5960-5966.

- In the third chapter, a lipase-catalyzed parallel kinetic resolution of  $\beta$ -D/L-nucleoside racemic mixtures was developed taking advantage of the opposite selectivity exhibited by

## Summary

---

*Pseudomonas cepacia* lipase in the acylation of  $\beta$ -D- and  $\beta$ -L-nucleosides. The results were published in:

"Enzymatic parallel kinetic resolution of mixtures of D/L-2'-deoxy and Ribonucleosides: an approach for the isolation of  $\beta$ -L-Nucleosides". Martínez-Montero, S.; Fernández, S.; Sanghvi, Y. S.; Gotor, V.; Ferrero, M. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 6605-6613.

- In the fourth chapter, molecular modeling studies were performed to study the role of the sugar conformation during the *Candida antarctica* lipase B catalyzed acylation of nucleosides. The 5'-acylated nucleosides synthesized are useful building blocks for the solution phase synthesis of oligonucleotides. These results are brought together in:

"CAL-B catalyzed acylation of nucleosides and role of the sugar conformation: an improved understanding for the enzyme-substrate recognition". Martínez-Montero, S.; Fernández, S.; Sanghvi, Y. S.; Gotor, V.; Ferrero, M. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, doi: 10.1002/ejoc.201200609.

- The fifth chapter describes a convenient synthesis of novel 2',3'-dideoxy-2',2'-difluoro-4'-azanucleosides and the evaluation of the biological activity as antivirals. The results are collected in:

"Synthesis, anti-HIV-1 and anti-HCV activity of novel 2',3'-dideoxy-2',2'-difluoro-4'-azanucleosides". Martínez-Montero, S.; Fernández, S.; Sanghvi, Y. S.; Theodorakis, E. A.; Detorio, M.; McBrayer, T. R.; Whitaker, T.; Schinazi, R. F.; Gotor, V.; Ferrero, M. Submitted.

- In the sixth chapter, several azanucleoside analogues as potential inhibitors of glycosydases and purine nucleoside phosphorylase (PNP) have been synthesized through a divergent approach from a common iminosugar precursor. The results obtained have been published in:

"Design and Divergent Synthesis of Aza Nucleosides from a Chiral Imino Sugar". Martínez-Montero, S.; Fernández, S.; Ramesh, N. G.; Chattopadhyaya, J.; Sanghvi, Y. S.; Gotor, V.; Ferrero, M. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 4671-4678.

# **PRÓLOGO**





La necesidad de aliviar los sufrimientos físicos y mentales es inherente a la existencia del hombre. La civilización china es la primera que deja constancia de determinados tratamientos para la salud. De hecho, en el 5000 a.C. ya conocían las propiedades beneficiosas del té y de la soja cultivando además un gran número de plantas con fines terapéuticos. Los egipcios dejaron reflejados en los papiros sus conocimientos en varios campos de la medicina y sus correspondientes tratamientos basados principalmente en las propiedades curativas de las plantas. Sin embargo, la Farmacología Moderna, tal como se entiende hoy en día, comienza en 1805 cuando el farmacéutico alemán Friedrich Serturner aísla por primera vez un principio activo, un alcaloide, de una planta medicinal, el opio. Posteriormente a su aislamiento, se autosuministró la exagerada cantidad de 100 mg. Serturner sufrió durante más de tres días los efectos somníferos de la droga. Este alcaloide se denominó morfina, en honor al dios griego del sueño Morpheus.<sup>1</sup>

Años más tarde, en 1828, el científico alemán Friedrich Wöhler sintetizó un compuesto orgánico, la urea, a partir de sales inorgánicas. De este modo, quedó demostrado que los compuestos orgánicos, es decir, los que contienen carbono, no sólo pueden producirlos los organismos vivos, como se creía hasta el momento. Este hallazgo supuso el nacimiento de la Química Orgánica. Desde entonces, pocas disciplinas han hecho tanto por el avance de la medicina. Desde los tiempos de Wöhler se han sintetizado millones de nuevas moléculas orgánicas. Muchas forman parte de nuestra vida cotidiana, otras son importantes fármacos, sin los cuales, no hubiera sido posible el repunte que la medicina ha experimentado en el último siglo.

La Química Orgánica ha tenido una aportación crucial para encontrar tratamientos eficaces frente a diversas enfermedades, y a buen seguro su papel será también determinante en un futuro próximo para encontrar tratamientos cada vez más efectivos para enfermedades tan devastadoras y a la vez tan desconocidas como las enfermedades neurodegenerativas y mentales. Por tanto, podría decirse que la Química Orgánica ha jugado y jugará un papel fundamental en el bienestar de la humanidad.

---

<sup>1</sup> a) *Biologically Active Natural Products: Pharmaceuticals*; Cutler, S. J.; Cutler, H. G., Eds.; CRC Press: Boca Raton, 1999. b) Leake, C. D. *An Historical Account of Pharmacology to the Twentieth Century*; Charles C. Thomas: Springfield, IL (USA), 1975.



# **INTRODUCCIÓN**



## **1. IMPORTANCIA DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS**

Las moléculas que mejor representan el nexo de unión existente entre la Química y la Biología Molecular son sin duda los ácidos nucleicos. Existen dos tipos de ácidos nucleicos, el ADN y el ARN. El primero es un polímero formado por la unión de nucleótidos de desoxirribosa mientras que el ARN posee nucleótidos de ribosa como unidad estructural. Ambos son moléculas fundamentales en todos los organismos vivos, ya que si estos compuestos se alteran, se producen modificaciones importantes en la actividad y en la supervivencia del organismo afectado. Estas moléculas fueron aisladas, por primera vez, en 1869 por el médico suizo Friederich Miescher a partir de extractos celulares, aunque no fueron publicadas hasta dos años más tarde.<sup>2</sup>

La elucidación de la estructura del ADN supuso uno de los mayores logros de la historia de la ciencia. Alrededor de 1950 Erwin Chargaff, tras estudiar una gran cantidad de muestras de ADN pertenecientes a diversas especies de organismos observó que siempre existía la misma cantidad de bases nitrogenadas púricas y pirimidínicas. Además, descubrió que el número de adeninas siempre era igual al de timinas, y el de guaninas al de citosinas, constituyendo lo que se conoce como la *ley de equivalencia de bases* de Chargaff.<sup>3</sup> Por otro lado, Rosalind Franklin obtuvo la fotografía de la doble hélice de ADN, que mostraba que esta molécula posee una estructura helicoidal.<sup>4</sup> Maurice Wilkins,<sup>5</sup> que trabajaba con Franklin, mostró esta fotografía a Watson y Crick, que también estaban implicados en el estudio de la estructura del ADN. En 1953 Watson y Crick publican en la revista *Nature* la famosa doble hélice del ADN.<sup>6</sup> En 1962 – cuatro años después del fallecimiento de Franklin y en ausencia de Chargaff, que no fue galardonado- Watson, Crick y Wilkins recogieron en Estocolmo el premio Nobel de Fisiología y Medicina por sus trabajos sobre la determinación de la estructura del ADN.

---

<sup>2</sup> Miescher, F. *Med.-Chem. Unters.* **1871**, 4, 441-460.

<sup>3</sup> a) Chargaff, E.; Vischer, E.; Doniger, R.; Green, C.; Misani, F. *J. Biol. Chem.* **1949**, 177, 405-416. b) Chargaff, E.; Lipshitz, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, 75, 3658-3661.

<sup>4</sup> Franklin, R. E.; Gosling, R. G. *Nature* **1953**, 171, 740-741.

<sup>5</sup> Wilkins, M. H.; Stokes, A. R.; Wilson, H. R. *Nature* **1953**, 171, 738-740.

<sup>6</sup> a) Watson, J. D.; Crick, F. H. *Nature*, **1953**, 171, 964-967. b) Watson, J. D.; Crick, F. H. *Nature* **1953**, 171, 737-738.

## Introducción

---

Toda la información hereditaria está recogida en el ADN, mientras que el ARN -que se forma tras el proceso de transcripción de una cadena de ADN- es el responsable de proporcionar la secuencia correcta de aminoácidos en la síntesis de proteínas en un proceso denominado traducción. Los procesos de transcripción, traducción y replicación -es decir, la síntesis de una cadena de ácido nucleico idéntica a la original- constituyen lo que habitualmente se conoce como el dogma central de la Biología Molecular. Inicialmente se creía que sólo se podía replicar el ADN y que la transcripción inversa no tenía lugar. Estos descubrimientos dieron lugar al dogma central de la Biología Molecular modificado (Figura 1).<sup>7</sup>



**Figura 1.** Dogma central de la Biología Molecular modificado.

## 2. NUCLEÓSIDOS MODIFICADOS COMO AGENTES TERAPÉUTICOS

El protagonismo que tienen los ácidos nucleicos en los sistemas biológicos puede aprovecharse con fines médicos. De hecho, los nucleósidos modificados son ampliamente reconocidos como una familia de compuestos con grandes aplicaciones terapéuticas.<sup>8</sup> Los compuestos de este tipo pueden interferir con el ADN o ARN cuya replicación o transcripción se quiere inhibir. El nucleósido, en su forma 5'-trifosforilada, se incorporaría a la cadena creciente interrumpiendo posteriormente el proceso de replicación catalizado por las polimerasas debido a las modificaciones estructurales que presentan respecto a los nucleótidos naturales.

En la búsqueda de análogos de nucleósido como agentes terapéuticos, la Química Orgánica ha servido como herramienta

---

<sup>7</sup> Crick, F. H. *Nature* **1970**, 227, 561-563.

<sup>8</sup> Morris, P. E.; Kamat, V. P. *Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine*; Wiley-VCH, 2008.

para modificar la estructura de la base nitrogenada o el anillo de ribosa respecto a los nucleósidos naturales.

## **2.1. NUCLEÓSIDOS COMO ANTIVIRALES**

### **2.1.1. Virus de inmunodeficiencia humana (VIH)**

Las vacunas han ayudado a controlar diversas enfermedades virales. Sin embargo, el VIH –agente patógeno causante del SIDA– presenta una gran facilidad de mutación, lo que dificulta enormemente encontrar una vacuna efectiva para combatirlo. En la actualidad, existen veinticinco medicamentos que alivian los síntomas y prorrogan la esperanza de vida en personas infectadas por el VIH. Sin embargo, la pandemia está aún lejos de la erradicación. Según las estadísticas de la Organización Mundial de la Salud,<sup>9</sup> en el año 2009, había 33 millones de personas infectadas por el VIH, se produjeron 2,6 millones de nuevas infecciones y 2,8 millones de muertes por SIDA. Además, se estima que en 2015 habrá 60 millones de personas infectadas en todo el mundo. Desafortunadamente, sólo el 28% de los infectados recibe algún tipo de tratamiento.

Para diseñar fármacos eficaces frente al VIH debe entenderse el mecanismo de multiplicación vírica y de este modo encontrar los focos adecuados de actuación. Los retrovirus como el VIH poseen dos copias idénticas de ARN monocatenario. Una vez en el citoplasma de la célula huésped, este ARN se replica de manera inusual para sintetizar ADN de doble cadena. Este proceso está dirigido por **la transcriptasa inversa**. El ADN entra posteriormente en el núcleo de la célula huésped y se transcribe a ARN, empleando la maquinaria biosintética de la célula a la que está infectando. El ARN se traduce dando lugar a largas cadenas peptídicas, que la denominada **proteasa del VIH** corta en cadenas más pequeñas, dando lugar a los componentes proteicos de un nuevo virus. Cada célula infectada es capaz de producir miles de nuevas partículas virales, expandiendo rápidamente la infección por todo el organismo humano (Figura 2).

En el párrafo anterior se encuentran destacadas en negrita las principales enzimas diana en cuya inhibición se centra la terapia

---

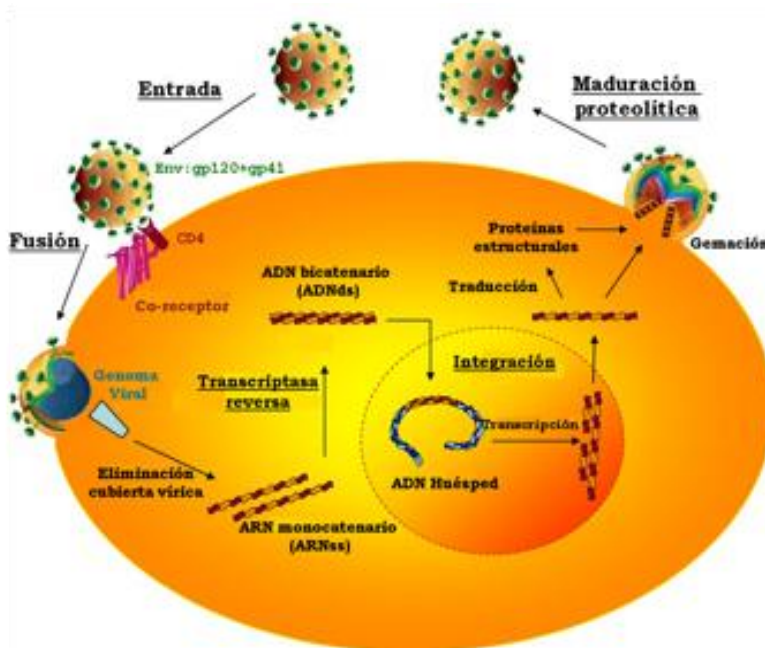
<sup>9</sup> a) [www.who.int/es/](http://www.who.int/es/). b) [www.unaids.org/](http://www.unaids.org/)

## Introducción

---

anti-VIH. Dependiendo de la naturaleza química del fármaco y de la enzima sobre la que actúen, los fármacos anti-VIH se dividen en tres grupos:

- Derivados nucleosídicos inhibidores de la transcriptasa inversa (*Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors*, NRTIs).
- Inhibidores no nucleosídicos de la transcriptasa inversa (*Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors*, NNRTIs).
- Inhibidores de la proteasa (*Protease Inhibitors*, PIs)



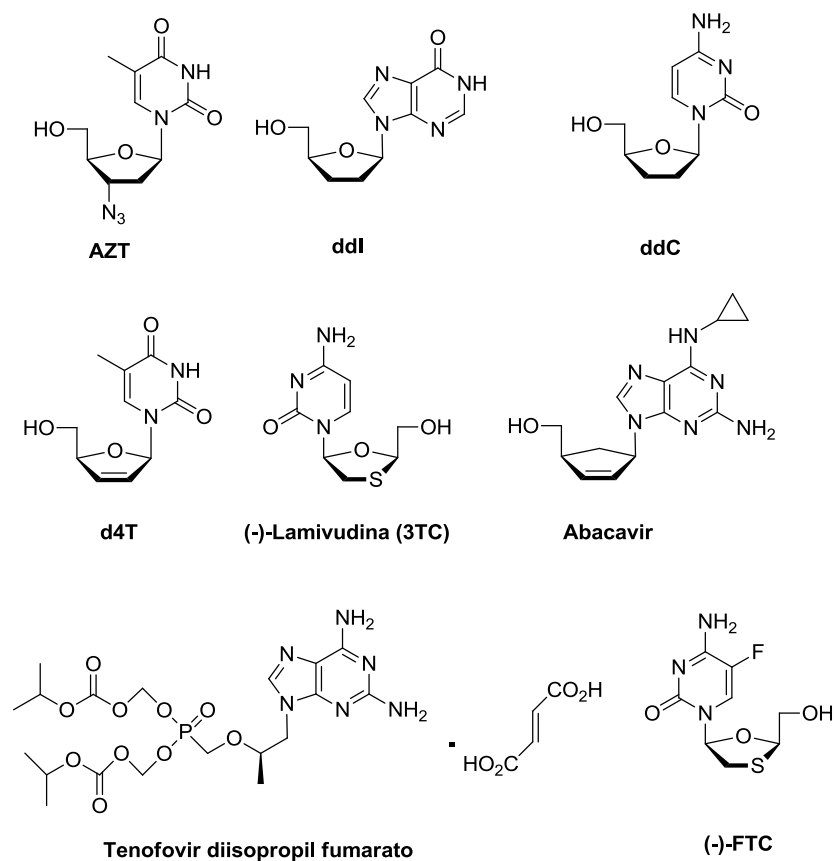
**Figura 2.** Ciclo de replicación del VIH.

La disponibilidad desde 1996 de la terapia antirretroviral altamente activa (*Highly Active Antiretroviral Therapy*, HAART) ha mejorado sustancialmente el tratamiento de las infecciones por VIH. Esta terapia ha conseguido en muchos casos convertir la infección en una enfermedad crónica. Consiste en la combinación de tres fármacos antirretrovirales, dos inhibidores de la transcriptasa inversa y un inhibidor de la proteasa.



## Introducción

Los nucleósidos son una piedra angular en el tratamiento de la infección por VIH.<sup>10</sup> La Figura 3 recoge la estructura de los ocho derivados nucleosídicos inhibidores de la transcriptasa inversa que han sido aprobados por la Agencia del Medicamento de EE.UU. (*Food and Drug Administration*, FDA), para el tratamiento del VIH. El primero en salir al mercado fue la zidovudina (AZT) en 1987.<sup>11</sup> Además, actualmente existen cuatro análogos de nucleósido en ensayos clínicos también como potentes agentes anti-VIH.<sup>12</sup>



**Figura 3.** Análogos de nucleósido aprobados contra el VIH.

<sup>10</sup> De Clercq, E. J. *J. Clin. Virol.* **2004**, *30*, 115-133. b) Warnke, D.; Barreto, J.; Temesgen, Z. *J. Clin. Pharmacol.* **2007**, *47*, 1570-1579.

<sup>11</sup> a) Mitsuya, H.; Weinhold, K.; Furman, P. A.; St. Clair, M. H.; Lehrman, S. N.; Gallo, R. C.; Bolognesi, D.; Barry, D. W.; Broder, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 7096-7100. b) Nakashima, H.; Matsui, T.; Harada, S.; Kobayashi, N.; Matsuda, A.; Ueda, T.; Yamamoto, N. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1986**, *30*, 933-937.

<sup>12</sup> <http://www.avert.org/>

## Introducción

---

Con la excepción del tenofovir, el resto de los análogos mostrados en la Figura 3 son 2',3'-didesoxinucleósidos. El principal mecanismo por el que estos derivados de nucleósidos actúan como potentes agentes anti-VIH implica una interacción previa con las quinasas celulares, que son las enzimas que catalizan su fosforilación a los correspondientes derivados 5'-trifosfatos.<sup>13</sup> Deben ser también sustratos adecuados para la transcriptasa inversa, que carga los nucleósidos fosforilados a la cadena de ADN creciente. Cuando esta enzima incorpora un 2',3'-didesoxinucleósido, la ausencia del hidroxilo en posición 3' impide la elongación de la cadena dando por concluida la síntesis del ADN viral.

Aunque la eficacia de los NRTIs ha quedado ampliamente demostrada, no están exentos de inconvenientes, como su toxicidad –probablemente debida a la facilidad que presentan los 2',3'-didesoxinucleósido fosfato de interactuar con otras enzimas celulares<sup>14</sup>- y la resistencia que presentan algunas cepas del virus a tratamientos con estos fármacos.

### 2.1.2. Virus de la hepatitis B

La hepatitis B es una infección vírica del hígado. Afecta aproximadamente a 2.000 millones de personas y cerca de 350 millones son crónicos. Alrededor de 600.000 personas mueren cada año por consecuencias graves de la hepatitis B como la cirrosis y el cáncer hepático. Desde 1982 existe una vacuna que es eficaz en el 95% de los casos.<sup>9a</sup>

El virus de la hepatitis B (*Hepatitis B Virus, HBV*) presenta un proceso de multiplicación muy parecido al del VIH. No existe un tratamiento específico eficaz para la hepatitis B, pero sí se puede aliviar. Sin embargo, el tratamiento supone un gasto económico muy elevado que no está al alcance de todos los pacientes de los países desarrollados y mucho menos de los no desarrollados.<sup>15</sup>

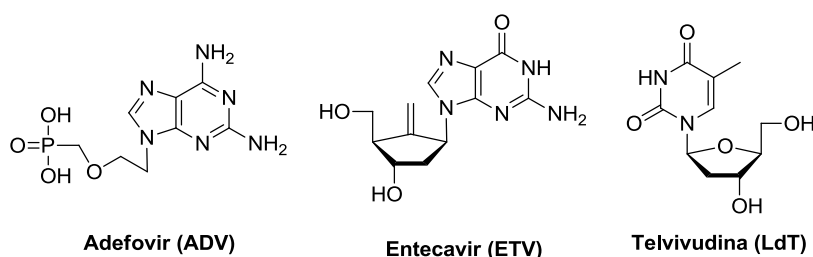
---

<sup>13</sup> a) Arts, R. J.; Wainberg, M. A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1996**, *40*, 527-540. b) Hertzberg, R. P. *Agents Interfering with DNA Enzymes*. In: *Comprehensive Medicinal Chemistry: The Rational Design, Mechanistic Study & Therapeutic Application of Chemical Compounds*, Hansch, C.; Sammes, P. G.; Taylor, J. B., Eds.; Pergamon Press, 1990; Vol. 2, p. 753-789.

<sup>14</sup> Larder, B. A. Darby, G.; Richman, D. *Science* **1989**, *243*, 1731-1734.

<sup>15</sup> Sharon, A.; Chu, C. K. *Antiviral Res.* **2008**, *80*, 339-353.

Existen siete medicamentos aprobados para el tratamiento de la enfermedad: dos tipos de  $\alpha$ -interferón y los derivados de nucleósidos lamivudina, tenofovir (Figura 3), adefovir, entecavir y telvivudina (Figura 4).



**Figura 4.** Fármacos aprobados para el tratamiento de la hepatitis B.

### **2.1.3. Virus de la hepatitis C**

La hepatitis C es también una enfermedad vírica hepática causada por el virus que lleva su nombre. Al año se producen unas 350.000 muertes por enfermedades hepáticas causadas por este virus que afecta en torno al 3,5% de la población.<sup>16</sup> No existe una vacuna para prevenir la infección por el virus de la hepatitis C (*Hepatitis C Virus*, HCV) y, a pesar de que el tratamiento con  $\alpha$ -interferón y un derivado de nucleósido –ribavirina (Figura 5)- pueden curar la enfermedad, un elevado número de pacientes no responden al tratamiento.<sup>17</sup> Esto hace que la búsqueda de antivirales más efectivos para tratar la hepatitis C sea actualmente un campo muy activo.

### **2.1.4. Otros virus**

Los derivados de nucleósidos se emplean también como fármacos frente a otros virus diferentes a los tres expuestos anteriormente. Por ejemplo, el virus del herpes simplex (*Herpes Simplex Virus*, HSV) y el virus de la varicela Zoster (*Varicela Zoster Virus*, VZV) se tratan con aciclovir (Figura 5), un derivado acíclico de la guanósina, mientras el ganciclovir –otro derivado

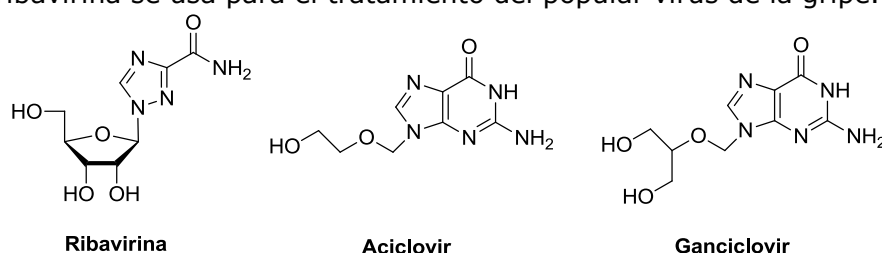
<sup>16</sup> a) Wasley, A.; Alter, M. J. *Semin. Liver Dis.* **2000**, *20*, 1-16. b) Kenny-Walsh, E. *Clin. Liver Dis.* **2001**, *5*, 969-977.

<sup>17</sup> Pierra, C.; Amador, A.; Benzaria, S.; Cretton-Scott, E.; D'Amours, M.; Mao, J.; Mathieu, S.; Moussa, A.; Bridges, E. G.; Standring, D. N.; Sommadossi, J. P.; Storer, R.; Gosselin, G. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6614-6620.

## Introducción

---

acíclico de la guanosina- es efectivo para el tratamiento del citomegalovirus humano (*Human Citomegalovirus*, HCMV). La ribavirina se usa para el tratamiento del popular virus de la gripe.



**Figura 5.** Derivados de nucleósidos utilizados en el tratamiento contra los virus: HCV, VZV, HSV, HCMV y la gripe.

## 2.2. NUCLEÓSIDOS COMO ANTITUMORALES

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad, la segunda en los países desarrollados tras las enfermedades cardiovasculares. Se prevé que a nivel mundial la mortalidad por cáncer aumente un 45% en los próximos 20 años debido, en gran parte, al crecimiento demográfico y envejecimiento de la población. Sin embargo, hoy en día, numerosos tipos de cáncer pueden curarse mediante cirugía, radioterapia o quimioterapia.<sup>9a</sup>

Si los nucleósidos son potentes agentes antivirales, sus aplicaciones como agentes anticancerígenos son también extraordinarias.<sup>18</sup> En la actualidad, existen catorce derivados nucleosídicos y tres bases nitrogenadas modificadas que son fármacos aprobados por la FDA para el tratamiento de diversos tipos de cáncer lo que supone, aproximadamente, en torno al 20% de los fármacos comercializados para tratar esta enfermedad.

El mecanismo de acción de los derivados de nucleósido es bastante similar. Estos compuestos entran en las células - ayudados por los transportadores de membrana-<sup>19</sup> y se transforman en los correspondientes nucleótidos por la acción de diversas quinasas celulares. Posteriormente, inhiben enzimas que intervienen en la síntesis del ADN, dañándolo e induciendo la apoptosis. Sin embargo, aún no se ha explicado cómo compuestos con estructuras tan similares, y que una vez que entran en el

<sup>18</sup> Parker, W. B. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2880-2883.

<sup>19</sup> Zhang, J.; Visser, F.; King, K. M.; Baldwin, S. A.; Young, J. D.; Cass, C. E. *Cancer Metastasis Rev.* **2007**, *6*, 85-110.

organismo comparten las mismas rutas metabólicas, muestran tal diversidad de aplicaciones, siendo activos para determinados tipos de cáncer.<sup>20</sup> El principal inconveniente que tienen estos derivados es que compiten con los nucleósidos naturales, interactuando con enzimas celulares e induciendo su citotoxicidad.

**Tabla 1.** Derivados de nucleósidos utilizados en quimioterapia.

<b>Fármaco</b>	<b>Año de aprobación</b>
<b>Análogos de nucleósido</b>	
Decitabina	2006
Nelarabina	2005
Clofarabina	2004
Vidaza	2004
Capecitabina	1998
Gemcitabina	1996
Cladribina	1992
Fludarabina	1991
Pentostatin	1991
Floxuridina	1970
Citarabina	1969
<b>Bases nitrogenadas</b>	
6-Tioguanina	1966
5-Fluorouracilo	1962
6-mercaptopurina	1953

Una prueba inequívoca de la importancia que tienen los derivados de nucleósidos en la quimioterapia del cáncer son los enormes beneficios económicos que proporcionan a las empresas farmacéuticas. A modo de curiosidad, la gemcitabina (Gemzar, Eli Lilly), fármaco usado en el tratamiento del cáncer de páncreas<sup>21</sup> y el cáncer de mama,<sup>22</sup> presentó en 2011 un beneficio anual de 452 millones de dólares;<sup>23</sup> mientras que el clofarabina (clorar, Genzyme), que se usa para tratar algunas formas de leucemia en niños,<sup>24</sup> proporciona 100 millones de dólares al año en ventas.<sup>25</sup> Actualmente, cuatro derivados de nucleósidos se encuentran en

<sup>20</sup> Sampath, D.; Rao, V. A.; Plunkett, W. *Oncogene* **2003**, *22*, 9063-9074.

<sup>21</sup> Vulfovich, M.; Rocha-Lima, C. *Expert. Rev. Anticancer Ther.* **2008**, *8*, 993-1002.

<sup>22</sup> Silvestris, N.; Cinieri, S.; La Torre, I.; Pezzela, G.; Numico, G.; Orlando, L.; Lorusso, V. *Breast* **2008**, *17*, 220-226.

<sup>23</sup> <http://investor.lilly.com/annuals.cfm>.

<sup>24</sup> a) Bonate, P. L.; Arthaud, L.; Stephenson, K.; Secrist, J.A., III; Weitman, S. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 855-863. b) Faderl, S.; Gandhi, V.; Keating, M.J.;

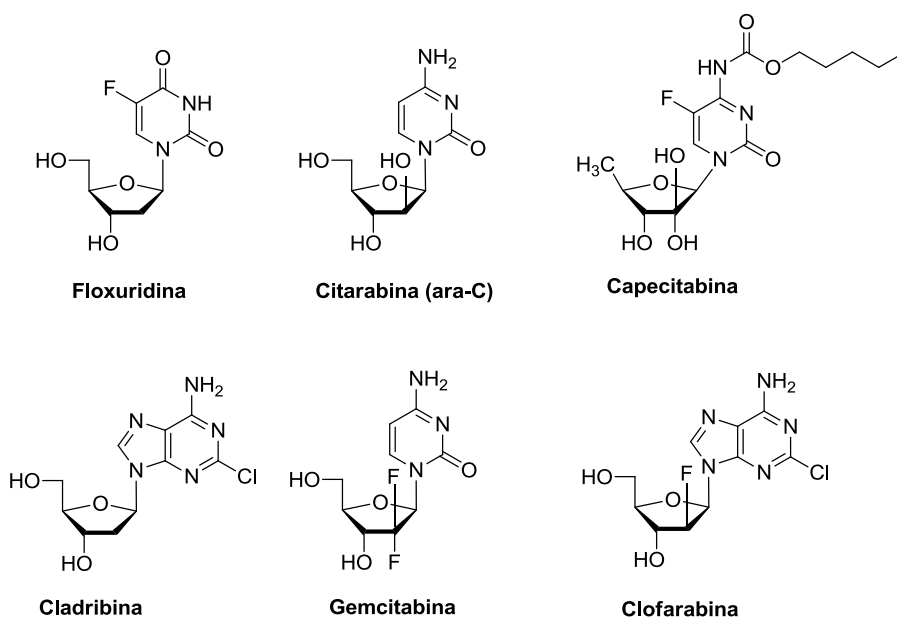
Jeha, S.; Plunkett, W.; Kantarjian, H. M. *Cancer* **2005**, *103*, 1985-1995.

<sup>25</sup> [http://www.genzyme.com/corp/investors/fin\\_fact.asp](http://www.genzyme.com/corp/investors/fin_fact.asp).

## Introducción

---

distintas fases de ensayos clínicos frente a diferentes tipos de cáncer (Figura 6).<sup>18</sup>



**Figura 6.** Estructura de algunos nucleósidos aprobados para el tratamiento del cáncer.

## 3. INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

La medicina actual no ha encontrado soluciones para enfermedades de alta incidencia entre la población como el Alzheimer, la esclerosis o la esquizofrenia, entre otras. Debido a que la mayoría de los fármacos que actualmente se encuentran en el mercado actúan sobre las proteínas, parece lógico pensar que el tratamiento de alguna de estas enfermedades podría abordarse de una forma distinta, esto es, impidiendo que se formen estas proteínas que causan la enfermedad. En este sentido, la **terapia génica** podría ser una nueva forma de combatir ciertas enfermedades. Se basa en la identificación de los genes o proteínas responsables de una determinada enfermedad y consiste en la transferencia de oligonucleótidos sintéticos (de ADN o ARN) a la célula con fines terapéuticos. Generalmente, se busca la inhibición de la expresión de un gen con efectos patológicos, es decir, capaz de desarrollar tras su traducción a la proteína una enfermedad. Estas técnicas se las denomina de silenciamiento de genes.

La llamada tecnología *antisense* actúa a nivel post-transcripcional, es decir, a nivel del ARNm, impidiendo que se exprese y consiguiendo que la proteína a la que da lugar no se sintetice. Esto se consigue mediante el empleo de oligonucleótidos modificados, que tras la hibridación con el ARNm diana impiden la traducción.<sup>26</sup> La terapia génica se ha convertido en una de las nuevas áreas del desarrollo farmacéutico, dando lugar a fármacos que son más selectivos y menos tóxicos que los habituales. El principal inconveniente que tiene esta nueva forma de afrontar el tratamiento de enfermedades es que se necesita conocer la secuencia del ARNm cuya expresión se desea inhibir. Se han desarrollado diversas técnicas para inhibir la expresión génica que se comentan brevemente a continuación.

**a) Oligonucleótidos *antisense*.** Son pequeños fragmentos de nucleótidos sintéticos –los naturales no son válidos porque serían degradados por las nucleasas– de unos 15 o 20 pares de bases de ADN o ARN de cadena sencilla, que son complementarios a un fragmento del ARNm diana. Esta complementariedad permite su unión al ARNm de forma específica, bloqueando su expresión e impidiendo la producción de la proteína diana. Tienen dos formas de actuación. La primera es por bloqueo estérico del ARNm (Figura 7) y la segunda es por activación de la enzima Ribonucleasa H (RNasa H) presente en las células, que rompe específicamente la cadena de ARNm en el dúplex que forma con el oligonucleótido *antisense*. En ambos casos es determinante que el oligonucleótido *antisense* tenga gran afinidad por el ARNm al que se quiere capturar.

El primer oligonucleótido *antisense* que se ha utilizado como fármaco es el **Vitravene**, desarrollado por la empresa ISIS Pharmaceuticals (Carlsbad, California, EE.UU.) y aprobado en 1998 para combatir la retinitis producida por el HCMV. Actualmente, muchos otros oligonucleótidos se encuentran en distintas fases de ensayos clínicos frente al SIDA, asma, artritis, psoriasis, etc.<sup>27</sup>

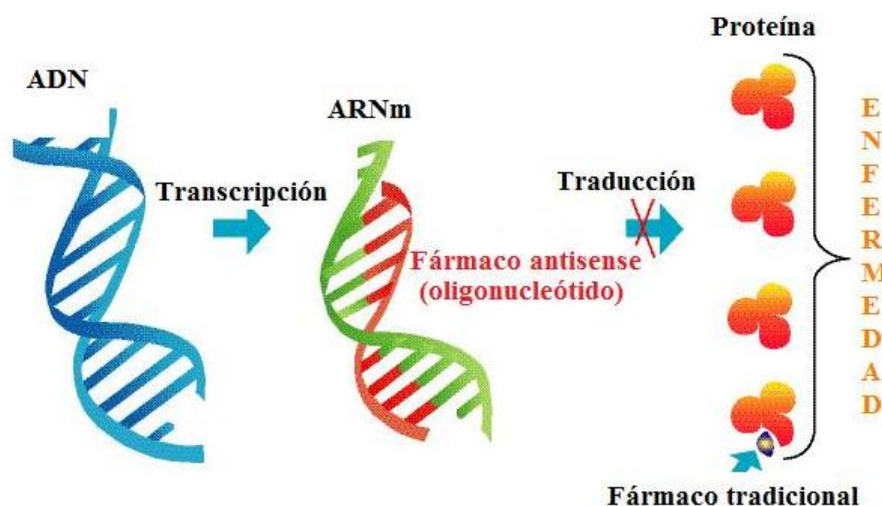
---

<sup>26</sup> *Therapeutic Oligonucleotides*; Kurreck, J. Ed.; RSC Publishing: Cambridge, 2008.

<sup>27</sup> a) Chan, J. H.; Lim, S.; Wong, W. F. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2006**, *33*, 533. b) Dean, N. M.; Bennett, C. F. *Oncogene* **2003**, *22*, 9087-9096. c) Fichou, Y.; Ferec, C. *Trends Biotechnol.* **2006**, *24*, 563-570. d) Rayburn, E. R.; Zhang, R. *Drug Discovery Today* **2008**, *13*, 513-521. e) Van Aerschot, A. *Antiviral Res.* **2006**, *71*, 307-316. g) Zhang, Y. C.; Taylor, M. M.; Samson, W. K.; Phillips, M. I. *Antisense Therapeutics*; Humana Press: Totowa, 2005; p 11.

## Introducción

---



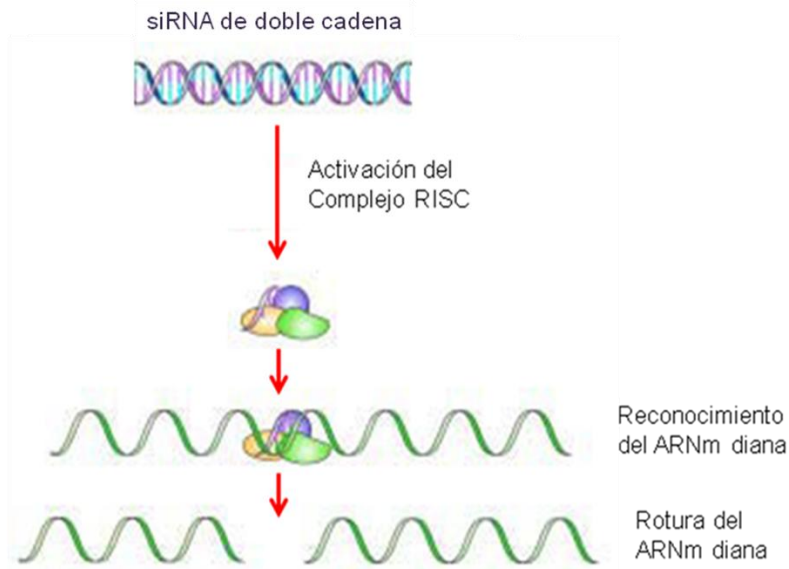
**Figura 7.** Mecanismo de acción por bloqueo de los oligonucleótidos *antisense*.

**b) ARN de interferencia (Short Interfering RNA, siRNA).** Es una técnica más reciente que la de los oligonucleótidos *antisense*.<sup>28</sup> Se basa en la introducción en la célula de pequeños fragmentos de ARN de doble cadena para bloquear la expresión de genes específicos. Son capaces de interactuar con el complejo silenciador inducido por ARN (*RNA Induced Silencing Complex, RISC*). Este complejo desune las dos cadenas de ARN, permitiendo a la cadena *antisense* hibridarse con la cadena de ARNm objetivo. Posteriormente, hidroliza selectivamente el ARNm rompiéndolo e impidiendo de este modo que se traduzca en la proteína (Figura 8).<sup>29</sup>

<sup>28</sup> Elbashir, S. M.; Harborth, J.; Lendeckel, W.; Yalcin, A.; Weber, K.; Tuschl, T. *Nature* **2001**, 411, 494-498.

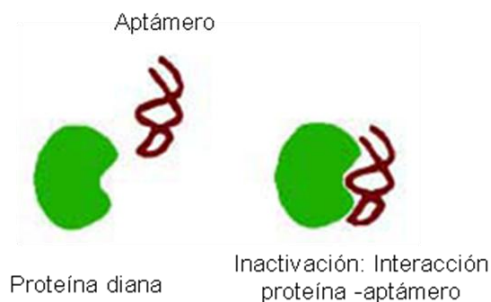
<sup>29</sup> a) Bumcrot, D.; Manoharan, M.; Koteliansky, V.; Sah, D. W. Y. *Nat. Chem. Biol.* **2006**, 2, 711-719. b) Gaither, A.; Iourgenko, V. *Curr. Opin. Oncol.* **2007**, 19, 50-54. c) de Fougères, A.; Vornlocher, H. P.; Maraganore, J.; Lieberman, J. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2007**, 6, 443-453.





**Figura 8.** Mecanismo de acción de los siRNA.

**c) Oligonucleótidos aptámeros.** Son también oligonucleótidos artificiales. Sin embargo, en lugar de unirse al ARNm, como en los casos anteriores, son capaces de unirse directamente a las proteínas causando su inactivación (Figura 9). En el año 2004 fue aprobado por la FDA un oligonucleótido aptámero (Macugen) para el tratamiento de una enfermedad degenerativa ocular.<sup>30</sup>



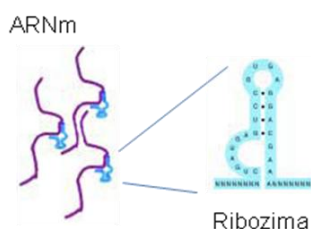
**Figura 9.** Inactivación de proteínas mediante aptámeros.

<sup>30</sup> a) Proske, D.; Blank, M.; Resch, A. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, 69, 367-374. b) Yan, A. C.; Levy, M. *RNA Biol.* **2009**, 6, 316-320.

## Introducción

---

**d) Ribozimas.** Son pequeñas moléculas de ARN con estructura tridimensional que actúan como enzimas y pueden cortar otras moléculas de ARN en sitios específicos. Poseen dos regiones clave. Una región se asocia a la secuencia objetivo del ARNm y la otra es responsable del corte en este sitio (Figura 10). Si se dirigen a los ARNm que codifican proteínas con papeles patológicos en el cáncer, las ribozimas pueden retardar o inhibir el crecimiento canceroso.<sup>31</sup>



**Figura 10.** Ribozima cortando el ARNm diana.

## 4. PREPARACIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS CON FINALIDAD TERAPÉUTICA

### 4.1. MODIFICACIONES EN LOS OLIGONUCLEÓTIDOS

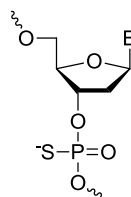
Como se ha comentado en el apartado anterior, los oligonucleótidos naturales son degradados por las nucleasas celulares en condiciones fisiológicas antes de que puedan desempeñar su papel en la inhibición de la expresión génica. Consecuentemente, se han introducido modificaciones en los oligonucleótidos para aumentar su estabilidad sin perder la afinidad por el ARNm. Esto ha dado lugar a tres generaciones de oligonucleótidos que se detallan a continuación.

**a) Oligonucleótidos de primera generación.** La primera generación de oligonucleótidos *antisense* son los oligonucleótidos fosforotioatos,<sup>32</sup> que están formados por unión de nucleótidos en los que el átomo de oxígeno que no forma parte del puente internucleotídico ha sido sustituido por un átomo de azufre (Figura 11). Han mostrado actividad en el tratamiento de varias

<sup>31</sup> Chatterton, J. E.; Hu, X.; Wong-Staal, F. *Drug. Discov. Today*. **2004**, *3*, 10-17.

<sup>32</sup> Stein, C.; Cohen, J. *Oligodeoxynucleotides: Antisense Inhibitors of Gene Expression*; Cohen, J., Ed.; CRC Press: Boca Raton, 1989; pp. 94-117.

enfermedades. De hecho, el Vitravene, mencionado anteriormente para el tratamiento de la retinitis, es un ejemplo de oligonucleótido de primera generación.



**Figura 11.** Estructura general de los oligonucleótidos de primera generación (fosforotioatos).

Como principales ventajas de este primer tipo de oligonucleótidos pueden citarse su resistencia a la degradación por parte de las nucleasas celulares, la alta capacidad para activar la RNasa H y su fácil método de síntesis. Sin embargo, tienen como principales desventajas la formación de diastereoisómeros, debido a la presencia de un átomo de fósforo quiral en el puente internucleotídico, la pérdida de afinidad en la hibridación con el ARN que se quiere hibridar y la baja capacidad para suministrarse vía oral.

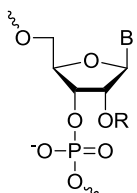
**b) Oligonucleótidos de segunda generación.** Con el fin de subsanar las desventajas de la primera generación de oligonucleótidos, se han diseñado los 2'-O-alkiloligonucleótidos (Figura 12).<sup>33</sup> Se mejora la afinidad hacia el ARN objetivo y la adsorción celular. Además, la presencia de un sustituyente alcóxido en la posición 2' hace que estos oligonucleótidos sean muy estables frente a las nucleasas celulares. Esta resistencia probablemente sea debida a que la presencia de estos grupos voluminosos impide el ataque de las nucleasas a los grupos fosfato.

La principal desventaja de estos oligonucleótidos es el alto coste de su síntesis debido a la dificultad de preparación de los monómeros precursores (2'-O-alkilribonucleósidos).

<sup>33</sup> a) Grotti, M.; Douglas, M.; Eritja, R.; Sproat, B. S. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 5899-5914. b). Altmann, K. H.; Martin, P.; Dean, N. M.; Monia, B. P. *Nucleosides Nucleotides* **1997**, *16*, 917-926. c) Martin, P. *Helv. Chim. Acta* **1995**, *78*, 486-504.

## Introducción

---



R= Me  
R= CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub> (MOE)

**Figura 12.** Estructura general de los oligonucleótidos de segunda generación (2'-O-alkiloligonucleótidos).

**c) Oligonucleótidos de tercera generación.** Incluyen una gran variedad de tipos de oligonucleótidos de ARN y ADN. Algunos ejemplos se muestran en la Figura 13: ácidos nucleicos peptídicos (*Peptide Nucleic Acid*, PNA),<sup>34</sup> morfolino-fosforamiditos,<sup>35</sup> ácidos nucleicos conformacionalmente restringidos (*Locked Nucleic Acid*, LNA)<sup>36</sup> y ácidos nucleicos formados por nucleótidos que presentan un átomo de flúor en la posición 2' (*2'-Fluoro-Arabino Nucleic Acid*, FANA).<sup>37</sup>

Los PNAs y LNAs tienen baja capacidad para activar la enzima RNasa H que corta el ARNm objetivo, pero tienen gran afinidad por él, actuando según el mecanismo de bloqueo e impidiendo la traducción. Los FANA presentan una buena afinidad por el ARNm y también activan la RNasa H.

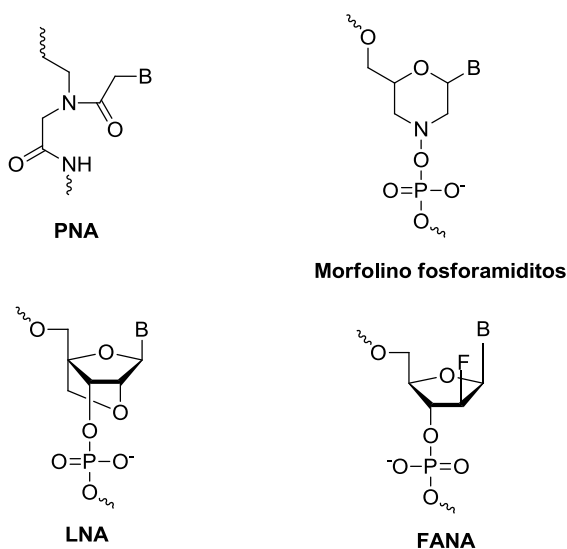
---

<sup>34</sup> a) Elayadi, A.; Corey, D. *Curr. Opin. Investigational Drugs* **2001**, *2*, 558-561. b) Nielsen, P. *Mol. Biotechnol.* **2004**, *26*, 233-248.

<sup>35</sup> a) Heasman, J. *Dev. Biol.* **2002**, *243*, 209-214. b) Summerton, J. *Biochim. Biophys. Acta, Gene Struct. Expression* **1999**, *1489*, 141-158.

<sup>36</sup> a) Braasch, D. A.; Corey, D. R. *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 1-7. b) Crinelli, R.; Bianchi, M.; Gentilini, L.; Palma, L.; Magnani, M. *Curr. Drug Targets* **2004**, *5*, 745-752. c) Zhou, C.; Chattopadhyaya, J. *Curr. Op. Drug. Discov.* **2009**, *12*, 876-898. d) Campbell, M. A.; Wengel, J. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5680-5689. e) Hughesman, C. B.; Turner, R. F. B.; Haynes, C. A.; *Biochemistry* **2011**, *50*, 5354-5368.

<sup>37</sup> a) Damha, M. J.; Wilds, C.J.; Noronha, A.; Brukner, I.; Borkow, G.; Arion, D.; Parniak, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 12976-12977. b) Wilds, J. C.; Damha M. J. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 3625-3635.



**Figura 13.** Estructura básica de algunos oligonucleótidos de tercera generación.

## 4.2. MÉTODOS DE SÍNTESIS DE OLIGONUCLEÓTIDOS

La formación de los enlaces internucleotídicos puede llevarse a cabo en fase sólida o en disolución.<sup>38</sup> El método más empleado actualmente para la síntesis de oligonucleótidos en fase sólida es el del fosforamidito,<sup>39</sup> mientras que en disolución es el del H-fosfonato.<sup>40</sup>

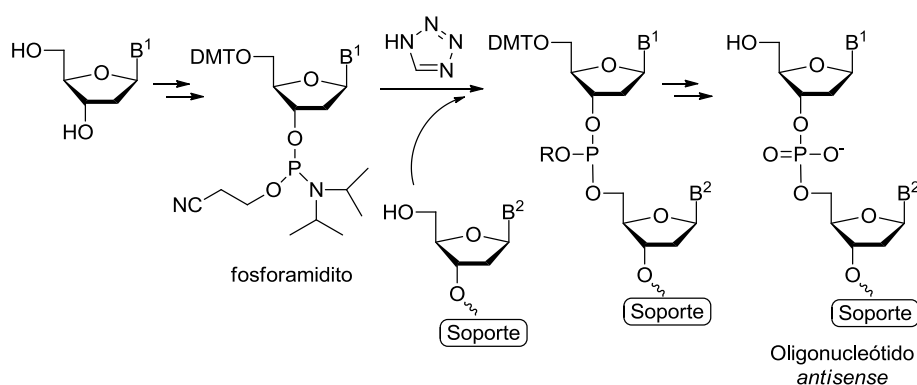
**a) Síntesis de oligonucleótidos en fase sólida.** El método del fosforamidito consiste en el acoplamiento de un nucleósido 5'-O-(4,4-dimetoxitritil)-3-fosforamidito, que se encuentra en disolución, con otro nucleósido que tiene la posición 5' libre pero que está anclado a un soporte sólido por su posición 3'. Posteriormente, se oxidaría el fosfito triéster y se desprotegería el grupo en la posición 5' para repetir el ciclo y así seguir alargando la cadena. La principal limitación de este método es el alto precio de los amiditos y del soporte sólido (Esquema 1).

<sup>38</sup> Reese, C. B. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 3851-3868.

<sup>39</sup> Beauge, S. L.; Caruthers, M. H. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 1859-1862.

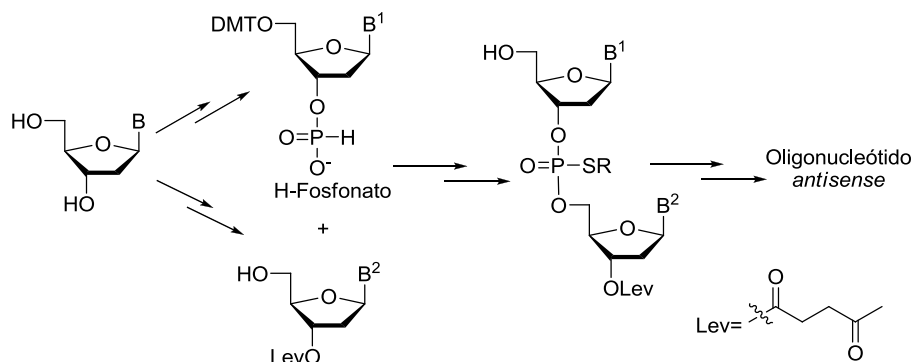
<sup>40</sup> a) Reese, C. B.; Song, Q. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 2787-2792. b) Reese, C. B.; Song, Q. *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 963-971.

## Introducción



**Esquema 1.** Método del fosforamidito para la síntesis de oligonucleótidos.

**b) Síntesis de oligonucleótidos en disolución.** Debido a las limitaciones económicas que supone la síntesis de oligonucleótidos en fase sólida, se han desarrollado métodos de síntesis en disolución. En este sentido, Reese describe en 1997 el método del H-fosfonato (Esquema 2).



**Esquema 2.** Método del H-fosfonato para la síntesis de oligonucleótidos.

Esta metodología está basada en una reacción de acoplamiento entre un nucleósido protegido en la posición 5' con el grupo dimetoxitritilo (DMT) y en posición 3' con un grupo H-fosfonato, y otro nucleósido que ha sido protegido en la posición 3' con el grupo levulinilo. De esta manera, se obtendrá un dinucleótido H-fosfonato que tras sustitución formal del átomo de hidrógeno por un sulfuro, mediante un reactivo de transferencia de azufre, y desprotección del grupo DMT permitiría seguir alargando la cadena.

---

## 5. BIOCATÁLISIS: EMPLEO DE ENZIMAS EN SÍNTESIS ORGÁNICA

### 5.1. BREVE INTRODUCCIÓN

Las enzimas son proteínas que catalizan las reacciones que tienen lugar en los organismos vivos, donde presentan una alta especificidad de sustrato, siendo la función que desempeñan altamente dependiente de su conformación. Sin embargo, los químicos han sabido extrapolar la alta eficiencia catalítica que presentan las enzimas con sus sustratos y medios habituales a la síntesis orgánica, dando lugar a la biocatálisis.

El uso de las enzimas o biocatalizadores en Química Orgánica ha experimentado un gran auge. En los últimos cincuenta años, han pasado de ser interesantes sólo desde un punto de vista académico a ser utilizados hoy en día en el mundo de la industria química.<sup>41</sup> Este éxito ha sido debido, en gran parte, a la tendencia actual hacia una química más sostenible que disminuya la cantidad y toxicidad de los residuos respecto a los métodos de producción tradicionales.<sup>42</sup> Las enzimas son capaces de acelerar las reacciones químicas e inducir quiralidad en procesos de bajo impacto ambiental al ser biodegradables y, por tanto, no contaminantes. En la medida de lo posible, el uso de enzimas en lugar de catalizadores químicos convencionales –por ejemplo, los metálicos– es especialmente recomendable en la industria farmacéutica, puesto que es crucial que un fármaco no contenga restos de metales –deben ser inferiores a 10 ppm–, lo que a veces no es fácil de conseguir si en la ruta sintética del fármaco se ha empleado en alguna etapa un catalizador metálico.<sup>43</sup>

Actualmente, se conocen más de 3.000 enzimas y cientos son asequibles comercialmente. Atendiendo al tipo de reacción natural que catalizan, las enzimas se pueden clasificar en seis grupos (Tabla 2).

---

<sup>41</sup> Wenda, S.; Illner, S.; Mell, A.; Kragl, U. *Green Chem.* **2011**, *13*, 3007-3047.

<sup>42</sup> Sheldon, R. en *Green Chemistry in the Pharmaceutical Industry*; Dunn, P. J.; Wells, A.; Williams, M. T., Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, 2010; pp. 1-18.

<sup>43</sup> Blacker, J.; Martin J. en *Asymmetric Catalysis on Industrial Scale*; Blaser, H. U.; Schmidt, E., Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, 2004; pp. 201-216.

## Introducción

---

**Tabla 2.** Tipos de enzimas y procesos que catalizan

Tipo de enzima	Reacción que cataliza
Oxidorreductasas	Reacciones rédox
Transferasas	Transferencia de grupos
Hidrolasas	Hidrólisis de ésteres
Liasas	Adición a dobles enlaces
Isomerasas	Isomerización de olefinas, racemización
Ligasas	Formación de enlaces

Cabe destacar que las enzimas presentan tres tipos de selectividades que pueden ser explotadas en función del tipo de sustrato estudiado, lo que las hace especialmente útiles en síntesis orgánica.

**a) Quimioselectividad:** Es la capacidad que tienen las enzimas de actuar solamente sobre uno de los diferentes grupos funcionales presentes en la molécula. De esta forma, por ejemplo, se ha conseguido acilar enzimáticamente un alcohol en presencia de una amina.<sup>44</sup>

**b) Regioselectividad:** Las enzimas pueden diferenciar entre varios grupos funcionales químicamente iguales presentes en un compuesto y realizar una transformación sobre uno de ellos.<sup>45</sup>

**c) Enantioselectividad:** Quizás la más preciada. Las enzimas pueden discriminar entre los dos enantiómeros de una mezcla racémica, consiguiendo que sólo uno de ellos reaccione o que reaccionen de manera diferente.<sup>46</sup>

Las enzimas con más aplicaciones en Química Orgánica son las lipasas –pertenecientes al grupo de las hidrolasas–, que tienen como función natural la hidrólisis de triglicéridos. Inicialmente se pensaba que estas enzimas sólo podían actuar en medios acuosos, puesto que este es su medio natural. Sin embargo, en 1985 Klivanov descubrió que podían ser también activas en medios orgánicos.<sup>47</sup> De este modo, el agua puede ser reemplazada por

---

<sup>44</sup> Chinsky, N.; Margolin, A. L.; Klivanov, A. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 386-388.

<sup>45</sup> Ferrero, M.; Gotor, V. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4319-4347.

<sup>46</sup> a) Gotor, V.; Alfonso, I.; García-Urdiales, E. *Asymmetric Organic Synthesis with Enzymes*; Wiley-VCH: Weinheim, 2008. b) Fessner, W.-D.; Anthonsen, T. *Modern Biocatalysis. Stereoselective and Environmentally Friendly Reactions*; Wiley-VCH: Weinheim, 2009.

<sup>47</sup> Kirchner, G.; Scollar, M. P.; Klivanov, A. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 7072-7076.



otros nucleófilos como alcoholes, aminas, amoniaco, hidracinas, perácidos y tioles, lo que permite la preparación de un gran número de compuestos orgánicos. Este hallazgo aumentó la versatilidad de las lipasas y supuso el verdadero lanzamiento de la biocatálisis como método utilizado en síntesis orgánica.<sup>48</sup>

## **5.2. RESOLUCIONES ENZIMÁTICAS**

Son los múltiples centros estereogénicos que poseen las enzimas los que hacen que los procesos biocatalíticos puedan ser altamente enantioselectivos. Podemos distinguir tres tipos de resoluciones:

**a) Resolución cinética.** Las enzimas pueden catalizar preferentemente la reacción sobre uno de los enantiómeros de una mezcla racémica dando lugar a una resolución cinética. La primera fue llevada a cabo por Pasteur en 1858 y consistió en la resolución del ácido tartárico mediante su fermentación empleando una levadura.<sup>49</sup>

En el caso ideal de una resolución cinética la diferencia entre las velocidades de reacción de los enantiómeros de una mezcla racémica es tan grande que uno de ellos reacciona muy rápidamente para dar el producto correspondiente, mientras que el otro enantiómero no reacciona, pudiéndose recuperar intacto al final del proceso (Figura 14a).

**b) Resolución cinética dinámica.** La mayor limitación de las resoluciones cinéticas (rendimiento teórico máximo del 50%) puede subsanarse si la resolución cinética se combina con una racemización de los enantiómeros que constituyen la mezcla racémica de partida. Así, como el enantiómero que no reacciona puede transformarse en el preferido por la enzima mediante una racemización, puede llegar a obtenerse el producto enantiopuro con un rendimiento teórico del 100%. Este proceso recibe el nombre de resolución cinética dinámica y fue aplicado por primera vez en 1997 por Stürmer combinando enzimas y metales de transición para llevar a cabo la racemización (Figura 14b).<sup>50</sup>

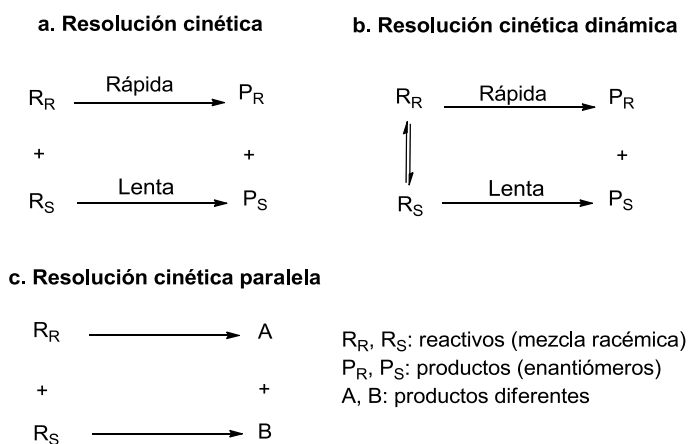
---

<sup>48</sup> Para revisiones de lipasas en síntesis orgánica, ver: a) Ghanem, A. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 1721-1754. b) Hudlicky, T.; Reed, J. W. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 3117-3132.

<sup>49</sup> Pasteur, M. L.; Hebd, C. R. *Séance Acad. Sci. Paris* **1858**, *46*, 615-618.

<sup>50</sup> Stürmer, R. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1173-1174.

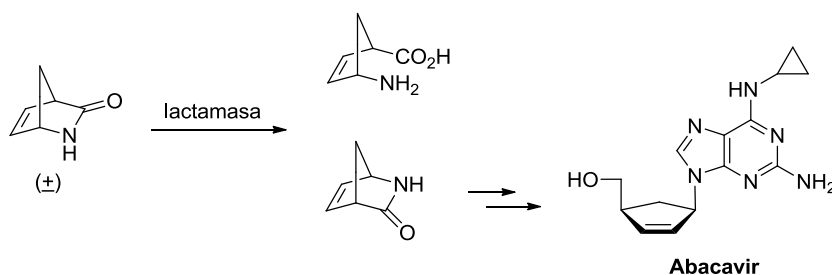
## Introducción



**Figura 14.** Diferentes tipos de resoluciones cinéticas.

**c) Resolución cinética paralela.** En este tipo de resolución cinética, la enzima cataliza la reacción de ambos enantiómeros pero lo hace con diferente regio- y/o quimioselectividad. Como consecuencia, los enantiómeros se transforman en productos con estructuras bien diferenciadas (Figura 14c).

Como ejemplo de la utilidad de los biocatalizadores en la industria farmacéutica y dentro del campo de la preparación de derivados de nucleósidos –objeto de esta memoria–, la compañía Downpharma prepara a escala de toneladas el potente agente anti-VIH abacavir (Figura 3) empleando una lactamasa -del grupo de las hidrolasas- para llevar a cabo una resolución cinética en una de las etapas del proceso de síntesis (Esquema 3).<sup>51</sup>



**Esquema 3.** Síntesis industrial del abacavir por Downpharma.

<sup>51</sup> Taylor, S. J.; Brown, R. C.; Keene, P. A.; Taylor, I. N. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 2163–2168.

### 5.3. NUEVAS TENDENCIAS DE LA BIOCATÁLISIS

Aunque las aplicaciones de los biocatalizadores para la preparación de productos de alto valor añadido continúa siendo un área muy activa, recientemente se han abierto nuevas líneas de investigación que se comentan brevemente a continuación.

**a) Modelización molecular.** Tradicionalmente, la predicción de los resultados de las reacciones enzimáticas se hacía mediante sencillas reglas empíricas. Por ejemplo, para determinar la preferencia quiral de las lipasas, la regla de Kazlauskas predice con bastante fiabilidad qué enantiómero de una mezcla racémica reacciona basándose en el tamaño de los sustituyentes unidos al centro estereogénico que se pretende resolver.<sup>52</sup>

Sin embargo, hoy día se conocen las estructuras tridimensionales de muchos biocatalizadores, lo que permite mediante programas informáticos de modelización molecular<sup>53</sup> predecir y justificar cualitativamente el resultado de una reacción enzimática en términos de enantio-, regio- y quimioselectividad. Hasta ahora, la mayoría de las modelizaciones se han llevado a cabo sobre lipasas y proteasas, pero se están empezando a conocer las estructuras tridimensionales de otros biocatalizadores, principalmente oxidorreductasas.

**b) Promiscuidad catalítica.** Se denomina así a la capacidad de una determinada enzima de catalizar otras reacciones diferentes a la natural. Desde el descubrimiento, en el año 2001, de que la lipasa de *Candida antarctica* B (CAL-B), cuya actividad natural es la hidrólisis de ésteres, cataliza la reacción aldólica para formar enlaces C-C,<sup>54</sup> ha habido un interés creciente en encontrar nuevos tipos de comportamiento promiscuo en lipasas y otros biocatalizadores.

**c) Evolución dirigida.** En muchas ocasiones, determinados sustratos no son aceptados por el centro activo de los biocatalizadores. Con los avances alcanzados en Biología Molecular, esto podría solucionarse mediante evolución dirigida, es decir, introduciendo algunos cambios en la secuencia de

<sup>52</sup> a) Kazlauskas, R. J.; Weissfloch, N. E.; Rappaport, A. T.; Cuccia, L. A. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2656-2665. b) Ahmed, S. N.; Kazlauskas, R. J.; Morinville, A. H.; Grochulski, P.; Schrag, J. D.; Cygler, M. *Biocatalysis* **1994**, *9*, 209-225.

<sup>53</sup> a) Kazlauskas, R. J. *Science* **2001**, *293*, 2277-2279. b) Kazlauskas, R. J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 81-88.

<sup>54</sup> Branneby, C.; Carlqvist, P.; Magnusson, A.; Hult, K.; Brinck, T.; Berglund, P. J. *Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 4354-4355.

## **Introducción**

---

aminoácidos del biocatalizador.<sup>55</sup> También pueden introducirse mutaciones para mejorar la enantioselectividad de las reacciones enzimáticas.<sup>56</sup> De este modo, puede ampliarse el rango de sustratos aceptados por el biocatalizador. Sin embargo, su aplicación en la industria aún no ha sido abordada debido a la dificultad de escalado de estos procesos.

---

<sup>55</sup> *Protein Engineering Handbook*; Lutz, S.; Bornscheuer, U. T., Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, 2009.

<sup>56</sup> Reetz, M. T.; Puls, M.; Carballeira, J. D.; Vogel, A.; Jaeger, K. -E.; Eggert, T.; Thiel, W.; Bocola, M.; Otte, N. *ChemBioChem* **2007**, *8*, 106-112.

# **CAPÍTULO 1**

**SEPARACIÓN DE 2'/3'-O-METILADENOSINA  
MEDIANTE CATÁLISIS ENZIMÁTICA.  
APLICACIÓN A LA SÍNTESIS A GRAN ESCALA  
DE 2'-O-METILADENOSINA**



## **1.1. ANTECEDENTES**

En los últimos años, varios oligonucleótidos se encuentran en ensayos clínicos como agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades virales, infecciosas o relacionadas con el cáncer.<sup>57</sup> Entre ellos, los 2'-*O*-metilribonucleótidos han sido ampliamente estudiados como una segunda generación de análogos que presentan una mayor resistencia a las nucleasas, mejor absorción celular y mayor afinidad por el ARN objetivo.<sup>58</sup> Además, los metilribonucleótidos tienen aplicaciones en el estudio del *splicing* del pre-ARNm, en el examen de las estructuras de los espliceosomas y en la preparación de ribozimas resistentes a las nucleasas.<sup>59</sup> Los 2'-*O*-alquilribonucleótidos también están presentes en el ARN como componentes minoritarios.<sup>60</sup>

---

<sup>57</sup> a) Sohail, M. *Drug Discov. Today* **2001**, *6*, 1260–1261; b) Dean, N. M. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2001**, *12*, 622–625; c) Crooke, S. T. *Oncogene* **2000**, *19*, 6651–6659; d) Green, D. W.; Roh, H.; Pippin, J.; Drebin, J. A. *J. Am. Coll. Surg.* **2000**, *191*, 93–105; e) Koller, E.; Gaarde, W. A.; Monia, B. P. *Trends Pharmacol. Sci.* **2000**, *21*, 142–148; f) Sanghvi, Y. S. in *Comprehensive Natural Products Chemistry* (Eds.: Barton, D. H. R.; Nakanishi, K.), vol. 7 (Ed.: Kool, E. T.): *DNA and Aspects of Molecular Biology*, Pergamon Press, New York, **1999**, p. 285.

<sup>58</sup> *Antisense Drug Technology Principles: Strategies and Applications* (Ed.: Crooke, S. T.), Marcel Dekker, New York, **2001**.

<sup>59</sup> a) Beigelman, L.; McSwiggen, J. A.; Draper, K. G.; Gonzalez, C.; Jensen, K.; Karpeisky, A. M.; Modak, A. S.; Matulic-Admic, J.; DiRenzo, A. B.; Haerberli, P.; Sweedler, D.; Tracz, D.; Grimm, S.; Wincott, F. E.; Thackray, V. G.; Usman, N. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 25702–25708; b) Lamond, A. I.; Sproat, B. S.; Rider, U. *Cell* **1989**, *58*, 383–390; c) Blencowe, B. J.; Sproat, B. S.; Rider, U.; Barbino, S.; Lamond, A. I. *Cell* **1989**, *59*, 531–539.

<sup>60</sup> Hall, R. H. in: *The Modified Nucleosides in Nucleic Acids*, Columbia University Press, New York, **1971**.

## Antecedentes

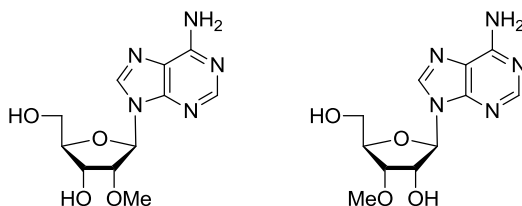
---

### 1.1.1. SÍNTESIS DE 2'-O-METILRIBONUCLEÓSIDOS

La importancia de los metilribonucleótidos, que constituyen una porción significativa del coste de los materiales de partida en la preparación de los oligonucleótidos, ha estimulado el desarrollo de estrategias sintéticas de 2'-O-metilnucleósidos, precursores claves en la síntesis de metilribonucleótidos.

Aunque se han desarrollado metodologías satisfactorias para la preparación 2'-O-metilnucleósidos con bases pirimidínicas,<sup>61</sup> la obtención de los mismos derivados con bases púricas es más complicado, debido a que la alquilación es menos selectiva hacia la posición buscada. La presencia de otros dos grupos funcionales hidroxilo en las posiciones 3' y 5', junto con el grupo amino exocíclico en las bases púricas, dificulta la metilación selectiva de los nucleósidos en la posición 2'. En la bibliografía se encuentran descritos numerosos métodos encaminados hacia la síntesis de 2'-O-metiladenosina.<sup>62</sup>

**a) Metilación directa de la adenosina.** En 1965 Broom y Robins publicaron la primera síntesis de 2'-O-metiladenosina. El método consiste en la metilación directa de la adenosina con diazometano.<sup>63</sup> Otro ejemplo de alquilación directa se describió años más tarde utilizando NaH como base y MeI como agente de alquilación.<sup>64</sup> En los procesos de alquilación directa siempre se forman mezclas de los isómeros 2'/3'-O-metiladenosina (Figura 15) e incluso productos derivados de la alquilación del grupo amino de la base nitrogenada. Además, la toxicidad de los agentes de metilación es incompatible con su aplicación a gran escala.



**Figura 15.** Estructuras de 2'-O-metiladenosina y 3'-O-metiladenosina.

<sup>61</sup> Roy, S. K.; Tang, J. *Org. Proc. Res. Dev.* **2000**, *4*, 170-171.

<sup>62</sup> Beigelman, L.; Haeberli, P.; Sweedler, D.; Karpeisky, A. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 1047-1056.

<sup>63</sup> Broom, A. D.; Robins, R. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 1145-1151.

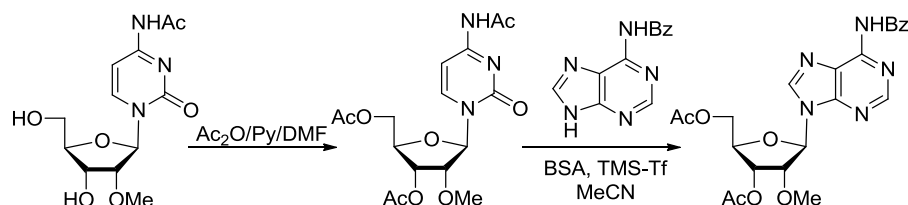
<sup>64</sup> Yano, J.; Kan, L. S.; Ts'o, P. O. *Biochim. Biophys. Acta*, **1980**, *629*, 178-183.



**b) Metilación de la adenosina utilizando catalizadores metálicos.** Con el objetivo de minimizar la alquilación en la base nitrogenada se han desarrollado métodos que implican el uso de catalizadores metálicos que activan el diol *cis* de las posiciones 2' y 3' del anillo de ribosa. De este modo, utilizando SnCl<sub>2</sub> como catalizador y diazometano se obtiene exclusivamente una mezcla de los regioisómeros 2'/3'-*O*-metiladenosina en una proporción 1:1.<sup>65</sup> Otra metodología también descrita implica el uso de acetilacetato de Cu (II) como activante del diol *cis* y del hidróxido de trimetilselenio como agente de alquilación, obteniéndose la mezcla de isómeros metilados en las posiciones 2' y 3' en una proporción 1:1.<sup>66</sup> Los acetilacetatos de Ag (I) y Sr (II) son más selectivos hacia la formación de la 2'-*O*-metiladenosina, pero su elevado precio complica el escalado del proceso.<sup>62</sup>

Por tanto, los procesos que implican una metilación de la adenosina dan lugar a la formación de los regioisómeros 2'/3'-*O*-metiladenosina en diferentes proporciones dependiendo del método utilizado. Éstos compuestos tienen idéntica polaridad y por tanto son inseparables por cromatografía de columna. Se debe recurrir a la cromatografía de intercambio iónico o a la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para su separación.

**c) Síntesis de 2'-*O*-metiladenosina mediante transglicosilación.** El hecho de que la metilación de la adenosina proporciona siempre mezclas de los regioisómeros 2'/3'-*O*-metiladenosina ha dado lugar a la aparición de otras estrategias sintéticas, entre las que se encuentran reacciones de transglicosilación. Así, sobre un derivado fácilmente accesible, 2'-*O*-metilcitosidina peracetilada, se lleva a cabo una reacción de transglicosilación con adenina protegida con el grupo benzoílo. El principal inconveniente de esta metodología es la formación de la mezcla de anómeros  $\alpha/\beta$  (Esquema 4).<sup>23</sup>



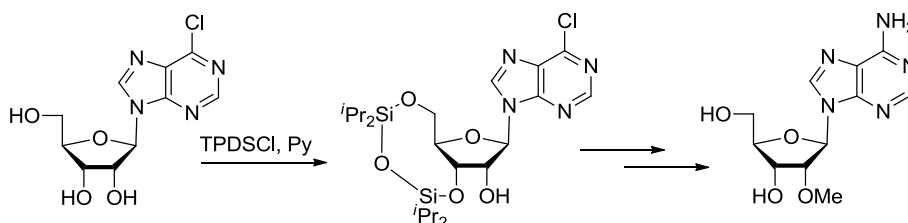
Esquema 4

<sup>65</sup> Robins, M. J.; Naik, S. R.; Lee, A. S. *J. Org. Chem.* **1974**, 39, 1891-1899.

<sup>66</sup> Yamauchi, K.; Hattori, K.; Kinoshita, M. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1985**, 1327-1330.

## Antecedentes

**d) Síntesis de 2'-O-metiladenosina mediante el uso de grupos protectores.** El empleo de grupos protectores permite sintetizar 2'-O-metiladenosina en siete etapas partiendo del derivado de 6-cloropurina. El reactivo 1,3-dicloro-1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano (TPDSCI) protege selectivamente las posiciones 3' y 5' de los nucleósidos, quedando libre el hidroxilo de la posición 2', que es fácilmente metilado con NaH/MeI (Esquema 5).<sup>67</sup> La principal limitación de esta metodología es el elevado número de etapas necesarias y el alto precio del reactivo de silicio, lo que dificulta el escalado del proceso.



Esquema 5

### 1.1.2. BIOTRANSFORMACIONES EN NUCLEÓSIDOS

De lo expuesto en el apartado anterior, podría decirse que la formación de los isómeros de idéntica polaridad 2'/3'-O-metiladenosina en las reacciones de metilación directa de la adenosina dificulta considerablemente la obtención del isómero metilado en posición 2' y, por tanto, su introducción en oligonucleótidos. Para lograr una separación efectiva de ambos regioisómeros, el empleo de la biocatálisis podría ser una alternativa muy adecuada debido al diferente comportamiento que, en ocasiones, exhiben las lipasas frente a los distintos isómeros de una mezcla.

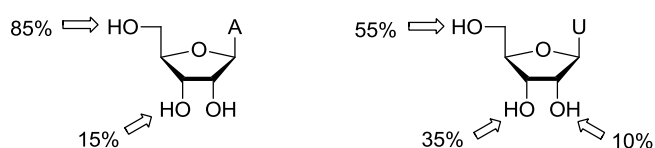
#### 1.1.2.1. Acilaciones enzimáticas en $\beta$ -D-nucleósidos

La protección/desprotección selectiva de compuestos que presentan varios grupos hidroxilo en su estructura –como los nucleósidos– es una tarea ardua en síntesis orgánica. De aquí que Klivanov<sup>68</sup> intentase la acilación enzimática regioselectiva de

<sup>67</sup> Inoue, H.; Hayase, Y.; Imura, A.; Iwai, S.; Miura, K.; Ohtsuka, E. *Nucl. Acids Res.* **1987**, *15*, 6131-6148.

<sup>68</sup> Riva, S.; Chopineau, J.; Kieboom, A. P.; Klivanov, A. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 584-589.

ribonucleósidos utilizando la proteasa Subtilisina y butirato de tricloroetilo como agente de acilación. Los resultados que obtuvo no fueron especialmente buenos, aunque se observaba cierta regioselectividad hacia el hidroxilo de la posición 5' (Figura 16).

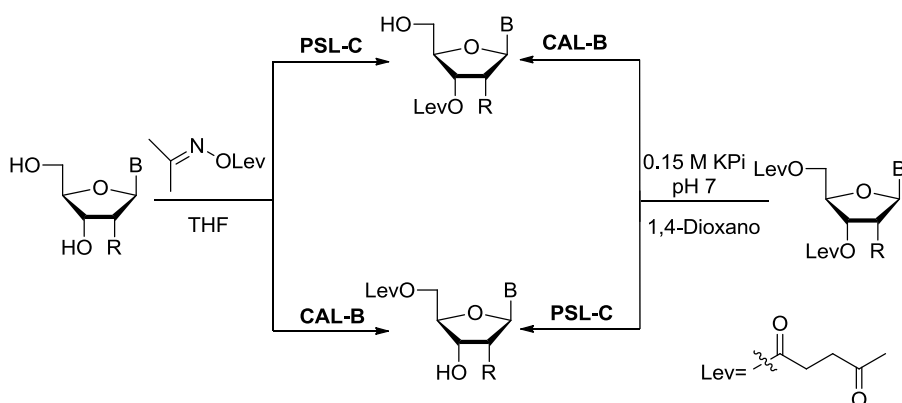


**Figura 16.** Porcentaje de acilación en nucleósidos con Subtilisina.

Posteriormente, en nuestro grupo de investigación se han llevado a cabo estudios de acilación/hidrólisis enzimática selectiva sobre derivados de nucleósidos que presentan diferentes sustituyentes en la posición 2'. De esta forma, se pueden conseguir en una sola etapa derivados selectivamente protegidos con el grupo levulinilo en la posición 3' ó 5', evitando las tediosas etapas de protección/desprotección que serían necesarias empleando métodos químicos convencionales. Estos análogos ortogonalmente protegidos son monómeros precursores para la preparación de oligonucleótidos. El levulinilo es el grupo protector más empleado en la síntesis de oligonucleótidos en disolución por el método del H-fosfonato. Existen varias razones que lo hacen especialmente útil: a) es estable a las condiciones de acoplamiento; b) puede ser selectivamente eliminado sin afectar a otros grupos protectores presentes en el oligonucleótido, como el grupo DMT; c) las condiciones suaves de desprotección, generalmente medio neutro y temperatura ambiente; y d) su gran asequibilidad económica. Aunque existen excepciones, se ha encontrado que la lipasa de *Pseudomonas cepacia* (PSL-C) hidroliza/acila la posición 3' de los nucleósidos, mientras que la CAL-B es selectiva a la posición 5'. Ambas lipasas muestran, por tanto, una regioselectividad complementaria (Esquema 6).<sup>69</sup>

<sup>69</sup> a) García, J.; Fernández, S.; Ferrero, M.; Sanghvi, Y. S.; Gotor, V. *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 3533-3540. b) García, J.; Fernández, S.; Ferrero, M.; Sanghvi, Y. S.; Gotor, V. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 4513-4519.

## Antecedentes



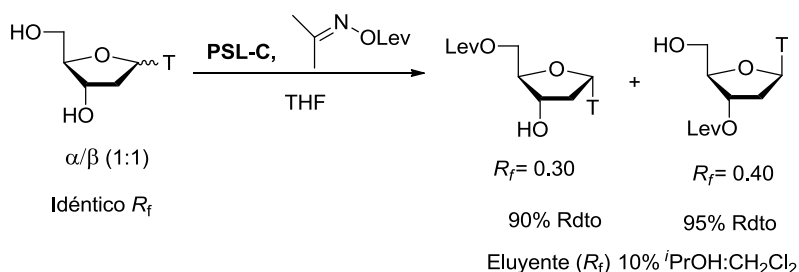
R= H, OMe, OMOE

B= A, T, C, A<sup>Bz</sup>, C<sup>Bz</sup>, G<sup>bu</sup>, 5-Me-C, 5-Me-C<sup>Bz</sup>

**Esquema 6.** Acilación/hidrólisis selectiva en  $\beta$ -D-nucleósidos con levulinato de acetoxima.

### 1.1.2.2. Separación enzimática de anómeros $\alpha/\beta$ en nucleósidos

Como se ha mostrado en el apartado anterior, la PSL-C cataliza la acilación en la posición 3' de  $\beta$ -D-2'-desoxinucleósidos; sin embargo, muestra una regioselectividad opuesta en la acilación de los anómeros  $\alpha$ , en los que es selectiva hacia la posición 5'. Este diferente comportamiento permitió, en nuestro grupo de investigación, la separación de la mezcla  $\alpha/\beta$ -D-timidina, en la que ambos anómeros poseen idénticos valores de  $R_f$ . Así, tras la reacción enzimática, se obtienen dos nucleósidos acilados en diferente posición y que presentan distintas polaridades, siendo fácilmente separables mediante una sencilla cromatografía de columna (Esquema 7).<sup>70</sup>



**Esquema 7.** Separación enzimática de la mezcla  $\alpha/\beta$ -D-timidina.

<sup>70</sup> García, J.; Díaz-Rodríguez, A.; Fernández, S.; Ferrero, M.; Sanghvi, Y. S; Gotor, V. J. *Org. Chem.* **2006**, *71*, 9765-9771.

---

### 1.1.3. IMPORTANCIA DE LOS 3'-O-METILRIBONUCLEÓSIDOS

Aunque hasta el momento no se han encontrado aplicaciones de los 3'-O-metilribonucleósidos –productos secundarios obtenidos en los procesos de metilación directa de nucleósidos- en la tecnología *antisense*, éstos poseen otras importantes aplicaciones biológicas. Por ejemplo, en su forma 5'-trifosforilada los análogos 3'-O-metiladenosina y 3'-O-metilguanosina actúan como terminadores en el alargamiento de cadenas de ARN y ADN. De este modo, estos derivados son ampliamente utilizados en la secuenciación de ácidos nucleicos.<sup>71</sup>

Por otro lado, se ha encontrado que la 3'-O-metiladenosina y, en menor medida, la 3'-O-metilguanosina actúan como inhibidores del crecimiento de *vaccinia virus* en algunas células. De hecho, la adición de 100 µM de 3'-O-metiladenosina a células infectadas inhibe en sólo 2,5 h la síntesis de ARN viral.<sup>72</sup>

---

<sup>71</sup> Axelrod, V. D.; Vartikyan, M. R.; Aivazashvili, V. A.; Beabealashvili, R. *Nucleic Acids Res.* **1978**, *15*, 3549-3561.

<sup>72</sup> Goswami, B. B.; Sharma, O. K. *J. Virol.* **1983**, *45*, 1164-1167.



## **1.2. OBJETIVOS**

Los oligonucleótidos *antisense* han surgido como una alternativa a los fármacos tradicionales, muchos se encuentran en ensayos clínicos y en un futuro próximo será necesario sintetizarlos en grandes cantidades. La segunda generación de oligonucleótidos ha mejorado sustancialmente las limitaciones que presentaba la primera generación. Sin embargo, su principal inconveniente es la preparación de los monómeros precursores, los 2'-*O*-alquilribonucleósidos, lo que supone aproximadamente el 80% del coste total del proceso. En el caso de la adenosina, la metilación directa da lugar a la formación de una mezcla de nucleósidos metilados en las posiciones 2' y 3', siendo necesario recurrir a procesos cromatográficos de elevado coste para su separación, dificultando su preparación a escala industrial.

Debido a la experiencia de nuestro grupo de investigación en la acilación enzimática regioselectiva de nucleósidos y en la separación de mezclas de anómeros de estos compuestos, y dado el alto valor añadido que poseen los regioisómeros 2'-*O*- y 3'-*O*-metiladenosina, en este capítulo nos planteamos el desarrollo de un proceso sencillo y respetuoso con el medio ambiente que permita separar dichos isómeros, con la meta final de poder aplicarlo a escala industrial. Es por ello, que se estudiará el escalado del proceso.

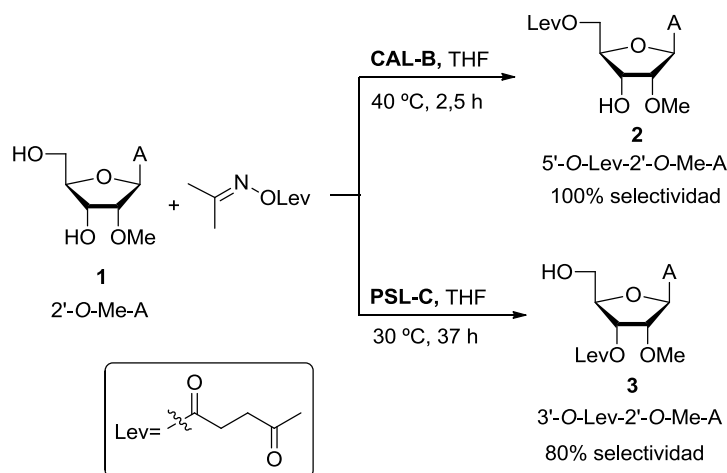




### 1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para desarrollar un método de separación enzimático de los regioisómeros 2'/3'-*O*-metiladenosina, éstos deben comportarse de manera diferente cuando se someten a reacciones de acilación catalizadas por lipasas. Por tanto, es necesario conocer previamente el comportamiento de cada uno de ellos por separado en este tipo de procesos.

Previamente, en nuestro grupo de investigación, se había encontrado que la lipasa CAL-B en combinación con el levulinato de acetoxima acilaba con total regioselectividad la posición 5' del derivado 2'-*O*-metiladenosina (**1**, Esquema 8), mientras que la lipasa de *Pseudomonas cepacia* inmovilizada sobre cerámica (PSL-C) mostraba una alta selectividad hacia la posición 3' del nucleósido.<sup>69a</sup>



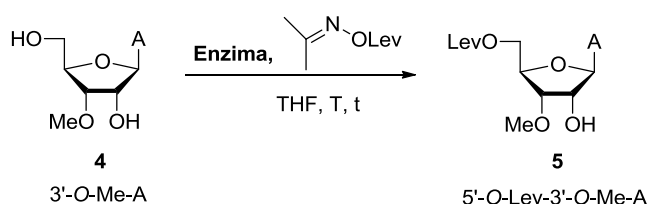
Esquema 8

## Resultados y discusión

### 1.3.1. SÍNTESIS DE DERIVADOS MONOACILADOS DE 3'-O-METILADENOSINA

#### 1.3.1.1. Acilación enzimática de 3'-O-metiladenosina

El primer lugar se estudió el comportamiento que presenta el sustrato 3'-O-metiladenosina (**4**, Esquema 9) en reacciones de acilación enzimática catalizadas por lipasas. Así, los mejores resultados en la acilación regioselectiva de 2'-O-alquilribonucleósidos los han proporcionado las enzimas PSL-C y CAL-B en combinación con el levulinato de acetoxima como agente de acilación.



**Esquema 9.** Acilaciones enzimáticas sobre 3'-O-metiladenosina.

Aplicando estas condiciones al nucleósido 3'-O-metiladenosina se observa que la CAL-B cataliza con total regioselectividad, tras 12 h de reacción y a 45 °C, la acilación en la posición 5' de **4**, aislándose el producto 5'-O-levulinil-3'-O-metiladenosina (**5**) con un 86% de rendimiento tras una sencilla filtración en gel de sílice. Por tanto, el sustrato 3'-O-metiladenosina (**4**) muestra exactamente el mismo comportamiento que su isómero 2'-O-metiladenosina (**1**) en la acilación con CAL-B (entrada 1, Tabla 3).

**Tabla 3.** Acilación enzimática de 3'-O-metiladenosina (**4**).

Entrada	Enzima <sup>a</sup>	T (°C)	t (h)	c (%) <sup>b</sup>	<b>5</b> (%) <sup>c,d</sup>
1	CAL-B	45	12	>99	>99 (86)
2	PSL-C II <sup>e</sup>	30	144	14	14

<sup>a</sup>Relación **4**:CAL-B es 1:1 (p/p); relación **4**:PSL-C II es 1:3 (p/p).

<sup>b</sup>Conversiones calculadas por HPLC. <sup>c</sup>Porcentaje de compuestos calculado por HPLC. <sup>d</sup>Rendimiento de producto aislado se da entre paréntesis.

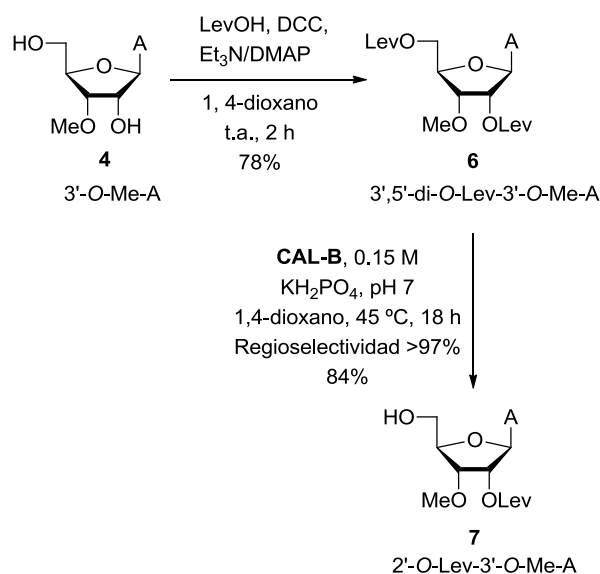
<sup>e</sup>Lipasa PS Amano inmovilizada sobre cerámica, 1195 U/g.

Sin embargo, el tratamiento de **4** con levulinato de acetoxima y en presencia de PSL-C II (Amano, 1195 U/g) como biocatalizador pone de manifiesto que la reacción es mucho más lenta, y da lugar a la formación del derivado 5'-O-levulinilo **5** con un 14% de conversión tras 144 h de reacción a 30 °C (entrada 2, Tabla 3).

Este resultado contrasta con el observado para el sustrato 2'-O-metiladenosina (**1**) en el que, como se ha comentado anteriormente, la PSL-C cataliza con alta selectividad y conversión la acilación en la posición 3'.

### 1.3.1.2. Síntesis de 2'-O-levulinil-3'-O-metiladenosina

A continuación, nos planteamos la síntesis del derivado 2'-O-levulinil-3'-O-metiladenosina (**7**) por dos razones. La primera, para preparar una muestra de referencia de **7** que nos permita demostrar inequívocamente que en la reacción de acilación enzimática de 3'-O-metiladenosina con PSL-C se obtiene sólo el derivado acilado **5** y nada de **7**. La segunda, el derivado 2'-O-levulinilo **7** puede ser un precursor muy adecuado para la preparación de oligonucleótidos.



**Esquema 10.** Síntesis quimioenzimática de 2'-O-levulinil-3'-O-metiladenosina (**7**).

Puesto que ni la PSL-C ni la CAL-B permiten por acilación directa sintetizar el derivado 2'-O-levulinil-3'-O-metiladenosina (**7**), se ha desarrollado un proceso quimioenzimático en dos etapas, tal como se indica en el Esquema 10, para su síntesis. De este modo, el tratamiento de 3'-O-metiladenosina (**4**) con 5,2 equivalentes de ácido levulínico (LevOH) y dicitlohexilcarbodiimida (DCC) en presencia de Et<sub>3</sub>N y dimetilaminopiridina (DMAP) da lugar a la formación de 3',5'-di-O-levulinil-3'-O-metiladenosina (**6**) con un 78% de rendimiento.

## **Resultados y discusión**

---

La hidrólisis del grupo 5'-acilo de **6** se lleva a cabo con CAL-B como catalizador, ya que ha demostrado una excelente selectividad hacia esta posición con una gran variedad de nucleósidos modificados. El tratamiento del diéster **6** con una disolución reguladora de fosfato de pH 7 utilizando un 18% de 1,4-dioxano como cosolvente y la lipasa CAL-B como biocatalizador origina el análogo 2'-*O*-levulinil-3'-*O*-metiladenosina (**7**) con un 84% de rendimiento tras 18 h de reacción a 45 °C. Esta lipasa exhibe el mismo comportamiento en los procesos de acilación y de hidrólisis, siendo totalmente regioselectiva hacia la posición 5' del nucleósido.

Con los compuestos **6** y **7** como referencia se puede asegurar que en la reacción de acilación enzimática de 3'-*O*-metiladenosina (**4**) con PSL-C y levulinato de acetoxima se obtiene, junto con el producto de partida **4**, exclusivamente el derivado 5' acilado **5**, puesto que en el cromatograma de HPLC del crudo de reacción no aparece ninguna señal a los tiempos de retención propios de **6** y **7**. Estos compuestos se analizan en HPLC utilizando una columna C18 con dos fases móviles (MeCN y H<sub>2</sub>O). Los tiempos de retención en estas condiciones son: 3'-*O*-metiladenosina (**4**): 17.6 min; 5'-*O*-levulinil-3'-*O*-metiladenosina (**5**): 26.7 min; 3',5'-di-*O*-levulinil-3'-*O*-metiladenosina (**6**): 28.6 min; 2'-*O*-levulinil-3'-*O*-metiladenosina (**7**): 27.1 min.

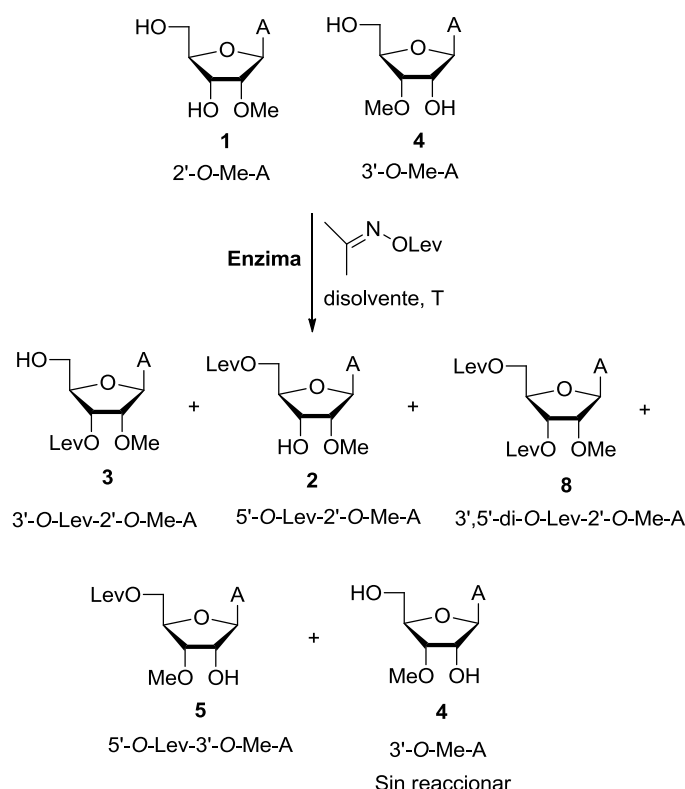
### **1.3.2. SEPARACIÓN ENZIMÁTICA DE LA MEZCLA DE REGIOISÓMEROS 2'/3'-O-METILADENOSINA**

#### **1.3.2.1. Optimización de las condiciones del proceso enzimático**

Una vez que se conoce el comportamiento frente a la acilación enzimática de cada uno de los regioisómeros por separado, se puede abordar la separación de una mezcla de 2'/3'-*O*-metiladenosina. La CAL-B cataliza con total regioselectividad la acilación en la posición 5' de ambos isómeros por lo que no se puede utilizar como biocatalizador para separar la mezcla.

Por otro lado, como se ha comentado anteriormente, la PSL-C es capaz de catalizar con alta regioselectividad y conversión la acilación de 2'-*O*-metiladenosina (**1**) en la posición 3', dando lugar a la formación de 3'-*O*-levulinil-2'-*O*-metiladenosina (**3**) como producto mayoritario. Sin embargo, cuando el sustrato es 3'-*O*-metiladenosina (**4**) esta lipasa cataliza exclusivamente la formación del derivado 5'-*O*-levulinilo (**5**) con muy baja conversión y a tiempos muy largos de reacción (144 h). Por tanto, debido al

diferente comportamiento que exhibe la PSL-C en la acilación de los regioisómeros en cuestión parece, en principio, factible diseñar una estrategia para llevar a cabo su separación empleando esta lipasa.



**Esquema 11.** Reacción enzimática de una mezcla 1:1 de los regioisómeros 2'/3'-O-Me-A.

Se parte de una mezcla equimolecular de 2'/3'-O-metiladenosina. Esta mezcla se somete a condiciones de acilación enzimática con PSL-C II (1:1.5, p/p) y levulinato de acetoxima (1:1.5 equivalentes) agitándose a 55 °C durante 6 días. Como era de esperar, el isómero 2'-O-metiladenosina (**1**) reaccionó preferentemente por su posición 3' dando lugar a la formación mayoritariamente de 3'-O-levulinil-2'-O-metiladenosina (**3**), junto con 5'-O-levulinil-2'-O-metiladenosina (**2**) y 3',5'-di-O-levulinil-2'-O-metiladenosina (**8**) como productos minoritarios. Por otra parte, el regioisómero 3'-O-metiladenosina (**4**) reacciona más lentamente y proporciona exclusivamente el derivado 5'-O-levulinil-3'-O-metiladenosina (**5**), si bien con baja conversión, recuperándose en su mayor parte el sustrato 3'-O-metiladenosina sin reaccionar (entrada 1, Tabla 4). En el Esquema 11 se recogen los productos

## Resultados y discusión

acilados que se obtienen como resultado de la acilación enzimática sobre cada uno de los isómeros.

**Tabla 4.** Acilación enzimática de mezclas 1:1 de 2'/3'-*O*-metiladenosina (**1/4**).<sup>a</sup>

Entrada	Enzima	M:E <sup>b</sup>	M:EO <sup>c</sup>	T (°C)	t (d)	Productos acilados			
						2 <sup>d</sup>	3 <sup>d</sup>	5 <sup>d</sup>	8 <sup>d</sup>
1	PSL-C II <sup>e</sup>	1:1.5	1:1.5	55	6	11	66	12	11
2	PSL-C I <sup>f</sup>	1:1.5	1:1.5	30	7	11	69	8	12
3 <sup>g</sup>	CVL	1:0.25	1:1.5	55	7	12	71	10	7
4	PSL-C I	1:3	1:3	30	4	10	55	16	19
5	PSL-C II	1:3	1:3	30	5	11	72	10	7
6	PSL-C II	1:3	1:3	40	5	12	62	17	9
7 <sup>h</sup>	PSL-C II	1:3	1:3	30	6	5	71	18	6
8 <sup>i</sup>	PSL-C II	1:3	1:3	30	5	15	70	8	7

<sup>a</sup>Las reacciones se llevan a cabo en THF, con una concentración 0.20 M y se agitan a 250 rpm. <sup>b</sup>Relación mezcla **1/4**:enzima (p:p). <sup>c</sup>Relación mezcla **1/4**:éster oxima. <sup>d</sup>Porcentajes de compuestos acilados en el crudo de reacción calculados por HPLC. <sup>e</sup>Lipasa PS Amano inmovilizada sobre cerámica, 1195 U/g. <sup>f</sup>Lipasa PS Amano inmovilizada sobre cerámica, 1387 U/g. <sup>g</sup>Tras 30 h a 30 °C, la temperatura se incrementa a 55 °C. <sup>h</sup>El disolvente es 1,4-dioxano. <sup>i</sup>La relación **1:4** es 3:1.

El siguiente objetivo fue optimizar el proceso variando la temperatura, los equivalentes de agente acilante y enzima, tiempo de reacción y biocatalizador. Lo que se busca es que **1** se transforme con la mayor selectividad posible en **3** y que el sustrato **4** permanezca en su mayor parte sin reaccionar para ser recuperado fácilmente al final de la reacción.

Los resultados de estos experimentos –monitorizados por HPLC– se encuentran resumidos en la Tabla 4. Cuando se disminuye la temperatura a 30 °C, utilizando PSL-C I (Amano, 1387 U/g) y manteniendo constantes los equivalentes de agente acilante y biocatalizador los resultados son muy similares en términos de selectividades, pero la reacción es más lenta debido a la disminución de la temperatura (entrada 2, Tabla 4). Por otra parte, el uso de la lipasa de *Chromobacterium viscosum* (CVL), a 55 °C, no proporciona una mejora considerable ni en términos de conversión ni tampoco de selectividad (entrada 3, Tabla 3).

Con el fin de aumentar la velocidad de la reacción se incrementa el número de equivalentes de agente acilante (1:3 equivalentes) y enzima (1:3, p/p). En estas condiciones y empleando la lipasa PSL-C I, el tiempo de reacción disminuye de 7 a 4 días; sin

embargo, la selectividad de la reacción decrece ligeramente (entrada 4, Tabla 4). Por otro lado, en estas mismas condiciones, pero empleando la lipasa PSL-C II, la selectividad de la reacción es alta hacia la obtención de **3**, minimizándose también la formación del compuesto no deseado **5** (entrada 5, Tabla 4). El incremento de la temperatura a 40 °C provoca una disminución de la selectividad (entrada 6, Tabla 4), mientras que el uso de 1,4-dioxano como disolvente no mejora los resultados obtenidos en THF (entrada 7, Tabla 4). Es por ello que se eligen las condiciones señaladas en la entrada 5 de la Tabla 4 como las más adecuadas para la separación de una mezcla de **1** y **4**.

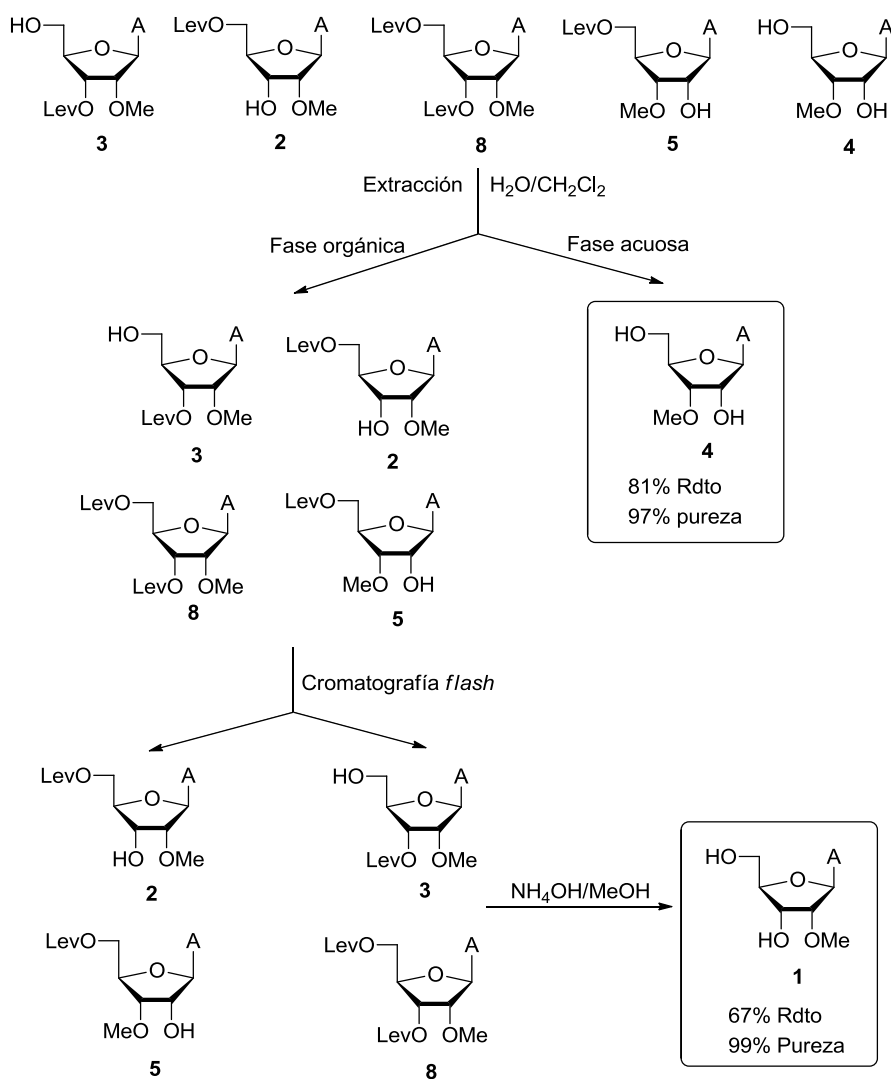
Puesto que en la alquilación directa de la adenosina se obtiene una relación de isómeros 2'/3'-*O*-metiladenosina de aproximadamente 3:1, se lleva a cabo la reacción de acilación enzimática sobre una mezcla que presenta dicha relación de sustratos para confirmar la utilidad del proceso diseñado.

Como puede observarse, la reacción tiene lugar de forma similar a cuando el sustrato de partida es la mezcla equimolecular (entrada 8, Tabla 4), lo que indica que la reacción enzimática es independiente de la relación de ambos isómeros.

#### **1.3.2.2. Aislamiento de los productos del crudo de reacción**

Una vez que se han encontrado las mejores condiciones para la reacción de acilación enzimática, el siguiente paso es el aislamiento de los productos del crudo de reacción. Cuando concluye la reacción enzimática se filtra el enzima, utilizando una placa, se lava y tras evaporar los disolventes se lleva a cabo una extracción de la mezcla de reacción en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O (Esquema 12).

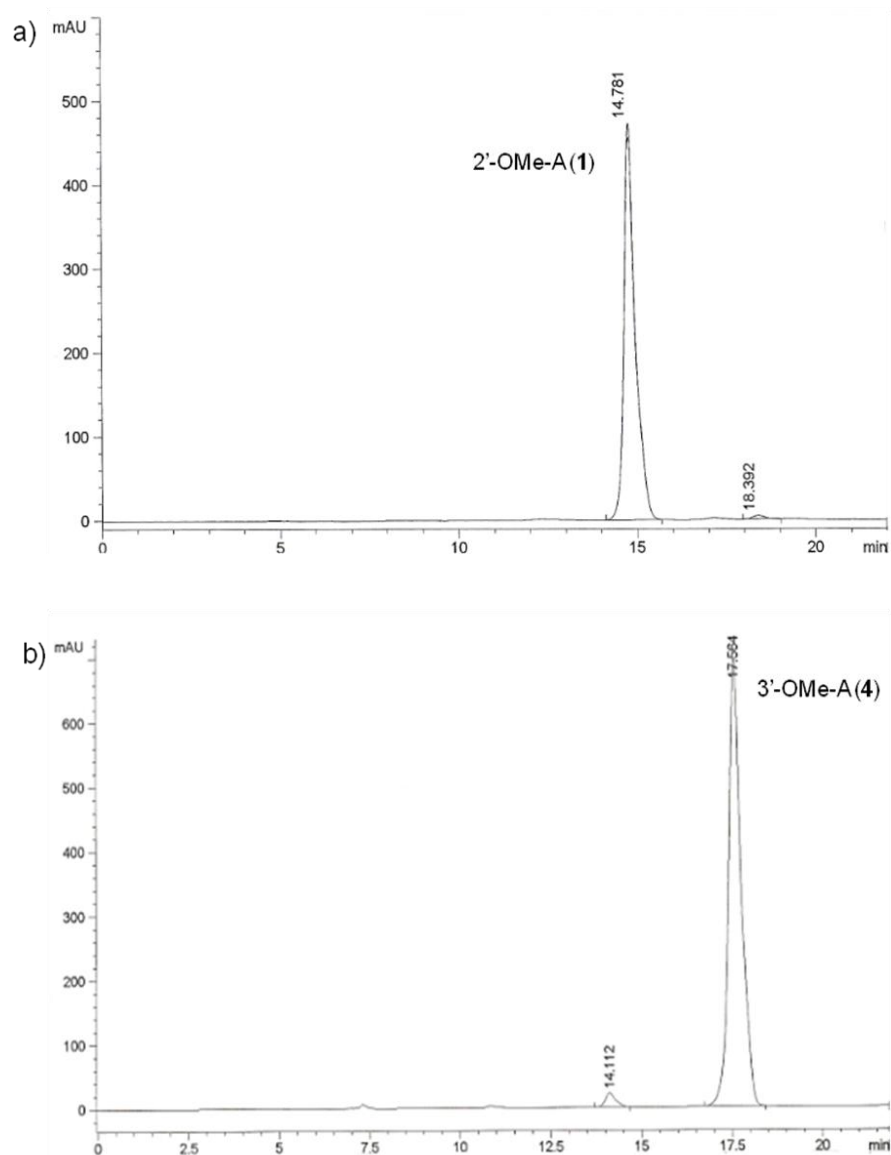
## Resultados y discusión



**Esquema 12.** Aislamiento de los productos del crudo de la reacción de acilación enzimática.

De este modo, los derivados acilados que se obtuvieron tras la reacción enzimática pasan a formar parte de la fase orgánica, mientras que el sustrato 3'-O-metiladenosina (**4**), que no reaccionó en el proceso, permanece en la fase acuosa al tener sus dos grupos hidroxilos libres y ser un compuesto muy polar. Tras evaporar el agua, este derivado se obtiene con un 81% de rendimiento y un 97% de pureza -medida por HPLC (Figura 17b)- dado que un 3% del regioisómero **1** permanece sin reaccionar incluso a tiempos de reacción más largos.





**Figura 17.** Cromatogramas de HPLC correspondientes a: a) 2'-*O*-metiladenosina (**1**) y b) 3'-*O*-metiladenosina (**4**) obtenidos tras el proceso de separación enzimático.

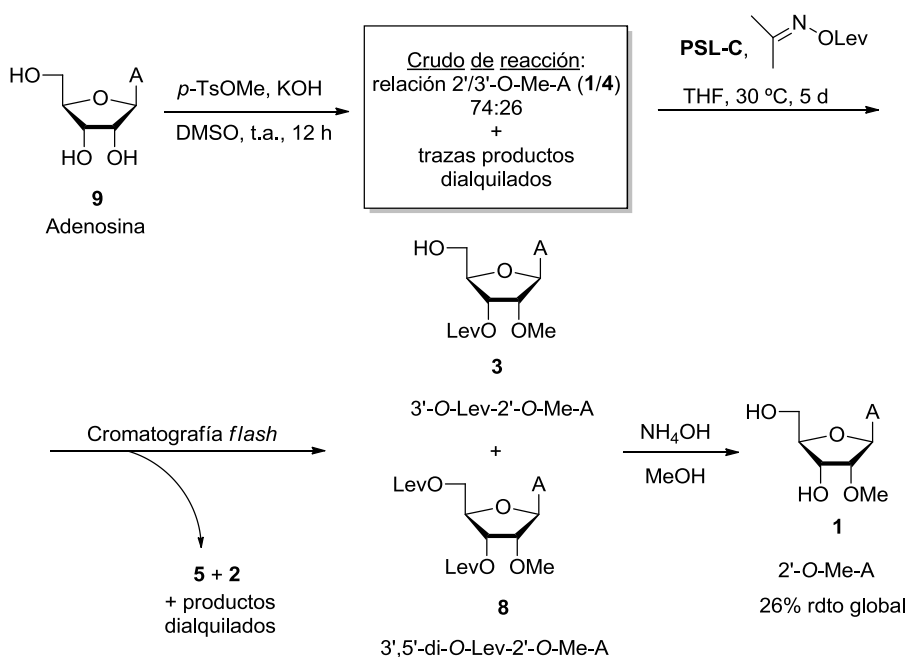
Por otra parte, la fase orgánica se somete a una sencilla cromatografía *flash* para separar los derivados acilados en la posición 5' (**2** y **5**), que tienen idéntica polaridad, de los productos 3'-*O*-levulinil-2'-*O*-metiladenosina (**3**) y 3',5'-di-*O*-levulinil-2'-*O*-metiladenosina (**8**). La hidrólisis convencional con NH<sub>4</sub>OH/MeOH de

## Resultados y discusión

estos últimos derivados da lugar a la 2'-*O*-metiladenosina (**1**) con un 67% de rendimiento global y un 99% de pureza calculada por HPLC (Figura 17a).

### 1.3.3. ESCALADO DEL PROCESO: SÍNTESIS QUIMIOENZIMÁTICA DE 2'-*O*-METILADENOSINA A PARTIR DE ADENOSINA

Para demostrar la aplicación industrial de este proceso, se decidió llevar a cabo la separación enzimática descrita en el apartado anterior a una mezcla real de los regioisómeros **1/4** proveniente del crudo de una reacción de alquilación directa de la adenosina. Para ello, se tratan 5 g de adenosina (**9**) con *p*-toluensulfonato de metilo (*p*-TsOMe) como agente de metilación, KOH y dimetilsulfóxido (DMSO) como disolvente. Estas condiciones evitan el uso de reactivos peligrosos como diazometano, yoduro de metilo o NaH que se usan comúnmente en reacciones de metilación de nucleósidos. Además, son reactivos baratos, por lo que son adecuados para su utilización a escala industrial (Esquema 13).



**Esquema 13.** Síntesis quimioenzimática de 2'-*O*-Me-A (**1**).

El análisis del espectro de <sup>1</sup>H-RMN del crudo de la alquilación muestra una mezcla de productos monoalquilados (2'- y 3'-*O*-

metiladenosina) junto con trazas de productos dialquilados. El cromatograma de HPLC de este crudo muestra una proporción 74:26 de los regioisómeros 2'/3'-O-metiladenosina (**1/4**), respectivamente.

Con el fin de evitar una cromatografía de columna para la purificación del crudo de alquilación, lo que aumentaría el coste del proceso, se lleva a cabo la reacción enzimática en las condiciones anteriormente descritas (PSL-C II 1:3, p:p; 30 °C, 3 equivalentes del levulinato de acetoxima y THF como disolvente) directamente sobre el crudo obtenido tras la reacción de metilación. La reacción se monitoriza por HPLC hasta la desaparición del sustrato **1**, lo que ocurre en 5 días; es decir, el mismo tiempo en el que transcurre la acilación enzimática de la mezcla pura 1:1 de ambos regioisómeros. Por tanto, la PSL-C no se ve inhibida por las impurezas presentes en el crudo de alquilación, lo que demuestra la resistencia que poseen las enzimas inmovilizadas.

Posteriormente, el crudo de la reacción enzimática se extrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O y el residuo procedente de la fase orgánica se somete a una cromatografía de columna para separar los productos 5'-O-acilados **5** y **2**, mientras que la fracción mayoritaria posee los derivados 3'-O-levulinil-2'-O-metiladenosina (**3**) y 3',5'-di-O-levulinil-2'-O-metiladenosina (**8**). La hidrólisis de estos derivados 2'-O-Me acilados proporciona el regioisómero deseado 2'-O-metiladenosina (**1**) con un 26% de rendimiento global y un 99% de pureza calculada por HPLC.



## **1.4. CONCLUSIONES**

En este capítulo se ha descrito un método biocatalítico muy eficiente para separar los regioisómeros 2'/3'-*O*-metiladenosina, que siempre se obtienen como mezcla en los procesos de metilación de la adenosina. El nucleósido 2'-*O*-metiladenosina es utilizado como monómero precursor en la síntesis de oligonucleótidos *antisense* y siRNA.

La lipasa de *Pseudomonas cepacia* (PSL-C) cataliza la acilación en el grupo hidroxilo de la posición 3' del nucleósido 2'-*O*-metiladenosina con alta selectividad; sin embargo, acila el derivado 3'-*O*-metiladenosina en su posición 5' con muy baja conversión. De este modo, el tratamiento de una mezcla 1:1 de 2'/3'-*O*-metiladenosina con PSL-C y levulinato de acetoxima y la posterior extracción del crudo permite obtener en la fase acuosa el isómero 3'-*O*-metiladenosina, que no ha reaccionado, con un 81% de rendimiento y un 97% de pureza. La hidrólisis con NH<sub>4</sub>OH/MeOH de los productos 3'-*O*-levulinil-2'-*O*-metiladenosina y 3',5'-di-*O*-levulinil-2'-*O*-metiladenosina, que se forman en la reacción enzimática y que se encuentran en la fase orgánica, da lugar al aislamiento del isómero 2'-*O*-metiladenosina con un 67% de rendimiento global y un 99% de pureza. Este protocolo ofrece una excelente separación de ambos regioisómeros con altos rendimientos y purezas.

La utilidad de este proceso para una posible aplicación industrial, se pone de manifiesto cuando la reacción enzimática se lleva a cabo satisfactoriamente sobre un crudo de metilación de 5 g de adenosina. A pesar de las impurezas presentes en la mezcla de reacción, la eficacia de la enzima no se ve comprometida.

Este estudio constituye un ejemplo del uso de enzimas inmovilizados como herramientas muy útiles en síntesis orgánica, proporcionando procesos mucho más económicos y respetuosos con el medio ambiente.



## **1.5. PARTE EXPERIMENTAL**

### **1.5.1. DISOLVENTES Y REACTIVOS GENERALES**

Los disolventes utilizados en las reacciones enzimáticas se secaron antes de ser usados. Así, el THF y el 1,4-dioxano se trataron con sodio en presencia de benzofenona como indicador.

La lipasa de *Candida antarctica* B (CAL-B, Novozym 435, 7300 PLU/g) ha sido donada por la compañía Novo Nordisk y está inmovilizada sobre un soporte de tipo polimérico. La lipasa de *Pseudomonas cepacia* inmovilizada sobre partículas cerámicas (PSL-C I, Amano, 1387 U/g) y (PSL-C II, Amano, 1195 U/g) ha sido adquirida a Aldrich. Por otro lado, la lipasa de *Chromobacterium viscosum* (CVL, 4100 U/mg) ha sido donada por Genzyme Co.

## Parte experimental

---

El levulinato de acetoxima empleado como agente de acilación ha sido adquirido a la empresa Sai Dru Syn Laboratories Ltd. ([www.saiintgroup.com](http://www.saiintgroup.com)) y ha sido destilado a vacío en una bomba rotatoria a 98 °C previamente a su utilización.

El *p*-toluensulfonato de metilo, la DCC y el ácido levulínico han sido suministrados por Aldrich, mientras que el dimetilsulfóxido (DMSO) ha sido adquirido a Prolabo.

Por otra parte, el nucleósido 2'-*O*-metiladenosina lo ha proporcionado a la empresa Rasayan Inc. (Encinitas, CA, EE.UU.), mientras que el derivado 3'-*O*-metiladenosina ha sido adquirido a la empresa R. I. Chemical Inc. (Orange, CA, EE.UU.).

### 1.5.2. TÉCNICAS DE ANÁLISIS

• **Cromatografía de capa fina (CCF).** Se realiza sobre un soporte de cromatofolios de gel de sílice 60 de 0.25 mm de espesor que incorporan un revelador de ultravioleta. Como revelador se ha utilizado la mezcla 2.5% de *p*-anisaldehído, 3.5% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y 1% de ácido acético en etanol.

• **Cromatografía de columna.** Se realiza sobre gel de sílice 60 (230-400 mesh) que es suministrado por Merck. Como eluyentes se utilizan mezclas de disolventes en las proporciones que se indican en los procedimientos experimentales.

• **Cromatografía de líquidos.** El seguimiento de las reacciones enzimáticas y el cálculo de los porcentajes de cada compuesto en el crudo de reacción se han realizado mediante HPLC (cromatógrafo HP 1100) a 254 nm utilizando el siguiente método: columna C18 Mediterranea Sea (250 x 45 mm), flujo 0.8 mL/min, temperatura 30 °C y dos fases móviles (A: MeCN, B: H<sub>2</sub>O); el gradiente de eluyentes se muestra en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Gradiente de eluyentes.

t (min)	A (%)	B (%)
0	8	92
15	10	90
20	20	80
25	50	50
30	70	30



Los tiempos de retención de cada compuesto en estas condiciones son: 2'-*O*-metiladenosina (**1**): 14.8 min; 3'-*O*-metiladenosina (**4**): 17.6 min; 5'-*O*-levulinil-3'-*O*-metiladenosina (**5**): 26.7 min; 3',5'-di-*O*-levulinil-3'-*O*-metiladenosina (**6**): 28.6 min; 2'-*O*-levulinil-3'-*O*-metiladenosina (**7**): 27.1 min; 3'-*O*-levulinil-2'-*O*-metiladenosina (**3**): 27.6 min; 5'-*O*-levulinil-2'-*O*-metiladenosina (**2**): 26.3 min; 3',5'-di-*O*-levulinil-2'-*O*-metiladenosina (**8**): 28.6 min.

- **Resonancia magnética nuclear.** Los espectros de resonancia magnética nuclear se han realizado en cuatro espectrómetros: Bruker AV-300 (de 300.13 MHz para  $^1\text{H}$  y 75.5 MHz para  $^{13}\text{C}$ ), Bruker AC-300 DPX (de 300.13 MHz para  $^1\text{H}$  y 75.5 MHz para  $^{13}\text{C}$ ), Bruker NAV-400 (de 400.13 MHz para  $^1\text{H}$  y 100.6 MHz para  $^{13}\text{C}$ ), Bruker AV-600 (de 600.13 MHz para  $^1\text{H}$  y 150.9 MHz para  $^{13}\text{C}$ ).

Se usan como disolventes cloroformo, metanol y dimetilsulfóxido deuterados. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se dan en valores de partes por millón (ppm) relativas al disolvente utilizado y las constantes de acoplamiento ( $J$ ) en hertzios (Hz). En la descripción de los espectros se usan las siguientes abreviaturas: s= singulete, sa= singulete ancho, d= doblete, dd= doble doblete, t= triplete, m= multiplete.

- **Espectroscopía infrarroja.** Los espectros de IR se han registrado en un espectrómetro Varian 1100 FT-IR empleando soporte con pastillas de NaCl o bien utilizando pastillas de KBr. Los valores indicados se refieren a  $\nu_{\text{máx}}$  y se expresan en  $\text{cm}^{-1}$ .

- **Espectrometría de masas.** Los espectros de masas se realizan en un equipo LC-MS HP 1100 utilizando electrospray ( $\text{ESI}^+$ ) o ionización química a presión atmosférica ( $\text{APCI}^+$ ) como fuente de ionización. Los valores están referidos a unidades de masa atómica (uma).

## Parte experimental

---

### 1.5.3. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

#### Acilación enzimática de 2'-O-metiladenosina (4). Síntesis de 5.

Una suspensión de 3'-O-metiladenosina (4) (58 mg, 0.21 mmol), levulinato de acetoxima (106 mg, 0.62 mmol) y CAL-B (58 mg) en THF anhidro (1.1 mL) se agita a 250 rpm bajo atmósfera de nitrógeno durante 12 h a 45 °C. Posteriormente, la enzima se filtra y se lava con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Los disolventes se evaporan a presión reducida y el crudo se purifica por cromatografía *flash* (4% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) obteniéndose 67 mg (86% de rendimiento) de 5'-O-levulinil-3'-O-metiladenosina (5).

#### Síntesis de 3',5'-di-O-levulinil-3'-O-metiladenosina (6).

Sobre una disolución en agitación constante de 3'-O-metiladenosina (4) (80 mg, 0.28 mmol) en 1,4-dioxano anhidro (2.8 mL) se adicionan Et<sub>3</sub>N (240 µL, 1.45 mmol), ácido levulínico (170 mg, 1.45 mmol), DCC (298 mg, 1.45 mmol) y DMAP (2.8 mg, 0.02 mmol). La reacción se monotoriza por CCF hasta la desaparición total del producto de partida, lo que ocurre tras 2 h de agitación a temperatura ambiente. El residuo insoluble se filtra y se lava con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. El filtrado se evapora a presión reducida y se purifica por cromatografía de columna (gradiente de eluyentes 1-3% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) para obtener 106 mg de 2',5'-di-O-levulinil-3'-O-metiladenosina (6).

#### Hidrólisis enzimática de 3',5'-di-O-levulinil-3'-O-metiladenosina (6). Síntesis de 7.

A una disolución de 3',5'-di-O-levulinil-3'-O-metiladenosina (6) (76 mg, 0.16 mmol) en 1,4-dioxano (0.28 mL) se añade una disolución reguladora 0.15 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> de pH 7 (1.30 mL) y CAL-B (76 mg). La reacción se agita a 250 rpm y a 45 °C, y se monitoriza por CCF hasta la desaparición total del sustrato de partida. Tras 18 h, se filtra la enzima en placa, se lava con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y MeOH y se evaporan los disolventes. El residuo resultante se extrae en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/NaHCO<sub>3</sub> (acuoso). Las capas orgánicas se combinan, se secan con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evaporan a presión reducida, obteniéndose 51 mg (84% de rendimiento) de 2'-O-levulinil-3'-O-metiladenosina (7).

**Separación enzimática de una mezcla 1:1 de 2'/3'-O-metiladenosina.**

A un matraz Erlenmeyer que contiene la mezcla equimolecular de los regioisómeros 2'/3'-O-metiladenosina (**1/4**) (300 mg, 1.07 mmol), el levulinato de acetoxima (547 mg, 3.20 mmol) y PSL-C II (900 mg) se adicionan 5.1 mL de THF anhidro. La reacción se agita -bajo atmósfera de nitrógeno- a 250 rpm y a una temperatura de 30 °C y se monitoriza por HPLC. Transcurridos 5 d, la enzima se filtra en placa, se lava con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y MeOH, y los disolventes se evaporan a presión reducida. El residuo se disuelve en H<sub>2</sub>O y se extrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La fase acuosa se evapora y el sólido resultante se lava con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> para obtener 121 mg (81% de rendimiento, 97% de pureza por HPLC) de 3'-O-metiladenosina (**4**).

Por otro lado, se combinan las capas orgánicas, se secan sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evaporan. El residuo se somete a cromatografía *flash* (3% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) para eliminar 5'-O-levulinil-3'-O-metiladenosina (**5**) y 5'-O-levulinil-2'-O-metiladenosina (**2**). La primera fracción, que contiene los derivados 3'-O-levulinil-2'-O-metiladenosina (**3**) y 3',5'-di-O-levulinil-2'-O-metiladenosina (**8**), se disuelve en MeOH (9 mL). Posteriormente, bajo agitación continua y a temperatura ambiente, se adiciona una disolución de NH<sub>4</sub>OH (8.4 mL). La reacción se sigue por CCF hasta la desaparición total de los productos de partida. Transcurridas 2 h, se evaporan los disolventes y el crudo de reacción se purifica por columna cromatográfica (4% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) obteniéndose 100 mg (67% de rendimiento, 99% de pureza por HPLC) de 2'-O-metiladenosina (**1**).

**Síntesis quimioenzimática de 2'-O-metiladenosina (1). Escalado del proceso.**

Sobre una disolución de adenosina (**9**) (5 g, 18.7 mmol) en DMSO (75 mL) se adicionan KOH (1.92 g, 34.2 mmol) y *p*-TsOMe (4.2 g, 22.5 mmol). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 12 h. Posteriormente, se evapora el DMSO en la bomba rotatoria y sobre el residuo obtenido se adiciona acetona (75 mL). El sólido se filtra en placa y el filtrado se evapora a presión reducida para obtener 5.7 g de residuo. Este crudo se pasa a un matraz Erlenmeyer donde se adicionan PSL-C II (17.1 g), levulinato de acetoxima (10.39 g, 60.8 mmol) y THF anhidro (100 mL). La mezcla de reacción se agita a 250 rpm y a 30 °C durante 5 d bajo atmósfera de nitrógeno. A continuación, la lipasa se filtra en placa y se lava con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y MeOH. Tras evaporar disolventes se obtiene un residuo sobre el que se adiciona H<sub>2</sub>O,

## **Parte experimental**

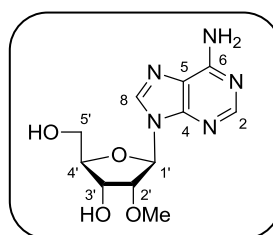
---

extrayéndose posteriormente con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Las capas orgánicas se combinan y se secan sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se evaporara el disolvente y el residuo obtenido se somete a cromatografía de columna para eliminar trazas de 5'-*O*-levulinil-3'-*O*-metiladenosina (**5**) y 5'-*O*-levulinil-2'-*O*-metiladenosina (**2**). La primera fracción, que contiene 3'-*O*-levulinil-2'-*O*-metiladenosina (**3**) y 3',5'-di-*O*-levulinil-2'-*O*-metiladenosina (**8**), se disuelve en MeOH (65 mL). Después se añade  $\text{NH}_4\text{OH}$  (61 mL) y la reacción se agita a temperatura ambiente durante 2 h. Tras evaporar disolventes el crudo de reacción se purifica por columna cromatográfica (4% MeOH/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) para obtener 1.36 g (26% de rendimiento, 99% de pureza por HPLC) de 2'-*O*-metiladenosina (**1**).

### **1.5.4. DATOS EXPERIMENTALES**

A continuación se recogen los datos experimentales que han permitido la caracterización de los compuestos. La numeración empleada en la asignación de los espectros de resonancia magnética nuclear está indicada en la figura que acompaña a cada compuesto.

**2'-O-metiladenosina (1)**



**Fórmula molecular:** C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>

**R<sub>f</sub>** (10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.21

**Pf:** 204-206 °C (sólido blanco)

**IR** (KBr):  $\nu$  3368, 3263, 3106, 2923, 1689 y 1611 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H RMN** (MeOH-*d*<sub>4</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  3.42 (s, 3H, OMe), 3.75 (dd, 1H, H-5', <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 2.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 12.6 Hz), 3.89 (dd, 1H, H-5', <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 2.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 12.6 Hz), 4.16 (c, 1H, H-4', <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 2.6 Hz) 4.43 (t, 1H, H-2', <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 5.0 Hz), 4.49 (dd, 1H, H-3', <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 3.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 5.0 Hz), 6.06 (d, 1H, H-1', <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 5.9 Hz), 8.19 (s, 1H, H-2 ó H-8), 8.34 (s, 1H, H-8 ó H-2)

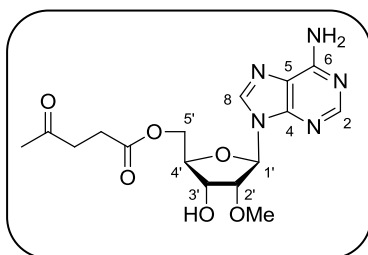
**<sup>13</sup>C NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  57.4 (OMe), 61.4 (C-5'), 68.7 (C-3'), 82.4, 85.7, 86.3 (C-1' + C-2' + C-4'), 119.2 (C-5), 139.6 (C-8 ó C-2), 148.9 (C4), 152.4 (C-2 ó C-8), 156.0 (C-6)

**EMAR** (EI): Calculada para C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub> [M]<sup>+</sup>: 281.1119.  
Encontrada: 281.1111.

**Parte experimental**

---

**5'-O-levunil-2'-O-metiladenosina (2)**



**Fórmula molecular:** C<sub>16</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>

**R<sub>f</sub>** (10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.35

**Pf:** 124-126 °C (sólido blanco)

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -15 (c 0.5, MeOH)

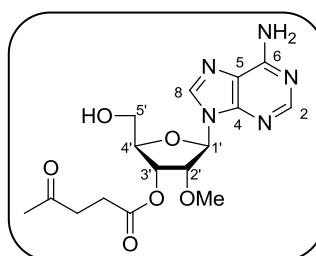
**IR** (KBr): ν 3146, 2968, 2927, 1731, 1713 y 1651 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 2.17 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Lev), 2.60 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-Lev), 2.77 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-Lev), 3.57 (s, 3H, OMe), 4.24 (m, 1H, H<sub>4'</sub>), 4.44 (m, 4H, H-2' + H-3' + H-5'), 6.12 (d, 1H, H-1', <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 3.1 Hz), 6.18 (sa, 2H, NH<sub>2</sub>), 8.10 (s, 1H, H-2' ó H-8) y 8.32 (s, 1H, H-8 ó H-2)

**<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 27.6 (CH<sub>2</sub>-Lev), 29.6 (CH<sub>3</sub>-Lev), 37.7 (CH<sub>2</sub>-Lev), 58.7 (OMe), 63.2 (C-5'), 69.4 (C-3'), 81.9, 83.0 (C-2' + C-4'), 86.7 (C-1'), 119.7 (C-5), 138.8 (C-2' ó C-8), 149.2 (C-4), 152.9 (C-8 ó C-2), 155.6 (C-6), 172.4 (C=O) y 206.7 (C=O)

**EM** (ESI<sup>+</sup>, m/z): 380 [(M+H)<sup>+</sup>, 10%], 402 [(M+Na)<sup>+</sup>, 100] y 418 [(M+K)<sup>+</sup>, 10]

**3'-O-levunil-2'-O-metiladenosina (3)**



**Fórmula molecular:** C<sub>16</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>

**R<sub>f</sub>** (10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.40

**Pf:** 186-188 °C (sólido blanco)

**IR** (KBr):  $\nu$  3404, 3107, 2927, 1741, 1719, 1679 y 1609 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  2.20 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Lev), 2.69 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-Lev), 2.80 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-Lev), 3.25 (s, 3H, OMe), 3.86 (m, 2H, H-5'), 4.32 (s, 1H, H-4'), 4.75 (dd, 1H, H-2', <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.9, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 4.8 Hz), 5.64 (d, 1H, H-3', <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 5.1 Hz), 5.83 (d, 1H, H-1', <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.9 Hz), 6.36 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 6.90 (sa, 1H, OH), 7.86 (s, 1H, H-2 ó H-8) y 8.31 (s, 1H, H-8 ó H-2)

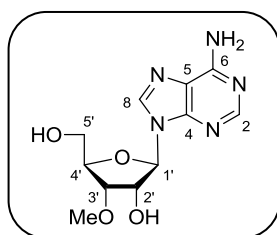
**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  27.8 (CH<sub>2</sub>-Lev), 29.7 (CH<sub>3</sub>-Lev), 37.8 (CH<sub>2</sub>-Lev), 59.0 (OMe), 62.8 (C-5'), 72.3 (C-3'), 80.9, 86.3 (C-2'+C-4'), 89.4 (C-1'), 121.1 (C-5), 140.7 (C-2 ó C-8), 148.3 (C-4), 152.3 (C-8 ó C-2), 156.1 (C-6), 171.9 (C=O) y 206.3 (C=O)

**EM** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*): 380 [(M+H)<sup>+</sup>, 100%] y 402 [(M+Na)<sup>+</sup>, 90]

**Parte experimental**

---

**3'-O-metiladenosina (4)**



**Fórmula molecular:** C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>

**R<sub>f</sub>** (10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.21

**Pf:** 175-177 °C (sólido blanco)

**IR** (KBr):  $\nu$  3365, 3266, 3135, 2924, 1689 y 1614 cm<sup>-1</sup>

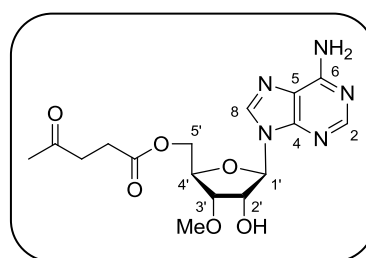
**<sup>1</sup>H RMN** (MeOH-*d*<sub>4</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  3.52 (s, 3H, OMe), 3.73 (dd, 1H, H-5', <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 2.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 12.6 Hz), 3.90 (dd, 1H, H-5', <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 2.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 12.6 Hz), 3.99 (dd, 1H, H-3', <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 2.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 5.1 Hz), 4.25 (c, 1H, H-4', <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 2.7 Hz), 4.83 (m, 1H, H-2'), 5.4 (d, 1H, H-1', <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.3 Hz), 8.19 (s, 1H H-2 ó H-8), 8.32 (s, 1H, H-8 ó H-2)

**<sup>13</sup>C NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  57.5 (OMe), 61.5 (C<sub>5'</sub>), 72.7 (C-3'), 79.9, 83.3, (C-2'+C-4'), 87.9 (C-1'), 119.3 (C-5), 139.7 (C-2 ó C-8), 148.9 (C-4), 152.3 (C-8 ó C-2), 156.0 (C-6)

**EMAR** Calculada para C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub> [M]<sup>+</sup>: 281.1119. Encontrada: 281.1116



**5'-O-levulinil-3'-O-metiladenosina (5)**



**Fórmula molecular:** C<sub>16</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>

**R<sub>f</sub>** (10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.35

**Pf:** 123-125 °C (sólido blanco)

**IR** (KBr):  $\nu$  3354, 3173, 2917, 1711 y 1662 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  2.17 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Lev), 2.56 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-Lev), 2.74 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-Lev), 3.53 (s, 3H, OMe), 4.14 (t, 1H, H-4, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 4.8 Hz), 4.38 (m, 3H, H-3'+ H-5'), 4.83 (t, 1H, H-2', <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 4.8 Hz), 6.00 (m, 3H, H-1' + NH<sub>2</sub>), 8.04 (s, 1H H-2 ó H-8), 8.30 (s, 1H, H-8 ó H-2)

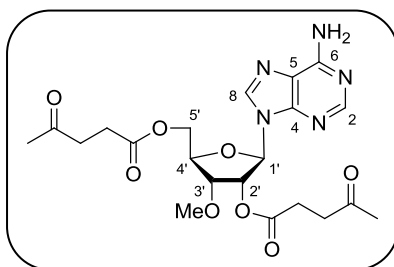
**<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 100.6 MHz):  $\delta$  27.7 (CH<sub>2</sub>-Lev), 29.8 (CH<sub>3</sub>-Lev), 37.8 (CH<sub>2</sub>-Lev), 58.6 (OMe), 63.6 (C-5'), 73.5 (C-3'), 79.7, 80.2 (C-2'+C-4'), 89.8 (C-1'), 120.0 (C-5), 139.3 (C-2 ó C-8), 149.4 (C-4), 152.9 (C-2 ó C8), 155.6 (C-6), 172.5 (C=O), 206.5 (C=O)

**EM** (APCI<sup>+</sup>, *m/z*): 380 [(M+H)<sup>+</sup>, 100%]

**Parte experimental**

---

**2',5'-di-O-levulinil-3'-O-metiladenosina (6)**



**Fórmula molecular:** C<sub>21</sub>H<sub>27</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub>

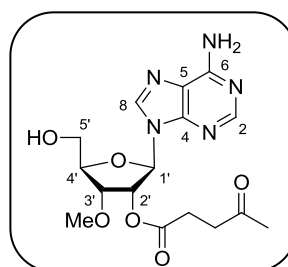
**R<sub>f</sub>** (10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.52

**<sup>1</sup>H RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 2.14 (s, 6H, 2Me-Lev), 2.65 (m, 8H, 4CH<sub>2</sub>-Lev), 3.38 (s, 3H, OMe), 4.36 (m, 4H, H-3'+H-4'+H-5'), 5.86 (dd, 1H, H-2', <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 3.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 5.0 Hz), 6.08 (d, 1H, H-1', <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 2.9 Hz), 6.23 (sa, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.99 (s, 1H, H-2 ó H-8) y 8.29 (s, 1H, H-8 ó H-2)

**<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 100.6 MHz): δ 27.9 (2CH<sub>2</sub>-Lev), 29.9 (2CH<sub>3</sub>-Lev), 38.0 (2CH<sub>2</sub>-Lev), 59.3 (OMe), 63.3 (C-5'), 74.0 (C-3'), 78.1, 80.1 (C-2'+C-4'), 87.4 (C-1'), 119.9 (C-5), 139.4 (C-2 ó C-8), 149.3 (C-4), 153.0 (C-8 ó C-2), 155.8 (C-6), 171.7 (C=O), 172.4 (C=O), 206.2 (C=O) y 206.6 (C=O)

**EM** (APCI<sup>+</sup>, m/z): 478 [(M+H)<sup>+</sup>, 100%]

**2'-O-levulinil-3'-O-metiladenosina (7)**



**Fórmula molecular:** C<sub>16</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>

**R<sub>f</sub>** (10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.40

**Pf:** 140-142 °C (sólido blanco)

**IR** (KBr):  $\nu$  3236, 3125, 2928, 1745 y 1713, 1691, 1616 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  2.13 (s, 3H, Me-Lev), 2.59 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-Lev), 2.68 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-Lev), 3.45 (s, 3H, OMe), 3.72 (d, 1H, H-5', <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 12.0 Hz), 4.00 (d, 1H, H-5', <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 12.0 Hz), 4.33 (m, 2H, H-3'+H-4'), 5.78 (t, 1H, H-2', <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.0 Hz), 6.01 (d, 1H, H-1', <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.0 Hz), 6.39 (sa, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.85 (s, 1H, H-2 ó H-8), 8.26 (s, 1H, H-8 ó H-2)

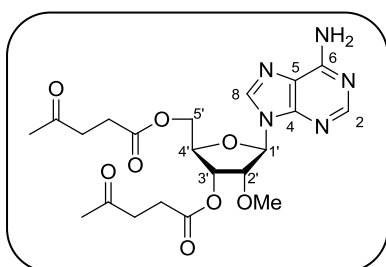
**<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 100.6 MHz):  $\delta$  27.6 (CH<sub>2</sub>-Lev), 29.7 (Me-Lev), 37.7 (CH<sub>2</sub>-Lev), 58.6 (OMe), 62.9 (C-5'), 74.7 (C-3'), 79.3, 85.7 (C-2'+C-4'), 88.7 (C-1'), 120.8 (C-5), 140.4 (C-2 ó C-8), 148.6 (C-4), 152.2 (C-2 ó C-8), 155.8 (C-6), 171.6 (C=O), 206.1 (C=O)

**EM** (APCI<sup>+</sup>, *m/z*): 380 [(M+H)<sup>+</sup>, 100%]

**Parte experimental**

---

**3',5'-di-O-levunil-2'-O-metiladenosina (8)**



**Fórmula molecular:** C<sub>21</sub>H<sub>27</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub>

**R<sub>f</sub>** (10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.50

**IR** (NaCl):  $\nu$  3351, 3187, 2933, 1740, 1715, 1642 y 1598 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  2.17 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Lev), 2.18 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Lev), 2.64 (m, 4H, 2CH<sub>2</sub>-Lev), 2.76 (m, 4H, 2CH<sub>2</sub>-Lev), 3.38 (s, 3H, OMe), 4.40 (m, 3H, H-4'+H-5'), 4.69 (t, 1H, H-2', <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 5.4 Hz), 5.40 (t, 1H, H-3', <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 4.3 Hz), 6.05 (d, 1H, H-1', <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 5.6 Hz), 6.25 (sa, 2H, NH<sub>2</sub>), 8.05 (s, 1H, H-2 ó H-8) y 8.31 (s, 1H, H-8 ó H-2)

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  27.7 (2CH<sub>2</sub>-Lev), 29.7 (2CH<sub>3</sub>-Lev), 37.7 (CH<sub>2</sub>-Lev), 37.8 (CH<sub>2</sub>-Lev), 59.0 (OMe), 63.1 (C-5'), 70.9 (C-3'), 80.2, 80.9 (C-2'+C-4'), 86.8 (C-1'), 119.9 (C-5), 139.0 (C-2 ó C-8), 149.6 (C-4), 153.1 (C-8 ó C-2), 155.6 (C-6), 171.8 (C=O), 172.2 (C=O), 206.2 (C=O) y 206.5 (C=O)

**EM** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*): 478 [(M+H)<sup>+</sup>, 20%] y 500 [(M+Na)<sup>+</sup>, 100]

## **CAPÍTULO 2**

### **SÍNTESIS BIOCATALÍTICA DE MONÓMEROS ABÁSICOS PARA SU INTRODUCCIÓN EN OLIGONUCLEÓTIDOS**



## **2.1. ANTECEDENTES**

### **2.1.1. MUTACIONES**

Las mutaciones son modificaciones en la secuencia del ADN. En condiciones normales las tasas de mutación son muy pequeñas -  $10^{-8}$  mutaciones por célula-. Sin embargo, en escalas de tiempo muy grandes –escalas geológicas- las mutaciones son imprescindibles para que exista evolución al ser la fuente de variabilidad genética, permitiendo que las especies se amolden con éxito a los continuos cambios. Suele decirse que las mutaciones son la base de la selección natural.

Aunque a escala evolutiva las mutaciones son beneficiosas, a más corto plazo pueden ser causa de muchas enfermedades. Las repercusiones biológicas de las mutaciones se derivan de la alteración que se produce en la secuencia de bases nitrogenadas del ADN. Se producen defectos en determinados genes que participan en la regulación de la división celular. De este modo, la proteína codificada por ese ADN dañado puede cambiar su función biológica o actuar incorrectamente. Si estas proteínas son las encargadas de inhibir la división celular, o están implicadas en este proceso, se estimula el ritmo reproductor de las células desarrollando un tumor y dando lugar al cáncer.

## Antecedentes

---

### 2.1.1.1. Fuentes de mutabilidad

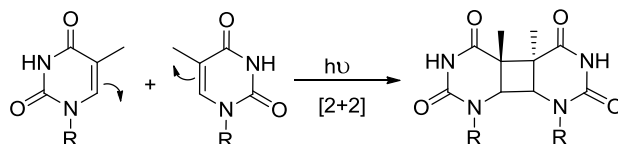
Las mutaciones pueden producirse de forma natural o inducida.<sup>73</sup> Así, se distinguen dos tipos de mutaciones dependiendo de su naturaleza:

a) Errores producidos durante la replicación del ADN. Existen tres tipos:

- Sustitución de una base nucleosídica por otra distinta
- Pérdida e inserción de bases nucleosídicas
- Cambios de lugar de algunos segmentos de ADN

b) Mutaciones producidas por la acción de determinados agentes físicos o químicos como las radiaciones o algunas sustancias procedentes del exterior celular.

Por ejemplo, la radiación UV es la responsable de la formación de dímeros de timina a través de una reacción de cicloadición [2+2]. Esta es la razón por la que una exposición excesiva al sol puede producir cáncer de piel (Esquema 14).



**Esquema 14.** Formación de dímeros de timina.

Por otro lado, numerosas sustancias tienen acción mutagénica (hidrocarburos policíclicos, aminas aromáticas, agentes alquilantes, etc...). A diferencia de las radiaciones, sus efectos suelen ser más retardados. Comprenden reacciones de desaminación, alquilación o hidroxilación en las bases nitrogenadas del ADN, provocando emparejamientos erróneos entre ellas.

### 2.1.1.2. Mecanismos de reparación del ADN

Los organismos vivos tienen sus propios mecanismos de reparación del ADN, evitando de este modo que en la mayoría de los casos las mutaciones den lugar a enfermedades. Los errores

---

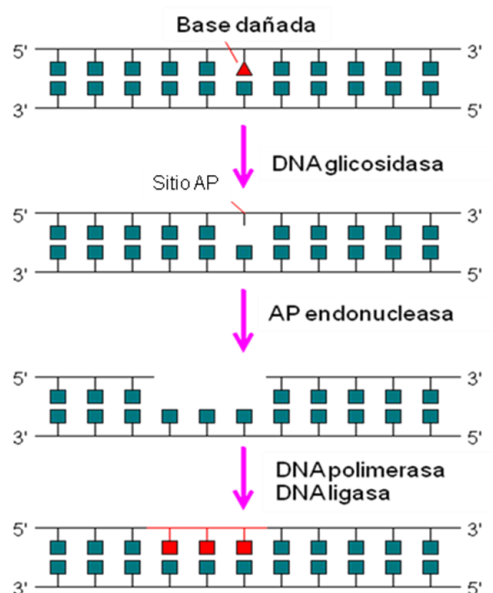
<sup>73</sup> a) Evans, A. R.; Limp-Foster, M.; Kelley, M. R. *Mutat. Res.* **2000**, *461*, 83-108.



pueden corregirse volviendo al estado original.<sup>74</sup> Se distinguen tres mecanismos principales para la reparación del ADN:

**a) Reparación directa.** La llevan a cabo enzimas que revierten directamente el daño. Por ejemplo, las alquiltransferasas eliminan los grupos metilo de bases dañadas que dan lugar a apareamientos incorrectos, mientras que las DNA fotoliasas reparan los dímeros de timina comentados anteriormente.

**b) Reparación por excisión de bases nitrogenadas.** También llamado BER (por sus siglas en inglés, *Base Excision Repair*). Es quizás la más común y la más estudiada. Una DNA glicosidasa específica reconoce el daño y rompe el enlace glicosídico entre el azúcar y la base nitrogenada, formándose así un sitio apurínico o apirimidínico (AP). El sitio AP o abásico es reconocido por una AP endonucleasa, que corta por la posición 5'; posteriormente, una ADN polimerasa rellena el hueco y una ligasa une el nuevo fragmento a la cadena de ADN ya existente (Figura 18).



**Figura 18.** Mecanismo de reparación BER.

<sup>74</sup> Friedberg, E. C. *Nature*, **2003**, 421, 436-440.

## Antecedentes

---

**c) Reparación por excisión de nucleótidos.** Está basado en el reconocimiento por parte de las exonucleasas de deformaciones en la estructura del ADN. En este mecanismo se empiezan a cortar directamente los enlaces internucleotídicos próximos a la posición donde se encuentra la base dañada.

### 2.1.2. FORMACIÓN DE SITIOS AP EN EL ADN Y SU INTRODUCCIÓN EN OLIGONUCLEÓTIDOS SINTÉTICOS: APLICACIONES

#### 2.1.2.1. Formación de sitios AP en el ADN

Los sitios abásicos son una de las lesiones del ADN más comunes en el genoma. Se estima que en cada célula humana hay un nivel constante de unos 10.000 sitios AP.<sup>75</sup> Son resultado de la ruptura del enlace glicosídico, lo cual puede ocurrir espontáneamente, en condiciones fisiológicas, o durante las etapas del proceso de reparación por excisión de bases cuando el ADN es expuesto a agentes endógenos o exógenos. Por ejemplo, el antibiótico bleomicina, utilizado como anticancerígeno, es responsable de la ruptura del enlace glicosídico entre la timina y la desoxirribosa.<sup>76</sup> Otros agentes bifuncionales como la mitomicina C y el cisplatino reaccionan con las bases del ADN originando lesiones abásicas.<sup>77</sup> Estos procesos de lesiones celulares son también responsables de la formación de enlaces cruzados en hebras opuestas en el ADN originando efectos citotóxicos.<sup>73,78</sup> Por ello, son importantes los estudios de reparación del ADN para mantener la integridad del genoma.<sup>79</sup>

Hasta la actualidad, se han sintetizado varios derivados de oligonucleótidos que contienen sitios abásicos para determinar las bases estructurales de estas lesiones.<sup>80</sup> Entre ellos destaca el sitio

---

<sup>75</sup> Lindahl, T. *Nature* **1993**, *362*, 709-715.

<sup>76</sup> Müller, W. E. G.; Yamazaki, Z. I.; Breter H. Y.; Zahn, R. K. *Eur. J. Biochem.* **1972**, *31*, 518-525.

<sup>77</sup> a) Noll, D. M.; Mason T. M.; Miller, P. S. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 277-301. b) Schärer, O. D. *ChemBioChem* **2005**, *6*, 27-32.

<sup>78</sup> a) Guan, L.; Greenberg, M. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15225-15231. b) Dutta, S.; Chowdhury, G.; Gates, K. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 1852-1853. c) Loeb, L. A.; Preston, B. D. *Annu. Rev. Genet.* **1986**, *20*, 201-230. d) Loeb, L. A. *Cell* **1985**, *40*, 483-484. e) Boiteux, S.; Laval, J. *Biochemistry* **1982**, *21*, 6746-6751.

<sup>79</sup> Para una mini-revisión ver: Boiteux, S.; Guillet, M. *DNA Repair* **2004**, *3*, 1-12.

<sup>80</sup> a) Huang, H.; Greenberg, M. M. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 2695-2703. b) Chen, J.; Dupradeau, F.-Y.; Case, D. A.; Turner, C. J.; Stubbe, J. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 253-262. c) Takeshita, M.; Chang, C.-N.; Johnson, F.; Will, S.; Grollman, A. P. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 10171-10179.

abásico 2-desoxirribosa (**AP**, Figura 19), resultado de la hidrólisis del enlace glicosídico, o las lesiones que se originan por oxidación a partir de ésta: la 2-desoxirribonolactona (**L**), el producto de oxidación en posición 4 **C4-AP**, o el 5-(2-fosforil-1,4-dioxobutano) (**DOB**),<sup>81</sup> el cual inhibe la reparación del ADN por la ADN polimerasa  $\beta$ .<sup>82</sup>

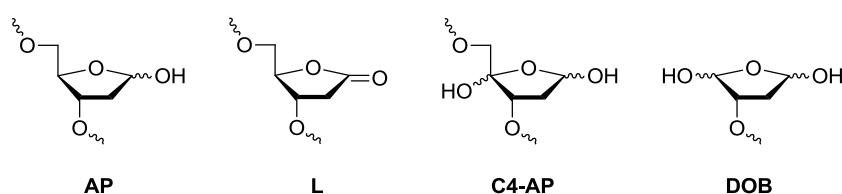
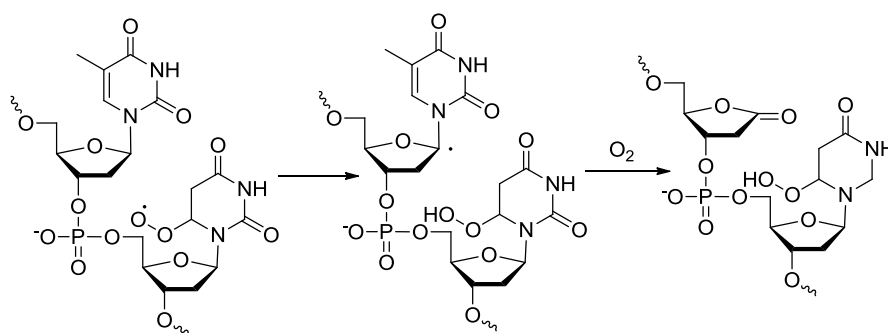


Figura 19

El compuesto **L** se forma por mediación de radicales hidroxilo ( $\text{HO}\cdot$ ) inducidos por la radiación  $\gamma$ . Éstos reaccionan con las bases nitrogenadas generando un radical en la posición C-5 que es susceptible de reaccionar con oxígeno molecular. Los radicales peróxido resultantes abstraen el hidrógeno de la posición 1' permitiendo, tras la acción del oxígeno molecular, la oxidación de esa posición en los nucleótidos (Esquema 15).<sup>83</sup>



Esquema 15

<sup>81</sup> Guan, L.; Greenberg, M. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 5004–5005.

<sup>82</sup> a) Balasubramanian, B.; Pogozeleski, W. K.; Tullius, T. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, *95*, 9738–9743. b) Miaskiewicz, K.; Osman, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 232–238. c) Roginskaya, M.; Razskazovskiy, Y.; Bernhard, W. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 6210–6213.

<sup>83</sup> a) Hong, I. S.; Carter, K. N.; Sato, K.; Greenberg, M. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *29*, 4089–4098. b) Carter, K. N.; Greenberg, M. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13376–13378.

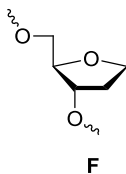
## Antecedentes

---

### 2.1.2.2. Introducción de sitios AP en oligonucleótidos sintéticos: aplicaciones

Cuando los sitios AP o sus derivados oxidados no son reparados por las AP endonucleasas, las ADN polimerasas incorporan generalmente un nucleótido de adenina en la cadena complementaria.<sup>84</sup> La transcripción de este ADN dañado daría lugar a la biosíntesis de un ARN alterado, que se traduce en proteínas que no tienen una adecuada actividad biológica y que pueden ser foco de enfermedades. Por tanto, la preparación de ADN sintéticos que poseen sitios AP permite comprender los efectos patológicos que estas lesiones tienen en el desarrollo, por ejemplo, del cáncer y también sirven para estudiar los mecanismos de reparación del ADN.<sup>85</sup>

Sin embargo, los sitios AP mostrados en la Figura 19, y que se forman de manera espontánea o inducida en los sistemas biológicos, son químicamente inestables. El derivado **L** posee hidrógenos ácidos en posición  $\alpha$  al carbonilo, mientras que **AP**, **C4-AP** y **DOB** existen en equilibrio con sus correspondientes formas abiertas –aldehídos–, que también poseen hidrógenos ácidos que favorecen reacciones de  $\beta$ -eliminación, rompiendo la cadena de oligonucleótido. Esto dificulta enormemente la preparación de oligonucleótidos que contengan estas lesiones abásicas, impidiendo el estudio de sus efectos. Consecuentemente, varios grupos de investigación han diseñado análogos sintéticos de los sitios **AP** naturales que sean capaces de mimetizar su función. Numerosos estudios demuestran que el monómero 1,2-didesoxirribosa (**F**, Figura 20) –derivado del THF– mimetiza extraordinariamente los sitios **AP**, **L** y **C4-AP**, siendo además químicamente estable.<sup>86</sup>



**Figura 20.** Análogo estructural mimético de los sitios AP.

<sup>84</sup> a) Strauss, B. S. *DNA repair* **2005**, 4, 951-957. b) Taylor, J. –S. *Mutat. Res.* **2002**, 510, 55-70.

<sup>85</sup> Boiteux, S.; Guillet, M. *DNA repair* **2004**, 3, 1-12.

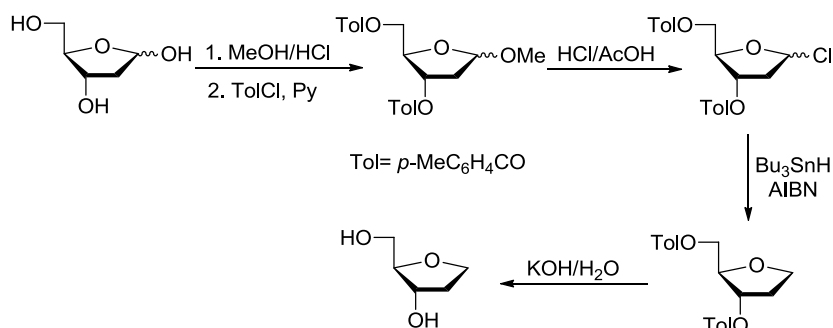
<sup>86</sup> a) Millican, T. A.; Mock, G. A.; Chauncey, M. A.; Patel, T. P. Eaton, M. A.; Gunning, J.; Cutbush, S. D.; Neidele, S.; Mann, J. *Nucleic Acids Res.* **1984**, 12, 7435-7453. b) Takeshita, M.; Chang, C.-N.; Johnson, F.; Will, S.; Grollman, A. P. *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 10171-10179. c) Eritja, R.; Walker, P. A.; Randall, S. K.; Goodman, M. F.; Kaplan, B. E. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **1987**, 6, 803-814.

### 2.1.2.3. Síntesis del monómero 1,2-didesoxirribosa

El amplio abanico de usos del glicial furanoide 1,2-didesoxirribosa como precursor en la síntesis de compuestos con importantes propiedades biológicas,<sup>87</sup> ha despertado un enorme interés por el desarrollo de métodos para su preparación a escala industrial.

En la bibliografía se encuentran descritos dos métodos para la preparación de este monómero:

**a) Síntesis a partir de la 2-desoxirribosa.** Es el sustrato de partida utilizado en la mayoría de los métodos descritos.<sup>86b,88</sup> En el procedimiento sintético más empleado en la bibliografía, el grupo hidroxilo anomérico de la 2-desoxirribosa se transforma en cloro, previa protección de los hidroxilos de las posiciones 3 y 5 como ésteres de toluoilo. Seguidamente, se reduce el enlace carbonohalógeno en las condiciones de Barton y se hidrolizan los grupos éster (Esquema 16).



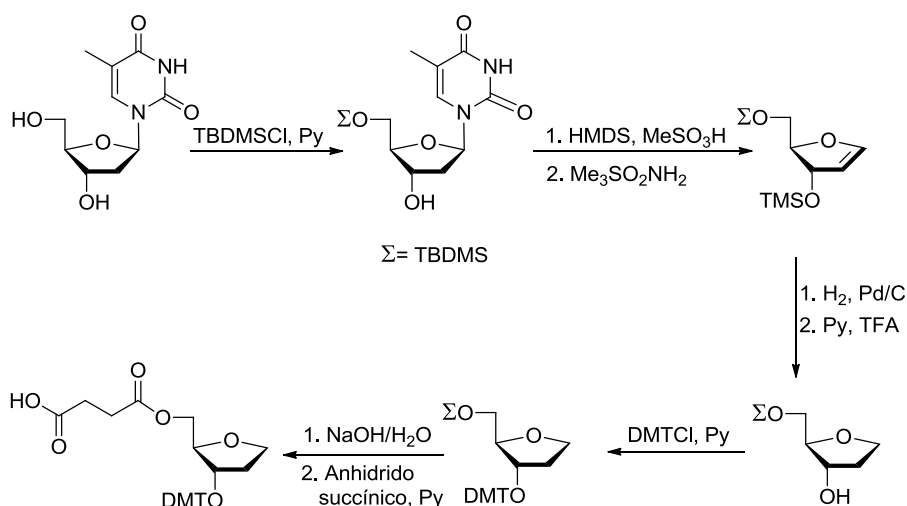
Esquema 16

<sup>87</sup> a) Lin, Y.-I.; Bitha, P.; Sakya, S. M.; Lang, S. A., Jr.; Yang, Y.; Weiss, W. J.; Petersen, P. J.; Bush, K.; Testa, R. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 3063–3068. b) Lin, Y.-I.; Bitha, P.; Sakya, S. M.; Strohmeyer, T. W.; Li, Z.; Lee, V. J.; Lang, S. A., Jr.; Yang, Y.; Bhachech, N.; Weiss, W. J.; Petersen, P. J.; Jacobus, N. V.; Bush, K.; Testa, R. T.; Tally, F. P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 1671–1676. c) Chen, J. J.; Walker, J. A.; Liu, W.; Wise, D. S.; Townsend, L. B. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 8363–8366. d) Hacksell, U.; Daves, G. D., Jr. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 2870–2976. e) Ireland, R. E.; Thaisrivongs, S.; Varier, N.; Wilcox, C. S. *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 48–61. f) Kalnik, M. W.; Chang, C. N.; Grollman, A. P.; Patel, D. J. *Biochemistry* **1988**, *27*, 924–931. g) Ravikumar, V. T.; Wyrzykiewicz, T. K.; Cole, D. L. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* **1994**, *13*, 1695–1706.

<sup>88</sup> a) Chenault, H. K.; Mandes, R. F. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 11033–11038. b) Plavec, J.; Tong, W.; Chattopadhyaya, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 9734–9746. c) Iyer, P. R.; Uznanski, B.; Boal, J.; Storm, C.; Egan, W.; Matsukura, M.; Broder, S.; Zon, G.; Wilk, A.; Koziolkiewicz, M.; Stec, W. J. *Nucleic Acids. Res.* **1990**, *18*, 2855–2859.

## Antecedentes

**b) Síntesis a partir de nucleósidos.** En 1984, Millican *et al* describen la síntesis de 1,2-didesoxirribosa a partir de 2'-desoxiadenosina mediante un procedimiento que implica la ruptura del enlace glicósidico.<sup>89</sup> En 1994, Pedersen *et al*<sup>90</sup> y, posteriormente, en el año 2002, Beigelman *et al*<sup>91</sup> emplean timidina como sustrato de partida a través de una estrategia similar. Es un método que implica el empleo de grupos protectores de silicio y la pérdida de una parte importante de la molécula para generar un enol éter cíclico, que posteriormente se hidrogena. Tras la manipulación de los grupos hidroxilo con varios grupos protectores se obtiene un derivado ortogonalmente diprotegido de la 1,2-didesoxirribosa para su introducción en oligonucleótidos (Esquema 17).



Esquema 17

### 2.1.2.4. Otras aplicaciones de la introducción de sitios AP

Aunque la existencia de sitios abásicos no reparados en el ADN puede tener efectos patológicos, su presencia en diversos tipos de

<sup>89</sup> a) Randall, S. K.; Eritja, R.; Kaplan, B.; Petruska, J.; Goodman, M. F. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 6864–6870. b) Millican, T. A.; Mock, G. A.; Chauncey, M. A.; Patel, T. P.; Eaton, M. A. W.; Gunning, J.; Cutbush, S. D.; Neidle, S.; Mann, J. *Nucleic Acids Res.* **1984**, *12*, 7435–7453.

<sup>90</sup> Larsen, E.; Jorgensen, P. T.; Mamdouh, A. S.; Pedersen, E. B. *Synthesis* **1994**, 1037–1038.

<sup>91</sup> a) Serebryany, B.; Beigelman, L. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2003**, *22*, 1305–1307. b) Serebryany, V.; Karpeisky, A.; Matulic-Adamic, J.; Beigelman, L. *Synthesis*, **2002**, *12*, 1652–1654.

oligonucleótidos sintéticos tiene potenciales aplicaciones terapéuticas.

Una de las mayores limitaciones que presenta el uso de oligonucleótidos *antisense*, ribozimas y siRNA en terapia génica es su alta inestabilidad debido a la facilidad que tienen las nucleasas celulares para degradarlos. Se han utilizado numerosas estrategias para incrementar la resistencia frente a las nucleasas de los oligonucleótidos sintéticos. Una de las más exitosas es la introducción de un monómero de 1,2-didesoxirribosa en el extremo 3' terminal, ya que no son reconocidos por las exonucleasas, aumentando así su estabilidad en las células.<sup>92</sup>

---

<sup>92</sup> a) Morrissey, D. V.; Blanchard, K.; Shaw, L. ; Jensen, K.; Lockridge, J. A.; Dickinson, B.; McSwiggen, J. A.; Vargeese, C.; Bowman, K.; Shaffer, B. a.; Polisky, B. A.; Zinnen, S. *Hepatology* **2005**, *41*, 1349-1355. b) Usman, N.; Beigelman, L. McSwiggen, J. A. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1996**, *1*, 527-533.





## **2.2. OBJETIVOS**

La existencia de sitiosapurínicos/apirimidínicos (**AP**) es la lesión más común presente en el ADN. El monómero 1,2-didesoxirribosa (**F**) mimetiza los sitios abásicos que se generan de forma espontánea o inducida, presentando una mayor estabilidad química.

Los métodos descritos en la bibliografía en los que sintetizan precursores adecuadamente protegidos de **F** para su introducción en oligonucleótidos utilizan tediosas etapas de protección-desprotección con reactivos de silicio, que son tóxicos y corrosivos, lo que dificulta el escalado. Además, se utiliza una estrategia *destruktiva*, en la cual partiendo de un nucleósido se desprende una porción considerable de la molécula, como es la base nucleosídica, para sintetizar la 1,2-didesoxirribosa. Por estas razones, el objetivo es diseñar un método más eficiente, con mayor eficiencia atómica (no-destruktivo) y fácilmente escalable partiendo de sustratos de partida sencillos y fácilmente accesibles, ya que se sintetizan a escala de toneladas como precursores para la síntesis de 2'-desoxinucleósidos. En este capítulo, se explorará el potencial de la catálisis enzimática para la manipulación de la 1,2-desoxirribosa con dos grupos protectores ortogonales en la posición que se desee de la molécula.

El empleo de biocatalizadores para la introducción selectiva de grupos protectores en los dos hidroxilos que presenta el monómero **F**, se pretende que disminuya el número de etapas, reactivos y coste respecto a los métodos descritos hasta el momento.



### **2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Como se ha comentado en la introducción y en el primer capítulo de esta memoria, la lipasa de *Candida antarctica* B (CAL-B) cataliza selectivamente las reacciones de acilación e hidrólisis en la posición 5' de nucleósidos, mientras que la lipasa de *Pseudomonas cepacia* (PSL-C) muestra una inusual selectividad hacia el grupo hidroxilo secundario de la posición 3'. El estudio de las reacciones de acilación enzimática sobre el monómero de 1,2-didesoxi-D-ribosa, o de hidrólisis sobre derivados diacilados, permitirá –además del principal objetivo de obtener compuestos ortogonalmente protegidos del monómero para su introducción en oligonucleótidos- estudiar el efecto de la presencia de la base nitrogenada en los procesos de acilación/hidrólisis selectiva de 2'-desoxi-β-D-nucleósidos llevada a cabo por lipasas.

Comenzamos estudiando la hidrólisis enzimática de 3,5-di-*O-p*-toluoil-1,2-didesoxi-D-ribosa (**10**, Esquema 18), un intermedio de accesibilidad comercial muy utilizado en la síntesis de 2'-desoxinucleósidos, que se prepara de manera eficiente a partir del 1α-cloro-3,5-di-*O-p*-toluoil-2-desoxirribofuranosa.<sup>93</sup>

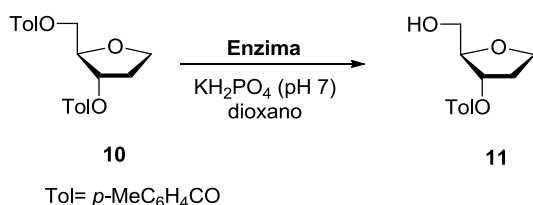
---

<sup>93</sup> El compuesto fue preparado siguiendo el método descrito en la referencia 88c. Se puede adquirir a *RI Chemical Inc.* (Orange, California, EE.UU.).

## Resultados y discusión

### 2.3.1. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE 3,5-DI-O-*p*-TOLUIOL-1,2-DIDESOXI-D-RIBOSA (**10**)

Para la hidrólisis enzimática de **10** se utilizaron inicialmente las lipasas que generalmente mejores resultados proporcionan cuando los sustratos son nucleósidos: PSL-C, CAL-B y CVL. Se emplea 1,4-dioxano como cosolvente y una disolución reguladora de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  para mantener el control del pH en torno a 7, que es el óptimo para estas enzimas. En el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del crudo de las reacciones se observa un claro apantallamiento de los protones en posición 5, pasando de 4.30 a 3.70 ppm, mientras que el hidrógeno en C-3 apenas sufre variación. Estos datos confirman la formación del producto **11** (Esquema 18).



Esquema 18

Tabla 6. Hidrólisis enzimática de 3,5-di-*O-p*-toluolil-1,2-didesoxi-D-ribosa.

Entrada	Enzima	<b>10</b> :Enz <sup>a</sup>	T (°C)	t (h)	Conv (%) <sup>b</sup>	<b>11</b> (%) <sup>b,c</sup>
1	CAL-B <sup>d</sup>	1:1	55	48	>97	>97
2	PSL-C <sup>e</sup>	1:2	50	2	>97	>97(95)
3	PSL-SD <sup>f</sup>	1:2	50	15	>97	>97
4	CVL <sup>g</sup>	1:0.25	50	1.5	>97	>97

<sup>a</sup>Relación **10**:enzima (p:p). <sup>b</sup>Calculado por  $^1\text{H}$ -RMN ( $\pm 3\%$  error). <sup>c</sup>Porcentaje de productos aislados entre paréntesis. <sup>d</sup>Lipasa Novozym 435. <sup>e</sup>Lipasa PS "Amano" inmovilizada sobre cerámica. <sup>f</sup>Crudo lipasa PS "Amano" SD. <sup>g</sup>Lipasa de *Chromobacterium viscosum*.

La lipasa CAL-B cataliza con total regioselectividad la hidrólisis del grupo acilo en C-5 de **10** tras 48 h de reacción a 55 °C, mostrando un comportamiento similar al que exhibe con 2'-desoxinucleósidos y dando lugar a la formación exclusiva de 3-*p*-*O*-toluolil-1,2-didesoxi-D-ribosa (**11**) (entrada 1, Tabla 6). El mismo patrón de regioselectividad se observa para la lipasa *Pseudomonas cepacia*, alcanzándose conversión completa en tiempos cortos de reacción (entradas 2 y 3, Tabla 6). El derivado **11** se obtiene puro con un 95% de rendimiento tras una sencilla extracción del crudo de reacción con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{NaHCO}_3(\text{ac})$ . Esta lipasa muestra un comportamiento diferente al que exhibe frente a

2'-desoxinucleósidos, en los que sorprendentemente hidroliza el grupo acilo correspondiente al hidroxilo secundario frente al primario. De este modo, queda patente que la presencia de la base nitrogenada es crucial en la unión del nucleósido al centro activo de la enzima.<sup>94</sup> La CVL también muestra total selectividad hacia la formación del derivado 3-O-acilo **11** en tan solo 1.5 h de reacción (entrada 4, Tabla 6). No obstante, se escoge la PSL-C en lugar de la CVL para la transformación de **10** en **11** con vista a llevar el proceso a gran escala. Esto es debido a que la PSL-C está inmovilizada y proporciona algunas ventajas tales como mayor estabilidad, reciclado, es fácilmente separada de la mezcla de reacción por filtración, evitando la contaminación del producto por la proteína, y presenta mayor homogeneidad de las distintas muestras comerciales. Además, el aislamiento de **11** se lleva a cabo mediante una simple extracción y el producto obtenido posee suficiente pureza sin necesidad de realizar una costosa cromatografía de columna. Por otra parte, el grupo toluilo en **11** parece ser un sustrato ideal para el reconocimiento de la lipasa. También facilita la detección en el UV y, lo más importante, favorece la extracción de **11** en disolventes orgánicos.

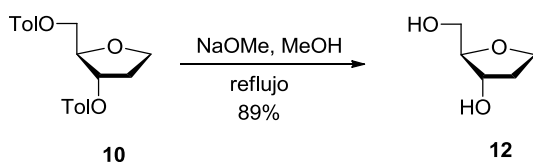
Es de destacar que **11** -un producto acilado en el hidroxilo menos reactivo- no podría ser obtenido en una sola etapa mediante métodos químicos convencionales, lo que vuelve a demostrar la utilidad de las lipasas para reducir el número de etapas en las rutas sintéticas.

### 2.3.2. ACILACIÓN ENZIMÁTICA DE 1,2-DIDESOXI-D-RIBOSA

Al igual que el compuesto 3-O-acilo de la 1,2-didesoxi-D-ribosa, el análogo acilado en la posición 5 también es un monómero útil para la síntesis de oligonucleótidos. Por ello, se decide preparar el derivado 5-O-acilo mediante una reacción de acilación enzimática de la 1,2-didesoxirribosa (**12**) aprovechando el comportamiento complementario que muestran las lipasas en las reacciones de acilación e hidrólisis. La 1,2-didesoxirribosa se sintetiza por tratamiento del diéster **10** con metóxido de sodio en metanol a reflujo, dando lugar a **12** con un 89% de rendimiento (Esquema 19).

<sup>94</sup> Lavandera, I.; Fernández, S.; Magdalena, J.; Ferrero, M.; Grewal, H.; Savile, C. K.; Kazlauskas, R. J.; Gotor, V. *ChemBioChem* **2006**, *7*, 693–698.

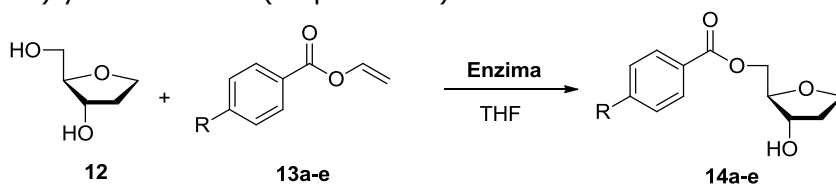
## Resultados y discusión



**Esquema 19**

Los ésteres de vinilo son los agentes de acilación más empleados en las reacciones de acilación enzimática de alcoholes con lipasas. Elegimos el benzoato de vinilo porque da lugar a compuestos visibles en el UV y fácilmente extraíbles en disolventes orgánicos. Además, es asequible comercialmente.

Para la acilación enzimática de **12** se emplean las lipasas inmovilizadas CAL-B y PSL. Para llevar a cabo este estudio, se disuelve la 1,2-didesoxirribosa en THF anhidro bajo atmósfera de nitrógeno y se trata con 2 equivalentes de benzoato de vinilo (**13a**) y CAL-B ó PSL (Esquema 20).



a, R= H; b, R= Me; c, R= OMe; d, R= NO<sub>2</sub>; e, R= F

**Esquema 20**

Ambas lipasas exhiben una excelente regioselectividad y catalizan la acilación del grupo hidroxilo primario aislándose exclusivamente el monómero 5-O-benzoil-1,2-dideoxirribosa (**14a**). Se observan tiempos de reacción más cortos con la lipasa PSL-C, obteniéndose **14a** con rendimiento prácticamente cuantitativo tras 3 h a 50 °C (entradas 1, 2 y 3, Tabla 7). Además, **14a** se ha aislado del crudo de reacción por precipitación y no ha sido necesaria una cromatografía de columna para su purificación. Es importante mencionar que se han utilizado menos equivalentes de benzoato de vinilo si comparamos esta reacción con un protocolo, previamente descrito en nuestro grupo de investigación, para la preparación de 5'-O-benzoil-2'-desoxinucleósidos.<sup>95</sup> En la transformación de **12** a **14a** no ha sido necesario utilizar un gran exceso de benzoato de vinilo para llevar la reacción a conversión

<sup>95</sup> García, J.; Fernández, S.; Ferrero, M.; Sanghvi, Y. S.; Gotor, V. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 1709-1712.

total. En el caso del carbohidrato **12** el tiempo de reacción es muy corto, sin que esta reactividad suponga una pérdida de selectividad.

**Tabla 7.** Acilación enzimática de 1,2-dideoxi-D-ribosa (**12**).<sup>a</sup>

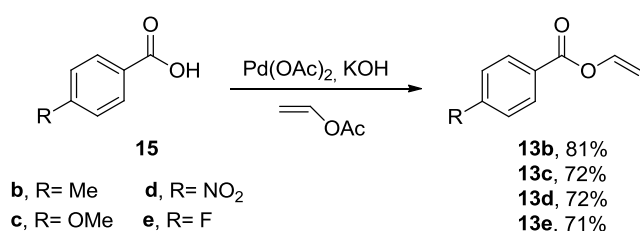
Entrada	R	Enzima <sup>b</sup>	T (°C)	t (h)	Conv. (%) <sup>c</sup>	<b>14</b> (%) <sup>c,d</sup>
1	H	CAL-B <sup>e</sup>	55	62	>97	>97
2	H	PSL-C <sup>f</sup>	50	3	>97	>97 (98)
3	H	PSL-IM <sup>g</sup>	50	3	>97	>97
4	Me	PSL-C <sup>f</sup>	50	3	>97	>97 (97)
5	Me	CAL-B <sup>e</sup>	55	65	42	>97
6	Me	CAL-B <sup>e</sup>	55	96	59	>97
7	Me	CAL-B <sup>e</sup>	55	168	85	>97
8	OMe	CAL-B <sup>e</sup>	55	96	32	>97
9	OMe	PSL-C <sup>f</sup>	50	26	>97	>97 (86)
10	NO <sub>2</sub>	CAL-B <sup>e</sup>	55	57	>97	>97
11	NO <sub>2</sub>	PSL-C <sup>f</sup>	50	0.5	>97	>97 (90)
12	F	CAL-B <sup>e</sup>	55	96	90	>97
13	F	PSL-C <sup>f</sup>	50	2.5	>97	>97 (86)

<sup>a</sup>Relación **12**:éster de vinilo es 1:2 equiv. <sup>b</sup>Relación **12**:CAL-B es 1:1 (p/p) y la relación **12**:PSL es 1:2 (p/p). <sup>c</sup>Calculado por <sup>1</sup>H-RMN ( $\pm 3\%$  error). <sup>d</sup>Porcentaje de producto aislado entre paréntesis. <sup>e</sup>Novozym 435. <sup>f</sup>Lipasa PS "Amano" inmovilizada sobre cerámica. <sup>g</sup>Lipasa PS "Amano" inmovilizada sobre diatomita.

Para demostrar la generalidad de este protocolo con otros derivados de acilo y estudiar la influencia de la naturaleza electrónica del donador de acilo **13** en la velocidad y selectividad de la reacción, se lleva a cabo la acilación enzimática de **12** con cuatro benzoatos de vinilo sustituidos en la posición *para* del anillo bencénico (**13b-e**). Estos ésteres de vinilo no son comerciales y fueron preparados en el laboratorio mediante una reacción de transferencia del grupo vinilo entre los correspondientes ácidos carboxílicos (**15b-e**) y acetato de vinilo catalizada por Pd(OAc)<sub>2</sub>.<sup>96</sup> En estas condiciones, se obtienen los ésteres (**13b-e**) con altos rendimientos (71-82%) (Esquema 21).

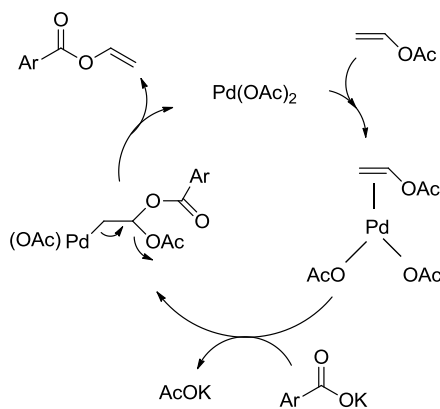
<sup>96</sup> Lobell, M.; Schneider, M. P. *Synthesis* **1994**, 375-377.

## Resultados y discusión



**Esquema 21**

El mecanismo de la reacción puede explicarse mediante la coordinación del  $\text{Pd(OAc)}_2$  al doble enlace C-C del acetato de vinilo, lo que invierte la reactividad de la olefina, que pasa a ser deficiente electrónicamente y susceptible de recibir ataques nucleófilos. Posteriormente, ocurre una reacción de inserción o carbopaladación promovida por el ataque del carboxilato al carbono más electrófilo de la olefina. Por último, la  $\beta$ -eliminación del acetato da lugar a los ésteres de vinilo y a la recuperación del catalizador, que entra en un nuevo ciclo catalítico (Esquema 22).



**Esquema 22**

La acilación de **12** con *p*-metilbenzoato de vinilo (**13b**) transcurre con total regioselectividad hacia el grupo hidroxilo primario con ambas enzimas, CAL-B y PSL-C. Esta última lipasa proporciona reacciones considerablemente más rápidas, observándose conversión completa en tan sólo 3 h de reacción y aislándose **14b** con 97% de rendimiento (entrada 4, Tabla 7). Con el fin de optimizar las condiciones para la CAL-B, se emplean tiempos más largos de reacción. Sin embargo, se alcanza una conversión máxima del 85% tras 168 h a 55 °C y el proceso no evoluciona aunque se deje más tiempo (entradas 5-7, Tabla 7).



CAL-B y PSL-C exhiben también excelente selectividad cuando el agente de acilación es *p*-metoxibenzoato de vinilo (**13c**), aunque CAL-B proporciona conversiones más bajas (entrada 8, Tabla 7). El agente de acilación **13c** contiene un grupo donador de electrones que disminuye la velocidad de la reacción de acilación y origina una menor proporción del derivado acilado, en comparación con el benzoato de vinilo (**13a**) o el *p*-metilbenzoato de vinilo (**13b**). Se observa el mismo efecto con la PSL-C; sin embargo, esta lipasa cataliza la acilación de **12** con conversión total tras 26 h a 50 °C (entrada 9, Tabla 7).

Es interesante destacar que la acilación es muy rápida cuando se utiliza *p*-nitrobenzoato de vinilo (**13d**), un éster de vinilo con un grupo electroattractor en el anillo aromático. Ambas lipasas transforman selectivamente a la 1,2-didesoxirribosa en el derivado 5-*O-p*-nitrobenzoilo **14d** (entradas 10 y 11, Tabla 7). La PSL-C proporciona dicho compuesto con un 90% de rendimiento en tan sólo 0.5 h.

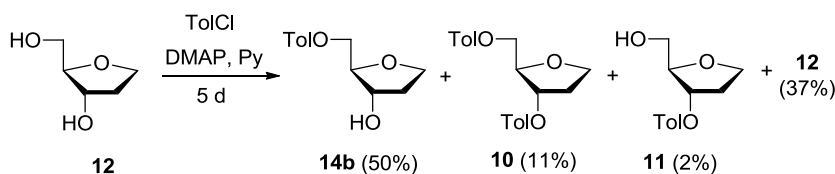
Con el fin de reforzar el estudio de la influencia del sustituyente en posición *para* en la reacción de acilación enzimática, se lleva a cabo el proceso con *p*-fluorobenzoato de vinilo (**13e**). La presencia de un grupo desactivante más débil en la posición 4 del grupo benzoilo origina tiempos de reacción más largos que el derivado nitro (entradas 12 y 13 vs. entradas 10 y 11, Tabla 7), pero significativamente más cortos que con los sustituyentes donadores metilo o metoxi.

En conjunto, con todos los enol ésteres estudiados se ha observado la acilación regioselectiva de la posición 5, obteniéndose condiciones de reacción más adecuadas con la PSL-C que con la CAL-B. Debido a que las conversiones son mejores y los tiempos de reacción más cortos empleando la PSL-C, el aislamiento de los productos **14a-e** se realiza en las reacciones catalizadas por esta lipasa. Para ello, una vez que termina la reacción, se filtra la enzima en placa y se realiza una extracción con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/NaHCO<sub>3</sub> (ac). Para aquellos casos en que los agentes de acilación son volátiles (**13a-b** y **13e**), el exceso de éster de vinilo se elimina en la bomba rotatoria a 60 °C, dando lugar a los productos **14a-b** y **14e** con un elevado grado de pureza, sin una posterior purificación, y con excelentes rendimientos. Cuando los ésteres de vinilo son sólidos (**13c-d**), tras la extracción se realiza una cromatografía de columna para separar los productos **14c-d** del exceso de agente de acilación.

Es de destacar que la acilación química convencional de **12** con un cloruro de ácido no es selectiva y proporciona mezclas de

## Resultados y discusión

productos acilados. A modo de comparación, se lleva a cabo la acilación de **12** con 1.5 equivalentes de cloruro de *p*-metilbenzoílo en piridina y DMAP como catalizador, dando lugar tras 5 días de reacción a una mezcla de productos mono y diacilados (Esquema 23). Además, el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del crudo de reacción muestra señales correspondientes a un 37% de producto de partida sin reaccionar. Estos resultados son indicativos de que la síntesis regioselectiva de los compuestos **14a-e** no podría conseguirse mediante acilación química convencional.



Esquema 23

### 2.3.3. ESCALADO DEL PROCESO DE ACILACIÓN ENZIMÁTICA. RECICLADO DE LA PSL-C

Los excelentes resultados obtenidos en la acilación regioselectiva de la 1,2-dideoxi-D-ribosa (**12**) catalizada por PSL-C nos llevaron a optimizar el proceso pensando en su potencial aplicación industrial. Así, aumentamos la cantidad del sustrato **12** hasta 5 mmol y la concentración de la reacción de 0.2 M a 1 M, mientras que se disminuye la cantidad de PSL-C hasta una relación 1:1 en peso respecto al sustrato de partida y se utiliza tan sólo 1.1 equivalentes de benzoato de vinilo (comercial) para reducir los costes del proceso.

En estas nuevas condiciones, en las que se rebaja notoriamente la carga de enzima y agente de acilación, el sustrato **12** se transforma completamente, tras 7.5 h de reacción, en el derivado acilado 5-*O*-benzoil-1,2-dideoxi-D-ribosa (**14a**), que se aísla con un 96% de rendimiento mediante una simple extracción del crudo de reacción (entrada 1, Tabla 8).

Además, debido a que la PSL-C puede recuperarse por simple filtración una vez concluida la reacción enzimática, nos planteamos su reutilización, analizando el tiempo de reacción y la conversión alcanzada tras cada ciclo de reciclado. Para aumentar la actividad de la lipasa se reactiva mediante hidratación. Para ello, la PSL-C se trata con agua, se filtra y se seca en vacío. Se realizan cinco ciclos catalíticos consecutivos, en los cuales la PSL-C exhibe el mismo comportamiento y la única excepción es que se requieren tiempos más largos de reacción. En el segundo ciclo se alcanza una

conversión total en 8.5 h (entrada 2, Tabla 8) y se obtiene el compuesto 5-O-acilo **14a** con 96% de rendimiento, resultados que se repiten para el tercer ciclo, con la única diferencia del aumento en el tiempo necesario para alcanzar la conversión completa, que pasa a ser de 26 h (entrada 3, Tabla 8). En el cuarto y quinto ciclo catalítico aumentan los tiempos de reacción (32 h y 54 h, respectivamente) y la conversión se estanca en torno al 90%, lo que sólo supone una ligera pérdida de rendimiento (entradas 4 y 5, Tabla 8). No obstante, la existencia en el crudo de reacción de un pequeño porcentaje del producto de partida **12** no constituye un inconveniente al separarse fácilmente del producto acilado **14a** en el proceso extracción dada su alta solubilidad en la fase acuosa. Los rendimientos tras cada reciclado son excelentes (86-96%).

**Tabla 8.** Estudio de reciclado de la PSL-C en la acilación de **12**.<sup>a</sup>

Ciclo	t (h)	Conv. (%) <sup>b</sup>	<b>15a</b> (%) <sup>c</sup>
1	7.5	>97	96
2	8.5	>97	96
3	26	>97	94
4	32	91	86
5	54	89	86

<sup>a</sup>Reacción a escala de 5 mmol de **12** a 50 °C, concentración 1 M en THF, 1.1 equiv de **13a**. <sup>b</sup>Calculada por 1H-RMN ( $\pm 3\%$  error). <sup>c</sup>Rendimiento de producto aislado.

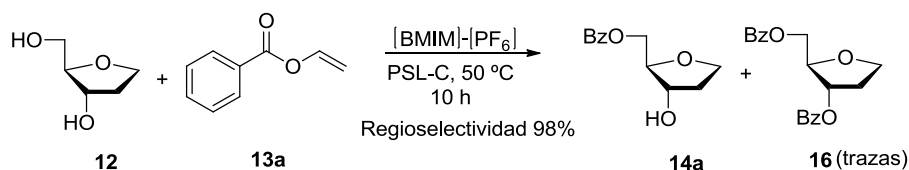
#### 2.3.4. ACILACIÓN DE 1,2-DIDESOXI-D-RIBOSA CON LÍQUIDOS IÓNICOS CATALIZADA POR PSL-C

Los líquidos iónicos han demostrado ser un medio muy atractivo en el campo de la biocatálisis.<sup>97</sup> El empleo de estos nuevos disolventes presenta beneficios medioambientales al reducir la generación de residuos, eliminando las pérdidas de disolvente por evaporación, y el consumo de energía, ya que en el aislamiento de los productos se elimina la etapa de evaporación del disolvente. Por tanto, se estudia el proceso de acilación de 1,2-didesoxi-D-ribosa catalizado por la PSL-C en 1-butil-3-metilimidazolio hexafluorofosfato [BMIM]-[PF<sub>6</sub>], y se compara este proceso con el que se realiza en THF como disolvente. La acilación de **12** con 1.1 equivalentes de benzoato de vinilo en [BMIM]-[PF<sub>6</sub>] a 50 °C catalizada por la PSL-C transcurre con alta regioselectividad en 10

<sup>97</sup> de María, P. D.; Maugeri, Z. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15*, 220-225.

## Resultados y discusión

h. En el espectro de  $^1\text{H-RMN}$  del crudo de la reacción sólo se observa un 2% del producto dibenzoilado **16** (Esquema 24).



Esquema 24

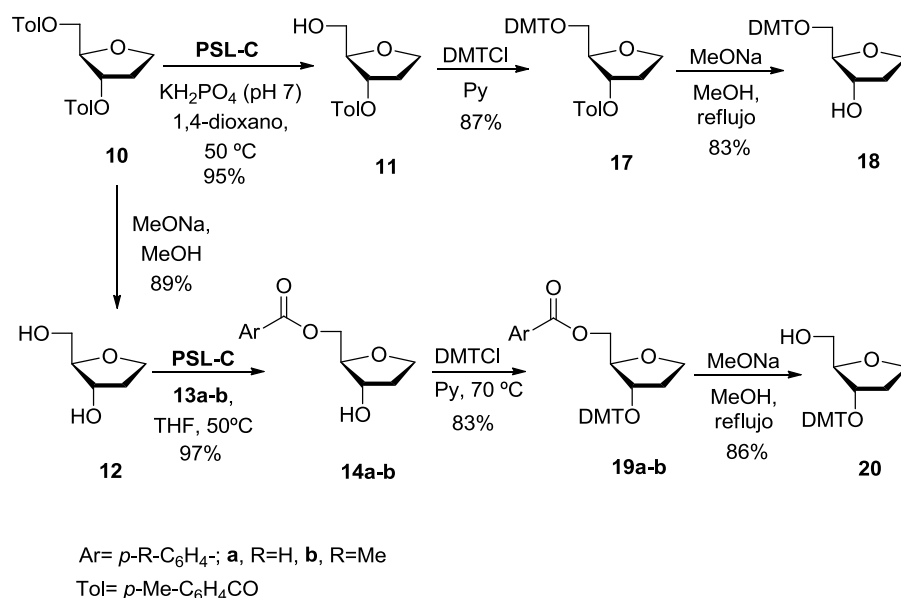
### 2.3.5. SÍNTESIS QUIMIOENZIMÁTICA DE 3-O-DMT- Y 5-O-DMT-1,2-DIDESOXI-D-RIBOSA

La introducción del monómero de 1,2-didesoxi-D-ribosa (**12**) en oligonucleótidos se lleva a cabo mediante su transformación en el correspondiente 5-O-DMT-3-fosforamidito o -H-fosfonato. Sin embargo, los oligonucleótidos también pueden sintetizarse de forma inversa, es decir, que la cadena crezca en sentido  $5' \rightarrow 3'$ .<sup>98</sup> Esta metodología no ha sido muy desarrollada, debido probablemente a la dificultad de obtener los precursores correspondientes 3'-O-DMT nucleósidos, en los que el grupo voluminoso dimetoxitritilo ha de introducirse en el grupo hidroxilo más impedido y menos reactivo del nucleósido. La catálisis enzimática proporciona intermedios sintéticos muy versátiles que pueden ser utilizados en la preparación de otras moléculas más complejas. De esta forma, nos planteamos diseñar una estrategia quimioenzimática para la preparación de 3-O-DMT- y 5-O-DMT-1,2-didesoxi-D-ribosa como precursores clave para la síntesis de los correspondientes amiditos en la síntesis de oligonucleótidos.

La síntesis de ambos monómeros se realiza a partir de un sustrato de partida común, el derivado 3,5-di-O-*p*-toluoil **10**, y de una manera sencilla y directa (Esquema 25). Para ello, se transforma **10** en **11** mediante una reacción de hidrólisis catalizada por la PSL-C (Sección 2.3.1), obteniéndose el derivado 3-O-*p*-toluoil **11** con 95% de rendimiento. La tritilación de **11** con DMTCl en piridina origina el compuesto **17**, que se encuentra ortogonalmente protegido, pudiendo desprotegerse selectivamente en función de las condiciones de reacción. Así, el grupo toluoil en posición 3 se desprotege selectivamente frente al grupo DMT por tratamiento con metóxido de sodio en metanol para generar 5-O-DMT-1,2-didesoxi-D-ribosa (**18**) con un 83% de rendimiento.

<sup>98</sup> Claebroe, C. D.; Gao, R.; Hecht, S. M.; *Nucleic Acids Res.* **2003**, *19*, 5685-5691

Para la preparación del derivado 3-*O*-DMT se sigue una estrategia complementaria a la indicada para la síntesis de **18**. Se parte del mismo sustrato de partida **10**, que se trata con metóxido de sodio en metanol para desproteger los dos grupos éster y obtener **12**. La acilación enzimática totalmente regioselectiva de **12** en el grupo hidroxilo primario con los agentes de acilación benzoato de vinilo (**13a**) o *p*-metilbenzoato de vinilo (**13b**) conduce a la formación de **14a-b** con un 97% de rendimiento para ambos casos. Estos derivados 5-*O* protegidos se tratan con DMTCl a 70 °C para dar lugar a **19a-b**. La desprotección selectiva del grupo éster de la posición 5 frente al grupo DMT se lleva a cabo por tratamiento con metóxido de sodio aislándose, con un 86% de rendimiento, el monómero 3-*O*-DMT-1,2-didesoxi-D-ribosa (**20**) (Esquema 25).



**Esquema 25.** Síntesis quimioenzimática de 3-DMT y 5-DMT-1,2-dideoxi-D-ribosa.



## **2.4. CONCLUSIONES**

En este capítulo se han sintetizado diferentes monómeros ortogonalmente protegidos de la 1,2-didesoxi-D-ribosa para su introducción en oligonucleótidos como precursores abásicos. Las lipasas de *Candida antarctica B* y de *Pseudomonas cepacia* catalizan la hidrólisis totalmente regioselectiva del diéster 3,5-di-O-toluoil-1,2-didesoxi-D-ribosa dando lugar al derivado 3-O-toluilo. El derivado protegido en la posición 5 se obtiene por un proceso complementario de acilación enzimática directa de la 1,2-didesoxi-D-ribosa. Es de destacar que el aislamiento de los productos se realiza mediante una sencilla extracción, evitando una costosa y tediosa cromatografía de columna. Además, la acilación se ha llevado a cabo empleando varios benzoatos de vinilo que presentan diferentes sustituyentes en la posición 4 del anillo de benceno, observándose claramente que tanto la velocidad como la conversión de la reacción están determinadas por la naturaleza electrónica del donador de acilo. Por otra parte, se ha realizado un escalado de la reacción de acilación de la 1,2-didesoxirribosa con benzoato de vinilo catalizada por la lipasa de *Pseudomonas cepacia*, reduciendo en la medida de lo posible la carga de biocatalizador y agente de acilación. Se ha llevado a cabo con éxito el reciclado de la enzima, lo que hace el proceso más económico para su aplicación industrial.

Además, se ha desarrollado una estrategia quimioenzimática divergente para obtener los derivados 5-O-DMT- y 3-O-DMT-1,2-didesoxirribosa a partir de 3,5-di-O-toluoil-1,2-didesoxi-D-ribosa. Especialmente, el derivado 3-O-DMT es difícil de obtener por métodos químicos convencionales y es muy útil para la síntesis inversa de oligonucleótidos.

El protocolo descrito proporciona una ruta escalable, con eficiencia atómica y de bajo impacto ambiental para la síntesis de precursores de fosforamiditos ortogonalmente protegidos para su introducción en oligonucleótidos que contienen la lesión abásica tetrahidrofurano.





## **2.5. PARTE EXPERIMENTAL**

### **2.5.1. DISOLVENTES, REACTIVOS GENERALES Y TÉCNICAS DE ANÁLISIS**

Los reactivos, métodos generales y técnicas de análisis han sido detallados en la Parte Experimental del Capítulo 1 con las siguientes excepciones.

El compuesto 3,5-di-O-toluoil-1,2-didesoxi-D-ribosa ha sido adquirido a la empresa Sapala (Hyderabad, India). El cloruro de dimetoxitritilo (DMTCl) ha sido suministrado por Aldrich. Además de las enzimas empleadas en el primer capítulo, se han utilizado las lipasas: de *Pseudomonas cepacia* inmovilizada en diatomita (PSL-IM, 943 U/g) y de *Pseudomonas cepacia* como un preparado de enzima crudo sobre dextrina (PSL-SD, 24700 U/g) que fueron donadas por la compañía *Amano Europe*.

Como revelador en la CCF para el seguimiento de las reacciones enzimáticas de acilación e hidrólisis se utiliza una mezcla 1:4 de ácido acético y ácido sulfúrico.

Las masas de alta resolución utilizando ESI<sup>+</sup> como fuente de ionización se realizaron en un aparato Bruker MicroTOF-Q con un analizador híbrido Cuadrupolo-Tiempo de Vuelo (Q-TOF). Cuando se empleó EI como fuente de ionización, las masas de alta resolución se realizaron en un aparato Micromass Autospec.

## **Parte experimental**

---

Los espectros de resonancia magnética nuclear de  $^{19}\text{F}$  se realizaron en un espectrómetro Bruker AV-300 (282 MHz para  $^{19}\text{F}$ ).

### **2.5.2. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES**

#### **Procedimiento general para la hidrólisis enzimática de 3,5-di-O-p-toluoil-1,2-didesoxi-D-ribosa (10). Síntesis de 11.**

A una disolución de **10** (400 mg, 1.13 mmol) en 1,4-dioxano (3.7 mL) se adiciona una disolución de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.15 M de pH 7 (7.4 mL) y la correspondiente lipasa (relación **10**:enzima, temperatura y tiempo de reacción se indica en la Tabla 6). Una vez terminada la reacción, se evaporan los disolventes y el residuo se extrae con  $\text{NaHCO}_3$  (ac.)/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Las fases orgánicas se juntan y se secan sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Tras evaporar el  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  se obtiene **11** (278 mg, 95%).

#### **Hidrólisis de 3,5-di-O-p-toluoil-1,2-didesoxi-D-ribosa (10). Síntesis de 12.**

A una disolución de **10** (5g, 14.1 mmol) en MeOH (28 mL) se adiciona NaOMe (1.9 g, 35.25 mmol). La reacción se sigue por TLC hasta la total desaparición del producto de partida, lo que ocurre en 2 h. El MeOH se evapora a vacío y el residuo se purifica por cromatografía de columna (2-10% MeOH- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) obteniéndose **11** (1.48 g, 89%) como un aceite incoloro.

#### **Procedimiento general para la síntesis de los benzoatos de vinilo 13b-e.**

Una mezcla del correspondiente ácido carboxílico (**15b-e**) (5 mmol), acetato de vinilo (50 mL),  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  (0.8 mmol, 1.6 mmol para 12d) y KOH (5 mmol, 275 mg) se agita durante 16 h a temperatura ambiente. Tras filtración sobre celita, el acetato de vinilo se evapora a vacío y el residuo se purifica por cromatografía de columna (20% AcOEt/hexano) para obtener los ésteres de vinilo **13a-e** con los rendimientos indicados en el Esquema 21.

#### **Procedimiento general para la acilación enzimática de 12. Síntesis de 14a-e.**

A un matraz erlenmeyer se adiciona **12** (59 mg, 0.5 mmol), el correspondiente éster de vinilo (1 mmol) y PSL-C (118 mg) en THF anhidro. La reacción se agita a 50 °C y 250 rpm durante 3 h. La

enzima se filtra en placa, se lava con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y el filtrado se extrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/NaHCO<sub>3</sub>. Las capas orgánicas se combinan, se secan sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evapora el disolvente. Para **14a-b** y **14e** el exceso de éster de vinilo se elimina en la bomba rotatoria a 60 °C. Para **14c-d** el residuo resultante tras la extracción se purifica por cromatografía de columna (10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Los rendimientos de cada producto **14a-e** se recogen en la Tabla 7.

#### **Procedimiento para el reciclado de la PSL-C. Escalado de la síntesis de 14a.**

Una suspensión de **12** (590 mg, 5 mmol), benzoato de vinilo (814 mg, 5.5 mmol) y PSL-C (1.18 g) en THF anhidro y bajo atmósfera de nitrógeno se calienta a 50 °C con agitación orbitalica (250 rpm) durante 7.5 h. La PSL-C se filtra y se lava con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. El filtrado se extrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y NaHCO<sub>3</sub> (ac.), las fases orgánicas se secan con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y el disolvente se evapora a vacío. El pequeño exceso de agente de acilación se elimina en la bomba rotatoria a 60 °C obteniéndose **14a** con un 97% de rendimiento. El proceso se repite cuatro ciclos utilizando la misma PSL-C. Tras cada reacción la enzima se lava con agua destilada y se seca en alto vacío a temperatura ambiente.

#### **Procedimiento general para la introducción del grupo DMT. Síntesis de 17 y 19a-b.**

A una disolución del correspondiente derivado 3' o 5' protegido (**11** o **14a-b** respectivamente) (0.34 mol) en piridina anhidra (3.4 mL) se adiciona DMTCl (127 mg, 0.37 mmol). La reacción se agita a temperatura ambiente para la síntesis de **17** y a 70 °C para la preparación de **19a-b** y se monitoriza por TLC (30% hexano/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) hasta completa desaparición del producto de partida. Una vez concluida, se evapora la piridina a presión reducida y la purificación se lleva a cabo por columna cromatográfica en gel de sílice neutro 60 Å (32-63 mm) pH 7 (20% hexano/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) para obtener **17** ó **19a-b** como sólidos blancos en los rendimientos indicados en el Esquema 25.

#### **Procedimiento general para la desprotección de los grupos acilo en 16 y 18a-b. Síntesis de 18 y 20.**

El correspondiente derivado **17** o **19a-b** (0.19 mmol) se disuelve en MeOH anhidro (2.0 mL) y se adiciona NaOMe (21 mg, 0.38 mmol) a temperatura ambiente. Posteriormente, la reacción se agita a reflujo durante 2 h. Cuando la reacción finaliza, el MeOH

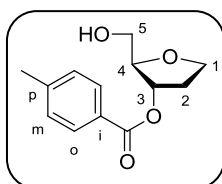
## Parte experimental

se evapora y el residuo se purifica por cromatografía de columna (40% AcOEt/hexano) para obtener **18** (83%) o **20** (86%) como un sólido blanco.

### 2.5.3. DATOS EXPERIMENTALES

A continuación se recogen los datos experimentales que han permitido la caracterización de los compuestos. La numeración empleada en la asignación de los espectros de resonancia magnética nuclear está indicada en la figura que acompaña a cada compuesto.

### 3-O-toluoil-1,2-didesoxi-D-ribosa (**11**)



**Fórmula molecular:** C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>O<sub>4</sub>

**R<sub>f</sub>** (10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.52

**Pf:** 88-90 °C (sólido blanco)

**IR** (KBr):  $\nu$  3460, 3055, 2987, 1713, 1612 cm<sup>-1</sup>

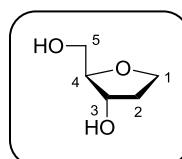
**<sup>1</sup>H RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  2.23 (m, 2H, H-2), 2.40 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.15 (m, 3H, H-1+H-4), 5.33 (dt, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 2.4, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.4 Hz), 7.23 (d, 2H, H<sub>m</sub>, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 8.3 Hz), 7.91 (d, 2H, H<sub>o</sub>, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 8.3 Hz)

**<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz),  $\delta$  22.3 (CH<sub>3</sub>), 33.8 (C-2), 63.6 (C-5), 68.3 (C-1), 77.2 (C-3), 85.6 (C-4), 127.7 (C<sub>i</sub>), 129.8 (C<sub>m</sub>), 130, 3 (C<sub>o</sub>), 144.7 (C<sub>p</sub>), 167.2 (C=O)

**EM** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*): 237 [(M+H)<sup>+</sup>, 10%], 259 [(M+Na)<sup>+</sup>, 100]

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): Calculada para C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>NaO<sub>4</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 259.0941.  
Encontrada: 259.0938

**1,2-didesoxi-D-ribosa (12)**



**Fórmula molecular:** C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub>

**R<sub>f</sub>** (10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.20

**IR** (KBr):  $\nu$  3370, 2945, 2882, 1441 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H RMN** (MeOH-*d*<sub>4</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  1.95 (m, 1H, H-2), 2.09 (m, 1H, H-2), 3.51 (m, 2H, H-5), 3.75 (m, 1H, H-4), 3.91 (m, 2H, H-1), 4.21 (dt, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 3.1Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.1 Hz)

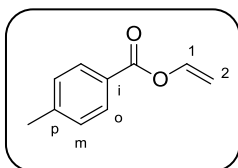
**<sup>13</sup>C NMR** (MeOH-*d*<sub>4</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  36.2 (C-2), 63.9 (C-5), 68.2 (C-1), 74.0 (C-3), 88.4 (C-4)

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): Calculada para C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>NaO<sub>3</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 141.0522.  
Encontrada: 141.0524

**Parte experimental**

---

***p*-metilbenzoato de vinilo (13b)**



**Fórmula molecular:** C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>

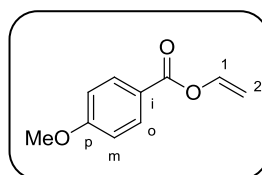
**R<sub>f</sub>** (20% AcOEt /hexano): 0.57

**IR** (KBr):  $\nu$  3055, 2987, 1730, 1645, 1613 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  2.40 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.67 (d, 1H, H-2, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.4 Hz), 5.06 (d, 1H, H-1, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 14.0 Hz), 7.24 (d, 2H, H<sub>o</sub>, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 8.3 Hz), 7.51 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 14.0 Hz), 7.98 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 8.4 Hz)

**<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  22.3 (CH<sub>3</sub>), 98.5 (C-2), 126.8 (C<sub>i</sub>), 129.8 (C<sub>m</sub>), 130.6 (C<sub>o</sub>), 142.0 (C-1), 145.0 (C<sub>p</sub>), 164.3 (C=O)

***p*-metoxibenzoato de vinilo (13c)**



**Fórmula molecular:** C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub>

**R<sub>f</sub>** (20% AcOEt /hexano): 0.57

**Pf:** 52-54 °C (sólido blanco)

**IR** (KBr):  $\nu$  3055, 2971, 2842, 1726, 1645, 1607 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  3.86 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.68 (d, 1H, H-2, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.3 Hz), 5.04 (d, 1H, H-1, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 14.2 Hz), 6.95 (d, 2H, H<sub>m</sub>, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 9.0 Hz), 7.52 (dd, 1H, H<sub>i</sub>, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 14.2 Hz), 8.06 (d, 1H, H<sub>o</sub>, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 8.4 Hz)

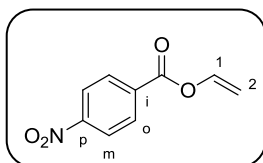
**<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz)  $\delta$ : 55.4 (CH<sub>3</sub>), 97.6 (C-2), 113.8 (C<sub>m</sub>), 121.2 (C<sub>i</sub>), 132.1 (C<sub>o</sub>), 141.5 (C-1), 163.3-163.9 (C=O + C<sub>p</sub>)

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): Calculada para C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>NaO<sub>3</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 201.0522.  
Encontrada: 201.0510

**Parte experimental**

---

***p*-nitrobenzoato de vinilo (13d)**



**Fórmula molecular:** C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>4</sub>

**R<sub>f</sub>** (20% AcOEt /hexano): 0.57

**Pf:** 74-76 °C (sólido amarillo)

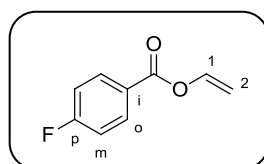
**IR** (KBr):  $\nu$  3056, 1737, 1647, 1609, 1530 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  4.80 (dd, 1H, H-2, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> 2.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.0 Hz), 5.14 (dd, 1H, H-2, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 2.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 14.0 Hz), 6.95 (d, 2H, H<sub>m</sub>, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 9.0 Hz), 7.52 (dd, 1H, H-1, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 13.9 Hz), 8.28 (m, 4H, H<sub>o</sub>+H<sub>m</sub>)

**<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz)  $\delta$ : 99.5 (C-2), 123.7 (C<sub>m</sub>), 131.1 (C<sub>o</sub>), 134.3 (C<sub>i</sub>), 141.1 (C-1), 161.8 (C<sub>p</sub>+C=O)



***p*-fluorobenzoato de vinilo (13e)**



**Fórmula molecular:** C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>FO<sub>2</sub>

**R<sub>f</sub>** (20% AcOEt /hexano): 0.57

**IR** (KBr): ν 3055, 3011, 2971, 2842, 1726, 1645, 1607 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 4.70 (dd, 1H, H-2, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> 2.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.3 Hz), 5.06 (d, 1H, H-2, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> Hz), 7.14 (m, 2H, H<sub>m</sub>), 7.48 (dd, 1H, H<sub>1</sub>, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 13.9 Hz), 8.14 (m, 2H, H<sub>m</sub>)

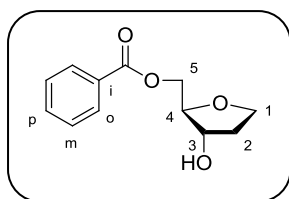
**<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz) δ: 98.3 (C-2), 115.7 (d, C<sub>m</sub>, <sup>2</sup>J<sub>CF</sub> 22.1 Hz), 125.2 (C<sub>i</sub>), 132.6 (d, C<sub>o</sub>, <sup>3</sup>J<sub>CF</sub> 9.3 Hz), 141.3 (C-1), 162.6 (C=O), 254.9 (d, C<sub>p</sub>, <sup>1</sup>J<sub>CF</sub> 64.1 Hz)

**<sup>19</sup>F NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 282 MHz) δ: 104.4

**Parte experimental**

---

**5-O-benzoil-1,2-dideoxi-D-ribosa (14a)**



**Fórmula molecular:** C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>

**R<sub>f</sub>** (10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.52

**Pf:** 57-59 °C (sólido blanco)

**IR** (KBr):  $\nu$  3445, 2986, 2953, 1721, 1602 cm<sup>-1</sup>

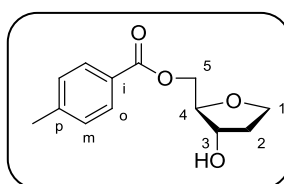
**<sup>1</sup>H RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  1.95 (m, 1H, H-2), 2.18 (m, 1H, H-2), 2.78 (1H, br s, OH), 4.05 (m, 3H, H-1 + H-4), 4.36 (m, 3H, H-3 + H-5), 7.42 (t, 2H, H<sub>m</sub> <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.6 Hz), 7.55 (tt, 2H, H<sub>p</sub> <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 1.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.7 Hz), 8.03 (m, 2H, H<sub>o</sub>)

**<sup>13</sup>C NMR** <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz),  $\delta$  35.0 (CH<sub>3</sub>), 34.9 (C-2), 64.9 (C-5), 67.1 (C-1), 73.5 (C-3), 83.8 (C-4), 128.4-129.6 (5C, C<sub>i</sub>+C<sub>o</sub>+C<sub>m</sub>), 133.2 (C<sub>p</sub>), 166.6 (C=O)

**EM** (EI, *m/z*): 259 [(M+Na)<sup>+</sup>, 100]

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): Calculada para C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 223.0965.  
Encontrada: 223.0959

**5-O-toluoil-1,2-didesoxi-D-ribosa (14b)**



**Fórmula molecular:** C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>O<sub>4</sub>

**R<sub>f</sub>** (10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.52

**Pf:** 45-47 °C (sólido blanco)

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = + 26 (c 1.0, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

**IR** (KBr): ν 3429, 3037, 2949, 1717, 1612 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 1.92 (m, 1H, H-2), 2.14 (m, 1H, H-2), 2.37 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.03 (br s, 1H, OH), 4.01 (m, 3H, H-1 + H-4), 4.31 (m, 3H, H-3 + H-5), 7.19 (d, 2H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 8.1 Hz), 7.89 (d, 2H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 8.1 Hz)

**<sup>13</sup>C NMR** <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz), δ 21.5 (CH<sub>3</sub>), 34.9 (C-2), 64.7 (C-5), 67.1 (C-1), 73.3 (C-3), 83.8 (C-4), 126.8 (C<sub>i</sub>), 129.0 (C<sub>m</sub>), 129.6 (C<sub>o</sub>), 143.8 (C<sub>p</sub>), 166.7 (C=O)

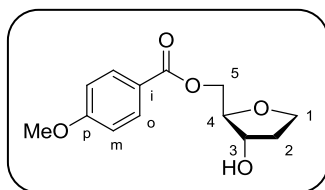
**EM** (ESI<sup>+</sup>, m/z): 237 [(M+H)<sup>+</sup>, 20%], 259 [(M+Na)<sup>+</sup>, 100]

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): Calculada para C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>NaO<sub>4</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 259.0941.  
Encontrada: 259.09220

**Parte experimental**

---

**5-O-(*p*-metoxibenzoil)-1,2-didesoxi-D-ribosa  
(14c)**



**Fórmula molecular:** C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>O<sub>5</sub>

**R<sub>f</sub>** (10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.52

**Pf:** 67-69 °C (sólido blanco)

$[\alpha]_D^{20} = + 21$  (c 0.72, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

**IR** (KBr):  $\nu$  3455, 3054, 2985, 1712, 1606 cm<sup>-1</sup>

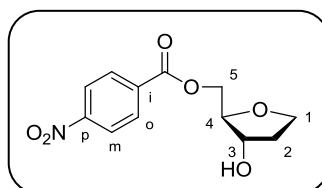
**<sup>1</sup>H RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 400.13 MHz):  $\delta$  1.96 (m, 1H, H-2), 2.19 (m, 1H, H-2), 3.85 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.02 (m, 2H, H-1), 4.08 (c, 1H, H-4, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 4.9 Hz), 4.35 (m, 3H, H-5 y H-3), 6.90 (d, 2H, H<sub>m</sub>, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 8.9 Hz), 7.89 (d, 2H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 8.9 Hz)

**<sup>13</sup>C NMR** <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100.6 MHz),  $\delta$  35.0 (C-2), 55.4 (OCH<sub>3</sub>), 64.7 (C-5), 67.2 (C-1), 73.5 (C-3), 84.0 (C-4), 113.7 (C<sub>m</sub>), 122.1 (C<sub>i</sub>), 131.8 (C<sub>o</sub>), 163.7, 166.4 (C<sub>p</sub> + C=O)

**EM** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*): 275.0 [(M+Na)<sup>+</sup>, 100%]

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): Calculada para C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>NaO<sub>5</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 275.0890.  
Encontrada: 275.0880

**5-O-(*p*-nitrobenzoi)-1,2-dideoxi-D-ribose (14d)**



**Fórmula molecular:** C<sub>12</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>6</sub>

**R<sub>f</sub>** (10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.52

**Pf:** 90-92 °C (sólido amarillo)

$[\alpha]_D^{20} = + 26$  (c 1.0, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

**IR** (KBr):  $\nu$  3352, 3074, 1716, 1606, 1527 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  1.96 (m, 1H, H-2), 2.21 (m, 1H, H-2), 4.00-4.12 (m, 3H, H-1 + H-4), 4.32-4.50 (m, 3H, H-3 + H-5), 8.26 (m, 4H, H<sub>o</sub> y H<sub>m</sub>)

**<sup>13</sup>C NMR** <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz),  $\delta$  35.0 (C-2), 65.7 (C-5), 67.2 (C-1), 73.6 (C-3), 83.6 (C-4), 123.6 (C<sub>m</sub>), 130.8 (C<sub>o</sub>), 135.2 (C<sub>i</sub>), 150.7 (C<sub>p</sub>), 164.7 (C=O)

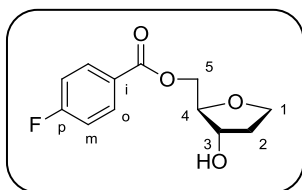
**EM** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*): 290.0 [(M+Na)<sup>+</sup>, 100%]

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): Calculada para C<sub>12</sub>H<sub>13</sub>NNaO<sub>6</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 290.0635.  
Encontrada: 290.0639

**Parte experimental**

---

**5-O-(*p*-fluorobenzoil)-1,2-didesoxi-D-ribosa  
(14e)**



**Fórmula molecular:** C<sub>12</sub>H<sub>13</sub>FO<sub>4</sub>

**R<sub>f</sub>** (10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.52

**Pf:** 59-61 °C (sólido blanco)

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = + 41 (c 1.0, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

**IR** (KBr): ν 3372, 3070, 1712, 1507, 1512 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 400.13 MHz): δ 1.96 (m, 1H, H-2), 2.20 (h, 1H, H-2, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 8.0 Hz), 3.99-4.10 (m, 3H, H-1 y H-4), 4.32-4.50 (m, 3H, H-3 + H-5), 7.11 (m, 2H, H<sub>m</sub>), 8.06 (m, 2H, H<sub>o</sub>)

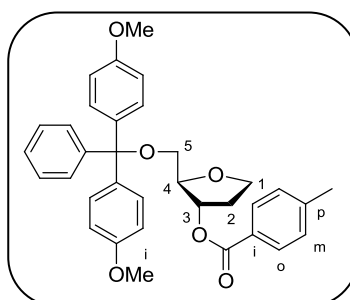
**<sup>13</sup>C NMR** <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100.6 MHz), δ 35.1 (C-2), 65.0 (C-5), 67.2 (C-1), 73.6 (C-3), 83.8 (C-4), 115.6 (d, C<sub>m</sub>, <sup>2</sup>J<sub>CF</sub> 22.0 Hz), 130.8 (C<sub>o</sub>), 126.0 (C<sub>i</sub>), 132.3 (C<sub>o</sub>), 165.7 (C=O), 165.9 (d, C<sub>p</sub>, <sup>2</sup>J<sub>CF</sub> 254.5 Hz)

**<sup>19</sup>F NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 282 MHz) δ: 105.2

**EM** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*): 263.0 [(M+Na)<sup>+</sup>, 100%]

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): Calculada para C<sub>12</sub>H<sub>13</sub>FNaO<sub>4</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 263.0690.  
Encontrada: 290.0690

**5-O-dimetoxitritil-3-O-toluoil-1,2-didesoxi-D-ribose (17)**



**Fórmula molecular:** C<sub>34</sub>H<sub>34</sub>O<sub>6</sub>

**R<sub>f</sub>** (30% hexane/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.37

**Pf:** 59-61 °C (sólido blanco)

$[\alpha]_D^{20} = + 39$  (c 1.0, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

**IR** (KBr):  $\nu$  3055, 2966, 1714, 1609 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H RMN** (MeOH-*d*<sub>4</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  2.09 (m, 1H, H-2), 2.33 (m, 1H, H-2), 2.39 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.25 (m, 2H, 2H-5), 3.73 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 4.09 (m, 3H, H-1 + H-4), 5.39 (dt, 1H, H-3, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 2.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.4 Hz), 6.82 (d, 4H, DMT, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 8.8 Hz), 7.25 (m, 9H, DMT), 7.43 (d, 2H, H<sub>m</sub>, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 8.3 Hz), 7.88 (d, 2H, H<sub>o</sub>, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 8.3 Hz)

**<sup>13</sup>C NMR** <sup>13</sup>C NMR (MeOH-*d*<sub>4</sub>, 75.5 MHz),  $\delta$  21.7 (CH<sub>3</sub>), 33.7 (C-2), 55.6 (2C, OCH<sub>3</sub>), 65.3 (C-5), 68.6 (C-1), 78.3 (C-3), 84.7 (C-4), 87.5 (C DMT), 114.1 (4C), 127.8-131.3 (14C), 137.3 (2C, DMT), 145.5-146.4 (2C), 160.1 (2C), 167.6 (C=O).

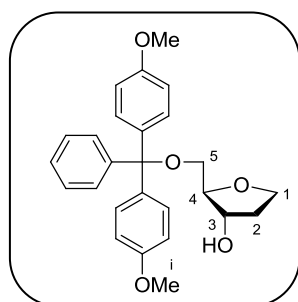
**EM** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*): 561 [(M+Na)<sup>+</sup>, 100]

**EMAR** (EI): Calculada para C<sub>34</sub>H<sub>34</sub>O<sub>6</sub> [M]<sup>+</sup>: 538.2355. Encontrada: 538.2351

**Parte experimental**

---

**5-O-dimetoxitritil-1,2-didesoxi-D-ribose (18)**



**Fórmula molecular:** C<sub>26</sub>H<sub>28</sub>O<sub>5</sub>

**R<sub>f</sub>** (40% hexane/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.26

**IR** (KBr):  $\nu$  3433, 3055, 2987, 1609 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H RMN** (MeOH-*d*<sub>4</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  1.86 (m, 1H, H-2), 2.06 (m, 1H, H-2), 3.08 (m, 2H, H-5), 3.75 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3.94 (m, 3H, H-1+H-4), 4.22 (dt, 1H, H-3, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 2.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 5.7 Hz), 6.83 (d, 4H, DMT, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 8.8 Hz), 7.26 (m, 7H, DMT), 7.44 (d, 2H, DMT, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.7 Hz)

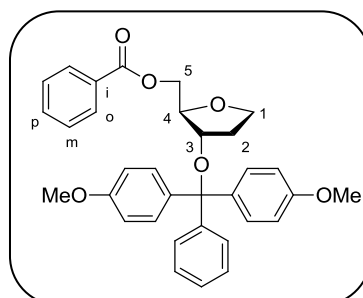
**<sup>13</sup>C NMR** <sup>13</sup>C NMR (MeOH-*d*<sub>4</sub>, 75.5 MHz),  $\delta$  36.1 (C-2), 56.0 (2C, OMe), 65.9 (C-5), 68.4 (C-1), 74.6 (C-3), 87.2 (C-4), 87.7 (C-DMT), 114.3 (4C), 128.0-131.6 (9C), 137.6 (2C), 146.8 (1C), 160.4 (2C)

**EM** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*): 443 [(M+Na)<sup>+</sup>, 10]

**EMAR** (EI): Calculada para C<sub>26</sub>H<sub>28</sub>O<sub>5</sub> [M]<sup>+</sup>:429.1937. Encontrada: 429.1936



**3-O-dimetoxitritil-5-O-benzoil-1,2-didesoxi-D-ribose (19a)**



**Fórmula molecular:** C<sub>33</sub>H<sub>32</sub>O<sub>6</sub>

**R<sub>f</sub>** (30% hexane/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.27

**Pf:** 47-49 °C (sólido blanco)

**IR** (KBr):  $\nu$  3055, 2986, 2957, 1720, 1608 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H RMN** (MeOH-*d*<sub>4</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  1.58 (m, 1H, H-2), 1.74 (m, 1H, H-2), 3.74 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.76 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.84-4.05 (m, 5H, H-1, H-4, H-5), 4.23 (dt, 1H, H-3, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 2.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 5.9 Hz), 6.85 (m, 4H, DMT), 7.10-7.69 (m, 11H), 7.61 (t, 1H, H<sub>p</sub>, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 1.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.8 Hz), 7.88 (m, 2H, H<sub>o</sub>)

**<sup>13</sup>C NMR** <sup>13</sup>C NMR (MeOH-*d*<sub>4</sub>, 75.5 MHz),  $\delta$  35.0 (C-2), 55.6 (2C, OCH<sub>3</sub>), 65.7 (C-5), 68.5 (C-1), 76.8 (C-4), 84.4-88.3 (C-3 + C-DMT), 114.1 (4C) 127.8-134.2 (15C), 137.6-137.8 (2C), 147.0 (1C), 160.2 (2C), 167.5 (C=O)

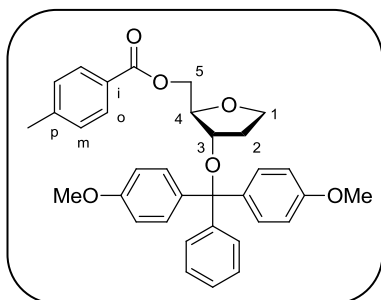
**EM** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*): 547 [(M+Na)<sup>+</sup>, 100]

**EMAR** (EI): Calculada para C<sub>33</sub>H<sub>32</sub>O<sub>6</sub> [M]<sup>+</sup>: 524.2199. Encontrada: 538.2204

**Parte experimental**

---

**3-O-dimetoxitritil-5-O-benzoil-1,2-dideoxirribosa (19b)**



**Fórmula molecular:** C<sub>34</sub>H<sub>34</sub>O<sub>6</sub>

**R<sub>f</sub>** (30% hexane/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.27

**Pf:** 48-50 °C (sólido blanco)

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = + 13 (c 1.0, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

**IR** (KBr): ν 3055, 2966, 1716, 1609 cm<sup>-1</sup>

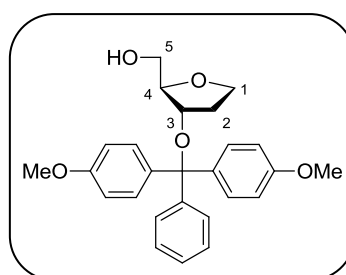
**<sup>1</sup>H RMN** (MeOH-*d*<sub>4</sub>, 300.13 MHz): δ 1.53 (m, 1H, H-2), 1.70 (m, 1H, H-2), 2.38 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.70 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.73 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.80-4.10 (m, 5H, H-1 + H-4 + H-5), 4.23 (dt, 1H, H-3, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 2.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 5.9 Hz), 6.82 (m, 4H, DMT), 7.09-7.39 (m, 9H), 7.46 (d, 2H, H<sub>m</sub>, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 8.3 Hz), 7.88 (d, 2H, H<sub>o</sub>, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 8.1 Hz)

**<sup>13</sup>C NMR** <sup>13</sup>C NMR (MeOH-*d*<sub>4</sub>, 75.5 MHz), δ 21.9 (CH<sub>3</sub>), 35.4 (C-2), 56.0 (2C, O-Me), 65.9 (C-5), 68.9 (C-1), 77.1 (C-4), 84.8-84.6 (C-3 + C-DMT), 114.1 (4C) 128.2-131.9 (14C), 137.9-138.2 (2C), 145.6 and 147.4 (2C), 160.6 (2C), 168.0 (C=O)

**EM** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*): 561 [(M+Na)<sup>+</sup>, 100]

**EMAR** (EI<sup>+</sup>): Calculada para C<sub>34</sub>H<sub>34</sub>O<sub>6</sub> [M]<sup>+</sup>: 538.2355. Encontrada: 538.2347

**3-O-dimetoxitritil-1,2-didesoxi-D-ribosa (20)**



**Fórmula molecular:** C<sub>26</sub>H<sub>28</sub>O<sub>5</sub>

**IR** (KBr):  $\nu$  3406, 3055, 2986, 1609 cm<sup>-1</sup>

**R<sub>f</sub>** (40% hexane/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.24

**Pf:** 54-56 °C (sólido blanco)

$[\alpha]_D^{20} = +36$  (c 1.0, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

**<sup>1</sup>H RMN** (MeOH-*d*<sub>4</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  1.34 (m, 1H, H-2), 1.56 (m, 1H, H-2), 3.15 (dd, 1H, H-5, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 5.3 Hz, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> 11.9 Hz), 3.30 (dd, 1H, H-5, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 3.5 Hz, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> 12.7 Hz), 3.75 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>), 3.83 (m, 3H, H-1 + H-4), 4.14 (dt, 1H, H-3, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 1.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 5.7 Hz), 6.84 (m, 4H, DMT), 7.27 (m, 7H, DMT), 7.46 (m, 2H, DMT)

**<sup>13</sup>C NMR** <sup>13</sup>C NMR (MeOH-*d*<sub>4</sub>, 75.5 MHz),  $\delta$  35.8 (C-2), 56.0 (2C, OMe), 63.7 (C-5), 68.8 (C-1), 77.2 (C-3), 88.0-88.4 (C<sub>t</sub> + C-4), 87.7 (C-4), 114.4 (4C), 128.2-131.9 (9C), 138.4 (2C), 147.4 (1C), 160.5 (2C)

**EM** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*): 443 [(M+Na)<sup>+</sup>, 100%], 863 [(2M+Na)<sup>+</sup>, 20]

**EMAR** (EI<sup>+</sup>): Calculada para C<sub>26</sub>H<sub>28</sub>O<sub>5</sub> [M]<sup>+</sup>: 420.1937. Encontrada: 420.1942



## **CAPÍTULO 3**

**RESOLUCIÓN CINÉTICA PARALELA  
ENZIMÁTICA DE MEZCLAS RACÉMICAS DE  $\beta$ -  
D/L-NUCLEÓSIDOS. UN MÉTODO PARA EL  
AISLAMIENTO DE  $\beta$ -L-NUCLEOSIDOS**



### **3.1. ANTECEDENTES**

Durante un largo periodo de tiempo se pensó que sólo los análogos de nucleósido con configuración natural ( $\beta$ -D) podían exhibir actividad biológica debido a la alta estereoespecificidad de las enzimas presentes en los organismos vivos. Sin embargo, a principios de los años 90 del pasado siglo se descubre que los L-nucleósidos podían ser un nuevo grupo de agentes antivirales.

Aunque la primera síntesis de un L-nucleósido fue publicada en 1964,<sup>99</sup> no fue hasta el año 1993 cuando se descubrió la importante actividad biológica que presentaba la lamivudina (L-2',3'-didesoxi-3'-tiacitidina, 3TC, Figura 3) para el tratamiento del VIH y el virus de la hepatitis B.<sup>100</sup> Desde entonces, han sido muchos los L-nucleósidos sintetizados como potenciales agentes terapéuticos. Como resultado de este estudio cabe destacar que los L-nucleósidos presentan una actividad comparable, y a veces superior, a sus homólogos de la serie D.<sup>101</sup> Además, en ocasiones, son menos tóxicos y poseen una mayor estabilidad metabólica, ya que presentan una mayor resistencia a la degradación por las enzimas que sus homólogos de la serie D. Su uso no se limita a su actividad como antivirales y antitumorales, sino que recientemente varios análogos de la  $\beta$ -adenosina han sido evaluados como agentes cardioprotectores. Así, se ha descubierto que la  $\beta$ -L-3'-amino-3'-desoxi- $N^6$ -dimetiladenosina incrementa la recuperación funcional tras sufrir una isquemia (Figura 21).<sup>102</sup>

---

<sup>99</sup> Smejkal, J.; Sorm, F. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1964**, *29*, 2809-2813.

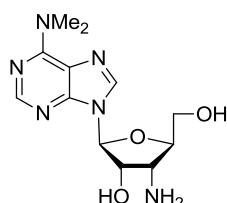
<sup>100</sup> Cameron, J. M.; Collins, P.; Daniel, M.; Storer, R. *Drugs Fut.* **1993**, *18*, 319-323.

<sup>101</sup> Para revisiones de aplicaciones terapéuticas de L-nucleósidos, consultar: a) Forsman, J. J.; Leino, R. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 3334-3357. b) Mathé, C.; Gosselin, G. *Antiviral Res.* **2006**, *71*, 276-281.

<sup>102</sup> Kasiganesan, H.; Wright, G. L.; Chiacchio, M. A.; Gumina, G. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 5347-5352.

## Antecedentes

---



$\beta$ -L-3'-Amino-3'-desoxi- $N^6$ -dimetiladenosina

**Figura 21.** L-Nucleósido con actividad fisiológica.

### 3.1.1. L-NUCLEÓSIDOS COMO ANTIVIRALES

Dos análogos de L-nucleósido aprobados para el tratamiento del VIH son la lamivudina (3TC, Figura 3) y la emtricitabina ( $\beta$ -L-2',3'-didesoxi-3'-tia-5-fluorocitidina, FTC, Figura 3), el análogo 5-fluoro del 3TC. Este fármaco está siendo evaluado como potencial tratamiento para pacientes con hepatitis B crónica.<sup>103</sup> En la actualidad, otro derivado de la citidina, la elvucitabina ( $\beta$ -L-2',3'-didesoxi-5-fluorocitidina,  $\beta$ -L-Fd4C) en combinación con otro fármaco NNTRI, se encuentra en fase II de ensayos clínicos frente al VIH (Figura 22).<sup>104</sup>

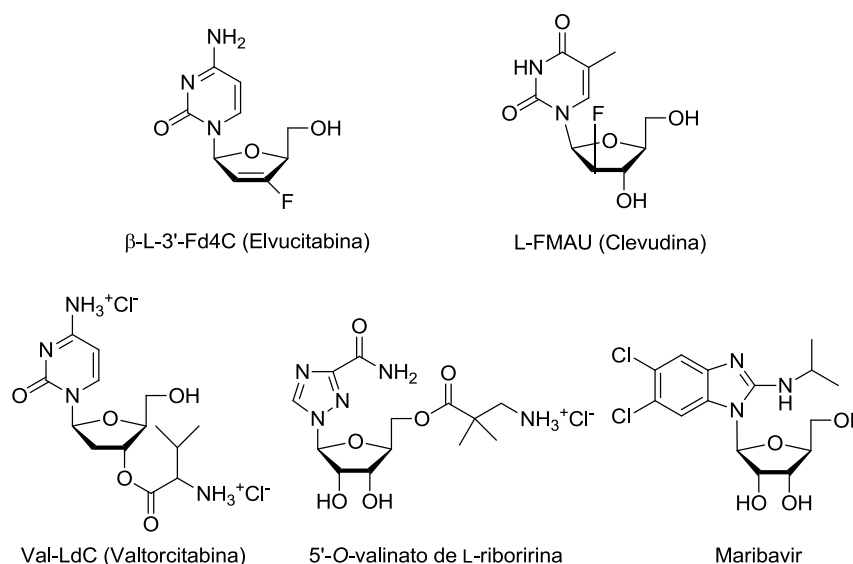
Además, numerosos L-nucleósidos muestran también gran actividad como agentes anti-HBV. Algunos ya han sido aprobados por la FDA como la telbivudina, el L-isómero de la timidina (LdT, Figura 4), en el año 2006. Ensayos clínicos han demostrado que la LdT es más efectiva que la lamivudina o el adefovir y causa menos resistencia frente al virus. El L-nucleósido clevidina (L-FMAU) ha sido aprobado en algunos países del continente asiático. Otros se encuentran en ensayos clínicos. Por ejemplo, el enantiómero del nucleósido natural 2'-desoxicitidina, la L-2'-desoxicitidina (LdC), muestra una gran actividad anti-HBV *in vitro*. Sin embargo, en ensayos realizados en monos presenta una biodisponibilidad oral de tan sólo un 18%. Consecuentemente, se han desarrollado

<sup>103</sup> a) Furman, P. A.; Davis, M.; Liotta, D. C.; Paff, M.; Frick, L. W.; Nelson, D. J.; Dornsife, R. E.; Wurster, J. A.; Wilson, L. J.; Fyfe, J. A.; Tuttle, J. V.; Miller, W. H.; Condreay, L.; Averett, D. R.; Schinazi, R. F.; Painter, G. R. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1992**, *36*, 2686–2692. b) Schinazi, R. F.; McMillan, A.; Cannon, D.; Mathis, R.; Lloyd, R. M.; Peck, A.; Sommadossi, J.-P.; Clair, M. St.; Wilson, J.; Furman, P. A.; Painter, G. R.; Choi, W. B.; Liotta, D. C. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1992**, *36*, 2423–2431. c) Jenh, A. M.; Thio, C. L.; Pham, P. A. *Pharmacotherapy* **2009**, *29*, 1212–1227. d) Saag, M. S. *Clin. Infect. Dis.* **2006**, *42*, 126–131.

<sup>104</sup> Colucci, P.; Potagge, J. C.; Robison, H.; Turgeon, J.; Schürman, D.; Hoepelman, I.; Ducharme, M. P. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53*, 662–669.



profármacos –compuestos farmacológicamente poco activos que se metabolizan *in vivo* dando lugar a su forma activa– que exhiben una mejor absorción sin perder su efecto antiviral. De este modo, el correspondiente éster de valina en la posición 3, la valtorcitabina (val-LdC),<sup>105</sup> se encuentra actualmente en ensayos clínicos frente al HBV en combinación con telbivudina. De forma análoga, el 5'-O-valinato del levovirín –el enantiómero de la ribavirina– se ha sometido a la primera fase de ensayos clínicos frente al HCV (Figura 22).<sup>106</sup>



**Figura 22.** L-Nucleósidos como agentes antivirales.

Los L-nucleósidos han mostrado también excelente actividad frente al citomegalovirus humano (HCMV). El maribavir (Figura 22), llegó satisfactoriamente hasta la fase II de ensayos clínicos como agente anti-HCMV.<sup>107</sup> Desafortunadamente, fracasó en la fase III al no mostrar efectos terapéuticos en algunos pacientes.

<sup>105</sup> Cretton-Scott, E.; Bridges, E.; Zhou, X.-J.; Juodawalkis, A.; Gosselin, G.; Imbach, J.-L.; Pierra, C.; Benzaria, S.; Sommadossi, J.-P.; Bryant, M. *Antiviral Res.* **2001**, *50*, A44.

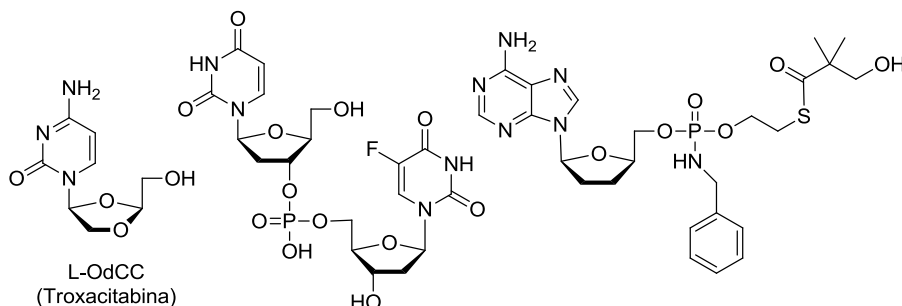
<sup>106</sup> Huang, Y.; Ostrowitzki, S.; Hill, G.; Navarro, M.; Berger, N.; Kopect, P.; Mau, C. I.; Alfredson, T.; Lal, R. *J. Clin. Pharmacol.* **2005**, *45*, 578-588.

<sup>107</sup> a) Biron, K. K.; Harvey, R. J.; Chamberlain, S. C.; Good, S. S.; Smith, A. A.; Davis, M. C.; Talarico, C. L.; Miller, W. H.; Ferris, R.; Dornsife, R. E.; Stanat, S. C.; Drach, J. C.; Townsend, L. B.; Koszalka, G. W. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46*, 2365-2372. b) Lalezari, J. O.; Aberg, J. A.; Wang, L. H.; Wire, M. B.; Miner, R.; Snowden, W.; Talarico, C. L.; Shaw, S.; Jacobson, M. A.; Drew, W. L. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46*, 2969-2976.

## Antecedentes

### 3.1.2. L-NUCLEÓSIDOS COMO ANTITUMORALES

Existen también derivados de L-nucleósidos que son prometedores agentes anticancerígenos. Por ejemplo, la troxacitabina (L-OdCC, Figura 23), el primer análogo de  $\beta$ -L-nucleósido que exhibió actividad antitumoral, está siendo estudiado en pacientes con cáncer de páncreas o distintos tipos de leucemia.<sup>108</sup> Otros análogos se encuentran descritos en patentes, como el dinucleótido de bases pirimidínicas<sup>109</sup> y el fosforamidito derivado de adenina<sup>110</sup> que se muestran en la Figura 23.



**Figura 23.** Derivados de L-nucleósidos con actividad antitumoral.

### 3.1.3. L-NUCLEÓTIDOS COMO COMPONENTES DEL ADN

La primera síntesis de L-oligonucleótidos conteniendo las cuatro bases naturales fue descrita por Garbesi y col.<sup>111</sup> (L-ADN, Figura 24). Posteriormente, Damha y col.<sup>112</sup> estudiaron las aplicaciones del ADN heteroquiral (D/L-ADN), encontrándose que los oligómeros que contienen de forma terminal o interna unidades de L-dC aumentan considerablemente su resistencia frente a la degradación por las nucleasas celulares activando, además, la RNasaH. Más recientemente, se ha observado que la introducción del monómeros conformacionalmente restringidos de L-nucleótidos ( $\beta$ -L-LNA) mejora la capacidad de hibridación del ADN con un ARN diana, su estabilidad y su resistencia en condiciones

<sup>108</sup> Swords, R.; Giles, F. *Hematology* **2007**, *12*, 219-227.

<sup>109</sup> Weis, A. L.; Pulenthiram K. WO 99/45935, Sep. 16, 1999.

<sup>110</sup> Somadossi, J.-P.; Gosselin, G.; Pierra, C.; Perigaud, C.; Peyrottes, S. WO 2008/082602, Jul. 10, 2008.

<sup>111</sup> Garbesi, A.; Capobianco, M. L.; Colonna, F. P.; Tondello, L.; Arcamone, F.; Manzini, C.; Hilbers, W.; Aelen, J. M.; Blommers, M. J. *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 4159-4165.

<sup>112</sup> Damha, M. J.; Giannaris, P. A.; Marfey, P. *Biochemistry* **1994**, *33*, 7877-7885.

fisiológicas.<sup>113</sup> Sobre los nucleósidos conformacionalmente restringidos se profundizará más en el Capítulo 4 de esta Memoria.

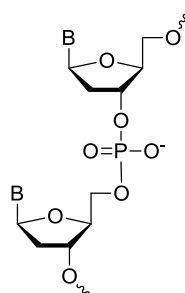
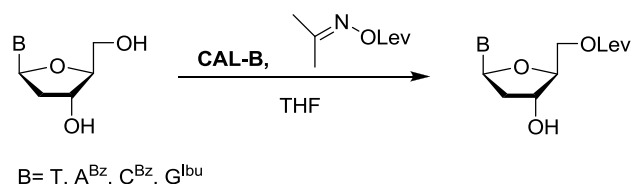


Figura 24. Estructura del L-ADN.

### 3.1.4. PROCESOS BIOCATALÍTICOS EN $\beta$ -L-NUCLEÓSIDOS

Debido al interés creciente en las aplicaciones terapéuticas de los L-nucleósidos son varias las rutas descritas para su síntesis. Sin embargo, es habitual que durante la preparación de estos compuestos se obtengan mezclas de  $\beta$ -D- y  $\beta$ -L-nucleósidos, con lo cual es necesario un método de separación sencillo que permita el aislamiento de ambos isómeros. En nuestro grupo de investigación se han llevado a cabo varios estudios de catálisis enzimática sobre L-nucleósidos y algunos de estos resultados se resumen a continuación.<sup>114</sup>

**a) Acilación enzimática de  $\beta$ -L-2'-desoxinucleósidos con CAL-B.** Al igual que ocurre con  $\beta$ -D-2'-desoxinucleósidos, la CAL-B acila con total regioselectividad el hidroxilo primario de la posición 5' de  $\beta$ -L-2'-desoxinucleósidos, aislándose los correspondientes 5'-O-levulinil-L-nucleósidos con excelentes rendimientos (Esquema 26).



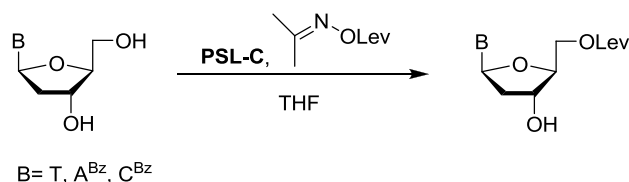
Esquema 26. Acilación de  $\beta$ -L-2'-desoxinucleósidos con CAL-B.

<sup>113</sup> a) Christensen, N. K.; Bryld, T.; Sorensen, M. D.; Arar, K.; Wengel, J.; Nielsen, P. *Chem Commun.* **2004**, 282-283.

<sup>114</sup> García, J.; Fernández, S.; Ferrero, M.; Sanghvi, Y. S.; Gotor, V. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 3759-3762.

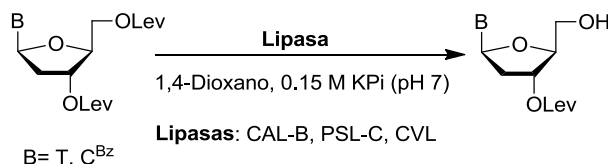
## Antecedentes

**b) Acilación enzimática de  $\beta$ -L-2'-desoxinucleósidos con PSL-C.** Se ha observado que esta lipasa, al igual que la CAL-B, cataliza la acilación en la posición 5' de  $\beta$ -L-2'-desoxinucleósidos (Esquema 27). Se trata de un resultado curioso teniendo en cuenta que en nucleósidos naturales, es decir, con configuración  $\beta$ -D, esta misma enzima muestra excelente regioselectividad hacia la acilación del hidroxilo secundario de la posición 3'. La única excepción es que la PSL-C no cataliza la acilación de *N*-isobutiril- $\beta$ -L-2'-desoxiguanosina, recuperándose este sustrato inalterado.



**Esquema 27.** Acilación de  $\beta$ -L-2'-desoxinucleósidos con PSL-C.

**c) Hidrólisis enzimática de di-*O*-levulinil- $\beta$ -L-2'-desoxinucleósidos.** Puesto que la acilación enzimática proporciona los derivados 5'-acilados, se aprovecha el carácter complementario de ambas lipasas (CAL-B y PSL-C) para sintetizar mediante una reacción de hidrólisis los derivados 3' acilados correspondientes (Esquema 28).



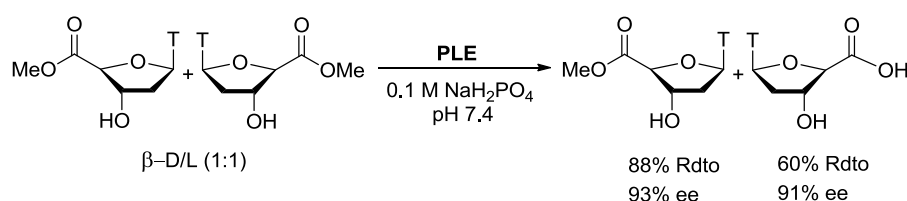
**Esquema 28.** Hidrólisis enzimática de di-*O*-levulinil- $\beta$ -L-2'-desoxinucleósidos.

Cuando el sustrato 3',5'-di-*O*-levulinil- $\beta$ -L-timidina se somete a hidrólisis enzimática con CAL-B, se encuentra que esta lipasa cataliza con excelente regioselectividad la hidrólisis del hidroxilo primario. Sin embargo, cuando se usa PSL-C como biocatalizador la cinética de la reacción es mucho más lenta, alcanzándose conversiones muy bajas incluso a tiempos largos de reacción.

Por otra parte, la reacción de hidrólisis del sustrato *N*-benzoil-3',5'-di-*O*-levulinil- $\beta$ -L-2'-desoxicitidina con la lipasa CAL-B es poco selectiva y hay que recurrir a la lipasa CVL para obtener una buena regioselectividad hacia la hidrólisis en la posición 5'.

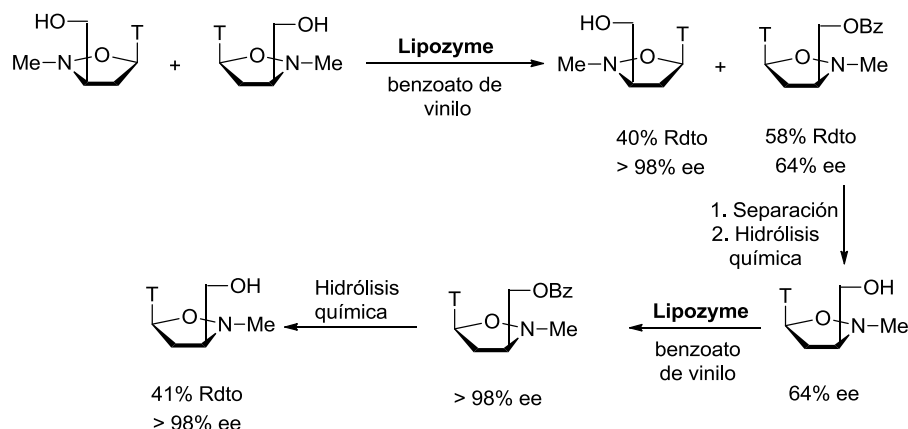
### 3.1.5. RESOLUCIONES ENZIMÁTICAS DE D/L-NUCLEÓSIDOS

Las enzimas son catalizadores muy eficaces en el aislamiento de L-nucleósidos con elevados excesos enantioméricos.<sup>45,115</sup> Un ejemplo interesante es la reacción de hidrólisis enantioselectiva de una mezcla racémica de un derivado de timidina con la esterasa del hígado de cerdo (*Pig Liver Esterase*, PLE) (Esquema 29).<sup>116</sup>



Esquema 29

En otro caso, se describe la resolución de isoxazolidín nucleósidos tras una doble resolución llevada a cabo por la lipasa Lipozyme IM –aislada de *Mucor miehei*-. Tras la purificación del crudo de la primera reacción biocatalítica se obtiene un bajo exceso enantiomérico en uno de los enantiómeros que se consigue mejorar mediante una nueva reacción enzimática. Los principales inconvenientes son los bajos rendimientos y el elevado número de etapas necesarias (Esquema 30).<sup>117</sup>



Esquema 30

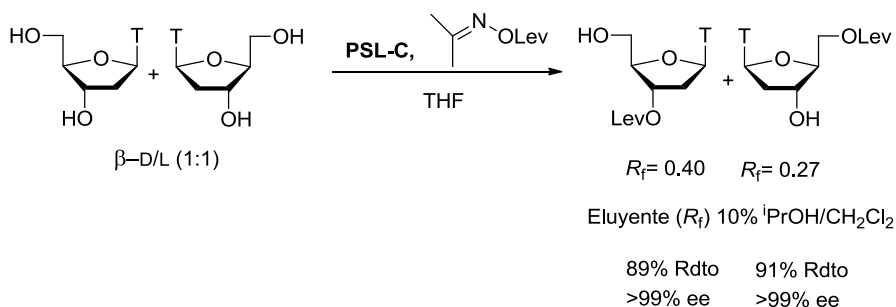
<sup>115</sup> Ferrero, M.; Gotor, V. *Monatsh. Chem.* **2000**, *131*, 585–616.

<sup>116</sup> Albert, M.; De Souza, D.; Feiertag, P.; Hönig, H. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 3251–3254.

<sup>117</sup> Carnovale, C.; Iannazzo, D.; Nicolosi, G.; Piperno, A.; Sanfilippo, C. *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 425–429.

## Antecedentes

Nuestro grupo también ha llevado a cabo de manera muy eficiente la resolución de  $\beta$ -D/L-timidina haciendo uso de la diferente regioselectividad que exhibe la PSL-C en D- y L-nucleósidos. Así, mediante una resolución cinética paralela se obtienen dos nucleósidos enantiopuros acilados en diferente posición y que tienen distintos  $R_f$ , haciendo viable su separación por cromatografía de columna (Esquema 31).<sup>114</sup>



Esquema 31

En la bibliografía existen otros ejemplos en los que se describe la preparación de D/L nucleósidos de forma enantiopura a partir de un producto de partida racémico. Sin embargo, el proceso de resolución enzimática se aborda sobre un precursor del nucleósido, es decir, previamente a la introducción de la base nitrogenada. De esta forma, se han sintetizado los carbociclonucleósidos biciclo[3.1.0]hexano y espiro[2.3]hexano con buenos excesos enantioméricos (Figura 25).<sup>118</sup>

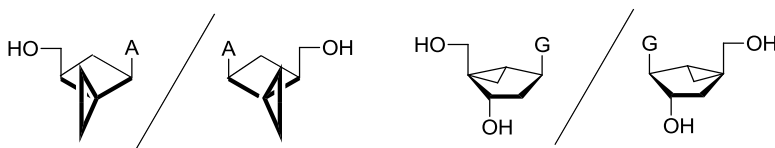


Figura 25

### 3.1.6. MODELIZACIÓN MOLECULAR DE LA CATÁLISIS ENZIMÁTICA

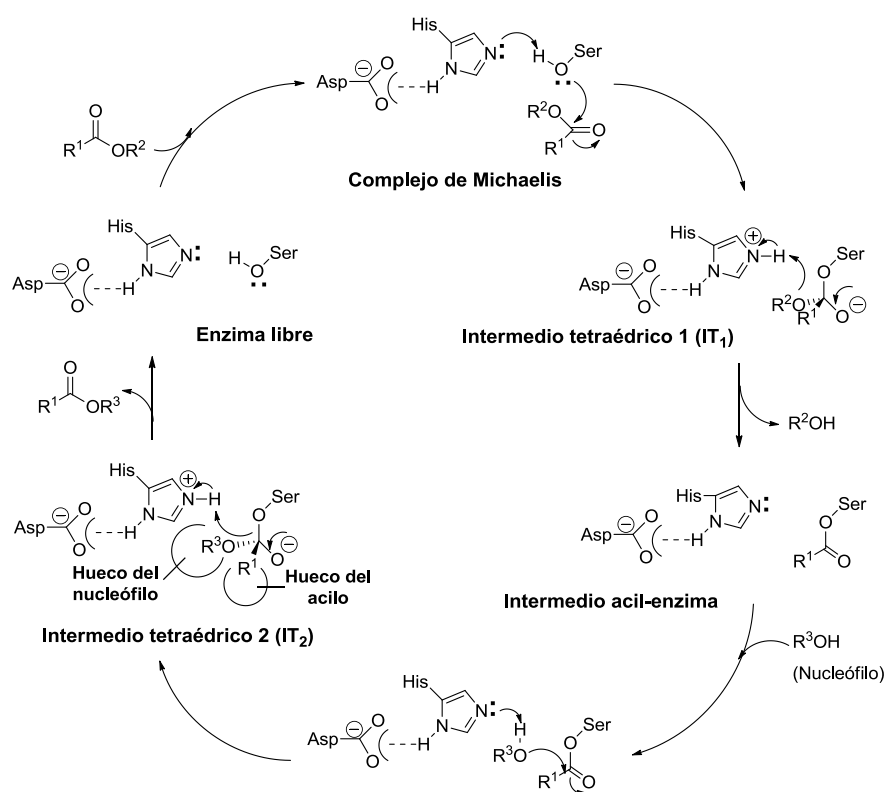
Centrándonos en las lipasas, es necesario comprender el mecanismo por el que estas enzimas exhiben su actividad

<sup>118</sup> Yoshimura, Y.; Moon, H. R.; Choi, Y.; Marquez, V. E. J. *Org. Chem.* **2002**, *67*, 5938-5945.

catalítica, así como conocer los aminoácidos involucrados en la catálisis, si lo que se pretende es predecir el comportamiento de las mismas.

### 3.1.6.1. Mecanismo de acción de las lipasas

Las lipasas poseen una triada catalítica, compuesta por un aspartato/glutamato, una histidina y una serina. Actúan de acuerdo al mecanismo de las serín-hidrolasas, que transcurre en tres etapas, tal y como se representa en el Esquema 32.<sup>119</sup>



Esquema 32. Mecanismo de las serin-hidrolasas.

**1. Formación del intermedio tetraédrico 1 (IT-1):** en una primera etapa, enzima y sustrato se asocian de forma no covalente formando el Complejo de Michaelis. Seguidamente tiene lugar el

<sup>119</sup> Fersht, A. *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*; 3ª ed.; Freeman: New York (USA), 2000.

## **Antecedentes**

---

ataque del hidroxilo de la serina sobre el grupo carbonilo del sustrato, formándose el IT-1.

**2. Formación del intermedio acil-enzima:** el IT-1 evoluciona hacia el intermedio acil-enzima a través de la donación de un protón de la histidina al heteroátomo del grupo saliente.

**3. Formación del intermedio tetraédrico 2 (IT-2):** tiene lugar el ataque del nucleófilo sobre el carbonilo del intermedio acil-enzima, formándose el denominado IT-2, que descompone liberando el producto y regenerándose el catalizador, que vuelve a entrar en un nuevo ciclo catalítico.

### **3.1.6.2. Breve introducción a la modelización molecular**

Como se ha comentado brevemente en la introducción de esta Memoria, la modelización molecular permite justificar y/o predecir cualitativamente el resultado de las reacciones enzimáticas. Esta técnica hace uso de la mecánica molecular teniendo como base la mecánica clásica para estudiar los sistemas moleculares. El estado del sistema se representa mediante una función de energía potencial llamada campo de fuerza que posee una serie de factores que tienen en cuenta distancias, ángulos de enlace, ángulos diedros y determinadas interacciones estéricas y electrostáticas. El campo de fuerza más utilizado para el caso de proteínas y ácidos nucleicos es el AMBER.<sup>120</sup>

El objetivo primordial de esta herramienta es encontrar un mínimo global del sistema que garantice las estructuras más estables. Sin embargo, se puede llegar a conclusiones erróneas si las estructuras de mínima energía obtenidas se corresponden con mínimos locales en lugar de mínimos absolutos. Para resolver este problema se han desarrollado diversos métodos. Por ejemplo, en la **búsqueda sistemática** se varían los ángulos de torsión del sistema de manera manual teniendo en cuenta la estructura de rayos X de la enzima. Otra forma es mediante el uso de los **métodos de Montecarlo**, donde se buscan estructuras aleatoriamente.

Hoy en día, se conocen las estructuras tridimensionales de muchas enzimas que se encuentran disponibles en la base de datos *Protein Data Bank*.<sup>121</sup> Así, se ha utilizado la modelización

---

<sup>120</sup> Weiner, S. J.; Kollman, P. A.; Case, D. A.; Singh, U. C.; Ghio, C.; Alagona, S.; Profeta, S.; Weiner, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 765-784.

<sup>121</sup> [www.rcsb.org/pdb](http://www.rcsb.org/pdb)



molecular para justificar la enantioselectividad observada en determinados procesos enzimáticos, explicando cualitativamente la diferente reactividad que presenta un enantiómero frente a otro, atendiendo a la peor disposición de alguno de ellos en el centro activo de la enzima por impedimentos estéricos o la pérdida de alguno de los puentes de hidrógeno esenciales para la catálisis.

En concreto, la lipasa de *Pseudomonas cepacia* posee varios huecos en su centro activo (Figura 26). Por encima de la triada catalítica, compuesta por los aminoácidos Asp264, His286 y Ser87 se encuentra el hueco hidrofóbico grande o "del acilo"; a su izquierda se encuentran los aminoácidos Val266 y Val267; a la derecha la Leu167 y por arriba la Phe119; en el fondo del hueco se encuentra la Pro113. Adyacente a la triada catalítica está el hueco hidrofóbico medio o "del nucleófilo", flanqueado por la His286 y la Leu287. En esta lipasa existe un hueco adicional, llamado hueco hidrofóbico alternativo, que es pequeño y se encuentra debajo de la triada catalítica, rodeado por los residuos Ile290, Leu287, Thr18 y Tyr29. Este hueco, señalado por primera vez por el grupo de Kazlauskas, ha sido utilizado en varias ocasiones para explicar la sorprendente reactividad de esta enzima. Por otra parte, el oxianión formado en los intermedios de reacción se encuentra acomodado en un pequeño hueco hidrofílico estabilizado por los puentes de hidrógeno que forma con la Gln88 y Leu17.

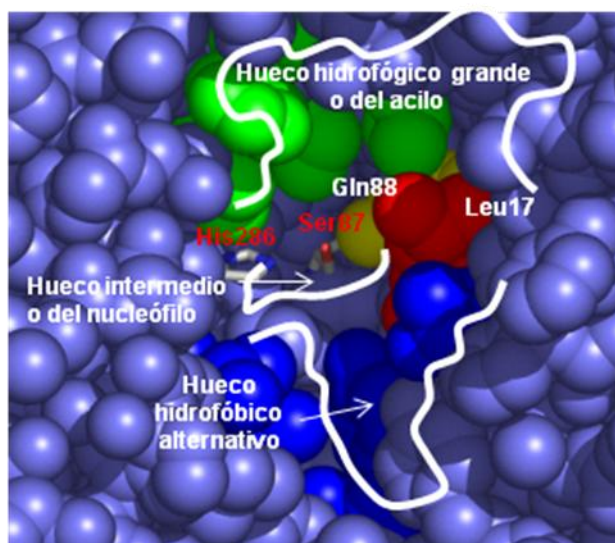


Figura 26. Centro activo de la PSL-C.

Aunque se han realizado diferentes estudios de modelización molecular que han conseguido explicar cualitativamente la

## **Antecedentes**

---

enantioselectividad de varios procesos enzimáticos, no se encuentran muchos ejemplos donde se explique la regioselectividad que son capaces de exhibir las lipasas. En nuestro grupo de investigación, se ha justificado la excelente regioselectividad que muestra la PSL-C en la acilación de la posición 3' de 2'-desoxinucleósidos.<sup>94</sup> De forma análoga, se ha explicado la acilación selectiva de la CAL-B en la posición 5' de 2'-desoxinucleósidos y 3',5'-diamino-2'-desoxinucleósidos.<sup>122</sup>

---

<sup>122</sup> Lavandera, I.; Fernández, S.; Magdalena, J.; Ferrero, M.; Kazlauskas, R. J.; Gotor, V. *ChemBioChem* **2005**, 6, 1381-1390.

### **3.2. OBJETIVOS**

El descubrimiento de que algunos L-nucleósidos presentan una importante actividad antiviral y antitumoral, además de los buenos resultados en términos de hibridación, selectividad y estabilidad frente a las nucleasas, que se observan cuando derivados de L-nucleótidos se introducen en una cadena de oligonucleótido *antisense*, han abierto numerosas líneas de investigación encaminadas a la síntesis de nuevos análogos de L-nucleósidos.

Uno de los mayores problemas que conlleva su síntesis es la obtención de mezclas racémicas D/L. Puesto que la cromatografía quiral no es un método adecuado para la separación de enantiómeros a escala industrial debido al alto coste que implicaría, el desarrollo de métodos alternativos que hagan viable su separación supondría un gran avance en la síntesis de nuevos análogos de L-nucleósidos.

Debido a los buenos resultados obtenidos en nuestro grupo de investigación en la acilación enzimática regioselectiva de  $\beta$ -L-2'-desoxinucleósidos y en la resolución de una mezcla racémica de  $\beta$ -D/L-timidina catalizada por una lipasa, los objetivos que nos planteamos en este capítulo son:

- Extender la resolución de  $\beta$ -D/L-timidina a otros 2'-desoxinucleósidos pirimidínicos y púricos.
- El estudio de la acilación enzimática regioselectiva de  $\beta$ -D- y  $\beta$ -L-ribonucleósidos.
- La resolución de mezclas racémicas de  $\beta$ -D/L-ribonucleósidos.

Por último, nos planteamos racionalizar mediante un estudio teórico de modelización molecular los resultados experimentales observados.



### **3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **3.3.1. RESOLUCIÓN ENZIMÁTICA DE MEZCLAS RACÉMICAS DE $\beta$ -D/L-2'-DESOXINUCLEÓSIDOS**

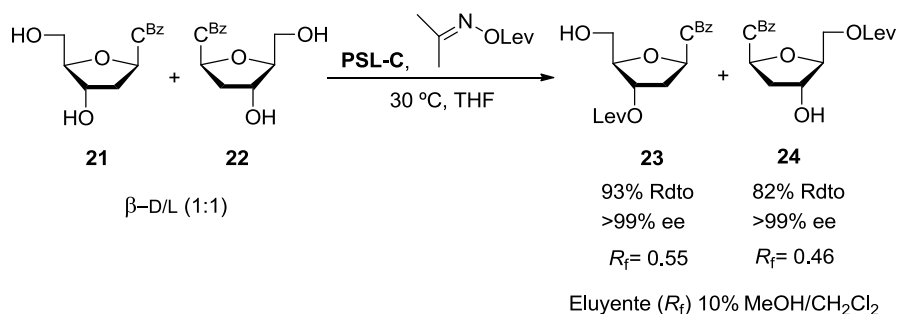
Teniendo en cuenta la diferente regioselectividad que exhibe la PSL-C en reacciones de acilación sobre  $\beta$ -L- y  $\beta$ -D-2'-desoxinucleósidos parece factible llevar a cabo la resolución de mezclas racémicas de estos isómeros. Utilizando el levulinato de acetoxima como agente de acilación se obtendrían los correspondientes 3'-O-levulinil- $\beta$ -D- y 5'-O-levulinil- $\beta$ -L-2'-desoxinucleósidos, que al tener diferente valor de  $R_f$  podrían ser separados por cromatografía de columna.

##### ***3.3.1.1. Resolución de la mezcla racémica de N-benzoil- $\beta$ -D/L-2'-desoxicitidina***

La potencial aplicación terapéutica del derivado val-LdC, el éster de la valina de la L-2'-desoxicitidina, para el tratamiento del virus de la hepatitis B nos motivó a desarrollar un método eficiente para la separación de una mezcla racémica de  $\beta$ -D/L-2'-desoxicitidina.

## Resultados y discusión

Teniendo en cuenta los antecedentes de nuestro grupo de investigación en la resolución de la mezcla racémica  $\beta$ -D/L-timidina,<sup>95</sup> se lleva a cabo la reacción de resolución de *N*-benzoil- $\beta$ -D/L-2'-desoxicitidina ( $\beta$ -D/L-dC<sup>Bz</sup>) en las mismas condiciones. Para ello, se parte de una mezcla 1:1 de ambos enantiómeros, los cuales no se pueden separar por cromatografía de columna al tener idénticos valores de  $R_f$ , y se hace reaccionar con levulinato de acetoxima (1.5 equivalentes) en presencia de PSL-C (1:1.5, p/p) como catalizador a 30 °C y una concentración 0.2 M en THF (Esquema 33).



**Esquema 33.** Resolución de una mezcla racémica de *N*-benzoil- $\beta$ -D/L-2'-desoxicitidina.

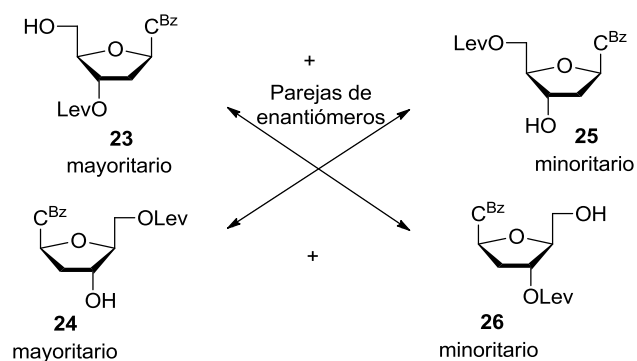
En estas condiciones la conversión no superaba el 50% tras 48 h de reacción. Esta diferencia de reactividad es posiblemente debida a la baja solubilidad que presenta este sustrato en THF con respecto a la timidina.

Para intentar aumentar la conversión, la reacción se lleva a cabo en una concentración 0.1 M, pero no se mejoran los resultados. Es entonces cuando se decide aumentar la cantidad de PSL-C (1:3, p/p) y del agente de acilación (3 equivalentes), manteniendo la temperatura a 30 °C por si un aumento de la misma diera lugar a una pérdida de selectividad de la enzima con el consiguiente descenso del exceso enantiomérico (*ee*).

Estas condiciones son las óptimas para la resolución de la mezcla racémica **21/22** alcanzándose la conversión total del sustrato de partida tras 24 h de reacción. El espectro de <sup>1</sup>H-RMN confirma la formación de los derivados  $\beta$ -D-3'-O-levulinil **23** y  $\beta$ -L-5'-O-levulinil **24** como únicos productos de reacción. La formación de ambos compuestos se atribuye a la preferencia opuesta que exhibe la PSL-C en  $\beta$ -D- y  $\beta$ -L-2'-desoxinucleósidos. Es decir, la PSL-C acila con total regioselectividad el hidroxilo primario del enantiómero  $\beta$ -L **22**, mientras que en el enantiómero  $\beta$ -D **21** sólo

cataliza la reacción de acilación del hidroxilo secundario. Este proceso recibe el nombre de resolución cinética paralela, ya que a partir de una mezcla racémica se obtienen dos productos diferentes, uno de cada uno de los enantiómeros. La mezcla de productos acilados **23** y **24** poseen valores de  $R_f$  bien diferenciados en CCF y se aíslan por cromatografía de columna con rendimientos del 93% y 82%, respectivamente.

**Determinación de los excesos enantioméricos.** Si esta reacción de resolución enzimática no fuera selectiva, además de los correspondientes productos diacilados, que se separarían fácilmente en la cromatografía de columna, podrían obtenerse hasta cuatro productos monoacilados -los derivados 5'- y 3'-*O*-levulinilo de cada uno de los dos enantiómeros-. Se espera que los compuestos **23** y **24** sean los mayoritarios; sin embargo, podrían haberse formado trazas de **25** y **26**, lo que daría lugar a un descenso del exceso enantiomérico en los productos de la reacción enzimática. Las parejas de compuestos **23/26** y **24/25** son enantiómeros entre sí (Figura 27).

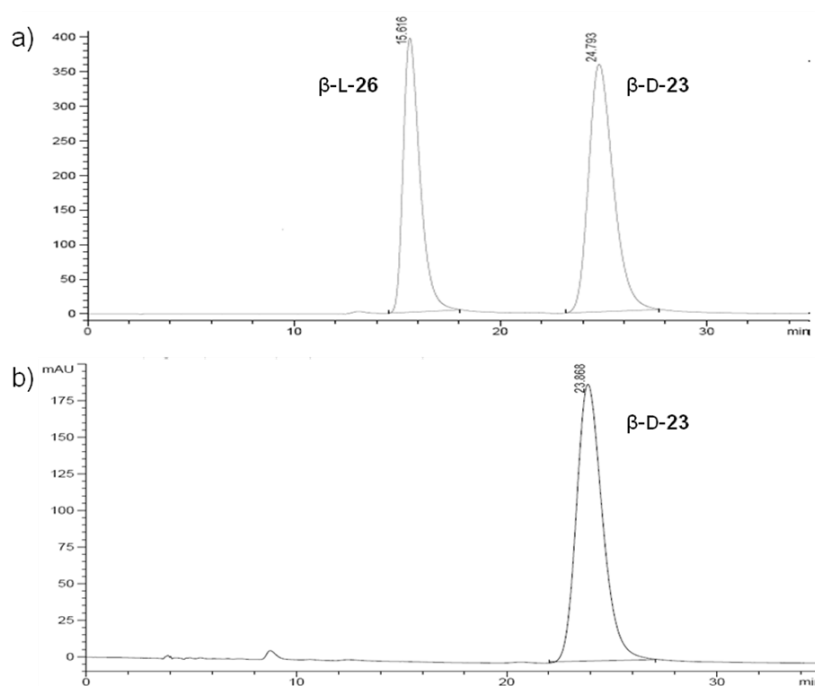


**Figura 27.** Posibles productos monoacilados de la reacción de acilación de *N*-benzoil-β-D/L-2'-desoxicitidina.

Los excesos enantioméricos se determinaron mediante el uso de la cromatografía de HPLC utilizando una columna quiral (Chiralcel OD). Para determinar el exceso enantiomérico del compuesto **23** se prepara una muestra racémica artificial de los enantiómeros **23** y **26** (acilados en la posición 3'). En la Figura 27 se muestran los cromatogramas de HPLC del compuesto *N*-benzoil-3'-*O*-levulinil-β-D/L-2'-desoxicitidina racémico (Figura 28a) y el obtenido en la reacción enzimática (Figura 28b). En el primero aparecen dos señales a 15.6 y 24.8 min de tiempo de retención, mientras que en el cromatograma del compuesto **23**, obtenido en la reacción enzimática, sólo se observa una única señal a tiempo de retención

## Resultados y discusión

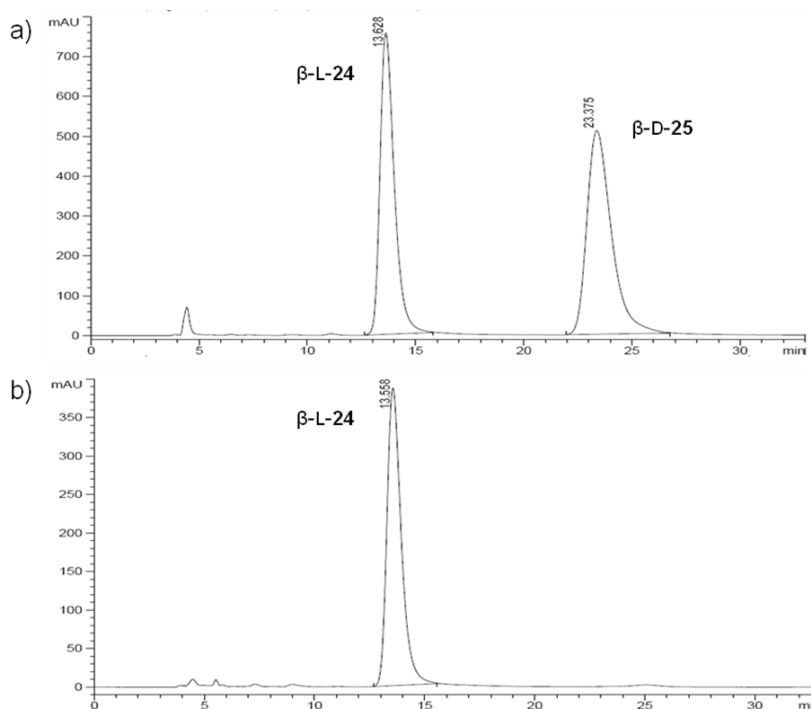
de 23.9 min, lo que supone un  $ee > 99\%$  ( $\pm 1\%$  error HPLC) para este derivado.



**Figura 28.** Cromatogramas correspondientes a: a) mezcla racémica de *N*-benzoyl-3'-*O*-levulinil- $\beta$ -D/L-2'-desoxycitidina (**23**+**26**); b) *N*-benzoyl-3'-*O*-levulinil- $\beta$ -D-2'-desoxycitidina (**23**) obtenido en la reacción enzimática.

De forma análoga se determina el  $ee$  del derivado *N*-benzoyl-5'-*O*-levulinil- $\beta$ -L-2'-desoxycitidina (**24**) que se forma en la reacción de resolución. En la Figura 29 se muestran los cromatogramas de la mezcla racémica (**24** y **25**) (Figura 29a) y del producto **24** obtenido en la reacción enzimática (Figura 29b). Como se observa, el cromatograma de la mezcla racémica presenta dos señales a tiempos de retención 13.6 y 23.4 min, mientras que el cromatograma del derivado **24** presenta únicamente una señal a 13.6 min, dando lugar a un  $ee > 99\%$  ( $\pm 1\%$  error HPLC).





**Figura 29.** Cromatogramas correspondientes a: a) mezcla racémica de *N*-benzoil-5'-*O*-levulinil-β-D/L-2'-desoxicitidina (**24+25**); b) *N*-benzoil-5'-*O*-levulinil-β-L-2'-desoxicitidina (**24**) obtenido en la reacción enzimática.

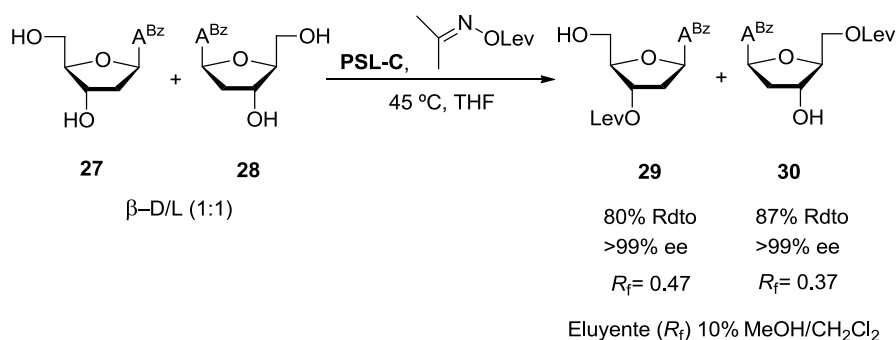
### 3.3.1.2. Resolución de la mezcla racémica de *N*-benzoil-β-D/L-2'-desoxiadenosina

Para llevar a cabo esta resolución, se utilizan las mismas condiciones que en el caso del sustrato *N*-benzoil-2'-desoxicitidina. Es decir, 3 equivalentes de levulinato de acetoxima respecto al sustrato racémico, la PSL-C (1:3, p/p), 30 °C y una concentración 0.1 M en THF. Sin embargo, tras 24 h el proceso de acilación de *N*-benzoil-β-D/L-2'-desoxiadenosina (**27/28**) no evoluciona y se observa una gran cantidad de sustrato de partida sin disolver. Con el fin de incrementar la solubilidad del sustrato racémico y, por tanto, la conversión se aumentó la dilución de la reacción hasta una concentración de 0.05 M, aunque no se obtuvieron los resultados deseados.

Otro parámetro que se puede modificar en un proceso enzimático es la temperatura. Así, manteniendo la concentración en 0.05 M se incrementó la temperatura de 30 a 45 °C. Tras 20 h de reacción, en el espectro de <sup>1</sup>H-RMN del crudo no aparecían señales del producto de partida, lo que indica que en el proceso se

## Resultados y discusión

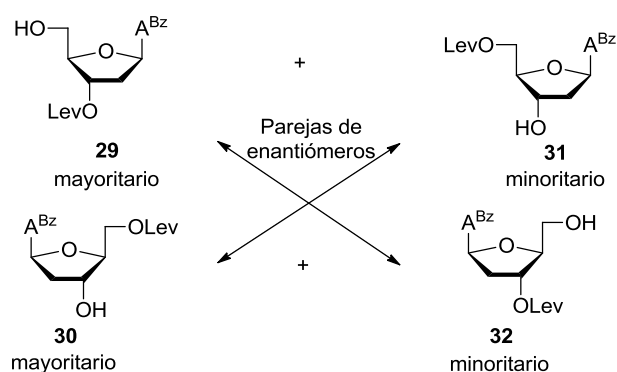
ha consumido todo el sustrato inicial. En el Esquema 34 se muestran los resultados obtenidos.



**Esquema 34.** Resolución de una mezcla racémica de *N*-benzoil- $\beta$ -D/L-2'-desoxiadenosina.

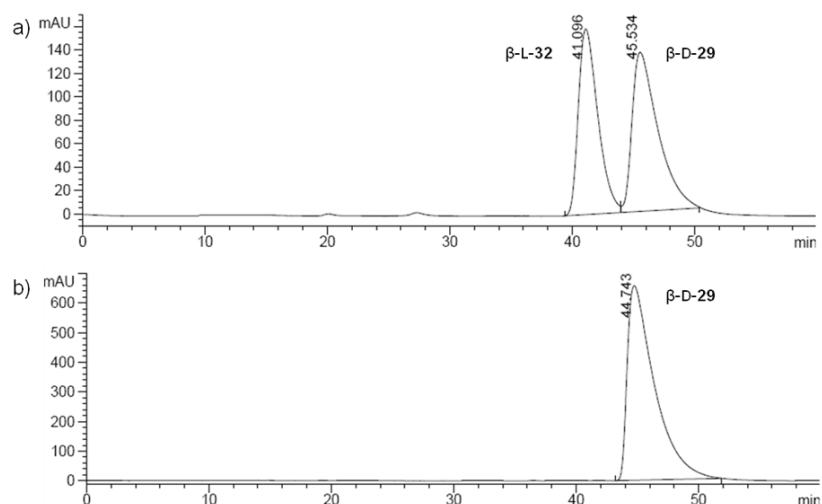
El aumento de la temperatura no conlleva una pérdida de selectividad de la PSL-C. Esta enzima exhibió la misma regioespecificidad con los derivados de 2'-desoxicitidina y 2'-desoxiadenosina. El enantiómero *N*-benzoil- $\beta$ -D-2'-desoxiadenosina (**27**) fue acilado exclusivamente en la posición 3', dando lugar a la formación del derivado 3'-*O*-levulinil- $\beta$ -D-2'-desoxiadenosina **29**, mientras que para su enantiómero, *N*-benzoil- $\beta$ -L-2'-desoxiadenosina (**28**), la PSL-C cataliza la acilación en la posición 5', generando el análogo 5'-*O*-levulinil- $\beta$ -L-2'-desoxiadenosina **30**.

**Determinación de los excesos enantioméricos.** Como en el caso anterior se ha examinado la pureza enantiomérica de los derivados **29** y **30** mediante HPLC con columna de relleno quiral (Chiralcel OJ-H). En la Figura 30 se muestran los productos monoacilados que se podrían formar si la reacción de acilación no fuera totalmente selectiva. En la parte de arriba tenemos los dos productos monoacilados que se obtendrían para el enantiómero  $\beta$ -D (**29** y **31**) y en la parte de abajo los compuestos monoacilados correspondientes al enantiómero  $\beta$ -L (**30** y **32**). Como se puede observar, los productos **29/32** y **30/31** son parejas de enantiómeros.



**Figura 30.** Posibles productos monoacilados de la reacción de acilación de *N*-benzoyl- $\beta$ -D/L-2'-desoxiadenosina.

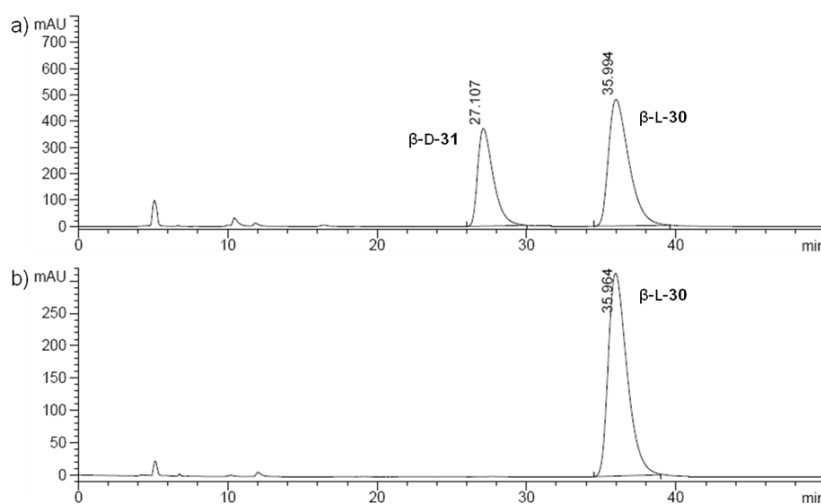
Para calcular el ee del derivado **29** obtenido en la reacción enzimática, se compara dicho cromatograma con el de la mezcla racémica de los enantiómeros **29** y **32**. En la Figura 31a se muestra el cromatograma en el que estos dos enantiómeros se encuentran separados con tiempos de retención de 45.5 y 41.1 min, respectivamente. El cromatograma del producto **29** aislado de la reacción de acilación presenta una única señal a tiempo de retención de 44.7 min, indicando que el 3'-*O*-levulinato **29** se obtiene con un ee >99% ( $\pm 1\%$  error HPLC) (Figura 31b).



**Figura 31.** Cromatogramas correspondientes a: a) mezcla racémica de *N*-benzoyl-3'-*O*-levulinil- $\beta$ -D/L-2'-desoxiadenosina (**29**+**32**); b) *N*-benzoyl-3'-*O*-levulinil- $\beta$ -D-2'-desoxiadenosina (**29**) obtenido en la reacción enzimática.

## Resultados y discusión

Análogamente, en la Figura 32a se muestra el cromatograma correspondiente a la mezcla artificial de *N*-benzoil-5'-*O*-levulinil- $\beta$ -L- (**30**) y *N*-benzoil-5'-*O*-levulinil- $\beta$ -D-2'-desoxiadenosina (**31**) con tiempos de retención de 36.0 y 27.1 min, respectivamente. En la Figura 32b aparece el cromatograma del compuesto **30** obtenido en la reacción enzimática. Sólo se observa un pico a 35.9 min, lo que indica que se obtiene de forma enantiopura.

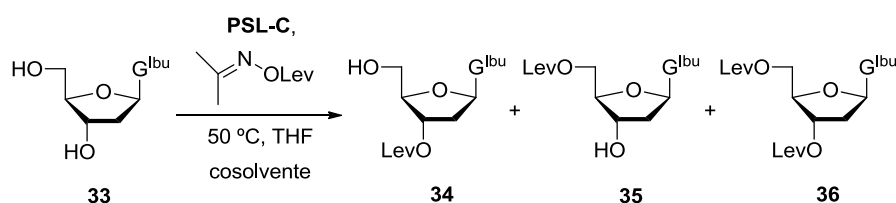


**Figura 32.** Cromatogramas correspondientes a: a) mezcla de *N*-benzoil-5'-*O*-levulinil- $\beta$ -D/L-2'-desoxiadenosina (**30+31**); b) *N*-benzoil-5'-*O*-levulinil- $\beta$ -L-2'-desoxiadenosina (**30**) obtenido en la reacción enzimática.

### 3.3.1.3. Resolución de la mezcla racémica de *N*-isobutiril- $\beta$ -D/L-2'-desoxiguanosina

Se sabe que la reacción de acilación catalizada por la PSL-C de *N*-isobutiril- $\beta$ -D-2'-desoxiguanosina no es selectiva y origina una mezcla de productos mono- y diacilados, además de nucleósido de partida sin reaccionar. Por otra parte, el enantiómero L no reacciona. Estos resultados complican la resolución de la mezcla racémica de *N*-isobutiril- $\beta$ -D/L-2'-desoxiguanosina.<sup>69a,114</sup>

Nos planteamos la siguiente estrategia. Se buscan condiciones para llevar el proceso de acilación a conversión completa con el enantiómero  $\beta$ -D. De esta forma, se separaría fácilmente por cromatografía de columna el enantiómero  $\beta$ -L sin reaccionar de los productos acilados provenientes de la reacción de acilación no selectiva del enantiómero D. Para ello, se estudia la reacción de acilación enzimática con el enantiómero  $\beta$ -D-**33** (Esquema 35).



**Esquema 35.** Acilación de *N*-isobutiril- $\beta$ -D-2'-desoxiguanosina (**33**) con PSL-C.

En la Tabla 9 se recogen los resultados obtenidos de las pruebas realizadas para llevar a conversión total la acilación de la *N*-isobutiril- $\beta$ -D-2'-desoxiguanosina (**33**) con PSL-C y levulinato de acetoxima. En primer lugar, se añade un mayor exceso tanto de catalizador como de agente de acilación. Sin embargo, se comprueba por CCF que después de 6 días la reacción no fue completa, probablemente debido a la alta insolubilidad de éste nucleósido en THF (entrada 1, Tabla 9). Por otra parte, el empleo de cosolventes polares como piridina o DMF, que ayudan a la solubilización del sustrato,<sup>123</sup> inhiben por completo la actividad enzimática (entradas 2 y 3, Tabla 9). En los últimos años, los líquidos iónicos han demostrado una alta capacidad para disolver compuestos polares y se han utilizado con éxito como disolventes y/o cosolventes en reacciones enzimáticas.<sup>97,124</sup> En nuestro caso, la adición del líquido iónico tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazolio, [C<sub>4</sub>MIm]BF<sub>4</sub>, no aumenta significativamente la solubilidad de este sustrato, por lo que la reacción tampoco alcanza la conversión completa (entrada 4, Tabla 9).

**Tabla 9.** Acilación enzimática de *N*-isobutiril- $\beta$ -D-2'-desoxiguanosina (**33**) con PSL-C a 50 °C.<sup>a</sup>

Entrada	<b>33</b> :PSL-C <sup>b</sup>	<b>33</b> :EO	t (d)	Cosolvente	Resultados
1	1:4	1:4	6	-	Incompleta
2	1:3	1:3	2	10% Piridina	No reac.
3	1:3	1:3	2	10% DMF	No reac.
4	1:4	1:4	6	20% [C <sub>4</sub> MIm]BF <sub>4</sub>	Incompleta

<sup>a</sup>La concentración de las reacciones es 0.05 M. <sup>b</sup>Relación **33**:PSL-C en peso.

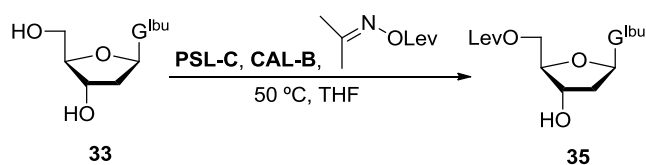
<sup>123</sup> Uemura, A.; Nazaki, K.; Yamashita, J.; Yasumoto, M. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 3817-3818.

<sup>124</sup> a) Li, N.; Ma, D.; Zong, M. *J. Biotech.* **2008**, *133*, 103-109. b) Kim, K.-W.; Song, B.; Choi, M.-Y.; Kim, M.-J. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1507-1509. c) Madeira, R.; Van Rantwijk, F.; Seddon, K. R.; Sheldon, R. A. *Org. Lett.* **2000**, 4189-4191.

## Resultados y discusión

Puesto que mediante acilación enzimática con PSL-C no se puede resolver esta mezcla racémica, se decide utilizar simultáneamente las lipasas CAL-B y PSL-C.<sup>125</sup> De esta forma, el enantiómero  $\beta$ -D podría diacilarse (dando lugar a la formación del compuesto **36**) debido a que la PSL-C muestra cierta selectividad hacia el hidroxilo de la posición 3' y la CAL-B es totalmente selectiva a 5'. Por otra parte, el enantiómero  $\beta$ -L sólo se monoacilaría -la PSL-C no cataliza su acilación en 3' y la CAL-B lo acilaría en posición 5'- y mediante una sencilla cromatografía de columna se separaría el derivado diacilado **36**, proveniente del enantiómero  $\beta$ -D, del compuesto monoacilado resultante de la acilación del enantiómero  $\beta$ -L.

Con el objetivo de comprobar si las consideraciones anteriores eran ciertas, se trata el enantiómero  $\beta$ -D con levulinato de acetoxima (5 equivalentes) como agente acilante y las lipasas PSL-C, en relación 1:3 (p/p), y CAL-B, en relación 1:1 (p/p), como catalizadores a 50 °C. Sin embargo, en ningún momento se observó por CCF la formación del derivado diacilado **36**, aislándose exclusivamente el compuesto monoacilado *N*-isobutiril-5'-*O*-levulinil- $\beta$ -D-2'-desoxiguanosina (**35**). Posiblemente este último no es un sustrato adecuado para la PSL-C y consecuentemente ésta no cataliza su acilación en el hidroxilo de la posición 3' que todavía tiene libre (Esquema 36). Por tanto, esta metodología no es adecuada para la resolución de la mezcla racémica.

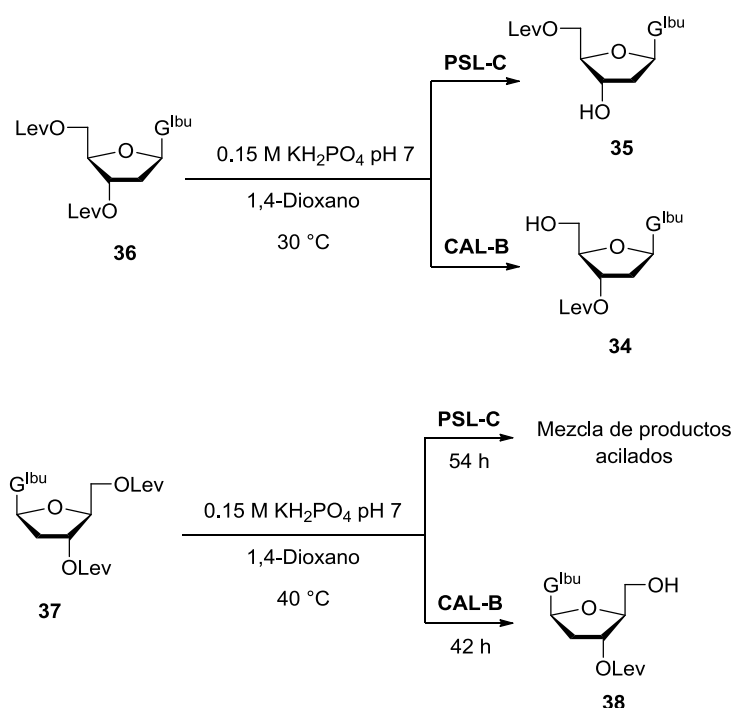


**Esquema 36.** Acilación con PSL-C y CAL-B de *N*-isobutiril- $\beta$ -D-2'-desoxiguanosina (**33**).

Por último, se intentó llevar a cabo la resolución mediante una hidrólisis enzimática de los correspondientes derivados D y L 3',5'-di-*O*-levulinilo **36** y **37**, respectivamente (Esquema 37). La reacción de hidrólisis catalizada por PSL-C de 3',5'-di-*O*-Lev- $\beta$ -D-dG<sup>Ibu</sup> (**36**) proporciona 5'-*O*-Lev- $\beta$ -D-dG<sup>Ibu</sup> (**35**), mientras que la CAL-B da lugar al regioisómero 3'-*O*-Lev **34**. La CAL-B exhibe la misma selectividad con el isómero L y se observa la hidrólisis del

<sup>125</sup> Este procedimiento se ha utilizado con éxito previamente en: Díaz-Rodríguez, A.; Fernández, S.; Lavandera, I.; Ferrero, M.; Gotor V. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 5835-5838.

éster en la posición 5' del derivado 3',5'-di-O-Lev-β-D-dG<sup>Ibu</sup> (**37**) para dar **38**. Sin embargo, la PSL-C exhibe una baja selectividad y se obtienen mezclas de productos acilados.



**Esquema 37.** Hidrólisis con PSL-C y CAL-B de 3',5'-di-O-Lev-β-D-dG<sup>Ibu</sup> (**36**) y 3',5'-di-O-Lev-β-L-dG<sup>Ibu</sup> (**37**).

A pesar de haber intentado varias estrategias no hemos encontrado una enzima adecuada para la separación de mezclas racémicas de β-D/L-dG<sup>Ibu</sup>.

### 3.3.2. ACILACIONES ENZIMÁTICAS EN β-D y β-L-RIBONUCLEÓSIDOS

Se decide ampliar la resolución mostrada anteriormente a los β-D/L-ribonucleósidos, debido a su aplicación en la síntesis de aptámeros terapéuticos.<sup>126</sup> Se procede, en primer lugar, al estudio de las acilaciones enzimáticas regioselectivas en cada uno de los enantiómeros por separado. Existen pocos ejemplos en la

<sup>126</sup> Eulberg, D.; Jarosch, F.; Vonhoff, S.; Klussmann, S. *Spiegelmers for Therapeutic Applications*. In *The Aptamer Handbook*; Klussmann, S., Ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 2006; Chapter 18, pp 417-439.

## Resultados y discusión

bibliografía de este tipo de procesos en  $\beta$ -D-ribonucleósidos poseyendo los tres grupos hidroxilo, y no se han investigado en  $\beta$ -L-ribonucleósidos. La mayor dificultad que, a priori, puede presentar la acilación de estos compuestos frente a los 2'-desoxinucleósidos es que su mayor polaridad conllevará una peor solubilidad en el disolvente generalmente empleado en las reacciones enzimáticas en nucleósidos, es decir, THF. Por ello, se estudió la solubilidad en THF de cada uno de los desoxi- y ribonucleósidos empleados en este capítulo (Tabla 10).

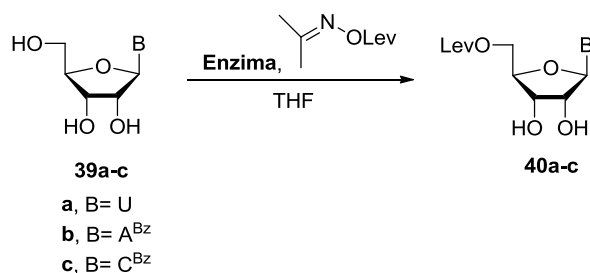
**Tabla 10.** Solubilidad de nucleósidos en THF.

Entrada	Nucleósido	Solubilidad (mg/mL)
1	T	4.4
2	dC <sup>Bz</sup>	2.1
3	dA <sup>Bz</sup>	5.4
4	dG <sup>Ibu</sup>	0.4
5	U	3.0
6	A <sup>Bz</sup>	0.5
7	C <sup>Bz</sup>	<<0.1

Los ribonucleósidos *N*-benzoil- $\beta$ -adenosina (entrada 6, Tabla 10) y, especialmente, *N*-benzoil- $\beta$ -citidina (entrada 7, Tabla 10) presentan valores de solubilidad muy bajos en THF. También el nucleósido *N*-isobutiril- $\beta$ -2'-desoxiguanosina (Entrada 4, Tabla 10) es extremadamente insoluble en THF, lo que justifica las dificultades encontradas para llevar a conversión completa las reacciones enzimáticas con este sustrato.

### 3.3.2.1. Acilaciones enzimáticas en $\beta$ -D-ribonucleósidos

Para este estudio se eligen las lipasas CAL-B y PSL-C (Esquema 38).



**Esquema 38.** Acilaciones enzimáticas en  $\beta$ -D-ribonucleósidos.



La acilación de  $\beta$ -D-uridina (**39a**) y *N*-benzoil- $\beta$ -D-adenosina (**39b**) con levulinato de acetoxima en presencia de CAL-B origina los ésteres 5'-*O*-levulinilo **40a** y **40b** con excelente regioselectividad y rendimientos altos en tiempos de reacción cortos (entradas 1 y 2, Tabla 11).

**Tabla 11.** Acilación enzimática de  $\beta$ -D-ribonucleósidos.<sup>a</sup>

Entrada	Sustrato	Enzima	c (M)	T (°C)	t (h)	<b>39</b> (%) <sup>b</sup>	<b>40</b> (%) <sup>b,c</sup>
1	<b>39a</b>	CAL-B	0.1	30	2		97 (80)
2	<b>39b</b>	CAL-B	0.05	45	2		>97 (83)
3	<b>39c</b>	CAL-B <sup>d</sup>	0.05	50	55	30	70 (56)
4	<b>39c</b>	CAL-B <sup>d,e</sup>	0.025	55	24		>97 (93)
5	<b>39a</b>	PSL-C	0.1	30	13		mezclas
6	<b>39b</b>	PSL-C	0.05	45	24	>97	
7	<b>39b</b>	PSL-C	0.025	45	27	78	mezclas
8	<b>39c</b>	PSL-C <sup>d</sup>	0.025	55	24	N.C. <sup>f</sup>	mezclas

<sup>a</sup>Relación de **39**:CAL-B es 1:1 (p/p); relación **39**:PSL-C es 1:3 (p/p); 3 equivalentes de levulinato de acetoxima. <sup>b</sup>Porcentaje de compuestos calculado por <sup>1</sup>H-RMN ( $\pm 3\%$  error). <sup>c</sup>Rendimiento de producto aislado entre paréntesis. <sup>d</sup>9 equivalentes de levulinato de acetoxima. <sup>e</sup>Relación de **39c**:CAL-B es 1:2 (p/p). <sup>f</sup>No calculado debido a la complejidad del espectro de RMN.

La reacción también transcurre con total selectividad con la *N*-benzoil- $\beta$ -D-citidina (**39c**). Sin embargo, la acilación es más lenta con este sustrato y no se consigue conversión completa incluso utilizando un gran exceso de agente acilante (9 equivalentes vs 3 equivalentes). Esto es debido principalmente a la baja solubilidad del nucleósido en el medio de reacción (entrada 7, Tabla 10). Para llevar la acilación de **39c** a conversión completa se precisa diluir la reacción hasta 0.025 M, subir la temperatura a 55 °C, utilizar 9 equivalentes de levulinato de acetoxima y doblar la carga de CAL-B, lo que no influye en la excelente selectividad del proceso, que continúa siendo total hacia la posición 5' (entrada 4, Tabla 11). Estas condiciones conducen a la obtención de 5'-*O*-levulinil- $\beta$ -D-C<sup>Bz</sup> (**40c**) con 93% de rendimiento.

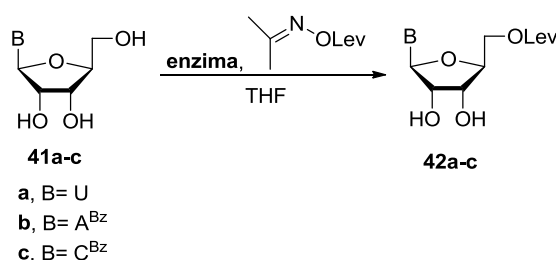
Con PSL-C se observan selectividades muy bajas. Esta lipasa, que en  $\beta$ -D-2'-desoxinucleósidos es totalmente selectiva hacia la posición 3', deja de serlo en  $\beta$ -D-ribonucleósidos. La acilación de uridina (**39a**) con PSL-C conduce a una mezcla de derivados acilados, siendo los nucleósidos 2'-*O*-Lev y 3'-*O*-Lev los productos mayoritarios (entrada 5, Tabla 11). En el caso de  $\beta$ -D-A<sup>Bz</sup> (**39b**) sólo se observa nucleósido de partida tras 24 h de reacción (entrada 6, Tabla 11). La baja solubilidad de  $\beta$ -D-A<sup>Bz</sup> en THF y la

## Resultados y discusión

baja reactividad de los ribonucleósidos en presencia de PSL-C justifican que la acilación no tenga lugar. Cuando se utilizan condiciones más diluidas se alcanza una conversión del 22% pero persiste la baja selectividad (entrada 7, Tabla 11). La PSL-C también mostró una baja regioselectividad en la reacción de acilación de  $\beta$ -D-C<sup>Bz</sup> (**39c**) (entrada 8, Tabla 11).

### 3.3.2.2. Acilaciones enzimáticas en $\beta$ -L-ribonucleósidos

Con el fin de demostrar la versatilidad de estos procesos nos planteamos estudiar el comportamiento que presentan las enzimas PSL-C y CAL-B en la reacción de acilación de  $\beta$ -L-ribonucleósidos para así sintetizar, en una sola etapa, derivados selectivamente protegidos (Esquema 39).



**Esquema 39.** Acilaciones enzimáticas en  $\beta$ -L-ribonucleósidos.

La lipasa CAL-B cataliza con total selectividad la acilación en la posición 5' de  $\beta$ -L-U (**41a**) y  $\beta$ -L-A<sup>Bz</sup> (**41b**). Se alcanzan conversiones completas en tiempos de reacción cortos (entradas 1 y 2, Tabla 12), aislándose los compuestos 5'-O-lev- $\beta$ -L-U (**42a**) y 5'-O-lev- $\beta$ -L-A<sup>Bz</sup> (**42b**) con rendimientos del 81 y 80%, respectivamente. Sin embargo, para el derivado  $\beta$ -L-C<sup>Bz</sup> (**41c**), a pesar de incrementar el número de equivalentes de levulinato de acetoxima y la cantidad de enzima, la reacción se estanca al 63% de conversión debido a la extremadamente baja solubilidad del sustrato en THF (entrada 3, Tabla 12). Además, aunque se obtiene el derivado 5'-O-lev **42c** como producto mayoritario también se observa la formación de compuestos diacilados.

La PSL-C es también selectiva a la posición 5', mostrando un comportamiento idéntico al que exhibe con  $\beta$ -L-2'-desoxinucleósidos y diferente al que muestra en  $\beta$ -D-ribonucleósidos, donde no es selectiva. Los derivados **42a** y **42b** (entradas 4 y 5, Tabla 12) se obtienen con rendimientos excelentes. La baja solubilidad de la *N*-benzoil- $\beta$ -D-citosina (**41c**)

impide que se alcance la conversión completa; a pesar de ello, **42c** se aísla con un 70% de rendimiento (entrada 6, Tabla 12).

**Tabla 12.** Acilación enzimática de  $\beta$ -L-ribonucleósidos.<sup>a</sup>

Entrada	Sustrato	Enzima	c (M)	T (°C)	t (h)	<b>41</b> (%) <sup>b</sup>	<b>42</b> (%) <sup>b,c</sup>
1	<b>41a</b>	CAL-B	0.1	30	5.5		97 (81)
2	<b>41b</b>	CAL-B	0.05	45	3		>97 (80)
3	<b>41c</b>	CAL-B <sup>d,e</sup>	0.025	55	41	18	63 (58)
4	<b>41a</b>	PSL-C	0.1	30	10.5		>97 (87)
5	<b>41b</b>	PSL-C	0.025	45	26		>97 (88)
6	<b>41c</b>	PSL-C <sup>d,f</sup>	0.025	55	46	25	75 (70)

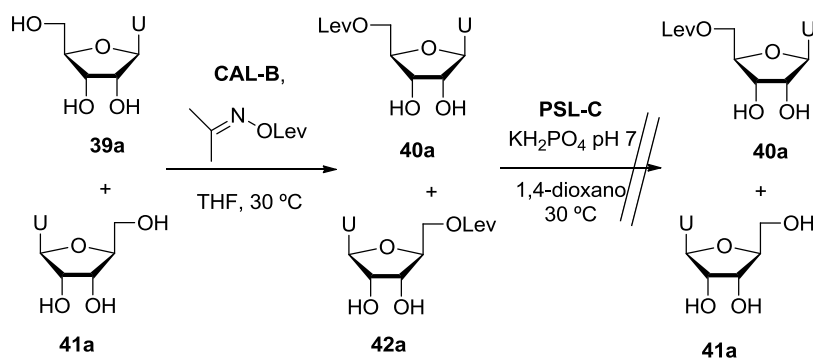
<sup>a</sup>Relación de **41**:CAL-B es 1:1 (p/p); relación **41**:PSL-C es 1:3; 3 equivalentes de levulinato de acetoxima. <sup>b</sup>Porcentaje de compuestos calculado por <sup>1</sup>H-RMN. <sup>c</sup>Rendimiento de producto aislado entre paréntesis. <sup>d</sup>9 equivalentes de levulinato de acetoxima. <sup>e</sup>Relación de **41c**:CAL-B es 1:2 (p/p). <sup>f</sup>Relación **41c**:PSL-C es 1:6 (p/p).

### 3.3.3. RESOLUCIÓN ENZIMÁTICA DE $\beta$ -D/L-URIDINA

Dados los excelentes resultados obtenidos en la resolución enzimática de  $\beta$ -D/L-2'-desoxinucleósidos, nos propusimos llevar a cabo la resolución de mezclas racémicas de  $\beta$ -D/L-ribonucleósidos. Sin embargo, la estrategia es más complicada, debido a que la PSL-C no reacciona selectivamente con  $\beta$ -D-ribonucleósidos, como ocurría con los análogos  $\beta$ -D-2'-desoxi, en donde la PSL-C acilaba selectivamente el hidroxilo secundario situado en la posición 3'. Ante esta falta de selectividad exhibida por la PSL-C en las reacciones de acilación se propone la estrategia detallada en el Esquema 40.

Para ello, la mezcla racémica  $\beta$ -D/L-uridina (**39a:41a**) se somete a acilación enzimática con la lipasa CAL-B y el levulinato de acetoxima a una temperatura de 30 °C. De esta forma, tras una sencilla cromatografía de columna, se obtienen los derivados 5'-O-levulinil- $\beta$ -D- y 5'-O-levulinil- $\beta$ -L-uridina (**40a** y **42a**), respectivamente. Posteriormente, sobre esta mezcla se realiza una hidrólisis enzimática con PSL-C, esperando que el derivado 5'-O-levulinil- $\beta$ -L-uridina (**42a**) fuese hidrolizado y su enantiómero, **40a**, quedase inalterado. Sin embargo, no se produjo reacción sobre ninguno de los enantiómeros.

## Resultados y discusión

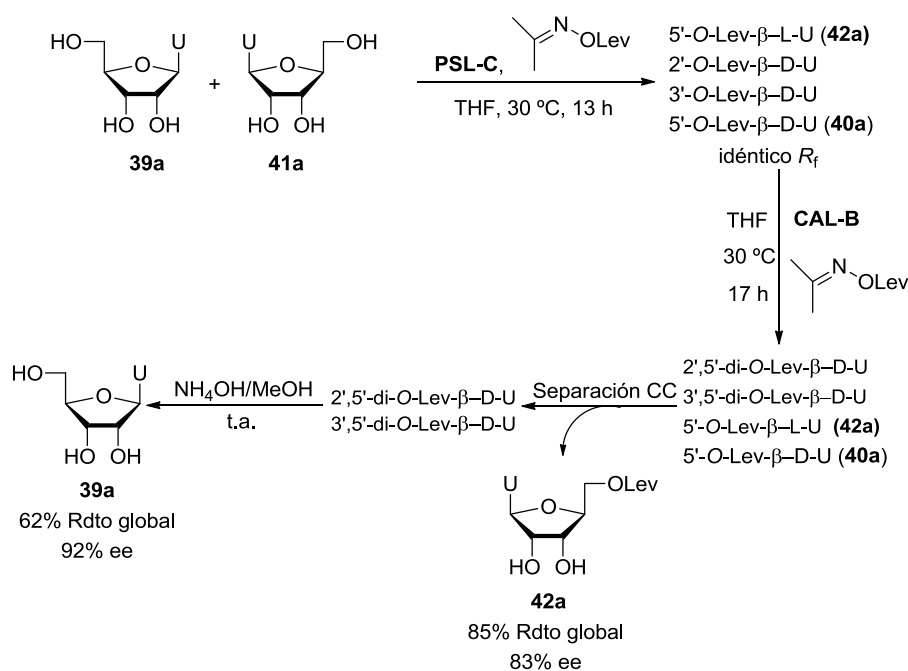


**Esquema 40**

Ante este intento fallido, se diseñó un nuevo protocolo que también implica el uso combinado y secuencial de las lipasas PSL-C y CAL-B. Se pretende transformar el enantiómero β-D-U **39a** en sus correspondientes derivados diacilados, puesto que la PSL-C muestra cierta selectividad hacia las posiciones 2' y 3' y la CAL-B es totalmente selectiva hacia la posición 5' (Esquema 41).

Por otra parte, es de esperar que, en estas condiciones, el enantiómero β-L-U (**41a**) sólo sea acilado en el hidroxilo primario, dado que tanto la PSL-C como la CAL-B sólo acilan su posición 5', dando lugar a la formación de **42a**. De este modo, una sencilla cromatografía de columna sería suficiente para separar los derivados diacilados provenientes del isómero **39a** de los monoacilados derivados de **41a**.

El tratamiento de β-D/L-U (**39a:41a**) con levulinato de acetoxima en presencia de PSL-C a 30 °C en THF origina una mezcla inseparable de múltiples productos monoacilados con el mismo  $R_f$ . En el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de esta fracción se observan señales correspondientes a los derivados 2'-, 3'- y 5'-O-levulinilo. Es de esperar que el enantiómero β-L-U (**41a**) se transforme en su derivado acilado en la posición 5' **42a**. Por otra parte, el enantiómero β-D-U **39a** da lugar a la formación de 2'- y 3'-O-levulinil-β-D-uridina, como producto mayoritario, junto con trazas del análogo acilado en la posición 5' **40a**.



Esquema 41

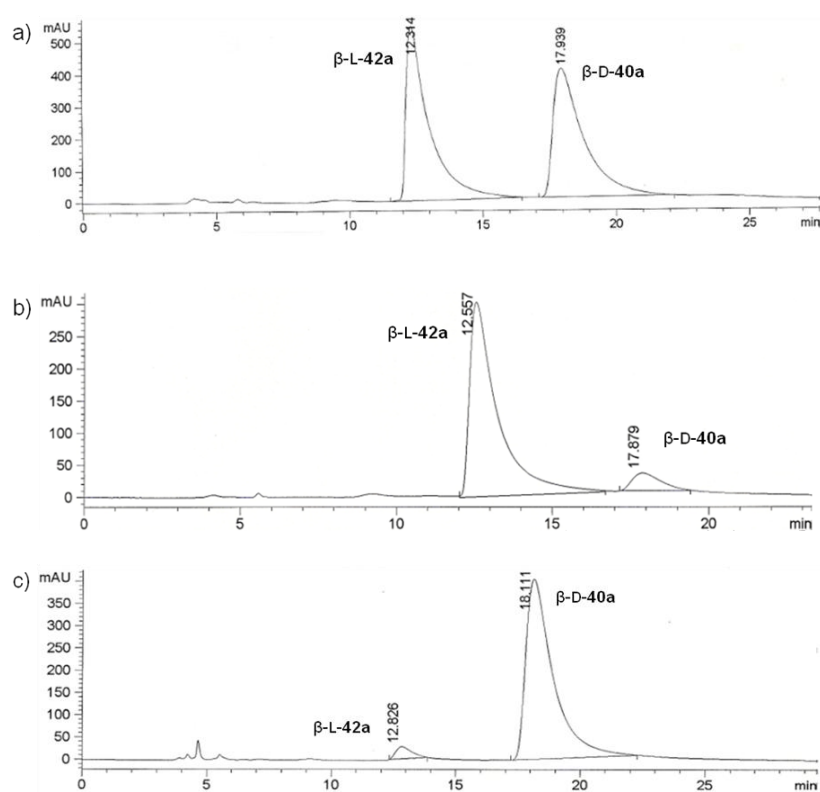
Sobre esta mezcla de productos se realiza una segunda acilación enzimática catalizada por CAL-B. Como esta lipasa es selectiva hacia la acilación en la posición 5', los análogos 2'- y 3'-O-levulinil-β-D-uridina –que tienen libre el hidroxilo de esta posición– se transforman en sus derivados diacilados, mientras que el nucleósido 5'-O-levulinil-β-L-uridina (**42a**) queda inalterado. Una sencilla cromatografía de columna permite separar los derivados diacilados y monoacilados. Este último se obtiene con un 85% de rendimiento global y un 83% de ee y se identifica como el derivado 5'-O-lev-β-L-U. La pérdida de ee se debe a la formación en la primera acilación enzimática con PSL-C de trazas de 5'-O-levulinil-β-D-uridina (**40a**).

Los derivados diacilados se tratan con una mezcla de NH<sub>4</sub>OH/MeOH dando lugar a la β-D-uridina (**39a**) con un 62% de rendimiento global y un 92% de ee.

Para calcular los excesos enantioméricos se ha utilizado un cromatógrafo de HPLC con una columna de relleno quiral (Chiralcel OD). En la Figura 33a se muestra el cromatograma de la mezcla racémica 5'-O-levulinil-β-D/L-uridina (**40a:42a**) y en la Figura 33b el correspondiente al derivado **42a** obtenido en el proceso enzimático. En el caso de la β-D/L-uridina no se han encontrado las

## Resultados y discusión

condiciones adecuadas para su separación mediante HPLC con columna quiral por lo que el compuesto **39a**, obtenido tras el proceso enzimático, debe ser derivatizado como 5'-*O*-levulinilo con el fin de calcular su exceso enantiomérico. Esta derivatización se realizó mediante una reacción de acilación enzimática catalizada por CAL-B (Figura 33c).



**Figura 33.** Cromatogramas correspondientes a: a) mezcla racémica de 5'-*O*-levulinil- $\beta$ -D/L-uridina (**40a:42a**); b) 5'-*O*-levulinil- $\beta$ -L-uridina (**40a**) obtenida en la reacción enzimática; c) 5'-*O*-levulinil- $\beta$ -D-uridina (**42a**) obtenida por derivatización del derivado  $\beta$ -D-uridina (**39a**) que se obtiene del proceso enzimático.

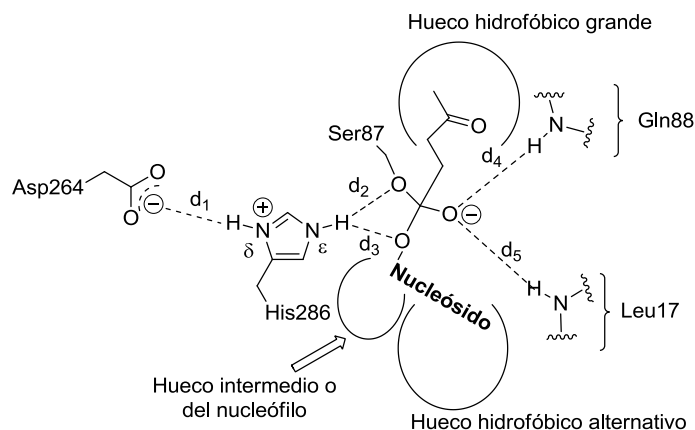
### 3.3.4. ESTUDIO DE LA ACILACIÓN ENZIMÁTICA CON PSL DE $\beta$ -D/L-NUCLEÓSIDOS MEDIANTE MODELIZACIÓN MOLECULAR

La excelente y diferente regio- y estereoselectividad que muestra la PSL-C en la acilación de  $\beta$ -D/L-2'-desoxinucleósidos nos llevó a realizar un análisis teórico mediante modelización molecular que explicase los resultados obtenidos. Como ejemplo

representativo, realizamos el estudio sobre la *N*-benzoil- $\beta$ -D/L-2'-desoxicitidina.

Que la reacción esté favorecida por la posición 3' ó 5' del nucleósido se deberá a diferencias de estabilidad entre los intermedios que, según el mecanismo de las serín-hidrolasas, conducen a los nucleósidos acilados en estas dos posiciones. El intermedio tetraédrico 2 (IT2, Esquema 32) contiene al nucleófilo – en nuestro caso el nucleósido- unido a la enzima y será el que determine la regioselectividad del proceso.

Como se ha comentado en los antecedentes, la estructura de rayos X de la PSL puede obtenerse de la base de datos de proteínas *Protein Data Bank*.<sup>121</sup> Se elige la forma abierta 3LIP que tiene tres subunidades para acomodar al sustrato. De izquierda a derecha en la triada catalítica Asp264-His286-Ser87 se puede observar: a) el hueco hidrofóbico grande o del acilo, b) el hueco intermedio o del nucleófilo y c) un hueco hidrofóbico alternativo (Figura 34). Este hueco hidrofóbico alternativo está situado debajo de la triada catalítica y tiene una forma estrecha y alargada. La mayoría de las enzimas, incluida la CAL-B, carecen de este hueco hidrofóbico alternativo.<sup>122</sup>



**Figura 34.** Estructura del IT2.

Es de esperar que el nucleósido se una al hueco intermedio, pero debido a que su tamaño es mucho mayor que el de éste, es probable que se extienda también hacia el hueco hidrofóbico alternativo. En el IT2, la His286 forma un enlace de hidrógeno con el Asp264 ( $d_1$ ), mientras que el protón enlazado al otro nitrógeno del imidazol forma dos enlaces de hidrógeno, uno con el oxígeno de la Ser87 ( $d_2$ ) y otro con el oxígeno de la posición 3' o 5' del nucleósido que realizó el ataque al intermedio acil-enzima ( $d_3$ ).

## Resultados y discusión

---

Además, el oxígeno del levulinilo que constituía el carbonilo del éster forma dos puentes de hidrógeno con la Gln88 (d<sub>4</sub>) y la Leu17 (d<sub>5</sub>). Estos cinco puentes de hidrógeno son esenciales para que ocurra la catálisis enzimática.

La existencia o no de los enlaces de hidrógeno esenciales y de otros que se pudieran formar, las congestiones estéricas que pudieran existir y los ángulos de torsión que se formen en el intermedio IT2, serán los principales factores que determinarán la regioselectividad de la reacción.<sup>127</sup> De este modo, el objetivo es modelizar y minimizar la energía de los IT2 para la acilación en las posiciones 3' y 5' en ambos enantiómeros D/L.

La modelización se lleva a cabo con el programa MOE (*Molecular Operating Environment*) y el campo de fuerzas AMBER. Se minimiza la energía de la lipasa hasta que se alcance un valor de RMS (*root mean square*) 0.00001 Å mol<sup>-1</sup> o menores. Este parámetro da una idea de lo lejos que se está del mínimo de energía más próximo; por tanto, cuanto menor sea más cerca nos encontraremos del mínimo. Relajando de esta manera a la enzima se consigue una estructura en la cual todos los puentes de hidrógenos necesarios para la catálisis se encuentran presentes. A continuación, se introduce manualmente el intermedio tetraédrico, que presenta un grupo etoxilo actuando como nucleófilo. En este punto se protona el nitrógeno del anillo de imidazol de la histidina puesto que así se encuentra en la catálisis. Para realizar las minimizaciones sobre este intermedio se llevan a cabo las sucesivas iteraciones aumentando el número de átomos con los que se trabaja. En primer lugar, se mantienen todos los átomos de la enzima inmovilizados dejando libres los átomos del intermedio tetraédrico. A continuación se liberan, además del sustrato, los átomos de las cadenas laterales de los aminoácidos, fijando sólo aquellos que pertenecen a la cadena principal de la lipasa (*backbone*). Por último, se liberan todos los átomos de la enzima junto con el sustrato. En todos los casos las moléculas de agua que acompañan a la estructura de la proteína están libres.

Una vez minimizada la estructura con el etoxilo se construye la estructura del nucleósido añadiendo por etapas el anillo de 2'-desoxirribosa, la citosina y, posteriormente, el grupo protector benzoílo. Al construir por pasos el nucleósido se minimiza que las estructuras obtenidas no sean productivas debido al desajuste

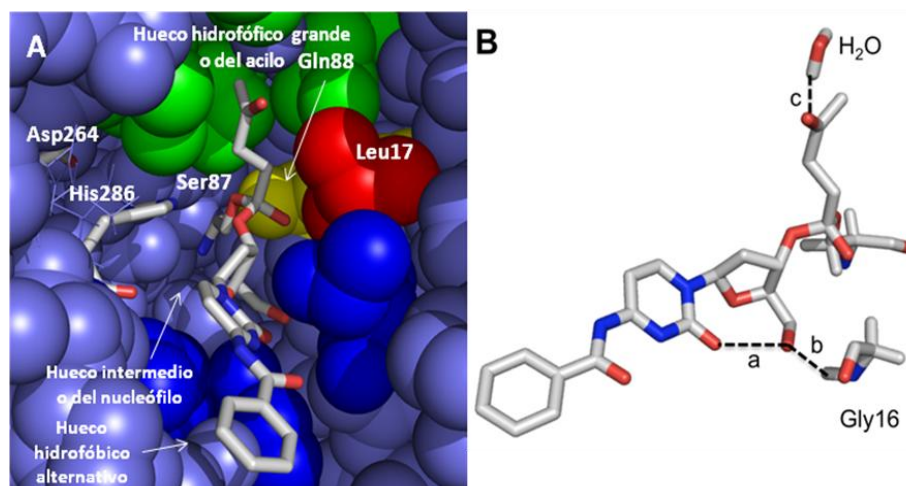
---

<sup>127</sup> Se considera que existe enlace de hidrógeno si la distancia entre el átomo donador y el átomo aceptor es menor de 3.30 Å y además que el ángulo átomo donador-hidrógeno-átomo aceptor esté comprendido entre 120-180°.



estructural que produciría la introducción de un grupo muy grande de una sola vez.

**a) Intermedio IT2 para la acilación en 3' de *N*-benzoil- $\beta$ -D-2'-desoxicitidina.** Cuando se llevó a cabo la optimización de la geometría correspondiente, se encontró que tanto la citosina como el grupo protector se sitúan en el hueco hidrofóbico alternativo, mientras que el anillo del azúcar lo hace en el hueco intermedio o del nucleófilo.

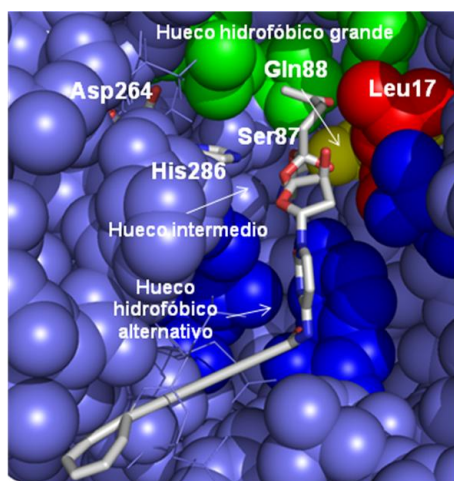


**Figura 35.** A) Conformación del intermedio IT2 para la levulinación de *N*-benzoil- $\beta$ -D-2'-desoxicitidina en 3'. B) Puentes de hidrógeno adicionales que estabilizan aún más la estructura propuesta.

De este modo se evitan impedimentos estéricos entre ambas partes de la molécula del nucleósido (Figura 35A). Además de los cinco enlaces de hidrógeno esenciales para la catálisis ( $d_1= 3.04$ ,  $d_2= 3.03$ ,  $d_3=2.84$ ,  $d_4= 3.17$ ,  $d_5= 3.23$  Å) se forman tres enlaces de hidrógeno adicionales: uno entre el grupo carbonilo de C2 de la citosina y el 5'-OH del azúcar (enlace a, 2.59 Å, 171°, Figura 35B), otro entre este 5'-OH y la Gly16 (enlace b, 2.84 Å, 146°) y el último, que se forma entre el oxígeno del carbonilo del levulinilo y una molécula de agua que se encuentra en el interior del hueco hidrofóbico grande (enlace c, 2.71 Å, 171°). Se propone que son estos enlaces de hidrógeno estabilizantes los que favorecen que la PSL acile el grupo hidroxilo en posición 3' en el enantiómero *N*-benzoil- $\beta$ -D-2'-desoxicitidina.

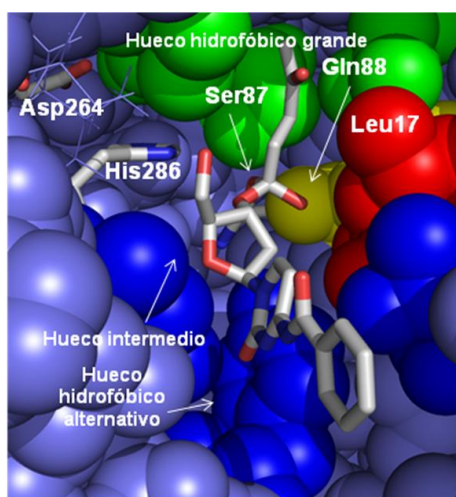
## Resultados y discusión

**b) Intermedio IT2 para la acilación en 5' de *N*-benzoil- $\beta$ -D-2'-desoxicitidina.** La minimización de este intermedio IT2 no da lugar a ninguna conformación productiva, ya que se pierden algunos de los enlaces de hidrógeno esenciales. En el mejor de los casos ( $d_1= 2.83$ ,  $d_2= 3.03$ ,  $d_3=2.71$ ,  $d_4= 3.62$ ,  $d_5= 3.84$  Å), la citosina se sitúa en el hueco hidrofóbico alternativo, sin embargo, el grupo protector benzoilo no encaja y sale fuera del centro activo de la PSL (Figura 36). Por tanto, la unión de la base nitrogenada y la posición del grupo protector obliga a fijar una conformación en la que desaparecen varios de los enlaces de hidrógeno esenciales y los tres adicionales respecto al intermedio IT2 que da lugar al producto acilado en posición 3', explicando la inusual regioselectividad de esta enzima.



**Figura 36.** Conformación del intermedio IT2 para la levulinación de *N*-benzoil- $\beta$ -D-2'-desoxicitidina en 5'.

**c) Intermedio IT2 para la acilación en 3' de *N*-benzoil- $\beta$ -L-2'-desoxicitidina.** Tras minimizar la energía del intermedio IT2 correspondiente se obtiene una disposición en la que el azúcar se sitúa en el hueco intermedio, mientras que la citosina y el grupo protector no pueden acomodarse y se orientan hacia el disolvente (Figura 37). Sólo se mantienen tres de los cinco enlaces de hidrógeno esenciales ( $d_1= 3.10$ ,  $d_2= 4.07$ ,  $d_3=3.15$ ,  $d_4= 3.57$ ,  $d_5= 3.10$  Å).

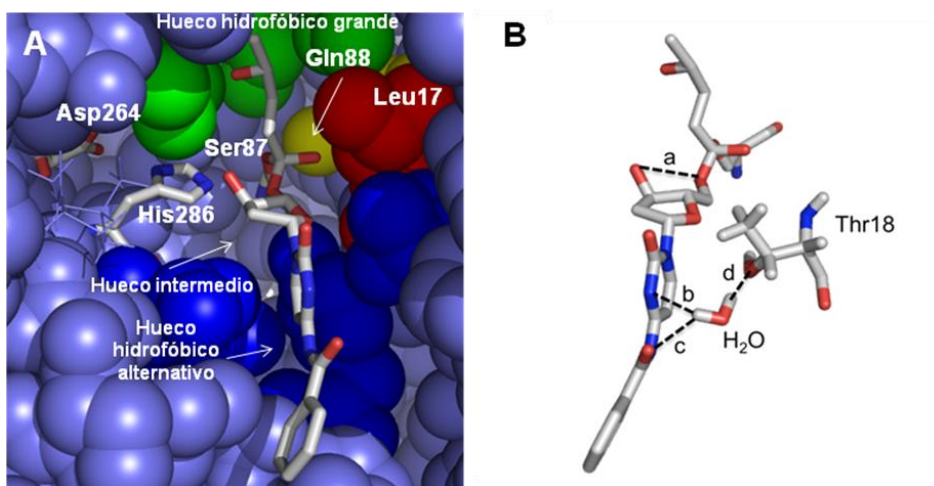


**Figura 37.** Conformación del intermedio IT2 para la levulinación de *N*-benzoil- $\beta$ -L-2'-desoxicitidina en 3'.

**d) Intermedio IT2 para la acilación en 5' de *N*-benzoil- $\beta$ -L-2'-desoxicitidina.** En la estructura óptima obtenida tras la minimización puede observarse el azúcar colocado en el hueco intermedio o del nucleófilo y la citosina –incluido el grupo benzoílico– se acomoda en el interior del hueco hidrofóbico alternativo (Figura 38A). Esta conformación permite que se formen los cinco enlaces de hidrógeno esenciales ( $d_1= 2.86$ ,  $d_2= 2.86$ ,  $d_3=2.82$ ,  $d_4= 3.30$ ,  $d_5= 3.15$  Å) junto con otros cuatro adicionales: el primero entre el grupo 3'-OH del azúcar y el 5'-O que está directamente unido al carbono cuaternario en el intermedio tetraédrico (enlace a,  $3.29$ Å,  $124^\circ$ , Figura 38B); otros dos se forman entre una molécula de agua del hueco hidrofóbico alternativo y los nitrógenos N-3 (enlace b,  $3.11$  Å,  $140^\circ$ ), y N-4 (enlace c,  $3.17$  Å,  $134^\circ$ ) de la citosina; y por último, el cuarto es un enlace de hidrógeno entre esta misma molécula de agua y el grupo hidroxilo de la Thr18 que forma parte del *backbone* de la lipasa. Estos enlaces de hidrógeno adicionales y la recuperación de dos de los enlaces de hidrógeno esenciales incrementa claramente la estabilidad de este intermedio respecto al IT2 para la acilación en la posición 3' (apartado c), y claramente justifica por qué se obtiene el derivado  $\beta$ -L-5'-O-levulinilo como único producto de acilación.

## Resultados y discusión

---



**Figura 38.** A) Conformación del intermedio IT2 para la levulinación de *N*-benzoil- $\beta$ -L-2'-desoxicitidina en 5'. B) Puentes de hidrógeno adicionales que estabilizan aún más la estructura propuesta.

### **3.4. CONCLUSIONES**

Se ha descrito una resolución cinética paralela de mezclas racémicas de  $\beta$ -D/L-nucleósidos. La selectividad opuesta exhibida por la lipasa de *Pseudomonas cepacia* en la acilación de  $\beta$ -D- y  $\beta$ -L-2'-desoxinucleósidos conduce a compuestos con valores de  $R_f$  diferentes que se aíslan tras una sencilla cromatografía de columna con excelentes rendimientos y de forma enantiopura. De este modo, se evita la utilización de un auxiliar quiral o el empleo de la cromatografía quiral, que es muy costosa.

Mediante el uso de las lipasas de *Pseudomonas cepacia* y *Candida antarctica* B se han sintetizado, en una sola etapa, los derivados 5'-O-levulinil- $\beta$ -D- y 5'-O-levulinil- $\beta$ -L-ribonucleósidos. Además, se ha desarrollado una doble resolución cinética paralela secuencial catalizada por las lipasas de *Pseudomonas cepacia* y *Candida antarctica* B para separar una mezcla racémica de  $\beta$ -D/L-uridina.

La metodología descrita ha demostrado ser muy útil para el aislamiento de  $\beta$ -L-nucleósidos, cada vez más utilizados como agentes terapéuticos antivirales y antitumorales, así como unidades estructurales de oligonucleótidos *antisense*.

Por último, se ha justificado mediante modelización molecular (ejemplificado para *N*-benzoil- $\beta$ -D/L-2'-desoxicitidina) la excelente estereo- y regioselectividad mostrada por la lipasa de *Pseudomonas cepacia*. Se ha encontrado que la disposición de la base nitrogenada y del grupo protector en el centro activo de la enzima es crucial, permitiendo (o impidiendo) la formación de los enlaces de hidrógeno que estabilizan el intermedio tetraédrico que lleva a la acilación en las posiciones 3' o 5' del nucleósido.



## **3.5. PARTE EXPERIMENTAL**

### **3.5.1. DISOLVENTES Y REACTIVOS GENERALES**

Los reactivos, métodos generales y técnicas de análisis han sido detallados en otros capítulos. Los  $\beta$ -D-nucleósidos utilizados han sido adquiridos a la empresa Isis Pharmaceuticals mientras que los  $\beta$ -L-nucleósidos se compraron a ChemGenes corporation.

### **3.5.2. TÉCNICAS DE ANÁLISIS**

Las técnicas de análisis han sido descritas en los capítulos anteriores con la excepción de los métodos cromatográficos particulares de este capítulo.

Para calcular el exceso enantiomérico en los derivados obtenidos en la resolución de *N*-benzoil- $\beta$ -D/L-2'-desoxicitidina (**21:22**) se utiliza el HPLC con una columna quiral Chiralcel OD (250 x 46 mm), con un flujo constante de 0.8 mL/min, una temperatura de 20 °C y una fase móvil hexano/isopropanol (50:50). Los tiempos de retención en estas condiciones son: **23**= 24.8, **24**= 13.6, **25**= 23.4 y **26**= 15.6 min.

## Parte experimental

---

En el análisis de la mezcla racémica *N*-benzoil- $\beta$ -D/L-2'-desoxiadenosina (**27:28**) se utiliza una columna Chiralcel OJ-H (250 x 46 mm), un flujo constante de 0.75 mL/min, una temperatura de 35 °C y como fase móvil hexano/isopropanol (65:35). Los tiempos de retención son: **29**=45.5, **30**= 36.0, **31**= 27.1 y **32**= 41.1 min.

En el caso de la 5'-*O*-levulinil- $\beta$ -D/L-uridina (**40a:42a**) se utiliza una columna Chiralcel OD (250 x 46 mm) con un flujo constante de 0.8 mL/min, una temperatura de 30 °C y hexano/isopropanol (45:55) como fase móvil. Los tiempos de retención en estas condiciones son: **40a**= 17.9 y **42a**= 12.3 min.

### 3.5.3. MODELIZACIÓN MOLECULAR

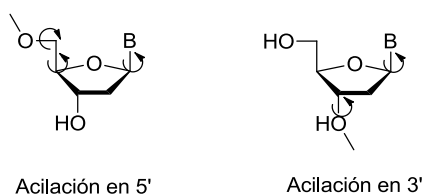
La modelización molecular se desarrolló en un iMac con el programa *Molecular Operating Environment* (MOE) 2009.10 (*Chemical computing Group, Inc*). Como campo de fuerzas se utilizó el AMBER99. Los estudios se realizaron considerando un entorno con una constante dieléctrica dependiente de la distancia con un valor de 2. La estructura cristalina de la PSL (3LIP) se obtuvo del *Protein Data Bank*.

Inicialmente, se permitió a la estructura relajarse para que alcanzase la conformación más estable en el entorno al que ha sido sometida. En este punto se protona la histidina, puesto que así se encuentra en el IT2. El resto de las cargas se ajustan de tal forma que mimeticen cómo se encontraría la proteína a un pH 7.

Se va construyendo poco a poco el sustrato, introduciendo primero el azúcar y luego la base. Cada minimización se realiza dejando libre el sustrato y fijando los átomos de la enzima; en un segundo paso se dejan libres también las cadenas laterales de los aminoácidos y por último, se dejan libres todos los átomos. En cada uno de estos casos se realizan primero iteraciones paso a paso y posteriormente conjugadas. Las moléculas de agua se dejan siempre libres.

Se buscan manualmente las conformaciones más favorables rotando los ángulos de torsión que se muestran en la Figura 39 según se esté modelizando el intermedio IT2 correspondiente a la acilación en posición 5' o 3'. Se realizan las iteraciones hasta alcanzar un valor de la desviación RMS de 0.00001 Å mol<sup>-1</sup>.





**Figura 39.** Ángulos de torsión.

### 3.5.4. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

#### Resolución de *N*-benzoil- $\beta$ -D/L-2'-desoxicitidina (**21/22**).

Una suspensión de una mezcla 1:1 de *N*-benzoil- $\beta$ -D/L-2'-desoxicitidina **21/22** (60 mg, 0.17 mmol), levulinato de acetoxima (89 mg, 0.52 mmol) y PSL-C (180 mg) en THF anhidro (1.7 mL) bajo atmósfera de nitrógeno se agita a 250 rpm y 30 °C durante 24 h. La reacción se monitorizó por CCF (10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Transcurrido este tiempo el enzima se filtra y se lava con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y MeOH. Posteriormente, se evaporan los disolventes a presión reducida y el crudo de reacción se somete a cromatografía de columna (gradiente de eluyentes 2-5% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) obteniéndose con un 93% de rendimiento el derivado *N*-benzoil-3'-*O*-levulinil- $\beta$ -D-2'-desoxicitidina (**23**) y con un 82% de rendimiento del compuesto *N*-benzoil-5'-*O*-levulinil- $\beta$ -L-2'-desoxicitidina (**24**).

#### Resolución de *N*-benzoil- $\beta$ -D/L-2'-desoxiadenosina (**27/28**).

En un procedimiento similar al descrito anteriormente, sobre una mezcla 1:1 de *N*-benzoil- $\beta$ -D/L-2'-desoxiadenosina **27/28** (60 mg, 0.16 mmol), levulinato de acetoxima (83mg, 0.48 mmol) y PSL-C (180 mg) se adiciona THF anhidro (3.2 mL). La reacción se agita a 250 rpm y 45 °C y se sigue por CCF (10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) hasta la desaparición total del producto de partida tras 20 h de reacción. Una vez filtrado el enzima y lavado con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y MeOH se evaporan los disolventes a presión reducida y el crudo de reacción se purifica por cromatografía de columna (gradiente de eluyentes 2.5-4.0% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) obteniéndose con rendimientos del 80% y 87% los derivados *N*-benzoil-3'-*O*-levulinil- $\beta$ -D-2'-desoxiadenosina (**29**) y *N*-benzoil-5'-*O*-levulinil- $\beta$ -L-2'-desoxiadenosina (**30**), respectivamente.

## Parte experimental

---

### Acilación enzimática de $\beta$ -D-ribonucleósidos (39a-c). Síntesis de los análogos 40a-c.

A un erlenmeyer que contiene el correspondiente nucleósido **39** (0.2 mmol), levulinato de acetoxima (0.6 mmol) y la lipasa se adiciona THF anhidro (2 mL) bajo atmósfera de nitrógeno. La relación de **39a-c**:enzima, tiempo de reacción y temperatura se recogen en la Tabla 11. Las reacciones se siguen por CCF (10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). La enzima se filtra, se lava con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y MeOH y se evaporan los disolventes a presión reducida. Los crudos resultantes se purifican por cromatografía de columna (gradiente de eluyentes 2-4% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) obteniéndose los correspondientes nucleósidos **40** con los rendimientos indicados en la Tabla 11.

### Acilación enzimática de $\beta$ -L-ribonucleósidos (41a-c). Síntesis de los derivados 42a-c.

Se sigue un procedimiento idéntico al descrito previamente para la síntesis de los análogos **40**. Los tiempos de reacción, relación **41**:enzima y temperatura se recogen en la Tabla 12, así como los rendimientos obtenidos.

### Resolución de $\beta$ -D/L-uridina (39a/41a).

Una suspensión de la mezcla racémica  $\beta$ -D/L-uridina **39a/41a**, (60 mg, 0.25 mmol), levulinato de acetoxima (131 mg, 0.76 mmol) y PSL-C (180 mg) en THF anhidro (2.5 mL), bajo atmósfera de nitrógeno se agita a 250 rpm durante 13 h. Transcurrido este tiempo se filtra la enzima, se lava con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y MeOH y se evaporan los disolventes a presión reducida. El crudo de reacción se somete a cromatografía de columna (gradiente de eluyentes 2-4% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) con la que se aísla una fracción que contiene 2'-, 3'- y 5'-O-Lev (mismo R<sub>f</sub>) que se separa del exceso de agente de acilación. Sobre esta mezcla, contenida en un Erlenmeyer, se adiciona levulinato de acetoxima (113 mg, 0.66 mmol), CAL-B (75 mg) y THF anhidro (2.2 mL). La reacción enzimática se agita a 250 rpm y 30 °C durante 17 h. Tras filtrar la enzima, lavarla y evaporar disolventes el crudo de reacción se somete a cromatografía de columna (gradiente de eluyente 2-4% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) en la que se separan dos fracciones; la primera de ellas contiene 2'-, 5'- y 3',5'-di-O-Lev-U, mientras que la segunda la constituye el derivado 5'-O-levulinil- $\beta$ -L-uridina (**42a**), que se obtiene con un rendimiento del 85% y un ee del 83%.

Los productos diacilados obtenidos en la primera fracción se hidrolizan en una mezcla de NH<sub>3</sub> acuoso (1.6 mL) y MeOH (1.6

mL). Tras 2 h de reacción, se evaporan los disolventes y el crudo se purifica por cromatografía de columna (eluyente 4% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) para dar lugar a la β-D-uridina (**39a**) con un 62% de rendimiento.

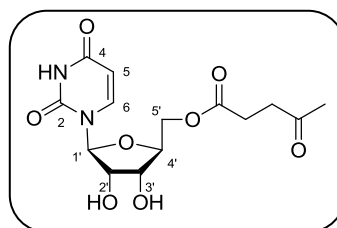
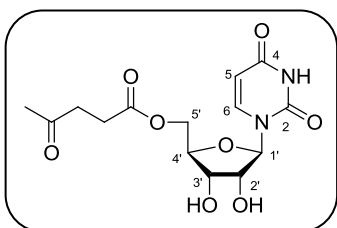
Con el objetivo de determinar el ee en **39a**, este compuesto es derivatizado al correspondiente compuesto 5'-O-acilado **40a**. Para ello, una mezcla del compuesto **39a** obtenido en la reacción enzimática (20 mg, 0.08 mmol), levulinato de acetoxima (44 mg, 0.25 mmol) y CAL-B (20 mg) en THF anhidro (0.8 ml) se agita a 250 rpm durante 10 h. Se filtra la enzima, se lava con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y MeOH y se evaporan los disolventes a presión reducida. El crudo se purifica por cromatografía de columna (gradiente de eluyentes 2-4% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) aislándose 5'-O-levulinil-β-D-uridina (**40a**) con un ee del 92%.

### **3.5.5. DATOS EXPERIMENTALES**

A continuación se describen los datos experimentales de los compuestos **40a-c** y los enantiómeros **42a-c** que no habían sido reportados hasta el momento. El resto de compuestos preparados en este capítulo (o sus respectivos enantiómeros) ya habían sido previamente descritos en nuestro grupo de investigación.<sup>69</sup>

**Parte experimental**

**5'-O-Levulinil- $\beta$ -D- o 5'-O-Levulinil- $\beta$ -L-uridina  
(40a ó 42a)**



**Fórmula molecular:** C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>

**R<sub>f</sub>** (10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.32

**Pf:** 60-62 °C (sólido blanco)

$[\alpha]_D^{20} = +14$  (c 1.0, MeOH) para **40a**,  $[\alpha]_D^{20} = -13$  (c 1.0, MeOH) para **42a**

**IR** (KBr):  $\nu$  3172, 2920, 2850, 1650, 1460 cm<sup>-1</sup>

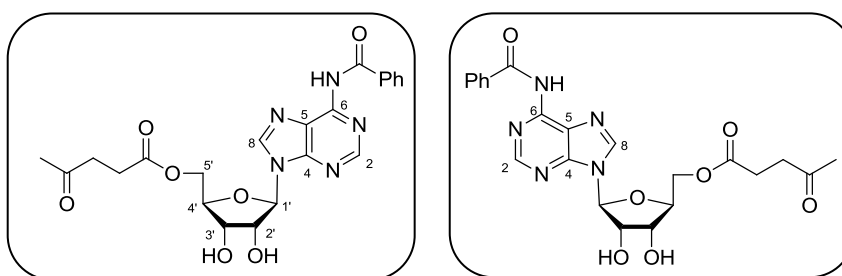
**<sup>1</sup>H RMN** (MeOH-*d*<sub>4</sub>, 300.13 MHz): 2.17 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Lev), 2.60 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-Lev, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.0 Hz), 2.83 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-Lev, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 5.9 Hz), 4.16 (m, 3H, H-2' + H-3' + H-4'), 4.29 (m, 2H, H-5'), 5.76 (d, 1H, H-5, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 8.1 Hz), 5.85 (d, 1H, H-1', <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 4.2 Hz), 7.75 (d, 1H, H-6, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 8.1 Hz)

**<sup>13</sup>C NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  27.5 (CH<sub>2</sub>-Lev), 29.5 (CH<sub>3</sub>-Lev), 37.4 (CH<sub>2</sub>-Lev), 63.7 (C-5'), 69.7, 72.8 (C-2' + C-3'), 81.2 (C-4'), 82.7 (C-1'), 102.0 (C-5), 140.7 (C-6), 150.6 (C-2), 162.9 (C-4), 172.2 (C=O), 206.9 (C=O)

**EM** (APCI<sup>+</sup>, *m/z*): 343 [(M+H)<sup>+</sup>, 90%], 366 [(M+Na)<sup>+</sup>, 35%]

**EMAR** (ESI): Calculada para C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 343.1141.  
Encontrada: 343.1139

***N*-benzoil-5'-*O*-Levulinil- $\beta$ -D- o *N*-benzoil-5'-*O*-levulinil- $\beta$ -L-adenosina (40b ó 42b)**



**Fórmula molecular:** C<sub>22</sub>H<sub>23</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>

**R<sub>f</sub>** (10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.38

**Pf:** 73-75 °C (sólido blanco)

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = - 15 (c 0.5, MeOH) para **40b**, [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +17 (c 0.5, MeOH) para **42b**

**IR** (KBr):  $\nu$  3335, 3060, 2930, 1737, 1711 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H RMN** (MeOH-*d*<sub>4</sub>, 400.13 MHz):  $\delta$  2.13 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Lev), 2.55 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-Lev, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.3 Hz), 2.78 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-Lev, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.4 Hz), 4.28 (c, 1H, H-4', <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 4.5 Hz), 4.41 (m, 3H, H-2' + H-5'), 4.84 (m, 1H, H-3'), 6.14 (d, 1H, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 4.3 Hz), 7.55 (t, 2H, H<sub>m</sub>, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.6 Hz), 7.64 (t, 1H, H<sub>p</sub>, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.4 Hz), 8.01 (d, 2H, H<sub>o</sub>, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.5 Hz), 8.57 (s, 1H, H-2 ó H-8), 8.71 (s, 1H, H-8 ó H-2)

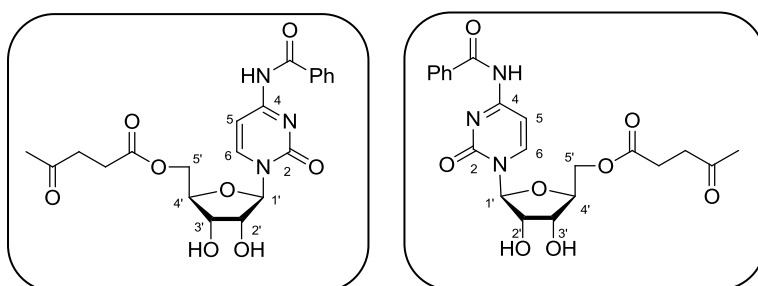
**<sup>13</sup>C NMR** (MeOH-*d*<sub>4</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  28.8 (CH<sub>2</sub>-Lev), 29.6 (CH<sub>3</sub>-Lev), 38.6 (CH<sub>2</sub>-Lev), 64.8 (C-5'), 72.8, 75.3 (C-2'+C-3'), 73.7 (C-4'), 90.6 (C-1'), 125.3 (C-5), 129.5, 129.8 (C<sub>o</sub> + C<sub>m</sub>), 133.9 (C<sub>p</sub>), 134.9 (C<sub>i</sub>), 144.5 (C-2 ó C-8), 151.1 (C-4), 153.3 (C-8 ó C-2 + C-6), 168.1 (Ph-C=O), 174.2 (C=O), 206.5 (C=O)

**EM** (APCI<sup>+</sup>, *m/z*): 470 [(M+H)<sup>+</sup>, 75%]

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): Calculada para C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 470.1670.  
Encontrada: 470.1677

**Parte experimental**

***N*-benzoil-5'-*O*-Levulinil- $\beta$ -D- o *N*-benzoil-5'-*O*-levulinil- $\beta$ -L-citosina (40c ó 42c)**



**Fórmula molecular:** C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>

**R<sub>f</sub>** (10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.47

**Pf:** 193-195 °C (sólido blanco)

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +35 (c 0.5, DMSO) para **40c**, [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -36 (c 0.5, DMSO) para **42c**

**IR** (KBr):  $\nu$  3493, 3323, 3162, 1728, 1703, 1651 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H RMN** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  2.12 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Lev), 2.54 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-Lev, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.3 Hz), 2.75 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-Lev, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.3 Hz), 3.97 (m, 1H, H-4'), 4.09 (m, 2H, H-2' + H-3'), 4.25 (dd, 1H, H-5', <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 5.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 12.2 Hz), 4.35 (dd, 1H, H-5', <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 2.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 12.1 Hz), 5.82 (d, 1H, H-5', <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 2.7 Hz), 7.38 (d, 1H, H-5, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.5 Hz), 7.51 (t, 2H, H<sub>m</sub>, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.5 Hz), 7.63 (t, 1H, H<sub>p</sub>, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.3 Hz), 8.01 (d, 2H, H<sub>o</sub>, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.4 Hz), 8.16 (d, 1H, H-6, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.5 Hz)

**<sup>13</sup>C NMR** <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 75.5 MHz): 28.0 (CH<sub>2</sub>-Lev), 30.0 (CH<sub>3</sub>-Lev), 37.9 (CH<sub>2</sub>-Lev), 63.9 (C-5'), 69.7 (C-4'), 74.3 (C-2'), 81.3 (C-3'), 91.4 (C-1'), 96.9 (C-5), 128.9 (C<sub>m</sub> + C<sub>o</sub>), 133.2, 133.6 (C<sub>p</sub> + C<sub>i</sub>), 145.5 (C-6), 154.9 (C-2), 163.5 (C-4), 168.0 (Ph-C=O), 172.7 (C=O), 207.4 (C=O)

**EM** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*): 446 [(M+H)<sup>+</sup>, 35%], 468 [(M+Na)<sup>+</sup>, 100%]

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): Calculada para C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 446.1563.  
Encontrada: 446.1564

## **CAPÍTULO 4**

### **INFLUENCIA DE LA CONFORMACIÓN DEL AZÚCAR EN LA ACILACIÓN DE NUCLEÓSIDOS CATALIZADA POR CAL-B**





## **4.1. ANTECEDENTES**

### **4.1.1. ANÁLISIS CONFORMACIONAL DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS**

Los ácidos nucleicos presentan flexibilidad conformacional. Ésta puede ser descrita atendiendo a los movimientos del anillo de ribosa y por la rotación respecto al enlace glicosídico, al enlace exocíclico C4'-C5' y los enlaces del grupo fosfato.

Nos centraremos en la flexibilidad debida a los anillos de furanósido, que adoptan conformaciones fuera del plano porque son más estables y favorables energéticamente que la conformación coplanar, al igual que ocurre con el anillo de ciclohexano. Se emplea la nomenclatura *endo* si el átomo que está fuera del plano se dispone del mismo lado de la posición C5' o *exo* si está en el lado contrario.<sup>128</sup>

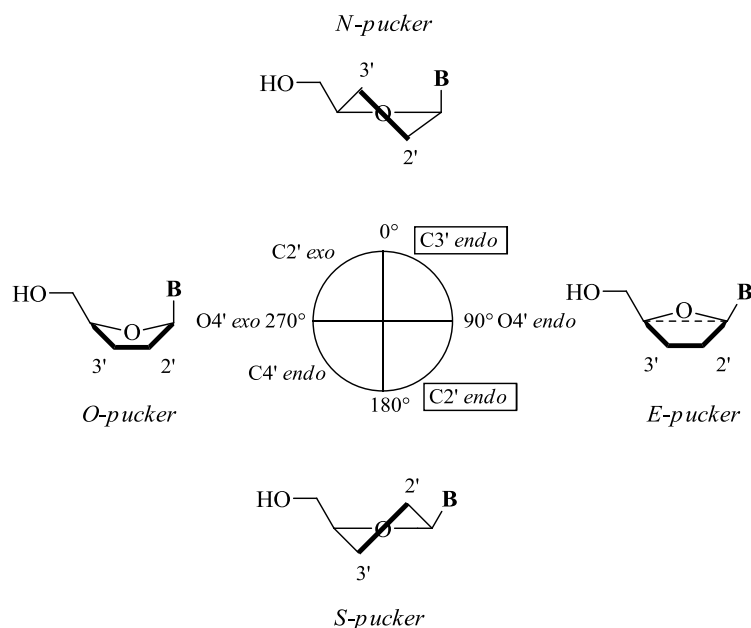
El ángulo de fase ( $P$ , *pucker*) da información sobre el átomo, o los átomos, que están fuera del plano formado por el resto. La conformación de la ribosa viene dada según su posición en el ciclo pseudorrotacional (Figura 40) en el que se pueden distinguir cuatro zonas: Norte ( $N$ ,  $P \approx 0^\circ$ ), Sur ( $S$ ,  $P \approx 180^\circ$ ), Este ( $E$ ,  $P \approx 90^\circ$ ) y Oeste ( $W$ ,  $P \approx 270^\circ$ ).<sup>129</sup>

---

<sup>128</sup> Jardetzsky, C. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 229-233.

<sup>129</sup> Altona, C.; Sunderalingam, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 8205-8212.

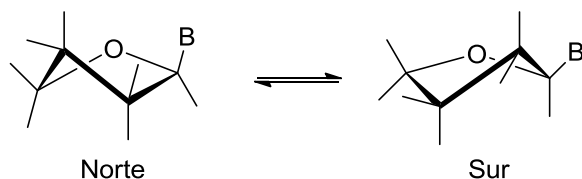
## Antecedentes



**Figura 40.** Ciclo pseudorotacional que muestra la relación entre el ángulo de pseudorotación ( $P$ ) y las diferentes conformaciones del anillo de furanosa.

Las conformaciones más favorecidas son la *N* y la *S*. La conformación en zona *N* suele ser *C-3'-endo* con un ángulo de fase en el rango  $15-20^\circ$ , y la conformación en zona *S* suele ser *C-2'-endo* con ángulo de fase de  $160-164^\circ$ .

En estado sólido los 2'-desoxinucleósidos tienen una conformación *S* fija, mientras que los ribonucleósidos se encuentran en conformación *N*. Sin embargo, en disolución ambos existen en un equilibrio dinámico entre las conformaciones *N* y *S*. Este equilibrio conformacional presenta una baja energía de activación (1-3 Kcal/mol), que es incluso menor que la barrera de activación existente para la conversión entre las sillas de ciclohexano (10.8 Kcal/mol), es decir, son más flexibles (Figura 41).



**Figura 41.** Equilibrio conformacional en nucleósidos.

Altona y col.<sup>130</sup> obtuvieron a través de una parametrización de las ecuaciones de Karplus, una serie de expresiones para calcular la proporción de los dos conformeros *N* y *S*. Para ello, utilizaron las constantes de acoplamiento entre los hidrógenos del azúcar, teniendo en cuenta que la suma de los valores de todas las constantes de acoplamiento en la ribosa debe ser constante e independiente de la conformación.

En el conformero *S* de los ribonucleósidos, los protones H1' y H2' se encuentran en una disposición *trans* diaxial. El valor habitual de la constante de acoplamiento entre dos protones ( $J_{1'2'}$ ) en esta disposición relativa es de aproximadamente 10 Hz. Sin embargo, en conformación *N* estos dos protones se encuentran en disposición ecuatorial-ecuatorial, por lo que  $J_{1'2'}$  es aproximadamente cero. Por tanto, una buena estimación para calcular la población de cada conformero en el equilibrio viene dada por la Ecuación 1. Realizando un razonamiento similar, el porcentaje conformacional para 2'-desoxinucleósidos viene dado por la ecuación 2.

Media ponderada de las constantes de acoplamiento:

$$J_{HH,obs} = X_N J_N + X_S J_S$$



Ribonucleósidos:

$$S(\%) = 10J_{1'2'}$$



2'-Desoxinucleósidos:

$$S(\%) = 100(J_{obs} - 7.1)/9;$$

$$J_{obs} = J_{1'2'}(cis) + J_{1'2'}(trans)$$

**Ecuación 1**

**Ecuación 2**

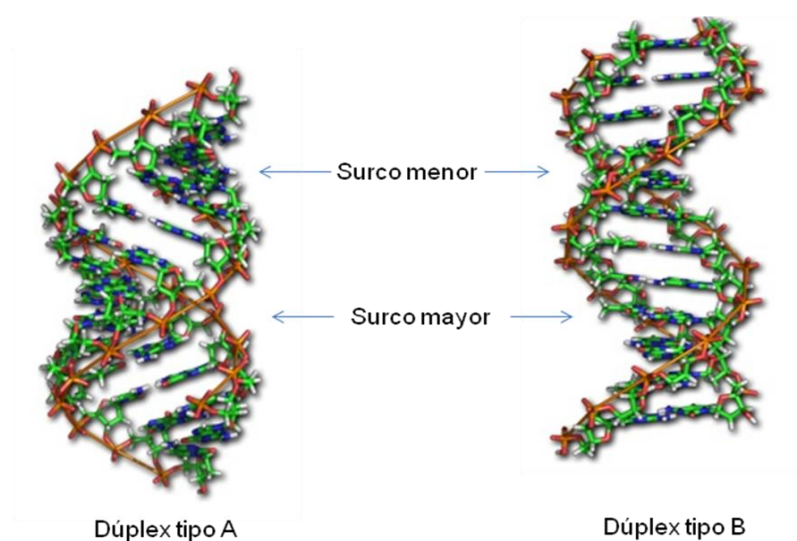
Las dos conformaciones dominantes en los anillos de furanosa para el ADN y ARN, hace que existan generalmente dos formas diferentes para la doble hélice. La hélice tipo B, que aparece para el ADN en disolución, tiene todos sus anillos en conformación sur (C2'-endo). Además, el ancho de la doble hélice tiene una longitud de 34 Å y la distancia entre dos pares de bases de nucleótidos sucesivos es de 3.4 Å, necesitándose 10 pares de bases por giro completo de hélice. Puede observarse también la presencia de un surco mayor y un surco menor, que se forman por los giros de la

<sup>130</sup> a) Altona, C; Sunderalingam, M. J. *Am. Chem. Soc.* **1973**, 94, 2333-2344. b) Leeuw, F. A.; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1982**, 375-384.

## Antecedentes

---

espiral y que para la hélice de tipo B presentan diferencias en su ancho (Figura 42).



**Figura 42**

Por su parte, la cadena de ARN adopta una hélice de tipo A en la que todas las furanosas se encuentran en conformación norte (C3'-endo), con 11 pares de base por giro de hélice. En ella los surcos mayor y menor tienen aproximadamente el mismo ancho (Figura 42).<sup>131</sup>

### 4.1.2. FACTORES QUE DETERMINAN LA CONFORMACIÓN DE LOS NUCLEÓSIDOS

La preferencia conformacional de los nucleósidos está determinada por factores estereoelectrónicos. Nos centraremos en el factor más importante, el efecto *gauche*. Este efecto designa la tendencia de fragmentos X-C-C-Y (X, Y son grupos o átomos electronegativos) de adoptar preferentemente una orientación *gauche* frente a una antiperiplanar a pesar de la existencia de repulsiones estéricas y electrostáticas. Esto puede justificarse atendiendo al mejor solapamiento existente entre el orbital  $\sigma$  del

---

<sup>131</sup> *Principles of Nucleic Acid Structure*; Saenger, W., Ed.; Springer-Verlag: New York, 1984.

átomo donador y  $\sigma^*$  del átomo aceptor, en una disposición *gauche* con respecto a la antiperiplanar.<sup>88b,132</sup>

En el caso de los nucleósidos, un sustituyente electronegativo en posición 2' desplaza el equilibrio conformacional hacia la conformación *N*, en la que el átomo electronegativo donador (O4') y el átomo electronegativo aceptor (X2') se encuentran en disposición relativa *gauche*. Esta es la principal razón por la que los 2'-desoxinucleósidos se encuentran mayoritariamente en conformación *S*, mientras que los ribonucleósidos prefieren la conformación *N*. Se observa distinta preferencia cuando el átomo electronegativo se encuentra en disposición 2'-ara (sustituyente en posición 2' $\beta$ ); en este caso, la conformación mayoritaria es la *S*. El efecto *gauche* también explica que sustituyentes electronegativos en posición 3' favorezcan la conformación *S* respecto a la *N* (Figura 43).

Por tanto, podría decirse que es posible modular la preferencia conformacional de un nucleósido variando la orientación y la electronegatividad de los sustituyentes de las posiciones 2' y 3'.

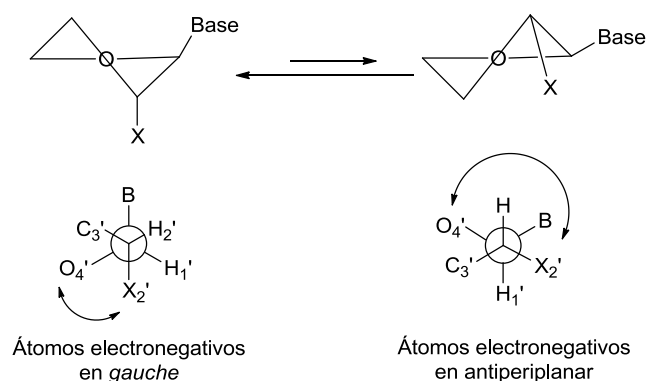


Figura 43. Efecto *gauche* en nucleósidos.

<sup>132</sup> a) Thibaudeau, C.; Acharya, P.; Chattopadhyaya, J. *Stereoelectronic Effects in Nucleosides and Nucleotides and their Structural Implications*, 2<sup>nd</sup> ed.; Uppsala University Press: Uppsala (Sweden), 2005.

## Antecedentes

---

### 4.1.3. INFLUENCIA DE LA CONFORMACIÓN EN LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE NUCLEÓSIDOS Y OLIGONUCLEÓTIDOS

Como se ha comentado en la Introducción de esta Memoria, la inserción de monómeros conformacionalmente restringidos ( $\beta$ -D-LNA) en una cadena de oligonucleótido, estabiliza termodinámicamente el dúplex que forma con otra cadena de ADN o ARN complementaria ( $\Delta T_m = 1-10$  °C). En la actualidad, algunos de los oligonucleótidos *antisense* y siRNA que se encuentran en ensayos clínicos contienen monómeros de LNA en su estructura.

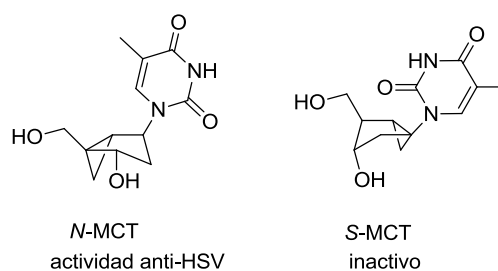
Además, Marquez et al<sup>133</sup> han demostrado que la conformación de los análogos de nucleósidos juega un papel fundamental en el reconocimiento de los mismos por parte de las quinasas y polimerasas celulares. Por ejemplo, los dos isómeros de metanocarbatimidina (MCT), uno restringido en conformación *N* y el otro en conformación *S*, tienen afinidades opuestas por las quinasas y polimerasas. A pesar de que el derivado *S*-MCT experimenta fosforilación por parte de las quinasas mucho más rápidamente que el nucleósido *N*-MCT, sólo éste último es incorporado a la cadena de ADN por las polimerasas, por lo que muestra una excelente actividad anti HSV. Por el contrario, el derivado *S*-MCT es totalmente inactivo (Figura 44).

A partir de estos resultados podría deducirse que cuando un nucleósido o nucleótido es activado por una determinada enzima – como las quinasas- o se une a la enzima que se pretende inhibir, sólo uno de los conformeros *N* o *S* está presente en el centro activo de la enzima. Las aplicaciones biológicas de los nucleósidos bloqueados en una conformación *N* o *S* fija hace que la síntesis de nuevos análogos sea un área tremendamente activa.<sup>36,134</sup>

---

<sup>133</sup> a) Marquez, V. E.; Siddiqui, M. A.; Ezzitouni, A.; Russ, P.; Wang, J.; Wagner, R. W.; Matteucci, M. D. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 3739-3747. b) Marquez, V. E.; Choi, Y.; Comin, M. J.; Russ, P.; George, C.; Huleihel, M.; Ben-Kasus, T.; Agbaria, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15145-15150. c) Marquez, V. E.; Ben-Kasus, T.; Barchi, J. J., Jr.; Green, K. M.; Nicklaus, M. C.; Agbaria, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 543-549.

<sup>134</sup> a) Mathé, C.; Périgaud, C. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 1489-1505. b) Zhou, C.; Chattopadhyaya, J. *Chem. Rev.* **2012**, DOI: 10.1021/cr100306q.



**Figura 44.** Derivados conformacionalmente restringidos de MCT.

Por otro lado, en trabajos previos en nuestro grupo de investigación,<sup>69a</sup> en los que se describe la acilación selectiva de nucleósidos en posición 5' catalizada por CAL-B, se observa que para ribonucleósidos 2'-O-Me y 2'-O-MOE sustituidos la reacción es completamente regioselectiva; sin embargo, cuando los sustratos son 2'-desoxinucleósidos, además del producto acilado en la posición 5', se obtienen los correspondientes nucleósidos 3'-O-levulinilo y 3',5'-di-O-levulinilo como productos minoritarios. Puesto que los 2'-desoxinucleósidos se encuentran preferentemente en conformación *S* y los ribonucleósidos en conformación *N*, parece que la conformación del anillo del azúcar juega un papel importante en la catálisis enzimática. Sin embargo, es necesario un estudio más profundo para confirmar estos resultados preliminares.





## **4.2. OBJETIVOS**

Como continuación al trabajo que se viene llevando a cabo en el grupo de investigación para realizar la acilación enzimática regioselectiva de nucleósidos, nos planteamos explorar la influencia de la conformación del azúcar en la acilación catalizada por la lipasa CAL-B de varios derivados de nucleósidos con diferentes sustituyentes en la posición 2' (H, OH, OMe, F) y que, por tanto, presentan diferentes preferencias conformacionales. De este modo, los objetivos concretos que nos planteamos en este Capítulo son:

- Debido a que la modificación en la posición 2' de los nucleósidos es ampliamente utilizada en el diseño de oligonucleótidos con finalidad terapéutica, estamos interesados en proteger selectivamente el grupo hidroxilo en posición 5' de los mismos. Los correspondientes derivados 5'-O-levulinilo son importantes precursores para la preparación de oligonucleótidos y la síntesis química convencional conlleva un protocolo con múltiples etapas.
- Estudiar por RMN la conformación en disolución de estos nucleósidos y correlacionarla con los resultados obtenidos en la acilación de nucleósidos catalizada por CAL-B.
- Justificar mediante modelización molecular los resultados obtenidos experimentalmente. La conjunción de los resultados teóricos y experimentales nos permitirá obtener una mejor comprensión de la interacción enzima-sustrato.



### **4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

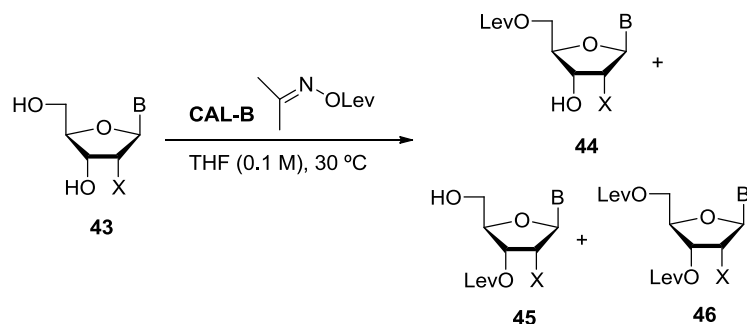
#### **4.3.1. ACILACIÓN CATALIZADA POR CAL-B DE NUCLEÓSIDOS 2'-SUSTITUIDOS**

El disolvente más habitualmente empleado en la acilación enzimática de nucleósidos es THF, al presentar una polaridad intermedia que permite la solubilidad parcial de los nucleósidos sin inhibir la actividad enzimática. Sin embargo, la mayor parte de los porcentajes conformacionales en nucleósidos se encuentran recogidos en D<sub>2</sub>O o DMSO. Por tanto, para llevar a cabo el estudio de la influencia de la conformación de los nucleósidos en la acilación enzimática catalizada por CAL-B necesitamos conocer la relación de conformeros *N/S* en el disolvente de la reacción, es decir, THF, permitiéndonos además compararlos con los obtenidos en DMSO.

El porcentaje conformacional de los nucleósidos que se emplearán como sustratos en el estudio se calculó aplicando las ecuaciones descritas por Altona et al.<sup>130</sup> Para ello, debe conocerse la constante de acoplamiento  $J_{1,2'}$ , que se obtiene directamente del espectro de <sup>1</sup>H-RMN previa identificación de los protones H1' y H2' para lo que se realizaron, en algunos casos, irradiaciones selectivas. La Tabla 13 recoge los resultados obtenidos. Para la mayoría de los sustratos, las poblaciones *N/S* en THF y DMSO son muy similares. Como era de esperar, el porcentaje de conformación *N* aumenta a medida que el sustituyente de la posición 2' se hace más electronegativo (H < O < F).

## Resultados y discusión

Una vez se conocen las preferencias conformacionales de los nucleósidos **43**, se lleva a cabo la acilación enzimática catalizada por CAL-B para cada uno de ellos. Como agente de acilación se utiliza el levulinato de acetoxima debido a su utilidad en la síntesis de oligonucleótidos en disolución y nuestra experiencia en la levulinación de nucleósidos catalizada por lipasas. Las reacciones se llevan a cabo con 3 equivalentes del donador de acilo, se agitan a 250 rpm y a 30 °C en THF (0.1M). Tanto la conversión como la relación de productos se determinan por HPLC. (Esquema 42).



Base	Sustituyente en 2' (X)			
	H	OH	OMe	F
U ( <b>a</b> )	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>c</b>	<b>d</b>
T ( <b>b</b> )	<b>a</b>	-	<b>c</b>	-
C ( <b>c</b> )	<b>a</b>	-	<b>c</b>	<b>d</b>
A ( <b>d</b> )	<b>a</b>	-	<b>c</b>	<b>d</b>
G ( <b>e</b> )	<b>a</b>	-	<b>c</b>	-

**Esquema 42.** Acilación con levulinato acetoxima de diversos nucleósidos **43** catalizada por CAL-B.

Los nucleósidos se designarán con el correspondiente descriptor (**43** para los sustratos y **44-46** para los posibles productos) y dos letras. La primera hace referencia a la base (**a**, U; **b**, T; **c**, C<sup>Bz</sup>; **d**, A<sup>Bz</sup>; **e**, G<sup>Ibu</sup>) y la segunda al sustituyente de la posición 2' (**a**, H; **b**, OH; **c**, OMe; **d**, F).

**Tabla 13.** Relación entre la conformación *N/S* y la acilación enzimática de varios nucleósidos.

Entrada	Nucleósido <b>43</b> <sup>c</sup>	Solubilidad <sup>d</sup>	<i>J</i> <sub>1'2'</sub> cis/trans (Hz)		<i>N</i> (%) <sup>a</sup>		t (h)	Conv. (%) <sup>b</sup>	Productos (%) <sup>b,c</sup>		
			THF	DMSO	THF	DMSO			<b>44</b>	<b>45</b>	<b>46</b>
1	dU ( <b>43aa</b> )	5.3	6.8 t	6.8 t	28	28	2	99	92	4	4
2	U ( <b>43ab</b> )	3.0	3.9	5.4	61	46	4	>99	97		3
3	2'-OMe-U ( <b>43ac</b> )	16.0	3.0	5.2	70	48	1	>99	>99		
4	2'-F-U ( <b>40ad</b> )	13.3	2.0	2.0	80	80	0.5	>99	>99		
5	T ( <b>43ba</b> )	4.4	6.6 t	6.8 t	32	28	2.5	99	89	6	5
6	2'-OMe-T ( <b>43bc</b> )	10	3.2	5.4	68	46	1.5	99	>99		
7	LNA-T ( <b>47</b> )	16	0	0	100	100	1.5	>99	>99		
8	dC <sup>Bz</sup> ( <b>43ca</b> )	2.1	6.2 t	6.2 t	41	41	19	99	79	16	5
9	2'-OMe-C <sup>Bz</sup> ( <b>43cc</b> )	N. A.	0	2.4	100	76	3	99	>99		
10	2'-F-C <sup>Bz</sup> ( <b>43cd</b> )	15	0	0	100	100	2	99	>99		
11	dA <sup>Bz</sup> ( <b>43da</b> )	5.4	7.4/6.2	6.8 t	28	28	2	>99	95	4	1
12	2'-OMe-A <sup>Bz</sup> ( <b>43dc</b> )	15	5.4	5.4	46	46	2	60	97	3	
13	2'-F-A <sup>Bz</sup> ( <b>43dd</b> )	4.6	3.8	2.4	62	76	2.5	97	98	2	
14	dG <sup>Ibu</sup> ( <b>43ea</b> )	0.4	6.8 t	7.6/6.4	28	23	24	97	99		1
15	2'-OMe-G <sup>Ibu</sup> ( <b>43ec</b> )	0.6	5.6	6.0	44	40	7.5	99	>99		

<sup>a</sup>*N*(%)= 100-*S*(%). Ribonucleósidos: *S*(%)=  $10J_{1'2'}$ ; 2'-Desoxinucleósidos: *S*(%)=  $100[J_{1'2'}(\text{cis})+J_{1'2'}(\text{trans})-7.1]/9$ ; <sup>b</sup>Reacciones monitorizadas por HPLC. <sup>c</sup>Ver Esquema 42. <sup>d</sup>En mg/L, en THF.

## Resultados y discusión

---

La levulinación enzimática de 2'-desoxiruridina (**43aa**), que presenta un 28% de conformación *N* en THF, da lugar a la formación de un 92% del derivado 5'-*O*-levulinil **44aa**, 4% del derivado 3' acilado **45aa** y también un 4% de 3',5'-di-*O*-levulinil-2'-desoxiuridina (**46aa**) (entrada 1, Tabla 13). Estos datos están de acuerdo con los resultados preliminares obtenidos en nuestro grupo de investigación, donde se describe que la acilación de 2'-desoxinucleósidos con CAL-B transcurre con alta selectividad hacia la posición 5', si bien el resto de posibles derivados acilados se obtienen como productos minoritarios. El análisis conformacional de los derivados 2'-sustituidos de uridina revela un incremento de la conformación *N* a medida que aumenta la electronegatividad del sustituyente. Cuando los derivados 2'-hidroxi, 2'-*O*-metil y 2'-desoxi-2'-fluorouridina (**43ab**, **43ac** y **43ad**, respectivamente) se someten a acilación enzimática se observa que la regioselectividad de la reacción es altamente dependiente del porcentaje de conformación *N* existente en disolución (entradas 2-4, Tabla 13). La acilación del fluoroderivado **43ad**, con un equilibrio fuertemente desplazado hacia la conformación *N*, se completa en sólo 30 min de reacción con una selectividad total hacia la posición 5' (entrada 4, Tabla 13). El mayor tiempo de reacción necesario para la acilación de la uridina (**43ab**) puede justificarse atendiendo a la menor solubilidad de este nucleósido en THF.

Con el objetivo de estudiar la influencia no sólo de la conformación del azúcar sino también de la base nitrogenada en los procesos de acilación enzimática con CAL-B, se llevó a cabo la acilación de timidina (**43ba**) y 2'-*O*-metil-5-metiluridina (**43bc**). Los resultados recogidos en las entradas 5 y 6 de la Tabla 13 muestran que la CAL-B acila con mejor selectividad el nucleósido con mayor porcentaje de conformación *N* en disolución de THF. La selectividad hacia la posición 5' de la timidina (32% de conformación *N*) es del 89% mientras que la CAL-B cataliza con total selectividad la acilación del derivado 2'-*O*-metil (68% de conformación *N* en THF). El tiempo necesario para alcanzar la conversión completa en los derivados de timidina es ligeramente mayor que en los análogos de uridina probablemente debido a la más alta solubilidad de estos últimos en THF (entrada 1 vs 5 y 3 vs 6, Tabla 13).

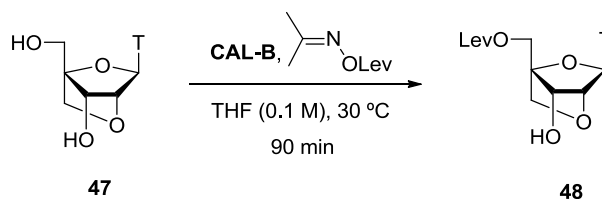
La acilación de los análogos de citidina en los que la base se encuentra protegida con el grupo benzoílo aporta los resultados esperados. Se observa total regioselectividad hacia la posición 5' para los derivados 2'-*O*-metil **43cc** y 2'-F **43cd**, que se encuentran en una conformación exclusivamente *N* en THF (entradas 9 y 10, Tabla 13). Por el contrario, en la acilación del nucleósido *N*-benzoil-2'-desoxicitidina (**43ca**), en el que la conformación *S* está

más favorecida, la selectividad es mucho menor (79%), formándose también el producto de acilación en la posición 3' **45ca** y el derivado diacilado **46ca** (entrada 8, Tabla 13).

También hemos evaluado la correlación existente entre la conformación y la regioselectividad en derivados de purina convenientemente protegidos. La acilación enzimática de *N*-benzoil-2'-desoxiadenosina (**43da**), *N*-benzoil-2'-*O*-Me-adenosina (**43dc**) y *N*-benzoil-2'-desoxi-2'-fluoroadenosina (**43dd**) transcurre con alta selectividad, observándose una mayor preferencia de la CAL-B por la acilación de la posición 5' a medida que aumenta el porcentaje de conformación *N* en disolución (entradas 11-13, Tabla 13). En el caso del nucleósido 2'-OMe-A<sup>Bz</sup> (**43dc**) la reacción se estanca en torno al 60% de conversión y no evoluciona incluso a tiempos largos de reacción.

Un comportamiento diferente se observa en la acilación del nucleósido *N*-isobutilil-2'-desoxiguanosina (**43ea**) (28% de conformación *N* en THF). En este caso, se forma el producto de acilación en posición 5' con un 99% de regioselectividad, siendo el único 2'-desoxinucleósido en el que la reacción es casi completamente regioselectiva (entrada 14, Tabla 13). Como era de esperar, en la acilación de *N*-isobutilil-2'-*O*-metilguanosina (**43ec**), con un mayor porcentaje de conformación *N* que el nucleósido **43ea**, la regioselectividad es total hacia la formación del derivado 5'-*O*-levulinilo **44ec** (entrada 15, Tabla 13). En ambos casos las reacciones son muy lentas debido a la extremadamente baja solubilidad de estos sustratos en THF.

Con el objetivo de encontrar más evidencias que demuestren la preferencia conformacional de la CAL-B en la acilación de nucleósidos, decidimos estudiar el proceso de acilación enzimática con un análogo de nucleósido conformacionalmente restringido en conformación *N*. Así, el análogo sintético de timidina LNA-T (**47**) con una conformación bloqueada *N* es ideal para esta finalidad (Esquema 43).



**Esquema 43.** Acilación de LNA-T (**47**) con levulinato de acetoxima catalizada por CAL-B.

## Resultados y discusión

---

La CAL-B cataliza la acilación de este nucleósido con completa selectividad y alta velocidad, lo que demuestra que esta lipasa es capaz de acomodar una estructura restringida en su centro activo, manifestando su preferencia por la conformación *N*. El nucleósido protegido **48** es un precursor muy importante que es utilizado para la inserción del monómero LNA-T en oligonucleótidos con finalidades terapéuticas, ya que proporciona estabilidad a la doble hélice y resistencia a la degradación por las nucleasas.<sup>36</sup>

De entre todos los datos anteriores es especialmente destacable el caso de los derivados de citidina **43ca** y **43cd** (entradas 8 y 10, Tabla 13). La sustitución de un átomo de hidrógeno por un átomo de flúor revierte el porcentaje conformacional (41 vs 100% de conformación *N*) y también la regioselectividad de la reacción de acilación catalizada por CAL-B (79% vs >99%). Éste, junto con el resto de datos recogidos en la Tabla 13, apoyan nuestra hipótesis de que la conformación del azúcar juega un papel importante en la forma en que los nucleósidos son reconocidos y se sitúan en el centro activo de la enzima. A tenor de estos resultados nos planteamos realizar un estudio de modelización molecular de la catálisis enzimática con el fin de justificar la influencia del sustituyente de la posición 2' y de la conformación del nucleósido en estas reacciones.

### 4.3.2. MODELIZACIÓN MOLECULAR PARA LA ACILACIÓN DE NUCLEÓSIDOS 2'-SUSTITUIDOS CATALIZADA POR CAL-B. INFLUENCIA DE LA CONFORMACIÓN

La CAL-B es una de las lipasas más utilizadas en síntesis orgánica debido a la alta enantioselectividad que es capaz de exhibir, su gran estabilidad térmica y óptima actividad en disolventes orgánicos. Al contrario que la mayoría de las lipasas la CAL-B no tiene una tapa cubriendo la entrada al centro activo y no muestra activación interfacial. Está formada por 317 aminoácidos y su peso molecular es de 33.5 KDa.

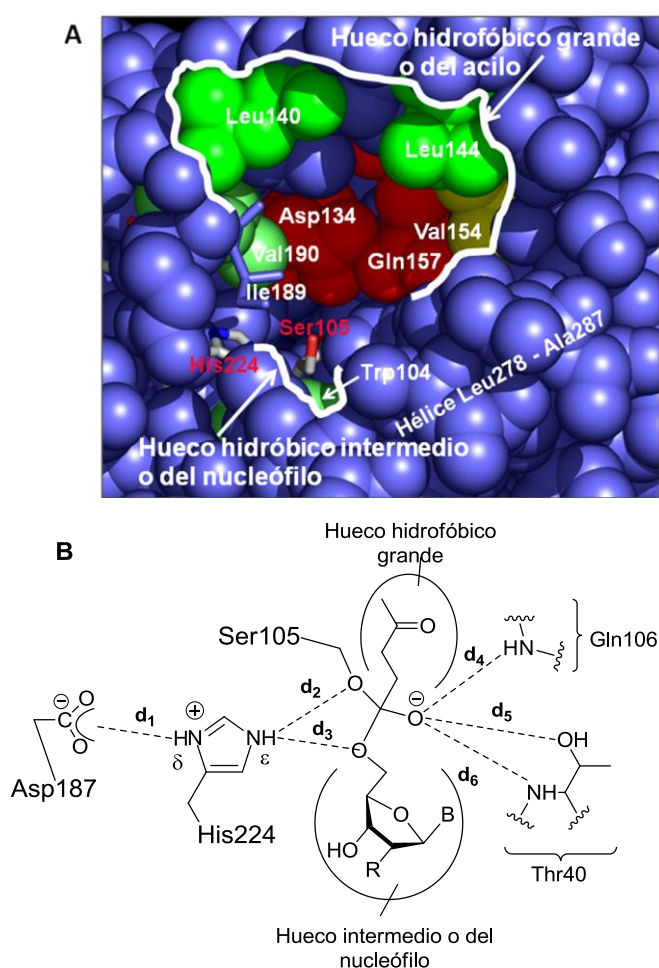
Su estructura de rayos X ha sido profundamente estudiada. Puede obtenerse de la base de datos de proteínas, *Protein Data Bank*,<sup>121</sup> donde se encuentran varias estructuras de esta lipasa con diferentes inhibidores. Decidimos utilizar la estructura 1LBS, puesto que tiene una resolución apropiada para nuestros propósitos.<sup>135</sup> Como la mayoría de las lipasas, la CAL-B posee en

---

<sup>135</sup> Uppenberg, J.; Öhrner, N.; Norin, M.; Hult, K.; Kleywegt, G. J.; Patkar, S.; Waagen, V.; Anthosen, T.; Jones, T. A. *Biochemistry* **1995**, *34*, 16838-16851.



su centro activo dos huecos bien diferenciados en cuanto al tamaño de los mismos. Así, por encima de la triada catalítica, compuesta por los aminoácidos Asp187, His224 y Ser105 se encuentra el hueco hidrofóbico grande o del acilo, flanqueado a la izquierda por los aminoácidos Ile189 y Val190, a la derecha por la Val154 y por arriba por la Leu140 y la Leu144. En el fondo del hueco se encuentran a la derecha el Asp134 y en la izquierda la Gln157. Por debajo de la triada catalítica se encuentra el hueco hidrofóbico medio o del nucleófilo, mucho más pequeño que el anterior, que está flanqueado por abajo por el Trp104 y la derecha por la hélice Leu278-Ala287. El oxianión formado en los intermedios de reacción se encuentra acomodado en una pequeña cavidad estabilizado por los puentes de hidrógeno que forma con la Gln106 y la Thr40 (Figura 45A).



**Figura 45.** A) Centro activo de la CAL-B. B) Estructura del IT2 para la levulinación en 5' de nucleósidos catalizada por CAL-B.

## Resultados y discusión

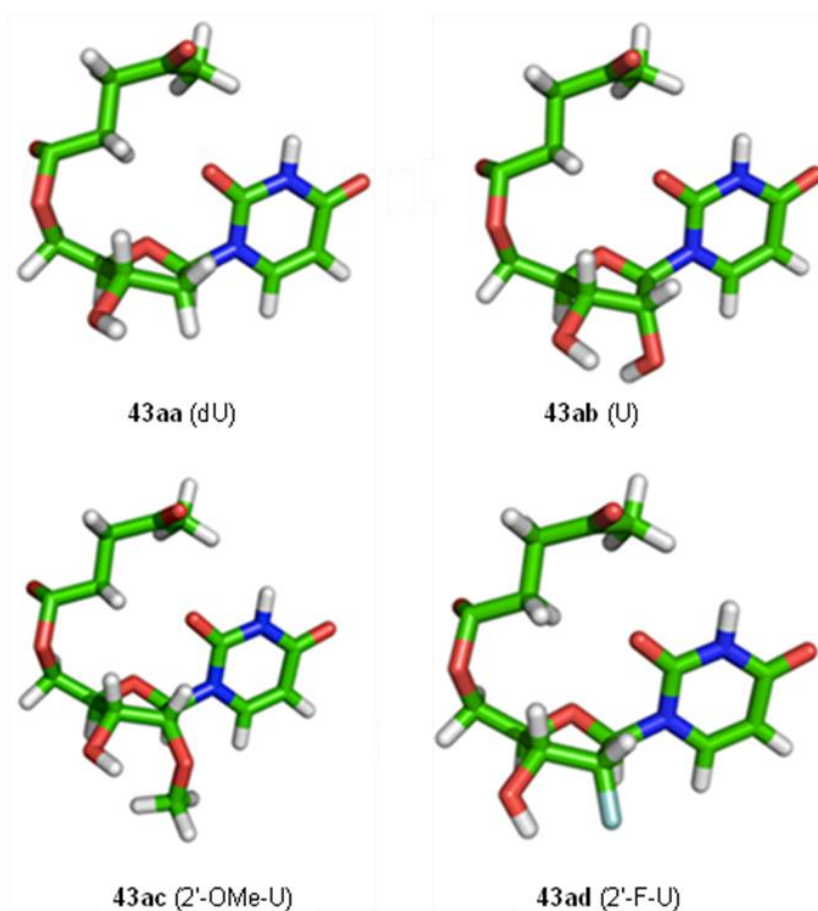
---

Los pasos seguidos para llevar a cabo las minimizaciones son similares a los descritos en el Capítulo 3 para el modelado molecular de la acilación catalizada por la lipasa PSL. El punto de partida del estudio es el intermedio tetraédrico 2 (IT2), que conduce a la levulinación en la posición 5' de nucleosidos catalizada por CAL-B. En primer lugar, se introduce el oxoanión y tras la minimización correspondiente se construye la estructura del nucleósido secuencialmente; primero se incorpora el azúcar y posteriormente la base nitrogenada, hasta que se obtiene la estructura mostrada en la Figura 45B.

Como puede observarse, la His224 forma un enlace de hidrógeno con el grupo carboxilato del Asp187 ( $d_1$ ), mientras que el protón enlazado al otro nitrógeno del imidazol forma dos enlaces de hidrógeno, uno con el oxígeno de la Ser105 ( $d_2$ ) y otro con el oxígeno de la posición 5' del nucleósido que realizó el ataque al intermedio acil-enzima ( $d_3$ ). Además, el oxígeno del levulinilo que constituía el carbonilo del éster forma tres puentes de hidrógeno: uno con la Gln106 ( $d_4$ ) y otros dos con la Thr40 ( $d_5$  y  $d_6$ ). Estos seis puentes de hidrógeno son esenciales para que ocurra la catálisis enzimática. Posteriormente, se optimiza esta geometría buscando mínimos de energía que contengan los seis puentes de hidrógeno, evitando además congestiones estéricas en el propio IT2 y entre el IT2 y la lipasa (Figura 45B).

Para explicar cualitativamente el comportamiento que exhibe la CAL-B en la acilación de nucleósidos nos centramos en los derivados de uracilo 2'-desoxi ó 2'-sustituídos **43aa-43ad** como ejemplos representativos (Figura 46). De este modo, modelizamos el intermedio IT2 que lleva a la levulinación en la posición 5' de la 2'-desoxiuridina (**43aa**) debido a que es éste el regioisómero mayoritario. Tras proceder a la optimización de la geometría, tanto el uracilo como el anillo de 2'-desoxirribosa se sitúan dentro del centro activo. Como se observa en la Figura 46, la conformación del azúcar en el centro activo es *N*, diferente de la conformación preferida en disolución, que es mayoritariamente *S*.

Se obtienen resultados similares cuando se procede a la minimización del intermedio IT2 para la levulinización de la uridina (**43ab**), 2'-*O*-metiluridina (**43ac**) y 2'-fluorouridina (**43ad**). Una vez minimizadas las estructuras, se obtienen conformaciones productivas en las que la conformación del azúcar también es *N*, coincidiendo en este caso con la conformación más estable en disolución de THF (Figura 46).

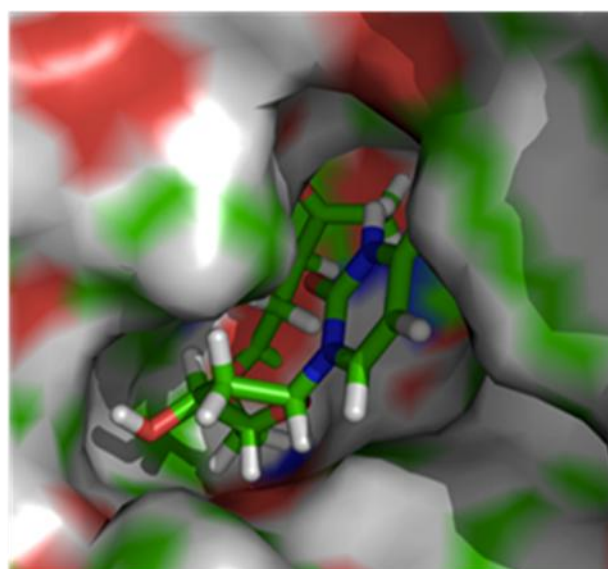


**Figura 46.** Geometrías optimizadas del intermedio IT2 en el centro activo de la CAL-B para los derivados de uracilo. Se omiten los átomos del enzima involucrados en el intermedio.

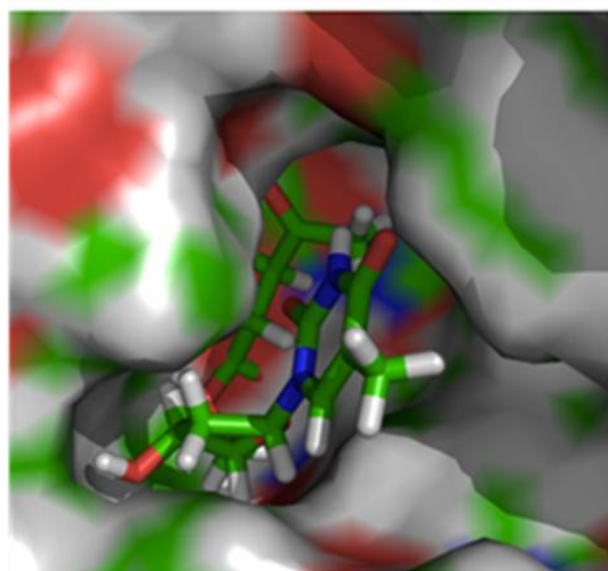
Con el objetivo de comprobar si la naturaleza de la base nitrogenada (púrica o pirimidínica) influye de algún modo en la catálisis enzimática, también estudiamos los intermedios IT2 para los análogos de adenina y guanina. La Figura 47, muestra cómo las bases pirimidínicas en la 2'-desoxiuridina (**43aa**) y en la timidina (**43ba**) encajan en el centro activo de la enzima. Sin embargo, las bases púricas –de mayor tamaño que las pirimidínicas– en los derivados protegidos de 2'-desoxiadenosina (**43da**) y 2'-desoxiguanosina (**43ea**) se orientan hacia el disolvente con los grupos protectores fuera del centro activo de la CAL-B (Figura 48). Por tanto, la interacción del azúcar es un factor determinante en la selectividad observada durante el proceso de acilación.

## Resultados y discusión

---

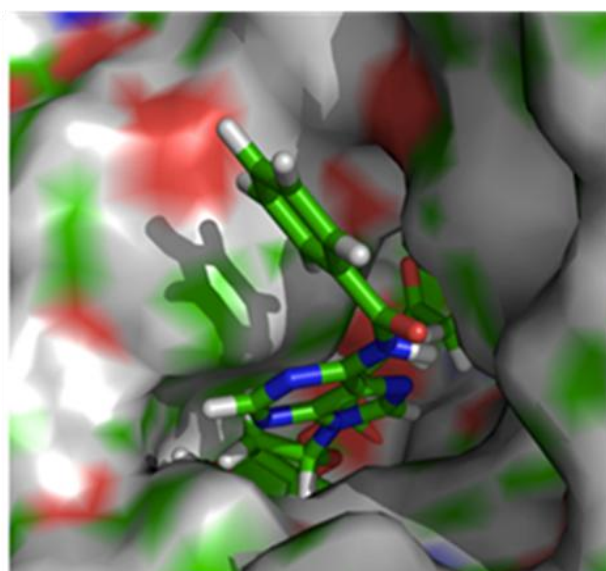


43aa (dU)

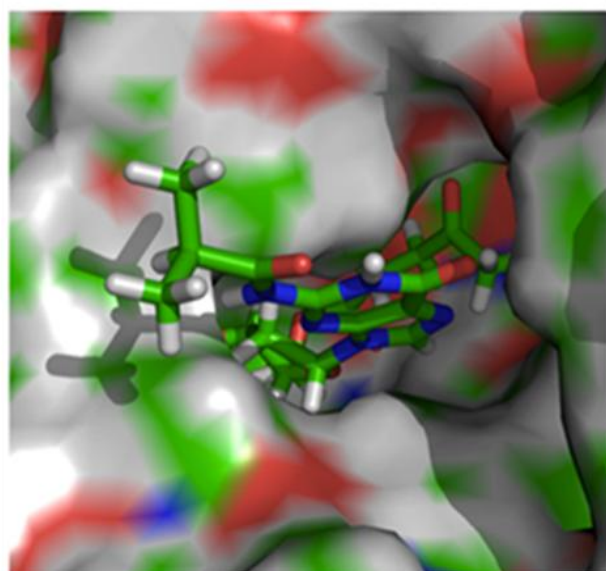


43ba (T)

**Figura 47.** Geometrías optimizadas del intermedio IT2 para los nucleósidos pirimidínicos **43aa** y **43ba** en el centro activo de la CAL-B. Los intermedios IT2 se encuentran representados en modelos de barras, mientras que los átomos de la superficie del enzima se encuentran representados en modelos de superficies. La conformación del azúcar es *N* en ambos casos, diferente de la preferida en disolución, que es la *S*.



43da (dA<sup>Bz</sup>)



43ea (dG<sup>Ibu</sup>)

**Figura 48.** Geometrías optimizadas del intermedio IT2 para los nucleósidos púricos **43da** y **43ea** en el centro activo de la CAL-B. Los intermedios IT2 se encuentran representados en modelos de barras, mientras que los átomos de la superficie del enzima se encuentran representados en modelos de superficies. La conformación del azúcar es *N* en ambos casos, diferente de la preferida en disolución, que es la *S*.

## Resultados y discusión

---

Además de la conformación, la solubilidad de los nucleósidos en THF tiene influencia en la acilación enzimática. Por ejemplo, la alta solubilidad del nucleósido 2'-fluorouridina (**43ad**) y el alto porcentaje de conformación *N* en que se encuentra en disolución pueden ser las razones que expliquen que el proceso de acilación sea el más rápido de cuantos se recogen en la Tabla 13. Aplicando el mismo razonamiento, la baja solubilidad del sustrato *N*-isobutiril-2'-desoxiguanosina (**43ea**) en THF unido al bajo porcentaje de conformación *N* en que se encuentra explicarían que se necesiten tiempos más largos (24 h) para alcanzar la conversión completa en la acilación biocatalítica. Los resultados muestran que que tanto los nucleósidos con conformación *N* ó *S* experimentan acilación selectiva, si bien con diferente velocidad. El equilibrio conformacional *N/S* es un proceso dinámico en donde la energía de activación es de aproximadamente 1-3 Kcal/mol. Por tanto, los nucleósidos que están predispuestos en conformación *N* experimentan la acilación más rápido. Por otra parte, los que se encuentran mayoritariamente en conformación *S*, también existen en baja proporción en conformación *N*, por lo que también pueden ser acilados selectivamente, como se pone de manifiesto con el sustrato *N*-isobutiril-2'-desoxiguanosina (**43ea**).

#### **4.4. CONCLUSIONES**

Se ha descrito la excelente regioselectividad que muestra la lipasa de *Candida antarctica* B hacia la posición 5' en la levulinación de varios nucleósidos 2'-sustituidos (H, OH, OMe, F), dando lugar a derivados selectivamente protegidos que son precursores útiles para la síntesis de oligonucleótidos.

Se ha demostrado que la conformación del azúcar juega un papel crucial en el reconocimiento enzima-sustrato durante la reacción de acilación enzimática. La lipasa de *Candida antarctica* B acila con mayor velocidad aquellos nucleósidos que se encuentran preferentemente en conformación *N* en disolución. La regioselectividad del proceso también es mayor para los nucleósidos en conformación *N* respecto a la *S*.

Los estudios de modelización molecular confirman los datos experimentales. Cuando el nucleósido se une al centro activo de la lipasa, el anillo del azúcar adopta siempre la conformación *N*, independientemente del conformero más favorecido en disolución. De estos estudios también se deduce que la base (púrica o pirimidínica) no tiene una influencia significativa en el proceso biocatalítico, cuya velocidad y regioselectividad vienen determinadas por la interacción de la enzima con el anillo de ribosa.

Se postula que la flexibilidad conformacional que presentan los nucleósidos es un factor determinante en la regioselectividad durante la etapa de acilación. Así, un nucleósido en el que la conformación *S* esté favorecida, puede ser acilado lenta pero selectivamente debido a que, a través del equilibrio conformacional, éste puede transformarse en el conformero *N*, que es aceptado por el centro activo de esta lipasa.





## **4.5. PARTE EXPERIMENTAL**

### **4.5.1. DISOLVENTES Y REACTIVOS GENERALES**

Los reactivos, métodos generales y técnicas de análisis han sido detallados en capítulos anteriores. Los nucleósidos utilizados se han adquirido a la empresa Isis Pharmaceuticals (Carlsbad, CA, EE.UU) o Rasayan Inc. (Encinitas, CA, EE.UU.).

### **4.5.2. TÉCNICAS DE ANÁLISIS**

Las técnicas de análisis han sido también descritas en los capítulos anteriores con la excepción de los métodos cromatográficos particulares de este capítulo. Las condiciones del HPLC para el seguimiento de las reacciones de acilación de los nucleósidos **43** y **47** así como los tiempos de retención de cada compuesto, incluidos los derivados 5'-O, 3'-O y 3',5'-di-O-levulinil (**44**, **45** y **46** respectivamente) que se utilizaron como referencia para calcular el porcentaje de regioselectividad se detallan a continuación (en todos los casos la temperatura se mantiene a 30 °C):

## Parte experimental

---

Acilación de **43aa**: Columna Spherisorb W 5  $\mu\text{m}$  (25 x 0.46 cm); eluyente  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (95:5) durante 12 min y posteriormente un gradiente hasta alcanzar 20%  $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  a los 16 min; flujo  $0.8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Los tiempos de retención son: **43aa**= 17.5, **44aa**= 9.0, **45aa**= 8.0, **46aa**= 5.2 min.

Acilación de **43ab**: columna Mediterránea sea C18 5  $\mu\text{m}$  (25 x 0.46 cm); eluyente  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$  (88:12) durante 7 min y posteriormente un gradiente hasta alcanzar 40%  $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$  a los 20 min; flujo  $0.8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Los tiempos de retención son: **40ab**= 3.8, **44ab**= 10.8, **45ab**= 9.3, **46ab**= 25.2 min.

Acilación de **43ac**: columna Lichrosorb Si 60 10  $\mu\text{m}$  (15 x 0.46 cm); eluyente  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (96:4); flujo  $0.75 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Los tiempos de retención son: **43ac**=15.3, **44ac**= 6.3, **45ac**= 7.3, **46ac**= 4.4 min

Acilación de **43ad**: columna Spherisorb W 5  $\mu\text{m}$  (25 x 0.46 cm); eluyente  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (97:3) durante 5 min y posteriormente un gradiente hasta alcanzar 6%  $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  a los 10 min y 9%  $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  a los 12 min; flujo  $0.8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Los tiempos de retención son: **43ad**= 13.4, **44ad**= 9.2, **45ad**= 8.7 min, **46ad**= 6.5 min.

Acilación de **43ba**: columna Lichrosorb Si 60 10  $\mu\text{m}$  (15 x 0.46 cm); eluyente  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (95:5); flujo  $0.8 \text{ mL}\cdot\text{min}$ . Los tiempos de retención son: **43ba**= 22, **44ba**= 8.8, **45ba**= 7.3, **46ba**= 5.2 min.

Acilación de **43bc**: columna Spherisorb W 5  $\mu\text{m}$  (25 x 0.46 cm); eluyente  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (93:7); flujo  $0.8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Los tiempos de retención son: **43bc**= 6.4 min, **44bc**= 4.6, **45bc**= 3.9, **46bc**= 3.0 min.

Acilación de **40ca**: columna Spherisorb W 5  $\mu\text{m}$  (25 x 0.46 cm); eluyente  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (96:4) durante 12 min y posteriormente un gradiente hasta alcanzar 12%  $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  a los 17 min; flujo  $0.8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Los tiempos de retención son: **43ca**= 19.9, **44ca**= 11.3, **45ca**= 7.3, **46ca**= 5.5 min.

Acilación de **43cc**: columna Lichrosorb Si 60 10  $\mu\text{m}$  (15 x 0.46 cm); eluyente  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (97:3) durante 7 min y posteriormente un gradiente hasta alcanzar 8%  $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  a los 12 min; flujo  $0.8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Los tiempos de retención son: **43cc**= 13.2, **44cc**=7.6, **45cc**= 5.6, **46cc**= 4.3 min.

Acilación de **43cd**: columna Spherisorb W 5  $\mu\text{m}$  (25 x 0.46 cm); eluyente  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (97:3) durante 7 min y posteriormente un gradiente hasta alcanzar 8%  $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  a los 12 min; flujo  $0.75 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Los tiempos de retención son: **43cd**= 16.6 , **44cd**= 11.0, **45cd**= 7.8, **46cd**= 6.0 min.

Acilación de **43da**: columna Spherisorb W 5  $\mu\text{m}$  (25 x 0.46 cm); eluyente  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (95:5); flujo  $0.8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Los tiempos de retención son: **43da**= 30.1, **44da**= 13.6, **45da**= 8.5, **46da**= 6.6 min.

Acilación de **43dc**: columna Lichrosorb Si 60 10  $\mu\text{m}$  (15 x 0.46 cm); eluyente  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (95:5); flujo  $0.8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Los tiempos de retención son: **43dc**=8.2, **44dc**=4.6, **45dc**= 3.9, **46dc**= 3.2 min.

Acilación de **43dd**: columna Mediterránea sea C18 5  $\mu\text{m}$  (25 x 0.46 cm); eluyente  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$  (88:12) durante 7 min y posteriormente un gradiente hasta alcanzar 40%  $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$  a los 20 min; flujo  $0.8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Los tiempos de retención son: **40dd**= 7.9, **44dd**= 19.6, **45dd**= 22.0, **46dd**= 27.1 min.

Acilación de **40ea**: columna Spherisorb W 5  $\mu\text{m}$  (25 x 0.46 cm); eluyente  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (92/8) durante 11 min y posteriormente un gradiente hasta alcanzar 15%  $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  a los 16 min; flujo  $0.8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Los tiempos de retención son: **43dd**= 17.8, **44dd**= 10.7, **45dd**= 6.7, **46dd**= 6.2 min.

Acilación de **40ec**: columna Spherisorb W 5  $\mu\text{m}$  (25 x 0.46 cm); eluyente  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (92:8) durante 5 min y posteriormente un gradiente hasta alcanzar 15%  $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  a los 15 min; flujo  $0.8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Los tiempos de retención son: **43ec**= 10.8, **44ec**: 7.3, **45ec**= 5.9, **46ec**= 5.2 min.

Acilación de **47**: columna Mediterránea sea C18 5  $\mu\text{m}$  (25 x 0.46 cm); eluyente  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$  (88:12) durante 7 min y posteriormente un gradiente hasta alcanzar 40%  $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$  a los 20 min; flujo  $0.8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Los tiempos de retención son: **47**= 5.6, **48**= 18.7 min.

### 4.5.3. MODELIZACIÓN MOLECULAR

La modelización molecular de los IT2 se realizó del mismo modo a como se encuentra descrito en la Parte Experimental del Capítulo 3. La única diferencia destacable es que se utilizó la estructura de rayos X de la CAL-B en lugar de la PSL. Ésta puede obtenerse de la base de datos *Protein Data Bank*.<sup>121</sup>

#### **4.5.4. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES**

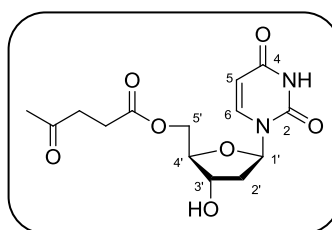
##### **Procedimiento general para la acilación de los nucleósidos 43 y 47. Síntesis de 44 y 48.**

A un matraz enrlenmeyer que contiene el correspondiente nucleósido (0.2 mmol), levulinato de acetoxima (103 mg, 0.6 mmoles) y CAL-B (1:1; p/p) se adiciona bajo atmósfera de nitrógeno 2 mL de THF anhidro. Las reacciones se monitorizan por HPLC y se agitan a 250 rpm y 30 °C durante el tiempo indicado en la Tabla 14. Una vez terminada la reacción, la enzima se filtra, se lava con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> Y MeOH y el residuo se purifica por cromatografía de columna. Los rendimientos obtenidos para los productos que no habían sido previamente descritos son: **44aa** (86%), **44ac** (92%), **44ad** (95%), **44bc** (95%), **44cc** (94%), **44cd** (92%), **44dc** (55%), **44dd** (91%), **44ec** (88%) y **45** (89%).

#### **4.5.5. DATOS EXPERIMENTALES**

A continuación se recogen los datos experimentales que han permitido la caracterización de los compuestos que no habían sido previamente reportados. La numeración empleada en la asignación de los espectros de resonancia magnética nuclear está indicada en la figura que acompaña a cada compuesto. El resto de derivados acilados en la posición 5' han sido previamente descritos en nuestro grupo de investigación.<sup>69</sup>

**5'-O-levulinil-2'-desoxiuridina (44aa)**



**Fórmula molecular:** C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>

**R<sub>f</sub>** (10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.47

**Pf:** 69-71 °C (sólido blanco)

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = + 15 (c 0.5, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

**<sup>1</sup>H RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 2.18 (m, 4H, CH<sub>3</sub>-Lev + H-2'), 2.62 (m, 3H, CH<sub>2</sub>-Lev + H-2'), 2.75 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-Lev), 4.31 (m, 5H, H-3' + H-4' + H-5'), 5.79 (d, 1H, H-5, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.7 Hz), 6.26 (m, 1H, H-1'), 7.63 (d, 1H, H-6, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.8 Hz), 10.14 (sa, 1H, NH)

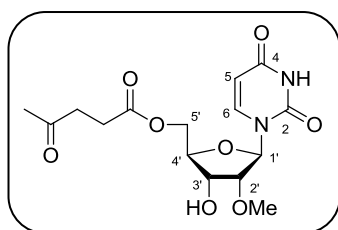
**<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 27.8 (CH<sub>2</sub>-Lev), 29.7 (CH<sub>3</sub>-Lev), 38.0 (CH<sub>2</sub>-Lev), 40.4 (C-2'), 64.0 (C-5'), 71.2 (C-3'), 84.4 (C-4'), 85.5 (C-1'), 102.6 (C-5), 140.2 (C-6), 150.6 (C-2), 164.1 (C-4), 172.7 (C=O), 207.4 (C=O)

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): Calculada para C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>7</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 349.1006.  
Encontrada: 349.0997

**Parte experimental**

---

**5'-O-levulinil-2'-O-metiluridina (44ac)**



**Fórmula molecular:** C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>

**R<sub>f</sub>** (10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.50

**Pf:** 114-116 °C (sólido blanco)

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = + 15 (c 0.5, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

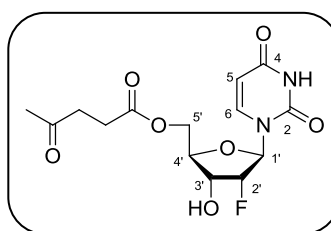
**IR** (KBr): ν 3226, 3107, 3057, 2953, 1746, 1709, 1677 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 2.21 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Lev), 2.58 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-Lev, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.2 Hz), 2.82 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-Lev, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.2 Hz), 3.65 (s, 3H, OMe), 3.86 (dd, 1H, H-4', <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 2.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 4.8 Hz), 4.15 (m, 2H, H-2' + H-3'), 4.46 (m, 2H, H-5'), 5.80 (d, 1H, H-5, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 8.1 Hz), 5.92 (d, 1H, H-1', <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 2.0 Hz), 7.73 (d, 1H, H-6, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 8.1 Hz), 9.28 (sa, 1H, NH)

**<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 27.8 (CH<sub>2</sub>-Lev), 29.7 (CH<sub>3</sub>-Lev), 37.9 (CH<sub>2</sub>-Lev), 58.8 (OMe), 62.5 (C-5'), 68.6 (C-3'), 81.6 (C-4'), 83.2 (C-2'), 87.9 (C-1'), 102.5 (C-5), 139.5 (C-6), 150.1 (C-2), 163.2 (C-4), 172.4 (C=O), 206.5 (C=O)

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): Calculada para C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>8</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 379.1112:  
Encontrada: 379.1083

**2'-desoxi-2'-fluoro 5'-O-levuliniluridina (44ad)**



**Fórmula molecular:** C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>7</sub>

**R<sub>f</sub>** (10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.47

$[\alpha]_D^{20} = + 14$  (c 0.5, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

**IR** (KBr):  $\nu$  3414, 3211, 3057, 2953, 1695, 1496 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  2.19 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Lev), 2.57 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-Lev), 2.78 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-Lev), 4.18-4.49 (m, 4H, H-5' + H-3' + H-4'), 5.13 (d, 1H, H-2', <sup>2</sup>J<sub>HF</sub> 52.9 Hz), 5.77 (d, 1H, H-5, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 8.0 Hz), 5.89 (d, 1H, H-1', <sup>3</sup>J<sub>HF</sub> 18.7 Hz), 7.62 (d, 1H, H-6, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 8.1 Hz), 10.13 (sa, 1H, NH)

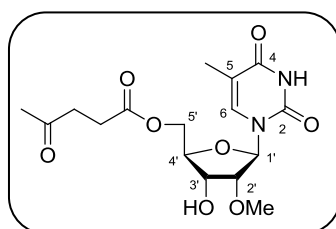
**<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  27.6 (CH<sub>2</sub>-Lev), 29.8 (CH<sub>3</sub>-Lev), 37.8 (CH<sub>2</sub>-Lev), 62.6 (C-5'), 68.9 (C-3'), 80.5 (C-4'), 89.4 (d, C-1', <sup>3</sup>J<sub>CF</sub> 35.1 Hz), 93.3 (d, C-2', <sup>2</sup>J<sub>CF</sub> 187.1 Hz), 102.5 (C-5), 141.0 (C-6), 150.3 (C-2), 164.0 (C-4), 172.7 (C=O), 207.7 (C=O)

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): Calculada para C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>7</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 367.0912.  
Encontrada: 367.0905

**Parte experimental**

---

**5'-O-levulinil-2'-O-metil-5-metiluridina (44bc)**



**Fórmula molecular:** C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>

**R<sub>f</sub>** (10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.54

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = + 20 (c 0.5, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

**IR** (KBr): ν 3392, 3202, 3066, 2932, 1742, 1703, 1681 cm<sup>-1</sup>

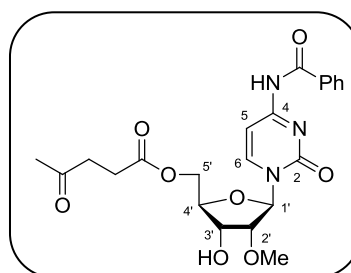
**<sup>1</sup>H RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 1.92 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.19 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Lev), 2.61 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-Lev), 2.80 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-Lev), 3.59 (s, 3H, OMe), 3.83 (dd, 1H, H-4', <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 2.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 4.9 Hz), 4.12 (m, 2H, H-2' + H-3'), 4.36 (dd, 1H, H-5', <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 2.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 12.6 Hz), 4.50 (dd, 1H, H-5', <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 3.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 12.6 Hz), 5.92 (m, 1H, H-1', <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 2.3 Hz), 7.41 (s, 1H, H-6), 9.87 (sa, 1H, NH)

**<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 12.3 (CH<sub>3</sub>), 27.8 (CH<sub>2</sub>-Lev), 29.7 (CH<sub>3</sub>-Lev), 37.8 (CH<sub>2</sub>-Lev), 58.7 (OMe), 62.8 (C-5'), 68.8 (C-3'), 81.4 (C-4'), 83.0 (C-2'), 87.8 (C-1'), 111.0 (C-5), 135.3 (C-6), 150.3 (C-2), 164.1 (C-4), 172.4 (C=O), 206.6 (C=O)

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): Calculada para C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>8</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 393.1268;  
Encontrada: 393.1252



**N-benzoil-5'-O-levulinil-2'-O-metilcitidina (44cc)**



**Fórmula molecular:** C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>

**R<sub>f</sub>** (10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.60

**Pf:** 114-116 °C (sólido blanco)

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = + 36 (c 0.35, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

**IR** (KBr): ν 3056, 2986, 1743, 1703, 1667 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 2.20 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Lev), 2.62 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-Lev), 2.83 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-Lev), 3.71 (s, 3H, OMe), 3.87 (d, 1H, H-4', <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 5.0 Hz), 4.12 (dd, 1H, H-5', <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 5.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 9.2 Hz), 4.20 (m, 1H, H-5'), 4.50 (m, 2H, H-3' + H-2'), 5.96 (s, 1H, H-1'), 7.50 (t, 2H, H<sub>m</sub>, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.5 Hz), 7.58 (m, 2H, H<sub>p</sub> + H-5), 7.91 (m, 2H, H<sub>o</sub>), 8.28 (d, 1H, H-6, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.4 Hz)

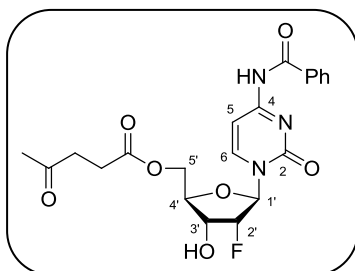
**<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 27.9 (CH<sub>2</sub>-Lev), 29.8 (CH<sub>3</sub>-Lev), 37.9 (CH<sub>2</sub>-Lev), 58.9 (OMe), 62.2 (C-5'), 68.2 (C-3'), 81.4 (C-4'), 83.3 (C-2'), 89.0 (C-1'), 96.6 (C-5), 127.7 (C<sub>o</sub> ó C<sub>m</sub>), 129.0 (C<sub>m</sub> ó C<sub>o</sub>), 132.0 (C<sub>p</sub> + C<sub>i</sub>), 144.3 (C-6), 154.7 (C-2), 162.7 (C-4), 166.7 (Ph-C=O), 172.5 (C=O), 206.6 (C=O)

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): Calculada para C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub> [M+H]<sup>+</sup> 460.1714.  
Encontrada: 460.1724

**Parte experimental**

---

**N-benzoil-2'-desoxi-2'-fluoro-5'-O-levulinilcitidina (44cd)**



**Fórmula molecular:** C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>7</sub>

**R<sub>f</sub>** (10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.60

**Pf:** 150-152 °C (sólido blanco)

$[\alpha]_D^{20} = + 78$  (c 0.5, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

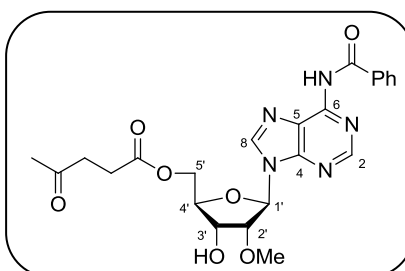
**IR** (KBr):  $\nu$  3336, 3290, 3126, 3057, 2987, 1738, 1702 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  2.18 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Lev), 2.60 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-Lev, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.2 Hz), 2.80 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-Lev, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.2 Hz), 4.25-4.57 (m, 4H, H-3' + H-4' + H-5'), 5.19 (dd, 1H, H-2', <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 3.7 Hz, <sup>2</sup>J<sub>HF</sub> 52.4 Hz), 5.95 (d, 1H, H-1', <sup>3</sup>J<sub>HF</sub> 17.6 Hz), 7.48 (t, 2H, H<sub>m</sub>, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.5 Hz), 7.58 (m, 2H, H<sub>p</sub> + H-5), 7.93 (d, 2H, H<sub>o</sub>, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.3 Hz), 8.17 (d, 1H, H-6, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.6 Hz)

**<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  27.8 (CH<sub>2</sub>-Lev), 29.7 (CH<sub>3</sub>-Lev), 37.9 (CH<sub>2</sub>-Lev), 62.2 (C-5'), 68.5 (C-3'), 80.5 (C-4'), 90.5 (d, C-1', <sup>3</sup>J<sub>CF</sub> 34.6 Hz), 93.4 (d, C-2', <sup>2</sup>J<sub>CF</sub> 187.6 Hz), 97.0 (C-5), 127.7 (C<sub>o</sub> or C<sub>m</sub>), 128.9 (C<sub>m</sub> o C<sub>o</sub>), 132.8 (C<sub>i</sub> o C<sub>p</sub>), 133.2 (C<sub>p</sub> ó C<sub>i</sub>), 144.8 (C-6), 154.9 (C-2), 163.0 (C-4), 166.8 (Ph-C=O), 172.6 (C=O), 207.1 (C=O)

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): Calculada para C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>7</sub> [M+H]<sup>+</sup> 448.1515.  
Encontrada: 448.1497

**N-benzoil-5'-O-levulinil-2'-O-metiladenosina  
(44dc)**



**Fórmula molecular:** C<sub>23</sub>H<sub>25</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>

**R<sub>f</sub>** (10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.52

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -10 (c 0.5, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

**IR** (KBr): ν 3405, 2922, 1712, 1613 cm<sup>-1</sup>

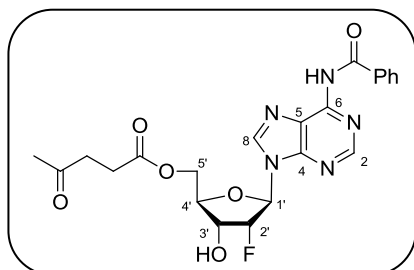
**<sup>1</sup>H RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 2.14 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Lev), 2.68 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-Lev), 2.77 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-Lev), 3.59 (s, 3H, OMe), 4.36-4.49 (m, 3H, H-4' + H-5'), 4.44 (m, 2H, H-2' + H-3'), 6.31 (m, 1H, H-1'), 7.49 (t, 2H, H<sub>m</sub>, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.7 Hz), 7.58 (t, 1H, H<sub>p</sub>, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.6 Hz), 8.06 (d, 2H, H<sub>o</sub>, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.5 Hz), 8.40 (s, 1H, H-2 ó H-8), 8.75 (s, 1H, H8 ó H2), 9.87 (sa, 1H, NH)

**<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 27.7 (CH<sub>2</sub>-Lev), 29.7 (CH<sub>3</sub>-Lev), 37.8 (CH<sub>2</sub>-Lev), 58.9 (OMe), 63.0 (C-5'), 69.4 (C-3'), 82.3 (C-4'), 83.1 (C-2'), 89.0 (C-1'), 123.6 (C-5), 128.3 (C<sub>o</sub> ó C<sub>m</sub>), 128.8 (C<sub>m</sub> ó C<sub>o</sub>), 132.7 (C<sub>p</sub>), 133.4 (C<sub>i</sub>), 141.7 (C-2 ó C-8), 149.9 (C-4 ó C-6), 151.5 (C-6 ó C-4), 152.3 (C-8 ó C-2), 165.4 (Ph-C=O), 172.6 (C=O), 206.1 (C=O)

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): Calculada para C<sub>23</sub>H<sub>26</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub> [M+H]<sup>+</sup> 484.1827  
472.1627; Encontrada: 484.1837

**Parte experimental**

**N-benzoil-2'-desoxi-2'-fluoro-5'-O-levuliniladenosina (44dd)**



**Fórmula molecular:** C<sub>25</sub>H<sub>22</sub>FN<sub>5</sub>O<sub>6</sub>

**R<sub>f</sub>** (10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.49

**Pf:** 63-65 °C (sólido blanco)

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -5 (c 0.35, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

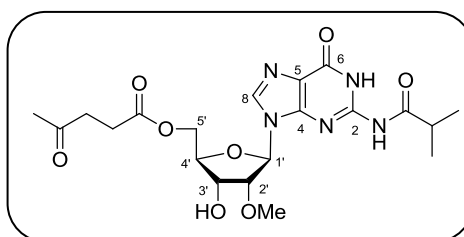
**IR** (KBr):  $\nu$  3396, 3055, 2987, 1713, 1612 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  2.14 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Lev), 2.53 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-Lev), 2.73 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-Lev), 4.32 (m, 1H, H-4'), 4.44 (m, 2H, H-5'), 4.82 (ddd, 1H, H-3', <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 4.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.9 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HF</sub> 20.3 Hz), 5.54 (dd, 1H, H-2', <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 4.1 Hz, <sup>2</sup>J<sub>HF</sub> 52.5 Hz), 6.30 (d, 1H, H-1', <sup>3</sup>J<sub>HF</sub> 17.7 Hz), 7.49 (t, 2H, H<sub>m</sub>, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.5 Hz), 7.59 (t, 1H, H<sub>p</sub>, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.2 Hz), 8.02 (d, 2H, H<sub>o</sub>, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.5 Hz), 8.31 (s, 1H, H-2 ó H-8), 8.73 (s, 1H, H-8 ó H-2), 9.45 (sa, 1H, NH)

**<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  27.7 (CH<sub>2</sub>-Lev), 29.7 (CH<sub>3</sub>-Lev), 37.8 (CH<sub>2</sub>-Lev), 62.6 (C-5'), 69.4 (C-3'), 80.9 (C-4'), 87.3 (d, C-1', <sup>3</sup>J<sub>CF</sub> 34.1 Hz), 93.3 (C-2', <sup>2</sup>J<sub>CF</sub> 188.0 Hz), 123.4 (C-5), 128.0 (C<sub>o</sub> or C<sub>m</sub>), 128.8 (C<sub>m</sub> o C<sub>o</sub>), 132.9 (C<sub>p</sub>), 133.4 (C<sub>i</sub>), 141.9 (C-2 ó C-8), 149.8 (C-4 ó C-6), 151.1 (C-6 ó C-4), 153.3 (C-8 ó C-2), 165.0 (Ph-C=O), 172.6 (C=O), 207.2 (C=O)

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): Calculada para C<sub>22</sub>H<sub>23</sub>FN<sub>5</sub>O<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup> 472.1627;  
Encontrada: 472.1638

**N-isobutiril-5'-O-levulinil-2'-O-metilguanosa  
(44ec)**



**Fórmula molecular:** C<sub>20</sub>H<sub>27</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub>

**R<sub>f</sub>** (10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.42

**Pf:** 52-54 °C (sólido blanco)

**[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>** = -20 (c 1.2, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

**IR** (KBr): ν 3194, 3055, 2984, 2937, 1716, 1682 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H RMN** (MeOH-*d*<sub>4</sub>, 300.13 MHz): δ 1.23 (d, 6H, CH<sub>3</sub>-Ibu, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.8 Hz), 2.15 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Lev), 2.58 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-Lev), 2.80 (m, 3H, CH<sub>2</sub>-Lev + CH-Ibu), 3.54 (s, 3H, OMe), 4.20 (m, 1H, H-4'), 4.29-4.48 (m, 4H, H-5' + H-3' + H-2'), 6.05 (d, 1H, H-1', <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 4.1 Hz), 8.17 (s, 1H, H-8)

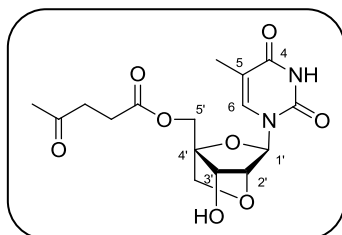
**<sup>13</sup>C NMR** (MeOH-*d*<sub>4</sub>, 75.5 MHz): δ 17.9 (CH<sub>3</sub>-Ibu), 27.4 (CH<sub>2</sub>-Lev), 28.2 (CH<sub>3</sub>-Lev), 35.5 (CH-Ibu), 37.2 (CH<sub>2</sub>-Lev), 57.7 (OMe), 63.2 (C-5'), 69.3 (C-3'), 82.2 (C-4'), 83.2 (C-2'), 86.6 (C-1'), 120.2 (C-5), 138.1 (C-8), 148.4 (C-2 ó C-4), 148.9 (C-4 ó C-2), 156.0 (C-6), 172.8 (C=O), 180.4 (Ibu-C=O), 208.0 (C=O)

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): Calculada para C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub> [M+H]<sup>+</sup> 466.1932.  
Encontrada: 466.1938

**Parte experimental**

---

**5'-O-levulinil-2'-O,4'-C-metilen-D-ribofuranosil-5-metiluridina (48)**



**Fórmula molecular:** C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>

**R<sub>f</sub>** (10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.44

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -33 (c 0.35, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

**IR** (KBr): ν 3392, 3055, 1743, 1691 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 1.81 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.15 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Lev), 2.59 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-Lev), 2.80 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-Lev), 3.79 (d, 1H, CH<sub>2</sub>, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> 8.1 Hz), 4.01 (d, 1H, CH<sub>2</sub>, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> 7.9 Hz), 4.08 (s, 1H, H-2' ó H3'), 4.39 (d, 1H, H-5', <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> 12.7), 4.43 (s, 1H, H-2' ó H-3'), 4.53 (d, 1H, H-5', <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> 12.7), 5.52 (s, 1H, H-1'), 7.44 (s, 1H, H-6), 10.04 (sa, 1H, NH)

**<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 12.5 (CH<sub>3</sub>), 27.6 (CH<sub>2</sub>-Lev), 29.6 (CH<sub>3</sub>-Lev), 37.7 (CH<sub>2</sub>-Lev), 62.8 (C-5'), 70.0 (C-3'), 72.0 (CH<sub>2</sub>), 79.1 (C-2'), 86.6 (C-1' ó C-4'), 86.9 (C-4' ó C-1'), 109.9 (C-5), 134.7 (C-6), 150.0 (C-2), 164.4 (C-4), 172.7 (C=O), 207.0 (C=O)

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): Calculada para C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>8</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 391.1112.  
Encontrada: 391.1106

## **CAPÍTULO 5**

**SÍNTESIS DE 2',3'-DIDESOXI-2',2'-  
DIFLUORO-4'-AZANUCLEÓSIDOS.  
EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD BIOLÓGICA**





## **5.1. ANTECEDENTES**

El amplio espectro de aplicaciones terapéuticas que presentan los nucleósidos ha dado lugar a un campo de investigación tremendamente activo encaminado a encontrar nuevos análogos que mejoren las actividades de los anteriores, disminuyendo los efectos adversos como la toxicidad. Algunas modificaciones en la base nitrogenada y, principalmente, en el anillo de ribosa han proporcionado excelentes resultados.

Centrándonos en las modificaciones del azúcar del nucleósido, se debe dejar al margen el grupo hidroximetilo, que constituye la posición 5' y que es necesario para realizar la fosforilación del nucleósido por las quinasas celulares. Por tanto, los mejores puntos de actuación son las posiciones 2' y 3'; concretamente, la sustitución de los grupos hidroxilo de estas posiciones por flúor puede potenciar las aplicaciones farmacológicas de los nucleósidos. Otro foco potencial de actuación es la sustitución del átomo de oxígeno del anillo de ribosa por un átomo diferente como un carbono u otro heteroátomo.

## Antecedentes

---

### 5.1.1. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS NUCLEÓSIDOS FLUORADOS

Entre las estrategias más utilizadas en el descubrimiento de fármacos se encuentra la modificación de la estructura de algún producto natural u otra molécula orgánica con una determinada actividad biológica para intentar potenciarla. Una de las sustituciones más empleadas es el reemplazamiento de átomos de hidrógeno o grupos hidroxilo por flúor. De hecho, la actividad biológica de algunas moléculas orgánicas se ve, en ocasiones, extraordinariamente potenciada por la introducción de un átomo de flúor en su estructura.<sup>136</sup>

Las principales razones que justifican la importancia biológica de los derivados con flúor son: (1) el flúor tiene un tamaño similar al del hidrógeno, por lo que la sustitución de un hidrógeno por flúor no distorsiona la geometría molecular; (2) puede mimetizar al grupo funcional hidroxilo, presentando una distancia media de enlace C-F de 1.35 Å, similar a la C-O (1.43 Å) siendo también aceptor de enlaces de hidrógeno; (3) aumenta la lipofilia de las moléculas respecto al grupo hidroxilo por lo que se facilita que los compuestos organofluorados atraviesen las membranas lipídicas incrementando la biodisponibilidad; (4) posibilidad de interacciones hidrofóbicas con los receptores o enzimas diana; (5) el carácter electrón-atrayente del flúor dificulta la oxidación en condiciones metabólicas, por lo que son compuestos más estables en el organismo, pudiendo realizar su acción terapéutica antes de ser metabolizados.

Como se ha comentado anteriormente, la presencia de átomos de flúor en la estructura de los nucleósidos también potencia sus aplicaciones farmacológicas.<sup>137</sup> En la Figura 6 de la Introducción se mostraban dos nucleósidos fluorados en la posición 2' del azúcar aprobados por la FDA para el tratamiento del cáncer: gemcitabina (2'-desoxi-2',2'-difluorocitidina) y clofarabina (2-cloro-2'-desoxi-2'-fluoroarabinoadenosina). Además, otros nucleósidos fluorados en las posiciones 2' ó 3' con propiedades terapéuticas son la 2',3'-didesoxi-2'-fluorocitosina (F-dCC, Figura

---

<sup>136</sup> a) Hagmann, W.K. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 4359-4369. b) Muller, K.; Faeh, C.; Diederich, F. *Science* **2007**, *317*, 1881-1886. c) Bohm, H.-J.; Banner, D.; Kuhn, B.; Müller, K.; Obst-Sander, U.; Stahl, M.; Bendels, S.; Kansy, M. *ChemBioChem* **2004**, *5*, 637-643.

<sup>137</sup> Para revisiones sobre nucleósidos fluorados ver: a) Qiu, X.-L.; Xu, X.-X.; Qing, F.-L. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 789-843. b) Liu, P.; Sharon, A.; Chu, C.K. *J. Fluor. Chem.* **2008**, *129*, 743-766.

49),<sup>138</sup> y la 3'-fluoro-3'-desoxitimidina (FLT),<sup>139</sup> con actividad anti-VIH. Especialmente destacable es el caso de la fialuridina (FIAC),<sup>140</sup> un potente agente anti-HBV que llegó exitosamente hasta la fase de ensayos clínicos en humanos. Sin embargo, en 1993, de los quince pacientes sometidos a ensayo, cinco fallecieron por graves trastornos hepáticos y dos sobrevivieron tras trasplante de hígado. Estos efectos no se habían observado previamente en animales.<sup>141</sup>

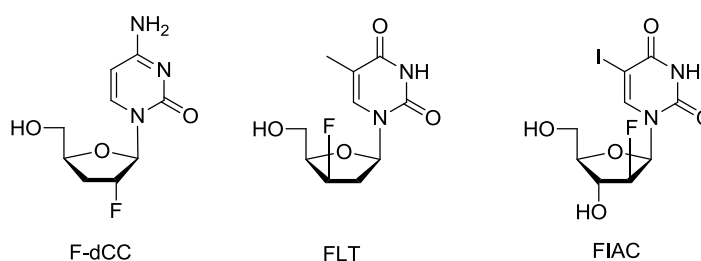


Figura 49. Nucleósidos fluorados con actividad antiviral.

### 5.1.2. NUCLEÓSIDOS HETEROCÍCLICOS

La sustitución del átomo de oxígeno del anillo de ribosa o 2'-desoxiribosa de los nucleósidos por otro átomo también ha dado lugar a la aparición de derivados con importantes actividades terapéuticas. Por ejemplo, el abacavir<sup>142</sup> (Figura 3), donde el átomo de oxígeno en posición 4' se ha remplazado por un grupo metileno, es un carbonucleósido con elevada actividad anti-VIH. Se han descrito numerosas síntesis encaminadas a la preparación de carbonucleósidos;<sup>143</sup> sin embargo, nos centraremos más en los

<sup>138</sup> a) Martin, J. A.; Bushnell, D. J.; Duncan, I. B.; Dunsdon, S. J.; Hall, M. J.; Machin, P. J.; Merrett, J. H.; Parkes, K. E. B.; Roberts, N. A.; Thomas, G. J.; Galpin, S. A.; Kinchington, D. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 2137-2145. b) Sterzycki, R. Z.; Ismail, G.; Brankovan, V.; Martin, J. C.; Mansur, M. M. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 2150-2157.

<sup>139</sup> Balzarini, J.; Baba, M.; Pauwels, R.; Herdewijn, P.; De Clercq, E. *Biochem. Pharmacol.* **1988**, *37*, 2847-2856.

<sup>140</sup> Fourel, I.; Hantz, O.; Watanabe, K. A.; Jacquet, C.; Chomel, B.; Fox, J. J.; Trepo, C. *Antimicrob. Agents. Chemoter.* **1990**, *34*, 473-475.

<sup>141</sup> Swartz, M.; Manning, F. J. *Review of the Fialuridine Clinical Trials*, 1995, *Institute of Medicine*.

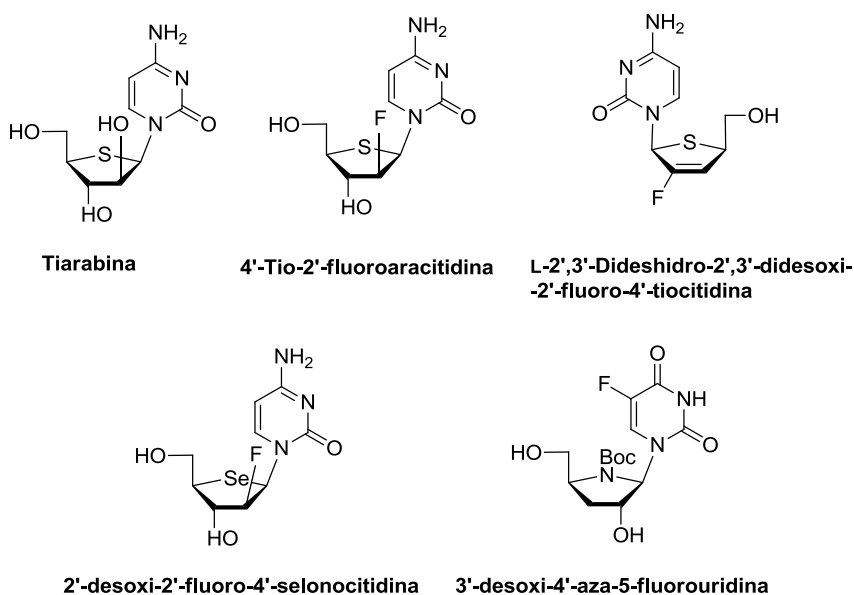
<sup>142</sup> Good, S. S.; Daluge, S. M.; Ching, S. V.; Ayers, K. M.; Mahony, W. B.; Faletto, M. B.; Domin, G. A.; Owens, B. S.; Dornsife, R. E.; McDowell, J. A.; Lafon, S. W.; Symonds, W. T. *Antiviral Res.* **1995**, *26*, A229

<sup>143</sup> Zhu, X.-F. *Nucleosides, Nucleotides, Nucleic Acids* **2000**, *19*, 651-690.

## Antecedentes

heteronucleósidos,<sup>144</sup> en los que el oxígeno se reemplaza por otro heteroátomo como azufre, nitrógeno o selenio.

Los 4'-tionucleósidos son sin lugar a dudas los que han concentrado más investigaciones.<sup>145</sup> De estos estudios ha surgido el derivado 4'-tioaracitosina (tiarabina, Figura 50) que, en ensayos clínicos, está logrando controlar la expansión de tumores sólidos metastásicos.<sup>146</sup> Otros ejemplos de 4'-tionucleósidos con actividad biológica son 4'-tio-2'-fluoroaracitidina y L-2',3'-dideshidro-2',3'-didesoxi-2'-fluoro-4'-tiocitidina, con actividad antitumoral<sup>147</sup> y anti VIH,<sup>148</sup> respectivamente.



**Figura 50.** Heteronucleósidos biológicamente activos.

<sup>144</sup> Para revisión sobre síntesis de heteronucleósidos ver: Romeo, G.; Chiacchio, U.; Corsaro, A.; Merino, P. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 3337-3370.

<sup>145</sup> Yokoyama, M. *Synthesis* **2000**, 1637-1655.

<sup>146</sup> a) Clarke, M. L.; Damaraju, V. L.; Zhang, J.; Mowles, D.; Tackaberry, T.; Lang, T.; Smith, K. M.; Young, J. D.; Tomkinson, B.; Cass, C. E. *Mol. Pharmacol.* **2006**, *70*, 303-310. b) Parker, W. B.; Shaddix, S. C.; Rose, L. M.; Waud, W. R.; Shewach, D. S.; Tiwari, K. N.; Secrist, J. A., III *Biochem. Pharmacol.* **2000**, *60*, 1925-1932.

<sup>147</sup> Miura, S.; Yoshimura, Y.; Endo, M.; Machida, H.; Matsuda, A., Tanaka, M.; Sasaki, T. *Cancer Lett.* **1998**, *129*, 103-110.

<sup>148</sup> Choi, Y.; Choo, Y.; Chong, Y.; Lee, S.; Olgen, S.; Schinazi, S.F.; Chu, C.K. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 305-307.

Recientemente, se ha descubierto que los 4'-selenonucleósidos y 4'-azanucleósidos poseen también destacadas actividades biológicas. La Figura 50 muestra los derivados 2'-desoxi-2'-fluoro 4'-selenocitidina (agente anticancerígeno)<sup>149</sup> y 3'-desoxi-4'-aza-5-fluorouridina (agente anti-HCV)<sup>150</sup> como ejemplos de esta clase de compuestos).

### 5.1.3. SÍNTESIS DE FLURO-4'-AZANUCLEÓSIDOS

Con la excepción de los selenonucleósidos, que han empezado a desarrollarse hace pocos años, los 4'-azanucleósidos comprenden el grupo de heteronucleósidos menos estudiado hasta el momento.<sup>151</sup> Si además nos fijamos en los derivados fluorados, hasta la fecha, sólo se encuentran publicados dos trabajos en los que se describe la preparación de fluorometil-4'-azanucleósidos. Ambas rutas sintéticas se explican brevemente a continuación.

**a) Síntesis de 2',3'-didesoxi-2'-difluorometil-4'-azanucleósidos.** Qiu y Qing<sup>152</sup> prepararon estos derivados partiendo de la *trans*-4-hidroxi-L-prolina, que se oxida a la correspondiente cetona previa esterificación del ácido carboxílico y protección del nitrógeno con Boc. Sobre el producto resultante se lleva a cabo la difluorometilación con CF<sub>2</sub>Br<sub>2</sub> y Zn. Posteriormente, se realiza la hidrogenación estereoselectiva del doble enlace formado y la posición 2 de la pirrolidina se oxida con RuO<sub>2</sub> para formar la lactama. En este punto, los intentos de reducción de la lactama no fueron satisfactorios, por lo que decidieron reemplazar el Boc por Cbz como grupo protector del nitrógeno. Tras la reducción del correspondiente intermedio con *superhidruro* (LiEt<sub>3</sub>BH) y la posterior acetilación se obtiene el precursor para la reacción de glicosilación. En el acoplamiento con las bases nitrogenadas uracilo y timina se obtienen los 4'-azanucleósidos como mezcla separable de anómeros. El grupo protector del

<sup>149</sup> Jeong, L.S.; Tosh, D. K.; Choi, W. J.; Lee, S. K.; Kang, Y.-J.; Choi, S.; Lee, J. H.; Lee, H.; Lee, H. W.; Kim, H. O. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 5503-5306.

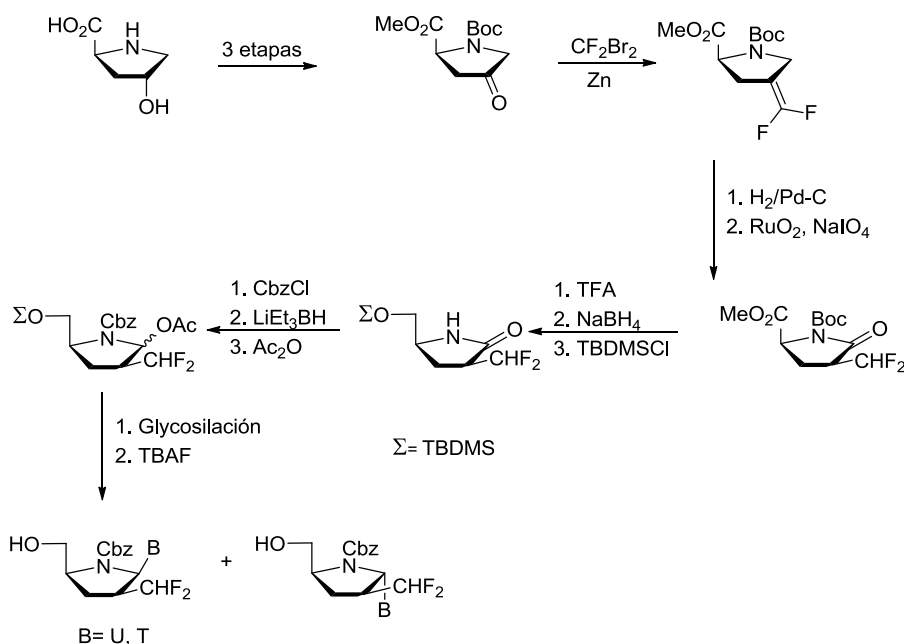
<sup>150</sup> Chiacchio, U.; Borrello, L.; Crispino, L.; Rescifina, A.; Merino, P.; Macchi, B.; Balestrieri, A.; Mastino, A.; Piperno, A.; Romeo, G. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 4054-4057.

<sup>151</sup> Publicaciones más destacadas sobre la síntesis de 4'-azanucleósidos: a) Hernández, D.; Boto, A.; Hernández, R. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 3847-3857. b) Hernández, D.; Boto, A.; Hernández, R. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 455-458. c) Costenaro, E. R.; Fontoura, L. A.; Oliveira, D. F.; Correia, C. R. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 1599-1602. d) Yokoyama, M.; Momotake, A. *Synthesis*, **1999**, *9*, 1541-1554. e) Rassa, G.; Pinna, L.; Spanu, P.; Ulgheri, F.; Casiraghi, G. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 4019-4022.

<sup>152</sup> Qiu, X.-L.; Qing, F.-L. *Synthesis* **2004**, *13*, 334-340

## Antecedentes

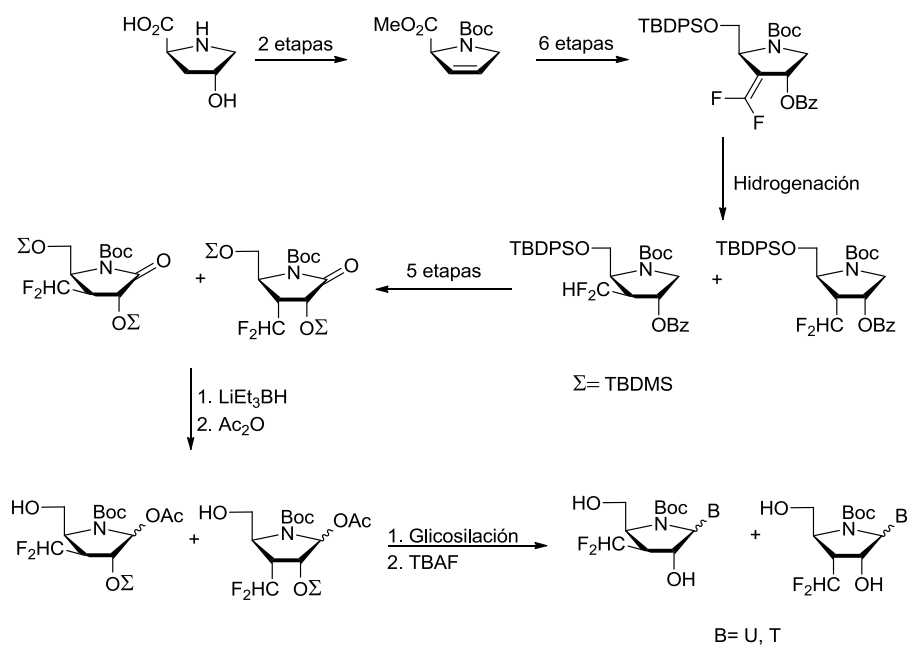
nitrógeno, en este caso el Cbz, es necesario para evitar la ruptura del enlace glicosídico (Esquema 44).



Esquema 44

**b) Síntesis de 3'-desoxi-3'-difluorometil-4'-azanucleósidos.** Los mismos autores,<sup>153</sup> describen la preparación de estos derivados partiendo igualmente de *trans*-4-hidroxi-L-prolina. Tras la adecuada manipulación de grupos funcionales se consigue la difluorometilación del anillo de pirrolidina. En esta ocasión, la hidrogenación del doble enlace formado no es estereoselectiva ocurriendo por ambas caras del anillo de pirrolidina y formándose dos estereoisómeros separables en diferente proporción. La oxidación de la posición contigua al nitrógeno, seguida de la reducción de la lactama resultante y posterior acetilación da lugar al precursor para la reacción de glicosilación. Este proceso de acoplamiento con las bases pirimidínicas uracilo y timina da lugar a mezclas separables de anómeros α/β para cada uno de los diferentes estereoisómeros provenientes del proceso de hidrogenación (Esquema 45).

<sup>153</sup> Qiu, X.-L.; Qing, F.-L. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 3826-3837.



Esquema 45

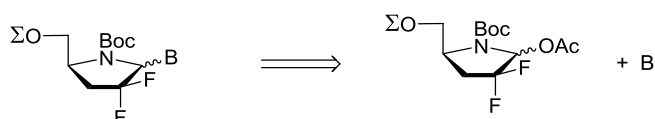




## 5.2. OBJETIVOS

Teniendo en cuenta las excelentes propiedades biológicas que proporciona la presencia de átomos de flúor en la estructura de los nucleósidos y los escasos ejemplos de 4'-azanucleósidos fluorados que se encuentran en la bibliografía, nos planteamos la preparación de 2',3'-didesoxi-2',2'-difluoro-4'-azanucleosidos. Hasta la fecha no existe ningún ejemplo de 4'-azanucleosidos en los que el átomo de flúor esté directamente unido al anillo de pirrolidina.

Desde un punto de vista retrosintético, estos nucleósidos podrían prepararse mediante una reacción de glicosilación entre la pirrolidina difluorada, convenientemente protegida, y las correspondientes bases nitrogenadas púricas y pirimidínicas.



Además, se llevarán a cabo ensayos biológicos sobre los compuestos sintetizados para examinar su actividad como antivirales. Por otra parte, estos análogos presentan dos átomos de flúor en la posición 2', al igual que el conocido nucleósido antitumoral gemcitabina, por lo que también podrían ser evaluados como potenciales agentes anticancerígenos.



## **5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **5.3.1. SÍNTESIS DEL PRECURSOR DEL AZÚCAR PARA LA GLICOSILACIÓN**

Según el análisis retrosintético propuesto, en primer lugar se debe sintetizar el derivado de pirrolidina difluorado que se empleará para la reacción de glicosilación. Su preparación se hace a partir del ácido L-piroglutámico (**49**), que posee la estereoquímica adecuada para preparar azanucleósidos con la configuración natural, es decir, de la serie D.

Este aminoácido comercial se transforma en L-piroglutaminol (**50**) a través de un procedimiento que implica una reacción de esterificación con  $\text{SOCl}_2$  en MeOH seguida de la reducción del éster metílico resultante con  $\text{NaBH}_4$ .<sup>154</sup> La protección de **50** con 2,2-dimetoxipropano (DMP) en presencia de CSA da lugar a la lactama bicíclica **51**. Coward y Konas<sup>155</sup> describieron la fluoración electrófila de este sustrato mediante un procedimiento en el que se utiliza la LDA como base para generar el enolato y *N*-fluorobencenosulfonimida como agente de fluoración. En una primera etapa, se genera una mezcla de diastereoisómeros

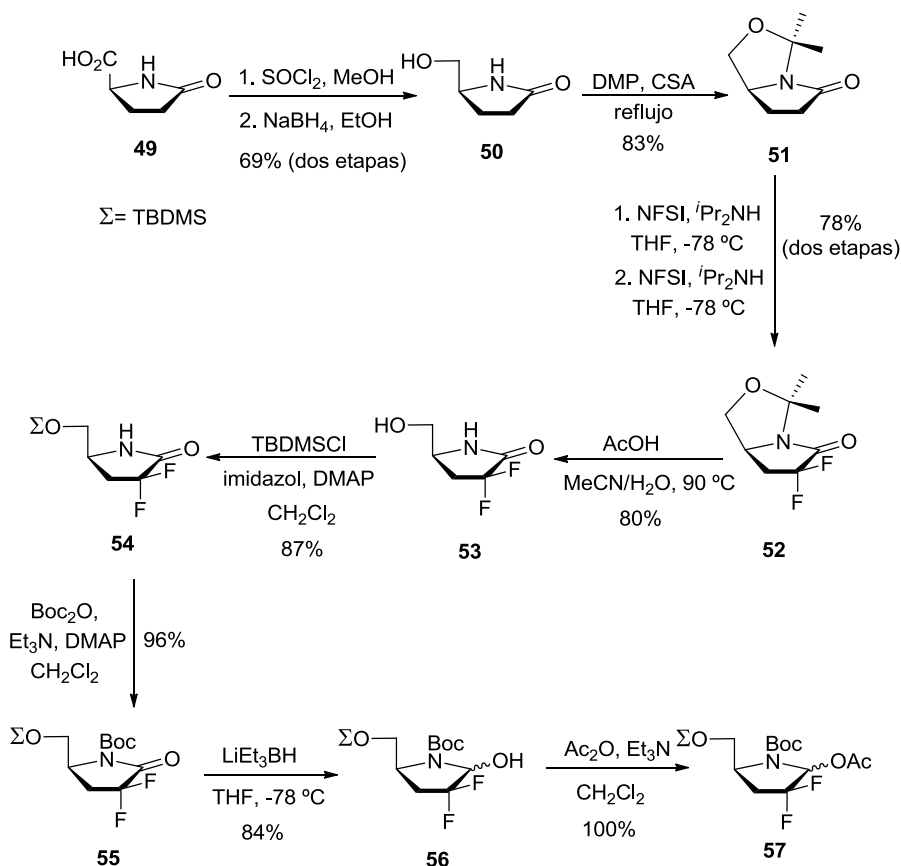
---

<sup>154</sup> Saijo, S.; Wada, M.; Himizu, J.-I.; Ishida, A. *Chem. Pharm. Bull.* **1980**, *28*, 1449-1458.

<sup>155</sup> a) Coward, J. K.; Konas, D. W. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 8831-8842. b) Coward, J. K.; Konas, D. W. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 2105-2107.

## Resultados y discusión

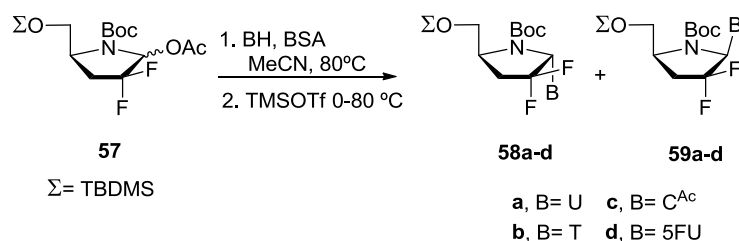
monofluorados en proporción 1.2:1.0 que se aísla y se somete de nuevo a las mismas condiciones de reacción para dar lugar a la difluorolactama bicíclica **52** con un 78% de rendimiento tras las dos etapas. Los intentos de difluoración directa no resultaron satisfactorios, siendo inevitable introducir los dos átomos de flúor secuencialmente. Tras la hidrólisis ácida de **52** con una mezcla AcOH/MeCN/H<sub>2</sub>O se obtiene el derivado desprotegido **53**, cuyo grupo hidroxilo se protege como éter de silicio para dar **54** con un 87% de rendimiento. El grupo amino se protege como carbamato con Boc<sub>2</sub>O en presencia de Et<sub>3</sub>N y DMAP para generar **55**. La reducción de la lactama **55** -completamente protegida- se consigue con LiEt<sub>3</sub>BH a -78 °C en THF formándose, con un 84% de rendimiento, la mezcla de anómeros **56** en proporción 1.9:1.0. Por último, se acetila el grupo hidroxilo de **56** con Ac<sub>2</sub>O para obtener **57** con rendimiento cuantitativo (Esquema 46).



Esquema 46. Síntesis del precursor **57** para la reacción de glicosilación.

### 5.3.2. SÍNTESIS DE 2',2'-DIFLUORO-4'-AZANUCLEÓSIDOS PIRIMIDÍNICOS

Tras la síntesis de **57**, se procede al acoplamiento con diferentes bases pirimidínicas bajo las condiciones de Vorbruggen. Es decir, las bases nitrogenadas se persililan con *N,O*-bistrimetilsililacetamida (BSA) en presencia de **57**, haciéndolas solubles en el disolvente de la reacción –acetonitrilo-. Es importante que este proceso se lleve a cabo bajo estrictas condiciones anhidras ya que las bases persililadas son muy lábiles en presencia de humedad. En una segunda etapa se adiciona trifluorometanosulfonato de trimetilsililo (TMSOTf), que actúa como catalizador en el proceso de glicosilación (Esquema 47).



**Esquema 47.** Glicosilación de **57** con bases pirimidínicas.

La reacción da lugar a mezclas de anómeros  $\alpha/\beta$  (**58/59**) con altos rendimientos (78-85%). La proporción para cada caso se calculó por HPLC, encontrándose que los anómeros  $\alpha$  se forman mayoritariamente. Esta preferencia posiblemente esté marcada por el impedimento estérico que supone la presencia de un grupo protector voluminoso como el *tert*-butildimetilsililo. La Tabla 14 recoge las proporciones de cada anómero en el crudo de la reacción de glicosilación, excepto en el caso de los anómeros de timina (entrada 2, Tabla 14) para los que no se encontró un método de separación adecuado en el HPLC y fue necesario calcular la proporción tras desproteger el grupo TBDMS.

**Tabla 14.** Datos de la reacción de glicosilación.

Entrada	Producto	Rendimiento (%)	Relación ( $\alpha:\beta$ ) <sup>a</sup>
1	<b>58a+59a</b>	85 <sup>b</sup>	2.3:1
2	<b>58b+59b</b>	78	2.0:1 <sup>c</sup>
3	<b>58c+59c</b>	82	2.0:1
4	<b>58d+59d</b>	83	2.7:1

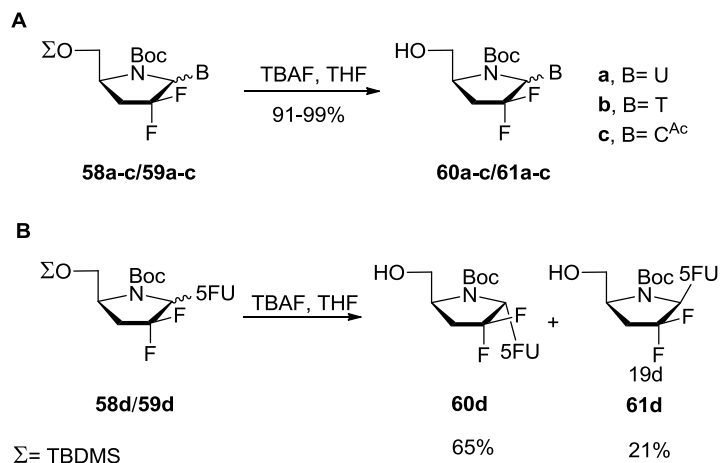
<sup>a</sup>Calculada en el crudo de glicosilación. <sup>b</sup>61% para **58a** y 24% para **59a**.

<sup>c</sup>Calculada tras desproteger el TBDMS.

## Resultados y discusión

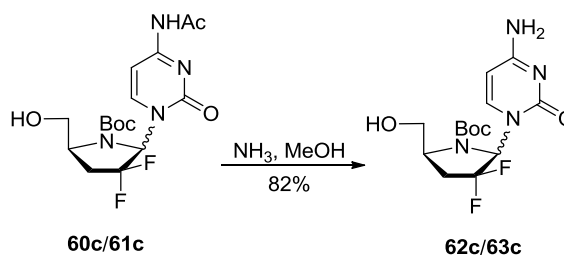
Sólo los isómeros derivados de uracilo **58a** y **59a** son separables por cromatografía de columna, mientras que el resto se obtiene como una mezcla no separable de anómeros. Por otra parte, los espectros de  $^1\text{H-RMN}$  presentan una baja resolución, por lo que resulta difícil la caracterización de los productos y la asignación de la configuración. Es por ello, que se decide eliminar el grupo TBDMS sin caracterización previa de los intermedios protegidos.

De este modo, tanto los anómeros puros **58a** y **59a** como las mezclas de anómeros **58c-d/59c-d** se tratan con una disolución de TBAF en THF (Esquema 48A). Tras la desprotección, los análogos de 5-fluorouracilo, que no eran separables cuando estaban protegidos, pasan a tener diferente polaridad y son fácilmente separables por cromatografía de columna, obteniéndose **60d** y **61d** con un 65% y 21% de rendimiento respectivamente (Esquema 48B). Por tanto, tras el proceso de dos etapas de glicosilación y desprotección del TBDMS los anómeros de uracilo (**60a** y **61a**) y 5-fluorouracilo (**60d** y **61d**) son separables, mientras que los nucleósidos de timina **60b/61b** y citosina **60c/61c** se obtienen como mezclas anoméricas.



**Esquema 48.** Desprotección de **58/59** con TBAF.

A continuación, se lleva a cabo la desprotección del grupo acetilo que actúa como protector del grupo amino de la base en el derivado de citosina. El tratamiento de **60c/61c** con una disolución saturada de amoníaco en metanol origina la mezcla de anómeros **62c/63c** con un 82% de rendimiento (Esquema 49).



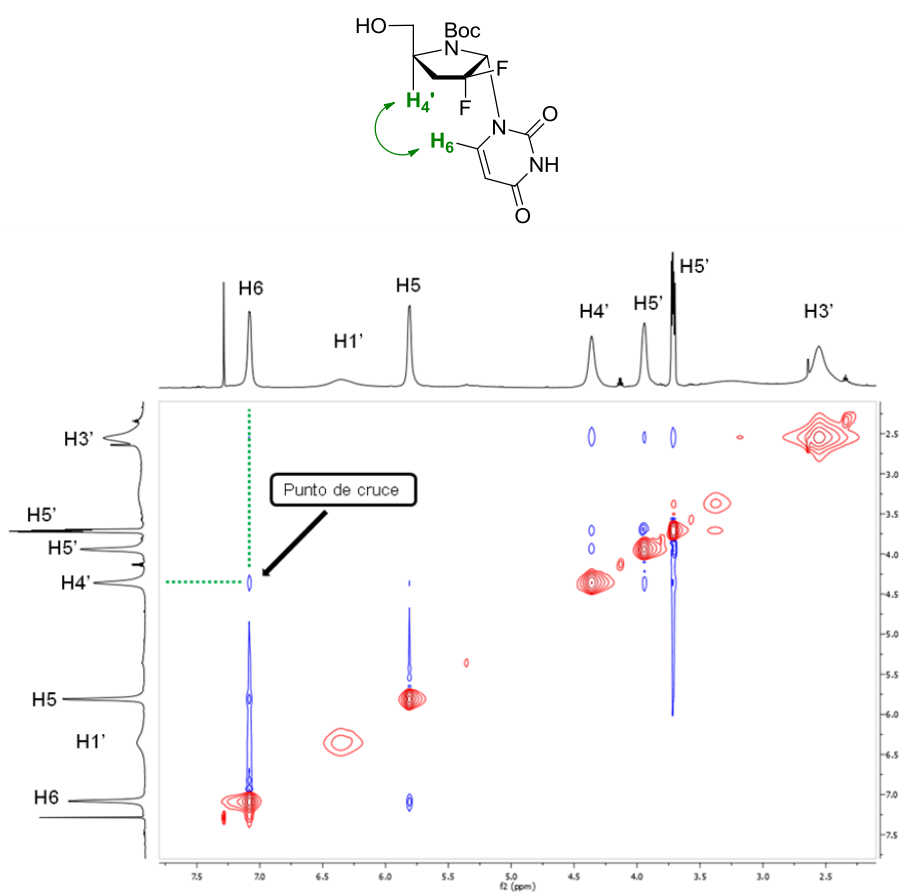
Esquema 49

Por último, el análogo de uracilo **60a** se trató con 2 equivalentes de TFA en diclorometano con la finalidad de desproteger el grupo Boc y obtener así el nucleósido completamente desprotegido. Sin embargo, el único producto aislado de la reacción fue uracilo, quedando patente que, a pesar de la estabilización del enlace glicosídico por parte de los dos átomos de flúor presentes en la posición 2', este enlace continúa siendo altamente inestable en 4'-azanucleósidos.

Los espectros de  $^1\text{H-RMN}$  de los nucleósidos desprovistos del grupo TBDMS presentan una mejor resolución. Ante los intentos fallidos de cristalización de los nuevos azanucleósidos sintetizados, la determinación de la estructura de cada nuevo compuesto se determinó por RMN bidimensional. Los puntos de cruce en el espectro COSY permitieron asignar cada protón, mientras que a partir de las correlaciones NOESY es posible determinar la estereoquímica del carbono anomérico, es decir, si el nucleósido en cuestión es  $\alpha$  o  $\beta$ .

Por ejemplo, en el espectro NOESY del nucleósido de uracilo **60a**, se observa un punto de cruce entre los protones H6 de la base nitrogenada y H4'. Esta correlación sólo es posible si el uracilo y el protón H4' están lo suficientemente cerca, es decir, se encuentran en una disposición relativa *cis*, lo que indica que la estructura se corresponde con la de un  $\alpha$ -nucleósido (Figura 51).

## Resultados y discusión



**Figura 51.** Espectro NOESY del compuesto **60a**.

Por otro lado, en el espectro NOESY de **61a**, se observan correlaciones entre uno de los protones H5' y H6 de la base nitrogenada; además, existe otro punto de cruce entre H1' y H4', lo que claramente indica una disposición relativa *cis* del grupo hidroximetilo y el uracilo, es decir, la estructura de un  $\beta$ -nucleósido (Figura 52).



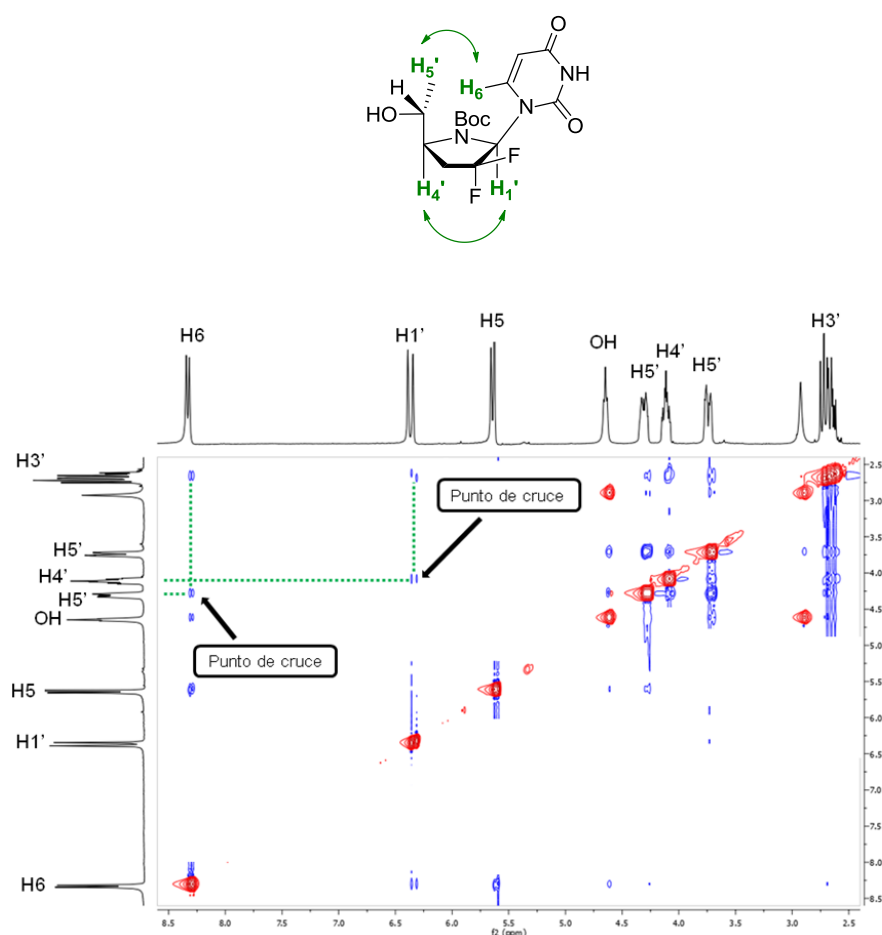


Figura 52. Espectro NOESY del compuesto **61a**.

### 5.3.3. SÍNTESIS DE 2',2'-DIFLUORO-4'-AZANUCLEÓSIDOS PÚRICOS

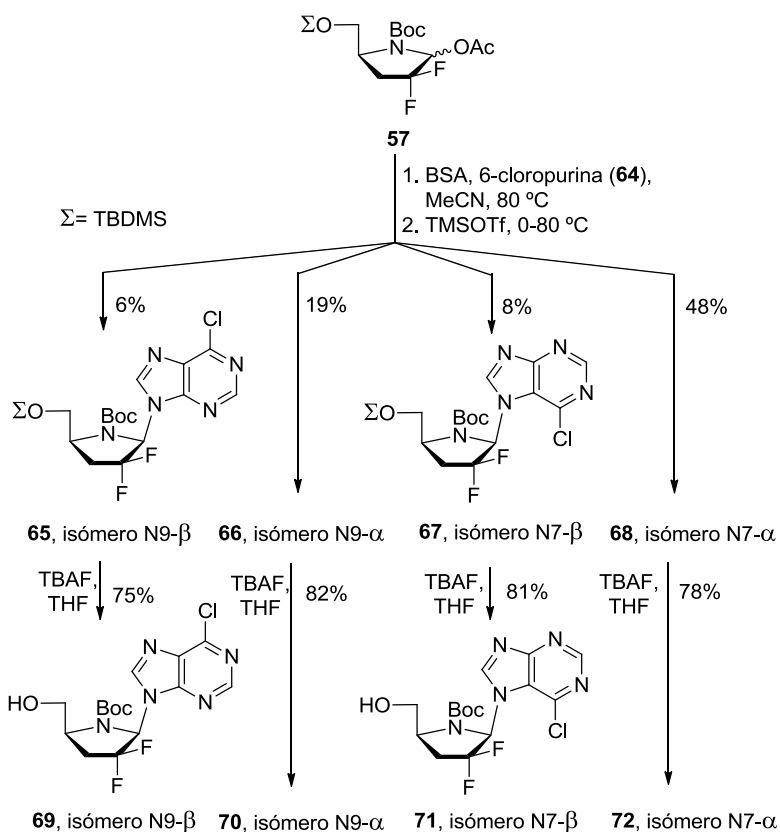
Seguidamente, debido a los buenos resultados obtenidos tras el acoplamiento con bases pirimidínicas y al escaso número de ejemplos de 4'-azanucleósidos de purina descritos en la bibliografía, decidimos llevar a cabo el acoplamiento de **57** con 6-cloropurina. Los nucleósidos resultantes darían los correspondientes derivados de adenina por reacción con amoniaco.

La glicosilación con bases púricas bajo las condiciones de Vorbruggen suele dar mezclas de isómeros, debido a que la base nitrogenada se une al azúcar por las posiciones N7 o N9. Teniendo

## Resultados y discusión

en cuenta que para cada regioisómero son posibles dos anómeros  $\alpha/\beta$ , pueden formarse cuatro compuestos.

En efecto, tras el acoplamiento entre **57** y 6-cloropurina (**64**), el análisis por CCF del crudo de reacción refleja la existencia de cuatro productos de glicosilación (**65-68**, Esquema 50). Sorprendentemente, para este caso particular, no sólo los anómeros  $\alpha/\beta$  muestran diferente polaridad sino que todos los isómeros presentan valores de  $R_f$  lo suficientemente diferentes para ser separados por cromatografía de columna. El análisis por espectrometría de masas muestra idéntica masa para cada uno de los compuestos. Para la caracterización de los productos, el grupo protector de silicio se desprotege en condiciones estándar con TBAF en THF, lo que origina **69-72** con buenos rendimientos (75-82%).



Esquema 50

La determinación de la estructura de cada uno de los cuatro isómeros se realizó mediante RMN bidimensional. Al igual que con

los derivados de pirimidina, a partir de las correlaciones encontradas en los espectros NOESY se asignó la estereoquímica del carbono anomérico. Por otro lado, las correlaciones  $^3J_{CH}$  propias de los espectros HMBC se utilizaron para averiguar si la 6-cloropurina se encuentra unida por la posición N7 o N9 al anillo de pirrolidina. Así, para el isómero N9- $\beta$  **69** se observa que los protones H2 y H8 junto con H1' muestran correlación con C4 de la purina. Este punto de cruce sólo es posible para los isómeros en los que la glicosilación se ha producido por la posición N9, ya que para el isómero N7- $\beta$  **71**, H2 y C5 se encuentran a una distancia de cuatro enlaces, no existiendo correlación entre ellos en el espectro HMBC. La Figura 53 muestra las correlaciones observadas en los isómeros **69** y **71**.

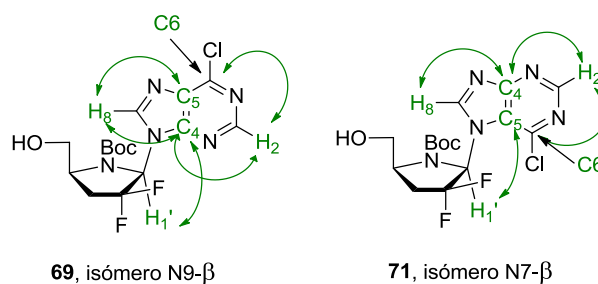
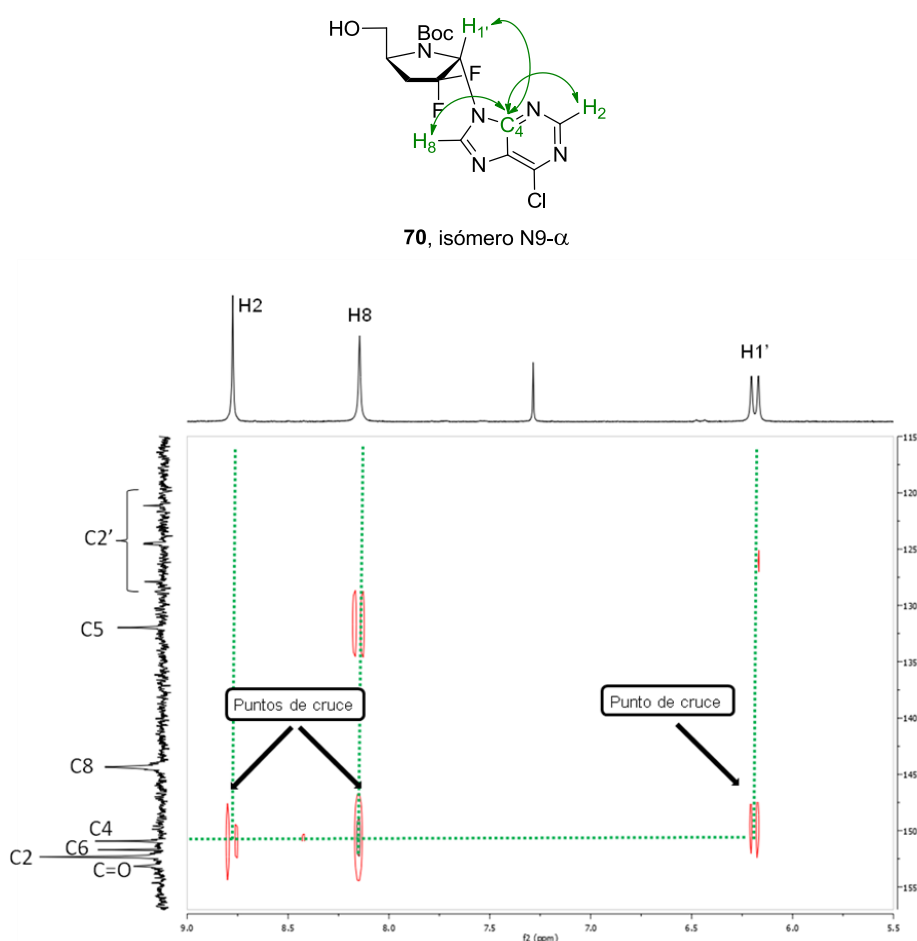


Figura 53. Correlaciones HMBC en **69** y **71**.

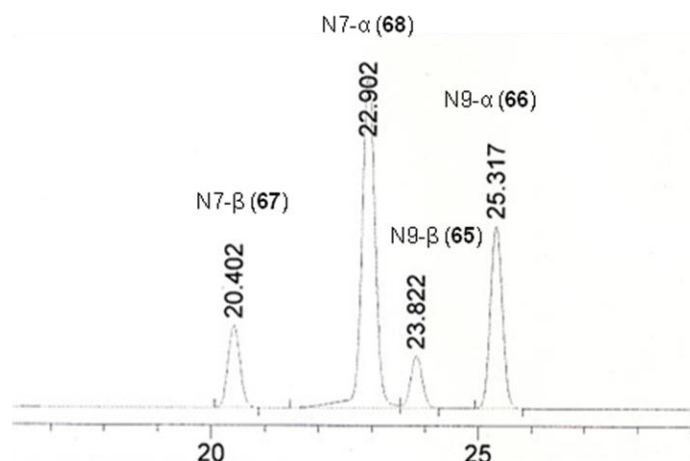
Los mismos patrones de correlación se observan para los correspondientes anómeros  $\alpha$ . La Figura 54 muestra el espectro HMBC del isómero N9- $\alpha$  **70** donde se encuentran resaltados los puntos de cruce ( $^3J_{CH}$ ) existentes entre H2, H8, H1' y C4 de la purina.

## Resultados y discusión



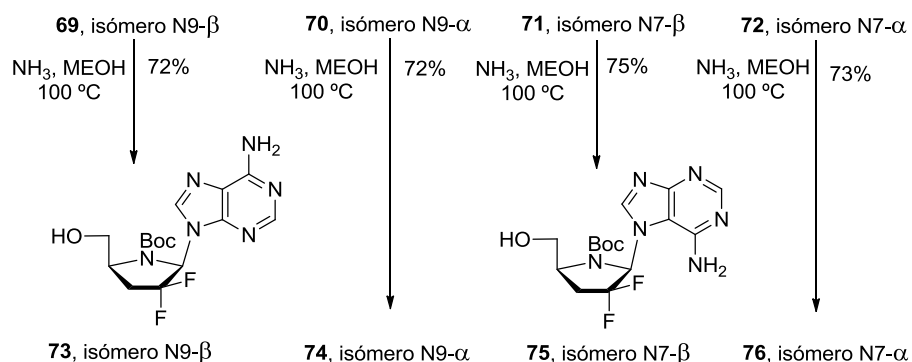
**Figura 54.** Ampliación del espectro HMBC del compuesto **70**.

Una vez conocida la estructura de cada uno de los isómeros obtenidos en la reacción de glicosilación, es posible calcular por HPLC la relación de productos (**65:66:67:68**, 8:27:12:53). Como ocurre tras el acoplamiento con pirimidinas, los anómeros  $\alpha$  son los mayoritarios. Además, los regioisómeros N7 –que son los favorecidos cinéticamente– se obtienen en mayor proporción frente a los N9 a pesar de incrementar la temperatura de la reacción hasta 80 °C. La Figura 55 recoge el cromatograma de HPLC del crudo de la reacción de glicosilación.



**Figura 55.** Cromatograma de HPLC correspondiente a la reacción de glicosilación entre **57** y 6-cloropurina (**64**).

Finalmente, los 4'-azanucleósidos de 6-cloropurina (**69-72**) se tratan a 100 °C en tubos sellados con una disolución saturada de NH<sub>3</sub> en metanol para obtener por sustitución nucleófila aromática los 4'-azanucleósidos de adenina **73-76** con altos rendimientos (72-75%) (Esquema 51).



**Esquema 51.** Síntesis de los 4'-azanucleósidos de adenina (**73-76**).

Cuando el proceso de glicosilación se lleva a cabo con 2,6-dicloropurina, hipoxantina y guanina se obtienen mezclas de isómeros no separables incluso después de la desprotección del TBDMS.

## Resultados y discusión

### 5.3.4. ENSAYOS BIOLÓGICOS DE LOS 2',2'-DIFLUORO-4'-AZANUCLEÓSIDOS SINTETIZADOS

Los nucleósidos sintetizados se sometieron a ensayos biológicos *in vitro* frente al VIH-I (más común e infeccioso que el VIH-II) en células de tipo PMB (*peripheral blood mononuclear cells*). La actividad se expresa como la concentración necesaria para inhibir la replicación del virus en un 50% (EC<sub>50</sub>) y en un 90% (EC<sub>90</sub>). Los derivados de timina (**60b/61b**) y de citosina (**62c/63c**) se ensayan como mezclas anoméricas no separables. Los resultados se encuentran recogidos en la Tabla 15. Como referencia se emplea el AZT.

**Tabla 15.** Actividad frente al VIH-I y citotoxicidad de los azanucleósidos (**60-76**).

Análogo	Base	Actividad anti-VIH en células PMB (EC <sub>50</sub> μM) <sup>a</sup>		Citotoxicidad (IC <sub>50</sub> μM) <sup>b</sup>		
		EC <sub>50</sub>	EC <sub>90</sub>	PMB	CEM	VERO
AZT	β-T	0.0017	0.0027	>100	14.3	56.0
<b>60a</b>	α-U	>100	>100	>100	>100	>100
<b>61a</b>	β-U	>100	>100	81.4	>100	44.4
<b>60b/61b</b>	α/β-T	>100	>100	>100	>100	>100
<b>62c/63c</b>	α/β-C	>100	>100	>100	>100	>100
<b>60d</b>	α-5-F-U	36.9	75.6	30.5	>100	>100
<b>61d</b>	β-5-F-U	44.5	90.8	28.2	>100	>100
<b>69</b>	N9-β-6-Cl-Pu	>100	>100	>100	57.1	>100
<b>70</b>	N9-α-6-Cl-Pu	64.5	>100	58.1	38.1	>100
<b>71</b>	N7-β-6-Cl-Pu	>100	>100	>100	>100	>100
<b>72</b>	N7-α-6-Cl-Pu	92.3	>100	59.5	55.4	>100
<b>73</b>	N9-β-A	>100	>100	>100	>100	>100
<b>74</b>	N9-α-A	>100	>100	>100	>100	>100
<b>75</b>	N7-β-A	>100	>100	>100	>100	>100
<b>76</b>	N7-α-A	>100	>100	>100	>100	>100

<sup>a</sup>El ensayo anti-VIH se realizó como se encuentra descrito en la referencia 155.

<sup>b</sup>Los ensayos de citotoxicidad se realizaron como describe la referencia 156.

<sup>156</sup> Schinazi, R. F.; Sommadossi, J. P.; Saalman, V.; Cannon, D. L.; Xie, M.-W.; Hart, G. C.; Smith, G. A.; Hahan, E. F.; *Antimicrob Agents Chemother.* **1990**, *34*, 1061-1067.

<sup>157</sup> Stuyver, L. J.; Lostia, S.; Adams, M.; Mathew, J.; Pai, B. S.; Grier, P.; Tharnish, P.; Choi, Y.; Chong, Y.; Chu, C. K.; Otto, M. J.; Schinazi, R. F. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46*, 3854-3860.

También se muestran los datos de citotoxicidad expresados como valores de  $IC_{50}$ , es decir, la concentración del compuesto necesaria para inhibir el 50% del crecimiento celular. Estos ensayos de citotoxicidad se realizaron en tres tipos de células diferentes: PMB, CEM (un tipo de células T linfoblásticas) y Vero (*African green monkey kidney cells*).

Se encuentra que cuatro nucleósidos son ligeramente activos cuando se comparan con el AZT. Los derivados de 5-fluorouracilo **60d** y **61d** muestran una apreciable actividad anti-VIH con valores de  $EC_{50}$  de 36.9 y 44.5  $\mu$ M, respectivamente. Estos nucleósidos son capaces de inhibir hasta el 90% de la replicación del virus en concentraciones inferiores a 100  $\mu$ M. De entre los derivados con bases púricas, los anómeros  $\alpha$  de 6-cloropurina **70** ( $EC_{50} = 64.5 \mu$ M) y **72** ( $EC_{50} = 92.3 \mu$ M) exhiben una ligera actividad antiviral. Es importante destacar que los anómeros  $\alpha$  muestran mejor actividad que sus homólogos  $\beta$ . El resto de los 4'-azanucleósidos sometidos a ensayo son inactivos frente a este virus.

Respecto a los efectos citotóxicos, los nucleósidos **60d**, **61d**, **70** y **72** muestran cierta toxicidad en células PMB. Los derivados de purina **69**, **70** y **72** son ligeramente tóxicos en las llamadas células CEM, mientras que el derivado de uracilo **61a** es el único que presenta toxicidad en células Vero.

Por último, se han realizado pruebas biológicas anti-HCV de los análogos sintetizados en este capítulo utilizando 2'-C-metilcitidina como referencia. Se ha encontrado que ninguno de ellos posee una actividad destacada frente a este virus en una concentración 10  $\mu$ M.<sup>158</sup>

---

<sup>158</sup> Los ensayos anti-HCV se realizaron según el procedimiento descrito en: Stuyer, L. J.; Whitaker, T.; McBrayer, T. C.; Hernández-Santiago, B. I.; Lostia, S.; Tharnish, P. M.; Ramesh, M.; Chu, C. K.; Jordan, T.; Shi, J.; Rachakonda, S.; Watanabe, K. A.; Otto, M. J.; Schinazi, R. F. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 244-254.





## **5.4.CONCLUSIONES**

Se ha descrito una síntesis muy eficiente de 2',3'-didesoxi-2',2'-difluoro-4'-azanucleósidos. Como sustrato de partida se utiliza el ácido L-pirolglutámico, sobre el que se realiza una difluoración electrofílica y posterior reacción de glicosilación con nucleobases pirimidínicas y púricas.

Los 2',3'-didesoxi-2',2'-difluoro-4'-azanucleósidos pirimidínicos se obtuvieron como mezclas de anómeros, siendo los  $\alpha$  los isómeros mayoritarios. Tras la posterior desprotección del TBDMS, las mezclas anoméricas de uracilo y 5-fluorouracilo se separan por cromatografía de columna, mientras que las de timina y citosina se obtienen como mezclas de anómeros no separables.

Por otro lado, el proceso de glicosilación con 6-cloropurina proporciona cuatro isómeros provenientes del acoplamiento por la posición N7 y N9 de la purina con sus correspondientes anómeros  $\alpha$  y  $\beta$ . Todos ellos son separables por cromatografía de columna y su estructura se determinó a partir del análisis de los espectros NOESY y HMBC. La reacción de cada uno de ellos con amoníaco da lugar a los derivados de adenina.

Se ha estudiado la actividad anti-VIH de los 4'-azanucleósidos sintetizados, encontrándose que los nucleósidos de  $\alpha$ -5-fluorouracilo ( $EC_{50} = 36.9 \mu\text{M}$ ),  $\beta$ -5-fluorouracilo ( $EC_{50} = 44.5 \mu\text{M}$ ) y N9- $\alpha$ -6-Cl-purina ( $EC_{50} = 64.5 \mu\text{M}$ ) son ligeramente activos, lo que justifica futuros trabajos sobre 4'-azanucleósidos fluorados, que no han sido lo suficientemente estudiados hasta la fecha.



## **5.5. PARTE EXPERIMENTAL**

### **5.5.1. DISOLVENTES Y REACTIVOS GENERALES**

Los reactivos, métodos generales y técnicas de análisis han sido detallados en capítulos anteriores. Los reactivos utilizados se adquirieron a Aldrich o Acros Organics. Los disolventes se secaron previamente a su utilización; en el caso del diclorometano y acetonitrilo el desecante fue el hidruro cálcico (CaH<sub>2</sub>).

### **5.5.2. TÉCNICAS DE ANÁLISIS**

Las técnicas de análisis han sido descritas en los capítulos anteriores con la excepción de los métodos cromatográficos particulares de este capítulo.

Así, tras la glicosilación, la proporción de cada anómero en las mezclas **58a/59a**, **58c/59c** y **58d/59d** se calculó por HPLC empleando una columna Agilent Poroshel 120 SB, C18, 2.7 μm (75 x 4.6 mm) y dos fases móviles (A: MeCN y B: H<sub>2</sub>O) con un gradiente que comienza con un 2.5% de B incrementándose de forma constante hasta un 95% en 5 min; el flujo es de 1 mL/min y la temperatura es de 30 °C. Para **58b/59b** no se encontró un método de separación adecuado y la proporción se calculó tras desprotección del TBDMS. Tras la glicosilación con 6-cloropurina la proporción de los compuestos **65-68** se determinó empleando una columna Mediterránea sea C18, 5 μm (250 x 46 mm), flujo 1.0 mL/min, temperatura 30 °C y un gradiente de eluyentes que empieza con un 60% de B, alcanzando a los 35 min el 100% de A. Los tiempos de retención en las condiciones expuestas son: **58a**= 6.92, **59a**= 6.86, **58c**=7.09, **59c**=7.02, **58d**= 6.84, **59d**=6.78, **65**= 23.8, **66**= 25.3, **67**= 20.4 y **68**= 22.9 min.

## Parte experimental

---

La pureza de los nucleósidos enviados a pruebas biológicas se calculó por HPLC siendo mayor del 95% para todos los casos. Se utilizó una columna Mediterránea sea C18, 5  $\mu\text{m}$  (250 x 46 mm), flujo 1.0 mL/min, temperatura 40 °C y dos fases móviles (A: 35% MeCN; B: 65% H<sub>2</sub>O), excepto para **53c/54c** donde se utilizó un 25% de A y 75% de B. Para los análogos de pirimidinas se encontraron los siguientes tiempos de retención: **60a**= 5.0, **61a**= 6.0, **60b**= 5.1, **61b**= 6.1, **62c**= 5.2, **63c**= 6.7, **60d**= 5.7, **61d**= 7.2 min; mientras que para los de purina son: **69**= 14.9, **72**= 11.3, **73**= 6.1, **74**= 5.35, **75**= 4.4, **76**= 3.8 min (no se determinó la pureza por HPLC de **69** y **71**).

### 5.5.3. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

#### Síntesis de (S)-piroglutaminol (**50**).

A una disolución de ácido L-piroglutámico (**49**) (6.0 g, 41.9 mmol) en MeOH a 0 °C se adiciona, gota a gota, SOCl<sub>2</sub> (4.9 g, 41.9 mmol) y la reacción se agita a t.a. durante 2 h. A continuación, se evaporan los disolventes para obtener el éster metílico correspondiente (5.2 g, 80%). Este aceite se disuelve en EtOH (80 mL) y se adiciona NaBH<sub>4</sub> (2.54 g, 67.0 mmol) durante 10 min. Tras 2 h de reacción, se acidula con HCl concentrado hasta pH 1. Los disolventes se evaporan y el residuo se purifica por cromatografía de columna (15% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) para dar **50** como un aceite incoloro (3.3 g, 28.5 mmol).

#### Síntesis de (5S)-2,2-dimetil-8-oxo-1-aza-3-oxa-biciclo[3.3.0]octano (**51**).

Una mezcla del compuesto **50** (3.3 g, 28.7 mmol), CSA (158 mg, 0.85 mmol) y 2,2-dimetoxipropano (12 mL) se refluxe durante 2 h. A continuación, los componentes volátiles se evaporan a vacío, se adiciona nuevamente 2,2-dimetoxipropano y se agita a reflujo durante 2 h. El proceso se repite un total de tres veces. Tras la evaporación final, el residuo resultante se purifica por cromatografía de columna (50% AcOEt/hexano) y posteriormente, se destila en alto vacío para dar **51** (3.67 g, 83%) como un aceite incoloro.

#### Síntesis de (5S)-7,7-difluoro-2,2-dimetil-8-oxo-1-aza-3-oxa-biciclo[3.3.0]octano (**52**).

Sobre una disolución de diisopropil amina (2.3 mL, 16.5 mmol) en THF anhidro a -78 °C se adiciona, gota a gota, *n*-BuLi (3.7 mL,

13.9 mmol). Tras 1 h de agitación a esta temperatura, se adiciona una disolución de **51** (1.8 g, 11.6 mmol) en THF anhidro (9 mL) y se deja reaccionar durante 1 h. A continuación, se añade una disolución de NFSI (5.19 g, 16.5 mmol) en THF anhidro (18 mL) y se agita durante 45 min adicionales. La reacción se detiene mediante la adición de una disolución saturada de NH<sub>4</sub>Cl. El THF se evapora a vacío y se extrae el residuo con AcOEt y agua. Las fases orgánicas se combinan, se secan sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y el AcOEt se evapora. El residuo se purifica por cromatografía de columna (gradiente de eluyentes 20-50% AcOEt/hexano) para proporcionar la lactama monofluorada como mezcla de diastereoisómeros (1.84 g, 92%). El mismo procedimiento se repite usando como sustrato de partida este producto monofluorado, obteniéndose el compuesto difluorado **52** (1.72 g, 85%) como un aceite amarillento.

#### **Síntesis de (5S)-3,3-difluoro-5-hidroxitil-2-pirrolidinona (53).**

El compuesto **52** (1.65 g, 8.37 mmol) se agita a 90 °C durante 14 h en una mezcla de ácido acético, acetonitrilo y agua (14:3:3) (20 mL). Tras la evaporación de disolventes, el residuo se purifica por cromatografía de columna (10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), obteniéndose **53** como un sólido blanco.

#### **Síntesis de (5S)-5-(*tert*-butildimetilsililoximetil)-3,3-difluoro-2-pirrolidinona (54).**

Sobre una disolución del compuesto **53** (960 mg, 6.39 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (40 mL) a 0 °C se añaden imidazol (566 mg, 8.31 mmol), DMAP (0.63 mmol, 78 mg) y TBDMSCl (1.25 g, 8.31 mmol). La reacción se agita a temperatura ambiente durante 30 min. A continuación, se adiciona agua y se extrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Las fases orgánicas se juntan, se secan sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evaporan. El residuo se purifica por cromatografía de columna (15% AcOEt/hexano) para obtener **54** (1.8 g, 87%) como un aceite viscoso e incoloro.

#### **Síntesis de (5S)-5-(*tert*-butildimetilsililoximetil)-*N*-*tert*-butiloxicarbonil-3,3-difluoro-2-pirrolidinona (55).**

A una disolución de **54** (854 mg, 3.21 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (28 mL) se adiciona Et<sub>3</sub>N (0.6 mL, 4.17 mmol), DMAP (427 mg, 3.53 mg) y Boc<sub>2</sub>O (1.41 mmol, 6.42 mmol). La reacción se agita a temperatura ambiente durante 30 min. Posteriormente, se evaporan los disolventes y el residuo resultante se purifica

## **Parte experimental**

---

mediante cromatografía de columna (10% AcOEt/hexano) para dar **55** (1.13 g, 96%) como un aceite viscoso e incoloro.

### **Síntesis de (5S)-5-(*tert*-butildimetilsililoximetil)-*N*-*tert*-butiloxicarbonil-3,3-difluoro-2-hidroxi-pirrolidina (**56**).**

LiEt<sub>3</sub>BH (504  $\mu$ L, 0.5 mmol) se añade, gota a gota, a una disolución del compuesto **55** (368 mg, 1.0 mmol) en THF anhidro (9.3 mL) a -78 °C. La reacción se agita durante durante 1 h. Transcurrido este tiempo se añade una nueva porción de LiEt<sub>3</sub>BH (504  $\mu$ L, 0.5 mmol) y se agita durante 1 h adicional. La reacción se detiene por adición de agua. A continuación, los disolventes se evaporan y el residuo se extrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Las fases orgánicas se juntan, se secan sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evaporan. El residuo se purifica por cromatografía de columna (30% AcOEt/hexano) para dar **56** (311 mg, 84%) como un aceite viscoso e incoloro (mezcla de anómeros en relación 4:1).

### **Síntesis de (5S)-2-acetiloxi-5-(*tert*-butildimetilsililoximetil)-*N*-*tert*-butiloxicarbonil-3,3-difluoro-pirrolidina (**57**).**

A una disolución de **56** (300 mg, 0.82 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (10 mL) se adiciona Et<sub>3</sub>N (3.4 mL, 2.5 mmol), Ac<sub>2</sub>O (1.2 mL, 12.0 mmol) y DMAP (catalítico). La reacción se agita a temperatura ambiente durante 30 min. A continuación, se evaporan los disolventes y el residuo se purifica por cromatografía de columna (20% AcOEt/hexano), obteniéndose **57** (332 mg, 100%) como un aceite viscoso e incoloro.

### **Procedimiento general para la glicosilación de **57** con bases pirimidínicas. Síntesis de **60a-d/61a-d**.**

A una disolución de **57** (0.3 mmol, 122 mg) y las diferentes bases nitrogenadas (1.2 mmol) en acetonitrilo anhidro (5 mL) se adiciona BSA (0.59 mL, 1.8 mmol). La reacción se agita a 80 °C durante 1 h. Posteriormente, se enfría a 0 °C y se adiciona, gota a gota, TMSOTf (0.17 mL, 0.83 mmol). Una vez terminada la adición, se vuelve a calentar a 80 °C durante 1 h. La reacción se detiene añadiendo Et<sub>3</sub>N (0.2 mL). A continuación, se evaporan los disolventes y el residuo se purifica por cromatografía de columna (gradiente de eluyentes 20-50% de AcOEt/hexano), obteniéndose los nucleósidos protegidos **58a-d/59a-d** con los rendimientos que indica la Tabla 14. Para llevar a cabo la desprotección del grupo TBDMS, estos nucleósidos -puros o como mezclas de anómeros- se

disuelven en THF anhidro (4 mL) y se tratan con 1.5 equiv de TBAF (1.0 M en THF) durante 2 h. Las reacciones se detienen por adición de agua, los disolventes se evaporan y la purificación se realiza mediante cromatografía de columna (gradiente de eluyentes 2-5% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) para obtener los 4'-azanucleósidos **60a-d/61a-d** con los rendimientos indicados en el Esquema 48.

**Síntesis de 1-[(2*S*,5*S*)-*N*-*tert*-butiloxicarbonil-3,3-difluoro-5-(hidroximetil)pirrolidin-2-il]citosina (**62c**) y *N*-[(2*R*,5*S*)-*N*-*tert*-butiloxicarbonil-3,3-difluoro-5-(hidroximetil)pirrolidin-2-il]citosina (**63c**).**

La mezcla de anómeros **60c/61c** (44 mg, 0.11 mmol) se disuelve en una disolución saturada de NH<sub>3</sub> en MeOH (3 mL). La reacción se agita durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se evapora el MeOH y el residuo se purifica por cromatografía de columna (5% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) para obtener **62c/63c** (32 mg, 82%).

**Procedimiento para la glicosilación de 57 con 6-cloropurina. Síntesis de 69-72.**

Se sigue un procedimiento similar al indicado en el apartado 5.5.3.9 pero partiendo de **57** (0.9 mmol, 366 mg) y 6-cloropurina (3.6 mmol, 554mg). Cuando termina la reacción se añade Et<sub>3</sub>N (0.6 mL) y se evaporan los disolventes. El residuo se purifica por cromatografía de columna (20% AcOEt/hexano), separándose cuatro fracciones –una para cada isómero– con los rendimientos mostrados en el Esquema 50. El tratamiento de cada isómero con 1.5 equiv de TBAF (1.0 M en THF) y posterior purificación por cromatografía de columna (gradiente de eluyentes 2-5% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) proporciona los nucleósidos **69-72** con los rendimientos que se indican en el Esquema 50.

**Procedimiento general para síntesis de 73-76.**

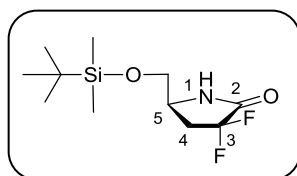
Los isómeros **69-72** (40 mg, 0.11 mmol) se disuelven en una disolución saturada de NH<sub>3</sub> en MeOH (3 mL) y la mezcla se calienta a 100 °C en un tubo sellado durante 2 h. La reacción se enfría, se evapora el MeOH y el residuo se purifica por cromatografía de columna (gradiente de eluyentes 5-10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) obteniéndose los nucleósidos de adenina **73-76** con los rendimientos que muestra el Esquema 51.

## Parte experimental

### 5.5.4. DATOS EXPERIMENTALES

A continuación se recogen detalladamente los datos experimentales que han permitido la caracterización de los productos sintetizados en este capítulo. Los compuestos **50**,<sup>154</sup> **51**, **52** y **53** han sido descritos con anterioridad.<sup>155</sup>

#### (5S)-5-(*tert*-butildimetilsililoximetil)-3,3-difluoro-2-pirrolidinona (**54**)



**Fórmula molecular:** C<sub>11</sub>H<sub>21</sub>F<sub>2</sub>NO<sub>2</sub>Si

**R<sub>f</sub>** (15% AcOEt/hexano): 0.23

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = + 35 (c 0.5, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

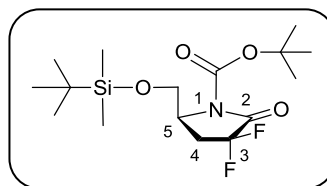
**<sup>1</sup>H RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 400.13 MHz):  $\delta$  0.05 (s, 6H, <sup>t</sup>Bu), 0.87 (s, 9H, <sup>t</sup>Bu), 2.29 (m, 1H, H3), 2.55 (m, 1H, H-3), 3.54 (dd, 1H, CH<sub>2</sub>O,  $J_{\text{HH}}$  6.2 Hz,  $J_{\text{HH}}$  10.3 Hz), 3.67 (dd, 1H, CH<sub>2</sub>O,  $J_{\text{HH}}$  4.4 Hz,  $J_{\text{HH}}$  10.4 Hz), 3.80 (m, 1H, H-5), 7.67 (sa, 1H, NH)

**<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 100.6 MHz):  $\delta$  5.4 (2CH<sub>3</sub>, <sup>t</sup>Bu), 18.4 (1C, <sup>t</sup>Bu), 26.0 (3CH<sub>3</sub>, <sup>t</sup>Bu), 33.1 (t, C-4,  $J_{\text{CF}}$  22.1 Hz), 50.7 (C-5), 65.1 (CH<sub>2</sub>O), 118.0 (t, C-3,  $J_{\text{CF}}$  249.5 Hz), 166.7 (t, C=O,  $J_{\text{CF}}$  31.2 Hz)

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): Calculada para C<sub>11</sub>H<sub>21</sub>F<sub>2</sub>NNaO<sub>2</sub>Si [M+Na]<sup>+</sup>: 288.1202. Encontrada: 288.1203



**(5S)-5-(tert-butildimetilsiloximetil)-N-tert-butiloxicarbonil-3,3-difluoro-2-pirrolidinona (55)**



**Fórmula molecular:** C<sub>16</sub>H<sub>29</sub>F<sub>2</sub>NO<sub>4</sub>Si

**R<sub>f</sub>** (20% AcOEt/hexano): 0.53

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = - 35 (c 0.5, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

**<sup>1</sup>H RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 400.13 MHz): δ 0.02 (s, 6H, <sup>t</sup>Bu), 0.85 (s, 9H, <sup>t</sup>Bu), 1.53 (s, 9H, <sup>t</sup>Bu), 2.48 (m, 2H, H-4), 3.70 (dd, 1H, CH<sub>2</sub>O, J<sub>HH</sub> 2.5 Hz, J<sub>HH</sub> 10.3 Hz), 3.83 (dd, 1H, CH<sub>2</sub>O, J<sub>HH</sub> 5.1 Hz, J<sub>HH</sub> 10.3 Hz), 4.22 (m, 1H, H-5)

**<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 100.6 MHz): δ 5.7 (<sup>t</sup>Bu), 18.4 (<sup>t</sup>Bu), 26.0 + 27.8 (<sup>t</sup>Bu + Boc), 31.0 (t, C-4, J<sub>CF</sub> 22.1 Hz), 53.4 (C-5), 62.3 (CH<sub>2</sub>O), 84.7 (Boc), 116.6 (t, C-3, J<sub>CF</sub> 251.0 Hz), 149.2 (C=O), 166.7 (t, C=O, J<sub>CF</sub> 32.2 Hz)

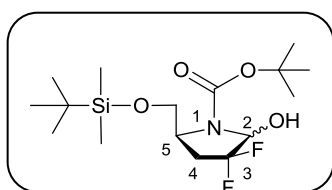
**EM** (ESI<sup>+</sup>, m/z): 382 [(M+NH<sub>4</sub>)<sup>+</sup>, 100%]; 388 [(M+Na)<sup>+</sup>, 10%]

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): Calculada para C<sub>16</sub>H<sub>29</sub>F<sub>2</sub>NNaO<sub>4</sub>Si [M+Na]<sup>+</sup>: 388.1726. Encontrada: 388.1727

**Parte experimental**

---

**(5S)-5-(*tert*-butildimetilsililoximetil)-*N*-*tert*-butiloxicarbonil-3,3-difluoro-2-hidroxi-pirrolidina (56)**



**Fórmula molecular:** C<sub>16</sub>H<sub>31</sub>F<sub>2</sub>NO<sub>4</sub>Si

**R<sub>f</sub>** (20% AcOEt/hexano): 0.51

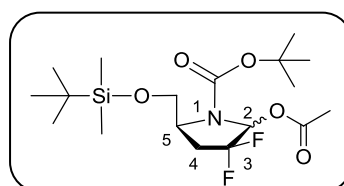
**<sup>1</sup>H RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 400.13 MHz): Isómero mayoritario δ 0.11 (s, 6H, <sup>t</sup>Bu), 0.91 (9H, <sup>t</sup>Bu), 1.48 (s, 9H, Boc), 2.45 (m, 2H), 3.39 (d, 1H, CH<sub>2</sub>O, J<sub>HH</sub> 10.2 Hz), 3.83 (d, 1H, CH<sub>2</sub>O, J<sub>HH</sub> 10.0 Hz), 4.07 (d, 1H, H-5, J<sub>HH</sub> 10.0 Hz), 5.16 (t, 1H, H-2, J<sub>HF</sub> 10.2 Hz). Isómero minoritario δ 0.11 (s, 6H, <sup>t</sup>Bu), 0.91 (9H, <sup>t</sup>Bu), 1.48 (s, 9H, Boc), 2.45 (m, 2H), 3.51 (d, 1H, CH<sub>2</sub>O, J<sub>HH</sub> 9.8 Hz), 3.69 (m, 1H, CH<sub>2</sub>O), 4.21 (m, 1H, H-5), 5.16 (m, 1H, H-2)

**<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 100.6 MHz): Isómero mayoritario δ 5.7 (<sup>t</sup>Bu), 18.5 (<sup>t</sup>Bu), 25.8 + 26.9 (<sup>t</sup>Bu + Boc), 28.6 (t, C-4, J<sub>CF</sub> 19.6 Hz), 55.7 (C-5), 61.7 (CH<sub>2</sub>O), 80.3-81.4 (C-2 + Boc), 124.4 (m, C-3), 153.1 (C=O). Isómero minoritario δ 5.7 (<sup>t</sup>Bu), 18.5 (<sup>t</sup>Bu), 25.8, 26.9 (<sup>t</sup>Bu + Boc), 33.0 (t, C-4, J<sub>CF</sub> 22.1 Hz), 55.8 (C-5), 63.4 (CH<sub>2</sub>O), 80.3-81.4 (C-2 + Boc), 124.4 (m, C-3), 153.4 (C=O)

**EM** (ESI<sup>+</sup>, m/z): 368 [(M+H)<sup>+</sup>, 10%]; 390 [(M+Na)<sup>+</sup>, 100%]

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): Calculada para C<sub>16</sub>H<sub>31</sub>F<sub>2</sub>NNaO<sub>4</sub>Si [M+Na]<sup>+</sup>: 390.1883. Encontrada: 388.1885

**(5S)-2-acetiloxi-5-(*tert*-butildimetilsililoximetil)-*N*-*tert*-butiloxycarbonil-3,3-difluoro-pirrolidina (57)**



**Fórmula molecular:** C<sub>18</sub>H<sub>33</sub>F<sub>2</sub>NO<sub>5</sub>Si

**R<sub>f</sub>** (20% AcOEt/hexano): 0.64

**<sup>1</sup>H RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 400.13 MHz): Baja resolución, no se distinguen los isómeros. δ 0.11 (s, 6H, <sup>t</sup>Bu), 0.95 (9H, <sup>t</sup>Bu), 1.47 (s, 9H, Boc), 2.08 (s, 3H, Ac), 2.45 (m, 2H), 3.77 (sa, 1H), 4.01 (sa, 2H), 6.49 (br s, 1H)

**<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 100.6 MHz): Las señales de los isómeros no se separan lo suficiente. δ 5.6 (<sup>t</sup>Bu), 18.5 (<sup>t</sup>Bu), 20.7 (Ac), 25.7 + 28.1 (<sup>t</sup>Bu + Boc), 32.5 (t, C-4, J<sub>CF</sub> 25.1 Hz), 56.2 (C-5), 61.4 (CH<sub>2</sub>O), 80.8-81.8 (C-2 + Boc), 124.4 (t, C-3, J<sub>CF</sub> 252.7 Hz), 152.9 (C=O), 168.8 (C=O)

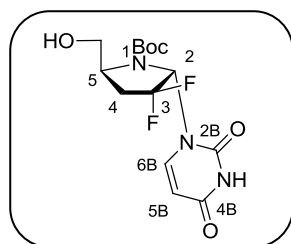
**EM** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*): 49 [(M+H)<sup>+</sup>, 10%]; 432 [(M+Na)<sup>+</sup>, 100%]

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): Calculada para C<sub>16</sub>H<sub>33</sub>F<sub>2</sub>NNaO<sub>5</sub>Si [M+Na]<sup>+</sup>: 432.1988. Encontrada: 432.2003

**Parte experimental**

---

**1-[(2*S*,5*S*)-*N*-*tert*-butiloxicarbonil-3,3-difluoro-5-(hidroximetil)pirrolidin-2-il]uracilo (60a)**



**Fórmula molecular:** C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>F<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>

**R<sub>f</sub>** (5% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.19

**Pf:** 82-85 °C (sólido blanco)

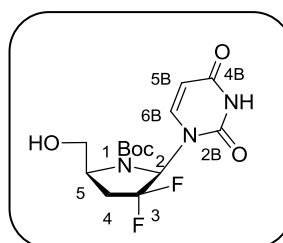
[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +18 (c 0.5, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

**<sup>1</sup>H RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 600.13 MHz, 328 K): δ 1.41 (s, 9H, Boc), 2.55 (m, 2H, H-4), 3.71 (dd, 1H, CH<sub>2</sub>O, *J*<sub>HH</sub> 6.2 Hz, *J*<sub>HH</sub> 11.1 Hz), 3.91 (s, 1H, CH<sub>2</sub>O), 4.36 (s, 1H, H-5), 5.75 (s, 1H, H-5B), 6.35 (sa, 1H, H-2), 7.09 (s, 1H, H-6B), 9.55 (sa, 1H, NH)

**<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 150.9 MHz, 328 K): δ 28.1 (Boc), 35.0 (C-4), 58.1 (C-5), 63.7 (CH<sub>2</sub>O), 70.6 (m, C-2), 83.4 (Boc), 101.6 (C-5B), 124.6 (C-3), 138.1 (C-6B), 150.2 (C-2B), 153.0 (C=O), 162.9 (C-4B)

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): Calculada para C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>F<sub>2</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>5</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 370.1185.  
Encontrada: 370.1186

**1-[(2*R*,5*S*)-*N*-*tert*-butiloxicarbonil-3,3-difluoro-5-(hidroximetil)pirrolidin-2-il]uracilo (61a)**



**Fórmula molecular:** C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>F<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>

**R<sub>f</sub>** (5% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.19

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -54 (c 0.5, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

**Pf:** 73-75 °C (sólido blanco)

**<sup>1</sup>H RMN** (acetona-*d*<sub>6</sub>, 300.13 MHz): δ 1.42 (s, 9H, Boc), 2.63 (m, 2H, H-4), 3.74 (ddd, 1H, CH<sub>2</sub>O, *J*<sub>HH</sub> 2.4 Hz, *J*<sub>HH</sub> 4.2 Hz, *J*<sub>HH</sub> 11.4 Hz), 4.10 (tt, 1H, H-5, *J*<sub>HH</sub> 2.7 Hz, *J*<sub>HH</sub> 8.1 Hz), 4.31 (m, 1H, CH<sub>2</sub>O), 4.64 (t, 1H, OH, *J*<sub>HH</sub> 4.4 Hz), 5.63 (d, 1H, H-5B, *J*<sub>HH</sub> 8.1 Hz), 6.36 (d, 1H, H-2, *J*<sub>HF</sub> 13.8 Hz), 8.33 (d, 1H, H-6B, *J*<sub>HH</sub> 8.1 Hz), 10.22 (sa, 1H, NH)

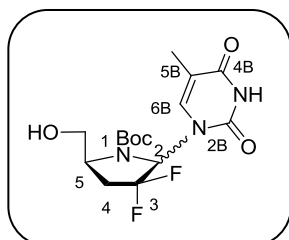
**<sup>13</sup>C NMR** (acetona-*d*<sub>6</sub>, 75.5 MHz) δ 27.3 (Boc), 33.1 (t, C-4, *J*<sub>CF</sub> 22.6 Hz), 54.1 (C-5), 57.1 (CH<sub>2</sub>O), 71.8 (m, C-2), 81.5 (Boc), 101.6 (C-5B), 124.5 (t, C-3, *J*<sub>CF</sub> 251.8 Hz), 140.1 (C-6B), 150.7 (C-2B), 153.6 (C=O), 162.6 (C-4B)

**EM** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*): 348 [(M+H)<sup>+</sup>, 100%]; 432 [(M+Na)<sup>+</sup>, 35%]

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): Calculada para C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>F<sub>2</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>5</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 370.1185.  
Encontrada: 370.1190

## Parte experimental

### 1-[(2*S*,5*S*)-*N*-*tert*-butiloxicarbonil-3,3-difluoro-5-(hidroximetil)pirrolidin-2-il]timina (**60b**) y 1-[(2*R*,5*S*)-*N*-*tert*-butiloxicarbonil-3,3-difluoro-5-(hidroximetil)pirrolidin-2-il]timina (**61b**)



**Fórmula molecular:** C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>F<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>

**R<sub>f</sub>** (5% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.22

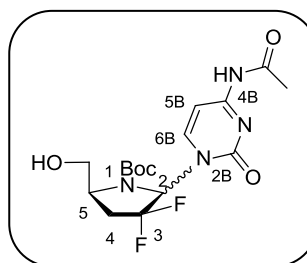
**<sup>1</sup>H RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 400.13 MHz): Isómero α (**60b**) δ 1.38 (s, 9H, Boc), 1.92 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.54 (m, 2H, H-4), 3.23 (s, 1H, OH), 3.71 (s, 1H, CH<sub>2</sub>O), 4.07 (s, 1H, CH<sub>2</sub>O), 4.35 (s, 1H, H-5), 6.35 (br s, H-2), 6.83 (1H, H-6B), 9.32 (sa, 1H, NH). Isómero β (**61b**) δ 1.42 (s, 9H, Boc), 1.90 (s, CH<sub>3</sub>), 2.54 (m, 2H, H-4), 3.15 (br s, 1H, OH), 3.77 (dd, 1H, CH<sub>2</sub>O, *J*<sub>HH</sub> 2.8 Hz, *J*<sub>HH</sub> 11.2 Hz), 4.10 (q, 1H, H-5, *J*<sub>HH</sub> 4.0 Hz), 4.26 (d, 1H, CH<sub>2</sub>O, *J*<sub>HH</sub> 11.2 Hz), 6.18 (d, 1H, H-2, *J*<sub>HF</sub> 13.2 Hz), 7.66 (s, 1H, H-6B), 9.24 (sa, 1H, NH)

**<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub> 100.6 MHz): Isómero α (**60b**) δ 12.3 (CH<sub>3</sub>), 27.3 (Boc), 35.1 (t, C-4, *J*<sub>CF</sub> 23.6 Hz), 58.1 (C-5), 63.8 (CH<sub>2</sub>O), 71.8 (m, C-2), 83.1 (Boc), 111.3 (C-5B), 123.8 (t, C-3, *J*<sub>CF</sub> 253.0 Hz), 133.3 (C-6B), 150.3 (C-2B), 153.1 (C=O), 163.5 (C-4B). Isómero β (**61b**) δ 12.3 (CH<sub>3</sub>), 27.3 (Boc), 34.2 (t, C-4, *J*<sub>CF</sub> 23.6 Hz), 57.1 (C-5), 62.1 (CH<sub>2</sub>O), 71.8 (m, C-2), 83.1 (Boc), 110.9 (C-5B), 123.8 (t, C-3, *J*<sub>CF</sub> 253.0 Hz), 136.3 (C-6B), 150.7 (C-2B), 154.3 (C=O), 163.8 (C-4B)

**EM** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*): 362 [(M+H)<sup>+</sup>, 25%]; 384 [(M+Na)<sup>+</sup>, 100%]

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): Calculada para C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>F<sub>2</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>5</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 384.1341.  
Encontrada: 384.1349

***N*-acetil-1-[(2*S*,5*S*)-*N*-*tert*-butiloxicarbonil-3,3-difluoro-5-(hidroximetil)pirrolidin-2-il]citosina (60c) y *N*-acetil-1-[(2*R*,5*S*)-*N*-*tert*-butiloxicarbonil-3,3-difluoro-5-(hidroximetil)pirrolidin-2-il]citosina (61c)**



**Fórmula molecular:** C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>F<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>

**R<sub>f</sub>** (70% AcOEt/hexane): 0.11

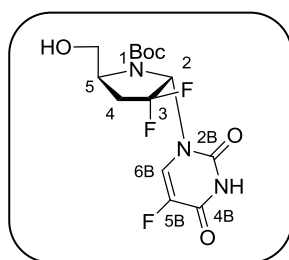
**<sup>1</sup>H RMN** (MeOH-*d*<sub>4</sub>, 300.13 MHz): Isómero α (**60c**) δ 1.33 (s, 9H, Boc), 2.21 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.61 (m, 2H, H-4), 3.58 (t, 1H, CH<sub>2</sub>O, *J*<sub>HH</sub> 8.7 Hz), 3.91 (s, 1H, CH<sub>2</sub>O), 4.33 (m, 1H, H-5), 6.45 (d, 1H, H-2, *J*<sub>HF</sub> 12.9 Hz), 7.46 (s, 1H, H-5), 7.92 (s, 1H, H-5). Isómero β (**61c**) δ 1.41 (s, 9H, Boc), 2.20 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.62 (m, 2H, H-4), 3.66 (d, 1H, CH<sub>2</sub>O, *J*<sub>HH</sub> 11.4 Hz), 4.07 (s, 1H, H-5), 4.30 (s, 1H, CH<sub>2</sub>O), 6.47 (d, 1H, H-2, *J*<sub>HF</sub> 12.9 Hz), 7.41 (d, 1H, H-5B, *J*<sub>HF</sub> 7.5 Hz), 8.76 (d, 1H, H-6B, *J*<sub>HF</sub> 7.5 Hz)

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): Calculada para C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>F<sub>2</sub>N<sub>4</sub>NaO<sub>5</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 411.1450.  
Encontrada: 411.1467

**Parte experimental**

---

**1-[(2*S*,5*S*)-*N*-*tert*-butiloxycarbonil-3,3-difluoro-5-(hidroximetil)pirrolidin-2-il]-5-fluorouracilo (60d)**



**Fórmula molecular:** C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>

**R<sub>f</sub>** (5% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.24

**Pf:** 61-63 °C (sólido blanco)

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +57 (c 0.5, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

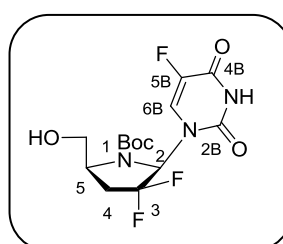
**<sup>1</sup>H RMN** (acetona-*d*<sub>6</sub>, 300.13 MHz): δ 1.39 (rotámeros, 9H, Boc), 2.75 (m, 2H, H-4), 3.55 (t, 1H, CH<sub>2</sub>O, *J*<sub>HH</sub> 6.2 Hz), 3.98 (d, 1H, CH<sub>2</sub>O, *J*<sub>HH</sub> 9.6 Hz), 4.43 (s, 1H, H-4), 6.30 (d, 1H, *J*<sub>HF</sub> 9.6 Hz), 7.84 (s, 1H, H-6)

**<sup>13</sup>C NMR** δ (acetona-*d*<sub>6</sub>, 75.5 MHz): 27.3 (Boc), 33.1 (t, C-4, *J*<sub>CF</sub> 23.4 Hz), 54.1 (C-5), 60.7 (CH<sub>2</sub>O), 70.9 (m, C-2), 81.5 (Boc), 123.2 (d, C-6B, *J*<sub>CF</sub> 36.2 Hz), 124.5 (t, C-3, *J*<sub>CF</sub> 249.8 Hz), 142.0 (d, C-5B, *J*<sub>CF</sub> 249.1 Hz), 149.2 (C-2B), 156.2, 156.6 (C-4 + C=O)

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): Calculada para C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>5</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 388.1091.  
Encontrada: 388.1108



**1-[(2*R*,5*S*)-*N*-*tert*-butiloxicarbonil-3,3-difluoro-5-(hidroximetil)pirrolidin-2-il]-5-fluorouracilo (61d)**



**Fórmula molecular:** C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>

**R<sub>f</sub>** (5% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.29

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -57 (c 0.5, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

**Pf:** 82-84 °C (sólido blanco)

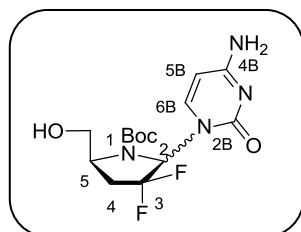
**<sup>1</sup>H RMN** (acetona-*d*<sub>6</sub>, 300.13 MHz): δ 1.44 (s, 9H, Boc), 2.75 (m, 2H, H-4), 3.72 (dd, 1H, CH<sub>2</sub>O, *J*<sub>HH</sub> 1.5 Hz, *J*<sub>HH</sub> 11.4 Hz), 4.12 (tt, 1H, H-5, *J*<sub>HH</sub> 2.1 Hz, *J*<sub>HH</sub> 8.4 Hz), 4.43 (tt, 1H, CH<sub>2</sub>O, *J*<sub>HH</sub> 2.7 Hz, *J*<sub>HH</sub> 11.4 Hz), 6.33 (d, 1H, H-2, *J*<sub>HF</sub> 13.8 Hz), 8.79 (d, 1H, H-6, *J*<sub>HF</sub> 7.5 Hz)

**<sup>13</sup>C NMR** (acetona-*d*<sub>6</sub>, 125.61 MHz): δ 27.3 (Boc), 33.1 (t, C-4, *J*<sub>CF</sub> 23.4 Hz), 54.1 (C-5), 57.1 (CH<sub>2</sub>O), 71.8 (m, C-2), 81.5 (Boc), 124.4 (d, C-6B, *J*<sub>CF</sub> 36.2 Hz), 124.5 (t, C-3, *J*<sub>CF</sub> 251.8 Hz), 142.0 (d, C-5B, *J*<sub>CF</sub> 231.8 Hz), 149.3 (C-2B), 156.3, 156.7 (C-4+C=O)

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): Calculada para C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>5</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 388.1091.  
Encontrada: 388.1085

## Parte experimental

### 1-[(2*S*,5*S*)-*N*-*tert*-butiloxicarbonil-3,3-difluoro-5-(hidroximetil)pirrolidin-2-il]citosina (**62c**) y *N*-[(2*R*,5*S*)-*N*-*tert*-butiloxicarbonil-3,3-difluoro-5-(hidroximetil)pirrolidin-2-il]citosina (**63c**)



**Fórmula molecular:** C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>F<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>

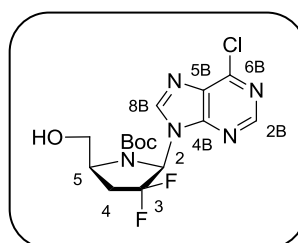
**R<sub>f</sub>** (70% AcOEt/hexane): 0.11

**<sup>1</sup>H RMN** (MeOH-*d*<sub>4</sub>, 300.13 MHz): Isómero α (**62c**) δ 1.39 (rotámeros, 9H, Boc), 2.59 (m, 2H, H-4), 3.52 (t, 1H, CH<sub>2</sub>O, *J*<sub>HH</sub> 8.7 Hz), 3.92 (s, 1H, CH<sub>2</sub>O), 4.32 (m, 1H, H-5), 5.96 (s, 1H, H-5), 6.45 (d, 1H, H-2, *J*<sub>HF</sub> 13.5 Hz), 7.45 (s, 1H, H-6). Isómero β (**63c**) δ 1.39 (rotámeros, 9H, Boc), 2.59 (m, 2H, H-4), 3.67 (dd, 1H, CH<sub>2</sub>O, *J*<sub>HH</sub> 2.1 Hz, *J*<sub>HH</sub> 11.4 Hz), 4.05 (tt, 1H, H-5, *J*<sub>HH</sub> 2.6 Hz, *J*<sub>HH</sub> 7.4), 4.26 (ddd, 1H, CH<sub>2</sub>O, *J*<sub>HH</sub> 2.3 Hz, *J*<sub>HH</sub> 11.4, *J*<sub>HH</sub> 11.6), 5.91 (d, 1H, H-5B, *J*<sub>HH</sub> 7.5 Hz), 6.40 (d, H-2, *J*<sub>HF</sub> 13.5 Hz), 8.29 (d, 1H, H-6B, *J*<sub>HH</sub> 9.1 Hz)

**<sup>13</sup>C NMR** (MeOH-*d*<sub>4</sub>, 75.5 MHz): Isómero α (**62c**) δ 27.4 (Boc), 34.2 (m, C-4), 57.0 (C-5), 61.0 (CH<sub>2</sub>O), 71.7 (m, C-2), 82.4 (Boc), 95.8 (C-5B), 124.5 (m, C-3), 141.5 (C-6B), 154.5 (C-2B), 157.3 (C=O), 166.7 (C-4B). Isómero β (**63c**) δ 27.4 (Boc), 34.2 (m, C-4), 57.4 (C-5), 60.2 (CH<sub>2</sub>O), 73.3 (m, C-2), 82.4 (Boc), 95.0 (C-5B), 124.5 (t, C-3, *J*<sub>CF</sub> 252.2 Hz), 139.9 (C-6B), 152.8 (C-2B), 157.3 (C=O), 166.5 (C-4B)

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): Calculada para C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>F<sub>2</sub>N<sub>4</sub>NaO<sub>4</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 369.1345.  
Encontrada: 369.1348

**9-[(2*R*,5*S*)-*N*-*tert*-butiloxicarbonil-3,3-difluoro-5-(hidroximetil)pirrolidin-2-il]-6-cloropurina (69)**



**Fórmula molecular:** C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>ClF<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>

**R<sub>f</sub>** (10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.52

**<sup>1</sup>H RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 400.13 MHz): δ 1.29 (9H, Boc), 2.64 (m, 1H, H-4), 2.99 (m, 1H, H-4), 3.84 (dd, 1H, CH<sub>2</sub>O, *J*<sub>HH</sub> 2.8 Hz, *J*<sub>HH</sub> 11.6 Hz), 4.24 (t, 1H, H-5, *J*<sub>HH</sub> 8.0 Hz), 4.46 (d, 1H, H-5, *J*<sub>HH</sub> 11.6 Hz), 6.45 (d, 1H, H-2, *J*<sub>HF</sub> 12.8 Hz), 8.77 (s, 1H, H-2B), 8.84 (s, 1H, H-8B)

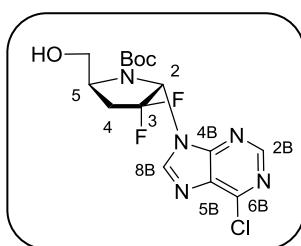
**<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 100.6 MHz): δ 27.9 (Boc), 33.5 (t, C-4, *J*<sub>CF</sub> 23.2 Hz), 57.7 (C-5), 61.6 (CH<sub>2</sub>O), 72.2 (m, C-2), 83.3 (Boc), 124.5 (t, C-3, *J*<sub>CF</sub> 225.9 Hz), 131.71 (C-5B), 144.2 (C-8B), 151.4 (C-4B), 151.6 (C-6B), 152.1 (C-2B), 153.8 (C=O)

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): Calculada para C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>ClF<sub>2</sub>N<sub>5</sub>NaO<sub>3</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 412.0958. Encontrada: 412.0969

**Parte experimental**

---

**9-[(2*S*,5*S*)-*N*-*tert*-butiloxycarbonil-3,3-difluoro-5-(hidroximetil)pirrolidin-2-il]-6-cloropurina (70)**



**Fórmula molecular:** C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>ClF<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>

**R<sub>f</sub>** (10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.52

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -12 (c 0.5, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

UV  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH) 265 nm (6866 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)

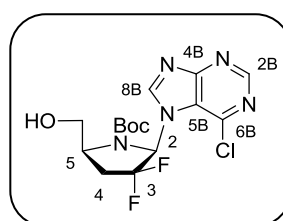
**Pf:** 64-66 °C (sólido blanco)

**<sup>1</sup>H RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  1.22 (rotámeros, 9H, Boc), 2.67 (m, 1H, H-4), 3.17 (m, 1H, H-4), 3.79 (dd, 1H, CH<sub>2</sub>O,  $J_{\text{HH}}$  5.7 Hz,  $J_{\text{HF}}$  10.5 Hz), 4.05 (dd, 1H, CH<sub>2</sub>O,  $J_{\text{HH}}$  5.7 Hz,  $J_{\text{HF}}$  11.1 Hz), 4.65 (s, 1H, H-4), 6.18 (d, 1H, H-2,  $J_{\text{HF}}$  10.5 Hz), 8.15 (s, 1H, H-2), 8.77 (s, 1H, H-8)

**<sup>13</sup>C NMR** (<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  27.9 (Boc), 33.5 (t, C-4,  $J_{\text{CF}}$  22.7 Hz), 58.9 (C-5), 64.5 (CH<sub>2</sub>O), 72.5 (m, C-2), 83.2 (Boc), 124.6 (t, C-3,  $J_{\text{CF}}$  254.4 Hz), 132.0 (C-5B), 144.4 (C-8B), 150.9 (C-4B), 151.7 (C-6B), 152.3 (C-2B), 153.2 (C=O)

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): Calculada para C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>ClF<sub>2</sub>N<sub>5</sub>NaO<sub>3</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 412.0958. Encontrada: 412.0963

**7-[(2*R*,5*S*)-*N*-*tert*-butiloxicarbonil-3,3-difluoro-5-(hidroximetil)pirrolidin-2-il]-6-cloropurina (71)**



**Fórmula molecular:** C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>ClF<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>

**R<sub>f</sub>** (10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.50

**<sup>1</sup>H RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 400.13 MHz): δ 1.31 (s, 9H, Boc), 2.55 (td, 1H, H-4, *J* 7.2, *J* 15.2), 2.89 (m, 1H, H-4), 3.85 (dd, 1H, CH<sub>2</sub>O, *J*<sub>HH</sub> 2.0 Hz, *J*<sub>HH</sub> 11.6 Hz), 4.16 (t, 1H, H-5, *J*<sub>HH</sub> 6.2 Hz), 4.69 (d, 1H, *J*<sub>HH</sub> 11.6 Hz), 6.88 (d, 1H, H-2, *J*<sub>HF</sub> 12.0 Hz), 8.77 (s, 1H, H-2B), 8.84 (s, 1H, H-8B)

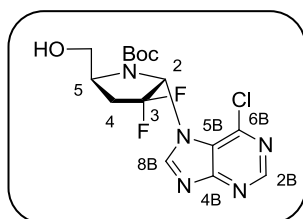
**<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 100.6 MHz): δ 27.9 (Boc), 33.5 (t, C-4, *J*<sub>CF</sub> 23.6 Hz), 57.4 (C-5), 60.2 (CH<sub>2</sub>O), 72.2 (m, C-2), 83.3 (Boc), 122.5 (C-5B), 123.3 (t, C-3, *J*<sub>CF</sub> 254.5 Hz), 143.1 (C-4B), 147.4 (C-8B), 152.7 (C-2B), 153.5 (C=O), 161.8 (C-6B)

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): Calculada para C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>ClF<sub>2</sub>N<sub>5</sub>NaO<sub>3</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 412.0958. Encontrada: 412.0943

**Parte experimental**

---

**7-[(2*S*,5*S*)-*N*-*tert*-butiloxicarbonil-3,3-difluoro-5-(hidroximetil)pirrolidin-2-il]-6-cloropurina (72)**



**Fórmula molecular:** C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>ClF<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>

**R<sub>f</sub>** (10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.47

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +9 (c 0.5, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

UV λ<sub>max</sub> (MeOH) 270 nm (6616 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)

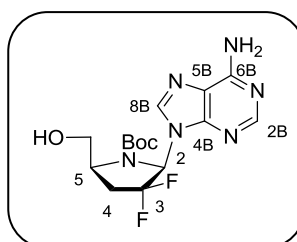
**Pf:** 76-78 °C (sólido blanco)

**<sup>1</sup>H RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 400.13 MHz): δ 1.23 (rotámeros, 9H, Boc), 2.67 (m, 2H, H-4), 3.28 (sa, 1H, OH), 3.79 (m, 1H, CH<sub>2</sub>O), 4.11 (m, 1H, CH<sub>2</sub>O), 4.51 (s, 1H, H-4), 6.83 (d, 1H, H-2, J<sub>HF</sub> 9.2 Hz), 8.30 (s, 1H, H-8B), 8.91 (s, 1H, H-2B)

**<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 27.7 (Boc), 33.7 (t, C-4, J<sub>CF</sub> 22.7 Hz), 57.6 (C-5), 63.0 (CH<sub>2</sub>O), 72.4 (m, C-2), 83.7 (Boc), 122.7 (C-5B), 124.2 (t, C-3, J<sub>CF</sub> 254.4 Hz), 143.2 (C-4B), 144.8 (C-8B), 152.5 (C=O), 152.8 (C-2B), 161.8 (C-6B)

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): Calculada para C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>ClF<sub>2</sub>N<sub>5</sub>NaO<sub>3</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 412.0958. Encontrada: 412.0970

**9-[(2*R*,5*S*)-*N*-*tert*-butiloxicarbonil-3,3-difluoro-5-(hidroximetil)pirrolidin-2-il]-adenina (73)**



**Fórmula molecular:** C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>F<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>

**R<sub>f</sub>** (10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.31

**<sup>1</sup>H RMN** (THF-*d*<sub>8</sub>, 400.13 MHz): δ 1.25 (s, 9H, Boc), 2.60 (m, 1H, H-4), 3.01 (m, 1H, H-4), 3.70 (d, 1H, CH<sub>2</sub>O, *J*<sub>HH</sub> 10.8 Hz), 4.07 (m, 1H, H-5), 4.28 (d, 1H, CH<sub>2</sub>O, *J*<sub>HH</sub> 10.4 Hz), 4.67 (br s, 1H, OH), 6.40 (d, 1H, H-2, *J*<sub>HF</sub> 13.6 Hz), 6.47 (sa, 2H, NH<sub>2</sub>), 8.14 (s, 1H, H-2 ó H-8), 8.39 (s, 1H, H-8 ó H-2)

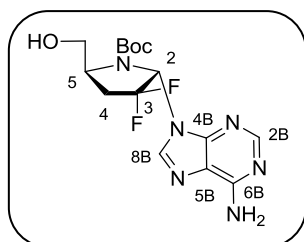
**<sup>13</sup>C NMR** (THF-*d*<sub>8</sub>, 100.6 MHz): δ 25.3 (Boc), 31.4 (t, C-4, *J*<sub>CF</sub> 11.3 Hz), 57.7 (C-5), 58.9 (CH<sub>2</sub>O), 69.0 (m, C-2), 79.2 (Boc), 117.7 (C-5B), 122.5 (t, C-3, *J*<sub>CF</sub> 252.3 Hz), 136.8 (C-8B), 148.3 (C-4B), 150.8 (C-2), 151.7 (C-6B), 161.8 (C=O)

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): Calculada para C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>F<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 371.1638.  
Encontrada: 371.1642

**Parte experimental**

---

**9-[(2*S*,5*S*)-*N*-*tert*-butiloxicarbonil-3,3-difluoro-5-(hidroximetil)pirrolidin-2-il]-adenina (74)**



**Fórmula molecular:** C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>F<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>

**R<sub>f</sub>** (10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.29

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -2 (c 0.5, MeOH)

UV λ<sub>max</sub> (MeOH) 260 nm (8975 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)

**Pf:** 105-107 °C (sólido blanco)

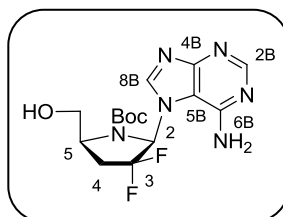
**<sup>1</sup>H RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 400.13 MHz): δ 1.16 (rotámeros, 9H, Boc), 2.58 (t, 1H, H-4, J<sub>HH</sub> 15.2 Hz), 3.15 (m, 1H, H-4), 3.75 (dd, 1H, CH<sub>2</sub>O, J<sub>HH</sub> 6.4 Hz, J<sub>HH</sub> 10.9 Hz), 4.05 (dd, 1H, CH<sub>2</sub>O, J<sub>HH</sub> 5.2 Hz, J<sub>HH</sub> 10.9 Hz), 4.63 (s, 1H, H-5), 6.07 (d, 1H, H-2, J<sub>HF</sub> 9.6 Hz), 6.13 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.81 (s, 1H, H-2 ó H-8), 8.33 (s, 1H, H-8 ó H-2)

**<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 27.7 (Boc), 34.3 (t, C-4, J<sub>CF</sub> 22.5 Hz), 58.5 (C-5), 63.9 (CH<sub>2</sub>O), 71.8 (m, C-2), 82.6 (Boc), 119.5 (C-5B), 124.8 (t, C-3, J<sub>CF</sub> 252.3 Hz), 139.4 (C-8B), 149.3 (C-4B), 153.3, 155.8 (C-2B + C-6B + C=O), 151.7 (C-6B), 161.8 (C=O)

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): Calculada para C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>F<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 371.1638.  
Encontrada: 371.1628



**7-[(2*R*,5*S*)-*N*-*tert*-butiloxicarbonil-3,3-difluoro-5-(hidroximetil)pirrolidin-2-il]-adenina (75)**



**Fórmula molecular:** C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>F<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>

**R<sub>f</sub>** (10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.29

**Pf:** 225-227 °C (sólido blanco)

**<sup>1</sup>H RMN** (THF-*d*<sub>8</sub>, 300.13 MHz): δ 1.29 (s, 9H, Boc), 2.68 (m, 2H, H-4), 3.63 (d, 1H, CH<sub>2</sub>O, *J*<sub>HH</sub> 11.1 Hz), 4.06 (m, 2H, CH<sub>2</sub>O + H-5), 5.38 (t, 1H, OH, *J*<sub>HH</sub> 9.6 Hz), 6.75 (d, 1H, H-2, *J*<sub>HF</sub> 10.5 Hz), 6.87 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 8.24 (s, 1H, H-2 ó H-8), 8.86 (s, 1H, H-8 ó H-2)

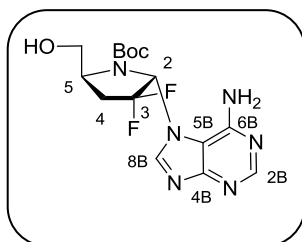
**<sup>13</sup>C NMR** (MeOH-*d*<sub>4</sub>, 75.5 MHz): δ 28.0 (Boc), 31.4 (t, C-4, *J*<sub>CF</sub> 22.3 Hz), 57.4 (C-5), 60.2 (CH<sub>2</sub>O), 73.7 (m, C-2), 81.9 (Boc), 111.4 (C-5B), 124.6 (t, C-3, *J*<sub>CF</sub> 252.9 Hz), 143.5 (C-8B), 151.6 (C-4B), 152.9 (C-2B), 153.8, 160.4 (C-6B + C=O)

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): Calculada para C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>F<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 371.1638.  
Encontrada: 371.1648

**Parte experimental**

---

**7-[(2*S*,5*S*)-*N*-*tert*-butiloxicarbonil-3,3-difluoro-5-(hidroximetil)pirrolidin-2-il]-adenina (76)**



**Fórmula molecular:** C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>F<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>

**R<sub>f</sub>** (10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.29

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +29 (c 0.5, MeOH)

UV  $\lambda_{\text{max}}$  (MeOH) 275 nm (4644 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)

**Pf:** 206-208 °C (sólido blanco)

**<sup>1</sup>H RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz)  $\delta$  1.56 (rotámeros, 9H, Boc), 2.80 (m, 2H, H-4), 3.61 (t, 1H, CH<sub>2</sub>O,  $J_{\text{HH}}$  9.9 Hz), 4.03 (d, 1H, CH<sub>2</sub>O,  $J_{\text{HH}}$  9.0 Hz), 4.52 (s, 1H, H-5), 6.68 (d, 1H, H-2,  $J_{\text{HF}}$  9.3 Hz), 8.33 (s, 1H, H-2 ó H-8), 8.54 (s, 1H, H-8 ó H-2)

**<sup>13</sup>C NMR** (MeOH-*d*<sub>4</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  26.6 (Boc), 33.9 (m, C-4), 56.9 (C-5), 60.3 (CH<sub>2</sub>O), 72.1 (m, C-2), 82.1 (Boc), 111.4 (C-5B), 124.6 (t, C-3,  $J_{\text{CF}}$  256.7 Hz), 142.6 (C-8B), 151.8, 152.1 (C-4B ó C=O ó C-6B), 152.6 (C-2B), 158.9 (C-4B ó C=O ó C-6B)

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): Calculada para C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>F<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 371.1638.  
Encontrada: 371.1628

## **CHAPTER 6**

**DESIGN AND DIVERGENT SYNTHESIS OF  
NOVEL AZANUCLEOSIDES FROM AN  
IMINOSUGAR: POTENTIAL INHIBITORS OF  
GLYCOSIDASES AND PURINE NUCLEOSIDE  
PHOSPHORILASE**



## **6.1. BACKGROUND**

The importance of nucleic acids as targets in the search for efficient drugs has already been exposed in previous Chapters. In addition, other biopolymers such as carbohydrates are also attractive as essential targets for the design of effective therapies. In the form of oligosaccharides, polysaccharides and their glycoconjugates are critical for the survival of an organism. They act as structural supports, energy reservoirs, and also form architectures for intra- and intercellular recognitions events.<sup>159</sup> The diverse roles displayed by this class of natural products in the biological systems provide an opportunity for the identification of chemotherapeutics able to interfere in these functions.

---

<sup>159</sup> a) Sinnot, M. L. *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 1171-1202. b) Yipentet, V. L.; Withers, S. G. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 2702-1713. c) Davies, G. J.; Gloster, T. M.; Henrissat, B. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2005**, *15*, 637-645.

## Background

---

### 6.1.1. BIOCHEMICAL FUNCTIONS OF GLYCOSIDASES

The biological activity of glycosidases involves the intestinal digestion of carbohydrates, glycogen phosphorylation,<sup>160</sup> and co- and post-translational processing of *N*- and *O*-linked glycoproteins.<sup>161</sup>

Glycosidases are placed in the cell membranes of the small intestine where they hydrolyze the oligosaccharides ingested in the diet to the more simple monosaccharides that are then absorbed into the blood. Thus, by inhibiting the action of this class of metabolic enzymes, it is possible to take control over glucose concentration in blood and therefore to treat metabolic disorders such as diabetes,<sup>162</sup> that currently affects approximately 250 million people worldwide.

On the other hand, it is well known that cancer cells present high levels of glycoproteins, whose synthesis is controlled by glycosidases. In addition, the coupling of some viruses to animal cells is related to the presence in the cell surface of these *N*- and *O*-linked glycoproteins which act as receptors interacting with the viral particles, allowing cellular infections. Therefore, compounds able to inhibit these enzymes are potential anticancer and antiviral agents.

Two mechanisms are accepted for the glycosidase catalyzed hydrolysis of carbohydrates through inversion or retention of the configuration.<sup>163</sup> The reaction mechanism of inverting glycosidases is represented in Scheme 52. Two carboxyl groups are located within the active site, one acting as an acid that protonates the exocyclic glycosidic bond, meanwhile the other one acts as a carboxylate that enhances the nucleophilic character of the water. For the retaining glycosidases the mechanism is similar, with the only difference that two substitution reactions occur in the process. Thus, in both cases, the reaction proceeds via an oxycarbenium-like transition state. It is remarkable the selectivity showed by these enzymes, hydrolyzing specific class of carbohydrates. In addition, although some exceptions were found, they typically can

---

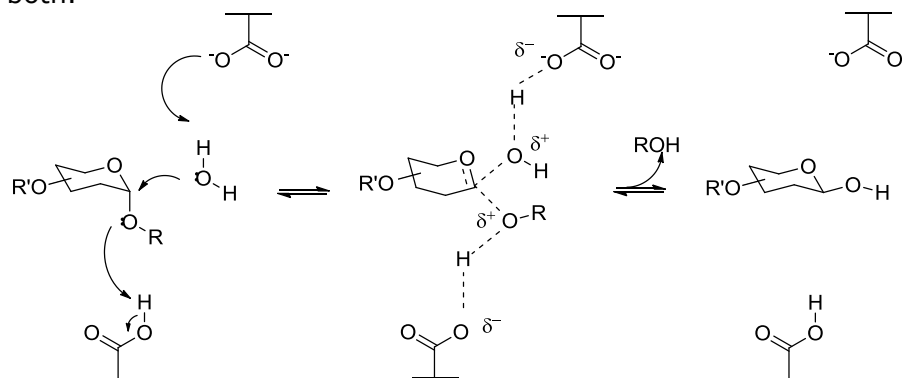
<sup>160</sup> Baker, D. J.; Greenhaff, P. L.; Timmons, J. A. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2006**, *16*, 459-466.

<sup>161</sup> Spiro, R. G. In *Carbohydrates in Chemistry and Biology*. Vol 3: Biosynthesis and degradation of glyconjugates. Ernst, B.; Hart, G. W.; Sinay, P., Ed. Wiley-VCH Verlag GmbH: Weinheim, Germany, 2000, 67-79.

<sup>162</sup> Rinhehart, B. L.; Robinson, K. M.; Liu, P. S.; Payne, A. J.; Wheatley, M. E.; Wagner, S. R. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1987**, *241*, 915-920

<sup>163</sup> Rye, C. S.; Withers, S. G. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 573-580.

act either on  $\alpha$  and on  $\beta$ -glycosidic glycosidic bonds but not on both.



**Scheme 52.** Accepted hydrolysis mechanism for inverting glycosidases.

## 6.1.2. IMINOSUGARS AS GLYCOSIDASE INHIBITORS

### 6.1.2.1. Therapeutic applications of iminosugars

The replacement of the ring oxygen atom by nitrogen in carbohydrates is a modification that has been designed by Nature itself, providing analogs known as iminosugars or azasugars. Polyhydroxylated alkaloids such as 1-deoxynojirimycin (DNJ, Figure 56) are widespread in plants and microorganisms.<sup>164</sup> These compounds are potent glycosidase inhibitors and both natural and synthetic derivatives have been extensively studied.<sup>165</sup>

The high affinity of azasugars for glycosidases results from their ability to become protonated, mimicking the oxocarbenium ion-like transition state of carbohydrate-processing enzymes.<sup>166</sup>

<sup>164</sup> Asano, N. *Curr. Top. Med. Chem.* **2003**, *3*, 471-484. b) Watson, A. A.; Fleet, G. W. J.; Asano, N.; Molyneux, R. J.; Nash, R. J. *Phytochemistry* **2001**, *56*, 265-295.

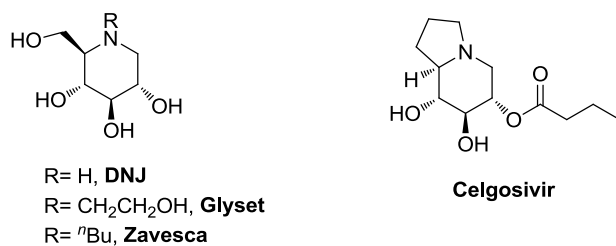
<sup>165</sup> a) Horne, G.; Wilson, F. X.; Tinsley, J.; Williams, D. H.; Storer, R. *Drug Disc. Today* **2011**, *16*, 107-118. b) Winchesterm B. G. *Tetrahedron: Assymetry* **2009**, *20*, 645-651. c) Compain, P.; Martin, O. R. *Iminosugars: From Synthesis to Therapeutic Applications*, Wiley-VCH: New York, 2007. d) Elbein, A. D.; Molyneux, R. J. in *Iminosugars as Glycosidase Inhibitors*; Stutz, A. E.; Ed. Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 1999, 216-251.

<sup>166</sup> For a review see: Lillelund, V. H.; Jensen, H. H.; Liang, X.; Bols, M. *Chem Rev.* **2002**, *102*, 515-551.

## Background

Accordingly, they have been intensively evaluated for antiviral,<sup>167</sup> anticancer,<sup>168</sup> and antidiabetic properties.<sup>169</sup>

Some iminosugar based drugs have already achieved market success: Glyset was approved for the treatment of noninsulin-dependent diabetes and Zavesca was licensed for use in treatment of Gaucher's disease (Figure 56). Both are closely related to the naturally occurring iminosugar (DNJ) which was safe and well tolerated in Phase I of clinical trials for the treatment of Pompe disease (glycogen storage caused by a deficiency in the enzyme  $\alpha$ -glucosidase) but failed in Phase II because of adverse effects. The use of these three compounds as therapeutics as well those under clinical trials -for instance, the promising anti-HCV agent Celgosivir- has been reviewed.<sup>164a</sup>



**Figure 56.** Therapeutic iminosugars.

### 6.1.2.2. Polyhydroxylated pyrrolidines as potent glycosidase inhibitors

Polyhydroxypyrrolidines (also known as iminocyclitols) have attracted much attention due to their very broad spectrum of biological activities.<sup>170</sup> Figure 57 shows naturally occurring 3,4-dihydroxy-2,5-bis(hydroxymethyl)pyrrolidine (DMDP), a strong inhibitor of  $\alpha$ - and  $\beta$ -glucosidases. The synthetic analog on its right, **77**, is a potent inhibitor of  $\alpha$ -fucosidase, meanwhile **78**

<sup>167</sup> a) Inmaculada, R.; Moreno-Vargas, A. J.; Carmona, A. T.; Vogel, P. *Curr. Drug. Metabol.* **2004**, *5*, 329-361. b) Bock, T. M.; Jordan R. *Antiviral Chem. Chemotherapy* **2001**, *12*, 317-325.

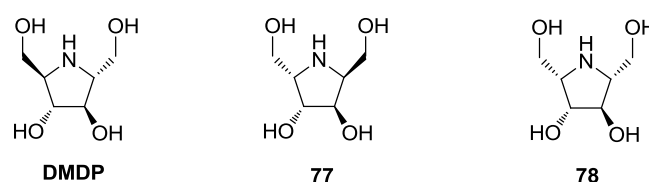
<sup>168</sup> a) Gerber-Lemaire, S.; Juillerat-Jeanneret, L. *Mini Rev. Med. Chem.* **2006**, *6*, 1043-1052.

<sup>169</sup> a) Jakobsen, P.; Lundbeck, J. M.; Kristiansen, M.; Breinholt, J.; Demuth, H.; Pawlas, J.; Candela, M. P.; Andersen, B.; Westergaard, N.; Lundgren, K.; Asano, N. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 733-744. b) Gravier-Pelletier, C.; Maton, W.; Le Merrer, Y. L. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 8285-8288.

<sup>170</sup> a) Asano, N. *Glycobiology* **2003**, *13*, 93R-104R. b) Nishimura, Y. *Curr. Top. Med. Chem.* **2003**, *3*, 575-591. c) Wrodnigg, T. M. *Monatsh. Chem.* **2002**, *133*, 393-426.



exhibits good inhibitory activity against  $\alpha$ -glycosidases and  $\alpha$ -mannosidase.<sup>171</sup> It is noteworthy that changes in the stereochemistry of the hydroxyls groups drastically influence the inhibitory activity.



**Figure 57.** Polyhydroxylated pyrrolidines with biological activity.

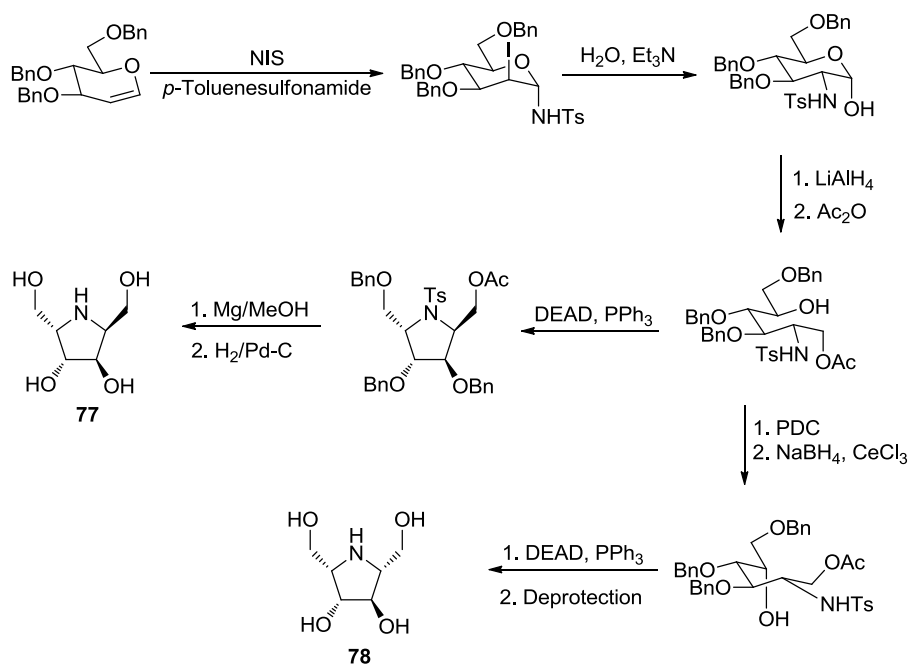
Conscious of the enormous potential of this class of azasugars as selective inhibitors, numerous research groups have been engaged in the search for effective synthetic methodologies towards the preparation of the above compounds as well as modified analogs.

In this regard, Kumar and Ramesh<sup>172</sup> described an improved synthesis of iminosugars **77** and **78** via a stereodivergent approach starting from commercially available tri-*O*-benzyl-D-glucal, which was subjected to a stereoselective iodosulfonamidation followed by treatment with H<sub>2</sub>O and Et<sub>3</sub>N to afford a glucose derivative that was reduced with LiAlH<sub>4</sub> (Scheme 53). The resulting diol was selectively acetylated at the primary hydroxyl group and the resulting compound cyclized under Mitsunobu conditions. Cleavage of the protecting groups afforded **77**. The monoacetylated intermediate was also used to synthesize **78** via oxidation, reduction, and cyclization.

<sup>171</sup> a) Le Merrer, Y.; Poitout, L.; Depezay, J. C.; Dosbaa, I.; Geoffroy, S.; Foglietti, M.-J.; *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 519-533. b) Takayama, S.; Martin, R.; Wu, J.; Laslo, K.; Siuzdak, G.; and Wong, C.-H. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8146-8151.

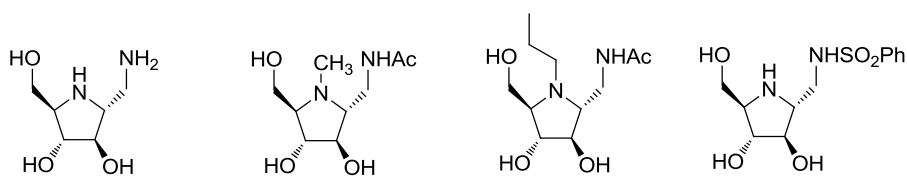
<sup>172</sup> Kumar, V.; Ramesh, N. G. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 1877-1885.

## Background



**Scheme 53**

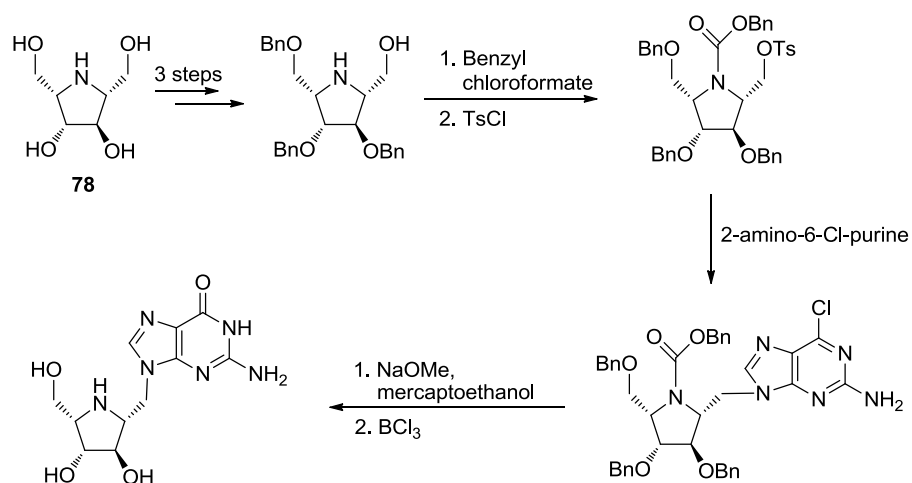
On the other hand, various synthetic amino-substituted iminocyclitols have also been prepared as potential glycosidase inhibitors and several were found to be active, such as those shown in Figure 58. The introduction of a hydrophobic group into endocyclic nitrogen may also enhance the biological properties.<sup>173</sup>



**Figure 58.** Some active amino-substituted iminocyclitols.

<sup>173</sup> a) Liu, J.; Numa, M. M.; Liu, H.; Huang, S. -J; Sears, P.; Shikhman, A. R.; Wong, C.-H. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 6273-6283. b) Liu, J.; Shikhman, A. F.; Lotz, M. K.; Wong, C.-H. *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 701-708. c) Takebayashi, M.; Hiranuma, S.; Kanie, Y.; Kajimoto, T.; Kanie, O.; Wong, C.-H. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 5280-5291. d) Wrodnigg, T. M.; Stütz, A. E.; Withers, S. G. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 5463-5466.

Another interesting derivative was described by Wong and coworkers,<sup>174</sup> in which one of the primary hydroxyl groups of **78** was substituted by guanine. The nucleobase was introduced by a nucleophilic displacement of the tosyl leaving group. The corresponding homoazanucleoside was prepared in only 8% isolated yield after the deprotection steps. Nevertheless, the biological activity of this compound was not reported (Scheme 54).



Scheme 54

Additionally to the extensive studies on iminosugars as glycosidase inhibitors, their therapeutic potential has been further exploited in the design of purine nucleoside phosphorilase (PNP) inhibitors.

### 6.1.3. ANOTHER TARGET METABOLIC ENZYME: PURINE NUCLEOSIDE PHOSPHORILASE

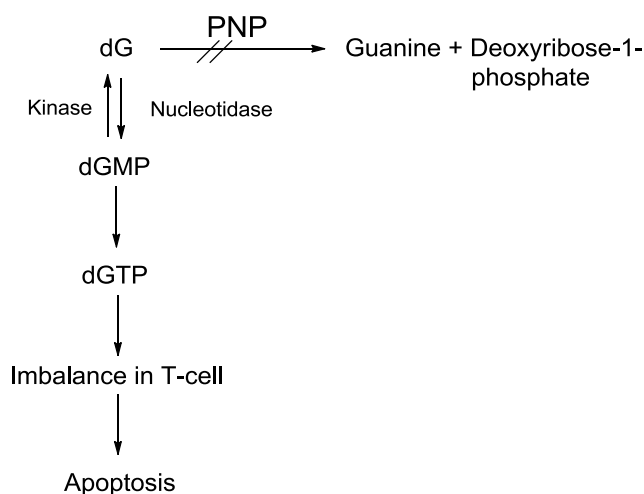
As glycosidases, PNP is another critical metabolic enzyme. It is involved in the reversible phosphorolysis of purine nucleosides to their respective bases and deoxy- $\alpha$ -1-phosphate. Inhibition of PNP leads to an accumulation of 2'-deoxyguanosine triphosphate (dGTP) in T-cells that are not able to metabolize dGTP because of their low nucleotidase activity, causing high concentrations of these compounds and finally leading to cellular apoptosis. The

<sup>174</sup> Wong, C.-H.; Provencher, L.; Porco, J. A., Jr.; Jung, S.-H.; Wang, Y.-F.; Chen, L.; Wang, R.; Steensma, D. H. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 1492-1501.

## Background

---

unique sensitive of human T-cells to PNP deficiency is attributed to the high level of kinase and low level of nucleotidase activity compared to other cells. Therefore, PNP is a key target for the control of T-cell proliferative disorders and consequently, for the treatment of leukemia and other autoimmune related diseases like psoriasis (Scheme 55).<sup>175</sup>



Scheme 55

### 6.1.4. DEVELOPMENT OF POWERFUL PNP INHIBITORS

#### 6.1.4.1. Rational design

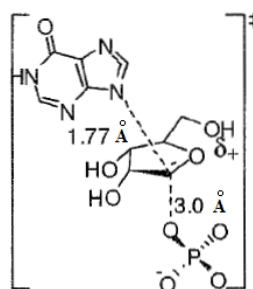
Theoretical studies on the geometry of the transition state for the PNP catalyzed hydrolysis of inosine revealed that the ribose moiety exists as an oxycarbenium ion with the charge distributed over its surface (Figure 59).<sup>176</sup>

The work by Schramm in understanding the transition state for the natural PNP catalyzed hydrolysis of inosine has resulted in the rational design and synthesis of a series of effective PNP inhibitors.<sup>177</sup>

<sup>175</sup> a) Morris, P. E.; Kamat, V. P.; *Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine*; Wiley-VCH, 2008, 451-471. b) Bantia, S.; Kilpatrick, J. M. *Curr. Opin. Drug. Discov. Devel.* **2004**, *7*, 243-247.

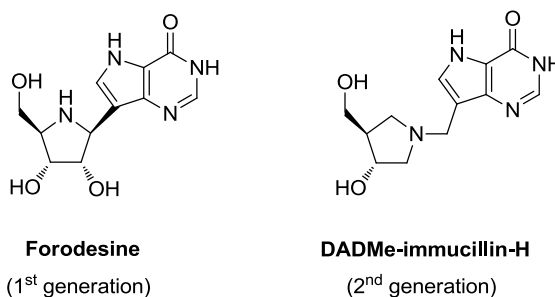
<sup>176</sup> a) Miles, R. W.; Tyler, P. C.; Furneaux, R. H.; Bagdassarian, C. K.; Schramm, V. L. *Biochemistry*, **1998**, *37*, 8615-8621. b) Horenstein, B. A.; Schramm, V. L. *Biochemistry* **1993**, *32*, 7089-7097. c) Horenstein, B. A.; Parkin, D. W. Estupinan, B.; Schramm, V.L. *Biochemistry*, **1991**, *30*, 10788-10795.

<sup>177</sup> a) Clinch, K.; Evans, G. B.; Fröhlich, R. F.; Furneaux, R. H.; Kelly, P. M.; Legentil, L.; Murkin, A. S.; Li, L.; Schramm, V. L.; Tyler, P. C.; Woolhouse, A. D.



**Figure 59.** Transition state for the PNP catalyzed phosphorolysis of inosine.

In fact, two nucleoside analogs are currently in human clinical trials for the treatment of T-cell cancers and other autoimmune disorders. These are first generation Immucillin-H (also known as Forodesine, Figure 60) and second generation DADMe-immucillin-H analogs. Immucillin-H was granted orphan drug status in the United States for the treatment of various leukemia. Use of a polyhydroxylated pyrrolydine and 9-deazapurine base was a central feature in the design of these two analogs.



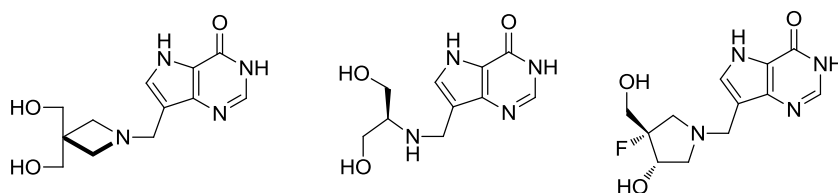
**Figure 60**

*J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 1126-1143. b) Mason, J. M.; Murkin, A.S.; Li, L.; Schramm, V. L.; Gainsford, G. J.; Skelton, B.W. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 5880-5884. c) Rinaldo-Matthis, A.; Murkin, A. S.; Ramagopal, U. A.; Clinch, K.; Mee, S. P.; Evans, G. B.; Tyler, P. C.; Furneaux, R. H.; Almo, S. C.; Schramm, V. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 842-844. d) Evans, G. B.; Furneaux, R. H.; Murkin, A. S.; Schramm, V. L.; Tyler, P. C. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 948-956. e) Taylor, E. A.; Clinch, K.; Kelly, P. M.; Li, L.; Evans, G. B.; Tyler, P. C.; Schramm, V. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 6984-6985. f) Taylor Ringia, E. A.; Tyler, P. C.; Evans, G. B.; Furneaux, R. H.; Murkin, A. S.; Schramm, V. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7126-7127. g) Semerano, T.; Lossani, A.; Botta, M.; Ghiron, C.; Alvarez, R.; Manneti, F.; Mugnaini, C.; Valensin, S.; Focher, F.; Corelli, F. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6037-6045. h) Evans, G. B.; Furneaux, R. H.; Lewandowicz, A.; Schramm, V. L.; Tyler, P. C. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 3412-3423.

## Background

---

Focusing on the second generation, it is remarkable that these compounds are the most potent human PNP inhibitors identified to date. In this structure, the methylene linker gives a 2.5 Å distance between the hydroxylated pyrrolidine and the 9-deaza base that mimics the 3 Å distance between ribose and the departing base in the transition state for the PNP catalyzed hydrolysis of inosine, supporting the great inhibitory properties. Together with DADMe-immucillin-H, several analogs with potent activity were described. An azetidine derivative,<sup>177d</sup> another one acyclic,<sup>177a</sup> and a fluorinated analog<sup>177b</sup> are represented in Figure 61.



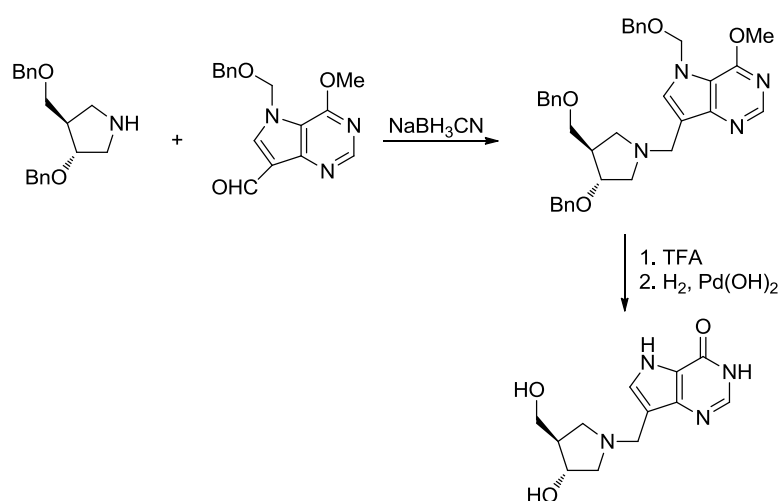
**Figure 61.** Some active DADMe-immucillin-H analogues.

### 6.1.4.2. Chemical synthesis of second generation PNP inhibitors

There are two main methods developed by Schramm and co-workers for the synthesis of second generation of PNP inhibitors. The first one involves a reductive amination between the protected iminosugar and a formylated and protected 9-deazapurine, further hydrogenolysis affords the target immucillin (Scheme 56).<sup>178</sup>

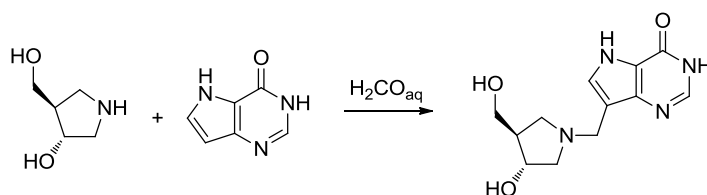
---

<sup>178</sup> Evans, G. B.; Furneaux, R. H.; Lewandowicz, A.; Schramm, V. L.; Tyler, P. C. J. *Med. Chem.* **2003**, 46, 5271-5276.



**Scheme 56.** Reductive amination for the synthesis of DADMe-immucillin-H.

The second approach applies the more elegant Mannich reaction of 9-deazahypoxanthine with the corresponding hydroxylated pyrrolidine to furnish the target compound (Scheme 57).<sup>179</sup>



**Scheme 57.** Mannich approach for the preparation of DADMe-immucillin-H.

<sup>179</sup> Evans, G. B.; Furneaux, R. H.; Tyler, P. C.; Schramm, V. L. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 3639-3640.





## **6.2. OBJECTIVES**

The overall biological importance of polyhydroxypyrrolidines has sparked significant efforts in their synthesis. As a result, further studies on the synthesis and biological evaluation of novel iminosugars are of broad interest.

Given the central role of the polyhydroxypyrrolydine moiety in the design of both glycosidase and PNP type inhibitors, the focus of this sixth Chapter is to use a common and versatile polyhydroxypyrrolydine precursor and introduce a suitable nitrogenated base at different positions of the iminosugar to generate potential enzyme inhibitors. We are interested in describing a practical synthetic strategy leading to a fast and efficient preparation of structurally diverse novel nucleoside analogs from a single iminosugar precursor.



### **6.3. RESULTS AND DISCUSSION**

One of the key objectives of modern drug discovery is to increase the diversity and number of small molecules available for biological screening.<sup>180</sup> Diversity-oriented synthesis (DOS) is already playing a major role in medicinal chemistry. Although DOS is usually directed toward a single biological target, it can also be used to identify new ligands for different targets, usually enzymes. To achieve this goal one approach involves generation of inhibitors of different enzymes from a common synthetic precursor and this is the main focus of this chapter.<sup>181</sup>

---

<sup>180</sup> Schreiber, S. L. *Science* **2000**, *287*, 1964-1969.

<sup>181</sup> a) Tan, D. S. *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 74-84. b) Jones, S. P.; Simmons, B.; Mastracchio, A.; Macmillan, D. W. *Nature* **2011**, *475*, 183-188.

### 6.3.1. SELECTION OF A VERSATILE IMINOSUGAR FOR THE DIVERGENT SYNTHESIS OF NUCLEOSIDES

As commented in the background, an efficient synthesis of iminosugar **77** was described by Kumar and Ramesh starting from commercially available tri-*O*-benzyl-D-glucal (Scheme 53).<sup>172</sup> The synthesis of **77** is accomplished in two steps from protected iminosugar **79**. We noted that chiral iminosugar **79** is perfectly set-up with three orthogonal protecting groups that could be cleaved or manipulated selectively at a time. The benzyl ethers are labile to hydrogenolysis or strong acidic media meanwhile the acetyl ester is basic labile and the *N*-Ts protecting group can be cleaved off by treatment with Mg in MeOH (Figure 61).

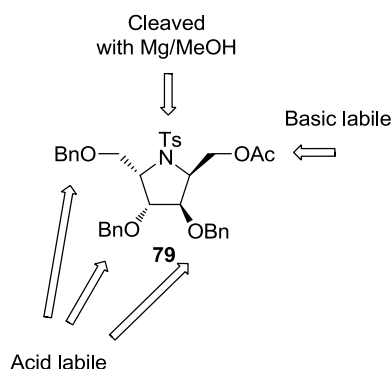


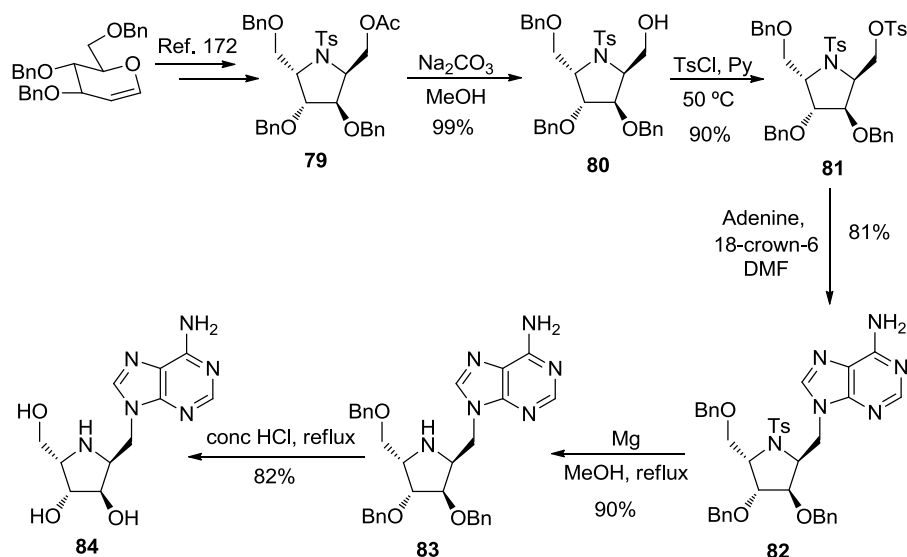
Figure 61

We envisioned synthesizing two types of nucleoside analogs starting from iminosugar **79**. The first set of C-linked nucleoside can be built via attachment of a natural adenine base to the C2 position of **79** furnishing potential glycosidase inhibitors. In the second set, *N*-linked nucleosides can be prepared utilizing the unnatural 9-deazapurine base and connecting it to the ring nitrogen to furnish potential PNP inhibitors.

### 6.3.2. SYNTHESIS OF C-LINKED NUCLEOSIDES

The synthesis of iminosugar containing nucleoside **84** (Scheme 58) was accomplished in five steps starting from **79**. First, selective hydrolysis of the acetyl group with Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in MeOH furnished **80** in quantitative yield. The deprotection of *N*-Ts was not observed under the mild conditions used for hydrolysis of acetyl group. Second, the primary hydroxyl group in **80** was tosylated under standard conditions to furnish **81** in excellent

yield. In the third step, displacement of the tosyl leaving group by adenine base in **81** afforded the protected nucleoside **82** in good yield (81%) after silica gel chromatography. It is noteworthy that N9-substituted product was isolated as the major compound upon glycosylation. The deprotection of **82** into **84** was achieved in a two-step process. First, *N*-detosylation with Mg/MeOH and then debenzoylation with an acid offered unprotected nucleoside **84** in good yield. The structure of homoazanucleoside **84** was established by  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR data.



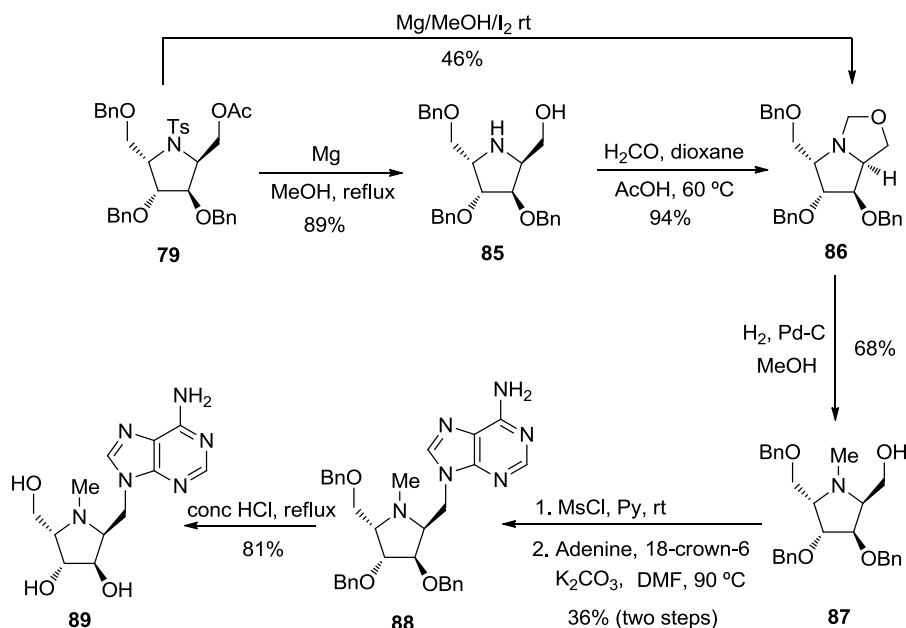
Scheme 58

As previously commented, Wong and co-workers<sup>173</sup> reported that the introduction of a methyl group into the amino ring nitrogen of the iminosugars resulted in improved biological properties. Therefore, we also became interested in developing a method to synthesize the *N*-methylated analogue of **84**. As shown in Scheme 59, the reaction of compound **79** with Mg in MeOH removed the tosyl group with concomitant cleavage of the acetyl protecting group to afford **85** in 89% yield. Interestingly, when we tried the *N*-detosylation of **79** using Mg turnings and activated with iodine, we observed formation of **86** in moderate yield (46%). We postulate that *in-situ* iodine mediate oxidation of MeOH to formaldehyde may have contributed to the formation of bicyclic structure **86**.<sup>182</sup> However, the synthesis of **86** was unequivocally

<sup>182</sup> Jereb, M.; Vrazic, D.; Zupan, M. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 1355-1387.

## Results and discussion

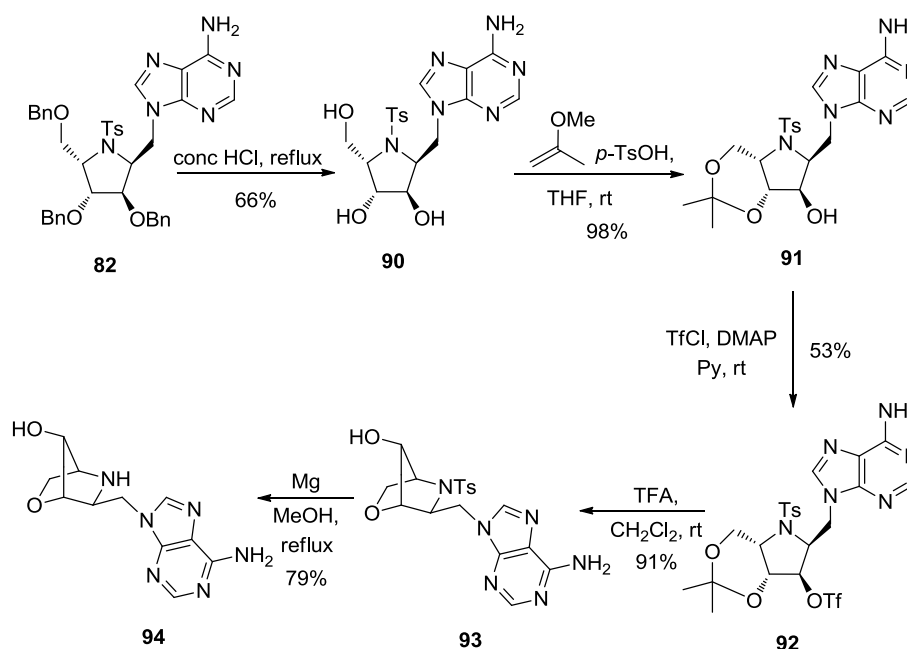
established by treatment of **85** with aqueous formaldehyde in presence of acid, isolating 94% of the desired product. Next, selective hydrogenolysis of the hemiaminal afforded *N*-methylated azasugar **87** without cleaving the benzyl groups. Subsequent tosylation of **87** under identical conditions as described for **80** furnished a mixture of products. The  $^1\text{H}$ -NMR spectra of the mixture failed to show the presence of the tosyl signals. Gratifyingly, mesylation of **87** followed by nucleophilic substitution by adenine yielded the fully protected compound **88**. Debenzylation of **88** with concentrated HCl furnished *N*-methylated nucleoside **89**, and the structure was corroborated by  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR data. Moreover, NOESY spectrum of **89** does not show correlations between H2 and H5 either between H3 and H4 hydrogen atoms, which is in agreement with a relative *trans* configuration, indicating retention of the stereochemistry of the azasugar after several chemical transformations.



Scheme 59

The expeditious synthesis of nucleoside **84** and the C3-hydroxyl group configuration suitable for an elimination followed by ring closure, encouraged us to assemble locked nucleic acid structures that are key building-blocks for antisense oligonucleotides as well as effective therapeutic agents.<sup>36</sup> Additionally, examples of natural and synthetic bicycle iminosugars with glycosidase inhibitory

activity,<sup>183</sup> prompted us to undertake the synthesis of a locked-azanucleoside. Therefore, installation of a leaving group on C3 hydroxyl group may allow ring closure onto the hydroxymethyl group, furnishing the novel bicyclic locked nucleoside analogue **94**.



Scheme 60

The synthesis of nucleoside **94** was accomplished in five steps starting with **82** (Scheme 60). First, acid treatment of **82** successfully cleaved the three benzyl groups simultaneously to furnish **90** in good yield. The resulting 1,3-diol system in **90** was selectively protected with 2,2-dimethoxypropane to afford ketal **91** in almost quantitative yield. Next, the hydroxyl group in **91** was transformed into triflate by treatment with TfCl in the presence of DMAP, furnishing **92** in modest 53% yield. We were pleased to note that the treatment of **92** with TFA-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> mixture not only deblocked the acetal but also triggered an *in-situ* cyclization, resulting in the formation of bicycle homoazanucleoside **93** in

<sup>183</sup> a) Liu, X.-K.; Qiu, S.; Xiang, Y.-G.; Ruan, Y.-P.; Zheng, X.; Huang, P.-Q. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 4952-4963. b) Asano, N.; Ikeda, K.; Kasahara, M.; Arai, Y.; Kiza, H. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 846-850. c) Teppler, D. *Phytochemistry* **1990**, *29*, 2125-2127.

## Results and discussion

excellent yield. Removal of the tosyl group from **93** following the same protocol as before yielded the final compound **94**. To the best of our knowledge, this is the first example of a locked bicyclic homoazanucleoside synthesized in a straightforward manner.

The structure of **93** and **94** was confirmed by extensive analysis of 1D- and 2D- NMR spectroscopy. After cyclization, HMBC spectra of compound **93** clearly shows a three bond correlation between  $C_3$  and  $CH_2O$  hydrogen atoms of the new five membered ring together with other expected cross peaks (Figure 62).

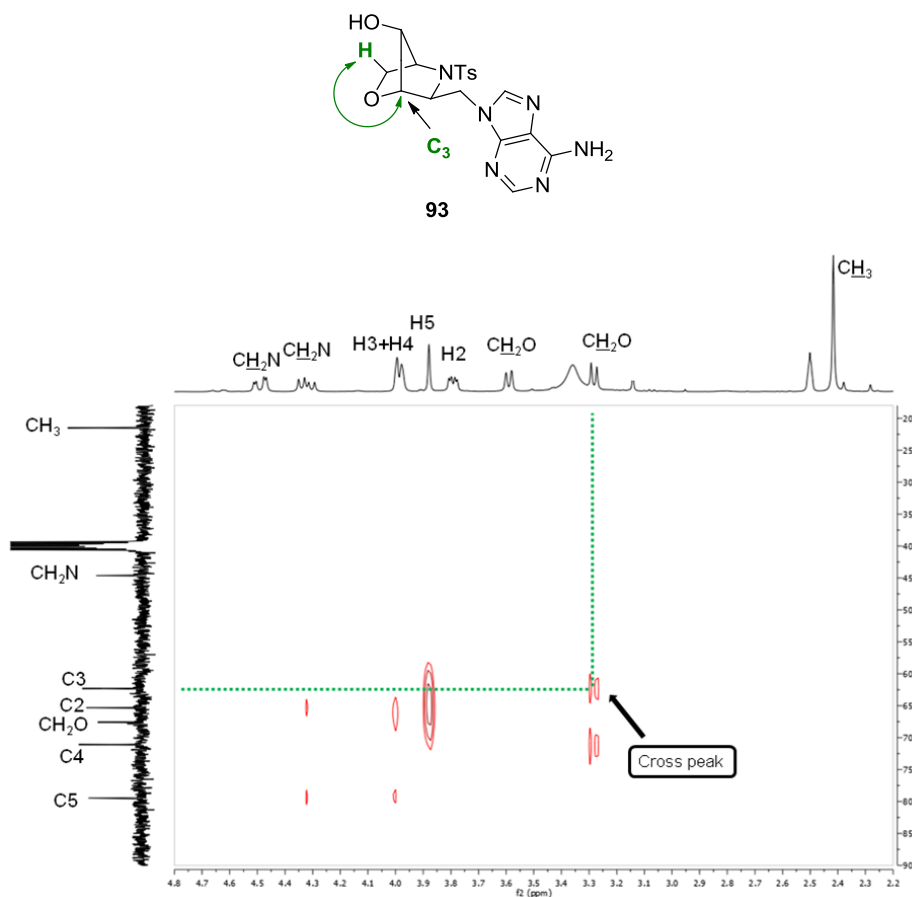
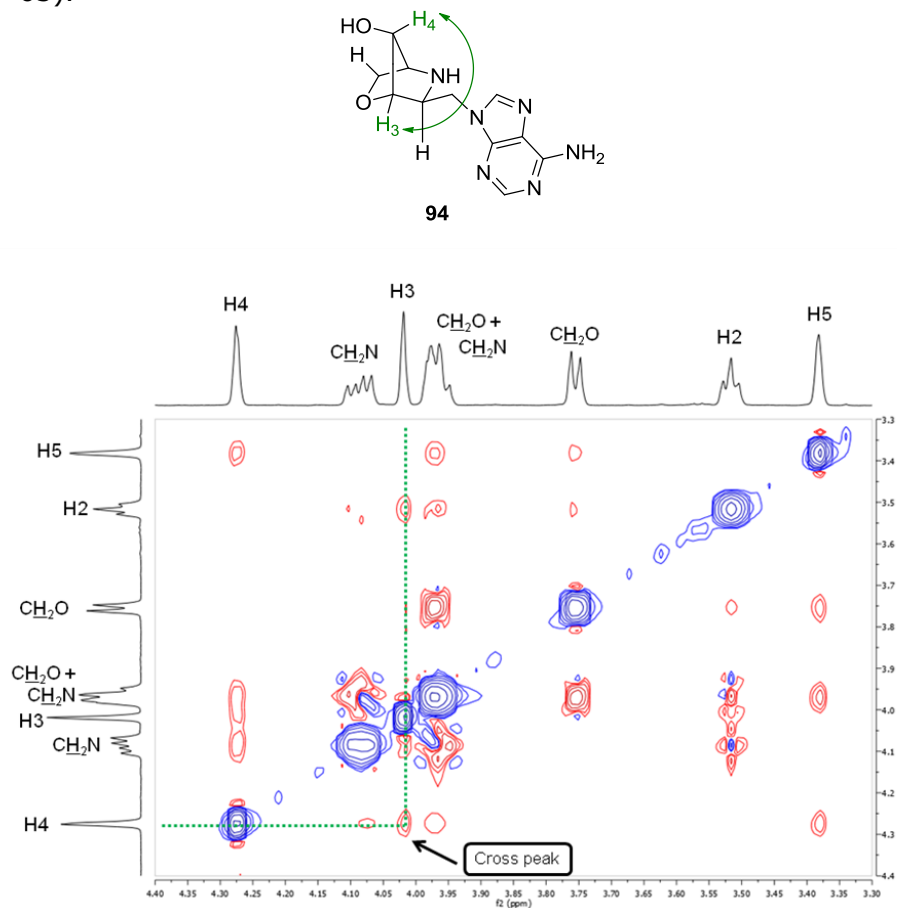


Figure 62. HMBC spectrum of compound **93**.

The structure was further confirmed on the basis of the NOESY spectrum of the final compound **94**, which showed a correlation between H3 and H4 hydrogen atoms, supporting the change in the previous *trans* relative configuration between them.



These data supported the inversion occurred at C3 position (Figure 63).



**Figure 63.** NOESY spectrum of compound **94**.

### 6.3.3. SYNTHESIS OF N-LINKED NUCLEOSIDES

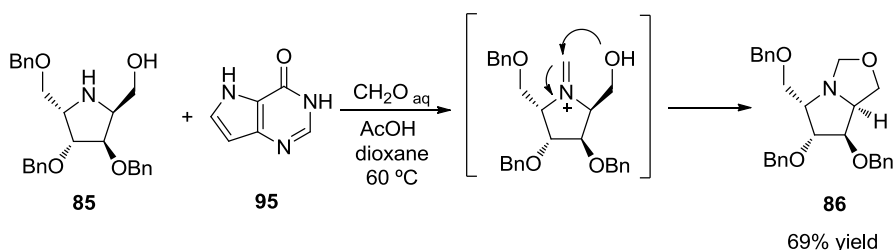
In 2003, Schramm and co-workers described a new class of inhibitors for PNP in which the 9-deazapurine moiety is directly attached to the N-atom of the azasugar via a methylene bridge.<sup>178,184</sup> Currently, DADMe-Immucillin-H is under Phase II clinical trials for treatment of human Gout. The promising PNP

<sup>184</sup> a) Leawandwicz, A.; Shi, W.; Evans, G. B.; Tyler, P. C.; Furneaux, R. H.; Basso, L. A.; Santos, D.S.; Almo, S. C.; Schramm, V. L. *Biochemistry* **2003**, *42*, 6057-6066.

## Results and discussion

inhibitory activity of *N*-linked nucleosides prompted us to undertake the synthesis of novel analogues.

Orthogonally protected azasugar **79** also serves as an attractive starting material for the synthesis of potential PNP inhibitors, increasing the molecular diversity that can be created from a single iminosugar structure. The azasugar **79** was conveniently transformed into **85** (Scheme 59) with the amino group ready for coupling with the base. However, reaction of **85**, 9-deazapurine (**95**) (commercially available, but it can also be synthesized in three steps following the procedure described by Kamath *et al*<sup>185</sup>) and formaldehyde under Mannich conditions<sup>179</sup> led to the formation of bicycle **86** as major product instead of the desired nucleoside. We believe that the iminium intermediate formed after the reaction of **85** with formaldehyde underwent concomitant intramolecular attack of the free hydroxyl group to furnish **86** faster than the required attack of 9-deazapurine (Scheme 61).

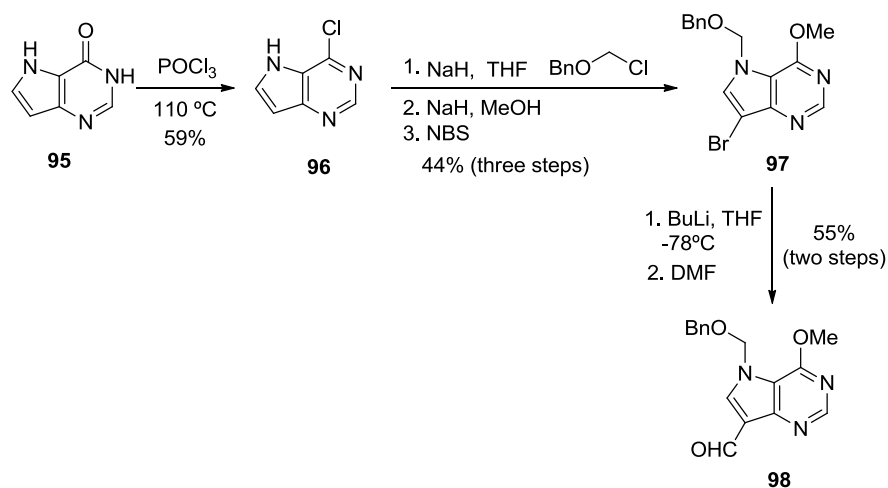


Scheme 61

Therefore, an alternative approach was conceived starting from 9-deazapurine prefucionalized with an aldehyde group that will be easier to link with iminosugar **85** using reductive amination conditions. The synthesis of 9-deazapurine **98** was carried out following the methodology described by Schramm and co-workers,<sup>186,177h</sup> which involves treatment of **95** with phosphoryl chloride to afford **96** (Scheme 62). This latter compound was sequentially *N*-protected and treated with sodium methoxide and *N*-bromosuccinimide (NBS) to give **97**. Lithiation followed by reaction with DMF furnished **98**.

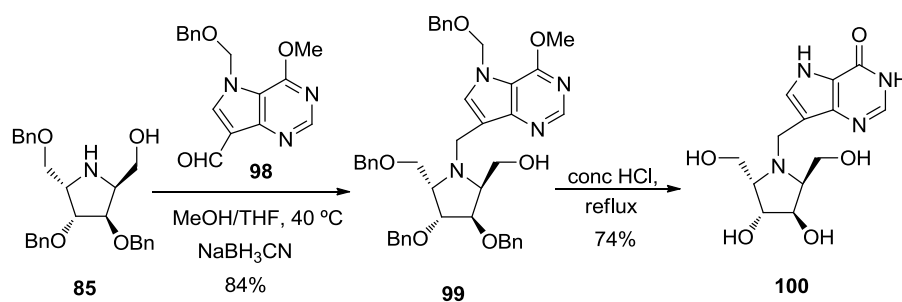
<sup>185</sup> Kamath, V.; Juarez-Brambila, J. J.; Morris, C. B.; Winslow, C. D.; Morris, P. E. *Org. Proc. Res. Dev.* **2009**, 13, 928-932.

<sup>186</sup> Evans, G. B.; Furneaux, R. H.; Hutchinson, T. L.; Kezar, H. S.; Morris, P. E.; Schramm, V. L.; Tyler, P. C. *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 5723-5730.



Scheme 62

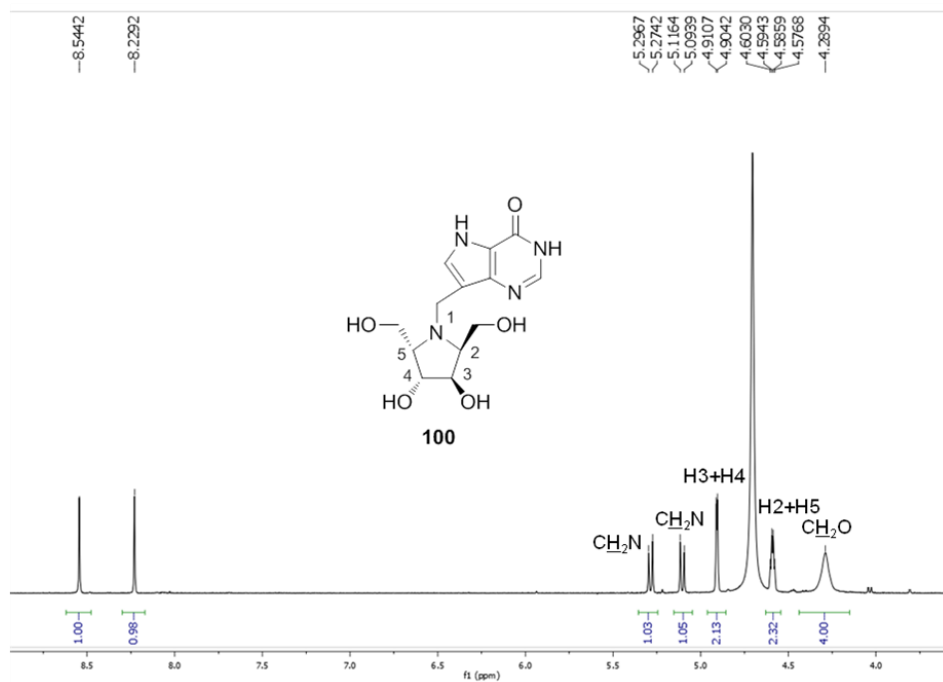
As expected, the coupling under reductive amination conditions of **85** with aldehyde **98** in the presence of  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  afforded desired nucleoside **99** in 84% isolated yield after chromatography (Scheme 63). Next, treatment of **99** with acid cleanly removed all five protecting groups in 2.5 h under reflux to furnish *N*-methylene-bridged **100** as a hydrochloride salt. It is striking to note that synthesis of a complex nucleoside such as **100** was accomplished in three simple steps starting with **79** in high overall yield.



Scheme 63

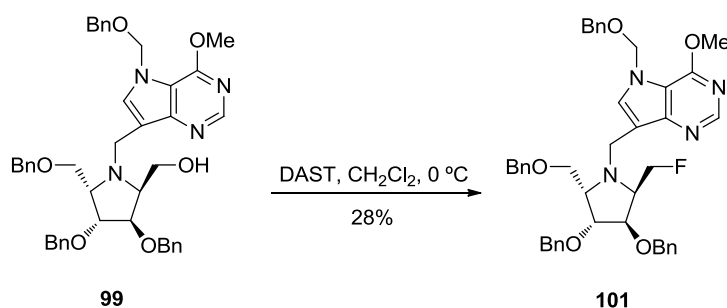
The structure of **100** was established by extensive NMR and MS data.  $^1\text{H-NMR}$  spectrum of compound **100** shows only half of the expected signals, confirming the  $\text{C}_2$  axis of symmetry that was further supported by NOESY experiments (Figure 64).

## Results and discussion



**Figure 64.** <sup>1</sup>H NMR spectrum of compound **100**·HCl at 373 K.

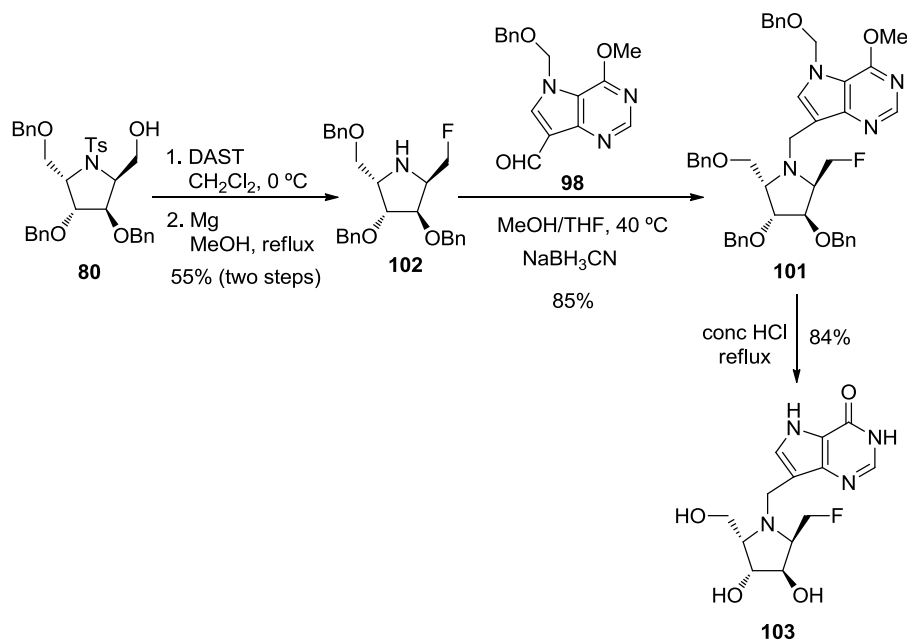
As reported in Chapter 5, the use of fluorine has proven to be an indispensable tool for drug discovery efforts. For this reason, Schramm and co-workers<sup>177b</sup> have described the synthesis of a potent inhibitor of human PNP containing a fluorine atom in the pyrrolidine moiety. In this context, we wished to synthesize a fluoro-analogue of compound **100**, expanding the repertoire of azanucleosides accessible for drug discovery efforts.



The free primary hydroxyl group in compound **99** can be transformed into fluorine by treatment with the well known fluorination agent DAST. However, the reaction afforded a mixture

of several products and the required compound **101** was isolated in only 28% yield (Scheme 64).

In the search for a more efficient method and based on the prior success of the synthesis of **100**, we decided to install the fluorine substituent first and then carry out the coupling with the formyl-functionalized nucleobase **98** (Scheme 65). Therefore, treatment of **80** with DAST at low temperature followed by *N*-detosylation of the crude product furnished **102** in moderate yield (55%) over two steps, being a considerable improvement with respect to the direct fluorination of **99**. Fluoroazasugar **102** was then reductively alkylated with aldehyde **98** in the presence of  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  in a MeOH/THF mixture to afford the protected product **101** in excellent yield. Next, the acid-mediated deprotection of **101** gave the fluoro nucleoside **103** in 84% isolated yield.



Scheme 65



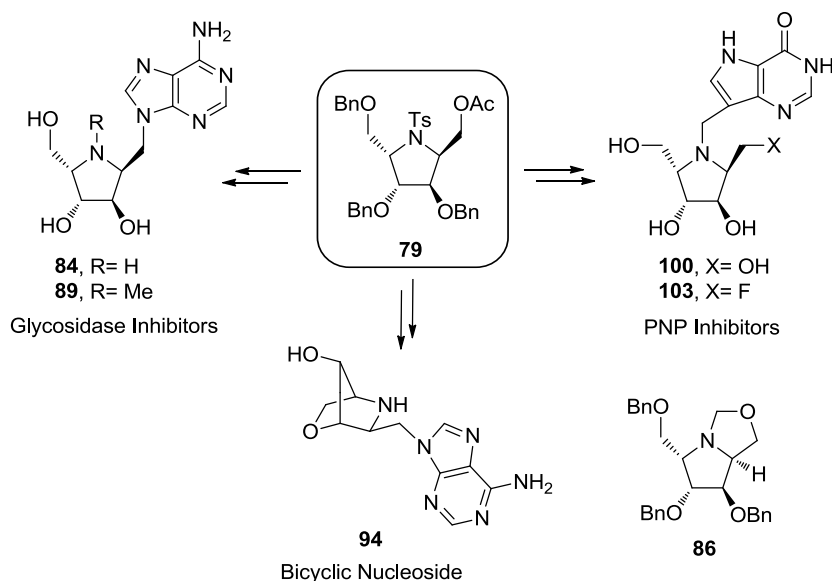
## 6.4. CONCLUSIONS

In this chapter the synthesis of five nucleoside analogs from a common iminosugar **79** has been described using divergent and high yielding protocols. Selective removal of the protecting groups of **79** followed by coupling with appropriate bases at strategic positions of the azasugar afforded potential glycosidase and PNP inhibitors.

The homoazanucleoside **84** and its bicycle analog **94** were assembled starting from **79**, where the *O*-acetyl group was deblocked selectively. A serendipitous reaction led to the formation of the bicyclic structure **86**, which was further transformed into the *N*-methyl derivative **89**.

On the other hand, concomitant deprotection of *N*-tosylate and *O*-acetyl groups from **79** led to the synthesis of potential PNP inhibitors **100** and its fluorine analogue **103** via reductive amination.

Clearly, azasugar **79** is a desirable scaffold containing orthogonal protecting groups that will enable the discovery of divergent reaction pathways and synthesis of structural diverse compounds needed for modern day drug discovery and synthetic organic chemistry applications.







## **6.5. EXPERIMENTAL SECTION**

### **6.5.1. GENERAL**

All reagents were bought from Aldrich and Acros at highest commercial quality and used without further purification. All non-aqueous reactions were carried out under anhydrous conditions in dry and freshly distilled solvents. Reactions were monitored by TLC using UV light as visualizing agent and 7% etanolic phosphomolybdic acid. Other techniques were reported in previous chapters.

### **6.5.2. SYNTHETIC PROCEDURES FOR REPORTED COMPOUNDS**

Compounds **79**, **80** and **85** were previously described<sup>172</sup> as well as **95**,<sup>185</sup> **96**, **97**, and **98**.<sup>186,177h</sup> The synthetic procedures for these compounds are shown below.

#### **Synthesis of (2*S*,3*R*,4*R*,5*R*)-3,4-bis(benzyloxy)-5-(benzyloxymethyl)-2-(hydroxymethyl)-*N*-(*p*-toluenesulfonamido)pyrrolidine (**80**)**

A suspension of **79** (400 mg, 0.96 mmol) and Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (508 mg, 4.8 mmol) in MeOH (8 mL) was stirred at reflux for 1.5 h. After completion of the reaction, the mixture was filtered over celite and washed with MeOH and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Solvents were evaporated to obtain **80** as a colorless viscous liquid (372 mg, 99%) without any further purification.

## Experimental section

---

### Synthesis of (2*S*,3*R*,4*R*,5*S*)-3,4-Bis(benzyloxy)-5-(benzyloxymethyl)-2-(hydroxymethyl)pyrrolidine (**85**).

Mg (turnings) was added (115 mg, 4.8 mmol) to a solution of compound **79** (600 mg, 0.96 mmol) in dry MeOH (4.8 mL), and the mixture was refluxed for 2 h. MeOH was evaporated and purification by column chromatography (10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) afforded **85** (367 mg, 89%) as a colorless gummy liquid.

### Synthesis of 6-chloro-9-deazapurine (**96**).

A suspension of 9-deazapurine (1.5 g, 11.1 mmol) and POCl<sub>3</sub> was heated to reflux for 2 h. POCl<sub>3</sub> was evaporated in high vacuum, and the residue purified by column chromatography (10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) to afford **96** (1.0 g, 59%) as a yellow solid.

### Synthesis of *N*-7-benzoyloxymethyl-9-bromo-9-deaza-6-*O*-methylhypoxanthine (**97**)

Sodium hydride (360 mg, 60% dispersion, 9.0 mmol) was added to a stirred suspension of **96** (1.0 g, 6.5 mmol) in dry THF (15 mL), and the resulting mixture was stirred at room temperature for 1 h. MeOH (3.8 mL) and then sodium hydride (308 mg, 60%, 7.7 mmol) were added carefully, and after 1 h, *N*-bromosuccinimide was added portionwise until TLC analysis indicated that the initial material was replaced by a less polar product. Solvents were evaporated, and the residue purified by column chromatography (30% EtOAc/hexanes) to afford **98** (1.0 g, 44%) as a pallid yellow solid.

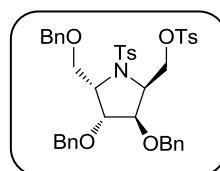
### Synthesis of *N*-7-benzoyloxymethyl-9-deaza-9-formyl-6-*O*-methylhypoxanthine (**98**)

A solution of **97** (500 mg, 1.43 mmol) in dry THF was cooled to -78 °C, and *n*-BuLi (0.9 mL, 1.6 M in hexanes, 1.44 mmol) was added to the resulting suspension. After 30 min, DMF (0.55 mL, 7.1 mmol) was added to the clear solution, which was stirred at -78 °C for 30 min and then quenched with water. Solvents were evaporated, and column chromatography (30% EtOAc/hexanes) yielded **98** (235 mg, 55%) as a pallid yellow solid.

### 6.5.3. SYNTHETIC PROCEDURES AND EXPERIMENTAL DATA FOR NEW COMPOUNDS

Experimental data for the new compounds as well as the synthetic procedures are shown on the following pages. The NMR signals are assigned for those compounds for which 2D NMR was performed.

#### (2*S*,3*R*,4*R*,5*S*)-3,4-bis(benzyloxy)-5-(benzyloxymethyl)-2-[(4-methylphenyl)sulfonyl]oxy-*N*-(*p*-toluenesulfonamido)pyrrolidine (**81**)



**Molecular formula:** C<sub>34</sub>H<sub>36</sub>NO<sub>7</sub>S<sub>2</sub>

**R<sub>f</sub>** (50% EtOAc/hexanes): 0.69

$[\alpha]_D^{20} = -14$  (c 0.5, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

**IR** (KBr):  $\nu$  3063, 3034, 2924, 2871, 1736, 1598, 1496 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  2.34, (s, 3H), 2.38 (s, 3H), 3.58 (d, 1H,  $J_{HH}$  10.0 Hz), 3.80 (dd, 1H,  $J_{HH}$  10.0 Hz,  $J_{HH}$  3.1 Hz), 3.98 (m, 2H), 4.23 (m, 5H), 4.63 (m, 6H), 7.03 (m, 2H), 7.24 (m, 16H), 7.70 (d, 2H,  $J_{HH}$  8.4 Hz), 7.77 (d, 2H,  $J_{HH}$  6.9 Hz)

**<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  21.3, 21.4, 56.9, 58.2, 65.8, 67.2, 72.5, 73.0, 73.3, 80.0, 80.2, 126.8-129.4 (23 C), 132.8, 137.2, 137.8, 138.0, 138.2, 143.4, 144.6

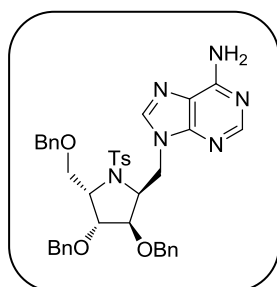
**MS** (ESI<sup>+</sup>, m/z): 742 [(M+H)<sup>+</sup> 10%]; 764 [(M+Na)<sup>+</sup> 60%]

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): Calculated for C<sub>41</sub>H<sub>43</sub>NNaO<sub>8</sub>S<sub>2</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 764.2322. Found 764.2299

**Procedure:** A solution of **80** (373 mg, 0.635 mmol) and *p*-TsCl (607 mg, 3.2 mmol) in dry pyridine (6.5 mL) was stirred overnight at 50 °C. Pyridine was evaporated in high vacuum, and the resulting residue was subjected to column chromatography (20% EtOAc/hexane) to yield **81** (424 mg, 90%) as a colorless viscous liquid.

## Experimental section

### (2*S*,3*R*,4*R*,5*S*)-2-(9-adeninylmethyl)-3,4-bis(benzyloxy)-5-(benzyloxymethyl)-*N*-(*p*-toluenesulfonamido)pyrrolidine (**82**)



**Molecular formula:** C<sub>39</sub>H<sub>40</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>S

**R<sub>f</sub>** (10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.48

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +20$  (c 0.5, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

**<sup>1</sup>H RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 2.32 (s, 3H), 3.57 (d, 1H, *J*<sub>HH</sub> 9.0 Hz), 3.97-4.17 (m, 4H), 4.25-4.70 (m, 7H), 4.96 (dd, 1H, *J*<sub>HH</sub> 2.2 Hz, *J*<sub>HH</sub> 13.8 Hz), 6.26 (br s, 2H), 6.88 (m, 2H), 6.90-7.32 (m, 16H), 7.93 (d, 2H, *J*<sub>HH</sub> 9.0 Hz), 7.97 (s, 1H), 8.39 (s, 1H)

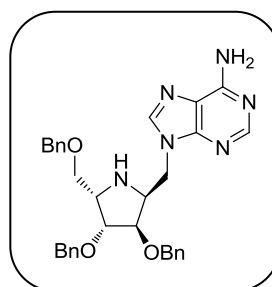
**<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 21.5, 44.3, 57.2, 59.0, 65.3, 72.6, 73.2, 80.1, 80.5, 119.3, 126.8-129.4 (20C), 136.9, 137.3, 137.5, 137.8, 142.1, 143.4, 150.5, 152.7, 155.6

**MS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) 705 [(M+H)<sup>+</sup> 100%]; 727 [(M+Na)<sup>+</sup> 50%]

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): Calculated for C<sub>39</sub>H<sub>41</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>S [M+H]<sup>+</sup> 705.2854. Found 705.2809

**Procedure:** A mixture of compound **81** (300 mg, 0.426 mmol), adenine (86 mg, 0.639 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (118 mg, 0.852 mmol), and 18-crown-6 (168 mg, 0.639 mmol) in dry DMF (4.3 mL) was heated at 90 °C overnight. DMF was evaporated under vacuum, and column chromatography (2% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) of the residue gave pure **82** (239 mg, 81%) as a white foam.

**(2*S*,3*R*,4*R*,5*S*)-2-(9-Adeninylmethyl)-3,4-bis(benzyloxy)-5-(benzyloxymethyl)pyrrolidine (**83**)**



**Molecular formula:** C<sub>32</sub>H<sub>34</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>

**R<sub>f</sub>** (10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.32

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +19 (c 0.5, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

**<sup>1</sup>H RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 2.33 (br s, 1H), 3.53 (dd, 1H, *J*<sub>HH</sub> 9.0 Hz, *J*<sub>HH</sub> 9.0 Hz), 3.61 (dd, 1H, *J*<sub>HH</sub> 6.4 Hz, *J*<sub>HH</sub> 9.2 Hz), 3.69 (q, 1H, *J*<sub>HH</sub> 6.4 Hz), 3.94 (m, 1H), 4.00 (m, 1H), 4.04 (m, 1H), 4.18 (dd, 1H, *J*<sub>HH</sub> 8.0 Hz, *J*<sub>HH</sub> 14.0 Hz), 4.21-4.59 (m, 7H), 5.86 (br s, 2H), 7.22-7.39 (m, 15H), 7.81 (s, 1H), 8.33 (s, 1H)

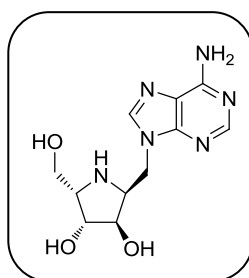
**<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 45.1, 58.0, 59.0, 68.8, 72.3, 73.4, 82.1, 82.2, 84.0, 127.5-128.5 (15 C), 138.0, 137.9, 138.1, 141.8, 150.1, 152.7, 156.4

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): Calculada para C<sub>32</sub>H<sub>35</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 551.2765. Encontrada: 551.2802

**Procedure:** Mg (turnings) was added (68 mg, 2.8 mmol) to a solution of compound **82** (200 mg, 0.28 mmol) in dry MeOH (2.8 mL), and the mixture was refluxed for 2 h. MeOH was evaporated, and purification by column chromatography (10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) afforded **83** (141 mg, 90%) as a white foam.

## Experimental section

### (2*S*,3*R*,4*R*,5*S*)-2-(9-adeninylmethyl)-3,4-bis(benzyloxy)-5-(benzyloxymethyl)-*N*-(*p*-toluenesulfonamido)pyrrolidine (84)



**Molecular formula:** C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>

**R<sub>f</sub>** (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/aq NH<sub>3</sub>, 7.5:2:0.5): 0.18

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -21 (c 0.5, MeOH)

**<sup>1</sup>H RMN** (D<sub>2</sub>O, 400.13 MHz): δ 3.80 (dd, 1H, *J*<sub>HH</sub> 8.8 Hz, *J*<sub>HH</sub> 12.4 Hz), 3.93 (dd, 1H, *J*<sub>HH</sub> 4.4 Hz, *J*<sub>HH</sub> 12.0 Hz), 4.07 (q, 1H, *J*<sub>HH</sub> 4.4 Hz), 4.25 (dd, 1H, *J*<sub>HH</sub> 1.6 Hz, *J*<sub>HH</sub> 3.2 Hz), 4.31 (m, 1H), 4.36 (dd, 1H, *J*<sub>HH</sub> 1.6 Hz, *J*<sub>HH</sub> 4.0 Hz), 4.62 (dd, 1H, *J*<sub>HH</sub> 7.6 Hz, *J*<sub>HH</sub> 15.2 Hz), 4.70 (dd, 1H, *J*<sub>HH</sub> 6.5 Hz, *J*<sub>HH</sub> 15.2 Hz), 8.18 (s, 2H)

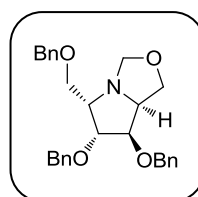
**<sup>13</sup>C NMR** (D<sub>2</sub>O, 100.6 MHz): δ 40.7, 57.5, 60.3, 63.9, 74.3, 74.6, 118.4, 142.3, 150.0, 152.3, 155.3

**MS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*): 281 [(*M*+*H*)<sup>+</sup> 100%]; 303 [(*M*+*Na*)<sup>+</sup> 80%]

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): Calculated for C<sub>11</sub>H<sub>17</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub> [*M*+*H*]<sup>+</sup> 281.1357. Found 281.1378

**Procedure:** A mixture of **83** (100 mg, 0.18 mmol) and concentrated aqueous HCl (38%; 1.8 mL) was refluxed for two hours. Water was evaporated, and aq NH<sub>3</sub> (32%; 1 mL) was added to the residue. After the aqueous phase was evaporated, the resulting solid was purified by column chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/aq NH<sub>3</sub>, 88:10:2) to afford **84** (41 mg, 82%) as a white solid.

**(8*S*,6*R*,7*R*,5*S*)-(8-Benzyloxymethyl)-6,7-bis(benzyloxy)-3-oxa-1-azabicyclo[3,3,0]octane (**86**)**



**Molecular formula:** C<sub>28</sub>H<sub>31</sub>NO<sub>4</sub>

**R<sub>f</sub>** (30% EtOAc/hexanes): 0.16

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +8$  (c 0.8, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

**<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 3.31 (q, 1H, *J*<sub>HH</sub> 6.3 Hz), 3.48 (t, 1H, *J*<sub>HH</sub> 8.3 Hz), 3.62 (dd, 1H, *J*<sub>HH</sub> 6.6 Hz, *J*<sub>HH</sub> 9.1 Hz), 3.82 (dd, 1H, *J*<sub>HH</sub> 6.0 Hz, *J*<sub>HH</sub> 9.3 Hz), 3.90 (q, *J*<sub>HH</sub> 4.4 Hz), 4.09 (m, 2H), 4.20 (m, 2H), 4.45 (d, 1H, *J*<sub>HH</sub> 12.0 Hz), 4.52-4.69 (m, 6 H), 7.29-7.43 (m, 15H)

**<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 65.0, 65.5, 65.7, 71.1, 72.9, 73.1, 74.1, 81.9, 83.4, 87.5, 128.2-129.2 (15C), 138.5, 138.7, 139.1

**MS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*): 446 [(*M*+*H*)<sup>+</sup> 100%]

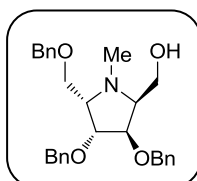
**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): Calculated for C<sub>28</sub>H<sub>32</sub>NO<sub>4</sub> [*M*+*H*]<sup>+</sup> 446.2326. Found 281.1378

**Procedure:** A solution of **85** (280 mg, 0.65 mmol), 37% aqueous formaldehyde (146 μL, 1.95 mmol), and acetic acid (186 μL, 3.25 mmol) in 1,4-dioxane (6.5 mL) was stirred at 60 °C for 30 min. After cooling, the solution was concentrated in vacuum and the residue purified by flash column chromatography (50% EtOAc/hexane) to obtain **86** (270 mg, 94%) as a colorless viscous oil.

**Experimental section**

---

**(2*S*, 3*R*, 4*R*, 5*S*)-3,4-bis(benzyloxy)-5-(benzyloxymethyl)-2-hydroxymethyl-*N*-methylpyrrolidine (**87**)**



**Molecular formula:** C<sub>28</sub>H<sub>33</sub>NO<sub>4</sub>

**R<sub>f</sub>** (5% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.44

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -56 (c 0.8, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

**<sup>1</sup>H RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 2.51 (s, 3H), 2.75 (br s, 1H), 3.15 (m, 1H), 3.46 (m, 1H), 3.58 (dd, 1H, *J*<sub>HH</sub> 3.0 Hz, *J*<sub>HH</sub> 9.9 Hz), 3.72 (m, 3H), 4.25 (t, *J*<sub>HH</sub> 6.9 Hz), 4.42-4.66 (m, 6H), 4.78 (d, 1H, *J*<sub>HH</sub> 11.7 Hz), 7.20-7.45 (m, 15H)

**<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 35.8, 59.7, 62.1, 64.8, 66.3, 72.7, 72.9, 73.5, 84.0, 84.7, 127.4-128.5 (15C), 138.1, 138.3, 138.5

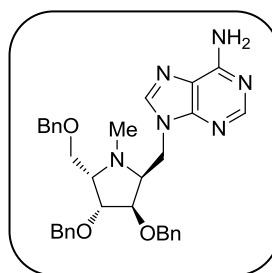
**MS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*): 448 [(M+H)<sup>+</sup> 100%]

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): Calculated for C<sub>28</sub>H<sub>34</sub>NO<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> 448.2482. Found 448.2492

**Procedure:** To compound **86** (220 mg, 0.49 mmol) in MeOH (3mL) was added 10% Pd-C (70 mg), and the mixture was stirred at room temperature under atmosphere of hydrogen overnight. The solution was filtered through celite and the filtrate concentrated in vacuo. The resulting residue was purified by column chromatography (60% EtOAc/hexane) to afford **87** (150 mg, 68%) as colorless viscous oil.



**(2*S*,3*R*,4*R*,5*S*)-2-(9-Adenynylmethyl)-3,4-bis(benzyloxy)-5-(benzyloxymethyl)-*N*-methyl-pyrrolidine (88)**



**Molecular formula:** C<sub>33</sub>H<sub>36</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>

**R<sub>f</sub>** (10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.38

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -7 (c 1.0, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

**<sup>1</sup>H RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 400.13 MHz): δ 2.41 (s, 3H), 3.35 (m, 1H), 3.53 (m, 2H), 3.68 (dd, 1H, *J*<sub>HH</sub> 2.8 Hz, *J*<sub>HH</sub> 10.0 Hz), 4.11 (t, 1H, *J*<sub>HH</sub> 6.0 Hz), 4.22 (dd, 1H, *J*<sub>HH</sub> 4.0 Hz, *J*<sub>HH</sub> 14.0 Hz), 4.34 (m, 2H), 4.50 (m, 5H), 4.71 (d, 1H, *J*<sub>HH</sub> 11.6 Hz), 6.16 (s, 2H), 7.32 (m, 15H), 7.85 (s, 1H), 8.35 (s, 1H)

**<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 100.6 MHz): δ 36.5, 42.9, 62.0, 63.5, 66.0, 72.7, 72.8, 73.4, 82.1, 84.0, 119.3, 127.5-128.5 (15 C), 137.9, 138.0, 138.3, 142.1, 150.5, 152.7, 155.1

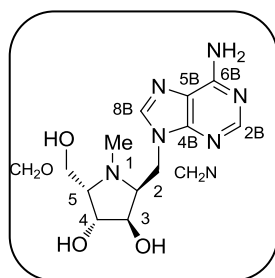
**MS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*): 565 [(*M*+*H*)<sup>+</sup> 100%]; 587 [(*M*+*Na*)<sup>+</sup> 10%]

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): Calculated for C<sub>33</sub>H<sub>37</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub> [*M*+*H*)<sup>+</sup> 565.2922. Found 565.2928

**Procedure:** To a solution of compound **87** (130 mg, 0.29 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3.6 mL) was added dry pyridine (88 μL, 1.1 mmol) and MsCl (79 μL, 1.0 mmol). The mixture was stirred at 0 °C for 20 min. Then, solvent was removed under vacuum, and the residue was dissolved in DMF (3 mL). Adenine (58 mg, 0.435 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (80 mg, 0.58 mmol), and 18-crown-6 (115 mg, 0.435 mmol) were added to the solution, and the mixture was stirred at 90 °C for 2.5 h. After the solvent was evaporated under high vacuum, the residue was purified by flash column chromatography (2% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) to yield **88** (60 mg, 81%) as a white foam.

## Experimental section

### (2*S*,3*R*,4*R*,5*S*)-2-(9-Adeninylmethyl)-3,4-dihydroxy-5-hydroxymethyl-*N*-methylpyrrolidine (**89**)



**Molecular formula:** C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>

**R<sub>f</sub>** (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/aq NH<sub>3</sub>, 7.5:2:0.5): 0.24

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +9 (c 0.5, MeOH)

**<sup>1</sup>H RMN** (MeOH-*d*<sub>4</sub>, 300.13 MHz): δ 2.55 (s, 3H), 2.56 (q, 1H, H-5, *J*<sub>HH</sub> 2.8 Hz), 3.55 (q, 1H, H-2, *J*<sub>HH</sub> 5.1 Hz), 3.80 (dd, 1H, CH<sub>2</sub>O, *J*<sub>HH</sub> 5.1 Hz, *J*<sub>HH</sub> 11.7 Hz), 3.87 (dd, 1H, CH<sub>2</sub>O, *J*<sub>HH</sub> 4.8 Hz, *J*<sub>HH</sub> 12.0 Hz), 4.10 (m, 2H, H-3 + H-4), 4.39 (dd, 1H, CH<sub>2</sub>N, *J*<sub>HH</sub> 5.1 Hz, *J*<sub>HH</sub> 14.0 Hz), 4.47 (dd, 1H, CH<sub>2</sub>N, *J*<sub>HH</sub> 7.8 Hz, *J*<sub>HH</sub> 15.0 Hz), 8.21 (s, 1H, H-2B or H-8B), 8.22 (s, 1H, H-8B or H-2B)

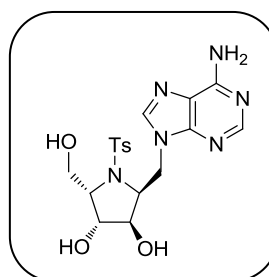
**<sup>13</sup>C NMR** (MeOH-*d*<sub>4</sub>, 75.5 MHz): δ 36.2 (CH<sub>3</sub>), 41.4 (CH<sub>2</sub>N), 57.6 (CH<sub>2</sub>O), 65.8 (C-5 + C-2), 75.6 (C-3), 76.8 (C-4B), 118.5 (C-5B), 142.3 (C-8B), 149.4 (C-4B), 152.1 (C-2B), 155.9 (C-6B)

**MS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*): 295 [(M+H)<sup>+</sup> 60%]; 317 [(M+Na)<sup>+</sup> 20%]

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): Calculated for C<sub>12</sub>H<sub>19</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup> 295.1513. Found 295.1511

**Procedure:** A mixture of **88** (60 mg, 0.11 mmol) and concentrated aqueous HCl (38%, 1.8 mL) was refluxed for 2 h. Water was evaporated, and aqueous NH<sub>3</sub> (32%, 1 mL) was added to the residue. After the aqueous phase was evaporated, the resulting solid was purified by column chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/ NH<sub>4</sub>OH, 88:10:2) to afford **89** (25 mg, 81%) as a white solid.

**(2*S*,3*R*,4*R*,5*S*)-2-(9-Adenylmethyl)-3,4-dihydroxy-5-hydroxymethyl-*N*-(*p*-toluenesulfonamido)pyrrolidine (90)**



**Molecular formula:** C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>S

**R<sub>f</sub>** (10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.39

**<sup>1</sup>H RMN** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 300.13 MHz): δ 2.38 (s, 3H), 3.17 (m, 1H), 3.60 (br s, 1H), 3.78 (m, 3H), 4.16 (m, 1H), 4.30 (br s, 1H), 4.45 (dd, 1H, *J*<sub>HH</sub> 9.6 Hz, *J*<sub>HH</sub> 13.4 Hz), 4.85 (dd, 1H, *J*<sub>HH</sub> 2.9 Hz, *J*<sub>HH</sub> 13.3 Hz), 5.16 (s, 1H), 5.68 (br s, 1H), 7.23 (br s, 2H), 7.36 (d, 2H, *J*<sub>HH</sub> 8.1 Hz), 7.90 (d, 2H, *J*<sub>HH</sub> 8.1 Hz), 8.01 (s, 1H), 8.22 (s, 1H)

**<sup>13</sup>C NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 75.5 MHz): δ 20.9, 42.3, 56.7, 59.9, 63.9, 72.8, 73.1, 118.5, 127.2, 129.4, 137.5, 141.8, 142.8, 149.6, 152.4, 155.9

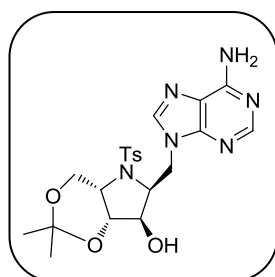
**MS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*): 435 [(*M*+*H*)<sup>+</sup> 100%]; 457 [(*M*+*Na*)<sup>+</sup> 10%]

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): Calculated for C<sub>18</sub>H<sub>23</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>S [*M*+*H*]<sup>+</sup> 435.1445. Found 435.1452

**Procedure:** Compound **82** (220 mg, 0.31 mmol) was refluxed in concentrated aqueous HCl (38%, 2.0 mL) for 2 h. Water was evaporated, and aqueous NH<sub>3</sub> (32%, 1 mL) was added to the residue. After the aqueous phase was evaporated the resulting solid was purified by column chromatography (10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) to obtain **90** (89 mg, 66%) as a white solid.

## Experimental section

### (4a*S*,6*S*,7*R*,7a*R*)-6-[(6-amino-9*H*-purin-9-yl)methyl]-2,2-dimethyl-5-tosylhexahydro[1,3]dioxino[5,4,*b*]pyrrol-7-ol (**91**)



**Molecular formula:** C<sub>21</sub>H<sub>26</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>S

**R<sub>f</sub>** (10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.56

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -15 (c 0.5, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

**<sup>1</sup>H RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  1.09 (s, 3H), 1.31 (s, 3H), 2.39 (s, 3H), 3.68 (s, 1H), 4.02 (tt, 1H, *J*<sub>HH</sub> 3.9, *J*<sub>HH</sub> 11.2), 4.13-4.30 (m, 5H), 4.47 (dd, 1H, *J*<sub>HH</sub> 11.2 Hz, *J*<sub>HH</sub> 13.6 Hz), 5.09 (dd, 1H, *J*<sub>HH</sub> 1.5 Hz, *J*<sub>HH</sub> 14.0 Hz), 6.53 (br s, 2H), 6.93 (br s, 1H), 7.30 (d, 2H, *J*<sub>HH</sub> 7.9 Hz), 7.82 (d, 2H, *J*<sub>HH</sub> 7.9 Hz), 8.00 (s, 1H), 8.25 (s, 1H)

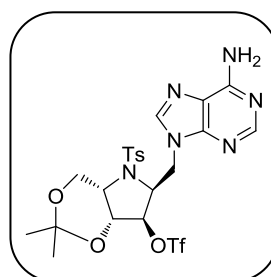
**<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  20.7, 21.4, 25.9, 41.1, 59.9, 60.0, 64.5, 73.0, 73.5, 98.4, 119.5, 127.0 (2C), 130.0 (2C), 138.7, 141.2, 143.7, 149.3, 152.5, 156.1

**MS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*): 475 [(M+H)<sup>+</sup> 100%]; 497 [(M+Na)<sup>+</sup> 25%]

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): Calculated for C<sub>21</sub>H<sub>27</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>S [M+H]<sup>+</sup> 475.1758. Found 475.1782

**Procedure:** To a solution of **90** (89 mg, 0.205 mmol) in anhydrous THF (4.0 mL) and anhydrous DMF (0.4 mL) were added 2-methoxypropene (57  $\mu$ L, 0.60 mmol) and *p*-TsOH (0.41 mmol, 72 mg). The solution was stirred at room temperature. After 30 min, additional 2-methoxypropene (97  $\mu$ L, 1.02 mmol) was added and the solution was allowed to react for an additional 30 min. Solvents were evaporated under vacuum, and the residue purified by column chromatography (2% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) to afford pure **91** (95 mg, 98%).

**(4a*S*,6*S*,7*R*,7a*R*)-6-[(6-amino-9*H*-purin-9-yl)methyl]-2,2-dimethyl-5-tosylhexahydro[1,3]dioxino[5,4,*b*]pyrrol-7-yl trifluoromethanesulfonate (92)**



**Molecular formula:** C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>F<sub>3</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>S<sub>2</sub>

**R<sub>f</sub>** (10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.53

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +41 (c 0.5, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

**<sup>1</sup>H RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 400.13 MHz): δ 1.16 (s, 3H), 1.37 (s, 3H), 2.38 (s, 3H), 4.07 (dd, 1H, J<sub>HH</sub> 4.4 Hz, J<sub>HH</sub> 12.8 Hz), 4.17 (q, 1H, J<sub>HH</sub> 4.4 Hz), 4.26 (dd, 1H, J<sub>HH</sub> 4.8 Hz, J<sub>HH</sub> 12.8 Hz), 4.45 (m, 2H), 5.12 (m, 3H), 5.95 (br s, 2H), 7.21 (d, 2H, J<sub>HH</sub> 8.0 Hz), 7.70 (d, 2H, J<sub>HH</sub> 8.0 Hz), 7.87 (s, 1H), 8.28 (s, 1H)

**<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 100.6 MHz): δ 20.9, 21.4, 26.6, 42.1, 57.3, 59.2, 60.0, 70.8, 87.3, 99.4, 119.4, 126.6 (2C), 129.6 (2C), 136.9, 141.1, 143.9, 150.2, 152.9, 155.5

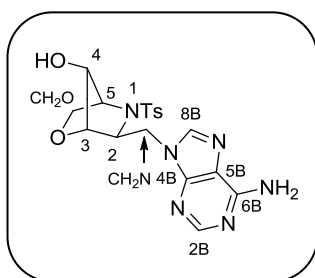
**MS** (ESI<sup>+</sup>, m/z): 607 [(M+H)<sup>+</sup> 100%]; 629 [(M+Na)<sup>+</sup> 20%]

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): Calculated for C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>F<sub>3</sub>N<sub>6</sub>O<sub>7</sub>S<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 607.1251.  
Found 607.1277

**Procedure:** Protected compound **91** (95 mg, 0.20 mmol) was dissolved in dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and DMAP (73 mg, 0.6 mmol) and TfCl (32 μL, 0.24 mmol) were added. The solution was stirred for 2.5 h at 0 °C. Solvent was concentrated and the residue was subjected to column chromatography (1% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) to give **92** (64 mg, 53%).

## Experimental section

### (2S,3S,4R,5S)-2-(9-Adenylmethyl)-(3-O,5-C-methylene)-N-(p-toluenesulfonamido)pyrrolidine (93)



**Molecular formula:** C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>S

**R<sub>f</sub>** (10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.39

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +89 (c 0.5, MeOH)

**<sup>1</sup>H RMN** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400.13 MHz): δ 2.41 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.28 (d, 1H, CH<sub>2</sub>O, *J*<sub>HH</sub> 8.4 Hz), 3.59 (d, 1H, CH<sub>2</sub>O, *J*<sub>HH</sub> 8.0 Hz), 3.78 (dd, 1H, H-2, *J*<sub>HH</sub> 3.6 Hz, *J*<sub>HH</sub> 8.4 Hz), 3.87 (s, 1H, H-5), 3.97 (s, 1H, H-4), 3.99 (s, 1H, H-3), 4.33 (dd, 1H, CH<sub>2</sub>N, *J*<sub>HH</sub> 8.8 Hz, *J*<sub>HH</sub> 14.4 Hz), 4.48 (dd, 1H, CH<sub>2</sub>N, *J*<sub>HH</sub> 3.4 Hz, *J*<sub>HH</sub> 14.5 Hz), 5.67 (br s, 1H, OH), 7.30 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.47 (d, 2H, Ts-m, *J*<sub>HH</sub> 8.1 Hz), 7.91 (d, 2H, Ts-o, *J*<sub>HH</sub> 8.2 Hz), 8.09 (s, 1H, H-8B), 8.24 (s, 1H, H-2B)

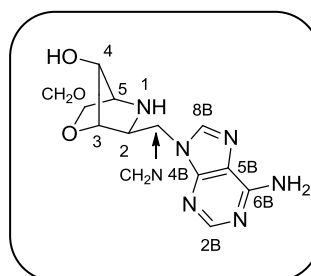
**<sup>13</sup>C NMR** (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100.6 MHz): δ 21.5 (CH<sub>3</sub>, Ts), 44.6 (CH<sub>2</sub>N), 62.3 (C-3), 65.3 (C-2), 67.6 (CH<sub>2</sub>O), 71.1 (C-4), 79.5 (C-5), 119.1 (C-5B), 128.1 (Ts-m), 144.1 (Ts-o), 136.1 (Ts), 141.3 (C-8B), 144.7 (Ts), 150.1 (C-4B), 153.3 (C-2B), 156.5 (C-6B)

**MS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*): 417 [(M+H)<sup>+</sup> 100%]; 439 [(M+Na)<sup>+</sup> 60%]

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): Calculated for C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>S [M+H]<sup>+</sup> 417.1340. Found 417.1349

**Procedure:** A solution of compound **92** (64 mg, 0.106 mmol) in a 1:1 mixture of TFA and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 mL) was stirred at room temperature for 1 h. After the solvents were evaporated, the resulting residue was purified by column chromatography (5% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) to afford **93** as a white solid (40 mg, 91%).

**(2*S*,3*S*,4*R*,5*S*)-2-(9-Adenylmethyl)-(3-*O*,5-*C*-methylene)pyrrolidine (94)**



**Molecular formula:** C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>

**R<sub>f</sub>** (10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.16

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -85 (c 0.5, MeOH)

**<sup>1</sup>H RMN** (D<sub>2</sub>O, 600.13 MHz): δ 3.38 (s, 1H, H-5), 3.52 (t, 1H, H-2, J<sub>HH</sub> 8.2 Hz), 3.76 (d, 1H, CH<sub>2</sub>O, J<sub>HH</sub> 8.4 Hz), 3.98 (m, 2H, CH<sub>2</sub>O + CH<sub>2</sub>N), 4.03 (s, 1H, H3), 4.10 (dd, 1H, CH<sub>2</sub>N, J<sub>HH</sub> 7.4 Hz, J<sub>HH</sub> 12.6 Hz), 4.28 (s, 1H, H-4), 7.98 (s, 1H, H-8B), 8.04 (s, 1H, H-2B)

**<sup>13</sup>C NMR** (D<sub>2</sub>O, 100.6 MHz): δ 46.0 (CH<sub>2</sub>N), 55.7 (C-5), 60.5 (C-2), 71.2 (C-4), 71.9 (CH<sub>2</sub>O), 78.8 (C-3), 118.0 (C-5B), 141.9 (C-8B), 148.6 (C-4B), 152.4 (C-2B), 155.2 (C-6B)

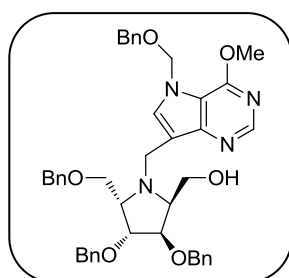
**MS** (ESI<sup>+</sup>, m/z): 263 [(M+H)<sup>+</sup> 100%]; 285 [(M+Na)<sup>+</sup> 25%]

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): Calculated for C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 263.1251. Found 263.1244

**Procedure:** A mixture of compound **93** (40 mg, 0.096 mmol) and Mg (turnings) was refluxed in dry MeOH (2 mL) for 2 h. MeOH was evaporated, and purification by column chromatography (10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) afforded **94** (19 mg, 79%) as a white solid.

## Experimental section

### (2*S*,3*R*,4*R*,5*S*)-3,4-bis(benzyloxy)-5-(benzyloxymethyl)-2-hydroxymethyl-*N*-(7-benzyloxymethyl-6-methoxy-9-deazapurin-9-yl)methylpyrrolidine (**99**)



**Molecular formula:** C<sub>43</sub>H<sub>47</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>

**R<sub>f</sub>** (5% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.44

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -30 (c 0.5, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

**<sup>1</sup>H RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 3.25 (m, 1H), 3.46 (tt, 1H, J<sub>HH</sub> 3.7 Hz), 3.57 (dd, 1H, J<sub>HH</sub> 3.7 Hz, J<sub>HH</sub> 10.1 Hz), 3.79 (m, 2H), 3.87 (dd, 1H, J<sub>HH</sub> 3.5 Hz, J<sub>HH</sub> 11.8 Hz), 4.10 (s, 3H), 4.19 (m, 3H), 4.38-4.77 (m, 7H), 4.68 (d, 1H, J<sub>HH</sub> 12.3 Hz), 4.73 (d, 1H, J<sub>HH</sub> 12.3 Hz), 5.60 (d, 1H, J<sub>HH</sub> 10.5 Hz), 5.66 (d, 1H, J<sub>HH</sub> 10.5 Hz), 7.17 (s, 1H), 7.21-7.38 (m, 20H), 8.55 (s, 1H)

**<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 41.8, 53.4, 57.3, 60.7, 62.6, 66.6, 69.9, 72.4, 72.8, 73.3, 82.3, 83.7, 115.3, 116.0, 127.2-128.3 (22C), 131.5, 136.8, 138.4, 138.6, 149.6, 150.0, 156.1

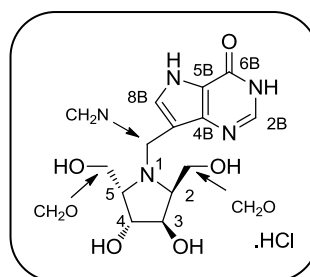
**MS** (ESI<sup>+</sup>, m/z): 715 [(M+H)<sup>+</sup> 100%]; 737 [(M+Na)<sup>+</sup> 10%]

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): Calculated for C<sub>43</sub>H<sub>47</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup> 715.3490. Found 715.3526

**Procedure:** Iminosugar **85** (90 mg, 0.21 mmol), sodium cyanoborohydride (0.36 mmol, 22 mg), and compound **98** (56 mg, 0.19 mmol) were dissolved in 4:1 mixture of MeOH and THF (4 mL). Three drops of acetic acid were added, and the solution was stirred at 40 °C overnight. Solvents were evaporated in vacuo, and the residue was purified by column chromatography (3% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) to give the coupled product **99** (113 mg, 84%).



**(2*S*,3*R*,4*R*,5*S*)-3,4-dihydroxy-2,5-bis(hydroxymethyl)-*N*-(9-deazahypoxanthin-9-yl)methylpyrrolidine  
(hydrochloride salt) (100·HCl)**



**Molecular formula:** C<sub>13</sub>H<sub>19</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>5</sub>

**R<sub>f</sub>** (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/aq NH<sub>3</sub>, 6:3:1): 0.19

$[\alpha]_D^{20} = +2$  (c 0.5, MeOH) gg

**<sup>1</sup>H RMN** (D<sub>2</sub>O, 600.13 MHz, 363 K): δ 3.80 (br s, 4H, CH<sub>2</sub>O), 4.58 (q, 2H, H-2 + H-5, *J*<sub>HH</sub> 5.3 Hz), 4.90 (d, 2H, H-3 + H-4, *J*<sub>HH</sub> 3.3 Hz), 5.10 (d, CH<sub>2</sub>N, 1H, *J*<sub>HH</sub> 13.4 Hz), 5.28 (d, 1H, CH<sub>2</sub>N, *J*<sub>HH</sub> 13.5 Hz), 8.22 (s, 1H, H-8B), 8.54 (s, 1H, H-2B)

**<sup>13</sup>C NMR** (D<sub>2</sub>O, 150.9 MHz): δ 45.9 (CH<sub>2</sub>N), 55.9 (2C, CH<sub>2</sub>O), 69.0 (C-2 + C-5), 74.6 (C-3 + C-4), 105.6 (C-9B), 117.7 (C-4B), 131.4 (C-8B), 143.1 (C-2B), 144.1 (C-5B), 155.1 (C-6B)

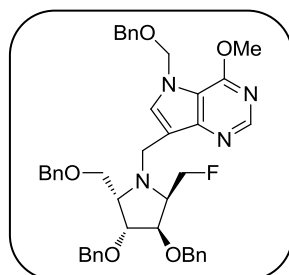
**MS** (APCI<sup>+</sup>, *m/z*): 311 [(M+H)<sup>+</sup> 20%]

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): Calculated for C<sub>13</sub>H<sub>19</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup> 311.1350. Found 311.1340

**Procedure:** Compound **99** (112 mg, 0.16 mmol) was heated under reflux in concentrated HCl (38%, 2 mL) for 2.5 h. After it was cooled, the solution was concentrated in vacuo and aqueous NH<sub>3</sub> (32%, 1 mL) was added to the residue. Water was evaporated, and the resulting solid was purified by column chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/aq NH<sub>3</sub>, 88:10:2) to afford **100** (36 mg, 74%), which was then converted with 10% aqueous HCl to **100**·HCl (white solid).

## Experimental section

### (2*S*, 3*R*, 4*R*, 5*S*)-3,4-bis(benzyloxy)-5-benzyloxymethyl-2-fluoromethyl-*N*-(7-benzyloxymethyl-6-methoxy-9-deazapurin-9-yl)methylpyrrolidine (**101**)



**Molecular formula:** C<sub>43</sub>H<sub>45</sub>FN<sub>4</sub>O<sub>5</sub>

**R<sub>f</sub>** (5% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.54

**<sup>1</sup>H RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 3.57 (m, 3H), 3.84 (dd, 1H, *J*<sub>HH</sub> 3.0 Hz, *J*<sub>HH</sub> 7.5 Hz), 4.13 (s, 3H), 4.15-4.64 (m, 13H), 4.75 (ddd, 1H, *J*<sub>HH</sub> 3.3 Hz, *J*<sub>HH</sub> 7.2 Hz, *J*<sub>HF</sub> 35.7 Hz), 5.67 (d, 1H, *J*<sub>HH</sub> 7.8 Hz), 5.71 (d, 1H, *J*<sub>HH</sub> 7.8 Hz), 7.22-7.40 (m, 21 H), 8.57 (s, 1H)

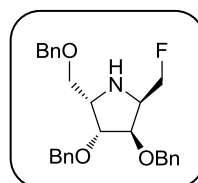
**<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 42.3, 53.51, 60.4, 61.2 (d, *J*<sub>CF</sub> 14.3 Hz), 68.0, 70.1, 72.8, 73.4, 77.0, 82.3 (d, *J*<sub>CF</sub> 126.8 Hz), 83.1, 83.5, 114.7, 114.8, 126.3-127.5 (22C), 131.2, 136.0, 137.5, 137.6, 148.9, 149.1, 155.2

**MS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*): 717 [(*M*+*H*)<sup>+</sup> 100%]

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): Calculated for C<sub>43</sub>H<sub>46</sub>FN<sub>4</sub>O<sub>5</sub> [*M*+*H*)<sup>+</sup> 717.3447  
715.3490. Found 717.3419

**Procedure:** DAST (40 μL, 0.24 mmol) was added dropwise to a stirred solution of compound **99** (100 mg, 0.14 mmol) in dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2.8 mL) at 0 °C. After 30 min, the reaction was quenched with water, solvents were evaporated and the residue purified by column chromatography to obtain **101** (28 mg, 28%). Alternatively, **101** can also be prepared from **102**: Sodium cyanoborohydride (8 mg, 0.13 mmol) was added to a stirred solution of **102** (31 mg, 0.07 mmol) and **98** (22 mg, 0.07 mmol) in a 4:1 mixture of MeOH and THF (2 mL). The reaction mixture was stirred overnight at 40 °C. Solvents were evaporated in vacuo, and the crude reaction was subjected to column chromatography (2% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) to afford **101** as a white foam (43 mg, 85%).

**(2*S*, 3*R*, 4*R*, 5*S*)-3,4-bis(benzyloxy)-5-benzyloxymethyl-2-(fluoromethyl)pyrrolidine (**102**)**



**Molecular formula:** C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>FNO<sub>2</sub>

**R<sub>f</sub>** (5% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.26

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -11 (c 1.0, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

**<sup>1</sup>H RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ .07 (br s, 1H), 3.56-3.81 (m, 4H), 4.05 (m, 2H), 4.38-4.71 (m, 8H), 7.28-7.40 (m, 15H)

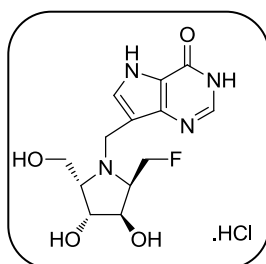
**<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 58.1 (d, J<sub>CF</sub> 20.4 Hz), 58.6, 71.2 (J<sub>CF</sub> 322.4 Hz), 72.3 (3C), 82.1, 82.3, 84.3, 127.6-128.5 (18C)

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): Calculated for C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>FNO<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 329.1786. Found: 329.1782

**Procedure:** DAST (33 μL, 0.20 mmol) was added dropwise to solution of compound **80** (80 mg, 0.14 mmol) in dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 mL) and the solution was stirred at 0 °C for 1h. The reaction was concentrated in vacuo, the crude product, without any purification, was dissolved in dry MeOH (2 mL), and Mg (33 mg, 1.4 mmol) was added to the solution. The mixture is refluxed for 2 h, solvents were evaporated, and the residue purified by column chromatography (5% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) to yield **102** (31 mg, 85%) as a viscous colorless oil.

## Experimental section

### (2*S*,3*R*,4*R*,5*S*)-5-Fluoromethyl-3,4-dihydroxy-5-hydroxymethyl-*N*-(9-deazahypoxanthin-9-yl)methylpyrrolidine (hydrochloride salt) (103·HCl)



**Molecular formula:** C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>ClFN<sub>4</sub>O<sub>4</sub>

**R<sub>f</sub>** (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/aq NH<sub>3</sub>, 6:3:1): 0.26

**<sup>1</sup>H RMN** (MeOH-*d*<sub>4</sub>, 300.13 MHz): δ 3.10 (dtt, *J*<sub>HH</sub> 2.4 Hz, *J*<sub>HH</sub> 7.0 Hz, *J*<sub>HF</sub> 38.1 Hz), 3.28 (m, 1H), 3.68 (dd, 1H, *J*<sub>HH</sub> 3.0 Hz, *J*<sub>HH</sub> 11.8 Hz), 3.82 (dd, 1H, *J*<sub>HH</sub> 4.1 Hz, *J*<sub>HH</sub> 11.8 Hz), 4.08-4.27 (m, 4H), 4.57 (ddd, 1H, *J*<sub>HH</sub> 2.4 Hz, *J*<sub>HH</sub> 7.0 Hz, *J*<sub>HF</sub> 46.1 Hz), 4.80 (ddd, 1H, *J*<sub>HH</sub> 2.6 Hz, *J*<sub>HH</sub> 10.1 Hz, *J*<sub>HF</sub> 46.1 Hz), 7.42 (s, 1H), 7.89 (s, 1H). For the chlorohydrate: <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O 300.13 MHz): δ 3.65 (br s, 4H), 4.05 (q, 1H, *J*<sub>HH</sub> 6.0 Hz), 4.24-4.39 (m, 3H), 4.62 (d, 1H, *J*<sub>HH</sub> 13.2 Hz), 4.76 (d, 1H, *J*<sub>HH</sub> 13.5 Hz), 7.42 (s, 1H), 7.88 (s, 1H)

**<sup>13</sup>C NMR** (D<sub>2</sub>O, 75.5 MHz): δ 46.3, 56.8, 69.2, 74.3 (2C), 78.4 (d, *J*<sub>CF</sub> 182.7 Hz), 104.3, 117.9, 131.8, 141.1, 143.6, 154.3

**MS** (APCI<sup>+</sup>, *m/z*): 335 [(M+Na)<sup>+</sup> 15%], 647 [(2M+Na)<sup>+</sup> 15%]

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>): Calculated for C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>FN<sub>4</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> 313.1307. Found 313.1296

**Procedure:** Concentrated HCl (2 mL) was added to a flask containing compound **101** (43 mg, 0.06 mmol). The mixture was refluxed for 2 h. After water was evaporated, aq. NH<sub>3</sub> (32%, 1 mL) was added to the residue and then, this mixture was concentrated under vacuo. The resulting residue was purified by column chromatography (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NH<sub>4</sub>OH 88:10:2) to afford **103** (16 mg, 84%), which was then converted with 10% aqueous HCl to **103**·HCl.