



Universidad de Oviedo

FACULTAD DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA E INORGÁNICA

**DESARROLLO DEL PROCESO DE 3'- Y
5'-LEVULINILACIÓN REGIOSELECTIVA
DE 2'-DESOXINUCLEÓSIDOS
UTILIZANDO BIOCATÁLISIS**

ALEJANDRO CARNERO MARTÍN

Máster Universitario en Síntesis y Reactividad Química

Trabajo Fin de Máster

Curso 2012-2013

D. **Alejandro Carnero Martín**, Licenciado en Química, ha realizado la Memoria titulada "DESARROLLO DEL PROCESO DE 3'- Y 5'-LEVULINILACIÓN REGIOSELECTIVA DE 2'-DESOXINUCLEÓSIDOS UTILIZANDO BIOCATÁLISIS" bajo la dirección de los profesores D. Miguel Ferrero Fuertes y Dña. Susana Fernández González, ambos Profesores Titulares de Química Orgánica del Departamento de Química Orgánica e Inorgánica de la Universidad de Oviedo.

Los Directores certifican que la citada Memoria ha sido realizada en el Departamento de Química Orgánica e Inorgánica de la Universidad de Oviedo bajo su dirección, autorizando su presentación para que sea calificada como **Trabajo Fin de Máster** del **Máster Universitario en Síntesis y Reactividad Química** correspondiente al Curso 2012-2013.

Oviedo, Julio 2013

Fdo.: Alejandro Carnero Martín

Fdo.: Prof. Miguel Ferrero

Fdo.: Prof. Susana Fernández

ÍNDICE

Introducción	1
I.1. Ácidos nucleicos.....	3
I.2. Componentes estructurales de los ácidos nucleicos	4
I.3. Nucleósidos modificados como agentes terapéuticos	5
I.3.1. Nucleósidos como antivirales.....	6
I.3.1.1. Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).....	6
I.3.1.2. Virus de la hepatitis B.....	8
I.3.1.3. Virus de la hepatitis C.....	9
I.3.1.4. Otros virus	9
I.3.2. Nucleósidos como antitumorales.....	9
I.4. Inhibición de la expresión génica	11
I.4.1. Oligonucleótidos <i>antisense</i>	11
I.5. Biocatálisis en síntesis orgánica	12
I.5.1. Lipasas.....	14
I.6. Empleo de enzimas en síntesis industrial	16
Antecedentes	19
A.1. Métodos de síntesis de 3'- y 5'- <i>O</i> -levulinil-2'-desoxinucleósidos	21
A.1.1. Síntesis de 3'- <i>O</i> -levulinilnucleósidos por métodos químicos convencionales	22
A.1.2. Síntesis de 5'- <i>O</i> -levulinilnucleósidos por métodos químicos convencionales	24
A.1.3. Síntesis de 3'- y 5'- <i>O</i> -levulinilnucleósidos mediante hidrólisis enzimática.....	25
A.1.4. Síntesis de 3'- y 5'- <i>O</i> -levulinilnucleósidos mediante acilación enzimática	26

Objetivos	27
Resultados y discusión	31
R.1. Síntesis de 3'- y 5'- <i>O</i> -levuliniltimidina	35
R.1.1. Acilación enzimática utilizando PSL: preparación de 3'- <i>O</i> -Lev-T	35
R.1.2. Acilación enzimática utilizando CAL-B: preparación de 5'- <i>O</i> -Lev-T	38
R.2. Síntesis de <i>N</i> ⁴ -benzoil-3'- y 5'- <i>O</i> -levulinil-2'-desoxicitidina.....	40
R.2.1. Acilación enzimática utilizando PSL: preparación de 3'- <i>O</i> -Lev-dC ^{Bz}	40
R.2.2. Acilación enzimática utilizando CAL-B: preparación de 5'- <i>O</i> -Lev- dC ^{Bz}	42
R.3. Síntesis de <i>N</i> ⁴ -benzoil-3'- y 5'- <i>O</i> -levulinil-2'-desoxiadenosina.....	44
R.3.1. Acilación enzimática utilizando PSL: preparación de 3'- <i>O</i> -Lev-dA ^{Bz}	44
R.3.2. Acilación enzimática utilizando CAL-B: preparación de 5'- <i>O</i> -Lev- dA ^{Bz}	46
R.4. Síntesis de <i>N</i> ² -isobutiril-3'- y 5'- <i>O</i> -levulinil-2'-desoxiguanosina.....	48
R.4.1. Acilación enzimática utilizando PSL: preparación de 3'- <i>O</i> -Lev-dG ^{Ibu}	48
R.4.2. Acilación enzimática utilizando CAL-B: preparación de 5'- <i>O</i> -Lev- dG ^{Ibu}	49
R.5. Síntesis de <i>N</i> -(4- <i>tert</i> -butilfenoxi)acetil-3'- y 5'- <i>O</i> -levulinil- 2'-desoxiguanosina	51
R.5.1. Acilación enzimática utilizando PSL: preparación de 3'- <i>O</i> -Lev-dG ^{Tac}	52
R.5.2. Acilación enzimática utilizando CAL-B: preparación de 5'- <i>O</i> -Lev- dG ^{Tac}	53
R.6. Estudio comparativo entre las síntesis de 5'- <i>O</i> -Lev- dG ^{Ibu} y 5'- <i>O</i> -Lev- dG ^{Tac}	54
R.7. Escalado de la síntesis de 5'- <i>O</i> -Lev- dG ^{Tac}	56
Conclusiones	59
Parte experimental	63
E.1. Disolventes y reactivos generales	65
E.2. Técnicas de análisis.....	66
E.3. Procedimientos sintéticos.....	68
E.3.1. Procedimiento general para la acilación enzimática de 2'-desoxinucleósidos 1a-e . Síntesis de los derivados 3'- <i>O</i> -levulinilo 2a-e y	

5'- <i>O</i> -levulinilo 3a-e	68
E.3.2. Síntesis de los 3',5'-di- <i>O</i> -levulinil-2'-desoxinucleósidos 4a-e	68
E.4. Datos experimentales	68
Parte espectral	85

INTRODUCCIÓN

I.1. 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 monómeros de ribosa como unidad estructural.

Ambos son moléculas fundamentales en todos los organismos vivos que 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.¹

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 variedad de muestras de ADN pertenecientes a diversas especies de organismos observó que siempre existía el mismo número de bases nitrogenadas púricas y pirimidínicas. Además, descubrió que el número de adeninas (A) siempre era igual al de timinas (T), y el de guaninas (G) al de citosinas (C), constituyendo lo que se conoce como la ley de equivalencia de bases de Chargaff.²

¹ F. Miescher, *Med.-Chem. Unters.* **1871**, 4, 441-460.

² a) E. Chargaff; E. Vischer, R. Doniger, C. Green, F. Misani, *J. Biol. Chem.* **1949**, 177, 405-416. b) E. Chargaff, R. Lipshitz, *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, 75, 3658-3661.

Por otro lado, Rosalind Franklin obtuvo la fotografía de la doble hélice de ADN, que mostraba que esta molécula posee una estructura helicoidal.³ Maurice Wilkins,⁴ que trabajaba con Franklin, mostró esta fotografía a Watson y Crick, que también estaban implicados en el estudio de la estructura del ADN.

Y es en 1953 cuando Watson y Crick publican en la revista *Nature* la famosa doble hélice del ADN.⁵ 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.

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).⁶



Figura 1. Dogma central de la Biología Molecular modificado.

I.2. COMPONENTES ESTRUCTURALES DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS

Desde el punto de vista químico, los ácidos nucleicos son polímeros lineales formados por monómeros llamados nucleótidos, que están constituidos por un nucleósido y un fosfato.⁷

³ R. E. Franklin, R. G. Gosling, *Nature* **1953**, *171*, 740-741.

⁴ M. H. Wilkins, A. R. Stokes, H. R. Wilson, *Nature* **1953**, *171*, 738-740.

⁵ a) J. D. Watson, F. H. Crick, *Nature*, **1953**, *171*, 964-967. b) J. D. Watson, F. H. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 737-738.

⁶ F. H. Crick, *Nature* **1970**, *227*, 561-563.

⁷ (a) R. Taylor, O. Kennard, *J. Mol. Struct.* **1982**, *78*, 1-28. (b) IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature, *Eur. J. Biochem.* **1983**, *131*, 9-15.

A su vez, los nucleósidos están compuestos por un azúcar y una base nitrogenada. Las bases nitrogenadas son estructuras heterocíclicas aromáticas y planas. Se clasifican en función de su estructura en bases púricas (derivadas de la purina) y bases pirimidínicas (derivadas de la pirimidina). Las bases nitrogenadas más comunes son adenina (A), guanina (G), citosina (C), timina (T) y uracilo (U) (Figura 2).

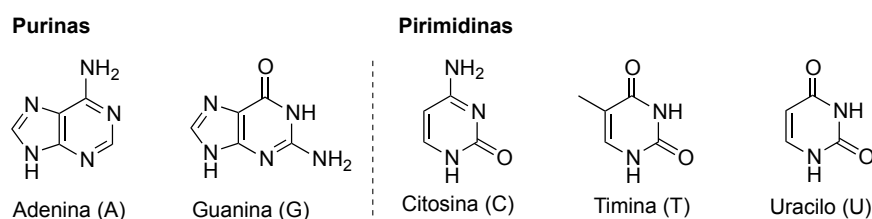


Figura 2. Estructura química de las bases nitrogenadas.

Las tres primeras bases (A, G y C) se encuentran en todos los ácidos nucleicos, mientras que la timina sólo está presente en el ADN y es sustituida por el uracilo en el ARN.

Las pentosas que aparecen en los ácidos nucleicos son la D-ribosa en el ARN y la 2'-desoxi-D-ribosa en el ADN. La numeración de la ribosa/desoxirribosa comienza por el carbono unido a la base, que se denomina 1', y sigue de tal manera que el carbono unido al grupo $-\text{CH}_2\text{OH}$ es el 4' (Figura 3).

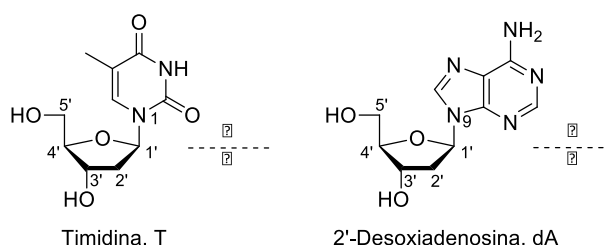


Figura 3. Estructura química y numeración de los nucleósidos.

I.3. NUCLEÓSIDOS MODIFICADOS COMO AGENTES TERAPÉUTICOS

Además de la función mostrada anteriormente como componentes estructurales de los ácidos nucleicos, los nucleósidos se pueden utilizar con fines médicos.

De hecho, los nucleósidos modificados son ampliamente reconocidos como una familia de compuestos con importantes aplicaciones terapéuticas.⁸ Así, pueden interferir con el ADN o ARN cuya replicación o transcripción se quiere inhibir, de forma que el nucleósido

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

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

I.3.1. Nucleósidos como antivirales

I.3.1.1. Virus de inmunodeficiencia humana (VIH)

El VIH, que es el 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 prolongan la esperanza de vida en personas infectadas por el VIH. Sin embargo, la enfermedad está aún lejos de la erradicación.

Para diseñar fármacos eficaces frente al VIH debe entenderse el mecanismo de multiplicación vírica y, de este modo, encontrar los focos adecuados de actuación (Figura 4).

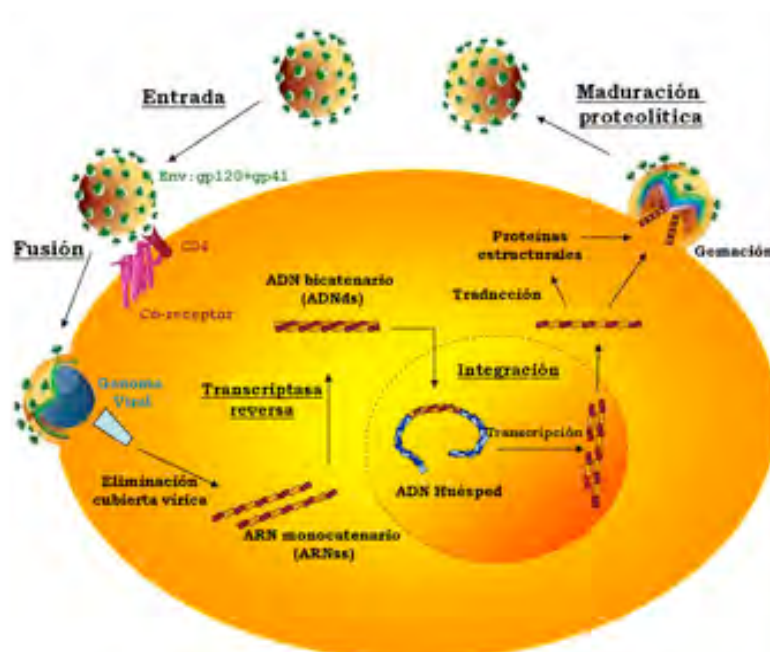


Figura 4. Ciclo de replicación del VIH.

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.

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.

Los nucleósidos son una piedra angular en el tratamiento de la infección por VIH.⁹ La Figura 5 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.

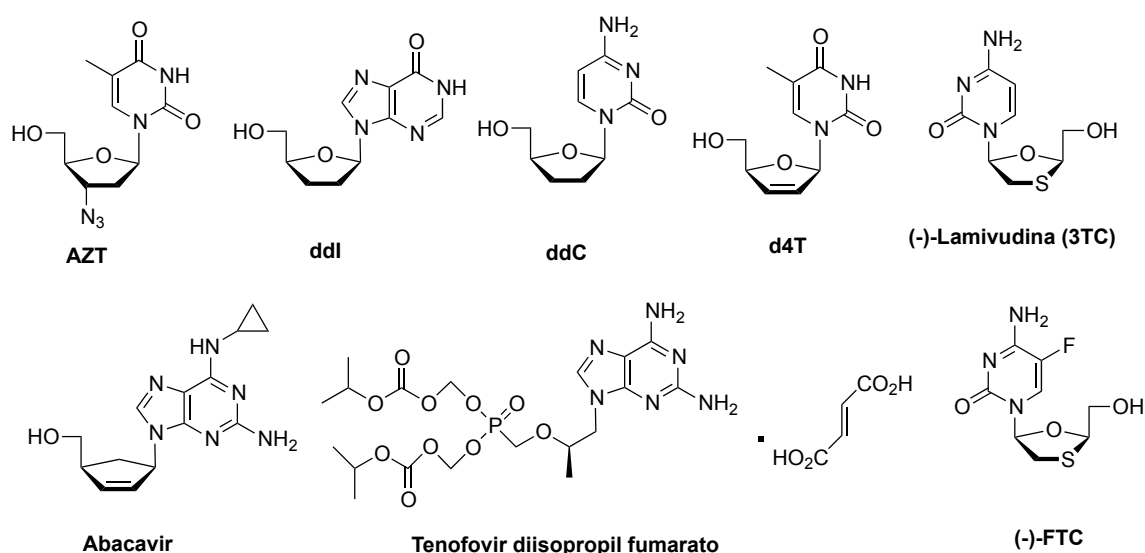


Figura 5. Análogos de nucleósido aprobados contra el VIH.

⁹ E. J. De Clercq, *J. Clin. Virol.* **2004**, *30*, 115-133. b) D. Warnke, J. Barreto, Z. J. Temesgen, *Clin. Pharmacol.* **2007**, *47*, 1570-1579.

El primero en salir al mercado fue la zidovudina (AZT) en 1987.¹⁰ Además, actualmente existen cuatro análogos de nucleósido en ensayos clínicos también como potentes agentes anti-VIH.¹¹

Con la excepción del tenofovir, el resto de los análogos mostrados en la Figura 5 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.¹²

Deben ser también sustratos adecuados para la transcriptasa inversa, que introduce 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.

1.3.1.2. Virus de la hepatitis B

La hepatitis B es una infección vírica del hígado. Este virus (*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.

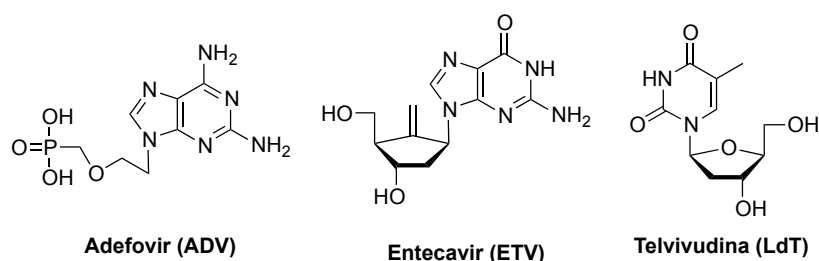


Figura 6. Fármacos aprobados para el tratamiento de la hepatitis B.

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.¹³ Existen siete medicamentos aprobados para el tratamiento de la

¹⁰ a) H. Mitsuya, K. Weinhold, P.A. Furman, M. H. St. Clair, S. N. Lehrman, R. C. Gallo, D. Bolognesi, D. W. Barry, S. Broder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, 82, 7096-7100. b) H. Nakashima, T. Matsui, S. Harada, N. Kobayashi, A. Matsuda, T. Ueda, N. Yamamoto, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1986**, 30, 933-937.

¹¹ <http://www.avert.org/>

¹² a) R. J. Arts, M. A. Wainberg, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1996**, 40, 527-540. b) R. P. Hertzberg, *Agents Interfering with DNA Enzymes*. In: *Comprehensive Medicinal Chemistry: The Rational Design, Mechanistic Study & Therapeutic Application of Chemical Compounds*, C. Hansch, P. G. Sammes, J. B. Taylor (Eds.); Pergamon Press, **1990**; Vol. 2, p. 753-789.

¹³ A. Sharon, C. K. Chu, *Antiviral Res.* **2008**, 80, 339-353.

enfermedad: dos tipos de α -interferón y los derivados de nucleósidos: lamivudina, tenofovir, adefovir, entecavir y telvivudina (Figuras 5 y 6).

I.3.1.3. Virus de la hepatitis C

La hepatitis C es también una enfermedad vírica hepática. 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 α -interferón y un derivado de nucleósido –ribavirina (Figura 7)- pueden curar la enfermedad, un elevado número de pacientes no responden al tratamiento.¹⁴ Esto hace que la búsqueda de antivirales más efectivos para tratar la hepatitis C sea actualmente un campo muy activo.

I.3.1.4. Otros virus

Los derivados de nucleósidos se emplean 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 7), un derivado acíclico de la guanósina.

De la misma manera, el ganciclovir –otro derivado acíclico de la guanósina– es efectivo para el tratamiento del citomegalovirus humano (*Human Citomegalovirus*, HCMV). La ribavirina se usa para el tratamiento del popular virus de la gripe.

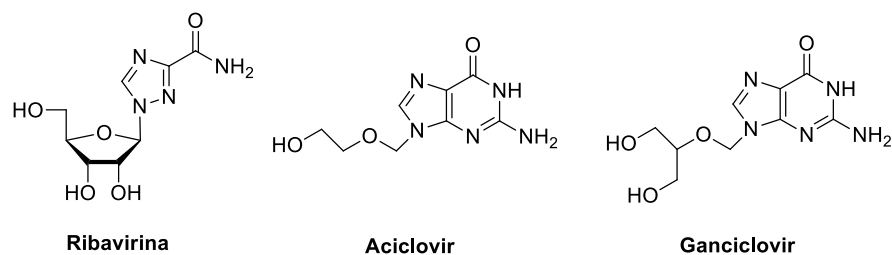


Figura 7. Derivados de nucleósidos utilizados en el tratamiento contra los virus: HCV, VZV, HSV, HCMV y la gripe.

I.3.2. Nucleósidos como antitumorales

Si los nucleósidos son potentes agentes antivirales, sus aplicaciones como agentes anticancerígenos son también extraordinarias.¹⁵ El cáncer es una de las principales causas de mortalidad, la segunda en los países desarrollados tras las enfermedades

¹⁴ C. Pierra, A. Amador, S. Benzaria, E. Cretton-Scott, M. D'Amours, J. Mao, S. Mathieu, A. Moussa, E. G. Bridges, D. N. Standring, J. P. Sommadossi, R. Storer, G. Gosselin, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6614-6620.

¹⁵ W. B. Parker, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2880-2883.

cardiovasculares, y 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 en torno al 20% de los fármacos comercializados para tratar esta enfermedad (Figura 8).

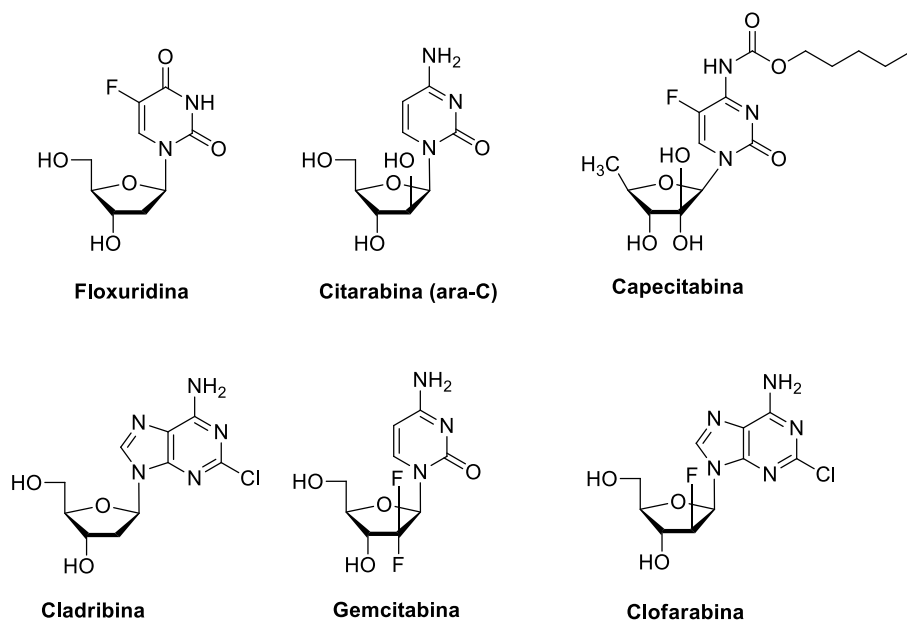


Figura 8. Estructura de algunos nucleósidos aprobados para el tratamiento del cáncer.

El mecanismo de acción de los derivados de nucleósido es bastante similar. Estos compuestos entran en las células –ayudados por los transportadores de membrana¹⁶ 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 organismo comparten las mismas rutas metabólicas, muestran tal diversidad de aplicaciones, siendo activos para determinados tipos de cáncer.¹⁷

El principal inconveniente que tienen estos derivados es que compiten con los nucleósidos naturales, interactuando con enzimas celulares e induciendo su citotoxicidad.

¹⁶ J. Zhang, F. Visser, K. M. King, S. A. Baldwin, J. D. Young, C. E. Cass, *Cancer Metastasis Rev.* **2007**, *6*, 85-110.

¹⁷ D. Sampath, V. A. Rao, W. Plunkett, *Oncogene* **2003**, *22*, 9063-9074.

I.4. 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. 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, es decir, 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 una enfermedad tras su traducción a la proteína. 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.¹⁸

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.

I.4.1. 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 9) y la segunda es por

¹⁸ *Therapeutic Oligonucleotides*; J. Kurreck (Ed.); RSC Publishing: Cambridge, 2008.

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*.

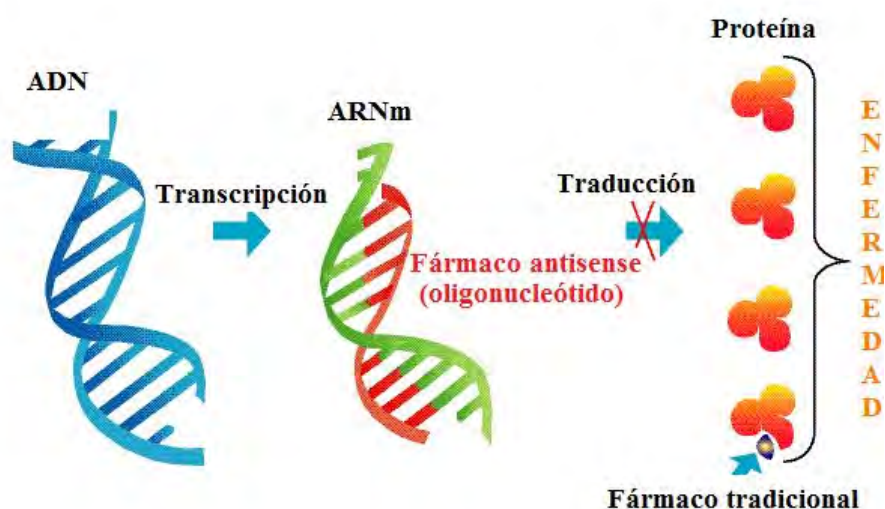


Figura 9. Mecanismo de acción por bloqueo de los oligonucleótidos *antisense*.

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.¹⁹

I.5. BIOCATALISIS EN SÍNTESIS ORGÁNICA

La biocatálisis estudia el uso de enzimas (bien sea en forma aislada o células enteras) como catalizadores en reacciones químicas.

Las enzimas son proteínas que catalizan determinados procesos biológicos cuyas características principales son.²⁰

¹⁹ a) J. H. Chan, S. Lim, W. F. Wong, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2006**, *33*, 533. b) N. M. Dean, C. F. Bennett, *Oncogene* **2003**, *22*, 9087-9096. c) Y. Fichou, C. Ferec, *Trends Biotechnol.* **2006**, *24*, 563-570. d) E. R. Rayburn, R. Zhang, *Drug Discovery Today* **2008**, *13*, 513-521. e) A. Van Aerschot, *Antiviral Res.* **2006**, *71*, 307-316. g) Y. C. Zhang, M. M. Taylor, W. K. Samson, M. I. Phillips, *Antisense Therapeutics*; Humana Press: Totowa, **2005**; p 11.

²⁰ (a) C.-H. Wong, G. M. Whitesides, *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry*, Eds. Elsevier Science Ltd.: Oxford, **1994**. (b) D. Voet, J. G. Voet *Biochemistry*, 2ª ed., Eds. John Wiley & Sons, Inc.: New York, **1995**.

1. Aumentan considerablemente la velocidad de reacción, llegando a ser entre 10^6 y 10^{14} órdenes de magnitud superior que las de las mismas reacciones sin catalizar.
2. Se utilizan en condiciones de reacción suaves, con temperaturas por debajo de $100\text{ }^\circ\text{C}$,²¹ normalmente alrededor de $30\text{ }^\circ\text{C}$, presión atmosférica y a pH neutro.
3. Ofrecen la posibilidad de llevar a cabo modificaciones en su centro activo, lo que supone un avance en el desarrollo de nuevos catalizadores biológicos. Se ha hecho posible la síntesis de enzimas con modificaciones puntuales para aumentar su especificidad de sustrato y su actividad catalítica.²²
4. Pueden recuperarse y reutilizarse varias veces, sobre todo en aquellos casos que están soportados sobre una resina polimérica.
5. Las enzimas no poseen los problemas de biodegradabilidad que poseen los catalizadores químicos, lo que es muy importante desde el punto de vista medioambiental (química limpia).

En las dos últimas décadas, los biocatalizadores se han consolidado como una herramienta más en síntesis orgánica debido al descubrimiento de su actividad en disolventes orgánicos.²³ En un principio se pensaba que estos catalizadores sólo se podían usar en medio acuoso, con los inconvenientes que esto conllevaba si lo que se pretendía era hacer reacciones con sustratos hidrofóbicos o inestables en ese medio. Pero se comprobó que las enzimas sólo necesitan una pequeña cantidad de agua para mantener su conformación nativa, que recibe el nombre de capa esencial de agua, y el resto puede ser reemplazado por un disolvente orgánico.

Así, los disolventes orgánicos más adecuados suelen ser los hidrófobos, ya que no extraen el agua esencial del enzima.

Las ventajas más importantes que se pueden destacar del uso de los biocatalizadores en disolventes orgánicos son:

1. Los sustratos orgánicos, normalmente hidrofóbicos, se disuelven mucho mejor.
2. Se eliminan reacciones laterales no deseadas debidas al agua.

²¹ A. Zaks, A. M. Klibanov, *Science* **1984**, *224*, 1249-1251.

²² K. M. Koeller, C.-H. Wong, *Nature* **2001**, *409*, 232-240.

²³ (a) A. Zaks, A. M. Klibanov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 3192-3196. (b) A. M. Klibanov, *Nature* **2001**, *409*, 241-246.

3. Se facilita el aislamiento y purificación de los productos finales de reacción.
4. Se incrementa la estabilidad térmica de las enzimas, soportando temperaturas superiores a 100 °C durante más tiempo.
5. Como las enzimas son insolubles en el medio orgánico, actúan en suspensión y pueden recuperarse del medio por simple filtración. En muchos casos, además, el enzima puede reutilizarse sin tratamientos adicionales.²⁴

No obstante, también presentan una serie de desventajas, ya que suelen mostrar una gran especificidad de sustrato, algunas clases de enzimas necesitan un cofactor y/o cosustrato para su correcto funcionamiento, actúan en un determinado intervalo de pH y temperatura fuera del cual no son activos, y por último, pueden presentar problemas de inhibición por sustrato o producto en algunos casos.²⁵

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: oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas.

Las enzimas con más aplicaciones en Química Orgánica son las lipasas (EC 3.1.1.3) – pertenecientes al grupo de las hidrolasas–, que tienen como función natural la hidrólisis de triglicéridos.

Al descubrir que podían ser también activas en medios orgánicos,²⁶ el agua puede ser reemplazada por otros nucleófilos como alcoholes, aminas, amoniaco, hidracinas, perácidos y tioles, lo que permite la preparación de un gran número de compuestos orgánicos.

I.5.1. Lipasas

Se han caracterizado un gran número de ellas, se ha comprobado su eficacia y especificidad²⁷ y poseen una serie de características únicas que las hace sumamente interesantes para su uso en síntesis orgánica.

²⁴ (a) A. Zaks, A. M. Klibanov, *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 3194-3201. (b) A. Zaks, A. M. Klibanov, *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 8017-8021.

²⁵ S. E. Hilner, A. R. Maguire, *Arkivoc* **2012** (i), 321-382.

²⁶ G. Kirchner, M. P. Scollar, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 7072-7076.

²⁷ R. D. Schmid, R. Verger, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1998**, 37, 1609-1633.

Destaca su capacidad de adoptar diferentes conformaciones en su centro activo, lo que se traduce en una gran versatilidad frente a sustratos de muy variada naturaleza y complejidad.²⁸ Les permite aceptar diversos nucleófilos, como el agua (reacciones de hidrólisis), alcoholes (reacciones de transesterificación), aminas (reacciones de aminólisis), peróxidos o tioles.

Por otra parte, el aspecto más importante de este tipo de enzimas, desde un punto de vista químico, es su especificidad por el sustrato. Las lipasas presentan altas quimio-, regio- y estereoselectividades frente a sus sustratos:

- **Quimioselectividad:** en sustratos con varios grupos funcionales susceptibles de sufrir reacción, las lipasas pueden actuar sobre un único grupo funcional.²⁹
- **Regioselectividad:** viene determinada por la capacidad de la enzima de diferenciar grupos funcionales iguales, dependiendo de su posición en la molécula.³⁰
- **Enantioselectividad:** casi todas las enzimas derivan de L-aminoácidos y como consecuencia de ello, cualquier tipo de quiralidad presente en el sustrato es reconocida en el momento de la formación del complejo enzima-sustrato. De este modo, se pueden resolver mezclas de enantiómeros mediante catálisis enzimática, debido simplemente a que uno de los enantiómeros reacciona más rápido que el otro, lo que se denomina resolución cinética. Algunos de estos casos permiten reacciones espectaculares que alcanzan hasta el 100% de conversión, de manera que a medida que el enantiómero que reacciona más rápido se va consumiendo, el otro se va transformando en él. Este proceso se denomina resolución cinética dinámica.³¹

Las lipasas de *Candida antarctica* de tipo A y B (CAL-A y CAL-B) y de *Pseudomonas cepacia* (PSL, también nombrada recientemente como lipasa de *Burkholderia cepacia*.) son, con diferencia, las más ampliamente utilizadas como biocatalizadores en procesos de síntesis orgánica. Así, presentan las siguientes ventajas:

1. Disponibilidad comercial a bajo coste.

²⁸ K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, 4^a ed.; Springer: Berlin, 2000.

²⁹ N. Chinsky, A. L. Margolin, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 386-388.

³⁰ I. Lavandera, S. Fernández, M. Ferrero, V. Gotor, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 4079-4082.

³¹ K. Faber, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 5004-5010.

2. No necesitan cofactor para su correcto funcionamiento.
3. Muestran altos valores de actividad en disolventes orgánicos.

I.6. EMPLEO DE ENZIMAS EN SÍNTESIS INDUSTRIAL

El número de biotransformaciones aplicadas en síntesis industrial ha crecido rápidamente en las últimas décadas y se espera que continúe su crecimiento. Como se puede observar en la Figura 10, en dos décadas se ha quintuplicado el número de procesos industriales que se llevan a cabo utilizando biocatalizadores.

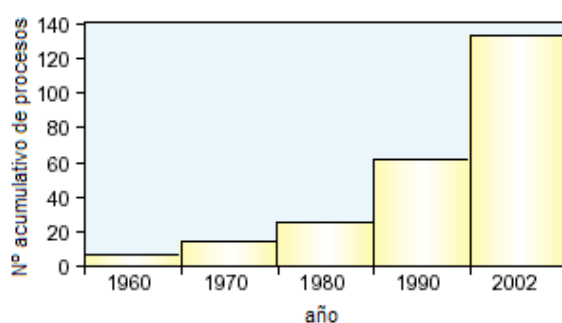


Figura 10. Número acumulado de biotransformaciones a escala industrial.

Actualmente, un gran número de empresas (químicas y farmacéuticas) están empleando reacciones catalizadas por enzimas para la producción a gran escala de productos con alto valor añadido.

Sin embargo, debido a la confidencialidad por parte de las empresas, suele ser muy difícil obtener información sobre estos procesos e incluso sobre los sustratos y enzimas utilizados.³² El análisis de estos procesos industriales revela que están dirigidos, mayoritariamente, a la preparación de productos naturales o de sus derivados (Figura 11).



Figura 11. Tipo de compuestos sintetizados mediante biotransformaciones.

³² (a) G. Carrea, S. Riva, *Angew. Chem., Int. Ed. Eng.* **2000**, *39*, 2226-2254. (b) A. J. J. Straathof, S. Panke, A. Schmid, *Curr. Opin. Biotech.* **2002**, *13*, 548-556.

Los derivados de ácidos grasos y carbohidratos son empleados mayoritariamente en el sector alimentario, mientras que los otros tipos de compuestos tienen su aplicación en la agricultura y el sector farmacéutico. Este último sector domina en cuanto a las aplicaciones enzimáticas, las cuales están dirigidas fundamentalmente a la síntesis de compuestos enantioméricamente puros. Para ello, se suele recurrir a las resoluciones cinéticas y a la síntesis asimétrica.

Los principales parámetros técnicos que influyen en los costes de una biotransformación, a nivel industrial, son:

1. Productividad: una alta productividad viene asociada a unos costes bajos.
2. Concentración del producto: que influye en la facilidad de recuperar y purificar el producto.
3. Rendimiento: el cual está determinado por el coste de la materia prima y la cantidad de subproductos formados en la reacción.
4. Consumo del biocatalizador.

La industria química usa las biotransformaciones para manufacturar productos a escala de 100 (a veces 10.000) toneladas por año. La escala en las compañías farmacéuticas varía entre 1 y 100 kg por año, lo cual viene determinado por la franja de tiempo en la que sea necesario suministrar productos para ensayos clínicos.

ANTECEDENTES

Uno de los mayores retos en Química Orgánica es la búsqueda de nuevas rutas sintéticas selectivas que permitan obtener compuestos de alto valor añadido. En este sentido, la metodología enzimática y, en concreto, el empleo de lipasas en disolventes orgánicos ofrece una gran versatilidad para este fin.

En esta Memoria se aborda la preparación de 3'- y 5'-*O*-levulinil-2'-desoxinucleósidos, por lo que a continuación se exponen las características de estos compuestos así como los ejemplos existentes en la bibliografía sobre su preparación.

A.1. MÉTODOS DE SÍNTESIS DE 3'- Y 5'-*O*-LEVULINIL-2'-DESOXINUCLEÓSIDOS

La modificación selectiva de nucleósidos, por introducción de un fragmento acilo en grupos funcionales con reactividades similares, supone un reto interesante para los químicos orgánicos. Además, los monómeros protegidos selectivamente se utilizan como precursores para la preparación de oligonucleótidos. De entre los escasos grupos protectores disponibles, el grupo levulinilo (Lev= -COCH₂CH₂COCH₃) resulta el más adecuado para proteger los grupos hidroxilo del azúcar debido a su estabilidad en las condiciones en las que se lleva a cabo el acoplamiento de estos monómeros de nucleósido para la síntesis de oligos. Además, puede ser eliminado selectivamente sin afectar a otros grupos protectores presentes en la molécula tales como el DMTr, protecciones sobre el grupo amino presente en la base o grupos protectores sobre el fosfato internucleotídico.³³

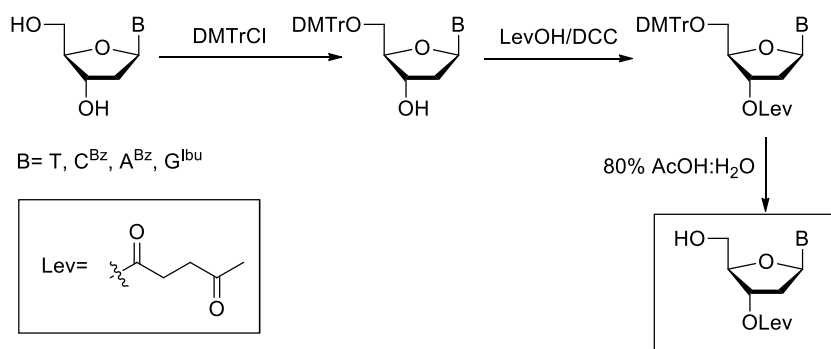
³³ (a) J. H. van Boom, P. M. J. Burgess, C. H. M. Verdegaal, G. Wille, *Tetrahedron* **1978**, *34*, 1999-2007. (b) G. Kumar, L. Celewicz, S. J. Chladek, *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 634-644.

Por tanto, centrándonos en el grupo levulinilo, se hará un breve repaso entre los escasos métodos de preparación de nucleósidos protegidos con este grupo tanto en la posición 3' como la posición 5'.

A.1.1. Síntesis de 3'-*O*-levulinilnucleósidos por métodos químicos convencionales

En 1984, Kumar y Poonian³⁴ sintetizaron una serie de 2'-desoxinucleósidos protegidos en el alcohol secundario con el grupo levulinilo para, posteriormente, obtener dinucleótidos *N,N*-dialquilfósforoamiditos y estudiar su aplicación en la síntesis en fase sólida.

En el Esquema 1 se muestra la ruta sintética para estos monómeros, que consta de tres etapas y que utiliza como materiales de partida 2'-desoxinucleósidos protegidos en el grupo amino exocíclico de la base (A^{Bz} , C^{Bz} y G^{Ibu}). En primer lugar, se protege selectivamente el hidroxilo primario por reacción con cloruro de 4,4-dimetoxitritilo. Una vez obtenido el producto puro se acila el hidroxilo secundario haciendo reaccionar el alcohol en posición 3' con ácido levulínico y dicitclohexilcarbodiimida como agente de condensación, formándose el levulinato en la posición 3'. La desprotección selectiva del grupo DMTr con ácido acético al 80%, daría lugar a los correspondientes 3'-*O*-levulinilnucleósidos.



Esquema 1. Síntesis de 3'-*O*-levulinilnucleósidos utilizando LevOH.

Los rendimientos de estas etapas son buenos, pero las limitaciones más importantes de esta estrategia son:

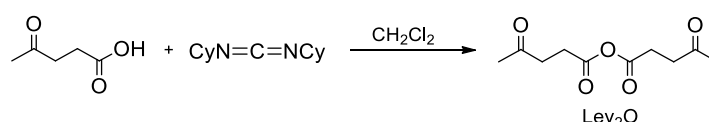
- Se llevan a cabo varias etapas de protección-desprotección empleando reactivos caros como el cloruro de 4,4-dimetoxitritilo.

³⁴ G. Kumar, M. S. Poonian, *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 4905-4912.

- Se necesitan aislar tanto los intermedios como los productos finales mediante cromatografía de columna. Esto, desde un punto de vista industrial, se debería evitar.

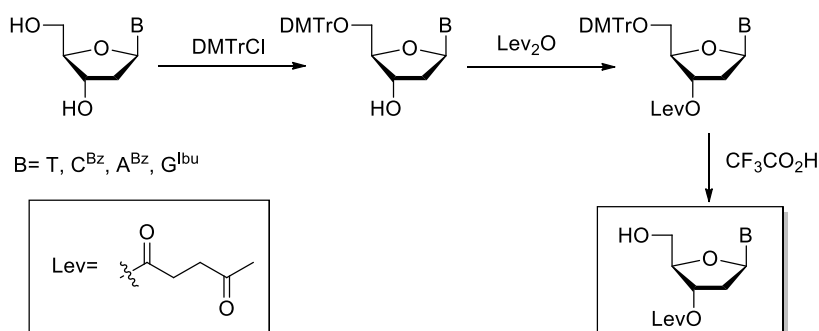
Esta misma metodología también ha sido utilizada por Ravikumar y col.³⁵ en la síntesis de fósforoamiditos dímeros y trímeros como precursores en la preparación de oligonucleótidos fósforotioatos.

Posteriormente, Reese y Song³⁶ y Ravikumar *et al.*³⁷ publican sendos trabajos donde desarrollan una estrategia para la obtención de 3'-*O*-levulinil-2'-desoxinucleósidos y 3'-*O*-levulinilribonucleósidos similar a la descrita anteriormente. La única diferencia radica en que la formación del levulinato en el grupo hidroxilo en posición 3' se hace por reacción con anhídrido levulínico (Lev₂O), el cual ha de prepararse previamente a partir del ácido levulínico y la dicitclohexilcarbodiimida (Esquema 2).



Esquema 2. Síntesis del anhídrido levulínico.

Las limitaciones de esta ruta, además de las descritas anteriormente, son la necesidad de preparar previamente el anhídrido levulínico y la inestabilidad de este reactivo, que descompone con el tiempo (Esquema 3).



Esquema 3. Síntesis de 3'-*O*-levulinilnucleósidos utilizando Lev₂O.

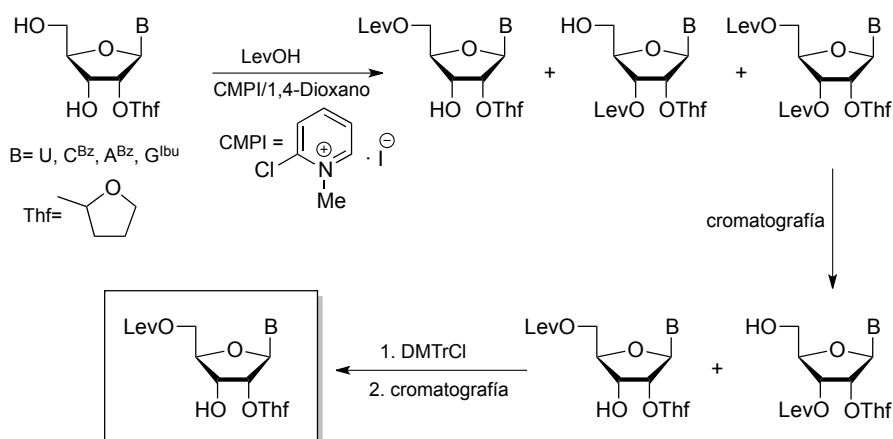
³⁵ (a) A. H. Krotz, P. Klopchin, D. L. Cole, V. T. Ravikumar, *Nucleosides Nucleotides* **1997**, *16*, 1637-1640. (b) A. Eleuteri, Z. S. Cheruvallath, D. C. Capaldi, D. L. Cole, V. T. Ravikumar, *Nucleosides Nucleotides* **1999**, *18*, 1803-1807.

³⁶ C. B. Reese, Q. Song, *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 963-971.

³⁷ A. Eleuteri, D. C. Capaldi, D. L. Cole, V. T. Ravikumar, *Nucleosides Nucleotides* **1999**, *18*, 475-483.

A.1.2. Síntesis de 5'-*O*-levulinilnucleósidos por métodos químicos convencionales

Ohtsuka y col.³⁸ prepararon una serie de derivados 5'-*O*-levulinilnucleósidos siguiendo una ruta que se detalla en el Esquema 4. En primer lugar, se hacen reaccionar los ribonucleósidos 2',*N*-diprotegidos con ácido levulínico y yoduro de 2-cloro-1-metilpiridinio (CMPI), obteniéndose una mezcla de los correspondientes monómeros 3'-*O*-levulinil, 5'-*O*-levulinil y 3',5'-di-*O*-levulinilnucleósidos. Después de separar el derivado dilevulinico por cromatografía de columna, se protege selectivamente, sobre la mezcla de monómeros monoprotegidos, el alcohol primario con DMTrCl, pudiendo ahora separar los monómeros 5'-*O*-dimetoxitritil-3'-*O*-levulinil y 5'-*O*-levulinilnucleósidos por cromatografía de columna en fase reversa y obtener así el derivado 5'-*O*-levulinilo protegido.



Esquema 4. Síntesis de 5'-*O*-levulinilnucleósidos.

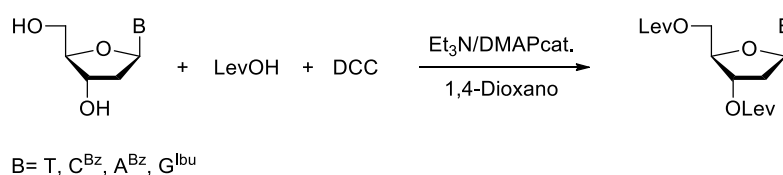
Las limitaciones de este procedimiento son, además de las que se han expuesto para la síntesis de los derivados 3'-*O*-levulinilnucleósidos, los bajos rendimientos (cercaos al 30%) y las múltiples etapas necesarias para la obtención de los correspondientes monómeros.

De esta forma, se puede observar que dichos métodos de síntesis de 3'- y/o 5'-*O*-levulinilnucleósidos no resultan adecuados para su producción a gran escala.

³⁸ (a) S. Iwai, E. Ohtsuka, *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 9443-9456. (b) S. Iwai, S. Toshiro, E. Ohtsuka, *Tetrahedron* **1990**, *46*, 6673-6688.

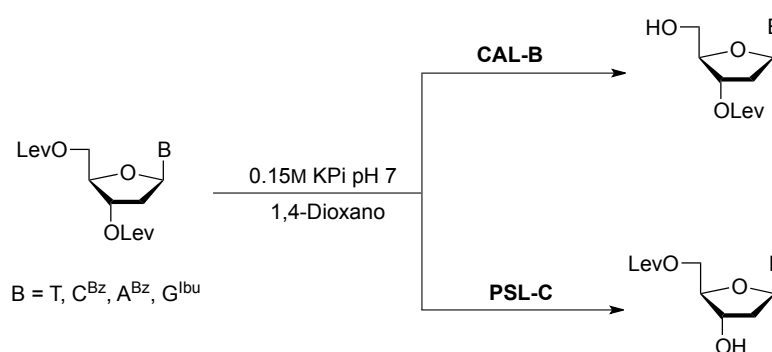
A.1.3. Síntesis de 3'- y 5'-*O*-levulinilnucleósidos mediante hidrólisis enzimática

Otra forma de obtener estos nucleósidos protegidos selectivamente es mediante la hidrólisis regioselectiva de 3',5'-di-*O*-levulinilnucleósidos haciendo uso del potencial de las enzimas para catalizar reacciones regioselectivas en compuestos polifuncionales.³⁹ Así, esta ruta quimioenzimática se inicia con la síntesis del nucleósido diacilado de manera convencional. Para ello, se emplea ácido levulínico y diciclohexilcarbodiimida, que da lugar a los derivados 3',5'-di-*O*-levulinil con rendimientos prácticamente cuantitativos (Esquema 5).



Esquema 5. Síntesis de 3',5'-di-*O*-levulinil-2'-desoxinucleósidos.

A continuación, mediante un proceso de hidrólisis utilizando un biocatalizador adecuado se obtienen los correspondientes derivados 3'- o 5'-acilados. (Esquema 6).



Esquema 6. Hidrólisis enzimática de los 3',5'-di-*O*-levulinil-2'-desoxinucleósidos.

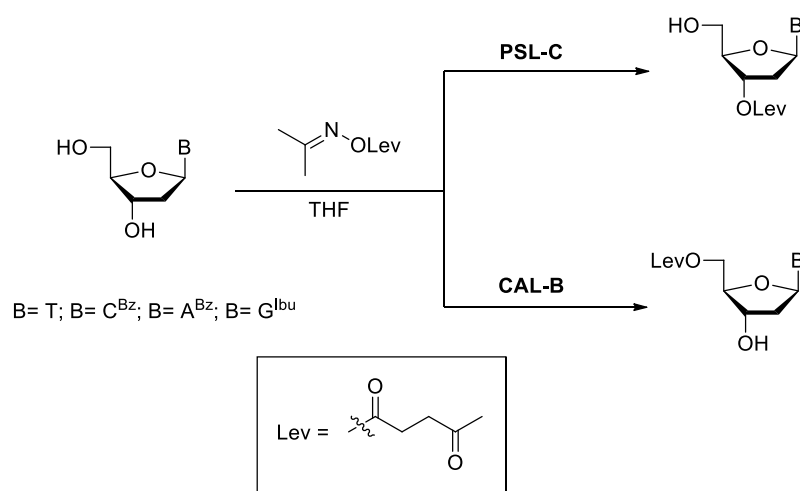
Así, cuando se utiliza la lipasa de *Candida antarctica* B (CAL-B) se obtiene una excelente regioselectividad hacia la hidrólisis del grupo levulinilo en la posición 5', aisándose los derivados 3'-*O*-levulinil con altos rendimientos. Por otra parte, la lipasa de *Pseudomonas cepacia* inmovilizada (PSL-C) y la lipasa de *Candida antarctica* A (CAL-A) muestran una selectividad opuesta a la CAL-B, catalizando la preparación de los correspondientes derivados 5'-*O*-levulinil con excelentes rendimientos. La única limitación del proceso es que los derivados *N*-protegidos de la citidina y de la adenosina no son

³⁹ J. García, S. Fernández, M. Ferrero, Y. S. Sanghvi, V. Gotor, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 4513-4519.

sustratos adecuados para la CAL-B. Sin embargo, la PSL-C o la CAL-A hidrolizan regioselectivamente los sustratos que poseen la base protegida.

A.1.4. Síntesis de 3'- y 5'-*O*-levulinilnucleósidos mediante acilación enzimática

Como hemos mencionado anteriormente, otra forma de sintetizar estos compuestos es mediante la acilación enzimática regioselectiva.⁴⁰ Este proceso enzimático para sintetizar 3'- y 5'-*O*-levulinilnucleósidos se realiza en una sola etapa utilizando levulinato de acetoxima como agente de acilación.⁴¹ La reacción enzimática de acilación sobre los nucleósidos, revela que la lipasa de *Pseudomonas cepacia* inmovilizada (PSL-C) cataliza con excelente regioselectividad la acilación del grupo hidroxilo en la posición 3', obteniéndose los derivados 3'-*O*-levulinilnucleósidos (Esquema 7).



Esquema 7. Acilación enzimática en nucleósidos con ésteres de oxima.

Por otra parte, la lipasa de *Candida antarctica* B (CAL-B) muestra una selectividad opuesta a la PSL-C, aislándose los correspondientes derivados 5'-*O*-levulinilnucleósidos, en ambos casos, con excelentes rendimientos.

Además, se resuelve la limitación existente en el proceso de hidrólisis enzimática, ya que los derivados *N*-protegidos en la base de la citidina y de la adenosina son sustratos adecuados para la acilación enzimática con PSL-C.

⁴⁰ J. García, S. Fernández, M. Ferrero, Y. S. Sanghvi, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 3533-3540.

⁴¹ I. Lavandera, J. García, S. Fernández, M. Ferrero, V. Gotor, Y. S. Sanghvi, *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry* **2005**, 2.11.1-2.11.36.

OBJETIVOS

En la introducción de este trabajo se ha puesto de manifiesto la importancia de los distintos análogos de nucleósido como importantes agentes antivirales y antitumorales, así como unidades estructurales de los oligonucleótidos. Por ello, basándonos en los antecedentes anteriormente mostrados, los objetivos que nos planteamos en esta Memoria son los siguientes:

- Optimización de la preparación de los derivados 3'- y 5'-*O*-levulinil-2'-desoxinucleósidos en procesos discontinuos, encontrando las condiciones óptimas de concentración y temperatura, así como del tiempo de reacción, para aumentar en lo posible las conversiones hacia los productos de interés.

- Se ensayarán diferentes preparados comerciales enzimáticos de las lipasas de *Candida antarctica* tipo B (CAL-B) y de *Pseudomonas cepacia* (PSL) para encontrar el catalizador más eficaz para llevar a cabo estas biotransformaciones.

- Encontrar una enzima que sustituya a la *Pseudomonas cepacia* inmovilizada sobre partículas de cerámica (PSL-C), que mostraba unos excelentes resultados de regioselectividad y rendimiento en las reacciones de acilación sobre los nucleósidos, ya que ha dejado de comercializarse.

Este estudio, junto con el del proceso de aislamiento y purificación de los productos finales, con el objeto de hacer un escalado de las reacciones y recuperar los reactivos no transformados en la síntesis, servirá como base para el desarrollo de un proceso en flujo continuo con vistas a su implantación industrial.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo se pretende sintetizar los derivados 3'- y 5'-*O*-levulinil-2'-desoxinucleósidos con las cuatro bases nitrogenadas más comunes en el ADN, es decir, se estudiarán los nucleósidos de timina (timidina, T), citosina (desoxicidina, dC), adenina (desoxiadenosina, dA) y guanina (desoxiguanosina, dG), de la manera más eficiente y sencilla para poder desarrollar el proceso a escala industrial. Al conjunto de estas actuaciones, cuyo objetivo final es la optimización de la síntesis, se las denomina **desarrollo del proceso**, en el cual se tendrán en cuenta factores como temperatura, relación de reactivos/catalizadores, concentración, tiempo de reacción, reutilización de reactivos/catalizadores, etc...

A la vista de los antecedentes relacionados con las reacciones de acilación enzimática en nucleósidos, en nuestro grupo de investigación^{7,8,9} se decide emplear el THF como disolvente para estos procesos, ya que mantiene la actividad de las lipasas siendo los nucleósidos parcialmente solubles. Otro factor a tener en cuenta es que el disolvente debe estar exento de humedad con el fin de evitar la posible hidrólisis de los productos o de los agentes de acilación.

Para estos estudios utilizaremos diferentes preparados enzimáticos de la lipasa de *Candida antarctica* del tipo B (CAL-B) y la lipasa de *Pseudomonas cepacia* (PSL) con el fin de determinar cuál es el más adecuado para realizar el proceso de acilación regioselectiva enzimática teniendo en cuenta que el fin último es el escalado del proceso. Las reacciones se llevarán a cabo para los nucleósidos que están presentes en el ADN, es decir, timidina, 2'-desoxicitidina, 2'-desoxiadenosina, y 2'-desoxiguanosina. Los tres últimos poseen el grupo amino exocíclico de la base protegido, ya que es la forma habitual en la que se utilizan como precursores de oligonucleótidos. El agente de acilación será el levulinato de acetoxima.

En cuanto a las enzimas CAL-B y PSL, se usarán cuatro tipos diferentes de CAL-B y tres tipos de PSL, cada uno en un soporte polimérico distinto que confiere al enzima propiedades características que afectarán al rendimiento o a la selectividad de la reacción.

Los preparados que vamos a utilizar de CAL-B son los siguientes:

- CAL-B Novozym 435, de la empresa Novo Nordisk, está inmovilizada por adsorción sobre la resina Lewait E (nos referiremos a esta enzima simplemente como CAL-B).
- CAL-B experimental adsorbida en una matriz acrílica, proporcionada por la empresa SPRINzymes (a la que llamaremos CAL-B1).
- LCAHNHE, es una CAL-B adsorbida en una resina de poliestireno comercializada por SPRINzymes (para abreviar la denominaremos CAL-B2).
- LCAME, CAL-B inmovilizada covalentemente sobre una resina epoxi acrílica, también de SPRINzymes y a la que nos referiremos como CAL-B3.

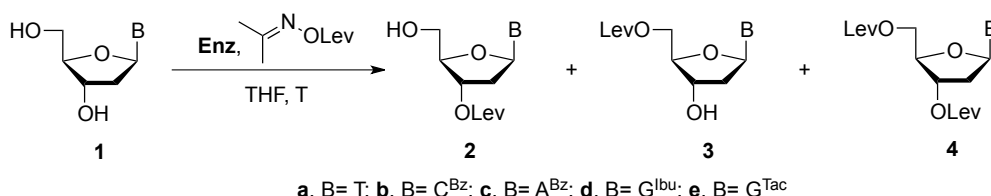
Por otro lado, los preparados de PSL[†] que vamos a utilizar son los siguientes:

- PSL-IM, de Amano Enzyme Inc.; es una PSL inmovilizada sobre diatomitas.
- LPSHN, que es una enzima PSL de SPRINzymes adsorbida sobre una resina de poliestireno, a la que nos referiremos como PSL1.
- LPSME, también una PSL de la misma empresa que la anterior pero inmovilizada covalentemente sobre una resina epoxi acrílica, y que llamaremos PSL2.

[†] En los antecedentes se menciona la PSL-C (de Amano Enzyme Inc., inmovilizada sobre partículas de cerámica) como la lipasa que ofrece los mejores resultados; sin embargo, no se ha empleado para este estudio debido a que ha dejado de comercializarse.

Como ha quedado reflejado en los antecedentes, la CAL-B actuará selectivamente sobre la posición 5' del nucleósido, acilando el grupo hidroxilo primario. Por el contrario, la PSL va a actuar sobre la posición 3', catalizando la acilación en el grupo hidroxilo secundario.

El proceso general que estudiaremos será el recogido en el Esquema 8.



Esquema 8. Levulinilación enzimática de 2'-desoxinucleósidos.

R.1. SÍNTESIS DE 3'- Y 5'-O-LEVULINILTIMIDINA

R.1.1. Acilación enzimática utilizando PSL: preparación de 3'-O-Lev-T

Iniciamos los estudios basándonos en los antecedentes anteriormente descritos en nuestro grupo de investigación para obtener los derivados de timidina 3'-acilados con el grupo levulinilo. Así, el tratamiento de la timidina (**1a**) con levulinato de acetoxima, utilizando THF como disolvente y PSL como catalizador, pone de manifiesto la selectividad de esta lipasa hacia la formación del derivado 3'-O-levulinilo **2a** (Esquema 8). La reacción se lleva a cabo a una concentración de 0.1 M empleando agitación orbital a 250 rpm.

Tabla 1. Levulinilación de la timidina (**1a**) con distintos preparados de PSL.

Entrada	Enzima	T (°C)	t (h)	Conv. (%) ^a	2a (%) ^a	3a (%) ^a	4a (%) ^a
1	PSL-IM ^b	30	48	74	67	1	6
2	PSL1 ^c	30	52	74	67	1	6
3	PSL2 ^d	30	52	29	23	2	4
4	PSL-IM ^b	45	48	97	92	1	4
5	PSL1 ^c	45	32	75	70	1	4
6	PSL2 ^d	45	48	58	30	24	4
7	PSL-IM ^b	60	19	97	94	1	2
8	PSL1 ^c	60	26	69	67	1	1
9	PSL2 ^d	60	47	61	58	1	2

^aPorcentaje de compuestos calculado mediante HPLC. ^bPSL-IM, de Amano. ^cPSL1, LPSHN de SPRINymes. ^dPSL2, LPSME de SPRINymes.

En el estudio se ensayarán tres preparados diferentes de la lipasa PSL. Inicialmente las reacciones se llevaron a cabo a una temperatura de 30 °C. Los resultados referentes a la conversión no fueron del todo satisfactorios, ya que con la PSL-IM y la PSL1, las lipasas que proporcionan los mejores resultados, se alcanza un máximo de 74% de conversión tras 48 h y 52 h, respectivamente (entradas 1 y 2, Tabla 1). En cuanto a la PSL2 no supera el 29% de conversión después del mismo tiempo de reacción (entrada 3, Tabla 1).

Como puede observarse en la Figura 12, la formación del producto **2a** sigue la misma tendencia que la conversión.

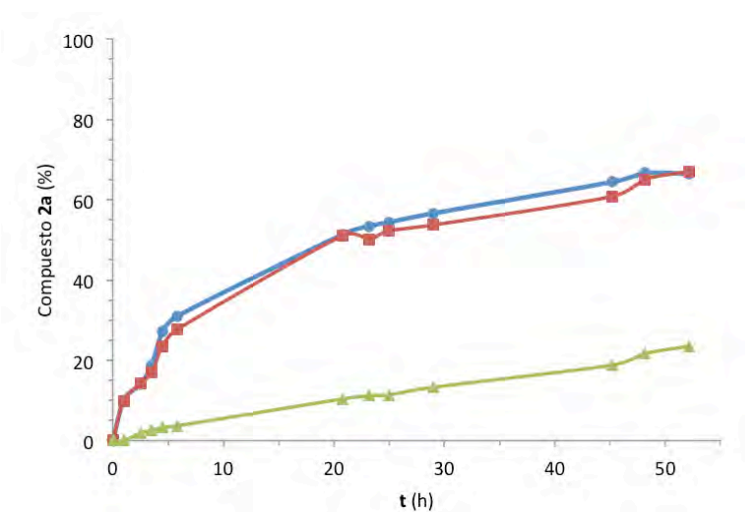


Figura 12. Formación de 3'-O-Lev-T (**2a**) a 30 °C con los diferentes preparados de la lipasa PSL: PSL-IM (—●—), PSL1 (—■—) y PSL2 (—▲—).

La PSL-IM y la PSL1 muestran similar regioselectividad, por lo que se espera obtener la misma proporción del producto 3'-acilado **2a**. Con la PSL-IM se obtiene un 67% de transformación hacia **2a** a las 48 h (entrada 1, Tabla 1), y con la PSL1, tras 52 h, se alcanza la misma proporción (entrada 2, Tabla 1). Por otro lado, la PSL2 exhibe una menor regioselectividad hacia la acilación del hidroxilo secundario, lo que unido a la baja conversión de la reacción, hace que se obtenga tan sólo un 23% del derivado **2a** en este proceso (entrada 3, Tabla 1).

A continuación, con la intención de mejorar la conversión y disminuir los tiempos de reacción, se aumenta la temperatura de 30 °C a 45 °C, manteniendo el resto de condiciones iguales. De esta forma, los resultados mejoran considerablemente. Así, con la PSL-IM se llega a un 88% de formación de **2a** a las 24 h (Figura 13a) y si se prolonga el tiempo de reacción hasta las 48 h se obtiene un 92% del producto deseado (entrada 4, Tabla 1).

A diferencia de las reacciones a 30 °C, la PSL1 a 45 °C no da resultados similares a los hallados con la PSL-IM, sino que son parecidos a los observados cuando la reacción se lleva a cabo a 30 °C. Se alcanza un 70% de formación de **2a** a las 24 h (Figura 13b) y si se deja más tiempo aumenta la conversión ligeramente, pero sin grandes cambios en cuanto a la formación del producto deseado (entrada 5, Tabla 1). Sin embargo, la PSL2 muestra un incremento de la conversión considerable respecto al proceso a 30 °C, pasando de un 29% a un 58% de conversión tras un tiempo de reacción similar (48-52 h) (Figura 13c). Desafortunadamente, esto no se traduce en un aumento en la formación del producto 3'-*O*-levulinilo, ya que se produce una disminución en la regioselectividad de la reacción de acilación y se obtiene una mezcla de derivados 3'-*O*-acilado/5'-*O*-acilado en relación 1.25:1, respectivamente (entrada 6, Tabla 1).

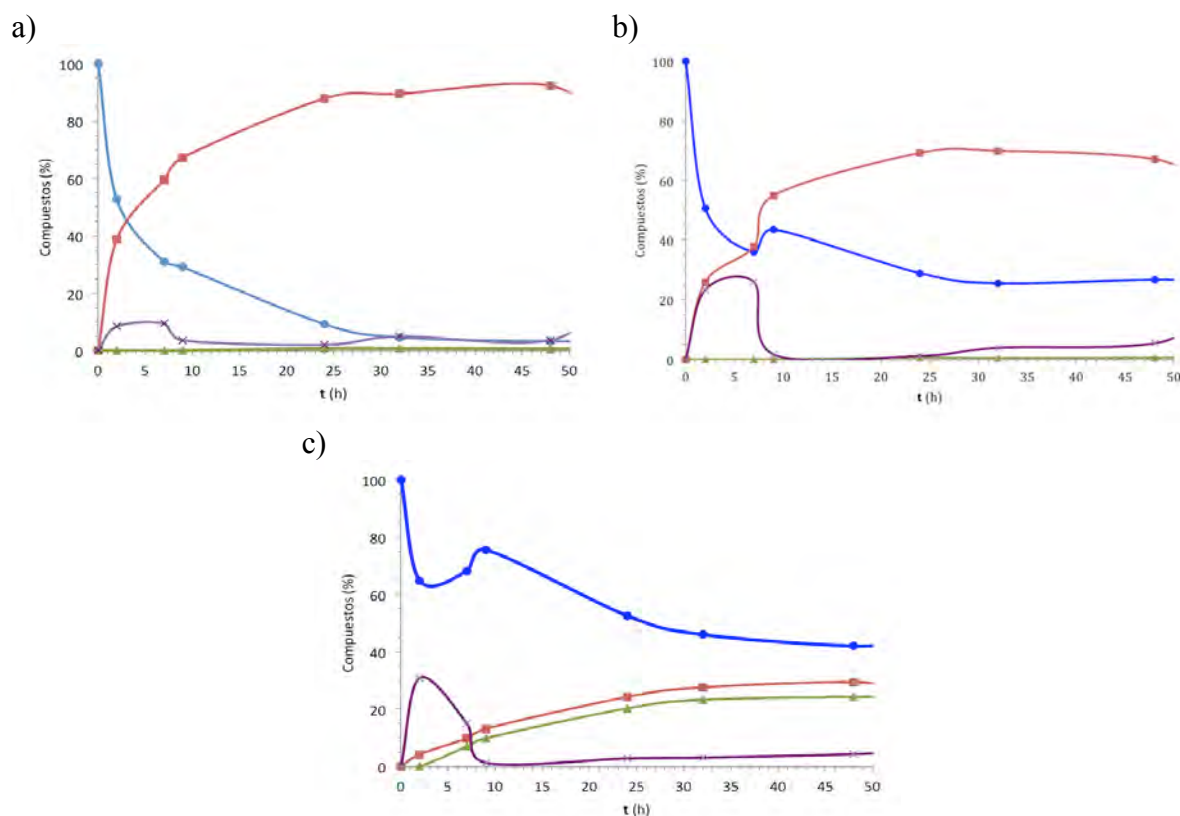


Figura 13. Reacciones de las distintas preparaciones de PSL con T (**1a**) a 45 °C: a) PSL-IM; b) PSL1; c) PSL2. Claves: T (—●—), 3'-*O*-Lev-T (—■—), 5'-*O*-Lev-T (—▲—) y 3',5'-di-*O*-Lev-T (—×—).

Por último, se decide llevar a cabo la reacción a 60 °C. Se observa que con la PSL-IM a las 19 h se obtiene una conversión del 97% y un 94% de formación del producto **2a**, con lo que se ha mejorado ostensiblemente la velocidad de reacción y la conversión, así como la selectividad de este proceso (entrada 7, Tabla 1).

Por otro lado, con la PSL1 a 60 °C prácticamente no se producen cambios respecto a las anteriores reacciones a 30 °C y 45 °C, ya que no se supera el 69% de conversión conseguido a las 26 h, incluso cuando se prolonga el tiempo de reacción (entrada 8, Tabla 1). Esto indica que a este preparado enzimático de PSL el cambio de temperatura no le afecta a la hora de catalizar la reacción, puesto que ha ofrecido resultados similares en las tres pruebas realizadas.

La otra enzima que se ha empleado, la PSL2, sigue mostrando resultados inferiores a los dos anteriores, y aunque no hay grandes cambios en lo que se refiere a la conversión, respecto al proceso a 45 °C, sí que se mejora sensiblemente la regioselectividad hacia la formación de **2a** al aumentar la temperatura. En este caso, se llega a un 44% de conversión a las 26 h de reacción, aumentando progresivamente hasta las 47 h, en las que se obtiene un 61% de conversión y un 58% de formación de **2a** (entrada 9, Tabla 1).

Se puede concluir que la temperatura óptima de reacción para la levulinilación de **1a** con PSL es 60 °C, empleando como preparado enzimático la PSL-IM. En estas condiciones se obtiene el derivado 3'-*O*-levulinil **2a** con excelente regioselectividad y sólo se observan trazas del nucleósido monoacilado en la posición 5' **3a** y el compuesto diacilado **4a**.

R.1.2. Acilación enzimática utilizando CAL-B: preparación de 5'-*O*-Lev-T

Con el fin de obtener de una forma directa los 5'-*O*-levulinilnucleosidos, se trata la timidina (**1a**) con distintos preparados de CAL-B y con levulinato de acetoxima como agente de acilación, empleando inicialmente una temperatura de 30 °C y una agitación de 250 rpm.

El primero de los cuatro preparados enzimáticos que se emplea para la preparación de **3a** es la CAL-B Novozym 435 (CAL-B). El progreso de la reacción se sigue por HPLC, y se observa que tras 2 h ya se alcanza cerca de un 90% de conversión y un 78% de formación del producto deseado (Figura 14a); a las 4 h prácticamente se llega a una conversión total del sustrato de partida y una alta selectividad en la acilación del grupo hidroxilo en posición 5', que da lugar a un 87% de **3a** (entrada 1, Tabla 2).

Cuando se lleva a cabo el proceso en las mismas condiciones pero con CAL-B1 como catalizador, en ningún momento se llega a conversión completa (Figura 14b). Se alcanza una conversión máxima del 85% a las 4 h y a partir de este tiempo no se produce ningún aumento significativo (entrada 2, Tabla 2).

Tabla 2. Levulinilación de la timidina (**1a**) con distintos preparados de CAL-B a y 30 °C.^a

Entrada	Enzima	t (h)	Conv. (%) ^a	2a (%) ^a	3a (%) ^a	4a (%) ^a
1	CAL-B ^b	4	99	5	87	7
2	CAL-B1 ^c	4	85	6	75	4
3	CAL-B2 ^d	6	89	6	78	5
4	CAL-B3 ^e	21	97 ^f	5	87	5

^aPorcentaje de compuestos calculado mediante HPLC. ^bCAL-B, Novozym 435 de Novo Nordisk. ^cCAL-B1, experimental de SPRINymes. ^dCAL-B2, LCAHNHE de SPRINymes. ^eCAL-B3, LCAME de SPRINymes. ^fA las 6 h se consigue un 85% de conversión con 77% de formación del compuesto **3a**.

La CAL-B2 muestra un comportamiento similar a la anterior (Figura 14c). Del mismo modo, se llega a un 87% de conversión tras 4 h, aunque a diferencia de la anterior, dejándola más tiempo se puede conseguir aumentar ligeramente la conversión hasta un 89% a las 6 h de reacción (entrada 3, Tabla 2).

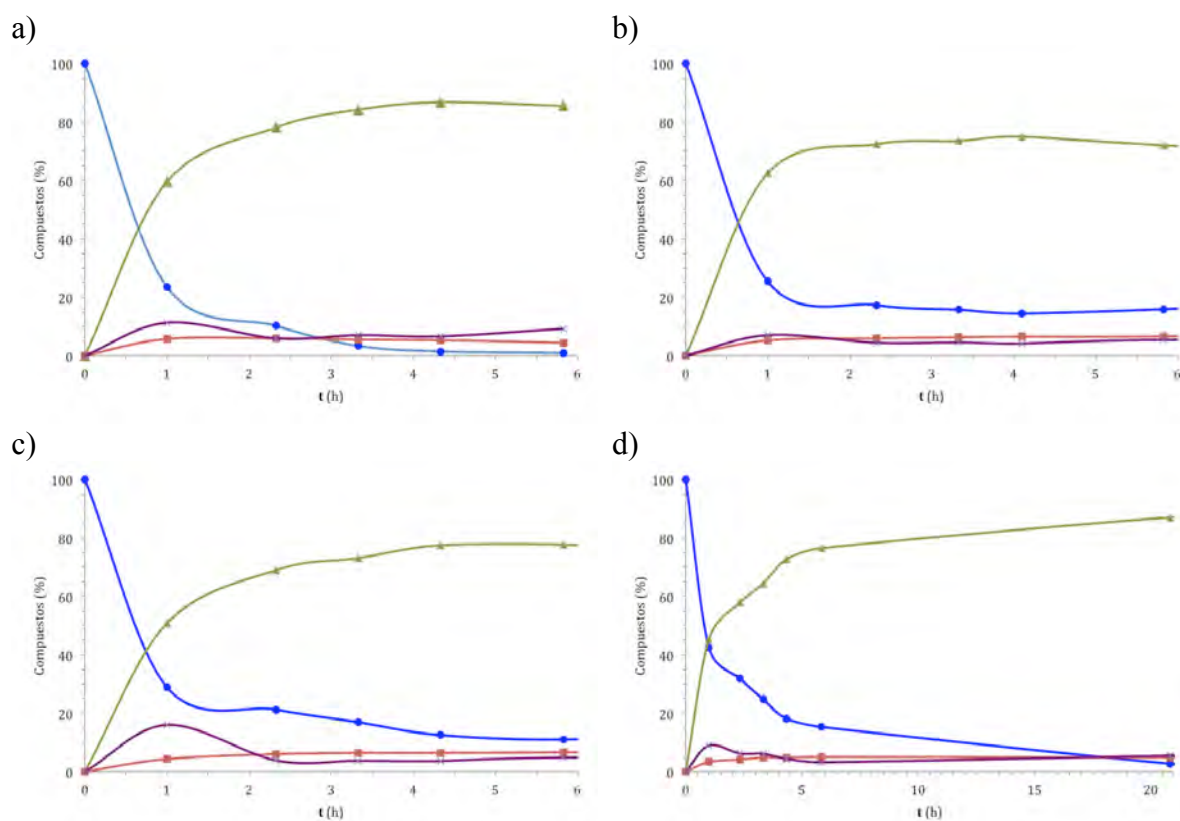


Figura 14. Reacciones de los distintos preparados de CAL-B con T (**1a**) a 30 °C: a) CAL-B; b) CAL-B1; c) CAL-B2; d) CAL-B3. Claves: T (—●—), 3'-O-Lev-T (—■—), 5'-O-Lev-T (—▲—) y 3',5'-di-O-Lev-T (—×—).

Con el biocatalizador CAL-B3, el cual presenta mejores resultados que la CAL-B1 y la CAL-B2, se obtienen conversiones que se asemejan a la CAL-B, aunque la reacción es un poco más lenta (Figura 14d). Sobre las 3 h se obtiene un 75% de conversión, a las 6 h un 85% de conversión, y si lo dejamos reaccionar más tiempo se llega a un máximo del 97% de conversión en torno a las 21 h (entrada 4, Tabla 2).

En lo correspondiente a la formación del producto 5'-*O*-acilado **3a**, se observa que todos estos preparados enzimáticos son claramente selectivos hacia la posición 5' del nucleósido y que se forma mayoritariamente éste. La CAL-B Novozym 435 es la que ofrece mejores conversiones y es con esta enzima con la que se obtiene mayor porcentaje de **3a** en menor tiempo, llegándose al 87% del producto deseado en 4 h. La CAL-B3 ofrece resultados similares, si bien se requiere un tiempo de reacción más largo (21 h en lugar de 4 h) para obtener el 87% de producto **3a**. Tanto la CAL-B1 como la CAL-B2 alcanzan un máximo de conversión del 85-89% tras 4-6 h de reacción. Transcurrido este tiempo se produce la hidrólisis del derivado 5'-*O*-acilado y aumenta la proporción de sustrato de partida.

Para este caso, se decide no aumentar la temperatura de reacción porque el proceso ofrece buenas conversiones, tiempos cortos de reacción y con buenos porcentajes de formación del producto deseado **3a** a 30 °C.

R.2. SÍNTESIS DE *N*⁴-BENZOIL-3'- Y 5'-*O*-LEVULINIL-2'-DESOXICITIDINA

R.2.1. Acilación enzimática utilizando PSL: preparación de 3'-*O*-Lev-dC^{Bz}

Tomando como referencia la preparación del compuesto 3'-acilado de la timidina, estudiaremos la reacción de acilación de la *N*⁴-benzoil-2'-desoxicitidina (dC^{Bz}, **1b**) con los distintos preparados enzimáticos que ya usamos en el caso anterior.

Para ello, se trata la dC^{Bz} con levulinato de acetoxima como agente acilante, THF como disolvente y agitación orbital de 250 rpm. Puesto que la PSL-IM era la lipasa que proporcionaba mejores resultados con el nucleósido timidina, se lleva a cabo la primera reacción con esta enzima y se decide realizar el proceso a 45 °C y 60 °C para elegir la temperatura más adecuada. El resumen de los datos obtenidos se encuentra recogido en la Tabla 3 y la Figura 15.

Tabla 3. Levulinilación de la dC^{Bz} (**1b**) con distintos preparados de PSL.

Entrada	Enzima	T (°C)	t (h)	Conv. (%) ^a	2b (%) ^a	3b (%) ^a	4b (%) ^a
1	PSL-IM ^b	45	24	64	62	2	0
2	PSL-IM ^b	60	24	88	84	1	3
3	PSL-IM ^b	60	27	91	88	1	2
4	PSL1 ^c	60	24	59	59	0	0
5	PSL2 ^d	60	24	47	47	0	0

^aPorcentaje de compuestos calculado mediante HPLC. ^bPSL-IM, de Amano. ^cPSL1, LPSHN de SPRINymes. ^dPSL2, LPSME de SPRINymes.

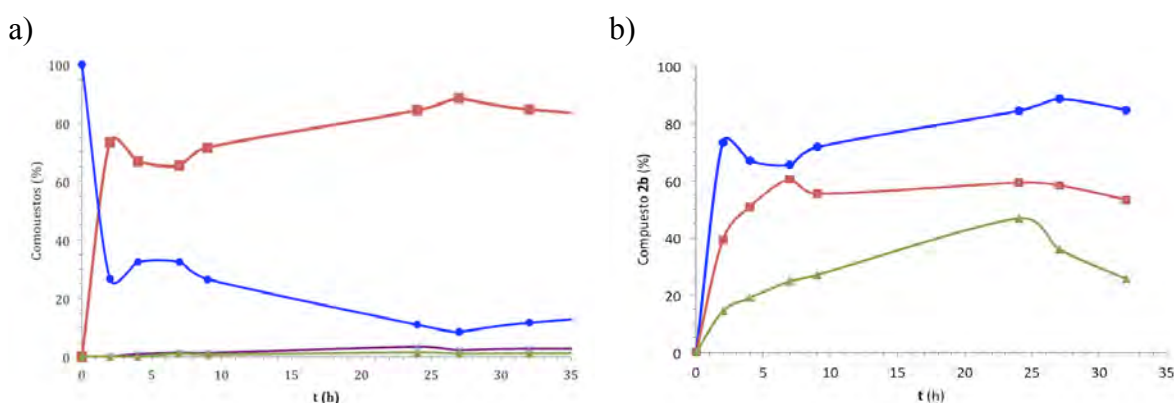


Figura 15. a) Reacción de la PSL-IM con dC^{Bz} (**1b**) a 60 °C. Claves: dC^{Bz} (—●—), 3'-O-Lev-dC^{Bz} (—■—), 5'-O-Lev-dC^{Bz} (—▲—) y 3',5'-di-O-Lev-dC^{Bz} (—×—). b) Formación de 3'-O-Lev-dC^{Bz} (**2b**) a 60 °C con distintas preparaciones de PSL: PSL-IM (—●—), PSL1 (—■—) y PSL2 (—▲—).

Las reacciones se monitorizan por HPLC, y a 45 °C se obtiene una conversión del 64% a las 24 h (entrada 1, Tabla 3). Sin embargo, cuando la reacción se realiza a 60 °C se produce un importante aumento de la conversión, del 64% al 88% (Figura 15a), destacando la excelente regioselectividad con la que ambas enzimas catalizan la reacción de acilación en la posición 3' del nucleósido, ya que sólo se observan trazas de los derivados 5'-O-acilado **3b** y diacilado **4b** (entrada 2, Tabla 3). Si el proceso se mantiene durante tiempos de reacción más largos, se observa una conversión máxima del 91% tras 27 h de reacción, obteniéndose un 88% del producto 3'-O-acilado **2b** (entrada 3, Tabla 3). Tiempos más prolongados no conducen a un aumento de la conversión sino a una disminución de la formación de producto **2b**, debido a la hidrólisis del grupo levulinilo.

Al ser una diferencia importante entre las cantidades de producto obtenido, se decide hacer el estudio con el resto preparados enzimáticos únicamente a 60 °C. Las otras dos enzimas no muestran unos resultados tan buenos como la PSL-IM. Tanto la PSL1 como la PSL2 alcanzan su máximo de conversión a las 24 h, dando un 59% y 47% de conversión, respectivamente. A este tiempo de reacción, ambas muestran una total regioselectividad hacia el producto **2b** (entradas 4 y 5, Tabla 3). Sin embargo, tiempos de reacción más largos conducen a la desaparición del derivado 3'-*O*-acilado **2b**, debido a la hidrólisis del grupo levulinilo (Figura 15b).

R.2.2. Acilación enzimática utilizando CAL-B: preparación de 5'-*O*-Lev-dC^{Bz}

Fijándonos en los buenos resultados obtenidos con la timidina (**1a**) en el apartado R.1.2 y con el objetivo de ampliar este estudio a otros nucleósidos, se trata la dC^{Bz} (**1b**) con los distintos preparados de CAL-B y con levulinato de acetoxima, en las mismas condiciones que empleamos para la timidina.

A 30 °C y utilizando la CAL-B Novozym 435 se obtiene una conversión casi completa (96%) a las 8 h. Pese a ello, la enzima muestra una selectividad moderada hacia la formación del producto deseado 5'-*O*-acilado **3b**, que se obtiene en un 77%. Para este nucleósido también se obtiene un 14% del derivado 3'-acilado **2b** y un 5% del compuesto diacilado **4b** (entrada 1, Tabla 4).

Tabla 4. Levulinilación de la dC^{Bz} (**1b**) con distintos preparados de CAL-B.^a

Entrada	Enzima	T (°C)	t (h)	Conv. (%) ^a	2b (%) ^a	3b (%) ^a	4b (%) ^a
1	CAL-B ^b	30	8	96	14	77	5
2	CAL-B1 ^c	30	4	71	11	59	1
3	CAL-B2 ^d	30	8	71	12	58	1
4	CAL-B3 ^e	30	6	71 ^f	10	60	1
5	CAL-B ^b	45	4	98	9	84	5

^aPorcentaje de compuestos calculado mediante HPLC. ^bCAL-B, Novozym 435 de Novo Nordisk. ^cCAL-B1, experimental de SPRINymes. ^dCAL-B2, LCAHNHE de SPRINymes. ^eCAL-B3, LCAME de SPRINymes. ^fA las 20 h se consigue un 90% de conversión con 72% de formación del compuesto **3b**.

El siguiente biocatalizador empleado es el preparado CAL-B1. Llevamos a cabo el proceso en las mismas condiciones, observándose que en ningún momento se llega a la

conversión completa. Se alcanza una conversión máxima del 71% a las 4 h y a partir de este tiempo no se produce ningún aumento significativo en la obtención del compuesto **3b**, del que se forma un 59%. Al igual que observamos con la anterior enzima, no se obtiene tan buena selectividad como en el caso de la timidina, pues se forma un 11% del compuesto **2b** y un 1% del derivado **4b** (entrada 2, Tabla 4).

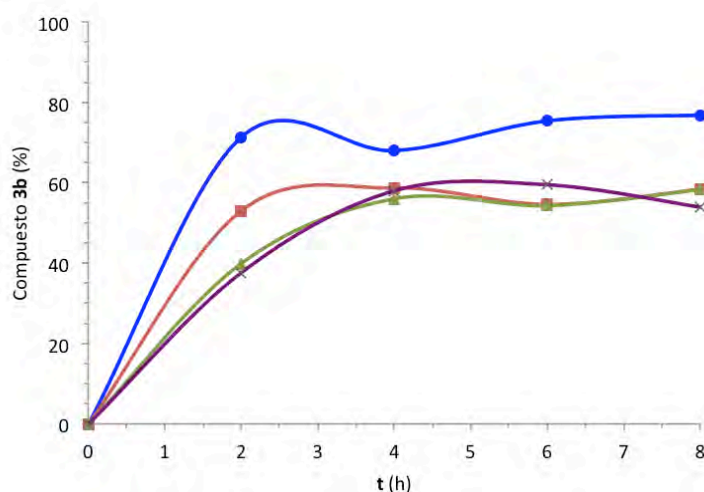


Figura 16. Formación de 5'-O-Lev-dC^{Bz} (**3b**) a 30 °C con distintas preparaciones de CAL-B: Novozym 435 (●), CAL-B1 (■), CAL-B2 (▲) y CAL-B3 (×).

La CAL-B2 muestra un comportamiento casi idéntico a la CAL-B1, si bien a tiempos más largos (Figura 16). Del mismo modo, se llega al 71% de conversión máxima, pero a las 8 h en lugar de 4 h, y se obtiene un 58% de formación del compuesto deseado **3b** (entrada 3, Tabla 4).

Cuando se utiliza CAL-B3 como catalizador, también muestra resultados muy parecidos a la CAL-B1 y CAL-B2 a tiempos cortos de reacción. Tras 6 h se obtiene un 71% de conversión y un 60% del producto deseado **3b**, observándose un 10% de formación del producto acilado en 3' (entrada 4, Tabla 2). Sin embargo, dejando la reacción más tiempo se llega a un máximo del 90% de conversión a las 32 h, con un 72% del producto 5'-O-acilado **3b**.

A pesar de que los resultados obtenidos para la formación del 5'-O-Lev-dC^{Bz} con la enzima CAL-B (Novozym 435) son relativamente buenos, se realiza la reacción a 45 °C para estudiar la influencia de la temperatura en la conversión y selectividad del proceso. Los resultados mejoraron considerablemente con respecto a los obtenidos a 30 °C. Se consigue prácticamente una conversión completa del 98% a las 4 h de reacción (Figura

17a), donde un 84% corresponde a la formación del producto 5'-*O*-acilado **3b**, mientras que un 9% se debe a la acilación del hidroxilo secundario (**2b**) y un 5% al compuesto **4b** diacilado (entrada 5, Tabla 4).

En la Figura 17b se comparan los resultados obtenidos con la CAL-B de Novo a 30 °C y 45 °C. Se pone de manifiesto la mejora que supone el aumento de la temperatura de la reacción, ya que se obtienen conversiones ligeramente mayores en la mitad de tiempo (4 h frente 8 h) y se observa un aumento de la regioselectividad de la enzima, pasando de un 77% a un 84% la formación del producto 5'-*O*-Lev-dC^{Bz}.

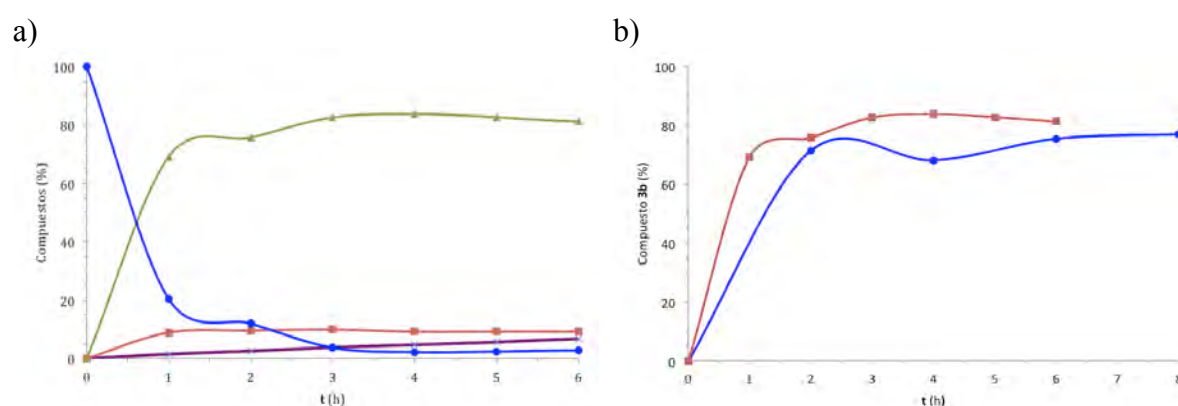


Figura 17. a) Reacción de la CAL-B con dC^{Bz} (**1b**) a 45 °C. Claves: dC^{Bz} (●), 3'-*O*-Lev-dC^{Bz} (■), 5'-*O*-Lev-dC^{Bz} (▲) y 3',5'-di-*O*-Lev-dC^{Bz} (×). b) Formación de 5'-*O*-Lev-dC^{Bz} (**3b**) a diferentes temperaturas: a) 30 °C (●) y b) 45 °C (■).

R.3. SÍNTESIS DE *N*⁴-BENZOIL-3'- Y 5'-*O*-LEVULINIL-2'-DESOXIADENOSINA

R.3.1. Acilación enzimática utilizando PSL: preparación de 3'-*O*-Lev-dA^{Bz}

Para el estudio de las reacciones de nucleósidos con las bases púricas (los nucleósidos 2'-desoxiadenosina y 2'-desoxiguanosina), iniciamos el estudio con la dA^{Bz} (**1c**) utilizando las mismas condiciones que anteriormente hemos aplicado con los nucleósidos pirimidínicos (timidina y 2'-desoxicidina). Así, se trata el compuesto **1c** con 3 equivalentes de levulinato de acetoxima catalizado por los distintos preparados de PSL, utilizando THF como disolvente a una concentración 0.1 M y agitación orbital de 250 rpm.

En cuanto a la temperatura con que se llevará a cabo la reacción, se ha visto que los mejores resultados para la acilación de la T y dC^{Bz} con la lipasa de *Pseudomonas cepacia* se han obtenido a 45 °C y 60 °C. Para encontrar la mejor temperatura para la levulinilación

de **1c**, se prueba a dichas temperaturas con el preparado que mejores resultados está dando (PSL-IM), y una vez optimizada la temperatura se hará el estudio para el resto de enzimas.

La reacción con PSL-IM a 45 °C se monitoriza por HPLC y se obtiene a las 7 h un 83% de conversión máxima del producto de partida **1c**, con una total regioselectividad hacia la formación del producto deseado **2c** (entrada 1, Tabla 5). Por otro lado, tras 9 h y a 60 °C, se obtiene un 84% de conversión de **1c**, con un 78% de formación del producto 3'-acilado **2c** (entrada 2, Tabla 5). Tiempos más largos de reacción no conducen a un aumento de la conversión sino a la hidrólisis del derivado 3'-*O*-levulinilo.

Como los resultados obtenidos a 45 °C son considerablemente mejores, se estudian el resto de los preparados enzimáticos a esta temperatura únicamente. Así, la PSL1 no ofrece tan buenos resultados como la enzima anterior. A las 7 h alcanza una conversión de un 31%, siendo al igual que la PSL-IM totalmente regioselectiva hacia la formación del producto **2c** (entrada 3, Tabla 5). Si se deja la reacción más tiempo no se traduce en un aumento significativo de la conversión, aumentando ligeramente la formación de **2c** hasta un 33% a las 23 h.

Tabla 5. Levulinilación de la dA^{Bz} (**1c**) con distintos preparados de PSL.

Entrada	Enzima	T (°C)	t (h)	Conv. (%) ^a	2c (%) ^a	3c (%) ^a	4c (%) ^a
1	PSL-IM ^b	45	7	83	83	0	0
2	PSL-IM ^b	60	9	84	78	6	0
3	PSL1 ^c	45	7	31	31	0	0
4	PSL2 ^d	45	23	36	35	1	0

^aPorcentaje de compuestos calculado mediante HPLC. ^bPSL-IM, de Amano. ^cPSL1, LPSHN de SPRINymes. ^dPSL2, LPSME de SPRINymes.

La enzima PSL2, al igual que la PSL1, sigue mostrando malas conversiones. A las 7 h muestra un 23% de formación de **2c**, obteniendo su mejor resultado a las 23 h con un 36% de conversión, que se mantiene prácticamente constante al aumentar el tiempo (entrada 4, Tabla 5). Ambas enzimas si exhiben una excelente regioselectividad en la levulinilación de la posición 3' del nucleósido.

En la Figura 18 se muestra la formación del producto 3'-*O*-Lev-dA^{Bz} (**2c**) en función del tiempo de reacción. Se pone de manifiesto que la PSL-IM es el mejor preparado

enzimático de los tres, mostrando un 83% de formación de **2c** en tan sólo 7 h, frente al 31% y 35% cuando se realiza el proceso con PSL1 y PSL2, respectivamente.

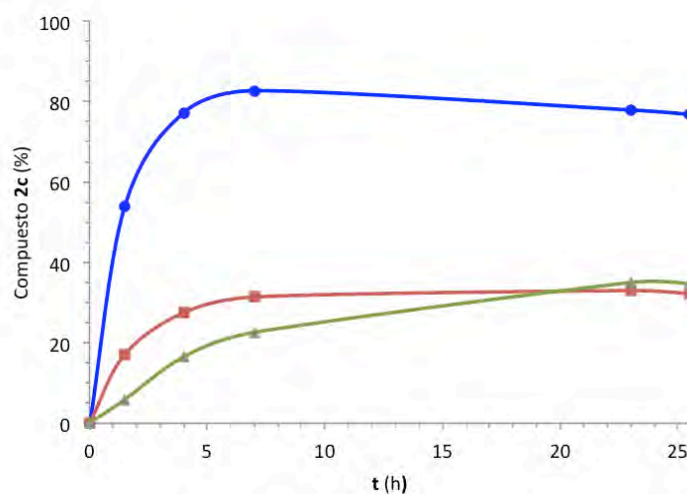


Figura 18. Formación de 3'-O-Lev-dA^{Bz} (**2c**) a 45 °C con los diferentes preparados de la lipasa PSL: PSL-IM (—●—), PSL1 (—■—) y PSL2 (—▲—).

Por tanto, se puede destacar que la PSL-IM es un catalizador adecuado para llevar a cabo esta reacción. En nuestro grupo de investigación se ha utilizado previamente la PSL-C, una enzima que se ha dejado de comercializar, y con la que se obtenía un 98% de conversión y regioselectividad total a las 34 h de reacción.⁸ En este caso, pese a que la conversión es ligeramente menor, la reacción es muchísimo más rápida, pues alcanza su máximo a las 7 h.

R.3.2. Acilación enzimática utilizando CAL-B: preparación de 5'-O-Lev-dA^{Bz}

Para la obtención de *N*⁴-benzoil-5'-*O*-levulinil-2'-desoxiadenosina (**3c**), utilizaremos las condiciones de reacción que se han empleado en los anteriores nucleósidos. De modo que comenzaremos estudiando la reacción a 30 °C y analizaremos los resultados.

En primer lugar, utilizamos la CAL-B Novozym 435. El progreso de la reacción se sigue por HPLC (Figura 19a), y se observa que a las 2 h ya se alcanza un 97% de conversión, de los que el 91% es el producto deseado, y a las 4 h se observa un aumento mínimo en la formación de **3c** hasta el 92%, que se mantiene en ese porcentaje aunque lo dejemos más tiempo (entrada 1, Tabla 6).

La CAL-B1 y la CAL-B2, ofrecen los mejores resultados a las 6 h, dando lugar al compuesto **3c** como producto mayoritario con un 37% y 28%, respectivamente (entradas 2 y 3, Tabla 6).

Tabla 6. Levulinilación de la dA^{Bz} (**1c**) con distintos preparados de CAL-B a 30 °C.

Entrada	Enzima	t (h)	Conv. (%) ^a	2c (%) ^a	3c (%) ^a	4c (%) ^a
1	CAL-B ^b	4	97	4	92	1
2	CAL-B1 ^c	6	41	4	37	0
3	CAL-B2 ^d	6	30	2	28	0
4	CAL-B3 ^e	2	68	4	64	0

^aPorcentaje de compuestos calculado mediante HPLC. ^bCAL-B, Novozym 435 de Novo Nordisk. ^cCAL-B1, experimental de SPRINymes. ^dCAL-B2, LCAHNHE de SPRINymes. ^eCAL-B3, LCAME de SPRINymes.

Por otra parte, la CAL-B3 proporciona mejores conversiones que los dos preparados enzimáticos anteriores (Figura 19b). A las 2 h se alcanza una conversión del 68%, que no aumenta aunque se deje la reacción a tiempos más largos, dando lugar a un 64% del producto deseado **3c**.

En la Figura 19, quedan reflejados los porcentajes obtenidos del producto **3c** y los buenos resultados obtenidos con la CAL-B a tiempos muy cortos, que es de nuevo el preparado que mejor cataliza este tipo de reacción.

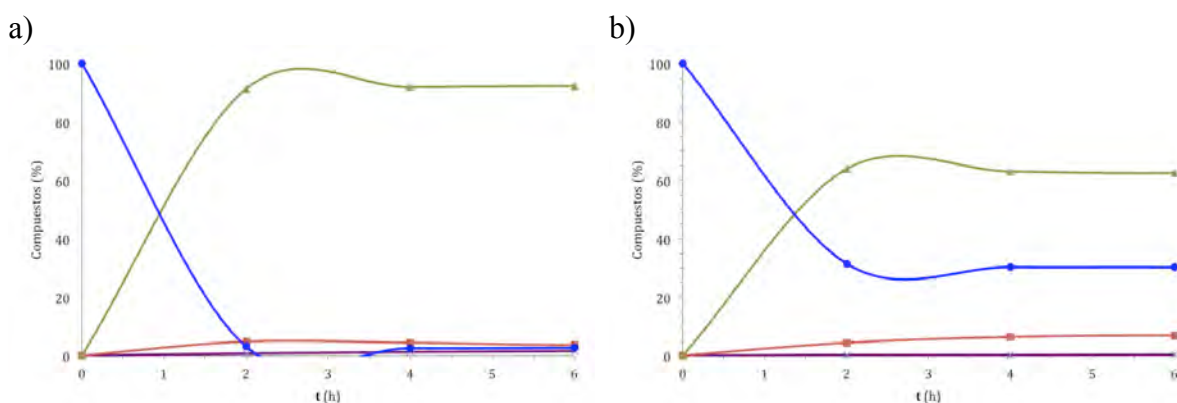


Figura 19. Reacciones de los distintos preparados de CAL-B con dA^{Bz} (**1c**) a 30 °C: a) CAL-B; b) CAL-B3. Claves: dA^{Bz} (●), $3'-O-Lev-dA^{Bz}$ (■), $5'-O-Lev-dA^{Bz}$ (▲) y $3',5'-di-O-Lev-dA^{Bz}$ (×).

R.4. SÍNTESIS DE N²-ISOBUTIRIL-3'- Y -5'-O-LEVULINIL-2'-DESOXIGUANOSINA

El grupo protector más comúnmente utilizado para la base nitrogenada guanosina es el grupo isobutirilo. Es por ello, que realizaremos el estudio enzimático con la N²-isobutiril-2'-desoxiguanosina (**1d**).

R.4.1. Acilación enzimática utilizando PSL: preparación de 3'-O-Lev-dG^{Ibu}

Siguiendo el procedimiento habitual, se trata la dG^{Ibu} (**1d**) con el levulinato de acetoxima y los distintos preparados de PSL en THF, a concentración 0.1 M y una agitación de 250 rpm.

En este caso, debido a la baja solubilidad que presenta el nucleósido de partida en THF, se lleva a cabo la reacción a 60 °C en lugar de 45 °C. Se observa que, incluso a esa temperatura, la dG^{Ibu} continúa siendo muy insoluble y prueba de ello son los resultados que se detallan en la Tabla 7.

Con la PSL-IM, el preparado enzimático de la lipasa de *Pseudomonas cepacia* que daba buenos resultados para los compuestos anteriores, sólo se llega a un 33% de conversión máxima. Además, para esta base nitrogenada la enzima no es tan selectiva, ya que se obtiene un 20% del producto 3'-O-levulinilo **2d**, un 10% del correspondiente monoacilado en 5' **3d** y un 3% del diacilado **4d** (entrada 1, Tabla 7).

Tabla 7. Levulinilación de la dG^{Ibu} (**1d**) con distintos preparados de PSL a 60 °C.

Entrada	Enzima	t (h)	Conv. (%) ^a	2d (%) ^a	3d (%) ^a	4d (%) ^a
1	PSL-IM ^b	19 ^e	33	20	10	3
2	PSL1 ^c	19	1	1	0	0
3	PSL2 ^d	19	5	3	2	0

^aPorcentaje de compuestos calculado mediante HPLC. ^bPSL-IM, de Amano. ^cPSL1, LPSHN de SPRINymes. ^dPSL2, LPSME de SPRINymes. ^eA las 68 h se consigue un 48% de conversión con un 27% de formación del producto **2d** monoacilado en 3'.

Cuando se emplean los otros dos preparados enzimáticos, la reacción prácticamente no evoluciona. Así, a las 19 h el proceso catalizado por la PSL1 apenas ha reaccionado y con la PSL2 sólo se obtiene un 3% de producto deseado (entradas 2 y 3, Tabla 7).

Estos datos ponen de manifiesto la baja solubilidad del compuesto y de ahí los malos resultados obtenidos en la levulinilación de la dG^{lbu} en la posición 3'.

R.4.2. Acilación enzimática utilizando CAL-B: preparación de 5'-O-Lev-dG^{lbu}

Inicialmente, la reacción se lleva a cabo a 30 °C y con la CAL-B Novozym 435 (Figura 20a). En estas condiciones, se obtiene una conversión del 75%, con un porcentaje del producto 5'-acilado **3d** del 73%, a las 27 h. Se observan trazas del derivado 3' monoacilado **2d** y el compuesto diacilado **4d** (entrada 1, Tabla 8). Cabe destacar, que a las 4,5 h ya se había llegado a un 66% del producto deseado **3d**, requiriéndose 22,5 h adicionales para incrementar tan sólo un 7% la formación de este derivado.

Los preparados CAL-B1 y CAL-B2 dan lugar a conversiones bajas. Sólo se observa reacción de acilación al principio del proceso enzimático. Así, a las 2 h se alcanza un 19% y 10% de conversión, respectivamente (entradas 2 y 3, Tabla 8). A partir de ese instante ya no se consigue aumentar la conversión aunque se deje reaccionar más tiempo.

Tabla 8. Levulinilación de la dG^{lbu} (**1d**) con distintos preparados de CAL-B.

Entrada	Enzima	T (°C)	t (h)	Conv. (%) ^a	2d (%) ^a	3d (%) ^a	4d (%) ^a
1	CAL-B ^b	30	27	75	1	73	1
2	CAL-B1 ^c	30	2	19	1	18	0
3	CAL-B2 ^d	30	2	10	1	9	0
4	CAL-B3 ^e	30	2	33	0	33	0
5	CAL-B ^{b,f}	30	27	66	1	64	1
6	CAL-B ^b	45	9	64	0	64	0
7	CAL-B ^b	60	22	84	3	80	1
8	CAL-B ^{b,g}	60	22	67	1	65	1

^aPorcentaje de compuestos calculado mediante HPLC. ^bCAL-B, Novozym 435 de Novo Nordisk. ^cCAL-B1, experimental de SPRINymes. ^dCAL-B2, LCAHNHE de SPRINymes. ^eCAL-B3, LCAME de SPRINymes. ^fEnzima añadida de forma fraccionada en 3 veces. ^gReacción llevada a cabo a concentración 0.05 M.

La CAL-B3, que hasta el momento era la que mostraba resultados más parecidos a la CAL-B, dista bastante de los buenos datos obtenidos con ella. A las 2 h se alcanza un 33% de conversión, con total regioselectividad hacia la formación del producto **3d**; sin embargo, a pesar de tener la reacción más tiempo no se consiguen aumentar esos valores.

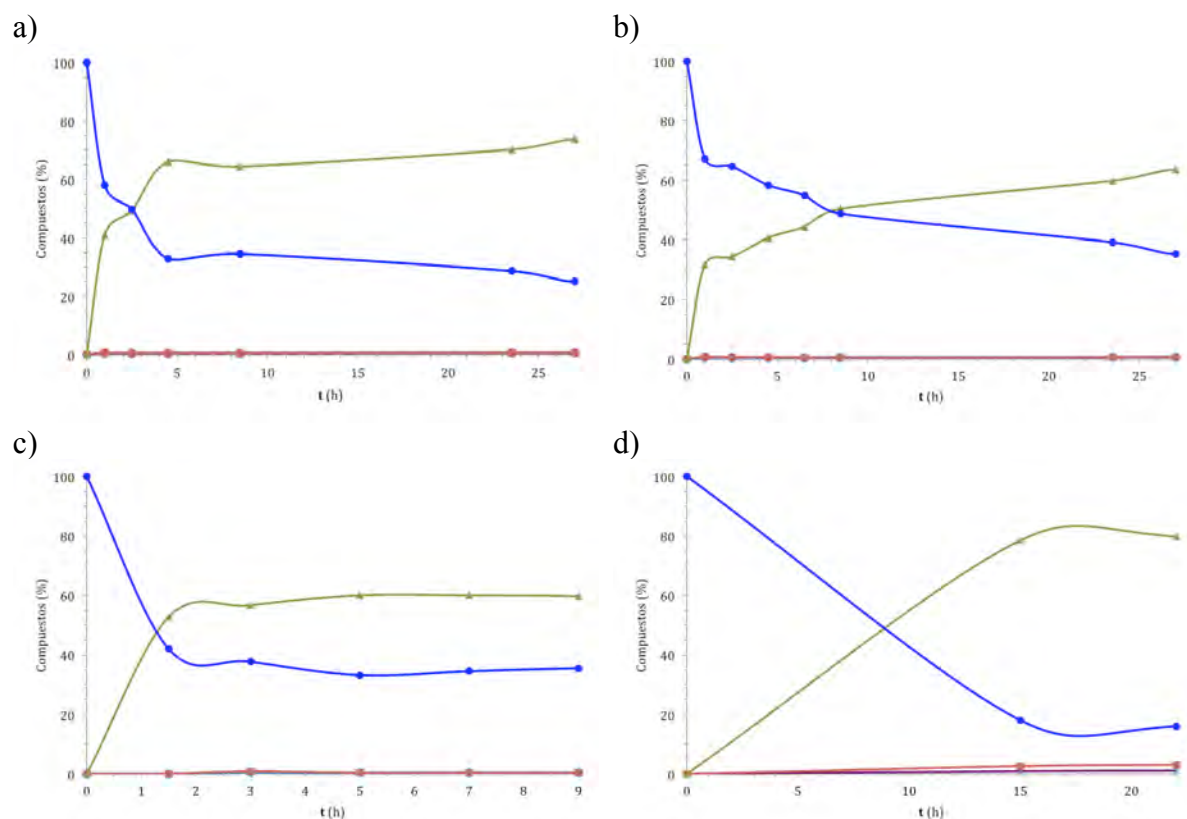


Figura 20. Reacciones de la dG^{Ibu} (**1d**) con la CAL-B a distintas temperaturas: a) 30 °C; b) 30 °C añadiendo la enzima en fracciones; c) 45 °C; d) 60 °C. Claves: dG^{Ibu} (—●—), 3'-O-Lev- dG^{Ibu} (—■—), 5'-O-Lev- dG^{Ibu} (—▲—) y 3',5'-di-O-Lev- dG^{Ibu} (—×—).

Con el fin de incrementar la conversión del proceso, se añade la cantidad total de enzima de forma fraccionada a la reacción (Figura 20b). Aún así, no se consigue mejorar los resultados (entrada 5, Tabla 8).

Las conversiones tan bajas obtenidas con estos tres preparados enzimáticos, aunque con regioselectividades muy altas, se pueden explicar por la baja solubilidad del sustrato de partida en THF. Así, se aumenta la temperatura de la reacción a 45 °C para la acilación con la CAL-B, ya que ha sido la que proporciona mejores conversiones.

Se obtienen resultados similares al proceso a 30 °C, aunque a tiempos más cortos. Se llega a conseguir una conversión máxima del 64% a las 9 h (Figura 20c). Además, a esta temperatura la reacción es completamente regioselectiva, pues toda la conversión es hacia el producto **3d** (entrada 6, Tabla 8). Se ha conseguido disminuir considerablemente el tiempo de reacción a 45 °C, pero no aumentar los valores de conversión.

A continuación, se estudia el proceso a 60 °C (Figura 20d). A esta temperatura se alcanza un 84% de conversión a las 22 h, manteniendo la enzima su alta regioselectividad en la acilación de la posición 5'. La formación de producto **3d** alcanza un 80%, con un 3% del 3'-acilado **2d** y un 1% del diacilado **4d** (entrada 7, Tabla 8).

En otro intento por aumentar la solubilidad del producto de partida en THF se lleva a cabo la reacción con una concentración más diluida; de esta forma, se pretende aumentar aún más la conversión de la reacción.

Así, se disminuye la concentración a 0.05 M en lugar de 0.1 M. Sin embargo, se observa una disminución en la conversión de la reacción, que pasa del 84% al 67% (entradas 7 y 8, Tabla 8).

En la Figura 20 se muestra de una manera más visual la formación del producto deseado cuando el proceso es catalizado por la lipasa de CAL-B, y se pone de manifiesto que a 60 °C es la temperatura más adecuada para la preparación del 5'-*O*-Lev-dG^{Ibu} (**3d**). Con el incremento de temperatura se ha conseguido aumentar en gran medida la conversión de la reacción debido a la insolubilidad que presenta el compuesto **1d** en THF.

R.5. SÍNTESIS DE *N*²-(4-*tert*-BUTILFENOXI)ACETIL-3'- Y -5'-*O*-LEVULINIL-2'-DESOXIGUANOSINA

En vista de los problemas de solubilidad de la dG^{Ibu}, se busca un nuevo grupo protector para la base nitrogenada con la intención de hacer más soluble este sustrato. Uno de los grupos protectores alternativo es el (4-*tert*-butilfenoxi)acetilo, que simplificaremos de ahora en adelante como Tac (Figura 21).

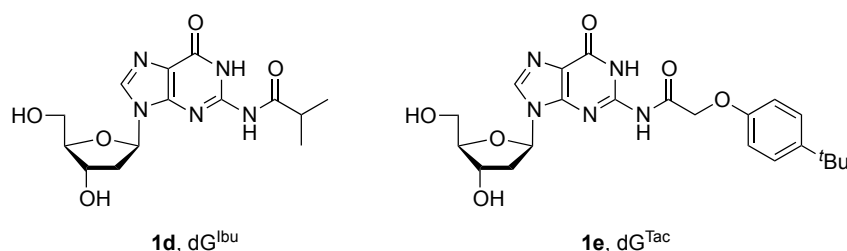


Figura 21. Estructuras de los nucleósidos derivados de 2'-desoxiguanosina.

Se utiliza como grupo protector estándar para la protección de las bases nitrogenadas de los nucleósidos debido a que se desprotege de manera muy fácil y en condiciones suaves.[‡]

En primer lugar, se compara la solubilidad en THF de ambos sustratos. Así, se comprobó que la dG^{Tac} es cinco veces más soluble en THF que la dG^{Ibu}: 0.28 mg/mL de la dG^{Ibu} (**1d**) frente a 1.33 mg/mL para la dG^{Tac} (**1e**).

R.5.1. Acilación enzimática utilizando PSL: preparación de 3'-O-Lev-dG^{Tac}

Con este nuevo sustrato, se espera mejorar los resultados obtenidos anteriormente en la preparación del compuesto 3'-O-Lev-dG^{Ibu} y acceder a un derivado 3'-O-levulinilo de la 2'-desoxiguanosina. Todas las reacciones se realizarán a 60 °C.

Cuando utilizamos la enzima PSL-IM con el sustrato dG^{Tac} (**1e**) no se obtienen los resultados esperados. Se alcanza un máximo de conversión del 20% a las 26 h, y no aumenta aunque dejemos la reacción más tiempo. Además, la enzima muestra baja selectividad con este nucleósido y se obtienen proporciones casi similares de los derivados 3'- y 5'-acilados (entrada 1, Tabla 9).

Por otro lado, la PSL1 y la PSL2 no son catalizadores adecuados para llevar a cabo la reacción de acilación. El proceso apenas evoluciona y no se supera el 2% de conversión (entradas 2 y 3, Tabla 9).

Con este nuevo sustrato (dG^{Tac}) no se ha conseguido mejorar los resultados que se habían obtenido para la dG^{Ibu}, por lo que no se ha podido encontrar entre los preparados enzimáticos estudiados, uno que pueda sustituir a la PSL-C que ya no se comercializa.⁸

Tabla 9. Levulinilación de la dG^{Tac} (**1e**) con distintos preparados de PSL a 60°C.

Entrada	Enzima	t (h)	Conv. (%) ^a	2e (%) ^a	3e (%) ^a	4e (%) ^a
1	PSL-IM ^b	26	20	11	9	0
2	PSL1 ^c	4	2	1	1	0
3	PSL2 ^d	4	2	1	1	0

^aPorcentaje de compuestos calculado mediante HPLC. ^bPSL-IM, de Amano. ^cPSL1, LPSHN de SPRINymes. ^dPSL2, LPSME de SPRINymes.

[‡] Este proceso se lleva a cabo con una mezcla (1:1, v/v) de dos disoluciones: una >25% de amoníaco acuoso y otra del 40% de metilamina acuosa, en sólo 5 min a 65 °C o bien 30 min a temperatura ambiente. Otra posibilidad es usar una disolución >25% de amoníaco acuoso; la reacción de desprotección se completa en 15 min a 55 °C o en 2 h a temperatura ambiente. NOTA: Las condiciones estándar para la desprotección de los grupos protectores Bz o Ibu son: amoníaco acuoso concentrado a 55 °C durante 12 h.

R.5.2. Acilación enzimática utilizando CAL-B: preparación de 5'-*O*-Lev-dG^{Tac}

En la reacción de acilación catalizada por la CAL-B Novozym 435 sobre el derivado dG^{lbu} se obtenía tras 22 h de reacción a 60 °C una conversión del 84%, con un 80% de formación del derivado 5'-*O*-levulinilo **3d** (entrada 7, Tabla 8). Con la ventaja de la mayor solubilidad del sustrato dG^{Tac} en THF, se estudia la acilación con los distintos preparados de CAL-B a diferentes temperaturas.

El proceso de levulinilación con CAL-B Novozym 435 a 30 °C proporciona una conversión del 89% a las 4 h con una regioselectividad total hacia el producto deseado **3e** (entrada 1, Tabla 10).

Cuando utilizamos el preparado CAL-B1 la reacción es más lenta, pero aún así los resultados son mejores que los que se obtiene con la dG^{lbu}, ya que se alcanza un 60% de conversión máxima a las 6 h (entrada 2, Tabla 10).

La enzima CAL-B2 muestra una conversión más baja a tiempos más largos (entrada 3, Tabla 10), mientras que la CAL-B3 también demostró ser un catalizador adecuado, obteniéndose tras 23 h un 77% del producto esperado **3e** (entrada 4, Tabla 10). Es de destacar que en todos los casos el proceso de acilación transcurre de manera totalmente regioselectiva en la posición 5' del nucleósido.

Tabla 10. Levulinilación de la dG^{Tac} (**1e**) con distintos preparados de CAL-B.

Entrada	Enzima	T (°C)	t (h)	Conv. (%) ^a	2e (%) ^a	3e (%) ^a	4e (%) ^a
1	CAL-B ^b	30	4	89	0	89	0
2	CAL-B1 ^c	30	6	60	0	60	0
3	CAL-B2 ^d	30	23	29	0	29	0
4	CAL-B3 ^e	30	23	77	0	77	0
5	CAL-B ^b	45	7	98	1	96	1
6	CAL-B1 ^c	45	5	26	0	26	0
7	CAL-B2 ^d	45	8	21	0	21	0
8	CAL-B3 ^e	45	24	68	1	67	0

^aPorcentaje de compuestos calculado mediante HPLC. ^bCAL-B, Novozym 435 de Novo Nordisk. ^cCAL-B1, experimental de SPRINymes. ^dCAL-B2, LCAHNHE de SPRINymes. ^eCAL-B3, LCAME de SPRINymes.

A continuación, se aumenta la temperatura de la reacción hasta 45 °C. La CAL-B proporciona unos excelentes resultados (Figura 22). Así, se produce una conversión casi completa del 98% a las 7 h, con una formación del derivado **3e** del 96% y con solo un 1% tanto del compuesto diacilado **4e** como del 3'-monoacilado **2e** (entrada 5, Tabla 10).

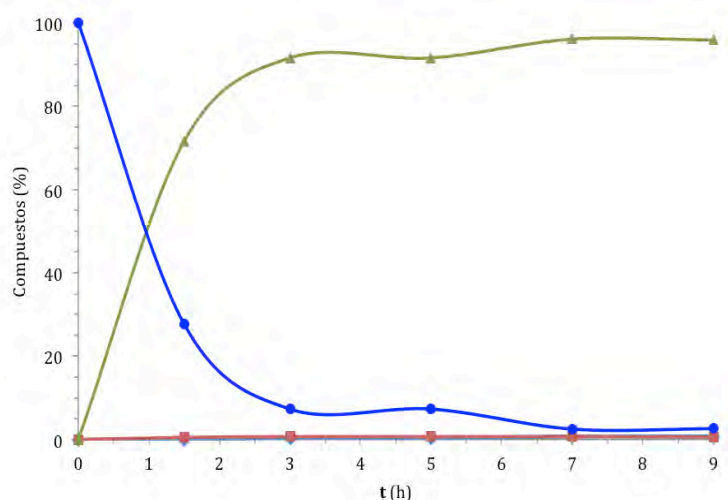


Figura 22. Reacción de la dG^{Tac} (**1e**) con CAL-B a 45 °C. Claves: dG^{Tac} (—●—), 3'-O-Lev- dG^{Tac} (—■—) y 5'-O-Lev- dG^{Tac} (—▲—).

En el resto de los preparados enzimáticos que se han estudiado, el incremento de la temperatura no provoca un aumento en la formación de **3e**, sino que se obtienen unos resultados peores que los obtenidos a 30 °C, probablemente debido a la inestabilidad de los biocatalizadores. Con la CAL-B1 se consigue un 26% de formación de **3e** a las 5 h y no aumenta aunque dejemos más tiempo la reacción (entrada 6, Tabla 10). La CAL-B2 sigue mostrando valores bajos de conversión, y únicamente se obtiene un 21% de formación de **3e** al cabo de 8 h (entrada 7, Tabla 10). La CAL-B3 también muestra una conversión menor, ya que necesita 24 h para alcanzar un 68% de conversión, del cual un 67% es hacia la formación del producto deseado **3e** y el otro 1% es debido al derivado monoacilado en 3' **2e** (entrada 8, Tabla 10).

R.6. COMPARACIÓN ENTRE LAS SÍNTESIS DE 5'-O-Lev- dG^{Ibu} Y 5'-O-Lev- dG^{Tac}

Debido a la importancia que presentan los nucleosidos acilados en la posición 5' en la síntesis de oligonucleótidos y en especial los derivados de la guanosina, por su baja solubilidad, se hace una comparación de los resultados que se han obtenido en las

reacciones de acilación enzimática con la guanosina dependiendo de los grupos protectores utilizados.

En ambos casos, la mejor enzima ha sido la CAL-B Novozym 435, por lo que se comparan únicamente los resultados obtenidos con dicho catalizador.

Para la preparación de 5'-*O*-Lev-dG^{Ibu} (**3d**), se intentan mejorar los resultados que había en la bibliografía y por ello, se hicieron las pruebas de aumento de temperatura y modificación de la concentración de la reacción.

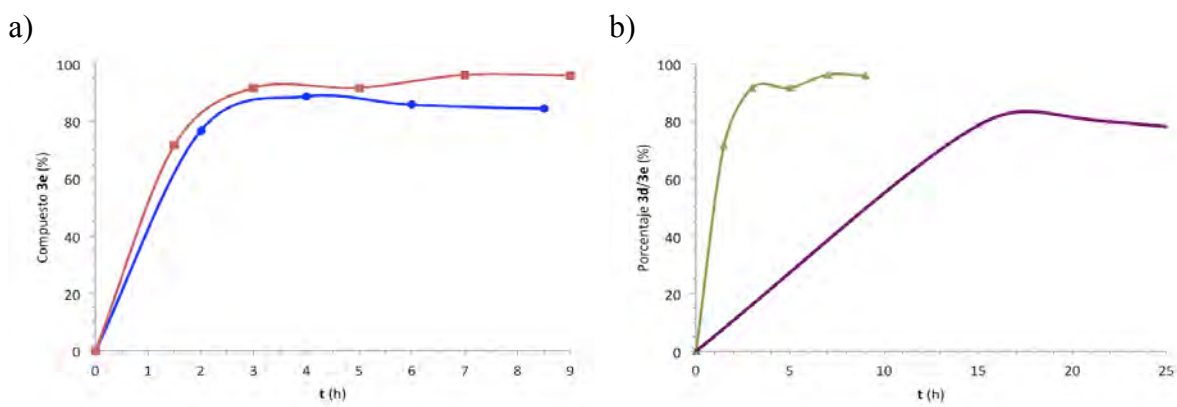


Figura 23. a) Formación de 5'-*O*-Lev-dG^{Tac} (**3e**) a distintas temperaturas con CAL-B: a 30 °C (—●—) y a 45 °C (—■—). b) Comparación de la formación de 5'-*O*-Lev-dG^{Ibu/Tac} (**3d/3e**) utilizando CAL-B en las mejores condiciones de reacción: a 45 °C usando como sustrato dG^{Tac} (**3e**) (—▲—) y a 60 °C usando como sustrato dG^{Ibu} (**3d**) (—×—).

La reacción va mejor a 60 °C que a 45 °C. Además, se obtienen mejores resultados a la concentración habitual (0.1 M) que al disminuir la concentración a la mitad.

En la síntesis de 5'-*O*-Lev-dG^{Tac} (**3e**), se mejoran los resultados obtenidos para la dG^{Ibu} tanto a 30 °C como a 45 °C. La solubilidad del sustrato dG^{Tac} es mucho mayor que para la dG^{Ibu}. A 45 °C se llega a una conversión del 98% tras 7 h, con un 96% de formación del derivado **3e** (Figura 23a).

Comparando las reacciones de acilación de ambos productos, se observa que se ha conseguido obtener un nucleósido de guanosina monoacilado en 5' con unas conversiones muy buenas en tiempos relativamente cortos (Figura 23b). Los resultados que se obtienen con el *Tac* como grupo protector son excelentes y se consigue mejorar los obtenidos cuando se utiliza el *Ibu* como grupo protector.

R.7. ESCALADO DE LA SÍNTESIS DE 5'-*O*-Lev-dG^{Tac}

Con el objetivo de realizar la síntesis del derivado de dG^{Tac} monoacilado en 5' a escala industrial se aumenta la escala de la reacción hasta 0.5 g de sustrato de partida. Para ello, se trata la dG^{Tac} (**1e**) con 3 equivalentes del levulinato de acetoxima en presencia de la CAL-B Novozym 435, utilizando THF como disolvente, a 45 °C y con una agitación orbital de 250 rpm. Además, como la intención es desarrollar la reacción para aplicación industrial, se duplica la concentración (0.2 M) con el fin de disminuir la cantidad de disolvente necesario para su preparación.

Tabla 11. Escalado a 0.5 g del proceso de levulinilación de la dG^{Tac} (**1e**) con CAL-B a 45 °C.^a

Entrada	Conc. (M)	t (h)	Conv. (%) ^b	2e (%) ^b	3e (%) ^b	4e (%) ^b
1	0.1	8	98	5	93	0
2	0.1	24	99	4	94	1

3	0.2	8	95	3	91	1
4	0.2	24	99	3	95	1

^aCAL-B, Novozym 435 de Novo Nordisk. ^bPorcentaje de compuestos calculado mediante HPLC.

Ambos procesos, a concentraciones de 0.1 M y 0.2 M, se siguen por HPLC, tal y como queda reflejado en la Figura 24.

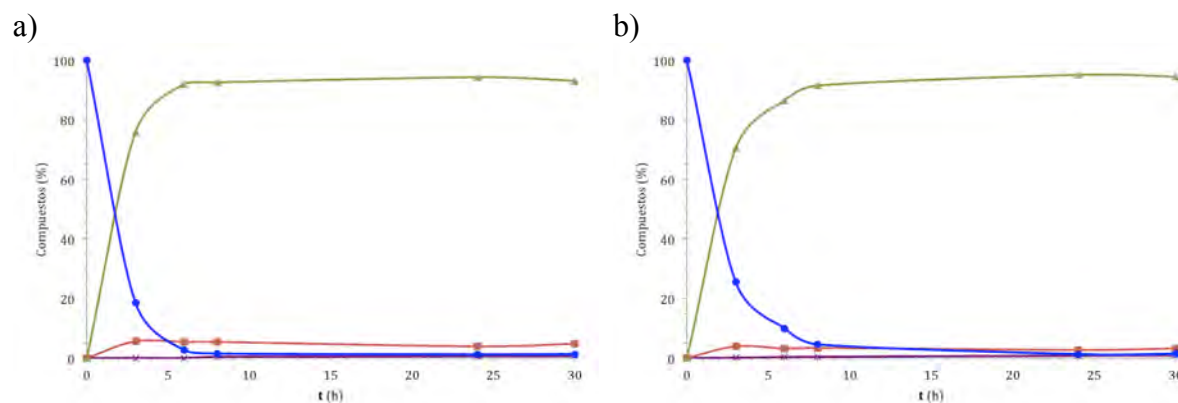


Figura 24. Procesos enzimáticos de levulinización de 0.5 g de dG^{Tac} (**3e**) con CAL-B a diferentes concentraciones: a) 0.1 M; b) 0.2 M. Claves: dG^{Tac} (—●—), 3'-*O*-Lev-dG^{Tac} (—■—), 5'-*O*-Lev-dG^{Tac} (—▲—) y 3',5'-di-*O*-Lev-dG^{Tac} (—×—).

El comportamiento de las dos reacciones es prácticamente el mismo, aunque a 0.1 M la reacción es ligeramente más rápida (entradas 1 y 3, Tabla 11). Tras 8 h, se obtiene un 98% de conversión en el proceso a concentración 0.1 M, mientras que para la reacción más

concentrada (0.2 M) se alcanza un 95% de conversión. A partir de las 10 h se observa el mismo resultado en ambos procesos alcanzando resultados muy parecidos a las 24 h (entradas 2 y 4, Tabla 11).

CONCLUSIONES

Se ha llevado a cabo un estudio de acilación enzimática de 2'-desoxinucleósidos utilizando diferentes preparados enzimáticos comerciales de la lipasa de *Pseudomonas cepacia* y de *Candida antarctica* tipo B, inmovilizadas en diferentes soportes. Como agente de acilación se utiliza el levulinato de acetoxima, debido a que el grupo levulinilo es ampliamente utilizado como grupo protector en la síntesis de oligonucleótidos.

La lipasa de *Pseudomonas cepacia* inmovilizada sobre diatomitas (PSL-IM) es el biocatalizador que proporciona los mejores resultados. Esta enzima cataliza la reacción de acilación en el hidroxilo secundario de la timidina, *N*⁴-benzoil-2'-desoxicitidina y *N*⁴-benzoil-2'-desoxiadenosina con excelentes conversiones y regioselectividades, encontrándose un preparado de esta lipasa alternativo a la que está inmovilizada sobre cerámica (PSL-C), que ha dejado de comercializarse, y que tan buenas selectividades había mostrado en los nucleósidos. Sin embargo, no se obtuvieron resultados positivos para el derivado de la guanina, incluso utilizando diferentes grupos protectores en la base nitrogenada como los grupos isobutirilo y (4-*tert*-butilfenoxi)acetilo.

De todos los preparados de la lipasa de *Candida antarctica* de tipo B, la que da lugar a mejores conversiones en tiempos muy cortos de reacción es la que está inmovilizada sobre la resina Lewatit E (CAL-B). Esta lipasa exhibe una alta regioselectividad en la formación de los derivados 5'-*O*-acilados para los cuatro 2'-desoxinucleósidos. Esta enzima acepta como sustrato tanto a la *N*²-isobutiril-2'-desoxiguanosina como a la *N*-(4-*tert*-butilfenoxi)acetil-2'-desoxiguanosina, obteniéndose los correspondientes derivados 5'-*O*-levulinilo con excelente selectividad.

Se ha escalado la reacción de acilación de la *N*²-(4-*tert*-butilfenoxi)acetil-2'-desoxiguanosina catalizada por la CAL-B con vista a su aplicación industrial. Se ha encontrado que la CAL-B sigue manteniendo su actividad catalítica y proporciona los mismos resultados que cuando el proceso se realiza a pequeña escala.

PARTE EXPERIMENTAL

E.1. DISOLVENTES Y REACTIVOS GENERALES

Los disolventes utilizados en las reacciones enzimáticas fueron secados antes de ser usados. Así, el THF se trató con sodio en presencia de benzofenona como indicador. Los nucleósidos han sido donados por Isis Pharmaceuticals (Carlsbad, CA, EE.UU) o Rasayan Inc. (Encinitas, CA, EE.UU.)

Las lipasas de *Candida antarctica* B:

- **CAL-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.
- **CAL-B1**: CAL-B experimental (10855 PLU/g) ha sido donada por la compañía SPRIN Technologies y está inmovilizada sobre un soporte de tipo polimérico de ésteres metacrílicos
- **CAL-B2**: CAL-B LCAHNHE (7320 PLU/g) ha sido adquirida a la compañía SPRIN Technologies y está inmovilizada sobre una resina de poliestireno.
- **CAL-B3**: CAL-B LCAME (2632 PLU/g) ha sido adquirida a la compañía SPRIN Technologies y está inmovilizada sobre una resina acrílica.

Las lipasas de *Pseudomonas cepacia*:

- **PSL-IM**: PSL (943 PLU/g) ha sido adquirida a Amano Inc. y está inmovilizada sobre diatomitas.
- **PSL1**: PSL LPSHN (229 PLU/g) ha sido adquirida a la compañía SPRIN Technologies y está inmovilizada sobre una resina entrecruzada de poliestireno.
- **PSL2**: PSL LPSME (159 PLU/g) ha sido adquirida a la compañía SPRIN Technologies y está inmovilizada sobre una resina acrílica.

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

E.2. TÉCNICAS DE ANÁLISIS

Las **cromatografías en capa fina** (CCF) se realizan 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 siguiente mezcla: 2.5% de *p*-anisaldehído, 3.5% de H₂SO₄ concentrado y 1% de ácido acético glacial, en etanol.

Las **cromatografías en columna** son realizadas sobre gel de sílice 60 (230-400 *mesh*) comercializada por Merck. Como eluyentes se utilizan mezclas de MeOH/CH₂Cl₂.

Los análisis de **cromatografía HPLC** se llevaron a cabo en un cromatógrafo Agilent HP 1100 con detector UV a 254 nm. Se ha empleado una columna Spherisorb W con un relleno de gel de sílice de 5 μm (0.46 x 25 cm) y una mezcla de eluyentes MeOH/CH₂Cl₂; también una columna Mediterranea Sea C18 con un relleno de gel de sílice de 5 μm (0.46 x 25 cm), y mezclas de eluyentes MeCN/H₂O.

Las condiciones del HPLC para el seguimiento de las reacciones de acilación de los nucleósidos así como los tiempos de retención de cada compuesto, incluidos los derivados 5'-*O*-, 3'-*O*- y 3',5'-di-*O*-levulinil 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):

- ✓ Acilación de la timidina (**1a**): columna Mediterránea Sea C18 5 μm (25 x 0.46 cm); eluyente MeCN/H₂O (13:87) durante 15 min y posteriormente un gradiente

hasta alcanzar 90% MeCN/H₂O a los 17 min, recuperando la relación inicial a los 21 min; flujo 1 mL/min. Los tiempos de retención son: Timidina (**1a**)= 4, 3'-*O*-Lev-T (**2a**)= 17, 5'-*O*-Lev-T (**3a**)= 15.1, 3',5'-di-*O*-Lev-T (**4a**)= 20 min.

- ✓ Acilación de dC^{Bz} (**1b**): Columna Spherisorb W 5 μm (25 x 0.46 cm); eluyente MeOH/CH₂Cl₂ (4:96) durante 12 min y posteriormente un gradiente hasta alcanzar 12% MeOH/CH₂Cl₂ a los 17 min; flujo 0.8 mL/min. Los tiempos de retención son: dC^{Bz} (**1b**)= 23.1, 3'-*O*-Lev-dC^{Bz} (**2b**)= 10.4, 5'-*O*-Lev-dC^{Bz} (**3b**)= 17.3, 3',5'-di-*O*-Lev-dC^{Bz} (**4b**)= 7.3 min.
- ✓ Acilación de dA^{Bz} (**1c**): columna Mediterránea Sea C18 5 μm (25 x 0.46 cm); eluyente MeCN/H₂O (30:70) durante 15 min y posteriormente un gradiente hasta alcanzar 60% MeCN/H₂O a los 17 min; flujo 1 mL/min. Los tiempos de retención son: dA^{Bz} (**1c**)= 3.6, 3'-*O*-Lev-dA^{Bz} (**2c**)= 6.7, 5'-*O*-Lev-dA^{Bz} (**3c**)= 5.7, 3',5'-di-*O*-Lev-dA^{Bz} (**4c**)= 9.9 min.
- ✓ Acilación de dG^{Ibu} (**1d**): columna Mediterránea Sea C18 5 μm (25 x 0.46 cm); eluyente MeCN/H₂O (30:70) durante 15 min y posteriormente un gradiente hasta alcanzar 70% MeCN/H₂O a los 17 min; flujo 1 mL/min. Los tiempos de retención son: dG^{Ibu} (**1d**)= 3.3, 3'-*O*-Lev-dG^{Ibu} (**2d**)= 5.9, 5'-*O*-Lev-dG^{Ibu} (**3d**)= 5.2, 3',5'-di-*O*-Lev-dG^{Ibu} (**4d**)= 8.3 min.
- ✓ Acilación de dG^{Tac} (**1e**): columna Mediterránea Sea C18 5 μm (25 x 0.46 cm); eluyente MeCN/H₂O (30:70) durante 15 min y posteriormente un gradiente hasta alcanzar 60% MeCN/H₂O a los 17 min; flujo 1 mL/min. Los tiempos de retención son: dG^{Tac} (**1e**)= 11.6, 3'-*O*-Lev-dG^{Tac} (**2e**)= 16.1, 5'-*O*-Lev-dG^{Tac} (**3e**)= 14.9, 3',5'-di-*O*-Lev-dG^{Tac} (**4e**)= 18.5 min.

Los espectros de resonancia magnética nuclear se han realizado en dos espectrómetros: Bruker AV-300, Bruker AC-300 DPX (ambos de 300.13 MHz para ¹H y 75.5 MHz para ¹³C).

Se usan como disolventes cloroformo, metanol y dimetilsulfóxido deuterados. Los desplazamientos químicos (δ) 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.

E.3. PROCEDIMIENTOS SINTÉTICOS

E.3.1. Procedimiento general para la acilación enzimática de 2'-desoxinucleósidos 1a-e. Síntesis de los derivados 3'-*O*-levulinilo 2a-e y 5'-*O*-levulinilo 3a-e

Una suspensión del correspondiente nucleósido **1** (0.2 mmol), el levulinato de acetoxima (0.6 mmol) y la lipasa se agita a 250 rpm en THF seco (2 mL) bajo atmósfera de nitrógeno. La relación de 1:enzima es 1:1 (p/p) cuando se utiliza CAL-B, y 1:3 (p/p) cuando se utiliza PSL. Temperatura y tiempo de reacción se indicó en la consiguiente sección de resultados y discusión. Las reacciones se siguen por CCF (10% MeOH/CH₂Cl₂) y se monitoriza por HPLC.

E.3.2. Síntesis de los 3',5'-di-*O*-levulinil-2'-desoxinucleósidos 4a-e

Los derivados diacilados **4a-e** se obtienen, en general, en proporciones muy bajas como subproductos de las reacciones enzimáticas y por tanto fue necesario sintetizarlos de manera independiente para utilizarlos como patrón en los análisis de HPLC.

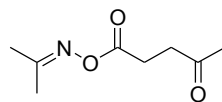
Sobre una mezcla bajo nitrógeno y en agitación de **1a-e** (2 mmol) en Et₃N seca (1.7 mL, 12 mmol) y 1,4-dioxano seco (20 mL), se añade el LevOH (1.21 g, 10.4 mmol), la DCC (2.14 g, 10.4 mmol) y la DMAP (20 mg, 0.16 mmol). La reacción se mantiene agitando a temperatura ambiente y se sigue por CCF (10% MeOH/CH₂Cl₂), hasta la desaparición del producto de partida **1** (1 a 3 h). Una vez finalizada la reacción se separa la dicitclohexilurea (sólido blanco) por filtración en placa y se evaporan los disolventes del filtrado a presión reducida. El residuo resultante se extrae con NaHCO₃(aq)/CH₂Cl₂.

Se combinan las fases orgánicas, se secan sobre Na₂SO₄ anhidro y se filtran. Los disolventes se eliminan por destilación a presión reducida. Se añade Et₂O frío sobre el crudo y se tritura hasta que precipite el sólido, que se filtra y se lava con Et₂O frío para eliminar la *N*-levulinilurea. Si quedasen trazas de DCU se disuelve el sólido en AcOEt, se filtran las partículas sólidas y se evaporan los disolventes para obtener los 3',5'-di-*O*-levulinil-2'-desoxinucleósidos **4a-e**.

E.4. DATOS EXPERIMENTALES

A continuación se describe de forma detallada los datos experimentales de los productos preparados en esta Memoria.

levulinato de acetoxima



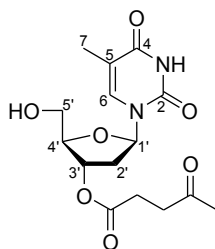
R_f (100% AcOEt): 0.37

Aceite viscoso amarillento

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): 1.99 (s, 3H, Me), 2.01 (s, 3H, Me), 2.19 (s, 3H, *Me*-Lev), 2.66 (t, 2H, CH₂-Lev, ³J_{HH} 6.6 Hz) y 2.82 (t, 2H, CH₂-Lev, ³J_{HH} 6.8 Hz)

¹³C-NMR (CDCl₃, 75.5 MHz): 16.9 (Me), 21.8 (Me), 26.5 (CH₂-Lev), 29.8 (Me), 37.7 (CH₂-Lev), 163.9 (C=N), 170.4 (C=O) y 206.3 (C=O)

3'-*O*-levuliniltimidina (2a)



R_f (10% MeOH/CH₂Cl₂): 0.40

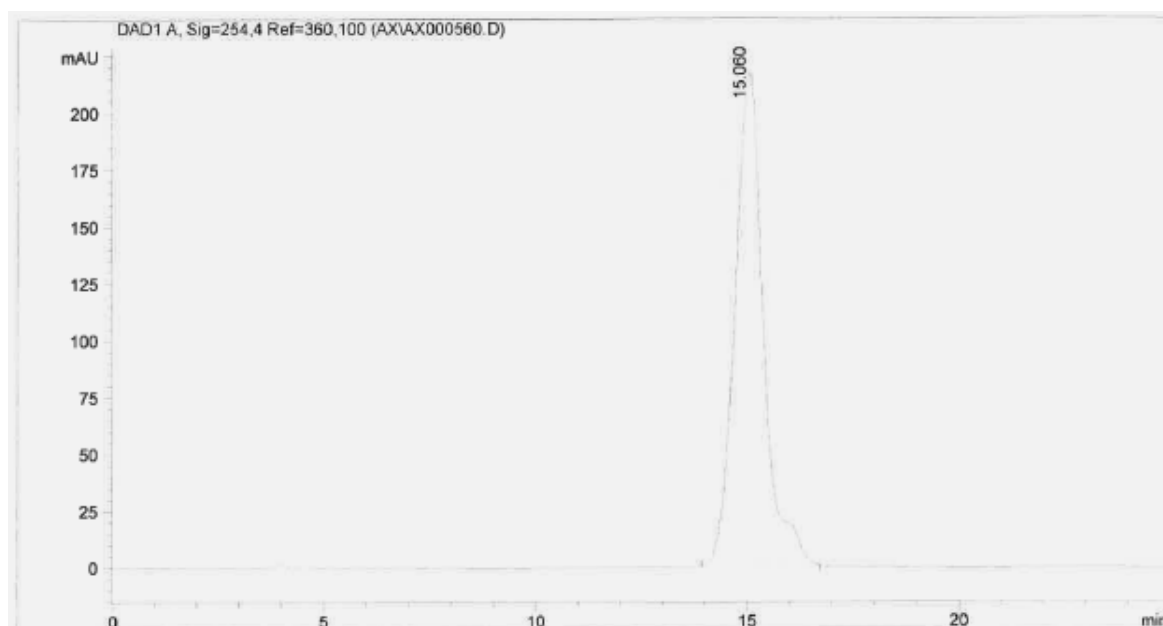
Sólido blanco

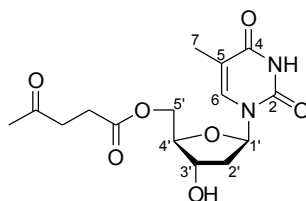
¹H-NMR (MeOH-*d*₄, 200 MHz): 2.09 (d, 3H, Me, J_{HH} 1.3 Hz), 2.39 (s, 3H, *Me*-Lev), 2.57 (m, 2H, H_{2'}), 2.80 (t, 2H, CH₂-Lev, $^3J_{HH}$ 6.0 Hz), 3.05 (t, 2H, CH₂-Lev, $^3J_{HH}$ 6.2 Hz), 4.01 (m, 2H, H_{5'}), 4.29 (m, 1H, H_{4'}), 5.02 (m, 1H, H_{3'}), 6.50 (dd, 1H, H_{1'}, $^3J_{HH}$ 8.1, $^3J_{HH}$ 6.5 Hz) y 8.04 (d, 1H, H₆, $^3J_{HH}$ 1.3 Hz)

¹³C-NMR (CDCl₃, 75.5 MHz): 12.4 (Me), 27.8 (CH₂-Lev), 29.6 (*Me*-Lev), 37.1 (C_{2'}), 37.7 (CH₂-Lev), 62.2 (C_{5'}), 74.9, 85.0 (C₃+C_{4'}), 85.7 (C_{1'}), 111.1 (C₅), 136.5 (C₆), 150.6 (C₂), 164.3 (C₄), 172.4 (2C=O) y 206.8 (2C=O)

HPLC:

Columna Mediterránea Sea C18, eluyente MeCN/H₂O (13:87); 1 mL·min⁻¹; t_R : 17 min



5'-*O*-levuliniltimidina (3a)

R_f (10% MeOH/CH₂Cl₂): 0.22

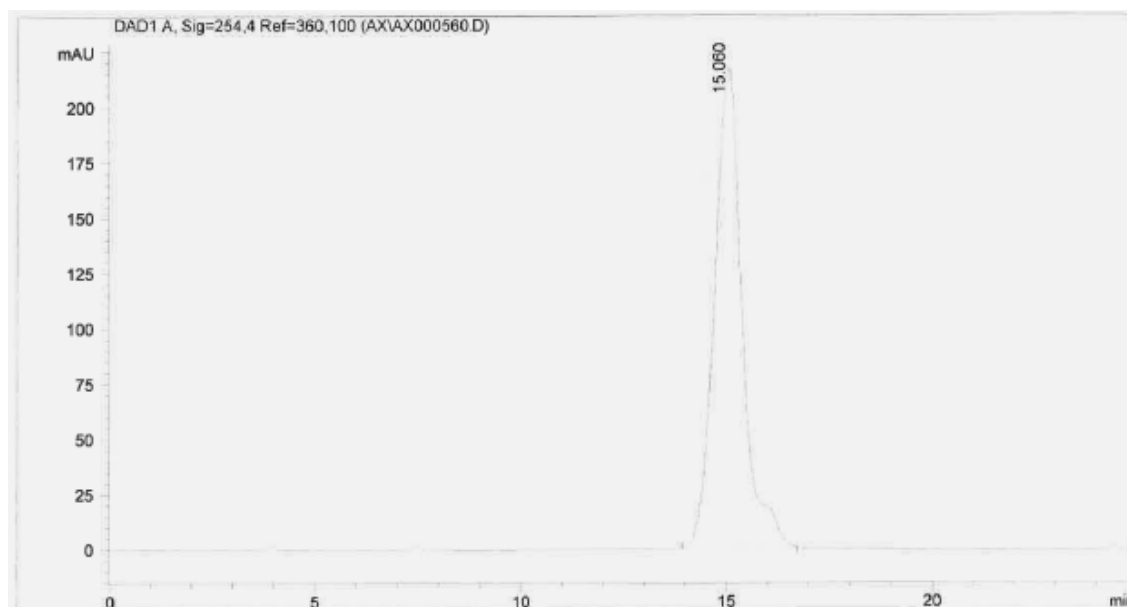
Sólido blanco

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 200 MHz): 1.91 (s, 3H, Me), 2.27 (s, 3H, *Me*-Lev), 2.30 (m, 2H, H₂), 2.66 (m, 2H, CH₂-Lev), 2.89 (t, 2H, CH₂-Lev, ³J_{HH} 6.2 Hz), 4.07 (m, 1H, H_{4'}), 4.35 (m, 3H, H₃+2H_{5'}), 5.55 (d, 1H, OH), 6.32 (t, 1H, H_{1'}, ³J_{HH} 7.0 Hz), 7.6 (s, 1H, H_{6'}) y 11.45 (s, 1H, NH)

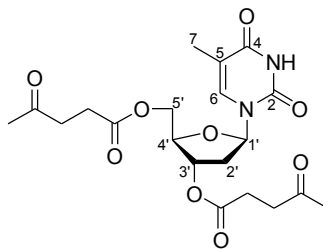
¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 50.3 MHz): 12.02 (Me), 27.4 (CH₂-Lev), 29.4 (*Me*-Lev), 37.2 (C_{2'}), 38.4 (CH₂-Lev), 63.8 (C_{5'}), 70.1, 83.5 (C₃+C_{4'}), 83.6 (C_{1'}), 109.7 (C₅), 135.7 (C₆), 150.3 (C₄), 163.6 (C₂), 172.1 (C=O) y 206.7 (C=O)

HPLC:

Columna Mediterránea Sea C18, eluyente MeCN/H₂O (13:87); 1 mL·min⁻¹; t_R: 15.1 min



3',5'-di-*O*-levuliniltimidina (4a)



R_f (10% MeOH/CH₂Cl₂): 0.45

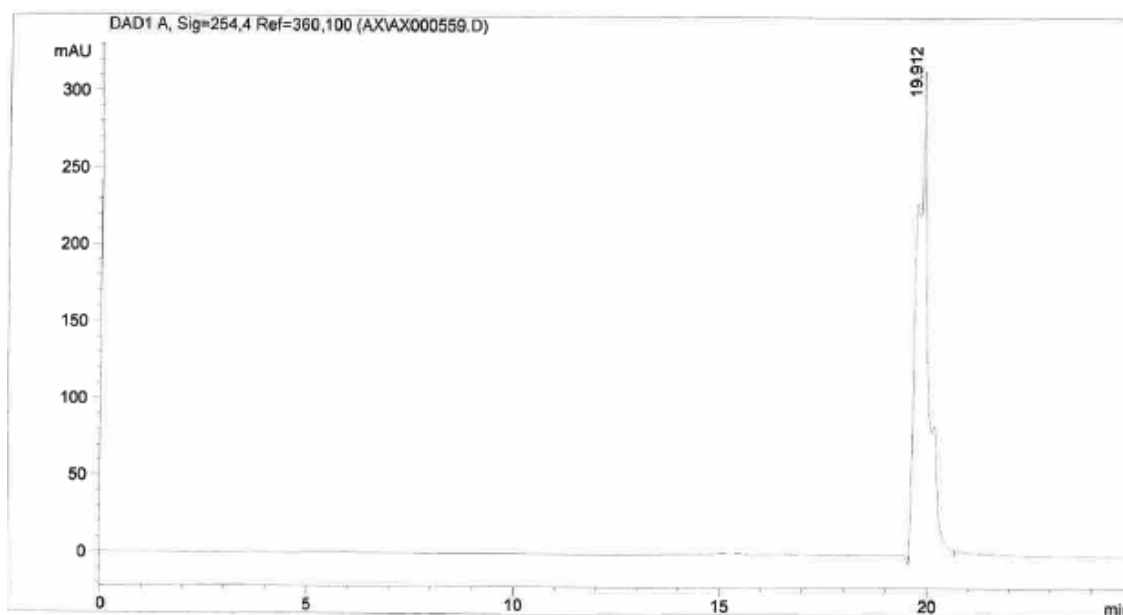
Sólido blanco

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): 1.88 (s, 3H, Me), 2.14 (s, 3H, *Me*-Lev), 2.15 (s, 3H, *Me*-Lev), 2.18 (m, 1H, H_{2'}), 2.41 (m, 1H, H_{2'}), 2.54 (m, 4H, 2CH₂-Lev), 2.73 (m, 4H, 2CH₂-Lev), 4.19 (m, 1H, H_{4'}), 4.31 (m, 2H, H_{5'}), 5.18 (m, 1H, H₃), 6.28 (dd, 1H, H_{1'}, ³J_{HH} 8.5, ³J_{HH} 5.4 Hz), 7.32 (s, 1H, H₆) y 9.99 (s, 1H, NH)

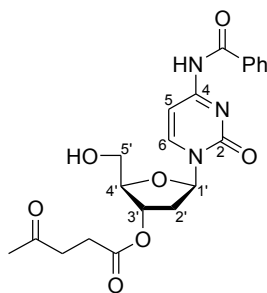
¹³C-NMR (CDCl₃, 75.5 MHz): 12.3 (Me), 27.48 (CH₂-Lev), 27.54 (CH₂-Lev), 29.4 (2-*Me*-Lev), 36.8 (C_{2'}), 37.5 (2CH₂-Lev), 63.7 (C_{5'}), 74.2, 81.8 (C_{3'}+C_{4'}) 84.3 (C_{1'}), 111.2 (C₅), 134.6 (C₆), 150.3 (C₂), 163.8 (C₄), 171.97 (C=O), 172.02 (C=O) y 206.3 (2C=O)

HPLC:

Columna Mediterránea Sea C18, eluyente MeCN/H₂O (13:87); 1 mL·min⁻¹; t_R: 20 min



***N*-benzoil-3'-*O*-levulinil-2'-desoxicitidina (2b)**



R_f (10% MeOH/CH₂Cl₂): 0.30

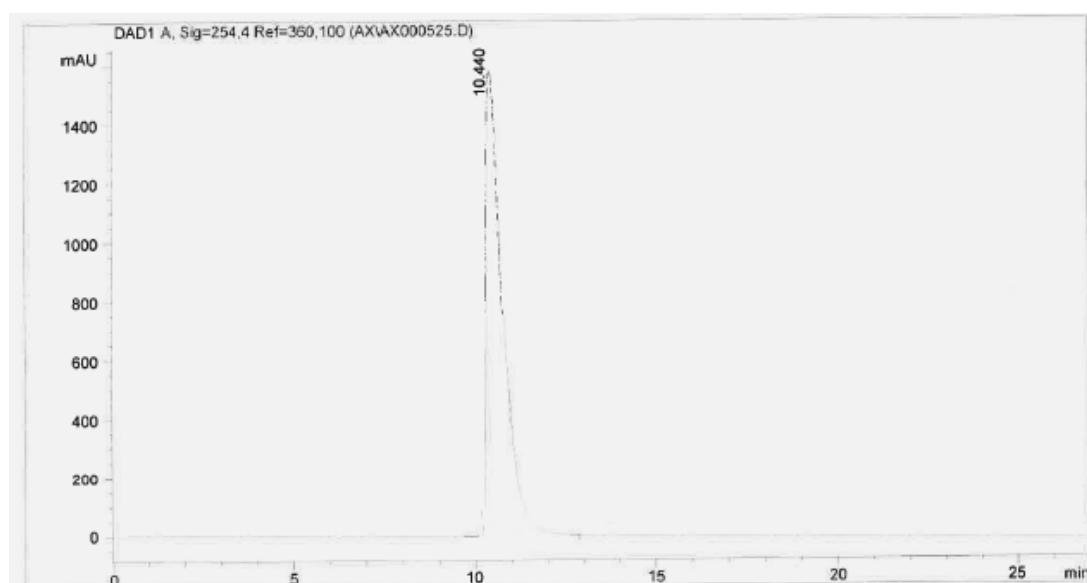
Sólido blanco

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): 2.20 (s, 3H, *Me*-Lev), 2.44 (m, 1H, H_{2'}), 2.59 (m, 2H, CH₂-Lev), 2.73 (m, 3H, H₂+CH₂-Lev), 3.97 (m, 2H, H_{5'}), 4.20 (m, 1H, H_{4'}), 5.37 (m, 1H, H_{3'}), 6.26 (aparente t, 1H, H_{1'}, ³J_{HH} 6.8 Hz), 7.58 (m, 4H, H₅+H_m+H_p), 7.90 (aparente d, 2H, H₆, ³J_{HH} 7.3 Hz) y 8.30 (d, 1H, H₆, ³J_{HH} 7.4 Hz)

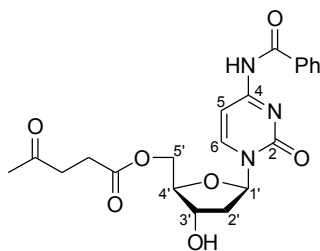
¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 75.5 MHz): 27.8 (CH₂-Lev), 29.6 (*Me*-Lev), 37.5 (CH₂-Lev), 38.2 (C_{2'}), 61.2 (C_{5'}), 74.9, 85.6 (C_{3'}+C_{4'}), 86.4 (C_{1'}), 96.3 (C₅), 128.5 (C_o+C_m), 132.8 (C_i), 133.1 (C_p), 145.0 (C₆), 154.5 (Ph-C=O), 163.3 (C₄), 167.4 (C₂), 172.1 (C=O) y 207.0 (C=O)

HPLC:

Columna Spherisorb W 5 μm, eluyente MeOH/CH₂Cl₂ (4:96); 0.8 mL·min⁻¹; t_R: 10.4 min



***N*-benzoil-5'-*O*-levulinil-2'-desoxicitidina (3b)**



R_f (10% MeOH/CH₂Cl₂): 0.37

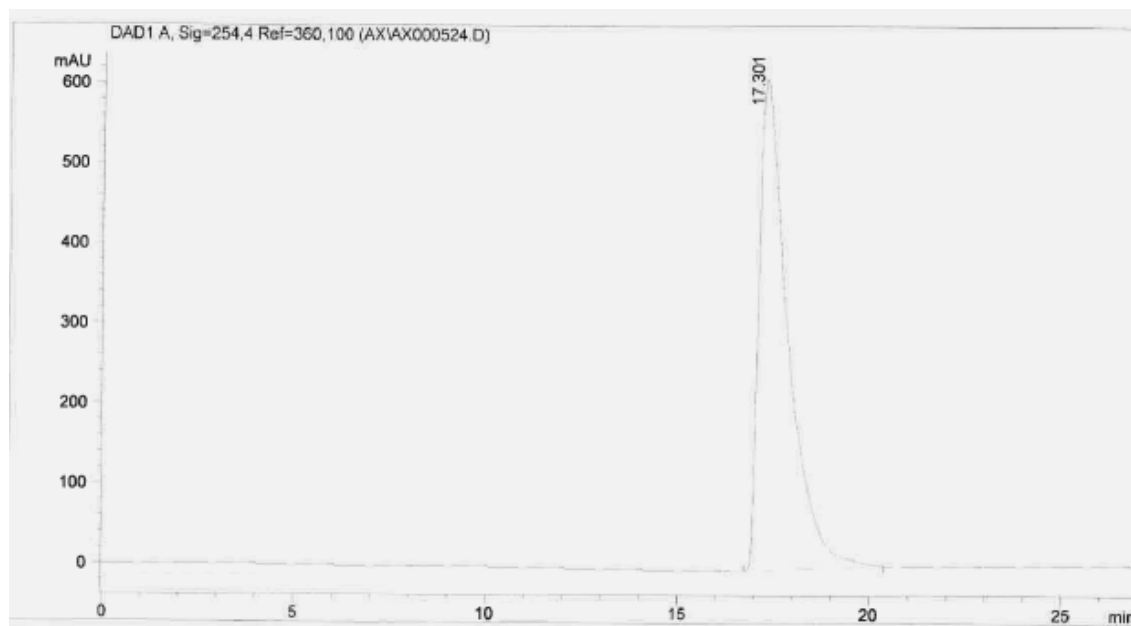
Sólido blanco

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): 2.20 (s, 3H, *Me*-Lev), 2.25 (m, 1H, H_{2'}), 2.58 (m, 2H, CH₂-Lev), 2.75 (m, 1H, H_{2'}), 2.82 (m, 2H, CH₂-Lev), 3.35 (s, 1H, OH), 4.25 (m, 1H, H_{3'}), 4.40 (m, 3H, 2H_{5'}+H_{4'}), 6.30 (aparente t, 1H, H_{1'}, ³J_{HH} 6.2 Hz), 7.55 (m, 4H, H₅+2H_m+H_p), 7.90 (aparente d, 2H, H₆, ³J_{HH} 7.1 Hz), 8.20 (d, 1H, H₆, ³J_{HH} 7.4 Hz) y 8.78 (s, 1H, NH)

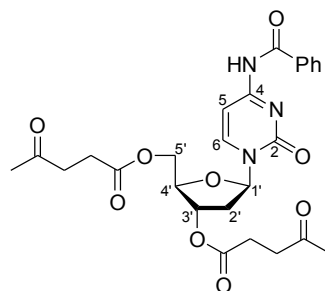
¹³C-NMR (CDCl₃, 75.5 MHz): 27.7 (CH₂-Lev), 29.6 (*Me*-Lev), 37.7 (CH₂-Lev), 41.3 (C_{2'}), 63.7 (C_{5'}), 70.6, 84.8 (C_{3'}+C_{4'}), 87.4 (C_{1'}), 96.8 (C₅), 127.6, 128.7 (C_o+C_m), 132.8 (C_i), 133.0 (C_p), 144.2 (C₆), 155.1 (C₂), 162.4 (C₄), 166.7 (Ph-C=O), 172.6 (C=O) y 206.8 (C=O)

HPLC:

Columna Spherisorb W 5 μm, eluyente MeOH/CH₂Cl₂ (4:96); 0.8 mL·min⁻¹; t_R: 17.3 min



***N*-benzoil-3',5'-di-*O*-levulinil-2'-desoxicitidina (4b)**



R_f (10% MeOH/CH₂Cl₂): 0.61

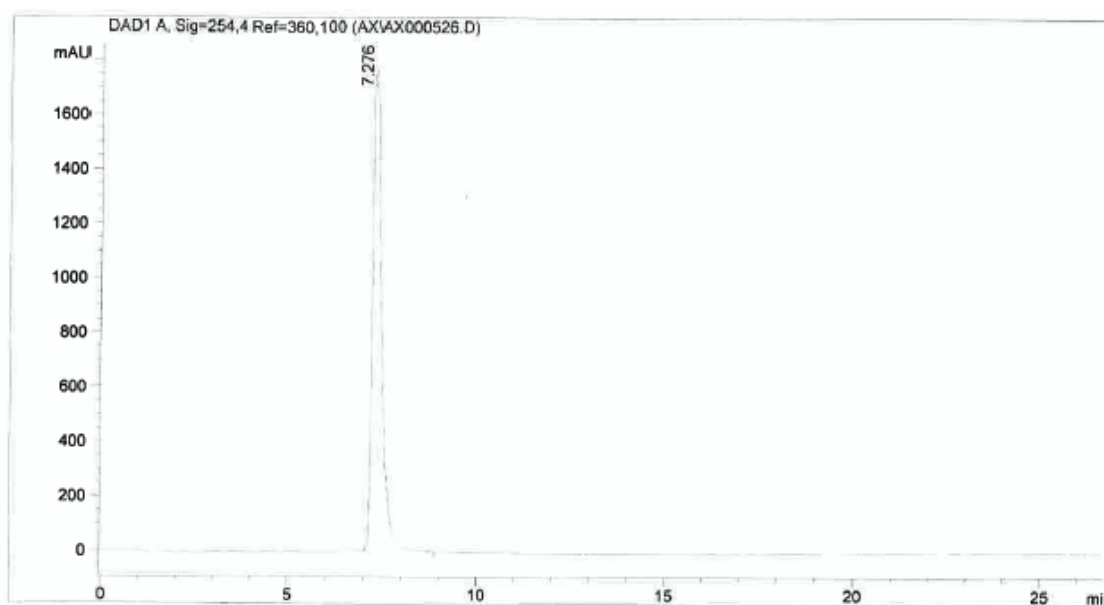
Sólido blanco

¹H-NMR (MeOH-*d*₄, 200 MHz): 2.31 (s, 3H, *Me*-Lev), 2.38 (s, 3H, *Me*-Lev), 2.50 (m, 1H, H_{2'}), 2.75 (m, 4H, 2CH₂-Lev), 2.95 (m, 1H, H_{2'}), 3.05 (m, 4H, 2CH₂-Lev), 4.59 (m, 3H, H₄+2H_{5'}), 5.49 (m, 1H, H_{3'}), 6.42 (dd, 1H, H_{1'}, ³*J*_{HH} 7.7, ³*J*_{HH} 5.7 Hz), 7.75 (m, 4H, H₅+H_m+H_p), 8.15 (m, 2H, H_o) y 8.45 (d, 1H, H₆, ³*J*_{HH} 7.6 Hz)

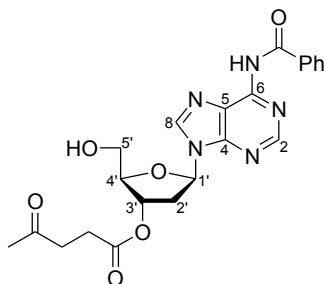
¹³C-NMR (MeOH-*d*₄, 75.5 MHz): 29.1 (CH₂-Lev), 29.2 (CH₂-Lev), 29.9 (*Me*-Lev), 38.91 (CH₂-Lev), 38.94 (CH₂-Lev), 39.8 (C_{2'}), 65.3 (C_{5'}), 76.5, 85.0 (C₃+C_{4'}), 89.3 (C_{1'}), 99.0 (C₅), 129.5, 130.1 (C_o+C_m), 134.4 (C_p), 135.0 (C_i), 146.2 (C₆), 158.0 (C₂), 165.1 (C₄), 169.2 (Ph-C=O), 174.3 (C=O), 174.4 (C=O), 209.67 (C=O) y 209.72 (C=O)

HPLC:

Columna Spherisorb W 5 μm, eluyente MeOH/CH₂Cl₂ (4:96); 0.8 mL·min⁻¹; *t*_R: 7.3 min



***N*-benzoil-3'-*O*-levulinil-2'-desoxiadenosina (2c)**



R_f (10% MeOH/CH₂Cl₂): 0.44

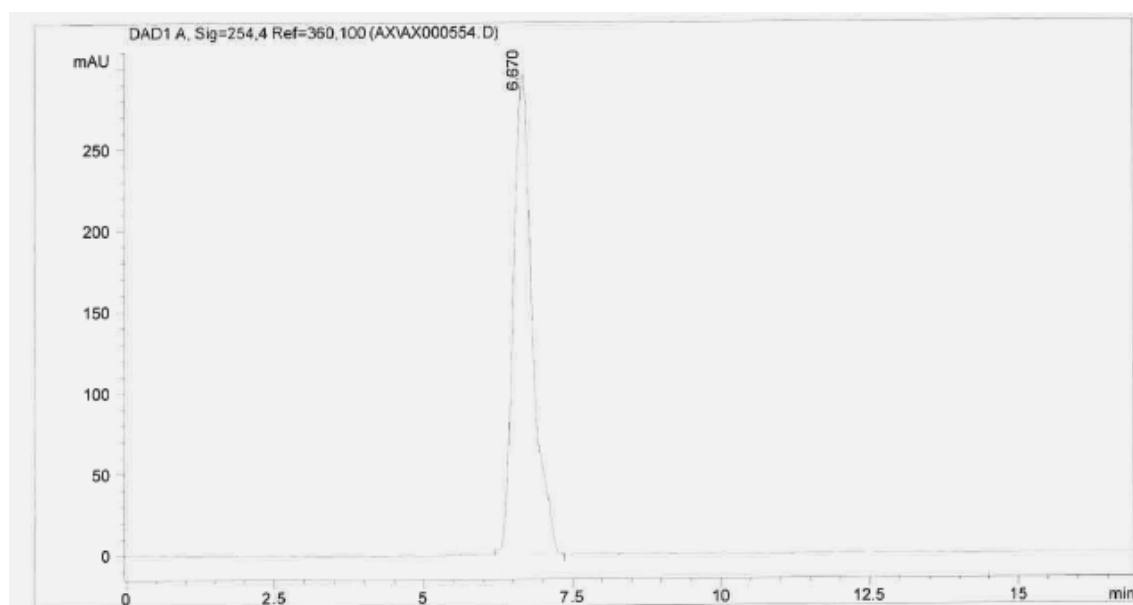
Sólido blanco

¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz): 2.22 (s, 3H, *Me*-Lev), 2.61 (m, 3H, CH₂-Lev+H_{2'}), 2.82 (m, 2H, CH₂-Lev), 3.18 (m, 1H, H_{2'}), 3.97 (m, 2H, H_{5'}), 4.31 (s, 1H, H_{4'}), 5.57 (aparente d, 1H, H_{3'}, ³J_{HH} 5.4 Hz), 6.38 (dd, 1H, H_{1'}, ³J_{HH} 9.8, ³J_{HH} 5.2 Hz), 7.57 (m, 3H, H_m+H_p), 8.05 (m, 2H, H_o), 8.17 (s, 1H, H₂ ó H₈) y 8.79 (s, 1H, H₈ ó H₂)

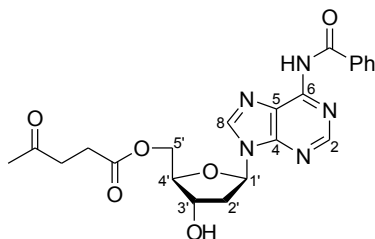
¹³C-NMR (CDCl₃, 75.5 MHz): 27.7 (CH₂-Lev), 29.6 (*Me*-Lev), 37.6 (CH₂-Lev+C_{2'}), 62.8 (C_{5'}), 76.1, 86.8 (C_{3'}+C_{4'}), 87.0 (C_{1'}), 124.3 (C₅), 127.8, 128.6 (C_o+C_m), 132.7 (C_p), 133.2 (C_i), 142.3 (C₂ ó C₈), 150.1 (C₄), 150.6 (C₆), 151.9 (C₈ ó C₂), 164.8 (Ph-C=O), 172.1 (C=O) y 206.4 (C=O)

HPLC:

Columna Mediterránea Sea C18, eluyente MeCN/H₂O (30:70); 1 mL·min⁻¹; t_R: 6.7 min



***N*-benzoil-5'-*O*-levulinil-2'-desoxiadenosina (3c)**



R_f (10% MeOH/CH₂Cl₂): 0.50

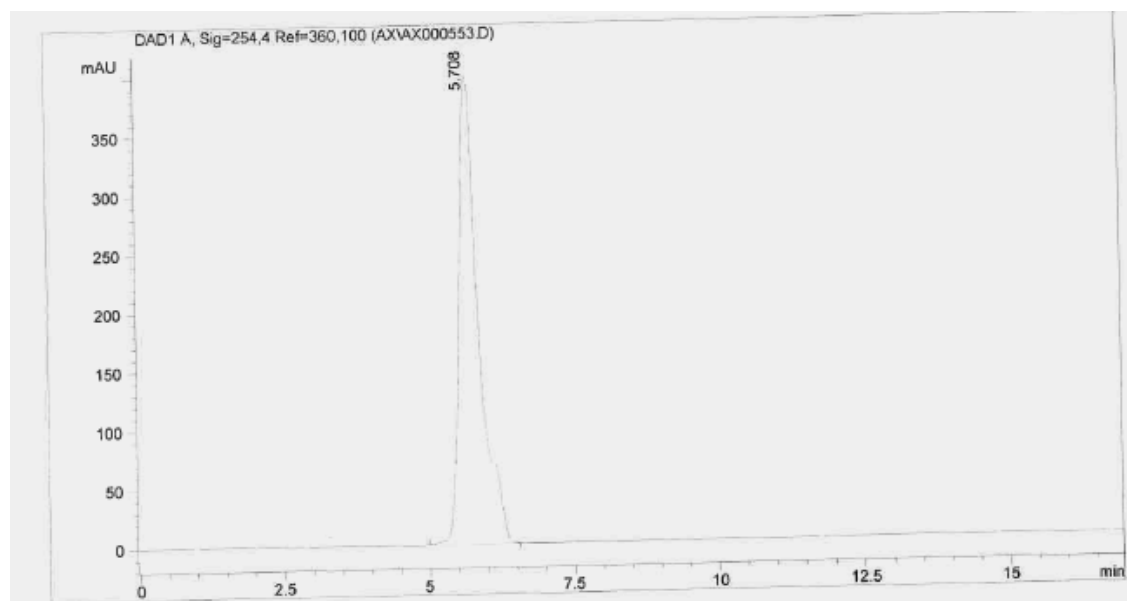
Sólido blanco

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): 2.06 (s, 3H, *Me*-Lev), 2.45 (m, 3H, CH₂-Lev+1H₂), 2.66 (m, 2H, CH₂-Lev), 2.90 (m, 1H, H₂'), 4.03 (m, 1H, H₄'), 4.20 (m, 2H, 2H₅'), 4.51 (m, 1H, H₃'), 5.55 (s, 1H, OH), 6.50 (aparente t, 1H, H₁', ³*J*_{HH} 6.5 Hz), 7.58 (m, 3H, 2H_m+H_p), 8.03 (m, 2H, 2H_o), 8.69 (s, 1H, H₂' ó H₈), 8.74 (s, 1H, H₈' ó H₂') y 11.20 (s, 1H, NH).

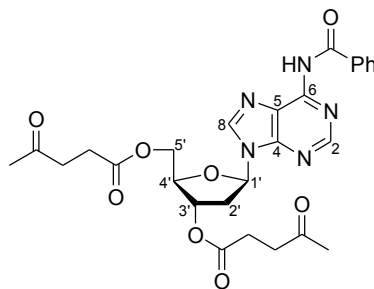
¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 75.5 MHz): 27.7 (CH₂-Lev), 29.8 (*Me*-Lev), 37.6, 38.7 (CH₂-Lev+C₂'), 64.2 (C₅'), 70.8, 83.8 (C₃+C₄'), 84.5 (C₁'), 126.1 (C₅), 128.7, 128.8 (C_o+C_m), 132.7 (C_p), 133.6 (C_i), 143.4 (C₂' ó C₈'), 150.7 (C₄'), 151.9 (C₈' ó C₂'), 152.1 (C₆'), 165.9 (Ph-C=O), 172.5 (C=O) y 207.1 (C=O)

HPLC:

Columna Mediterránea Sea C18, eluyente MeCN/H₂O (30:70); 1 mL·min⁻¹; *t*_R: 5.7 min



***N*-benzoil-3',5'-di-*O*-levulinil-2'-desoxiadenosina (4c)**



R_f (10% MeOH/CH₂Cl₂): 0.71

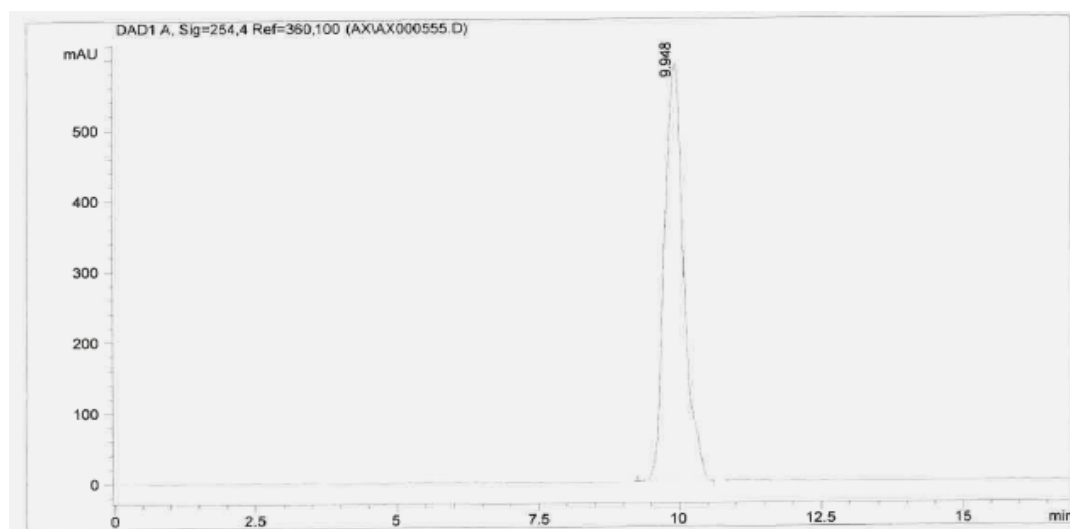
Sólido blanco

¹H-NMR (MeOH-*d*₄, 300 MHz): 2.28 (s, 3H, *Me*-Lev), 2.35 (s, 3H, *Me*-Lev), 2.75 (m, 4H, 2CH₂-Lev), 2.87 (m, 1H, H_{2'}), 2.99 (m, 4H, 2CH₂-Lev), 3.30 (m, 1H, H_{2'}), 4.52 (m, 3H, H_{4'}+2H_{5'}), 5.65 (m, 1H, H_{3'}), 6.70 (aparente t, 1H, H_{1'}, ³*J*_{HH} 6.8 Hz), 7.75 (m, 3H, 2H_m+H_p), 8.25 (aparente d, 2H, 2H_o, ³*J*_{HH} 7.4 Hz), 8.75 (s, 1H, H₂ ó H₈) y 8.88 (s, 1H, H₈ ó H₂)

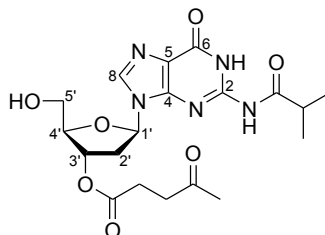
¹³C-NMR (MeOH-*d*₄, 75.5 MHz): 29.0 (CH₂-Lev), 29.2 (CH₂-Lev), 30.0 (*Me*-Lev), 37.9 (C_{2'}), 38.87 (CH₂-Lev), 38.91 (CH₂-Lev), 65.2 (C_{5'}), 76.4, 84.3 (C_{3'}+C_{4'}), 86.5 (C_{1'}), 125.5 (C₅), 129.7, 130.0 (C_o+C_m), 134.1 (C_p), 135.1 (C_i), 144.5 (C₂ ó C₈), 151.3 (C₄), 153.3 (C₆), 153.5 (C₈ ó C₂), 168.1 (Ph-C=O), 174.2 (C=O), 174.3 (C=O), 209.6 (C=O) y 209.7 (C=O)

HPLC:

Columna Mediterránea Sea C18, eluyente MeCN/H₂O (30:70); 1 mL·min⁻¹; t_R: 9.9 min



***N*-isobutiril-3'-*O*-levulinil-2'-desoxiguanosina (2d)**



R_f (20% MeOH/CH₂Cl₂): 0.75

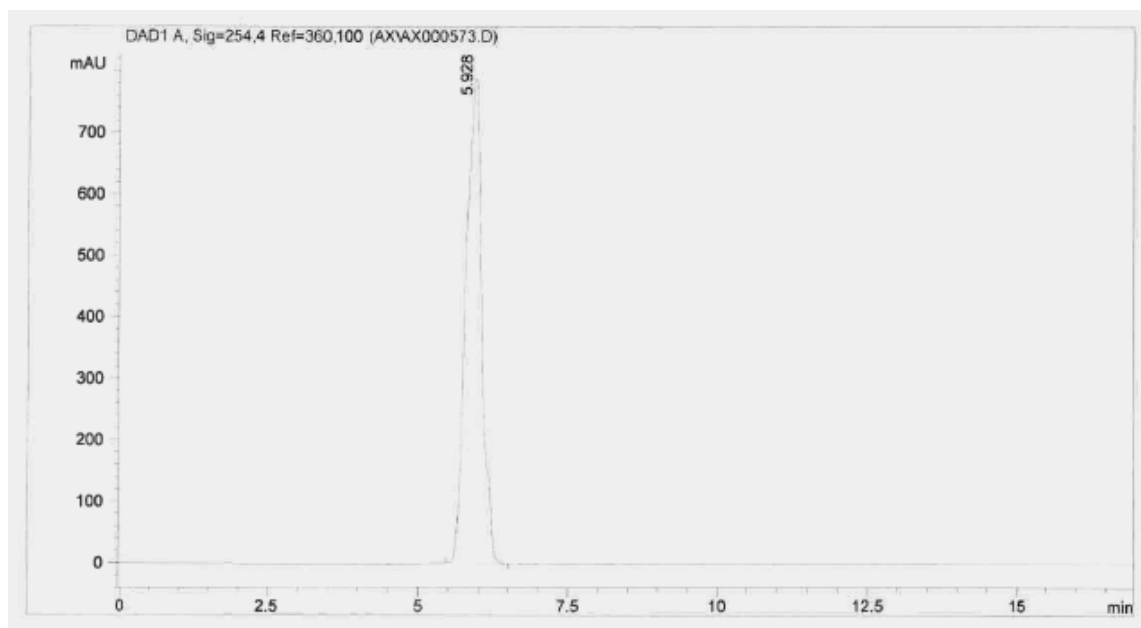
Sólido blanco

¹H-NMR (MeOH-*d*₄, 200 MHz): 1.41 (d, 6H, *Me*-Ibu, ³*J*_{HH} 6.8 Hz), 2.38 (s, 3H, *Me*-Lev), 2.70-3.09 (m, 7H, 2CH₂-Lev+2H₂+CH-Ibu), 3.98 (d, 2H, 2H_{5'}, ³*J*_{HH} 3.6 Hz), 4.32 (m, 1H, H_{4'}), 5.57 (m, 1H, H_{3'}), 6.51 (dd, 1H, H_{1'}, ³*J*_{HH} 6.1, ³*J*_{HH} 8.0 Hz) y 8.43 (s, 1H, H₈)

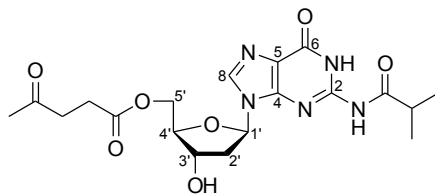
¹³C-NMR (MeOH-*d*₄, 50.3 MHz): 19.3 (*Me*-Ibu), 28.9 (CH₂-Lev), 29.7 (*Me*-Lev), 36.9 (CH-Ibu), 38.6, 39.0 (C_{2'}+CH₂-Lev), 63.0 (C_{5'}), 76.6, 85.6 (C_{3'}+C_{4'}), 87.0 (C_{1'}), 121.2 (C₅), 139.6 (C₈), 149.7, 150.2 (C₂+C₄), 157.3 (C₆), 173.9 (C=O), 181.7 (Ibu-C=O) y 209.5 (C=O)

HPLC:

Columna Mediterránea Sea C18, eluyente MeCN/H₂O (30:70); 1 mL·min⁻¹; *t*_R: 5.9 min



***N*-isobutiril-5'-*O*-levulinil-2'-desoxiguanosina (3d)**



R_f (20% MeOH/CH₂Cl₂): 0.60

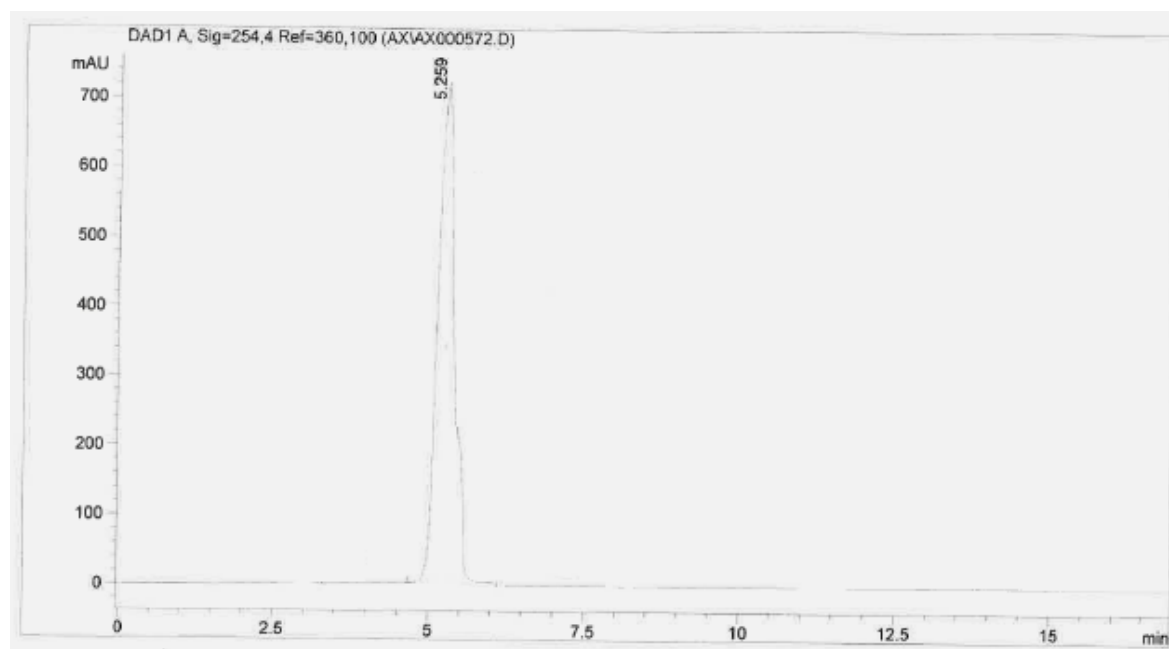
Sólido blanco

¹H-NMR (MeOH-*d*₄, 300 MHz): 1.42 (d, 6H, *Me*-Ibu, ³*J*_{HH} 6.8 Hz), 2.32 (s, 3H, *Me*-Lev), 2.59–3.07 (m, 7H, 2CH₂-Lev+2H₂+CH-Ibu), 4.32 (m, 1H, H_{4'}), 4.50 (m, 2H, H_{5'}), 4.75 (m, 1H, H_{3'}), 6.53 (aparente t, 1H, H_{1'}, ³*J*_{HH} 6.5 Hz) y 8.33 (s, 1H, H₈)

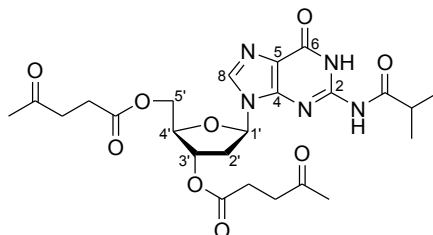
¹³C-NMR (MeOH-*d*₄, 75.5 MHz): 9.7 (*Me*-Ibu), 29.0 (CH₂-Lev), 29.9 (*Me*-Lev), 37.2 (CH-Ibu), 38.9, 41.1 (C₂+CH₂-Lev), 65.3 (C_{5'}), 72.6, 86.1 (C₃+C_{4'}), 86.5 (C_{1'}), 121.8 (C₅), 139.8 (C₈), 150.0, 150.5 (C₂+C₄), 157.8 (C₆), 174.5 (C=O), 182.0 (Ibu-C=O) y 209.7 (C=O)

HPLC:

Columna Mediterránea Sea C18, eluyente MeCN/H₂O (30:70); 1 mL·min⁻¹; t_R: 5.2 min



***N*-isobutiril-3',5'-di-*O*-levulinil-2'-desoxiguanosina (4d)**



R_f (20% MeOH/CH₂Cl₂): 0.85

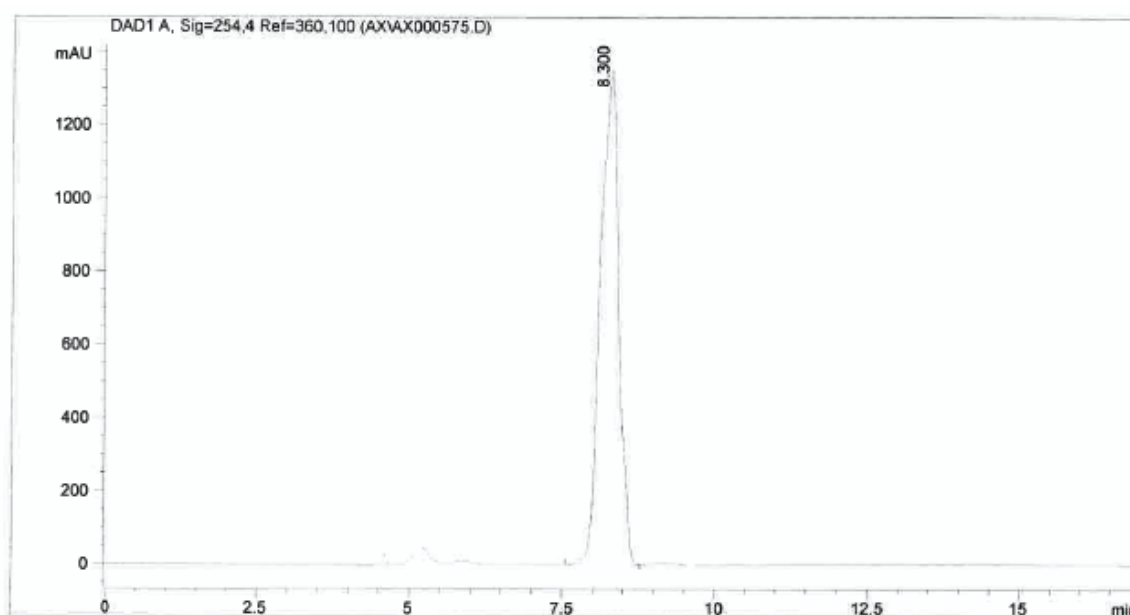
Sólido blanco

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 200 MHz): 1.23 (d, 6H, *Me*-Ibu, ³*J*_{HH} 6.5 Hz), 2.15 (s, 3H, *Me*-Lev), 2.20 (s, 3H, *Me*-Lev), 2.55-3.19 (ma, 11H, 4CH₂-Lev+2H₂+CH-Ibu), 4.32 (m, 3H, H_{4'}+2H_{5'}), 5.35 (m, 1H, H_{3'}), 6.35 (aparente t, 1H, H_{1'}, ³*J*_{HH} 7.2 Hz), 8.35 (s, 1H, H₈), 11.80 (sa, 1H, NH) y 12.20 (sa, 1H, NH)

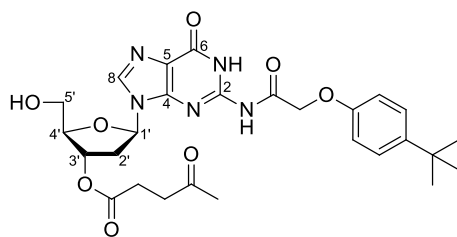
¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 50.3 MHz): 18.86 (*Me*-Ibu), 18.91 (*Me*-Ibu), 27.5 (CH₂-Lev), 27.6 (CH₂-Lev), 29.5 (*Me*-Lev), 29.6 (*Me*-Lev), 34.8 (CH-Ibu), 35.5 (C₂), 37.38 (CH₂-Lev), 37.45 (CH₂-Lev), 63.7 (C_{5'}), 74.6, 81.7 (C₃+C_{4'}), 82.9 (C_{1'}), 120.3 (C₅), 137.3 (C₈), 148.3, 148.7 (C₂+C₄), 154.8 (C₆), 172.1 (C=O), 172.2 (C=O), 180.2 (Ibu-C=O), 206.9 (C=O) y 207.1 (C=O)

HPLC:

Columna Mediterránea Sea C18, eluyente MeCN/H₂O (30:70); 1 mL·min⁻¹; *t*_R: 8.3 min



***N*²-(4-*tert*-butilfenoxi)acetil-3'-*O*-levulinil-2'-desoxiguanosina (2e)**



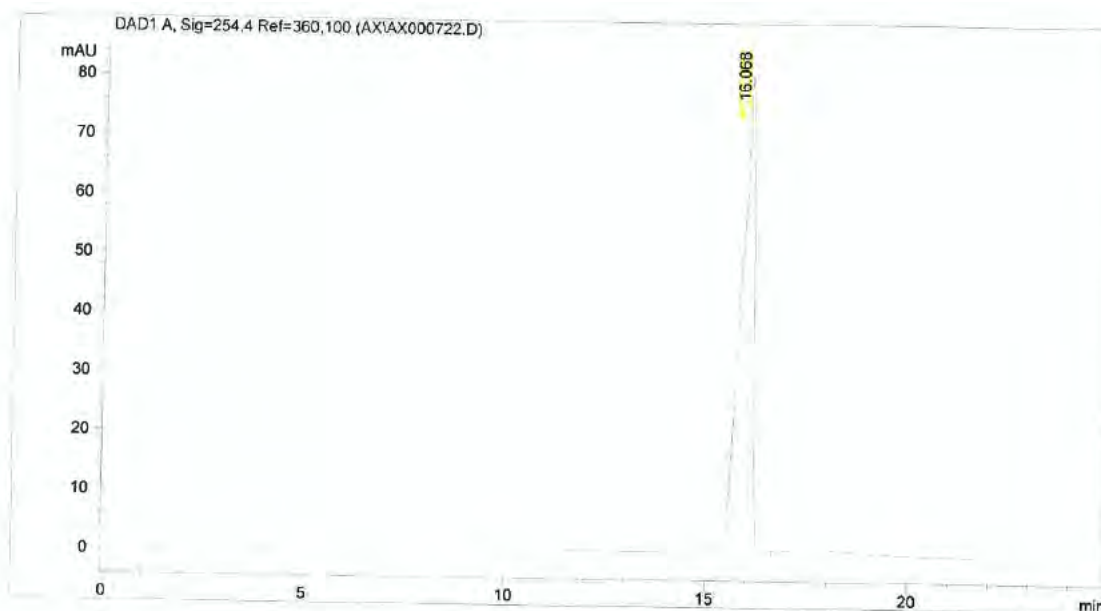
R_f (10% MeOH/CH₂Cl₂): 0.62

Sólido blanco

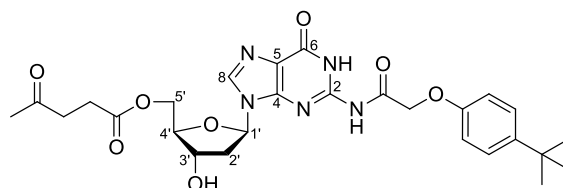
¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): 1.26 (s, 9H, *Me*-*tert*butilo), 2.14 (s, 3H, *Me*-*Lev*), 2.47 (1H, H₂), 2.50 (2H, CH₂-*Lev*), 2.77 (2H, CH₂-*Lev*), 2.86 (1H, H₂'), 3.60 (2H, H_{5'}), 4.11 (2H, H_{4'}), 4.81 (s, 2H, CH₂-O), 5.15 (1H, HO-CH₂(5')), 5.33 (1H, H_{3'}), 6.24 (1H, H_{1'}), 6.90 (d, 2H, Ph, ²*J*_{HH} 8.8 Hz), 7.30 (d, 2H, Ph, ²*J*_{HH} 8.8 Hz), 8.27 (s, 1H, H₈), 11.90 (sa, 2H, NH)

HPLC:

Columna Mediterránea Sea C18, eluyente MeCN/H₂O (30:70); 1 mL·min⁻¹; t_R: 16.1 min



 N^2 -(4-*tert*-butilfenoxi)acetil-5'-*O*-levulinil-2'-desoxiguanosina (3e)



R_f (10% MeOH/CH₂Cl₂): 0.52

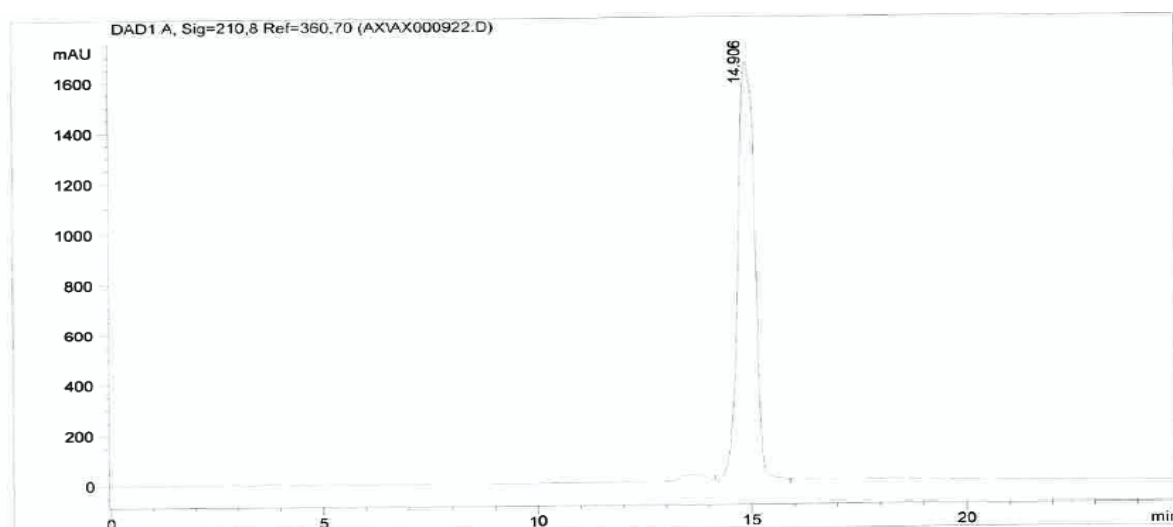
Sólido blanco

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): 1.26 (s, 9H, *Me*-*tert*butilo), 2.10 (s, 3H, *Me*-Lev), 2.38 (1H, H₂), 2.50 (2H, CH₂-Lev), 2.70 (2H, CH₂-Lev), 2.74 (1H, H₂'), 4.09 (1H, H₄'), 4.2 (2H, H₅'), 4.44 (1H, H₃'), 4.84 (s, 2H, CH₂-O), 5.49 (1H, HO-CH₂(3')), 6.25 (1H, H₃'), 6.90 (d, 2H, Ph, ²J_{HH} 8.8 Hz), 7.30 (d, 2H, Ph, ²J_{HH} 8.8 Hz), 8.20 (s, 1H, H₈), 11.39 (sa, 2H, NH)

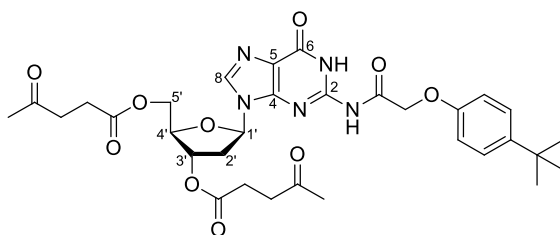
¹³C-NMR (MeOH-*d*₄, 75.5 MHz): 27.3 (CH₂-Lev), 28.2 (*Me*-Lev), 30.5 (3CH₃-^tBu), 33.6 (C-^tBu), 37.2 (CH₂-Lev), 39.3 (C₂'), 63.6 (C₅'), 66.9 (CH₂-Tac), 71.0 (C₃'), 84.5, 84.9 (C₁' + C₄'), 114.0 (2CH-Ph), 120.6 (C₅), 126.1 (2CH-Ph), 138.4 (C₈), 144.6 (C-Ph-^tBu), 147.3, 148.5 (C₂ + C₄'), 155.3 (C-Ph-O), 156.0 (C₆'), 171.6 (C=O, Tac), 172.9 (C=O, éster), 208.1 (C=O, Lev)

HPLC:

Columna Mediterránea Sea C18, eluyente MeCN/H₂O (30:70); 1 mL·min⁻¹; *t*_R: 14.9 min



***N*²-(4-*tert*-butilfenoxi)acetil-3',5'-di-*O*-levulinil-2'-desoxiguanosina (4e)**



R_f (10% MeOH/CH₂Cl₂): 0.75

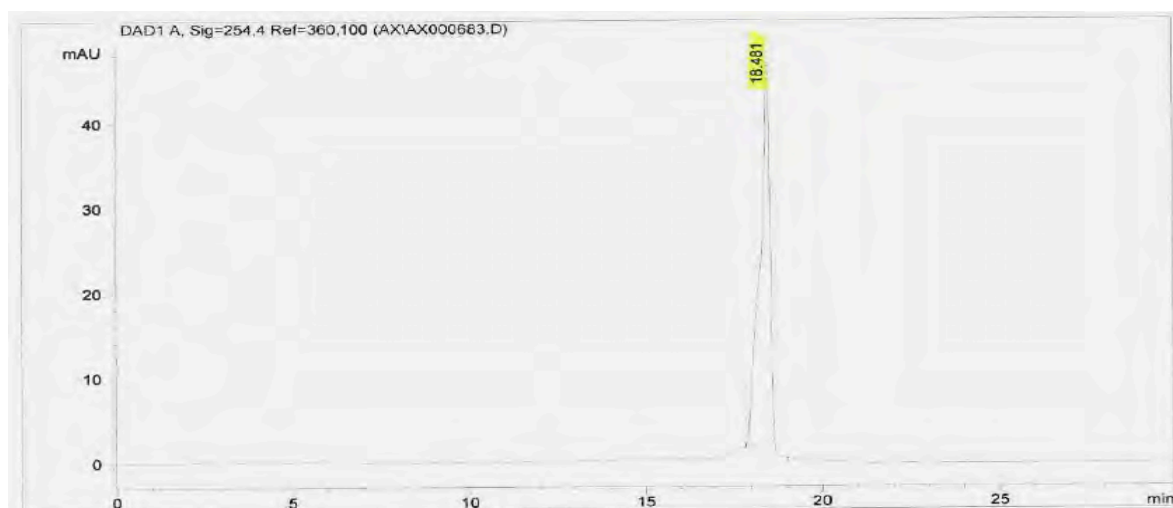
Sólido blanco

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): 1.25 (s, 9H, *Me*-*tert*butilo), 2.08 (s, 3H, *Me*-Lev), 2.10 (s, 3H, *Me*-Lev), 2.50 (m, 3H, H₂+CH₂-Lev), 2.70 (2H, CH₂-Lev), 2.77 (2H, CH₂-Lev), 2.99 (1H, H₂'), 4.22 (m, 3H, H₄'+2H₅'), 4.83 (s, 2H, CH₂-O), 5.30 (1H, H₃'), 6.25 (1H, H₁'), 6.90 (d, 2H, Ph, ²*J*_{HH} 8.8 Hz), 7.30 (d, 2H, Ph, ²*J*_{HH} 8.8 Hz), 8.25 (s, 1H, H₈), 11.82 (sa, 2H, NH)

¹³C-NMR (MeOH-*d*₄, 75.5 MHz): 27.8 (CH₂-Lev), 27.9 (CH₂-Lev), 28.67 (*Me*-Lev), 28.73 (*Me*-Lev), 31.0 (3CH₃-^tBu), 34.0 (C-^tBu), 36.8 (C₂'), 37.7 (2CH₂-Lev), 63.9 (C₅'), 67.3 (CH₂-Tac), 75.1 (C₃'), 82.9, 85.1 (C₁' + C₄'), 114.5 (2CH-Ph), 121.1 (C₅), 126.5 (2CH-Ph), 138.9 (C₈), 145.0 (C-Ph-^tBu), 147.7, 148.8 (C₂ + C₄), 155.7 (C-Ph-O), 156.3 (C₆), 171.9 (C=O, Tac), 173.0 (C=O, éster), 173.2 (C=O, éster), 208.4 (C=O, Lev), 208.6 (C=O, Lev)

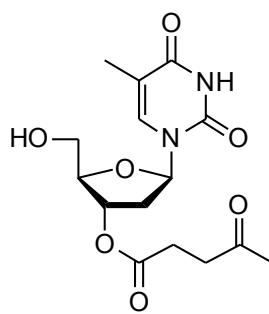
HPLC:

Columna Mediterránea Sea C18, eluyente MeCN/H₂O (30:70); 1 mL·min⁻¹; t_R: 18.5 min

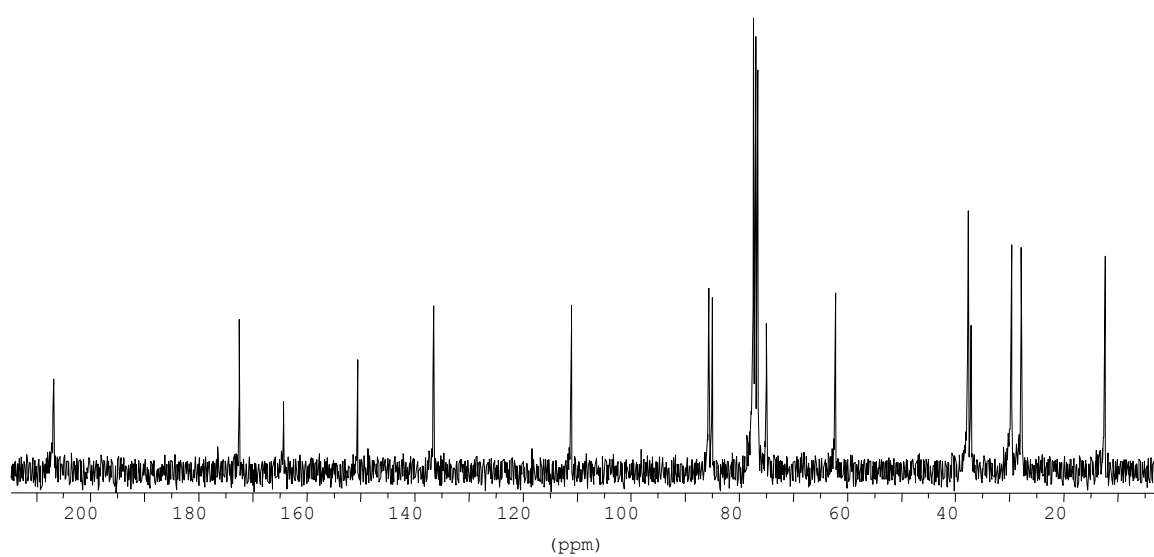
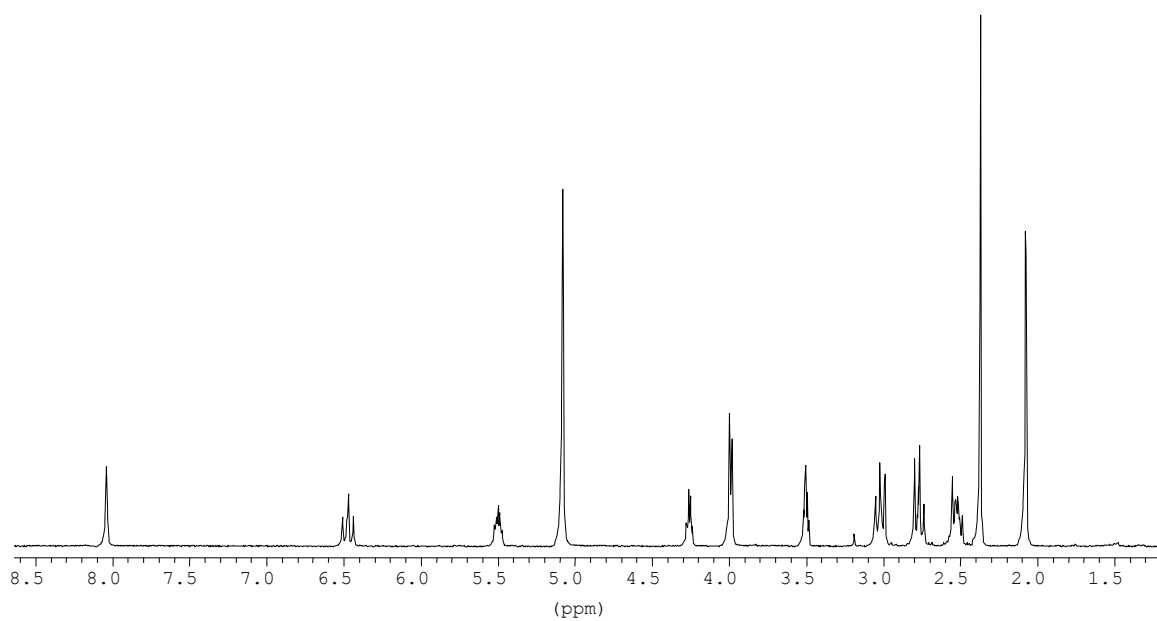


PARTE ESPECTRAL

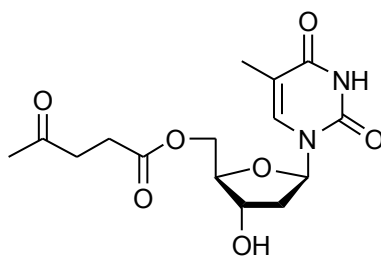
3'-*O*-levulinilimidina (2a)



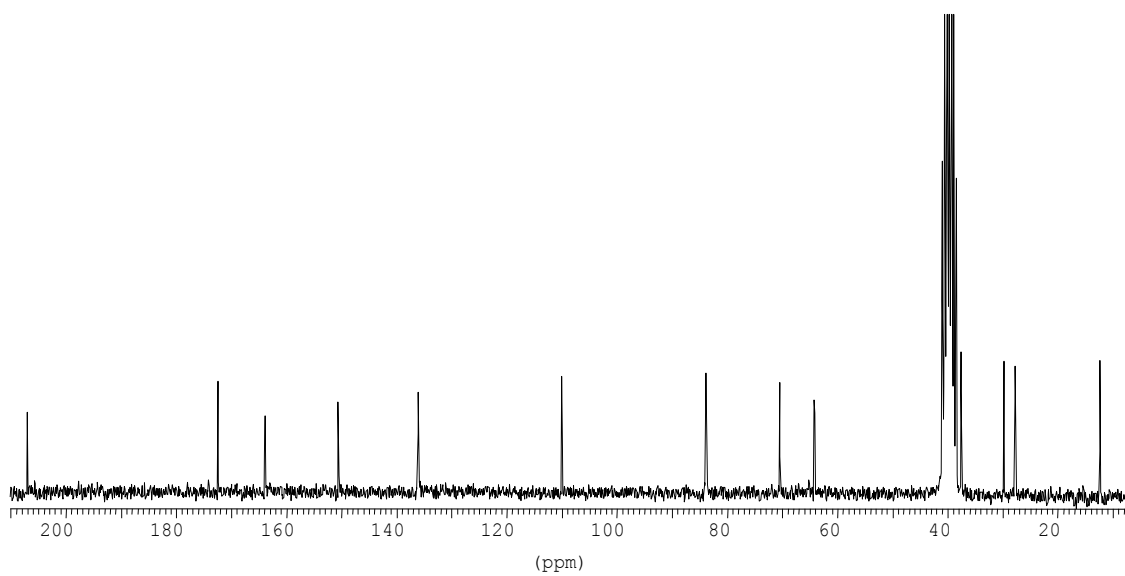
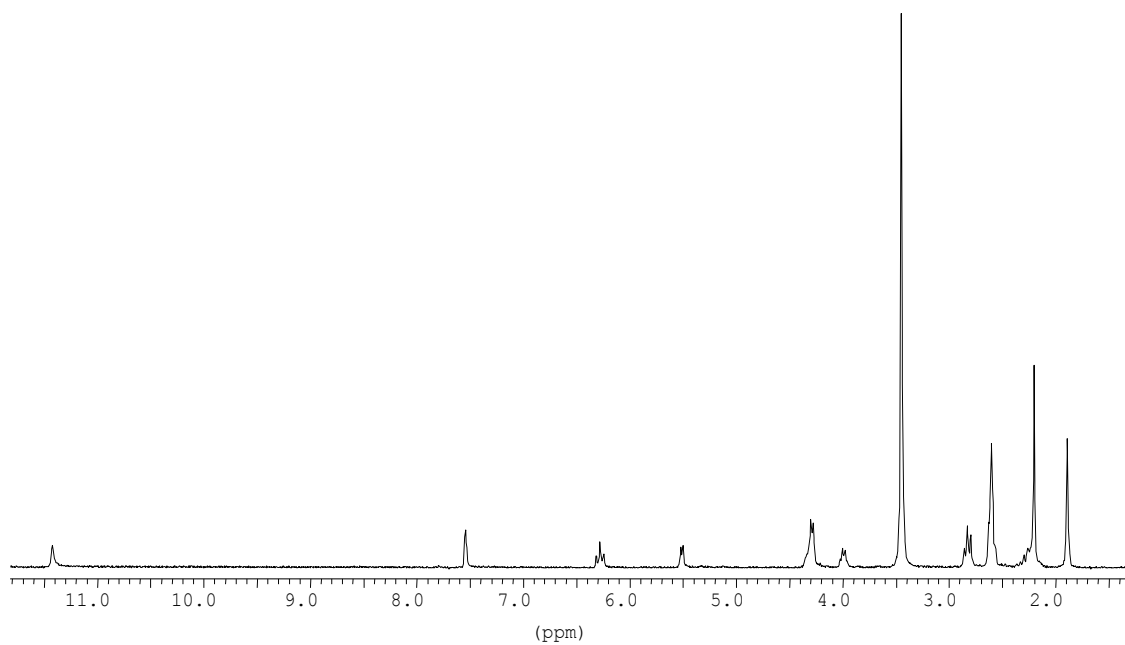
2a



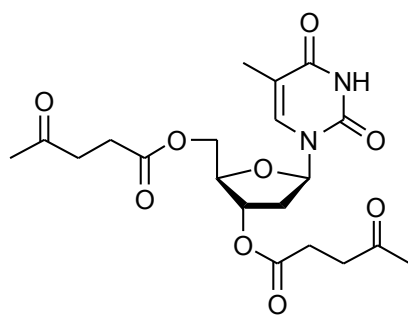
5'-O-levuliniltimidina (3a)



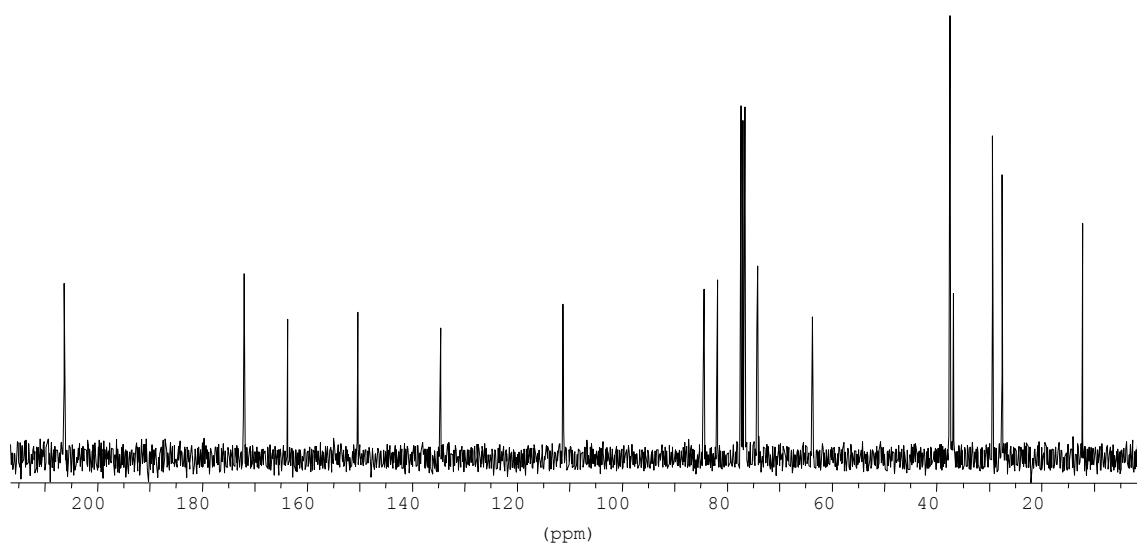
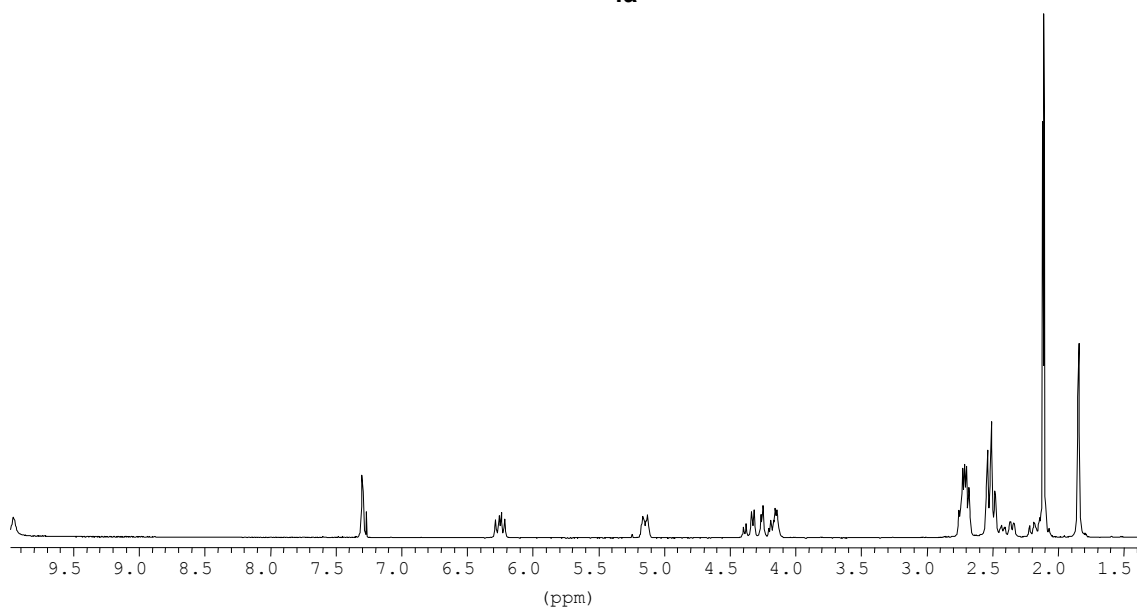
3a



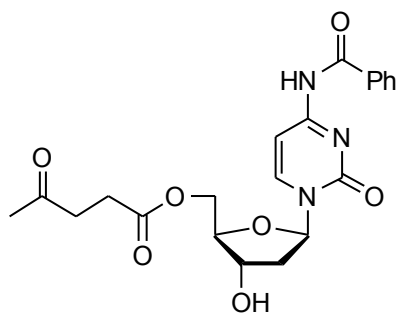
3',5'-di-*O*-levuliniltimidina (4a)



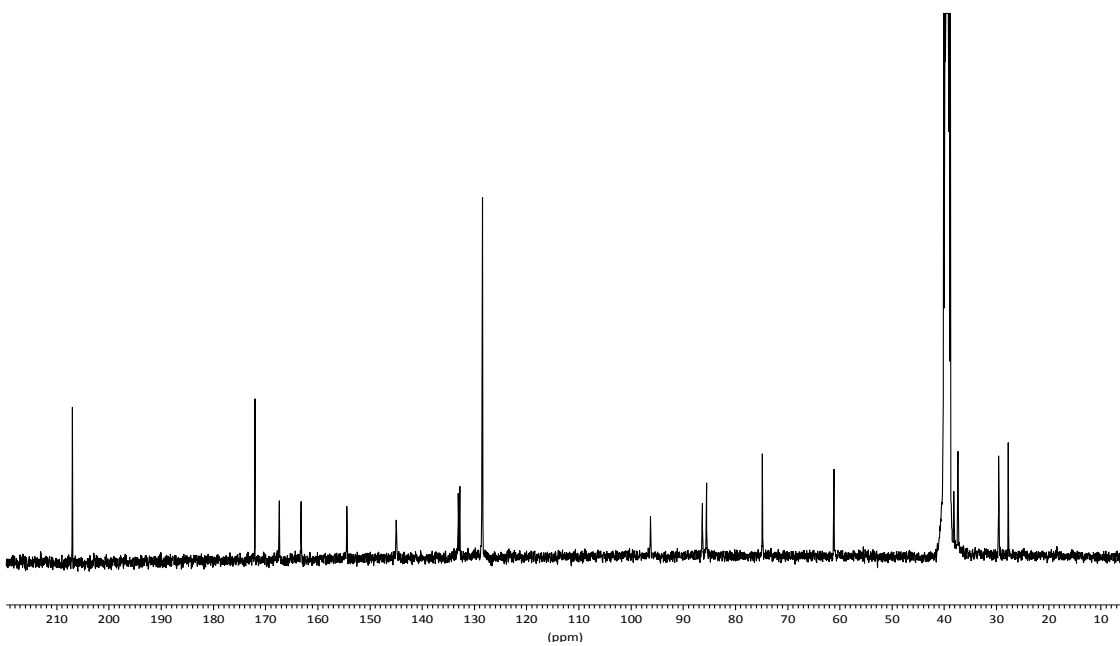
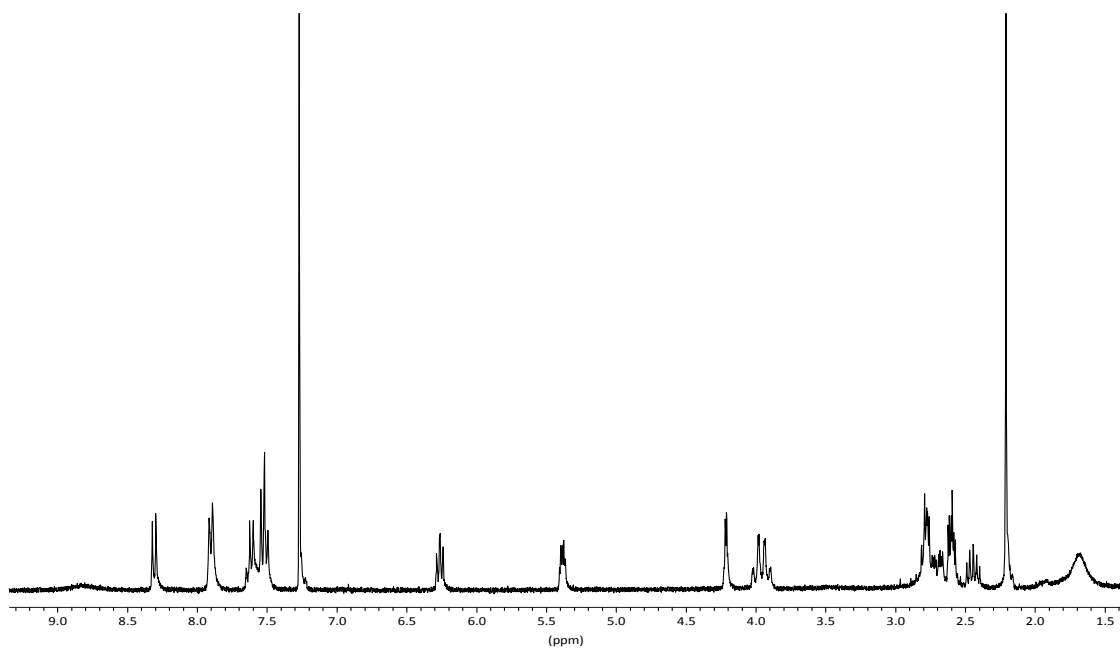
4a



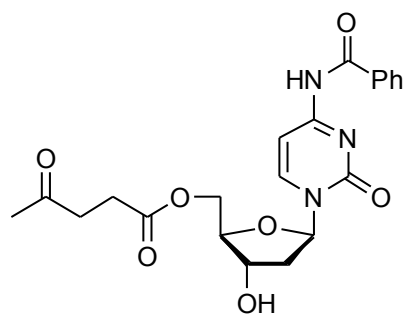
***N*-Benzoil-3'-*O*-levulinil-2'-desoxicitidina (2b)**



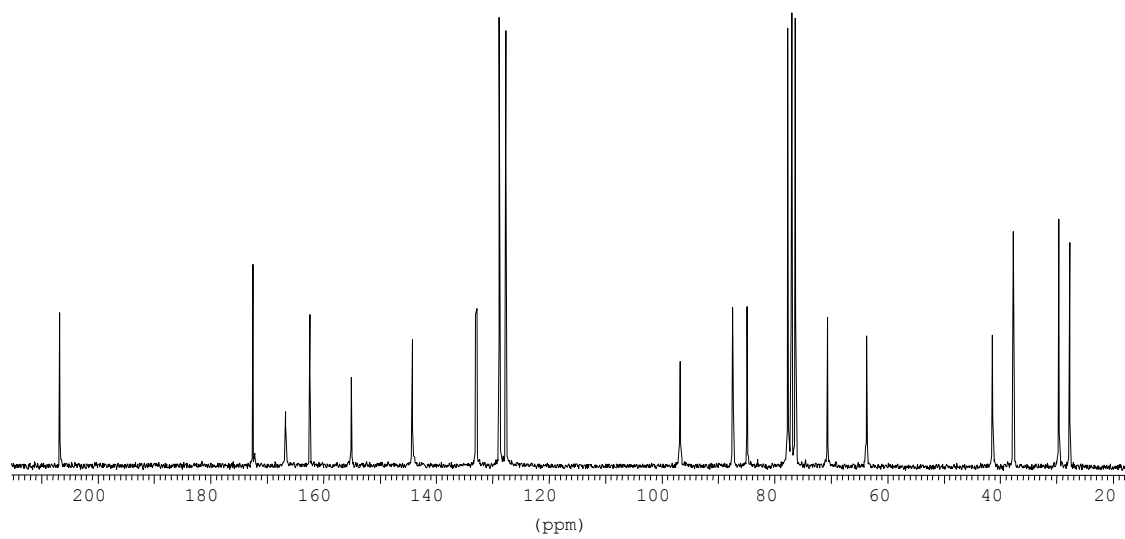
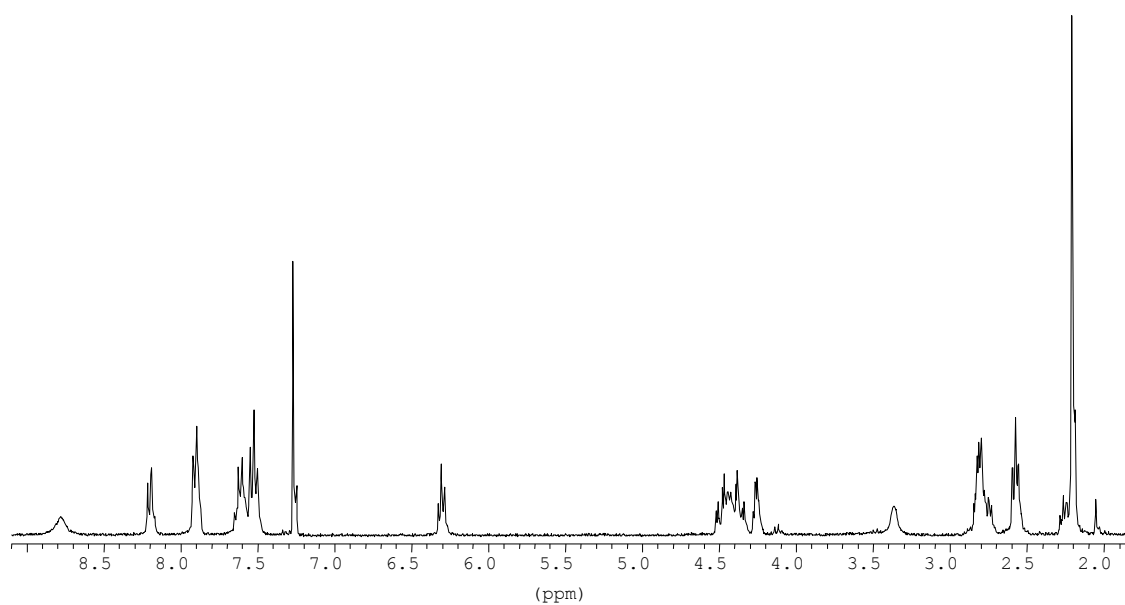
2b



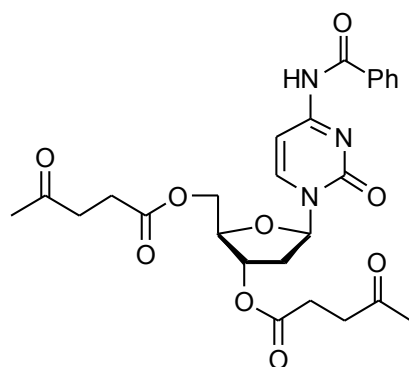
***N*-Benzoil-5'-*O*-levulinil-2'-desoxicitidina (3b)**



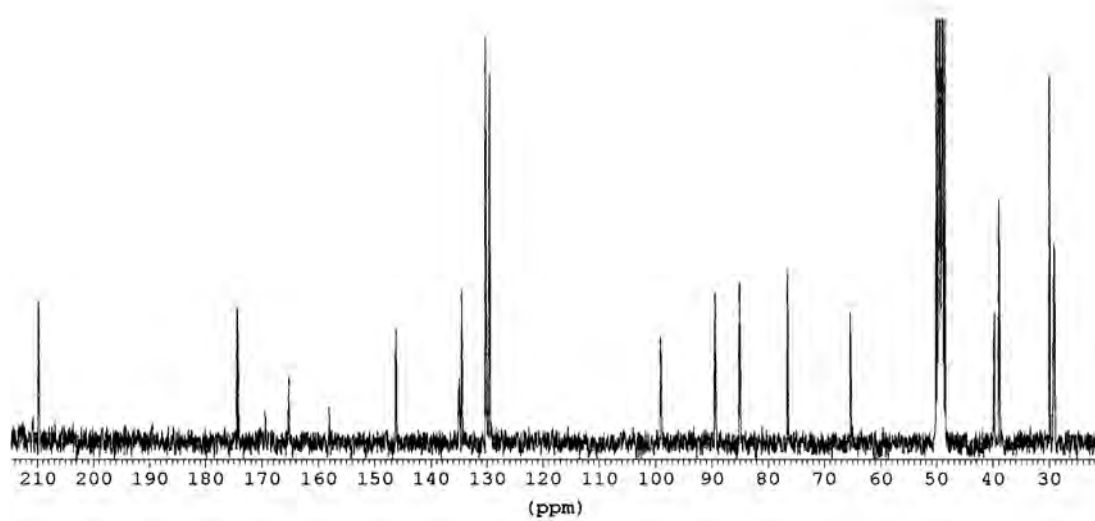
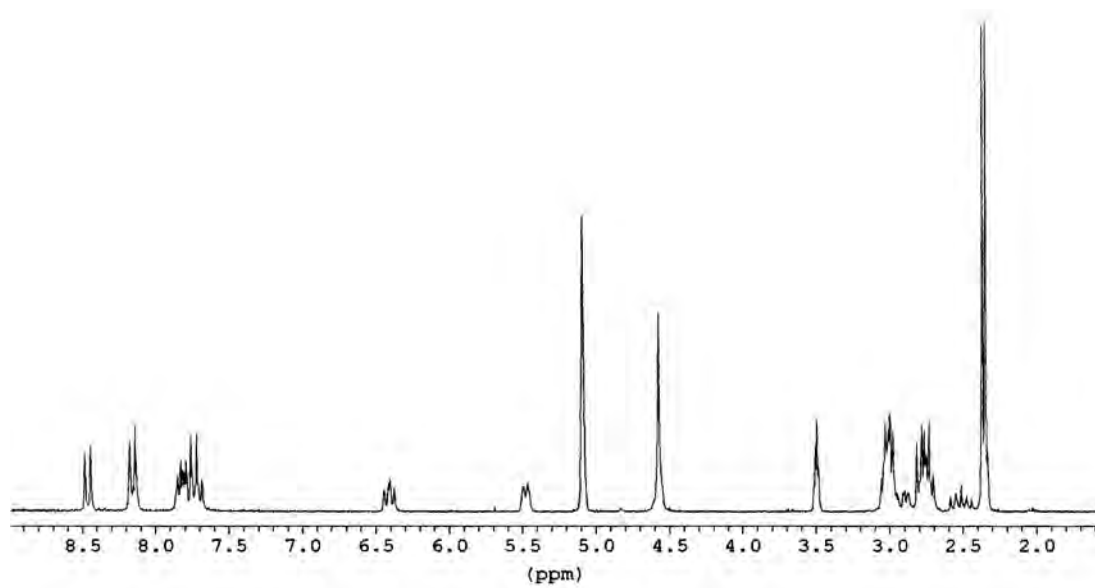
3b



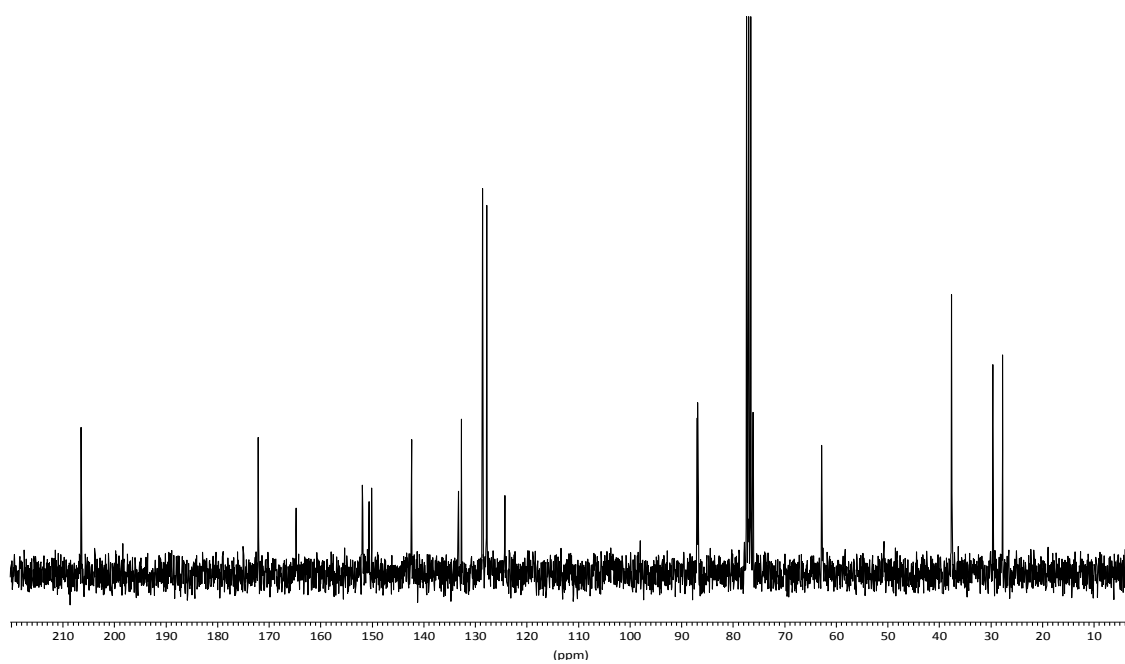
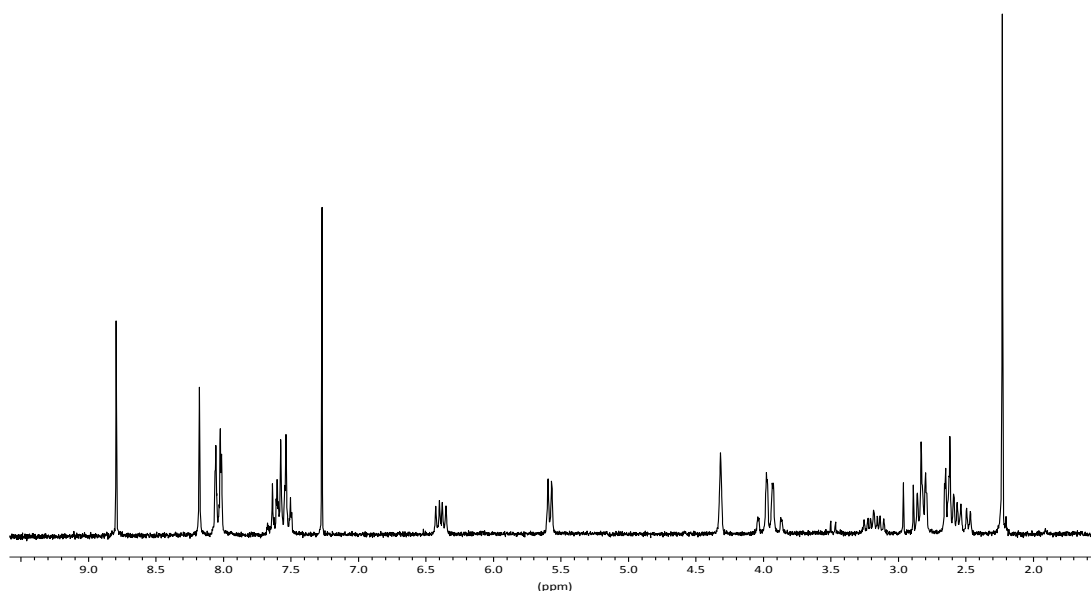
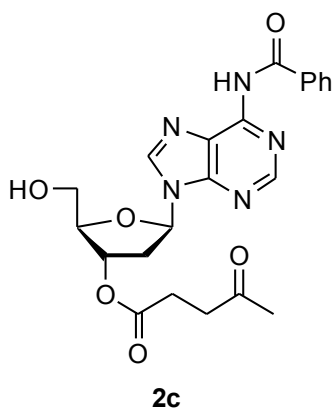
***N*-Benzoyl-3',5'-di-*O*-levulinil-2'-desoxicitidina (4b)**



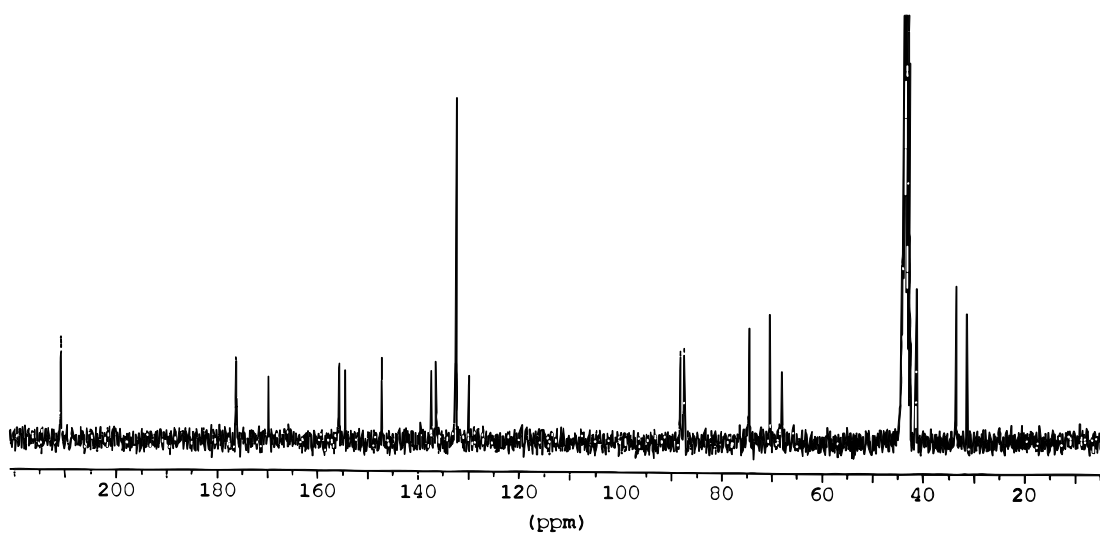
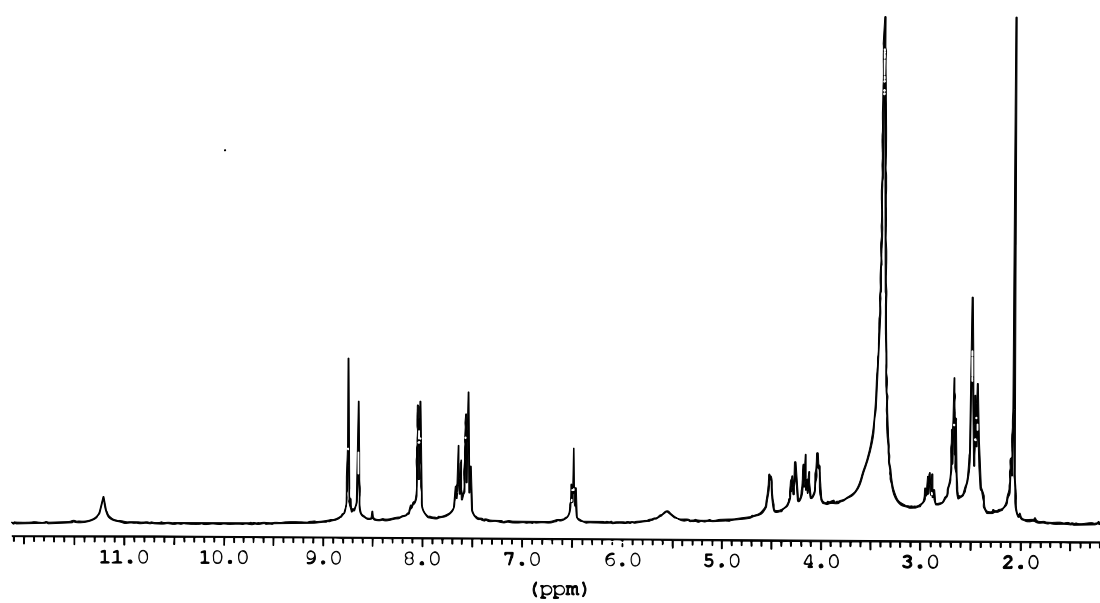
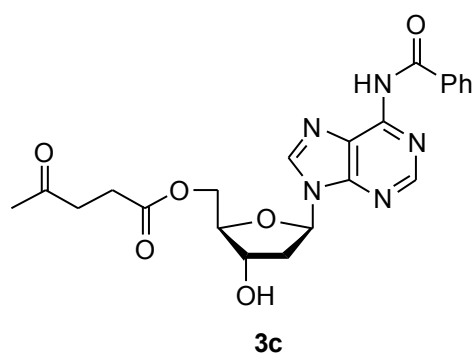
4b



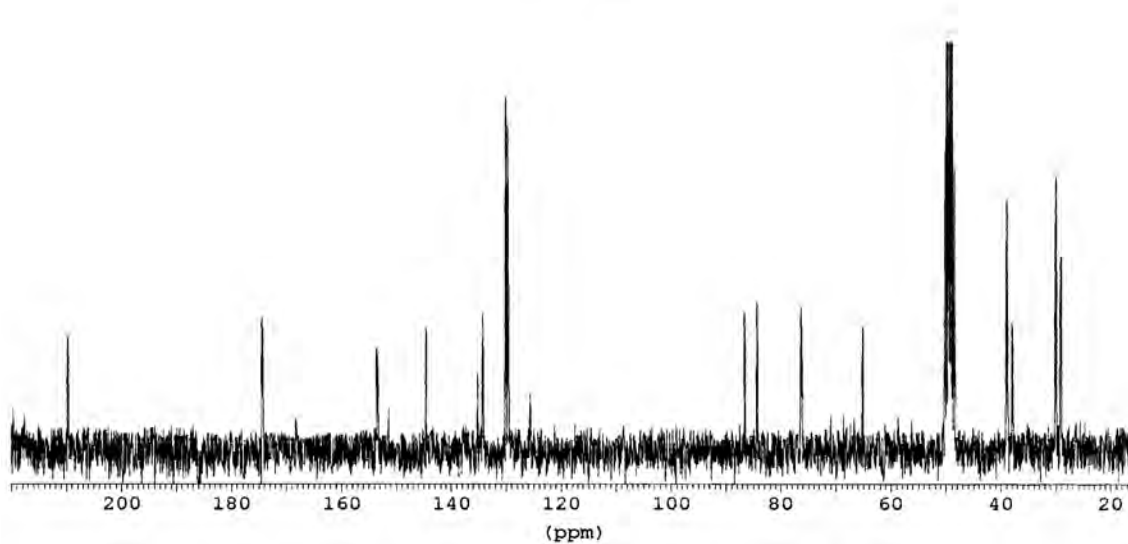
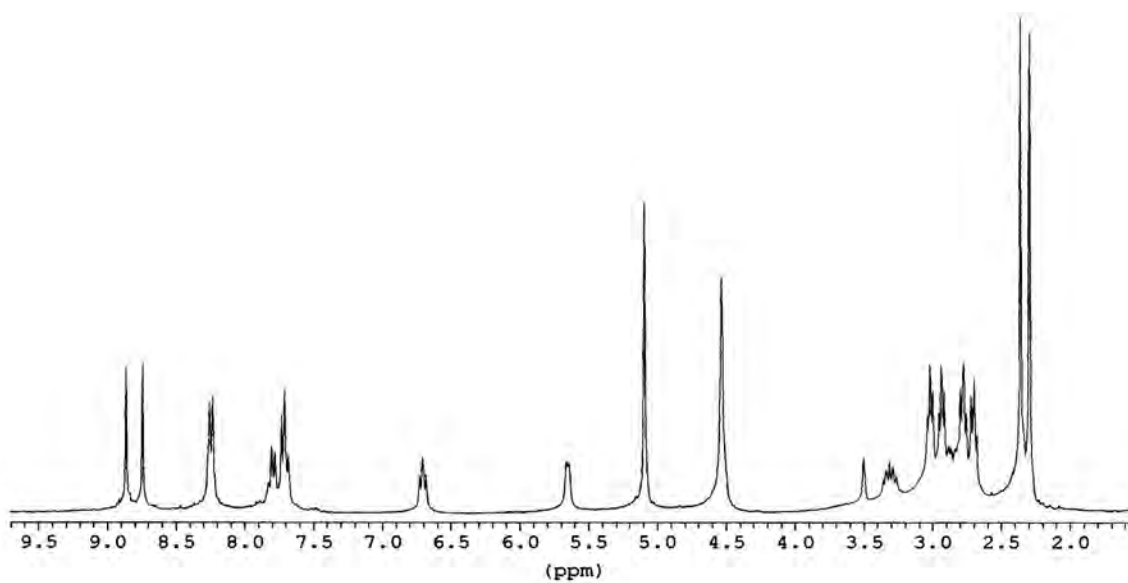
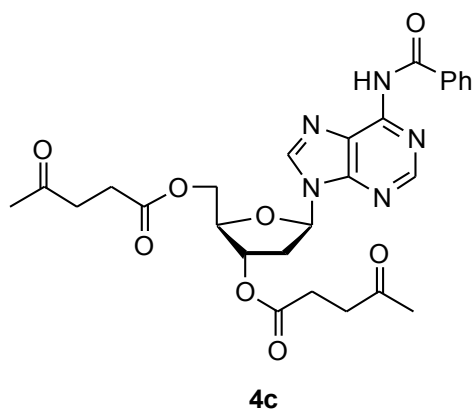
***N*-Benzoyl-3'-*O*-Levulinyl-2'-deoxyadenosine (2c)**



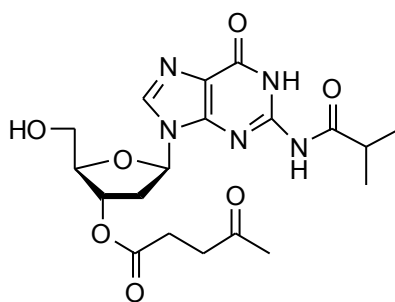
***N*-Benzoyl-5'-*O*-Levulinyl-2'-deoxyadenosine (3c)**



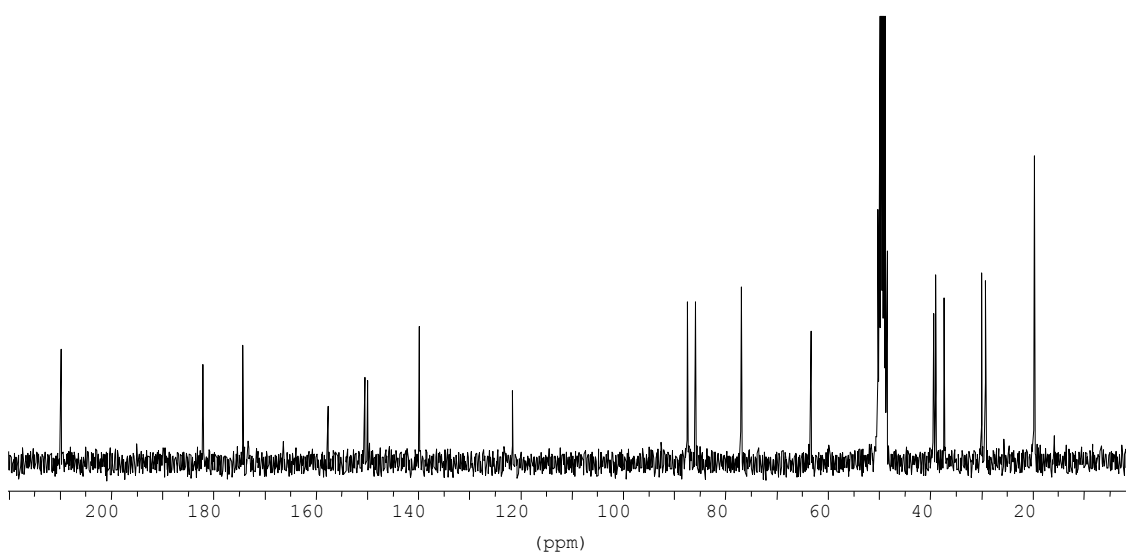
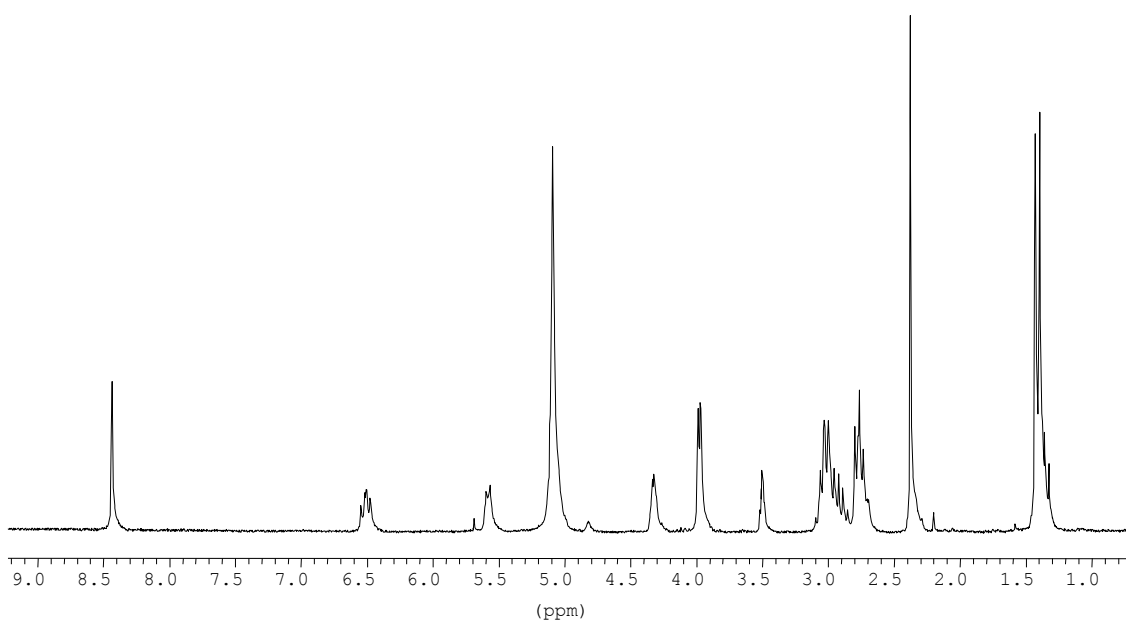
***N*-Benzoyl-3',5'-di-*O*-Levulinyl-2'-deoxyadenosine (4c)**



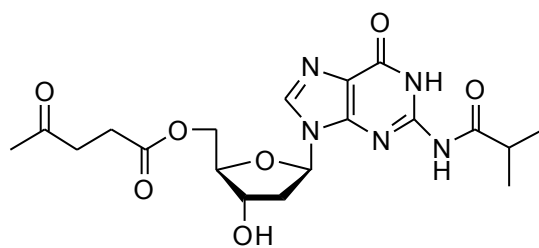
***N*-Isobutiril-3'-*O*-levulinyil-2'-desoxiguanosina (2d)**



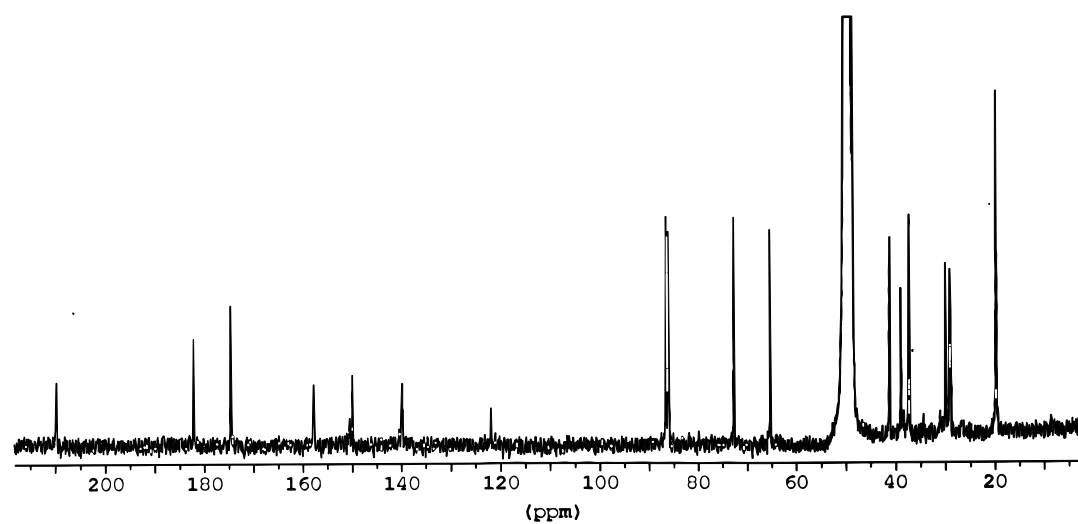
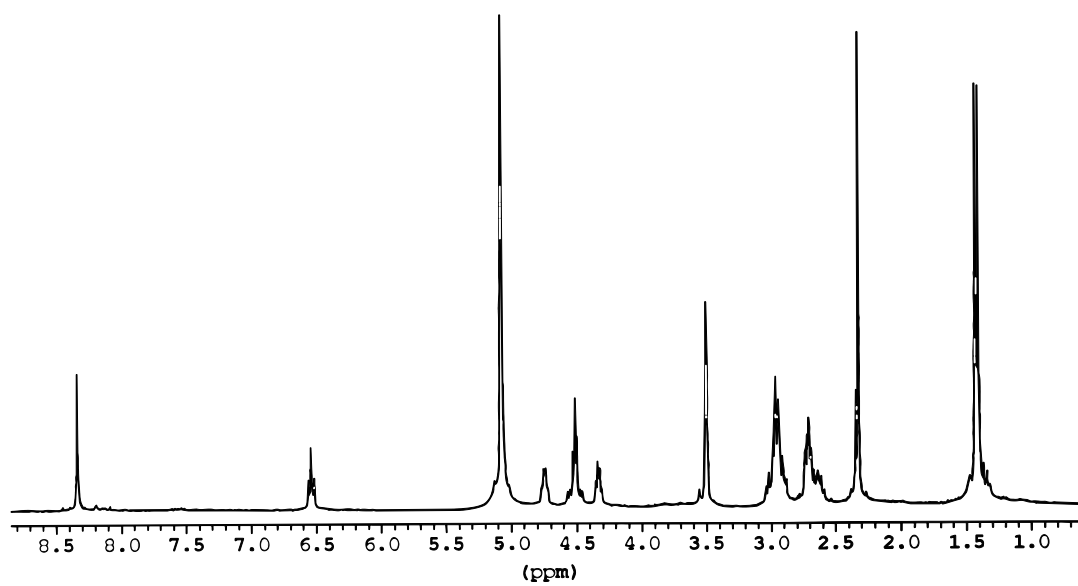
2d



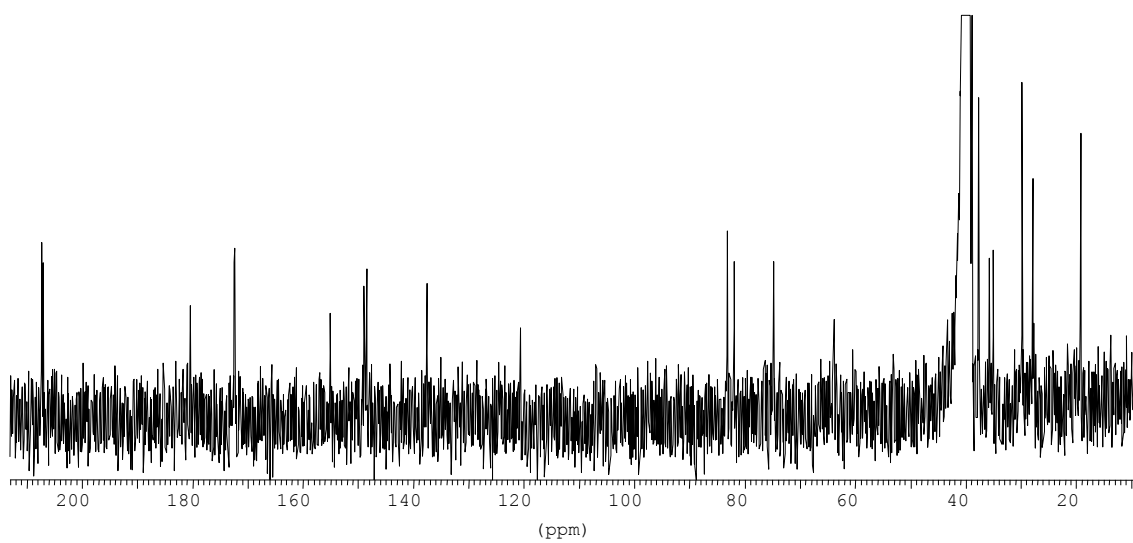
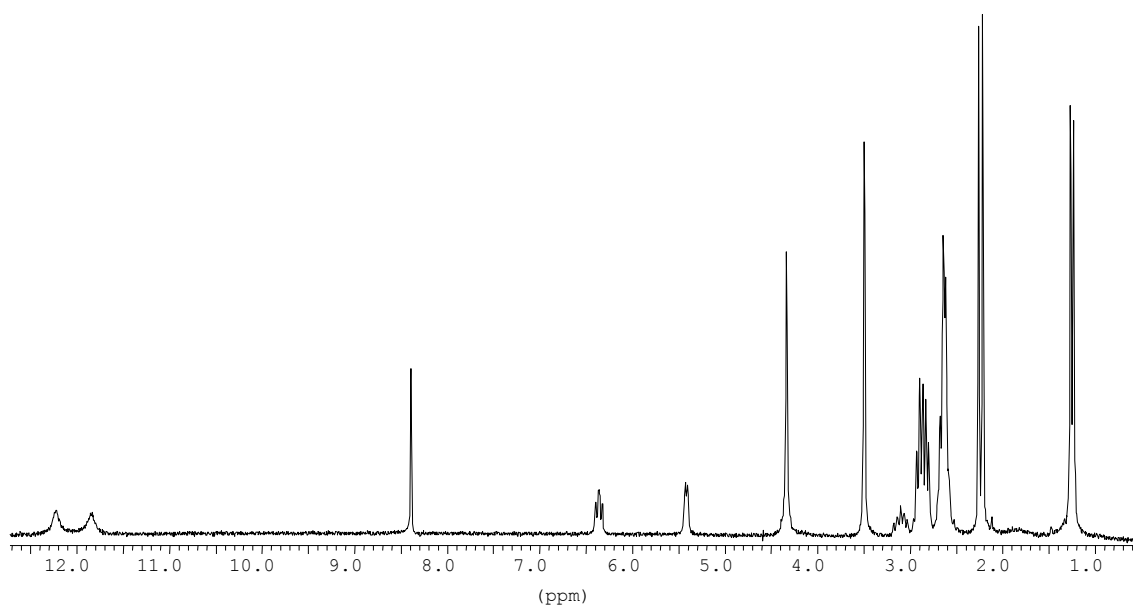
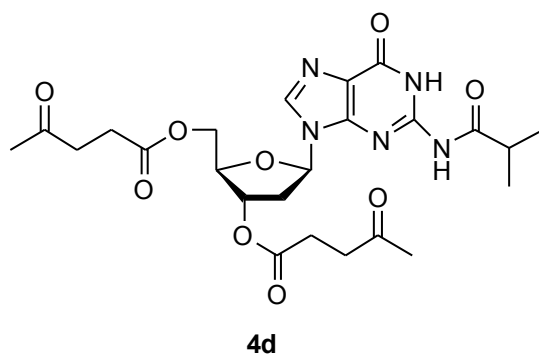
***N*-Isobutiril-5'-*O*-levuliny-2'-desoxiguanosina (3d)**

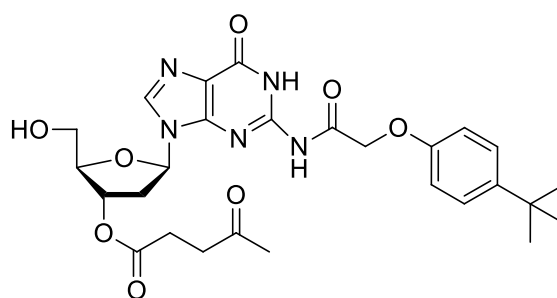
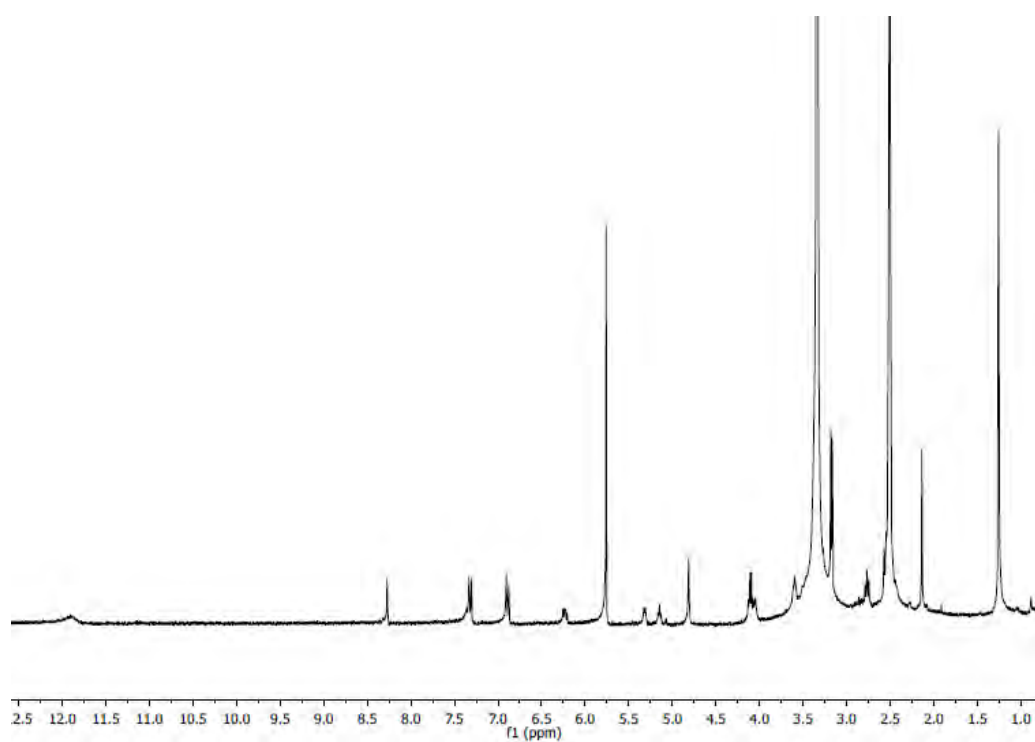


3d

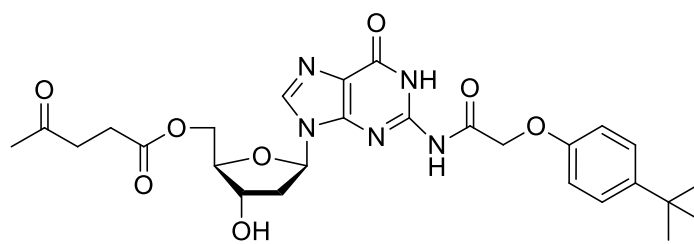


***N*-Isobutiril-3',5'-di-*O*-levulinil-2'-desoxiguanosina (4d)**

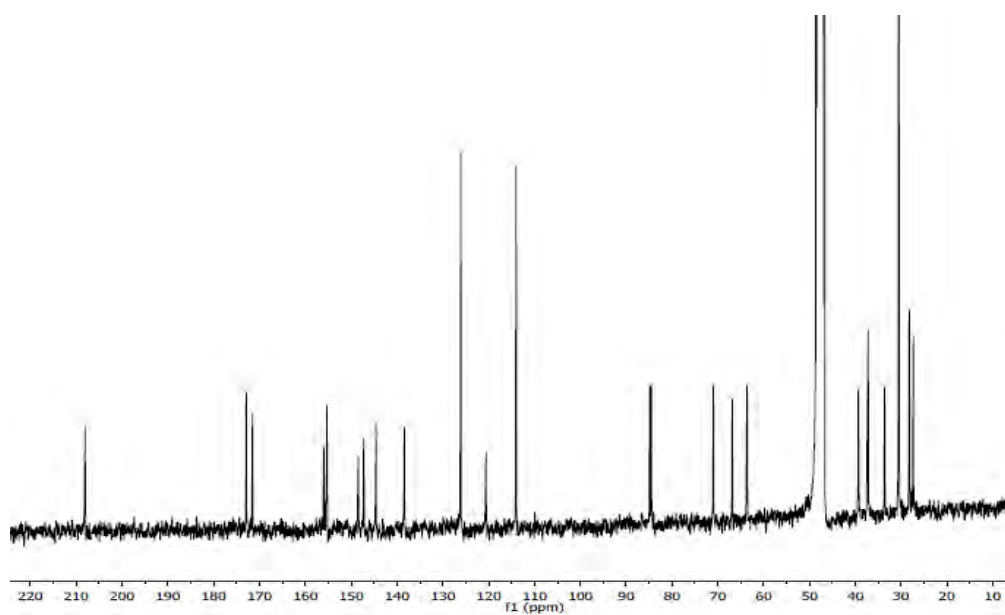
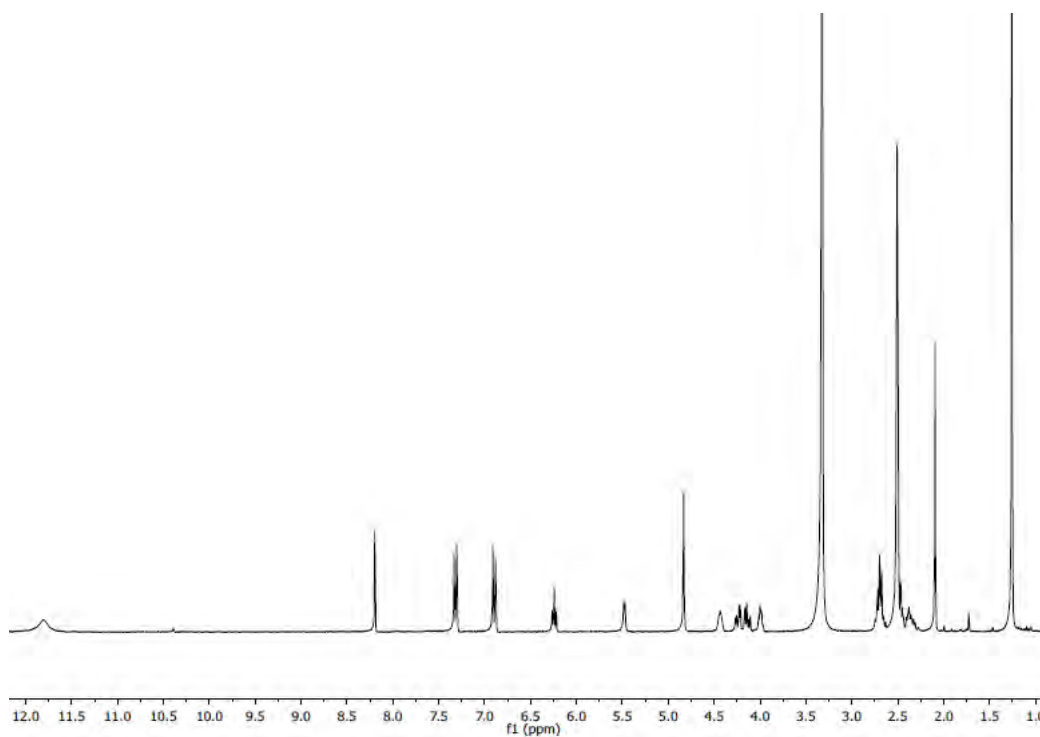


***N*²-(4-*tert*-butilfenoxi)acetil-3'-*O*-levulinyil-2'-desoxiguanosina (2e)****2e**

***N*²-(4-*tert*-butilfenoxi)acetil-5'-*O*-levulinyil-2'-desoxiguanosina (3e)**



3e



***N*²-(4-*tert*-butilfenoxi)acetil-3',5'-di-*O*-levulinil-2'-desoxiguanosina (4e)**

