



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

Departamento de Química Orgánica e Inorgánica
Programa de Doctorado de Síntesis y Reactividad Química

**APLICACIÓN DE PROCESOS ENZIMÁTICOS EN
FLUJO CONTINUO PARA LA PREPARACIÓN DE
NUCLEÓSIDOS. SÍNTESIS DE OLIGONUCLEÓTIDOS**

Tesis Doctoral

Alejandro Carnero Martín



Universidad de Oviedo

Universidá d'Uviéu

University of Oviedo

Departamento de Química Orgánica e Inorgánica

Programa de Doctorado de Síntesis y Reactividad Química

**APLICACIÓN DE PROCESOS ENZIMÁTICOS EN
FLUJO CONTINUO PARA LA PREPARACIÓN DE
NUCLEÓSIDOS. SÍNTESIS DE OLIGONUCLEÓTIDOS**

**Memoria presentada para optar
al grado de Doctor en Química por
Alejandro Carnero Martín**



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Aplicación de procesos enzimáticos en flujo continuo para la preparación de nucleósidos. Síntesis de oligonucleótidos	Inglés: Application of continuous flow enzymatic processes for the preparation of nucleosides. Synthesis of oligonucleotides
2.- Autor	
Nombre: ALEJANDRO CARNERO MARTÍN	DNI/Pasaporte/NIE: -F
Programa de Doctorado: SÍNTESIS Y REACTIVIDAD QUÍMICA	
Órgano responsable: DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA E INORGÁNICA	

RESUMEN (en español)

Los análogos de nucleósido están recibiendo gran atención en Química Médica debido al descubrimiento de sus propiedades biológicas, que los convierten en importantes agentes antivirales y antitumorales. Por otro lado, son las unidades estructurales de los oligonucleótidos *antisense* y siRNA, desarrollados en los últimos años para inhibir la expresión de un gen que causa una determinada enfermedad. Así pues, los fármacos basados en oligonucleótidos constituyen un área importante para el desarrollo de la industria farmacéutica.

Esta Memoria, estructurada en cuatro capítulos, se centra en el uso de la biocatálisis para la preparación de nucleósidos modificados a través de un proceso enzimático en flujo continuo, derivados no naturales de alcaloides muscarínicos, 1'-homo-*N*- α -nucleósidos y análogos de timina como monómeros precursores de oligonucleótidos.

En el primer capítulo, se ha optimizado un proceso enzimático para la levulinilación regioselectiva de los grupos hidroxilo situados en las posiciones 3' o 5' en 2'-desoxinucleósidos utilizando las lipasas inmovilizadas de *Pseudomonas cepacia* y *Candida antarctica* de tipo B. Se observa que el grupo protector de la nucleobase influye en el resultado de la reacción. Además, se ha desarrollado un proceso en flujo continuo como alternativa al método convencional para llevar a cabo la síntesis a gran escala. Los resultados se encuentran publicados en:

“Process Development of Biocatalytic Regioselective 5'-*O*-Levulinylation of 2'-Deoxynucleosides”. A. Carnero, Y. S. Sanghvi, V. Gotor, S. Fernández, M. Ferrero. *Org. Process Res. Dev.* **2015**, *19*, 701-709.

En el segundo capítulo se desarrolla una síntesis eficiente de la (-)-muscarina y (+)-*allo*-muscarina, empleando una estrategia quimioenzimática, a partir de un ciano-azúcar fácilmente accesible a gran escala. La etapa clave es una hidrólisis enzimática selectiva mediada por la lipasa de *Pseudomonas cepacia* inmovilizada. Los resultados se encuentran recogidos en la siguiente publicación:

“Short and efficient chemoenzymatic syntheses of non-natural (-)-muscarine and (+)-*allo*-muscarine from cyano-sugar precursors catalyzed by immobilized *Burkholderia cepacia* lipase”. A. Carnero, Y. S. Sanghvi, V. Gotor, S. Fernández, M. Ferrero. *Adv. Synth. Catal.* **2017**, *359*, 130-137.

En el tercer capítulo, se sintetizan varios análogos de 1'-homo-*N*- α -nucleósidos como potenciales agentes antivirales y antitumorales, mediante una estrategia de acoplamiento de la nucleobase con un azúcar tosilado. Estos importantes monómeros se utilizarán como precursores clave en la preparación de oligonucleótidos. Se está preparando una próxima publicación.

El cuarto capítulo describe la síntesis y propiedades de un nuevo derivado de timina que presenta una elongación entre la base y el fragmento de 2'-desoxirribosa. Se han incorporado los derivados succinil y fosforamiditos correspondientes en sitios predeterminados de oligonucleótidos empleando una estrategia de síntesis en fase sólida. Los resultados se han



recogido en la siguiente publicación:

“The impact of an extended nucleobase-2'-deoxyribose linker in the biophysical and biological properties of oligonucleotides”. A. Carnero, S Pérez-Rentero, A. Alagia, A. Aviñó, Y. S. Sanghvi, S. Fernández, M. Ferrero, R. Eritja. *RSC Adv.* **2017**, *7*, 9579-9586.

RESUMEN (en Inglés)

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

This Doctoral Dissertation, divided in four different chapters, is focused in the use of biocatalysis to prepare modified nucleosides through enzymatic continuous flow processes, non-natural derivatives of muscarine alkaloids, 1'-homo-*N*- α -nucleosides, and thymine analogues as building blocks for the construction of oligonucleotides.

In the first chapter, an enzymatic process has been optimized for regioselective levulinylation of the 3'- or 5'-hydroxyl group in 2'-deoxynucleosides using *Pseudomonas cepacia* and *Candida antarctica* type B immobilized lipases. The nucleobase protecting group influenced the successful outcome of the enzymatic reaction. Furthermore, a continuous flow protocol as a superior alternative to batch process has been developed, particularly when scale-up is required. The results obtained were published in:

“Process Development of Biocatalytic Regioselective 5'-*O*-Levulinylation of 2'-Deoxynucleosides”. A. Carnero, Y. S. Sanghvi, V. Gotor, S. Fernández, M. Ferrero. *Org. Process Res. Dev.* **2015**, *19*, 701-709.

The second chapter describes the efficient preparation of enantiopure (2*R*)-configured non-natural (-)-muscarine and (+)-*allo*-muscarine by a chemoenzymatic approach from an easily accessible cyano-sugar available on a large-scale. The key selective enzymatic hydrolysis step has been accomplished by immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase. The results have been published in:

“Short and efficient chemoenzymatic syntheses of non-natural (-)-muscarine and (+)-*allo*-muscarine from cyano-sugar precursors catalyzed by immobilized *Burkholderia cepacia* lipase”. A. Carnero, Y. S. Sanghvi, V. Gotor, S. Fernández, M. Ferrero. *Adv. Synth. Catal.* **2017**, *359*, 130-137.

In the third chapter, several new 1'-homo-*N*- α -nucleoside analogues as potential antiviral or antitumor compounds have been synthesized via coupling of a nucleobase and a tosylated intermediate sugar precursor. These important monomers will be use as building-blocks to prepare oligonucleotides. A paper is under preparation.

The fourth chapter describes the synthesis and properties of a novel thymine derivative containing an extended linker between the thymine nucleobase and the 2'-deoxyribose moiety. Corresponding phosphoramidite and succinyl derivatives have also been incorporated into oligonucleotides at predetermined sites and defined internucleotidic motifs using the solid-phase synthesis approach. The results obtained were published in:

“The impact of an extended nucleobase-2'-deoxyribose linker in the biophysical and biological properties of oligonucleotides”. A. Carnero, S Pérez-Rentero, A. Alagia, A. Aviñó, Y. S. Sanghvi, S. Fernández, M. Ferrero, R. Eritja. *RSC Adv.* **2017**, *7*, 9579-9586.

Abreviaturas y acrónimos

Abreviaturas y acrónimos

[α]	Rotación específica
A	Adenina/adenosina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
B	Base nitrogenada
Boc	<i>tert</i> -Butiloxicarbonilo
Bz	Benzoílo
C	Citosina/citidina
CAL-B	Lipasa de <i>Candida antarctica</i> tipo B
Conv.	Conversión
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
d4T	2',3'-Dideshidro-2',3'-desoxitimidina
dA	2'-Desoxiadenosina
dC	2'-Desoxicitidina
DCC	Diciclohexilcarbodiimida
ddC	2',3'-Didesoxicitosina
ddI	2',3'-Didesoxiinosina
dG	2'-Desosiguanosina
DMAP	<i>N,N</i> -Dimetilaminopiridina
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
DMT	4,4'-Dimetoxitritilo
dU	2'-Desoxiuridina
EM	Espectrometría de masas
EMAR	Espectrometría de masas de alta resolución

Abreviaturas y acrónimos

Enz.	Enzima
ESI	Ionización de electrospray
FC	Flujo continuo
FTC	Emtricitabina
G	Guanina/guanosina
GP	Grupo protector
GS	Grupo saliente
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
Hz	Hertzio
Ibu	Isobutirilo
IC ₅₀	Concentración inhibidora que reduce el crecimiento de la placa viral en un 50%
IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
Lev	Levulinilo
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Spectroscopy</i>
p/p	Relación en peso
P _f	Punto de fusión
PSL	Lipasa de <i>Pseudomonas cepacia</i>
PSL-IM	Lipasa de <i>Pseudomonas cepacia</i> inmovilizada sobre diatomita
PSL-SD	Crudo de <i>Pseudomonas cepacia</i>
Pur	Purina
Py	Piridina

Abreviaturas y acrónimos

Pyr	Pirimidina
Rdto	Rendimiento
R _f	Factor de retención
RISC	<i>RNA Induced silencing complex</i>
RMN	Resonancia magnética nuclear
siRNA	<i>Short interfering RNA</i>
T	Timina/timidina
t.a.	Temperatura ambiente
Tac	4- <i>tert</i> -Butilfenoxiacetilo
TBAF	Fluoruro de tetrabutilamonio
TBS	<i>tert</i> -Butildimetilsililo
TCA	Ácido tricloroacético
THF	Tetrahidrofurano
TLC	<i>Thin Layer Chromatography</i> (Cromatografía en capa fina)
T _m	<i>Melting temperature</i> (Temperatura de fusión)
Tol	Toluido
t _R	Tiempo de retención
Ts	Tosilo
U	Uracilo/uridina
UV	Ultravioleta
δ	Desplazamiento químico

Índice

RESUMEN	1
SUMMARY	5
INTRODUCCIÓN	9
I.1. Breve historia e importancia de los ácidos nucleicos	11
<i>I.1.1. Composición estructural de los ácidos nucleicos</i>	12
I.2. Nucleósidos modificados como agentes terapéuticos.....	14
<i>I.2.1. Nucleósidos como antivirales</i>	15
<i>I.2.1.1. Virus de inmunodeficiencia humana</i>	15
<i>I.2.1.2. Otros virus</i>	18
<i>I.2.2. Nucleósidos como antitumorales</i>	20
I.3. Inhibición de la expresión génica	21
<i>I.3.1. Oligonucleótidos antisense</i>	22
<i>I.3.2. Ribozimas</i>	23
<i>I.3.3. ARN de interferencia (Short Interfering RNA, siRNA)</i>	24
<i>I.3.4. Aptámeros</i>	25
<i>I.3.5. Plásmidos</i>	26
I.4. Preparación de oligonucleótidos con finalidad terapéutica	27
<i>I.4.1. Modificaciones en oligonucleótidos</i>	27
<i>I.4.2. Métodos de síntesis de oligonucleótidos</i>	29
I.5. Biocatálisis.....	31
<i>I.5.1. Uso de enzimas en síntesis orgánica</i>	31
<i>I.5.2. Importancia de la inmovilización de enzimas</i>	33
<i>I.5.3. Biocatálisis en la industria</i>	33

Índice

CAPÍTULO 1. LEVULINILACIÓN REGIOSELECTIVA DE 2'-DESOXINUCLEÓSIDOS MEDIANTE PROCESOS ENZIMÁTICOS EN FLUJO CONTINUO	37
Antecedentes.....	39
A.1. Sostenibilidad en procesos químicos.....	41
A.2. Biocatálisis aplicada a procesos de flujo continuo.....	42
A.3. Preparación regioselectiva de 2'-desoxinucleósidos.....	44
Objetivos	49
Resultados y discusión	53
1. Esquema general	55
2. Levulinilación enzimática de timidina	56
3. Levulinilación enzimática de N^4 -benzoil-2'-desoxicitidina.....	58
4. Levulinilación enzimática de N^6 -benzoil-2'-desoxiadenosina...	59
5. Levulinilación enzimática de N^2 -isobutilil-2'-desoxiguanosina	61
6. Influencia del grupo protector <i>N-tert</i> -butilfenoxiacetilo en la solubilidad de los nucleósidos.....	62
7. Levulinilación enzimática de <i>N-tert</i> -butilfenoxiacetil-2'-desoxinucleósidos.....	64
7.1. Elección del disolvente de reacción	65
8. Proceso enzimático en flujo continuo	66
8.1. Reutilización de la enzima.....	68
8.2 Levulinilación de 2'-desoxinucleósidos. Escalado de la reacción	69
Conclusiones	73

Parte experimental	77
1. Condiciones de trabajo, disolventes y reactivos.....	79
2. Técnicas instrumentales.....	82
3. Procedimientos experimentales	83
4. Datos experimentales.....	86
CAPÍTULO 2. SÍNTESIS QUIMIOENZIMÁTICA DE (–)-MUSCARINA Y (+)-ALLO-MUSCARINA	97
Antecedentes	99
A.1. Importancia de los metabolitos secundarios.....	101
A.2. Relevancia de las síntesis totales de productos naturales	103
A.3. Tipos de productos naturales. Alcaloides.....	104
A.4. Síntesis de derivados muscarínicos	106
Objetivos	113
Resultados y discusión	117
1. Síntesis de (–)-muscarina	120
1.1. <i>Hidrólisis enzimática</i>	120
1.2. <i>Hidrogenólisis de un derivado mesilado</i>	122
1.3. <i>Hidrogenólisis de un derivado tosilado</i>	123
2. Síntesis de (+)-allo-muscarina.....	124
3. Escalado de la reacción y reutilización de la enzima	126
Conclusiones	129

Índice

Parte experimental	133
1. Condiciones de trabajo, disolventes y reactivos	135
2. Técnicas instrumentales	136
3. Procedimientos sintéticos y datos experimentales	136
CAPÍTULO 3. SÍNTESIS DE 1'-HOMO-<i>N</i>-2'-DESOXI-α-NUCLEÓSIDOS	157
Antecedentes	159
A.1. C-nucleósidos	162
A.2. Homonucleósidos	163
A.3. Síntesis de 1'-homo- <i>N</i> -nucleósidos.....	164
Objetivos	173
Resultados y discusión	177
1. Modificaciones en el anillo de tetrahidrofurano	179
2. Acoplamiento de las bases	184
3. Desprotección de los grupos hidroxilo.....	192
Conclusiones	195
Parte experimental	199
1. Condiciones de trabajo, disolventes y reactivos	201
2. Técnicas instrumentales	201
3. Procedimientos sintéticos y datos experimentales	201

CAPÍTULO 4. SÍNTESIS DE OLIGONUCLEÓTIDOS CON MONÓMEROS MODIFICADOS DE TIMIDINA QUE CONTIENEN UN ESPACIADOR EN EL ENLACE GLICOSÍDICO. ESTUDIO DE SUS PROPIEDADES..... 229

Antecedentes 231

 1. Aspectos generales en la síntesis de oligonucleótidos 233

 1.1. Grupos protectores en el fosforamidito 235

 2. Monómeros modificados en la síntesis de oligonucleótidos ... 237

 2.1. Restricción en la conformación de los nucleósidos..... 237

 2.2. Flexibilidad en la conformación de los nucleósidos 238

 3. Estructuras del ADN y el ARN 240

 3.1. Apareamiento de las bases 240

 3.2. Estructuras canónicas del ADN y el ARN 241

 3.3. Desnaturalización del ADN. Temperatura de fusión 243

 3.4. Triplex de ADN 244

 3.5. ARN interferente 245

Objetivos 247

Resultados y discusión 251

 1. Síntesis de la unidad monomérica T* 254

 2. Síntesis de los oligonucleótidos..... 256

 2.1. Síntesis del 3'-O-succinato de **52** 256

 2.2. Síntesis del 3'-O-fosforamidito de **52** 259

 2.3. Metodología general para la síntesis de oligonucleótidos..... 260

 2.4. Oligonucleótidos sintéticos..... 263

Índice

3. Estudios de desnaturalización de los duplex de ADN	265
3.1. Afinidad de T^* en los apareamientos erróneos.....	267
3.2. Oligonucleótidos 7Mer: formación de duplex paralelos y antiparalelos.....	269
3.3. Oligonucleótidos 7Mer: formación de triplex.....	270
4. Oligonucleótidos modificados de ARN	271
Conclusiones	277
Parte experimental	281
1. Condiciones de trabajo, disolventes y reactivos	283
2. Técnicas instrumentales	283
3. Procedimientos sintéticos y datos experimentales	283

Resumen

Los análogos de nucleósido están recibiendo gran atención en Química Médica debido al descubrimiento de sus propiedades biológicas, que los convierten en importantes agentes antivirales y antitumorales. Por otro lado, son las unidades estructurales de los oligonucleótidos *antisense* y siRNA, desarrollados en los últimos años para inhibir la expresión de un gen que causa una determinada enfermedad. Así pues, los fármacos basados en oligonucleótidos constituyen un área importante para el desarrollo de la industria farmacéutica.

Esta Memoria, estructurada en cuatro capítulos, se centra en el uso de la biocatálisis para la preparación de nucleósidos modificados a través de un proceso enzimático en flujo continuo, derivados no naturales de alcaloides muscarínicos, 1'-homo-*N*- α -nucleósidos y análogos de timina como monómeros precursores de oligonucleótidos.

En el primer capítulo, se ha optimizado un proceso enzimático para la levulinilación regioselectiva de los grupos hidroxilo situados en las posiciones 3' o 5' en 2'-desoxinucleósidos utilizando las lipasas inmovilizadas de *Pseudomonas cepacia* y *Candida antarctica* de tipo B. Se observa que el grupo protector de la nucleobase influye en el resultado de la reacción. Además, se ha desarrollado un proceso en flujo continuo como alternativa al método convencional para llevar a cabo la síntesis a gran escala. Los resultados se encuentran publicados en:

“Process Development of Biocatalytic Regioselective 5'-*O*-Levulinylation of 2'-Deoxynucleosides”. A. Carnero, Y. S. Sanghvi, V. Gotor, S. Fernández, M. Ferrero. *Org. Process Res. Dev.* **2015**, *19*, 701-709.

Resumen

En el segundo capítulo se desarrolla una síntesis eficiente de la (-)-muscarina y (+)-*allo*-muscarina, empleando una estrategia quimioenzimática, a partir de un ciano-azúcar fácilmente accesible a gran escala. La etapa clave es una hidrólisis enzimática selectiva mediada por la lipasa de *Pseudomonas cepacia* inmovilizada. Los resultados se encuentran recogidos en la siguiente publicación:

“Short and efficient chemoenzymatic syntheses of non-natural (-)-muscarine and (+)-*allo*-muscarine from cyano-sugar precursors catalyzed by immobilized *Burkholderia cepacia* lipase”. A. Carnero, Y. S. Sanghvi, V. Gotor, S. Fernández, M. Ferrero. *Adv. Synth. Catal.* **2017**, 359, 130-137.

En el tercer capítulo, se sintetizan varios análogos de 1'-homo-*N*- α -nucleósidos como potenciales agentes antivirales y antitumorales, mediante una estrategia de acoplamiento de la nucleobase con un azúcar tosilado. Estos importantes monómeros se utilizarán como precursores clave en la preparación de oligonucleótidos. Se está preparando una próxima publicación.

El cuarto capítulo describe la síntesis y propiedades de un nuevo derivado de timina que presenta una elongación entre la base y el fragmento de 2'-desoxirribosa. Se han incorporado los derivados succinil y fosforamiditos correspondientes en sitios predeterminados de oligonucleótidos empleando una estrategia de síntesis en fase sólida. Los resultados se han recogido en la siguiente publicación:

“The impact of an extended nucleobase-2'-deoxyribose linker in the biophysical and biological properties of oligonucleotides”. A. Carnero, S. Pérez-Rentero, A. Alagia, A. Aviñó, Y. S. Sanghvi, S. Fernández, M. Ferrero, R. Eritja. *RSC Adv.* **2017**, 7, 9579-9586.

Summary

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

This Doctoral Dissertation, divided in four different chapters, is focused in the use of biocatalysis to prepare modified nucleosides through enzymatic continuous flow processes, non-natural derivatives of muscarine alkaloids, 1'-homo-*N*- α -nucleosides, and thymine analogues as building blocks for the construction of oligonucleotides.

In the first chapter, an enzymatic process has been optimized for regioselective levulinylolation of the 3'- or 5'-hydroxyl group in 2'-deoxynucleosides using *Pseudomonas cepacia* and *Candida antarctica* type B immobilized lipases. The nucleobase protecting group influenced the successful outcome of the enzymatic reaction. Furthermore, a continuous flow protocol as a superior alternative to batch process has been developed, particularly when scale-up is required. The results obtained were published in:

“Process Development of Biocatalytic Regioselective 5'-*O*-Levulinylation of 2'-Deoxynucleosides”. A. Carnero, Y. S. Sanghvi, V. Gotor, S. Fernández, M. Ferrero. *Org. Process Res. Dev.* **2015**, *19*, 701-709.

Summary

The second chapter describes the efficient preparation of enantiopure (2*R*)-configured non-natural (–)-muscarine and (+)-*allo*-muscarine by a chemoenzymatic approach from an easily accessible cyano-sugar available on a large-scale. The key selective enzymatic hydrolysis step has been accomplished by immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase. The results have been published in:

“Short and efficient chemoenzymatic syntheses of non-natural (–)-muscarine and (+)-*allo*-muscarine from cyano-sugar precursors catalyzed by immobilized *Burkholderia cepacia* lipase”. A. Carnero, Y. S. Sanghvi, V. Gotor, S. Fernández, M. Ferrero. *Adv. Synth. Catal.* **2017**, 359, 130-137.

In the third chapter, several new 1'-homo-*N*- α -nucleoside analogues as potential antiviral or antitumor compounds have been synthesized via coupling of a nucleobase and a tosylated intermediate sugar precursor. These important monomers will be use as building-blocks to prepare oligonucleotides. A paper is under preparation.

The fourth chapter describes the synthesis and properties of a novel thymine derivative containing an extended linker between the thymine nucleobase and the 2'-deoxyribose moiety. Corresponding phosphoramidite and succinyl derivatives have also been incorporated into oligonucleotides at predetermined sites and defined internucleotidic motifs using the solid-phase synthesis approach. The results obtained were published in:

“The impact of an extended nucleobase-2'-deoxyribose linker in the biophysical and biological properties of oligonucleotides”. A. Carnero, S Pérez-Rentero, A. Alagia, A. Aviñó, Y. S. Sanghvi, S. Fernández, M. Ferrero, R. Eritja. *RSC Adv.* **2017**, 7, 9579-9586.

Introducción

I.1. Breve historia e importancia de los ácidos nucleicos

Las moléculas que mejor pueden representar el nexo de unión entre la Química y la Biología Molecular son los ácidos nucleicos. Existen dos tipos de ácidos nucleicos, el ADN (ácido desoxirribonucleico) y el ARN (ácido ribonucleico).

Estas moléculas fueron aisladas por primera vez en 1869 por el médico suizo Friederich Miescher a partir de leucocitos obtenidos del pus de desechos quirúrgicos, resultados que fueron publicados dos años más tarde.¹ Sin embargo, la evidencia de que el ADN es el responsable de la información hereditaria no se obtuvo hasta 1944.

Estudios del bioquímico alemán Albrecht Kossel establecieron que la subunidad repetitiva del ADN es un nucleótido que contiene un azúcar, un grupo fosfato y una base nitrogenada. Gracias a los descubrimientos establecidos por Kossel, y a trabajos posteriores, se descubrió cómo están unidos estos componentes. En los años 50, Erwin Chargaff observó, tras estudiar gran cantidad de muestras de ADN, que el número de bases de adenina es igual al número de bases de timina y el número de bases de guanina es igual que el de citosina. Estableciendo lo que se conoce como la *ley de equivalencia de bases* de Chargaff.² Pero no fue hasta 1953

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.

Introducción

cuando James Watson y Francis Crick descubrieron la estructura tridimensional y famosa doble hélice del ADN (Figura 1),³ basándose en la anteriormente mencionada ley de equivalencia de bases y en los estudios de difracción de rayos X sobre fibras de ADN que habían obtenido Rosalind Franklin⁴ y Maurice Wilkins.⁵

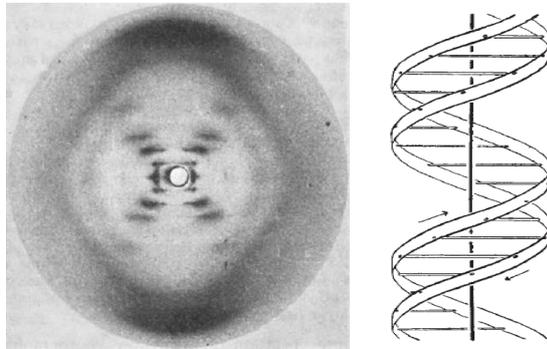


Figura 1. Estructura de rayos X de la sal de ADN tomada por Franklin y la doble hélice de ADN propuesta por Watson y Crick, ambas imágenes recogidas en la revista *Nature* de 1953.

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 (proceso denominado traducción).

1.1.1. Composición estructural de los ácidos nucleicos

Desde un punto de vista químico, los ácidos nucleicos son macromoléculas formadas por polímeros lineales de nucleótidos, unidos por enlaces fosfodiéster. Cada nucleótido es una molécula relativamente compleja compuesta por la unión de tres unidades elementales: un azúcar, una base nitrogenada y uno o varios grupos fosfato.

³ a) J. D. Watson, F. H. Crick. *Nature* **1953**, 171, 964-967. b) J. D. Watson, F. H. Crick. *Nature* **1953**, 171, 737-738.

⁴ R. E. Franklin, R. G. Gosling. *Nature* **1953**, 171, 740-741.

⁵ M. H. Wilkins, A. R. Stokes, H. R. Wilson. *Nature* **1953**, 171, 738-740.

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). 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.

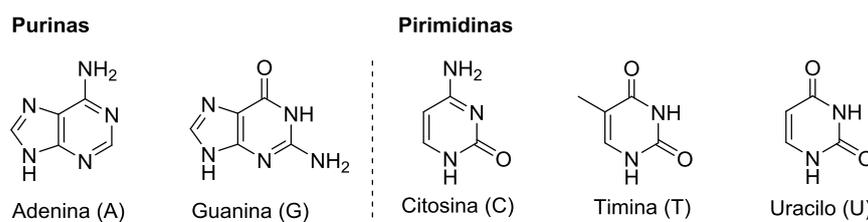


Figura 2. Estructura química de las bases nitrogenadas.

Los nucleósidos están formados por la unión de una base nitrogenada y una pentosa mediante un enlace glicosídico (Figura 3). Esta unión se realiza por la misma cara del anillo de azúcar en la que está el grupo $-CH_2OH$ (cara β). Las pentosas que aparecen en los ácidos nucleicos son la β -D-ribosa en el ARN y la 2'-desoxi- β -D-ribosa en el ADN. La numeración de la pentosa comienza por el carbono unido a la base, que se denomina 1'. Del mismo modo, si seguimos esta numeración, el carbono unido al alcohol primario sería el C5'.

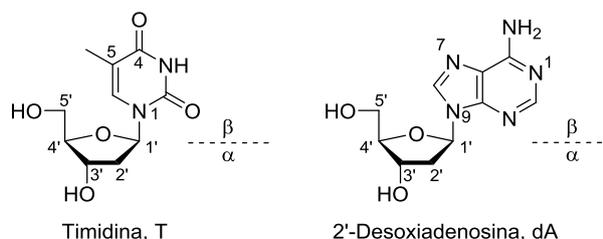


Figura 3. Estructura química de los 2'-desoxinucleósidos.

Introducción

Un nucleótido es el resultado de la esterificación de la pentosa de un nucleósido con un fosfato, y la suma de varios nucleótidos proporciona un ácido nucleico (Figura 4). Es decir, los ácidos nucleicos son polímeros de nucleótidos unidos a través de los fosfatos, que por una parte se enlazan con el C3' de la pentosa de un nucleósido y por otra parte con el C5' de la pentosa de otro nucleósido. Al enlace que se forma se le denomina enlace fosfodiéster. Los polímeros forman largas cadenas, con una parte idéntica en todas ellas (fosfato-pentosa-fosfato) y otra variable, las bases unidas a las pentosas. Por ello, las cadenas se nombran a nivel de estructura primaria por la composición de las bases y siempre se nombra del extremo 5' al 3'.

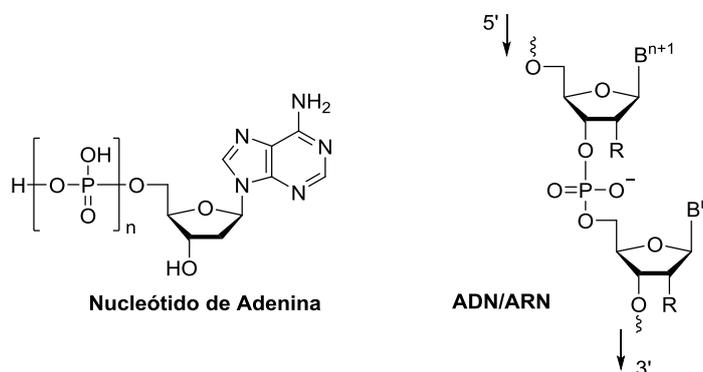


Figura 4. Estructura química de un nucleótido y fragmento de un ácido nucleico.

1.2. Nucleósidos modificados como agentes terapéuticos

La enorme importancia que poseen los ácidos nucleicos en los sistemas biológicos puede aprovecharse con fines médicos. Es en este punto donde los nucleótidos, y por ende los nucleósidos, adquieren una gran relevancia.⁶ Son biomoléculas esenciales que juegan un papel fundamental en el sistema biológico, ya que proporcionan los bloques fundamentales para la síntesis de los ácidos nucleicos.

⁶ B. Roy, A. Depaix, C. Périgaud, S. Peyrottes. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 7854-7897.

Muchos análogos estructurales de nucleósidos se han sintetizado tanto química como enzimáticamente para su estudio en los sistemas biológicos debido al gran potencial terapéutico que poseen,⁷ ya que pueden interferir con el ADN o ARN cuya replicación o transcripción se quiera inhibir. Las modificaciones para la búsqueda de nuevos análogos respecto a los nucleósidos naturales pueden realizarse en el azúcar (la pentosa), en la base nitrogenada o en el enlace glicosídico que une al azúcar con la base.⁸

I.2.1. Nucleósidos como antivirales

I.2.1.1. Virus de inmunodeficiencia humana

El virus de inmunodeficiencia humana (VIH) es el agente patógeno causante del SIDA que presenta una gran facilidad de mutación, dificultando así el hallazgo de una vacuna efectiva para combatirlo. Para diseñar fármacos eficaces debe entenderse el mecanismo de multiplicación vírica y de este modo encontrar los focos adecuados de actuación.

Los retrovirus como el VIH poseen dos copias idénticas de ARN monocatenario. Una vez en el citoplasma de la célula huésped sana, este ARN se replica de manera inusual para sintetizar ADN de doble cadena, proceso que es dirigido por **la transcriptasa inversa** (también llamada transcriptasa reversa). Posteriormente, el ADN entra en el núcleo de la célula huésped sana 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 (Figura 5). Cada célula infectada es capaz de producir miles de nuevas partículas virales, expandiendo rápidamente la infección por todo el organismo.

⁷ P. E. Morris, P. V. Kamat. *Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine*; Wiley-VCH, 2008.

⁸ E. Ichikawa, K. Kato. *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 385-423.

Introducción

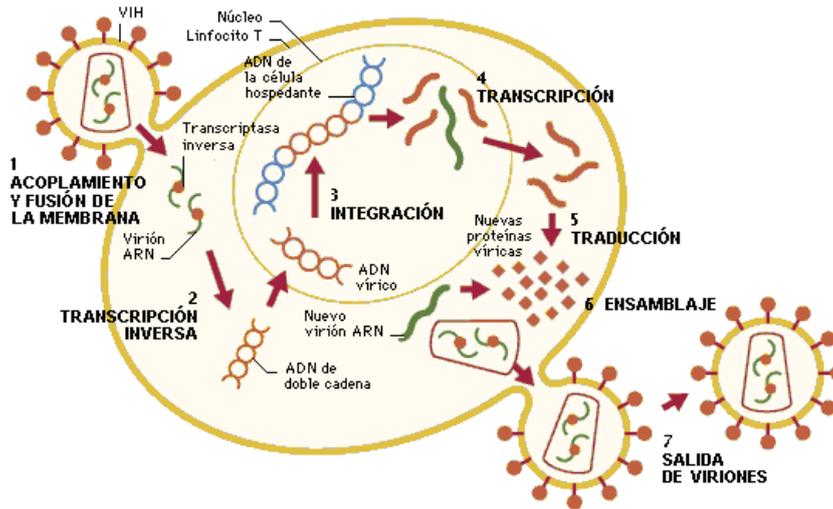


Figura 5. Ciclo de replicación del VIH.

Con este mecanismo de actuación, el objetivo de la terapia anti-VIH es inhibir alguna de las dos enzimas anteriores. Dependiendo de la enzima sobre la que actúen podemos dividir los fármacos en estos dos grupos: Inhibidores de la proteasa (*Protease Inhibitors*, PIs) e inhibidores de la transcriptasa reversa, que a su vez pueden ser derivados nucleosídicos (*Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors*, NRTIs) o no nucleosídicos (*Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors*, NNRTIs).⁹

Los nucleósidos son un grupo de compuestos muy importante en el tratamiento de la infección por VIH.¹⁰ La Figura 6 recoge la estructura de los ocho derivados nucleosídicos inhibidores de la transcriptasa inversa que han sido aprobados para el tratamiento del VIH por la Agencia del Medicamento de EE.UU. (*Food and Drug Administration*, FDA), siendo

⁹ <https://www.niaid.nih.gov/>. Visitada el 16/01/2017.

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

la zidovudina (el nombre químico es azidotimidina, AZT) el primero en salir al mercado en 1987.¹¹

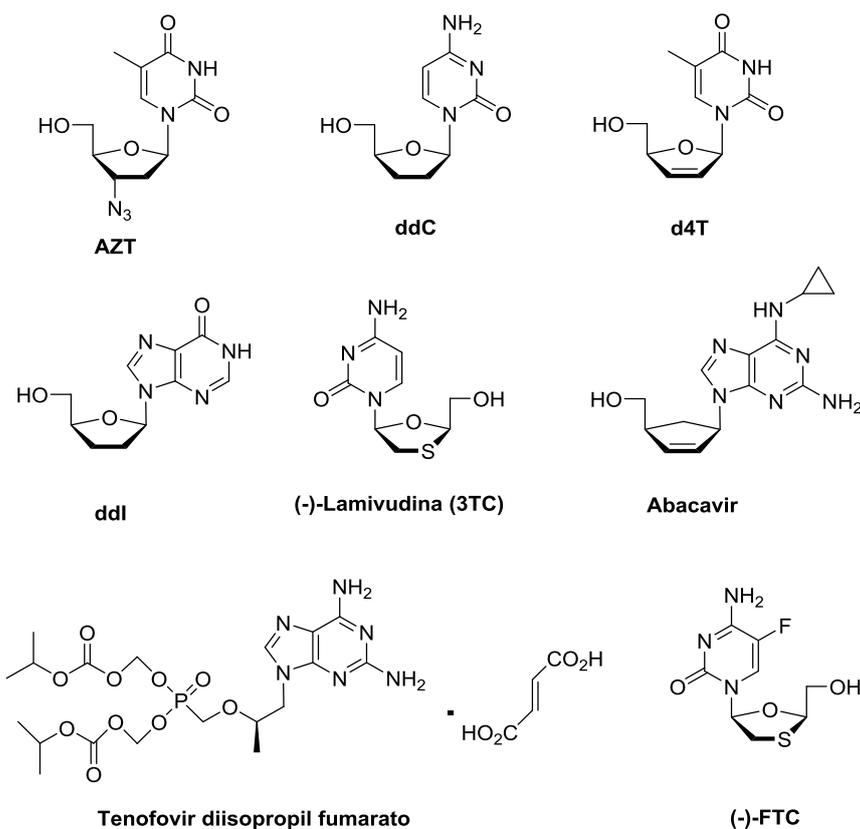


Figura 6. Análogos de nucleósido aprobados contra el VIH.

Con la excepción del tenofovir, el resto de los análogos mostrados en la Figura 6 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

¹¹ 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.

Introducción

5'-trifosfatos.¹² Deben ser también sustratos adecuados para la transcriptasa inversa, que carga los nucleósidos fosforilados a la cadena de ADN creciente. Cuando esta enzima incorpora un 2',3'-didesoxinucleósido, la ausencia del hidroxilo en posición 3' impide la elongación de la cadena, dando por concluida la síntesis del ADN viral.

Aunque la eficacia de los NRTIs ha quedado ampliamente demostrada, no están exentos de inconvenientes. Presentan efectos adversos que dependen de su potencial para inhibir a la transcriptasa inversa del virus sin inhibir a las polimerasas de ADN de la célula hospedadora. Los fosfatos de estos fármacos tienen una afinidad reducida por la polimerasa α y β de ADN humano, pero pueden interactuar con otras enzimas celulares como la polimerasa γ (enzima mitocondrial).¹³ De esta manera, los efectos adversos más destacables de estos fármacos, como la anemia o la pancreatitis, derivan en buena parte de la inhibición de síntesis de ADN mitocondrial.

I.2.1.2. Otros virus

Los derivados nucleosídicos se emplean también como fármacos frente a otros virus diferentes al expuesto anteriormente. Entre ellos destacan los siguientes:

a) Virus de la hepatitis B (*Hepatitis B virus*, HBV). La hepatitis B es una infección vírica que afecta al hígado. Este virus presenta un proceso de multiplicación muy parecido al del VIH y para el cual no existe un tratamiento específico eficaz. Existen siete medicamentos aprobados para el tratamiento de la enfermedad: dos tipos de

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 B. A. Larder, G. Darby, D. Richman. *Science* **1989**, *243*, 1731-1734.

α -interferón y los derivados de nucleósidos lamivudina, tenofovir (Figura 6),¹⁴ adefovir, entecavir¹⁵ y telivudina (Figura 7).

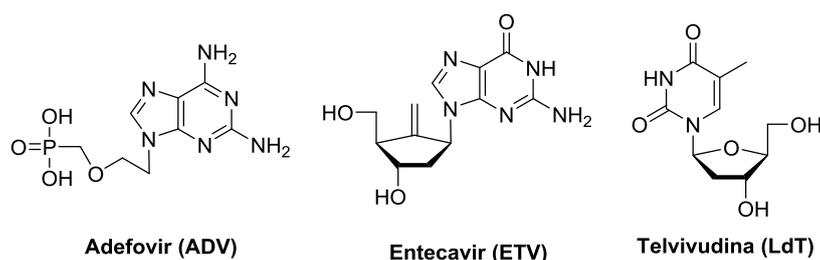


Figura 7. Fármacos aprobados para el tratamiento de la hepatitis B.

b) Virus de la hepatitis C (*Hepatitis C virus*, HCV). La hepatitis C también es una enfermedad infecciosa del hígado y para la que tampoco existe una vacuna para prevenir su infección. Aunque el tratamiento con α -interferón y el derivado nucleosídico ribavirina (Figura 8) podía curar la enfermedad, un gran número de pacientes no responden al tratamiento. Sin embargo, recientemente se ha descubierto que el derivado nucleosídico sofosbuvir (Figura 8)¹⁶ evita que el HCV se multiplique y por tanto puede curar la enfermedad. Este novedoso medicamento se usa en combinación con otros fármacos como la ribavirina y es efectivo entorno a un 90% de los casos.

c) Virus del herpes simple (*Herpes simplex virus*, HSV), virus de la varicela Zoster (*Varicela Zoster virus*, VZV) y virus de la gripe. Para el tratamiento de los dos primeros virus se emplean derivados acíclicos de la guanosina como el aciclovir y valaciclovir,¹⁷ mientras que para el tratamiento del virus de la gripe se usa la ribavirina (Figura 8).

¹⁴ F. Van Bömmel, B. Zöllner, C. Sarrazin, U. Splenger, D. Hüppe, B. Möller. *Hepatology* **2006**, *44*, 318-325.

¹⁵ Y. S. Lim, T. H. Lee, N. Y. Heo, J. H. Shim, H. C. Lee, D. J. Suh. *Antivir. Ther.* **2012**, *17*, 53-60.

¹⁶ R. Schinazi, P. Halfon, P. Marcellin, T. Asselah. *Liver International* **2014**, *34*, 69-78.

¹⁷ J. Colin, O. Prisant, B. Cochener, O. Lescale, B. Rolland, T. Hoang-Xuan. *Ophthalmology* **2000**, *107*, 1507-1511.

Introducción

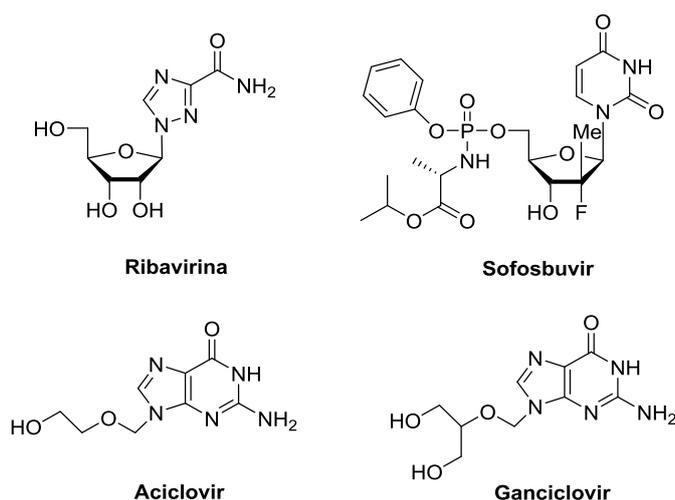


Figura 8. Derivados nucleosídicos usados en el tratamiento de HSV, VZV y la gripe.

I.2.2. Nucleósidos como antitumorales

“Cáncer” es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo. Una característica del cáncer es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, proceso conocido como metástasis. Es la principal causa de muerte a nivel mundial, y se prevé que el número de nuevos casos aumente un 70% en las próximas dos décadas.

Si los nucleósidos son potentes agentes antivirales, sus aplicaciones como agentes anticancerígenos son también extraordinarias.¹⁸ En la actualidad, existen varios derivados nucleosídicos y bases nitrogenadas modificadas que son fármacos aprobados por la FDA para el tratamiento de distintos tipos de cáncer (Figura 9).

¹⁸ W. B. Parker. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2880-2883.

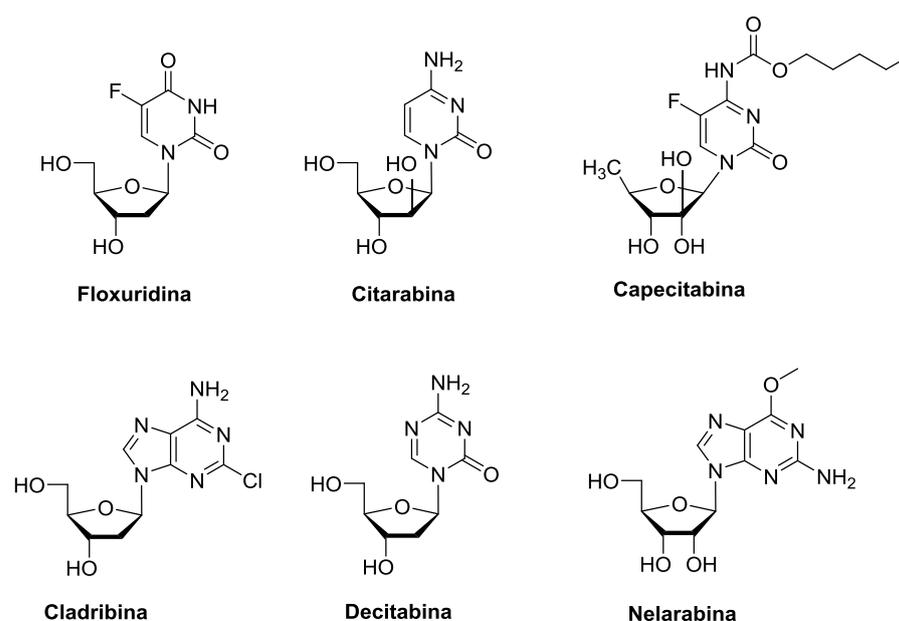


Figura 9. Nucleósidos utilizados para el tratamiento contra distintos tipos de cáncer.

El mecanismo de acción de estos derivados consiste en incorporarse en las células ayudados por los transportadores de membrana y transformarse en los correspondientes nucleótidos.¹⁹ Posteriormente, inhiben enzimas que intervienen en la síntesis del ADN, dañándolo e induciendo la apoptosis o muerte celular.²⁰ No obstante, el principal inconveniente que tienen es que compiten con los nucleósidos naturales, interactuando con enzimas celulares e induciendo su citotoxicidad.

I.3. Inhibición de la expresión génica

Actualmente, la medicina no ha encontrado soluciones para enfermedades con alta incidencia en la población como el Alzheimer, la esquizofrenia o el cáncer. Los fármacos que se utilizan para combatir estas enfermedades, o paliar sus síntomas, han tenido una eficacia moderada o

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

²⁰ D. Sampath, V. A. Rao, W. Plunkett. *Oncogene* **2003**, *22*, 9063-9074.

Introducción

baja debido a que la mayoría de ellos actúan sobre las proteínas causantes de las enfermedades.

Los avances en la búsqueda de nuevos fármacos requerirán nuevos mecanismos de acción, como la posibilidad de ir a la raíz del problema e impedir que se formen dichas proteínas. A esta idea se ajusta la **terapia génica**.²¹ 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.²² Es decir, se busca la inhibición de la expresión de un gen, que tras la hibridación con el ARNm diana impida la traducción de una proteína causante de una determinada enfermedad.²³ De esta manera, se lograrían fármacos más selectivos y menos tóxicos que los habituales. El principal inconveniente es que se necesita conocer la secuencia del ARNm cuya expresión se desea inhibir.

A continuación, se describen brevemente diversas técnicas para la inhibición de la expresión génica.

1.3.1. Oligonucleótidos *antisense*

Son pequeñas secuencias de ácidos nucleicos de ADN o ARN de cadena simple que, tras su internalización, pueden impedir la expresión de una proteína específica involucrada en el desarrollo de una enfermedad.²⁴ El oligonucleótido *antisense* se unirá al ARNm para formar un dúplex e impedir su traducción, bloqueando así la producción de la proteína mutada. Tienen dos formas de actuación: la primera es por bloqueo estérico del ARNm (Figura 10) y la segunda es por activación de la enzima

²¹ D. Kirn. *Molecular Therapy* **2005**, *11*, 493-493

²² a) S. T. Crooke. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **1998**, *8*, 115-122. b) R. A. Stull, F. C. Szoka. *Pharm. Res.* **1995**, *12*, 465-483.

²³ *Therapeutic Oligonucleotides*; J. Kurreck. Ed.; RSC Publishing: Cambridge, 2008.

²⁴ a) S. T. Crooke. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1*, 31-44. b) S. Akhtar, M. D. Hughes, A. Khan, M. Bibby. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2000**, *44*, 3-21

Ribonucleasa H (RNasa H), que rompe específicamente la cadena de ARNm en el dúplex que forma con el oligonucleótido *antisense*. Esta técnica de inhibición se emplea en diferentes fases de ensayos clínicos frente a distintas patologías como el cáncer, atrofia muscular espinal, papilomavirus, etc.²⁵

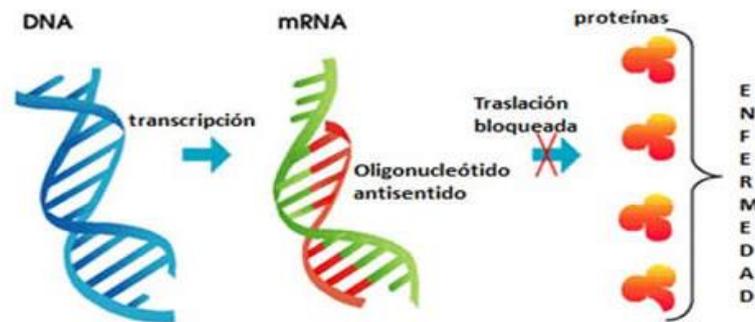


Figura 10. Mecanismo de acción por bloqueo de los oligonucleótidos *antisense*.

I.3.2. Ribozimas

Son pequeñas moléculas de ARN que gracias a su estructura terciaria presentan actividad enzimática, cortando y pegando otras moléculas de ARN en sitios específicos. Poseen dos regiones clave. Una región se asocia a la secuencia objetivo del ARNm y la otra es responsable del corte en ese sitio (Figura 11). De esta manera, si se dirigen a los ARNm que codifican proteínas con papeles patológicos en el cáncer, las ribozimas pueden retardar o inhibir el crecimiento canceroso.²⁶

²⁵ a) J. H. Chan, S. Lim, W. F. Wong. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2006**, *33*, 533-540. 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 Discov. Today* **2008**, *13*, 513-521. e) A. Van Aerschot. *Antiviral Res.* **2006**, *71*, 307-316. f) Y. C. Zhang, M. M. Taylor, W. K. Samson, M. I. Phillips. *Antisense Therapeutics*; Humana Press: Totowa, 2005; p 11.

²⁶ S. G. Mansfield, J. Kole, M. Puttaraju, C. C. Yang. *Gene Ther.* **2000**, *7*, 1885-1895.

Introducción

Esta estrategia ha sido probada, entre otras, en patologías como la fibrosis quística²⁷ o la hemofilia A.²⁸ Tiene la ventaja de ser específica y poco inmunogénica. A pesar de ello, los principales problemas para su uso terapéutico son su baja estabilidad y la dificultad de dirigir al ribozima hacia la secuencia que se desea cortar.

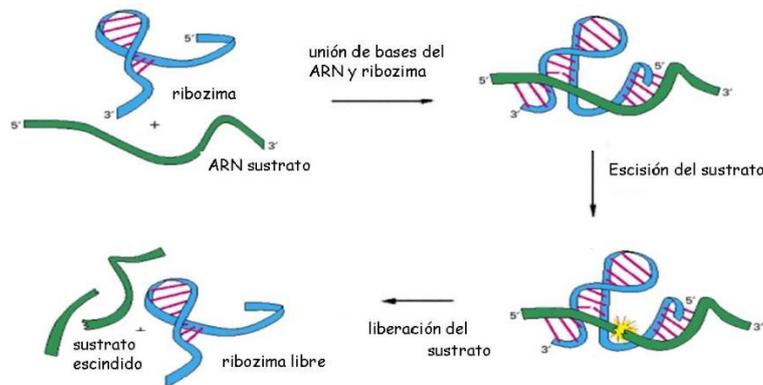


Figura 11. Actuación del ribozima frente al ARNm diana.

I.3.3. ARN de interferencia (*Short Interfering RNA, siRNA*)

La interferencia del ARN es un fenómeno natural que lleva a silenciar la expresión de un determinado gen por un mecanismo postranscripcional.²⁹ Se basa en la introducción en la célula de pequeños fragmentos de ARN de doble cadena que interactúan con el complejo silenciador inducido por el ARN (*RNA Induced Silencing Complex, RISC*). Posteriormente, una de las hebras se degrada y la otra (hebra *antisense*) identifica al ARNm complementario que se desea anular. Finalmente, se corta este ARNm complementario y con ello se evita la expresión del gen

²⁷ H. Chao, S. G. Mansfield, R. C. Bartel, S. Hirianna. *Nat. Med.* **2003**, 9, 1015-1019.

²⁸ J. E. Chatterton, X. Hu, F. Wong-Staal. *Drug Discov. Today* **2004**, 3, 10-17.

²⁹ S. M. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, T. Tuschl. *Nature* **2001**, 411, 494-498.

involucrado en la patología (Figura 12).³⁰ Esta estrategia se ha aplicado en distintas patologías oncológicas³¹ y contra el VIH.³²

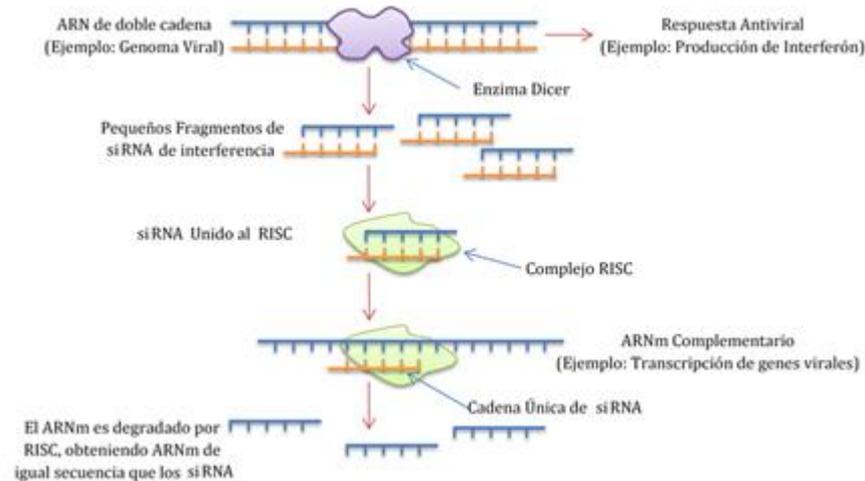


Figura 12. Mecanismo de acción de los siRNA.

I.3.4. Aptámeros

Son también ácidos nucleicos que no existen naturalmente. Sin embargo, en lugar de unirse al ARNm, pueden interactuar directamente con las proteínas involucradas en el desarrollo de una enfermedad, causando su inactivación (Figura 13).³³ Son muy específicos y poco inmunogénicos,³⁴ pero su mayor limitación vendría dada por su corta semivida. A modo de empleo, se han ensayado aptámeros contra infecciones como el VIH³¹ y la hepatitis C.³⁵

³⁰ a) D. Bumcrot, M. Manoharan, V. Koteliansky, D. W. Y. Sah. *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 711-719. b) A. Gaither, V. Iourgenko. *Curr. Opin. Oncol.* **2007**, *19*, 50-54. c) A. de Fougerolles, H. P. Vornlocher, J. Maraganore, J. Lieberman. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6*, 443-453.

³¹ R. S. Tomar, H. Matta, P. M. Chaudhary. *Oncogene* **2003**, *22*, 5712-5715.

³² J. Zhou, H. Li, S. Li, J. Zaia, J. J. Rossi. *Mol. Ther.* **2008**, *16*, 1481-1489.

³³ a) R. A. Stull, F. C. Szoka. *Pharm. Res.* **1995**, *12*, 465-483. b) B. Suess, J. E. Weigand. *Methods Mol. Biol.* **2009**, *535*, 201-208

³⁴ S. D. Jayasena. *Clin. Chem.* **1999**, *45*, 1628-1650.

³⁵ A. J. Thompson, K. Patel. *Clin. Liver Dis.* **2009**, *13*, 375-390.

Introducción

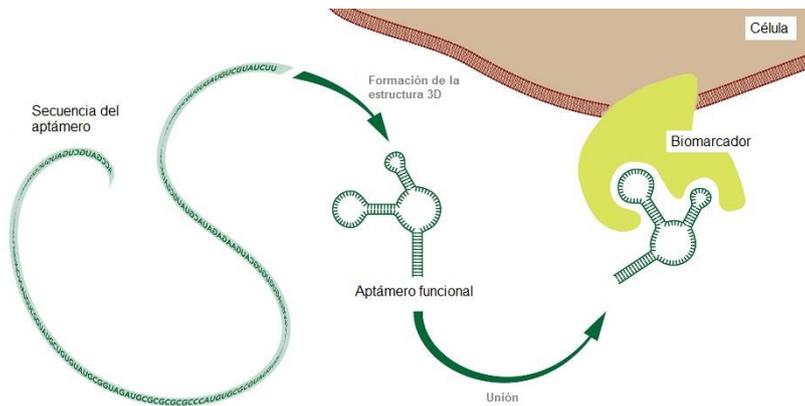


Figura 13. Inactivación de proteínas empleando aptámeros.

I.3.5. Plásmidos

A diferencia de los anteriores, los plásmidos son estructuras de ADN de cadena doble que ya existen en procariotas (bacterias) y en algunas eucariotas (levaduras). En el contexto que nos ocupa dentro de la terapia génica, los plásmidos se pueden utilizar como herramientas que lleven incorporado un gen productor de una proteína deseada. Una vez que se introducen en la célula del paciente, su secuencia se transcribe y luego traduce la proteína que cumple la función terapéutica.³⁶ Actualmente, su uso incluye el tratamiento de enfermedades como Parkinson³⁷ y Alzheimer.³⁸

³⁶ C. Uherek, W. Wels. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2000**, *44*, 153-166.

³⁷ V. Baekelandt, B. De Strooper, B. Nuttin, Z. Debyser. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **2000**, *2*, 540-554.

³⁸ B. X. Qu, D. Lambrecht-Washington, M. Fu, T. N. Eagar, O. Stüve, R. N. Rosenberg. *Vaccine* **2010**, *28*, 5280-5287.

I.4. Preparación de oligonucleótidos con finalidad terapéutica

I.4.1. Modificaciones en oligonucleótidos

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

a) Oligonucleótidos de primera generación. La primera generación de oligonucleótidos *antisense* son los oligonucleótidos fosforotioatos,³⁹ que están formados por la unión de nucleótidos en los que el átomo de oxígeno que no forma parte del puente internucleotídico ha sido sustituido por un átomo de azufre (Figura 14). La principal ventaja que poseen es su resistencia a la degradación por parte de las nucleasas celulares, además de tener un sencillo método de síntesis. Sin embargo, tienen como principales desventajas la formación de diastereoisómeros debido a la presencia de un átomo de fósforo quiral en el puente internucleotídico, la pérdida de afinidad en la hibridación con el ARN y la baja capacidad para administrarse vía oral.

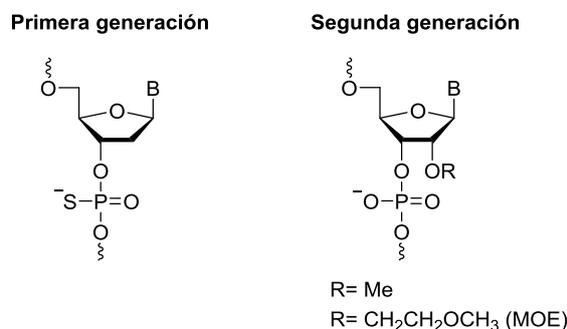


Figura 14. Estructura general de oligonucleótidos de primera y segunda generación.

³⁹ C. Stein, J. Cohen. *Oligodeoxynucleotides: Antisense Inhibitors of Gene Expression*; J. Cohen. Ed.; CRC Press: Boca Raton, **1989**; pp. 94-117.

Introducción

b) Oligonucleótidos de segunda generación. Se han diseñado los 2'-*O*-alquiloligonucleótidos con el objetivo de corregir las desventajas que presentaba la primera generación (Figura 14):⁴⁰ se mejora la afinidad hacia el ARN objetivo y la adsorción celular. Además, la presencia de un sustituyente alcóxido en la posición 2' hace que estos oligonucleótidos sean muy estables frente a las nucleasas celulares. La principal desventaja es el alto coste de su síntesis debido a la dificultad de preparación de los monómeros precursores (2'-*O*-alquilribonucleósidos).

c) Oligonucleótidos de tercera generación. Incluyen una gran variedad de tipos de oligonucleótidos de ARN y ADN. Algunos ejemplos se muestran en la Figura 15: ácidos nucleicos peptídicos (*Peptide Nucleic Acid*, PNA),⁴¹ morfolino-fosforamiditos,⁴² ácidos nucleicos conformacionalmente restringidos (*Locked Nucleic Acid*, LNA)⁴³ y ácidos nucleicos formados por nucleósidos que presentan un átomo de flúor en la posición 2' (2'-*Fluoro-Arabino Nucleic Acid*, FANA).⁴⁴

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

⁴⁰ a) M. Grotti, M. Douglas, R. Eritja, B. S. Sproat. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 5899-5914. b) K. H. Altmann, P. Martin, N. M. Dean, B. P. Monia. *Nucleosides Nucleotides* **1997**, *16*, 917-926. c) P. Martin. *Helv. Chim. Acta* **1995**, *78*, 486-504.

⁴¹ a) A. Elayadi, D. Corey. *Curr. Opin. Investigational Drugs* **2001**, *2*, 558-561. b) P. Nielsen. *Mol. Biotechnol.* **2004**, *26*, 233-248.

⁴² a) J. Heasman. *Dev. Biol.* **2002**, *243*, 209-214. b) J. Summerton. *Biochim. Biophys. Acta, Gene Struct. Expression* **1999**, *1489*, 141-158.

⁴³ a) D. A. Braasch, D. R. Corey. *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 1-7. b) R. Crinelli, M. Bianchi, L. Gentilini, L. Palma, M. Magnani. *Curr. Drug Targets* **2004**, *5*, 745-752. c) C. Zhou, J. Chattopadhyaya. *Curr. Op. Drug Discov.* **2009**, *12*, 876-898. d) M. A. Campbell, J. Wengel. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5680-5689. e) C. B. Hughesman, R. F. B. Turner, C. A. Haynes. *Biochemistry* **2011**, *50*, 5354-5368.

⁴⁴ a) M. J. Damha, C. J. Wilds, A. Noronha, I. Brukner, G. Borkow, D. Arion, M. A. Parniak. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 12976-12977. b) J. C. Wilds, M. J. Damha. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 3625-3635.

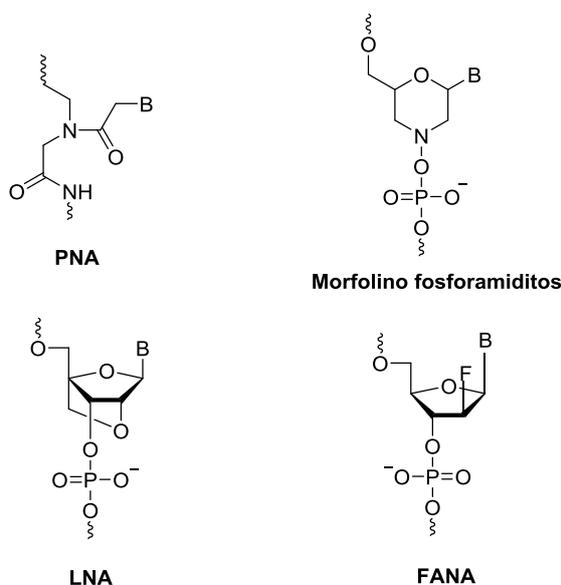


Figura 15. Estructura de algunos oligonucleótidos de tercera generación.

1.4.2. Métodos de síntesis de oligonucleótidos

La formación de los enlaces internucleotídicos puede llevarse a cabo en fase sólida o en disolución.⁴⁵ El método más empleado actualmente para la síntesis de oligonucleótidos en fase sólida es el del fosforamidito,⁴⁶ mientras que en disolución es el del H-fosfonato.⁴⁷

a) Síntesis de oligonucleótidos en fase sólida. El método del fosforamidito consiste en el acoplamiento de un nucleósido 5'-O-(4,4-dimetoxitritil)-3'-fosforamidito, que se encuentra en disolución, con otro nucleósido que tiene la posición 5' libre pero que está anclado a un soporte sólido por su posición 3'.

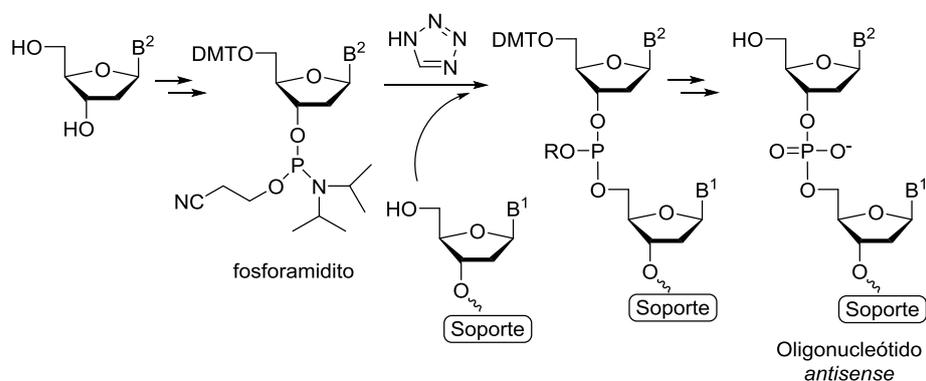
⁴⁵ C. B. Reese. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 3851-3868.

⁴⁶ S. L. Beauge, M. H. Caruthers. *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22, 1859-1862.

⁴⁷ a) P. J. Garegg, I. Lmdh, T. Regberg, J. Stawinskt, R. Stromberg. *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 4051-4054. b) B. C. Froehler, M. D. Matteucci. *Nucleosides Nucleotides* **1987**, 6, 287-291. c) C. B. Reese, Q. Song. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, 7, 2787-2792. d) C. B. Reese, Q. Song. *Nucleic Acids Res.* **1999**, 27, 963-971.

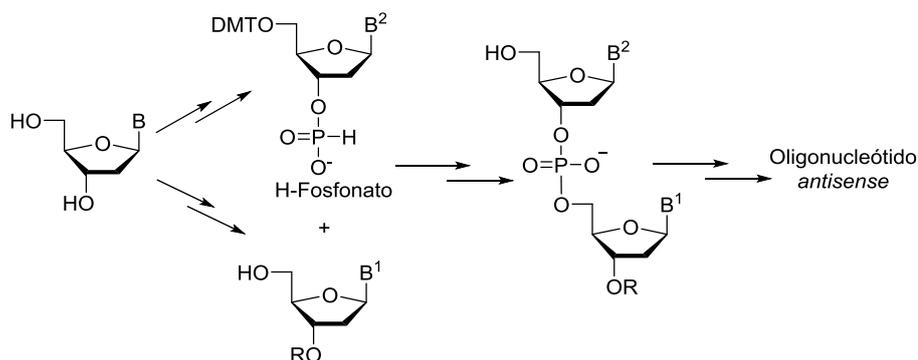
Introducción

Posteriormente, se oxidaría el fosfito triéster y se desprotegería el grupo DMT en la posición 5', para seguidamente repetir el ciclo y alargar la cadena. La principal limitación de este método es el alto precio de los amiditos y del soporte sólido (Esquema 1).



Esquema 1. Síntesis de oligonucleótidos en fase sólida.

b) Síntesis de oligonucleótidos en disolución. Debido a las limitaciones económicas que supone la síntesis en fase sólida, se han desarrollado métodos de síntesis en disolución, como es el método del H-fosfonato (Esquema 2).



Esquema 2. Síntesis de oligonucleótidos en disolución.

Esta metodología está basada en una reacción de acoplamiento entre un nucleósido protegido en la posición 5' con el grupo dimetoxitritilo (DMT) que posee en posición 3' un grupo H-fosfonato, y un nucleósido que ha sido protegido en la posición 3'. De esta manera, se obtendrá un

dinucleótido H-fosfonato que tras su oxidación y desprotección del grupo DMT permitirá seguir alargando la cadena.

1.5. Biocatálisis

1.5.1. Uso de enzimas en síntesis orgánica

La biocatálisis, que también es conocida como catálisis enzimática o biotransformación, es el proceso en el que se aumenta la velocidad de una determinada reacción mediante el uso de enzimas o agregados celulares.

Las enzimas son proteínas que catalizan las reacciones químicas en los seres vivos. Presentan una alta especificidad, puesto que cada enzima cataliza un solo tipo de reacción y casi siempre actúa sobre un único sustrato. Además, generan un reducido volumen de desechos y operan en condiciones suaves o poco agresivas.⁴⁸ Por todo ello, el uso de enzimas o biocatalizadores en Química Orgánica ha experimentado un crecimiento exponencial en las últimas décadas, adquiriendo una gran importancia en la industria química.⁴⁹

Atendiendo al tipo de reacción que catalizan, las enzimas se pueden clasificar en 6 grupos distintos (Tabla 1).

Tabla 1. Tipos de enzimas y proceso que catalizan.

<i>Tipo de enzima</i>	<i>Reacción que catalizan</i>
Oxidoreductasas	Oxidación-reducción
Transferasas	Transferencia de grupos
Hidrolasas	Hidrólisis
Liasas	Adición a enlaces múltiples
Isomerasas	Cambios estructurales (isomerización)
Ligasas	Formación de enlaces

⁴⁸ R. Sheldon. *Green Chemistry in the Pharmaceutical Industry*; P. J. Dunn, A. Wells, M. T. Williams. Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, 2010; pp. 1–18.

⁴⁹ S. Wenda, S. Illner, A. Mell, U. Kragl. *Green Chem.* **2011**, *13*, 3007-3047.

Introducción

Las enzimas con más aplicaciones en síntesis orgánica son las lipasas (pertenecen al grupo de las hidrolasas), que tienen como función natural la hidrólisis de triglicéridos. Inicialmente, se pensaba que estas enzimas sólo podían actuar en su medio natural, es decir, en medios acuosos. Sin embargo, en 1985 se descubrió que podían ser también activas en medios orgánicos,⁵⁰ reemplazando el agua por otros nucleófilos como alcoholes o aminas, lo que permite la preparación de un gran número de compuestos orgánicos. Este hallazgo aumentó la versatilidad de las lipasas y supuso el verdadero lanzamiento de la biocatálisis como método utilizado en síntesis orgánica.⁵¹

También cabe destacar la utilidad de las enzimas debido a sus tres tipos de selectividades:

- ✓ *Quimioselectividad*: es la preferencia que posee la enzima para reaccionar con uno de entre los diferentes grupos funcionales de la molécula. Por ejemplo, la acilación enzimática de un alcohol en presencia de una amina.⁵²
- ✓ *Regioselectividad*: es la preferencia que tendrá la enzima sobre varios grupos funcionales iguales dentro de una molécula y realizar una transformación sobre uno de ellos.⁵³
- ✓ *Enantioselectividad*: es la discriminación que puede realizar el enzima entre dos enantiómeros de una mezcla racémica, logrando que únicamente uno de ellos reaccione.⁵⁴

⁵⁰ G. Kirchner, M. P. Scollar, A. M. Klibanov. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 7072–7076.

⁵¹ a) A. Ghanem. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 1721-1754. b) T. Hudlicky, J. W. Reed. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 3117-3132.

⁵² N. Chinsky, A. L. Margolin, A. M. Klibanov. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 386-388.

⁵³ M. Ferrero, V. Gotor. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4319-4347.

⁵⁴ a) V. Gotor, I. Alfonso, E. García-Urdiales. *Asymmetric Organic Synthesis with Enzymes*; Wiley-VCH: Weinheim, 2008. b) W. D. Fessner, T. Anthonsen. *Modern Biocatalysis. Stereoselective and Environmentally Friendly Reactions*; Wiley-VCH: Weinheim, 2009.

I.5.2. Importancia de la inmovilización de enzimas

Las enzimas en disolución son utilizadas generalmente una sola vez, debido a la dificultad que representa su recuperación al término de una reacción, una limitación que impacta directamente en el coste del proceso. En este sentido, un gran avance en la consolidación del uso de enzimas a escala industrial se debe en gran medida al desarrollo de métodos eficientes de inmovilización de enzimas (Figura 16). Se trata de la unión física o química de la enzima a un soporte inerte, de manera que permita su fácil recuperación y reutilización.

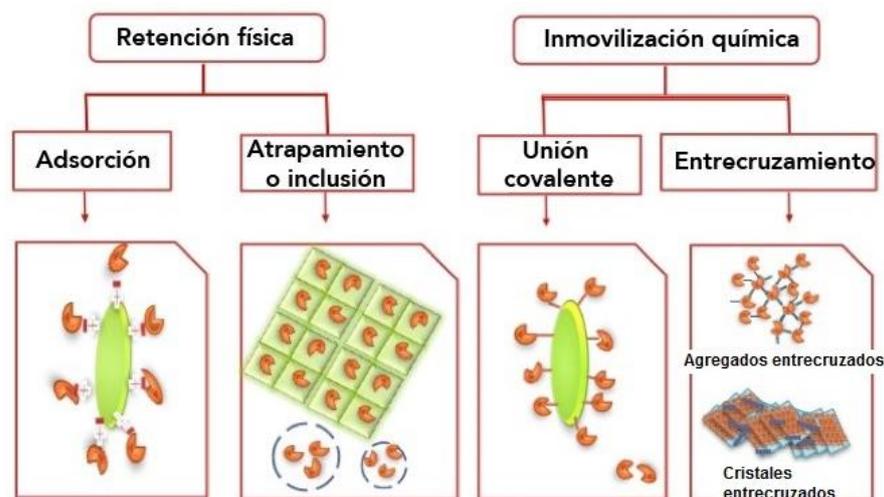


Figura 16. Métodos de inmovilización de enzimas.

Estas ventajas que presentan las enzimas inmovilizadas en particular, y los biocatalizadores en general, los validan como una herramienta estratégica para el desarrollo de compuestos químicos, farmacéuticos, agroquímicos, etc. de cara a procesos industriales.

I.5.3. Biocatálisis en la industria

El primer ejemplo representativo de biocatálisis a nivel industrial data de mediados del siglo XX, donde la empresa Merck venía produciendo

Introducción

cortisona de manera tradicional empleando un proceso químico de 31 etapas. Con el objetivo de hacer más eficiente el proceso, la empresa UpJohn implementó una estrategia biocatalítica de tan sólo 11 etapas, en la que un citocromo P450 resultó ser clave para la economía del proceso. Este hecho no sólo permitió la disminución del precio del producto (de 200 a 6 dólares por gramo), sino que permitió la realización del proceso con menor impacto medioambiental.

A día de hoy, un gran número de empresas (químicas y farmacéuticas) están empleando reacciones catalizadas por enzimas para la producción a gran escala de compuestos 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.⁵⁵ El análisis de estos procesos industriales revela que están dirigidos mayoritariamente a la preparación de productos naturales o de sus derivados (Figura 17).



Figura 17. Tipos de compuestos obtenidos mediante el uso de biocatalizadores en la industria.

Los derivados de ácidos grasos y carbohidratos son prácticamente en su totalidad aplicados en el sector alimentario. Por el contrario, los otros

⁵⁵ 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. c) P. Hoyos, V. Pace, M. J. Hernaiz, A. R. Alcantara. *Curr. Green Chem.* **2014**, *1*, 155-181.

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.

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

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

La industria química usa las biotransformaciones para manufacturar productos a escala de entre 100 y 10000 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.

Capítulo 1

*Levulinilación regioselectiva de
2'-desoxinucleósidos mediante procesos enzimáticos
en flujo continuo*

Antecedentes

A.1. Sostenibilidad en procesos químicos

La Química Orgánica y la industria química se enfrentan a una serie de retos en cuanto a procedimientos sostenibles se refiere, debido a la cada vez mayor sensibilización con el medio ambiente y la regulación de leyes hacia una química más sostenible, necesitando así una clara apuesta por la investigación e innovación.⁵⁶

Las soluciones a gran parte de estos retos pasan por el desarrollo en el campo de la química sostenible. Este concepto (del inglés “*Green Chemistry*”, fue un término introducido en EE.UU. en 1998) explora la idea del diseño y desarrollo de nuevos o mejorados procesos químicos con el fin de disminuir los peligros para la salud humana y el medio ambiente.⁵⁷ Así pues, los doce principios de la química verde se postulan como un marco de referencia para los químicos en su búsqueda de una producción más eficiente y sostenible, y al mismo tiempo, económicamente factible.⁵⁸

Al margen de las magnitudes económicas, en estos términos se ajusta la biocatálisis, principalmente en el sector farmacéutico y en la obtención

⁵⁶ *Sustainable Industrial Chemistry: Principles, Tools and Industrial Examples*. G. Centi, S. Perathoner, F. Trifiró (Eds); Wiley: New York, 2009.

⁵⁷ P. T. Anastas, J. C. Warner. *Green Chemistry: Theory and Practice*; Oxford University Press: New York, 1998; p 30.

⁵⁸ M. C. Bryan, B. Dillo, L. G. Hamann, G. J. Hughes, M. E. Kopach, E. A. Peterson, M. Pourashraf, I. Raheem, P. Richardson, D. Richter, H. F. Sneddon. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 6007-6021.

Antecedentes

de compuestos de alto valor añadido.⁵⁹ Existen ejemplos de una gran variedad de procedimientos industriales donde la aplicación de la biocatálisis ha supuesto una mejora en lo referente al desarrollo de procesos más sostenibles y rutas más eficientes, que va desde la obtención de pequeñas moléculas quirales hasta la síntesis de compuestos más complejos.⁶⁰

Por otra parte, los avances en biología molecular y bioinformática han hecho posible el diseño de enzimas para procesos específicos.⁶¹ Estas son capaces de aceptar una amplia gama de sustratos y catalizar reacciones con diferentes selectividades (quimio-, regio- y enantio-) contribuyendo así a rutas sintéticas más cortas. Además, como se ha puesto de manifiesto previamente en la introducción, los procesos biocatalíticos consumen menos energía y generan menos residuos que los procesos químicos convencionales. A esto se puede añadir la reutilización del biocatalizador si se encuentra inmovilizado, y que también simplificaría su manejo en operaciones a gran escala.

A.2. Biocatálisis aplicada a procesos de flujo continuo

Los procesos en flujo continuo (FC) están emergiendo como una buena herramienta para la obtención de distintos productos naturales bajo condiciones sostenibles.⁶² La implementación de estos procesos conlleva las siguientes ventajas: reducción de la manipulación, mayor seguridad del

⁵⁹ H. P. Meyer, E. Eichhorn, S. Hanlon, S. Lütz, M. Schürmann, R. Wohlgemuth, R. Coppolecchia. *Catal. Sci. Technol.* **2013**, *3*, 29-40.

⁶⁰ B. M. Nestl, B. A. Nebel, B. Hauer. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15*, 187-193.

⁶¹ a) U. T. Bornscheuer. *Synlett.* **2013**, *24*, 150-156. b) U. T. Bornscheuer, G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, J. C. Moore, K. Robins. *Nature* **2012**, *485*, 185-194. c) G. A. Behrens, A. Hummel, S. K. Padhi, S. Schätzle, U. T. Bornscheuer. *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2191-2215.

⁶² a) C. Wiles, P. Watts. *Green Chem.* **2014**, *16*, 55-62. b) S. G. Newman, K. F. Jensen. *Green Chem.* **2013**, *15*, 1456-1472. c) S. V. Ley. *Chem. Rec.* **2012**, *12*, 378-390. d) J. Wegner, S. Ceylan, A. Kirschning. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 4583-4592.

proceso, mejor control de las variables de reacción, mayor reproducibilidad y mayor facilidad para la reutilización del catalizador.⁶³

De manera que si combinamos el FC con la biocatálisis podemos lograr una mayor efectividad en el proceso, donde a las ventajas ya mencionadas para los procesos en FC, habría que añadir aquellas que suponen el uso de enzimas, como por ejemplo el reciclado del biocatalizador, la simplificación del trabajo de reacción entre los ciclos o la reducción en el uso de disolventes.

En la bibliografía existen algunos ejemplos de síntesis quimioenzimáticas en las que se han desarrollado procesos en FC catalizados por enzimas. Entre ellos, destacan la síntesis estereoselectiva de 2-(1*H*-imidazolil)cicloalcanoles,⁶⁴ las resoluciones cinéticas de un precursor de *myo*-inositol⁶⁵ y cicloalcanoles 2-metilen-sustituídos,⁶⁶ y la síntesis del alcaloide calicotomina.⁶⁷

En cambio, solo se ha encontrado un ejemplo de biocatálisis en FC en el ámbito de los nucleósidos.⁶⁸ En él, Gallou y col. describen una síntesis del profármaco de la isatoribina mediante una hidrólisis enzimática regioselectiva empleando la lipasa de *Candida antarctica* B (CAL-B).

Como se refleja en el Esquema 3, el nucleósido triacetilado se sintetizó a partir de la pirimidina-2,4-diamina y una posterior glicosilación con la D-ribosa tetraacilada. Para el proceso final de la hidrólisis se diseñó un

⁶³ a) A. Puglisi, M. Benaglia, V. Chiroli. *Green Chem.* **2013**, *15*, 1790-1813. b) D. T. McQuade, P. H. Seeberger. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 6384-6389. c) L. Malet-Sanz, F. Susanne. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 4062-4098.

⁶⁴ R. Porcar, V. Sans, N. Ríos-Lombardía, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, M. I. Burguete, E. García-Verdugo, S. V. Luis. *ACS Catal.* **2012**, *2*, 1976-1983.

⁶⁵ E. A. Manoel, K. C. Pais, M. C. Flores, L. S. M. Miranda, M. A. Z. Coelho, A. B. C. Simas, D. M. G. Freire, M. A. R. O. de Souza. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2013**, *87*, 139-143.

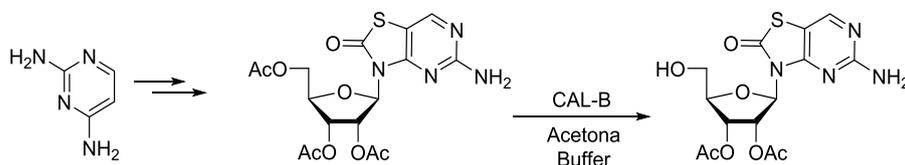
⁶⁶ A. Tomin, G. Hornyánszky, K. Kupai, Z. Dorkó, L. Üрге, F. Darvas, L. Poppe. *Process Biochem.* **2010**, *45*, 859-865.

⁶⁷ L. Schönstein, E. Forró, F. Fülöp. *Tetrahedron: Asymmetry* **2013**, *24*, 202-206.

⁶⁸ F. Gallou, M. Seeger-Weibel, P. Chassagne. *Org. Process Res. Dev.* **2013**, *17*, 390-396.

Antecedentes

sistema en el que se utiliza una columna rellena con CAL-B. Por dicha columna se hace recircular el nucleósido de partida triacilado en acetona a distintas velocidades hasta la conversión completa del producto final, empleando una disolución tampón fosfato para ajustar el pH. Con este sistema se consiguió una conversión casi completa, donde únicamente el 1% eran distintos subproductos de la hidrólisis.



Esquema 3. Hidrólisis enzimática mediante un proceso de flujo semicontinuo.

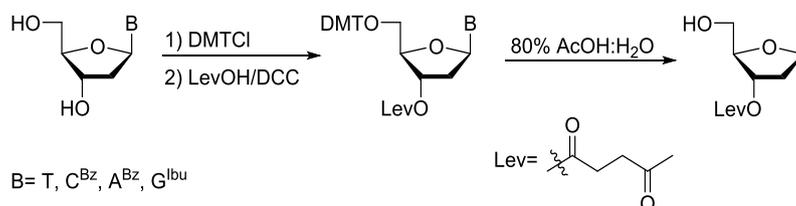
A.3. Preparación regioselectiva de 2'-desoxinucleósidos

La modificación selectiva de nucleósidos supone un reto interesante para los químicos orgánicos. De entre los distintos grupos protectores disponibles, el grupo levulinilo (Esquema 4) resulta el más adecuado para proteger los grupos hidroxilo del azúcar. Esto se debe a la estabilidad que presenta en las condiciones en las que se produce el acoplamiento entre monómeros en la síntesis de oligonucleótidos, además de su desprotección sin afectar a otros grupos protectores presentes en la molécula. A continuación, se exponen distintos procedimientos de obtención de 3'- y 5'-*O*-levulinilnucleósidos a partir de métodos químicos convencionales y métodos quimioenzimáticos.

A.3.1. Métodos químicos convencionales

En 1984, Kumar y Poonian⁶⁹ sintetizaron una serie de 2'-desoxinucleósidos con el alcohol secundario protegido por el grupo levulinilo, con el fin de preparar dinucleótidos *N,N*-dialquilfósforoamiditos y estudiar su aplicación en la síntesis en fase sólida.

En el Esquema 4 se muestra la ruta sintética en la que se utilizan como materiales de partida 2'-desoxinucleósidos protegidos (A^{Bz} , C^{Bz} y G^{ibu}). En primer lugar, se protege selectivamente el hidroxilo primario por reacción con el cloruro de 4,4-dimetoxitritilo (DMTCl). Después, un tratamiento con ácido levulínico y *N,N*'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) forma el correspondiente levulinato en la posición 3'. Finalmente, la desprotección selectiva del DMT tiene lugar con ácido acético al 80%, obteniendo los correspondientes 3'-*O*-levulinilnucleósidos.



Esquema 4. Preparación de 3'-*O*-Lev-dNs mediante métodos químicos convencionales.

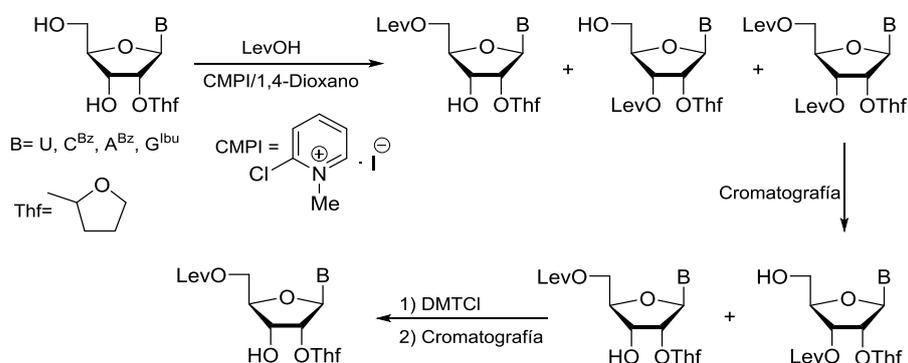
Los derivados 5'-*O*-levulinilnucleósidos fueron preparados por Ohtsuka y col.⁷⁰ como se detalla en el Esquema 5. En primer lugar, se hacen reaccionar los ribonucleósidos con ácido levulínico y yoduro de 2-cloro-1-metilpiridinio (CMPI), proporcionando una mezcla de los posibles levulinilnucleósidos. Se separa el derivado dilevulínico por cromatografía de columna y la mezcla de los compuestos monoprottegidos

⁶⁹ G. Kumar, M. S. Poonian. *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 4905-4912.

⁷⁰ a) S. Iwai, E. Ohtsuka. *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 9443-9456. b) S. Iwai, S. Toshiro, E. Ohtsuka. *Tetrahedron* **1990**, *46*, 6673-6688.

Antecedentes

se hace reaccionar con DMTCl, el cual solo reacciona con el alcohol primario (posición 5'). De este modo, ya se pueden separar los monómeros 5'-*O*-dimetoxitritil-3'-*O*-levulinil y 5'-*O*-levulinil por cromatografía de columna en fase reversa.



Esquema 5. Preparación de 5'-*O*-Lev-Ns mediante métodos químicos convencionales.

Las limitaciones de estos procedimientos son, entre otras, los bajos rendimientos, las múltiples etapas de protección-desprotección y la necesidad de aislar tanto los intermedios como los productos finales mediante costosas técnicas cromatográficas.

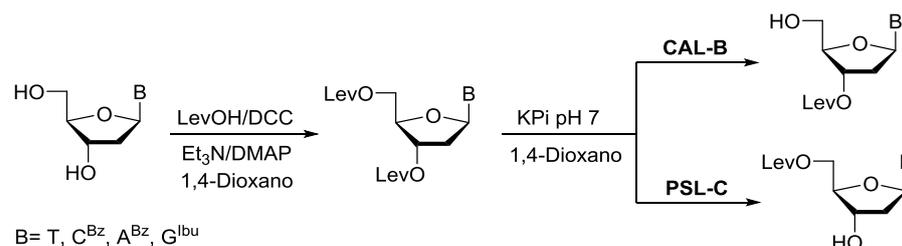
A.3.2. Métodos quimioenzimáticos

La aplicación de la biocatálisis a la química de nucleósidos ha sido reconocida como una buena alternativa a la síntesis orgánica convencional.⁷¹ Uno de los primeros ejemplos en el que se utiliza el grupo levulinilo, desarrollado en nuestro grupo de investigación, consiste en la hidrólisis enzimática regioselectiva de 2'-desoxinucleósidos.⁷²

⁷¹ a) M. Ferrero, S. Fernández, V. Gotor. *Biocatalytic Methodologies for Selective Modified Nucleosides*. In *Chemical Synthesis of Nucleoside Analogues*; P. Merino (Ed.); John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, New Jersey, 2013, pp 1-40; Chapter 1. b) M. Ferrero, V. Gotor. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4319-4347. c) M. Ferrero, V. Gotor. *Monatsh. Chem.* **2000**, *131*, 585-616.

⁷² J. García, S. Fernández, M. Ferrero, Y. S. Sanghvi, V. Gotor. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 4513-4519.

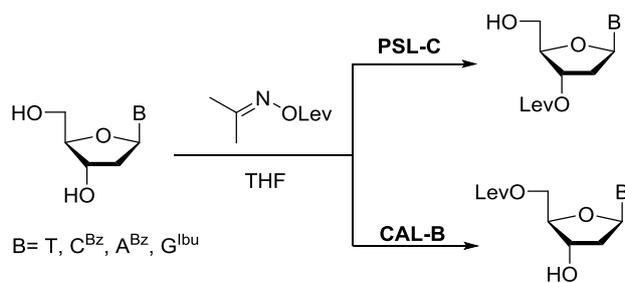
Como se muestra en el Esquema 6, se hace reaccionar el nucleósido de partida con ácido levulínico y DCC obteniéndose el correspondiente compuesto diacilado, para a continuación realizar una etapa de hidrólisis enzimática. Así pues, cuando se emplea la lipasa de *Candida antarctica* B (CAL-B) se logra una excelente regioselectividad hacia la posición C5', proporcionando el correspondiente compuesto 3'-*O*-levulinilo. Mientras que si se utiliza la lipasa de *Pseudomonas cepacia* inmovilizada (PSL-C) la regioselectividad cambia hacia la posición C3' y se obtiene el derivado 5'-*O*-levulinilo.



Esquema 6. Preparación de 3'- y 5'-*O*-Lev-dNs mediante hidrólisis enzimática.

Por otra parte, la acilación enzimática regioselectiva es otra forma de sintetizar eficientemente este tipo de compuestos.⁷³ Se realiza en una sola etapa empleando levulinato de acetoxima como agente de acilación y THF como disolvente. La PSL-C y la CAL-B siguen exhibiendo una excelente selectividad hacia las posiciones 3' y 5', respectivamente, aislándose con excelentes rendimientos y regioselectividades los derivados 3'- y 5'-*O*-levulinilo (Esquema 7).

⁷³ a) S. Martínez-Montero, S. Fernández, Y. S. Sanghvi, V. Gotor, M. Ferrero. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 5483-5490. b) S. Martínez-Montero, S. Fernández, Y. S. Sanghvi, V. Gotor, M. Ferrero. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, 9, 5960-5966. c) S. Martínez-Montero, S. Fernández, Y. S. Sanghvi, V. Gotor, M. Ferrero. *J. Org. Chem.* **2010**, 75, 6605-6613. d) S. Martínez-Montero, S. Fernández, T. Rodríguez-Pérez, Y. S. Sanghvi, K. Wen, V. Gotor, M. Ferrero. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 3265-3271. e) J. García, A. Díaz-Rodríguez, S. Fernández, Y. S. Sanghvi, M. Ferrero, V. Gotor. *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 9765-9771. f) J. García, S. Fernández, M. Ferrero, Y. S. Sanghvi, V. Gotor. *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, 14, 3533-3540.



Esquema 7. Preparación de 3'- y 5'-O-Lev-dNs mediante acilación enzimática.

Objetivos

En los antecedentes se ha mostrado la preparación de derivados nucleosídicos selectivamente modificados en 3' y 5' con el grupo levulinilo mediante diferentes métodos. Por otro lado, ha quedado patente la importancia que tiene la aplicación del flujo continuo a distintos procesos químicos y las ventajas que esto supone.

Por estas razones, nos propusimos hacer un estudio comparativo de la acilación enzimática regioselectiva de 2'-desoxinucleósidos. En primer lugar, se optimizarán las condiciones de reacción utilizando procedimientos estándar con agitación orbital (método en discontinuo), para posteriormente desarrollar un proceso en flujo continuo con vistas a su aplicación industrial.

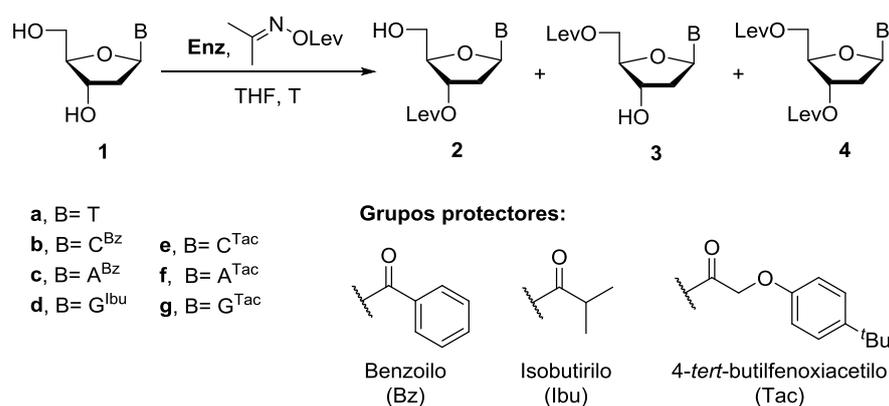
El objetivo principal es el estudio de varias lipasas comerciales inmovilizadas para identificar cuál es la más eficiente y establecer un protocolo para su fácil implementación a gran escala. Se tratará de encontrar una enzima que pueda sustituir a la PSL-C, que se ha dejado de comercializar y que ofrecía excelentes resultados.

También se evaluará la influencia que presenta el grupo protector (GP) sobre la amina de la base exocíclica de los 2'-desoxinucleósidos (dC^{GP} , dA^{GP} , dG^{GP}), así como su impacto sobre la actividad y selectividad de la enzima. Para nuestro estudio se eligió el grupo 4-tert-butilfenoxiacetilo (Tac) como posible alternativa a los grupos protectores convencionales (Bz para dC y dA; Ibu para dG).

Resultados y discusión

1. Esquema general

Como se ha comentado en los antecedentes de este capítulo, la lipasa de *Candida antarctica* B (CAL-B) cataliza selectivamente las reacciones de acilación e hidrólisis de nucleósidos en la posición 5', mientras que la lipasa de *Pseudomonas cepacia*⁷⁴ (PSL) muestra una inusual selectividad hacia el hidroxilo secundario en la posición 3'. El estudio para la acilación enzimática de 2'-desoxinucleósidos se llevó a cabo empleando las dos lipasas inmovilizadas en diferentes soportes, levulinato de acetoxima como agente de acilación y THF como disolvente de la reacción (Esquema 8).



Esquema 8. Esquema general del proceso enzimático de levulinilación.

Se eligieron cuatro tipos diferentes de CAL-B: una de ellas, la Novozym 435 fue adquirida a la compañía Novo Nordisk y está adsorbida sobre una resina Lewait E; las otras tres fueron adquiridas a SPRYNzymes.

⁷⁴ Nota: el nombre correcto sería *Burkholderia cepacia*, pero se sigue utilizando con mayor frecuencia su nombre comercial.

Resultados y discusión

La primera de estas se encuentra adsorbida a una matriz de ésteres metacrílicos, y la denominaremos CAL-B1. La segunda está adsorbida a una resina de poliestireno, que nombraremos como CAL-B2. La tercera lipasa se encuentra inmovilizada covalentemente sobre una resina epoxiacrítica, y le asignaremos el nombre de CAL-B3.

Respecto a la PSL, había mostrado muy buenos resultados la PSL-C, inmovilizada sobre partículas de cerámica, pero que ya no se encuentra disponible comercialmente. Es importante hallar una alternativa y por ello se prueban tres tipos distintos de PSL: la primera es la PSL-IM de Amano, inmovilizada sobre diatomitas; la segunda está adsorbida sobre una resina de poliestireno y nos referiremos a ella como PSL1; y la tercera, que llamaremos PSL2, se encuentra inmovilizada covalentemente sobre una resina epoxiacrítica. Las dos últimas se adquirieron a la empresa SPRIN technologies.

2. Levulinilación enzimática de timidina

En primer lugar, se estudia la acilación de la timidina con las distintas lipasas de *Pseudomonas cepacia* mediante el procedimiento clásico enzimático (método discontinuo) con agitación orbital. Las primeras pruebas se realizaron a 30 °C y con 3 equivalentes del levulinato de acetoxima en THF. Se pudo observar la alta selectividad de las tres enzimas testadas hacia el grupo hidroxilo secundario en posición 3'. Las mejores conversiones se observaron con PSL-IM y PSL1, ya que la conversión máxima para la PSL2 solo fue de un 29% tras 52 h de reacción (entradas 1-3, Tabla 2).

Con el fin de mejorar la conversión, se incrementó la temperatura de reacción. Los resultados con PSL1 a 45 y 60 °C mostraron conversiones similares (69-75%) en comparación con la conversión obtenida a 30 °C, aunque con tiempos de reacción más cortos (entradas 2, 5 y 8, Tabla 2).

Resultados y Discusión

Con la enzima PSL2, la conversión a temperaturas más altas se mejoró ostensiblemente hasta un 60-61% (entradas 6 y 9, Tabla 2). Sin embargo, los mejores resultados se lograron con la PSL-IM (entradas 4 y 7, Tabla 2). Esta lipasa proporcionó una conversión casi completa del 97% después de 19 h a 60 °C y mostró una excelente regioselectividad hacia la formación del derivado 3'-*O*-levulinilo **2a**, encontrándose únicamente trazas de los productos 5'-*O*-acilado **3a** y 3',5'-di-*O*-acilado **4a**.

Tabla 2. Levulinilación enzimática de timidina (**1a**).

Entrada	Enzima	T (°C)	t (h)	Conv. (%) ^a	2a (%) ^a	3a (%) ^a	4a (%) ^a
1	PSL-IM	30	48	74	67	1	6
2	PSL1	30	52	74	67	1	6
3	PSL2	30	52	29	23	2	4
4	PSL-IM	45	48	97	92	1	4
5	PSL1	45	32	75	70	1	4
6	PSL2	45	48	60	53	3	4
7	PSL-IM	60	19	97	94	1	2
8	PSL1	60	26	69	67	1	1
9	PSL2	60	47	61	58	1	2
10	Novozym 435	30	2.5	>99	5	91	4
11	CAL-B1	30	4	85	6	75	4
12	CAL-B2	30	6	89	6	78	5
13	CAL-B3	30	21	97 ^b	5	87	5

^aPorcentaje de los compuestos calculado por HPLC. ^bDespués de 6 h, la reacción alcanzó un 85% de conversión con una formación del 77% hacia **3a**.

Resultados y discusión

La reacción de la timidina con los distintos preparados de CAL-B se desarrolló en condiciones similares al anterior. Todas las enzimas probadas proporcionaron altas conversiones y selectividades en unos tiempos de reacción cortos a una temperatura de 30 °C. La Novozym 435 catalizó la acilación de la posición 5' con una conversión completa en tan solo 2.5 h (entrada 10, Tabla 2). La CAL-B1 y CAL-B2 mostraron una actividad inferior, con una conversión del 85-89%, respectivamente (entradas 11 y 12, Tabla 2). Por otro lado, la CAL-B3 exhibe un comportamiento similar a la Novozym 435, pero la reacción fue ligeramente más lenta. Después de 6 h, la conversión fue del 85% y posteriormente aumentó al 97% en 21 h (entrada 13, Tabla 2). De este modo, la lipasa Novozym 435 demostró ser la más eficaz de entre las cuatro enzimas examinadas, proporcionando un 91% del compuesto deseado 5'-*O*-acilado **3a**.

3. Levulinilación enzimática de *N*⁴-benzoil-2'-desoxicitidina

A continuación, se estudió la acilación de la dC^{Bz} (**1b**) con las diferentes lipasas de *Pseudomonas cepacia*. Como la PSL-IM resultó ser el catalizador más eficaz con la timidina, se examinó primero la levulinilación de **1b** con este enzima a 45 y 60 °C. Al subir la temperatura, aumentó la actividad biocatalítica, con una conversión del 91% tras 27 h de reacción a 60 °C, manteniendo al mismo tiempo una alta selectividad (entrada 1 frente a la entrada 2, Tabla 3).

La reacción de acilación con PSL1 y PSL2 fue totalmente selectiva, aislándose exclusivamente 3'-*O*-Lev-dC^{Bz} (**2b**). Sin embargo, con ambas lipasas se alcanza una conversión máxima del 59 y 47%, respectivamente, tras 24 h, y tiempos de reacción más largos solo originan la hidrólisis del producto acilado (entradas 3 y 4, Tabla 3).

Tabla 3. Levulinilación enzimática de dC^{Bz} (**1b**).

Entrada	Enzima	T (°C)	t (h)	Conv. (%) ^a	2b (%) ^a	3b (%) ^a	4b (%) ^a
1	PSL-IM	45	24	64	62	2	0
2	PSL-IM	60	27	91	88	1	2
3	PSL1	60	24	59	59	0	0
4	PSL2	60	24	47	47	0	0
5	Novozym 435	30	8	96	14	77	5
6	CAL-B1	30	4	71	11	59	1
7	CAL-B2	30	8	71	12	58	1
8	CAL-B3	30	20	90 ^b	15	72	3
9	Novozym 435	45	4	98	9	84	5

^aPorcentaje de los compuestos calculado por HPLC. ^bDespués de 6 h, la reacción alcanzó un 71% de conversión con una formación del 60% hacia **3b**.

Por otra parte, todos los preparados de *Candida antarctica* B mostraron una moderada regioselectividad en la acilación del grupo 5'-hidroxilo (entradas 5-9, Tabla 3). Con Novozym 435 se obtuvo la conversión más alta, catalizando la reacción de acilación de **1b** con una conversión casi completa después de 8 h a 30 °C. Para estudiar la influencia de la temperatura sobre la selectividad del enzima, se realizó el experimento a 45 °C, lo que supuso un tiempo de reacción más corto para alcanzar una conversión del 98%. La relación de **3b** también se elevó hasta el 84% (entrada 9, Tabla 3).

4. Levulinilación enzimática de N⁶-benzoil-2'-desoxiadenosina

Para analizar más a fondo el proceso enzimático, también se han estudiado nucleósidos con base púrica. A la dA^{Bz} (**1c**) se le aplicaron las distintas enzimas de PSL, destacando entre ellas la PSL-IM, que mostró

Resultados y discusión

una selectividad total a 45 °C y proporcionó una conversión máxima del 83% después de 7 h (entrada 1, Tabla 4).

Tabla 4. Levulinilación enzimática de dA^{Bz} (**1c**).

Entrada	Enzima	T (°C)	t (h)	Conv. (%) ^a	2c (%) ^a	3c (%) ^a	4c (%) ^a
1	PSL-IM	45	7	83	83	0	0
2	PSL-IM	60	9	84	78	6	0
3	PSL1	45	7	31	31	0	0
4	PSL2	45	23	36	35	1	0
5	Novozym 435	30	4	97	4	92	1
6	CAL-B1	30	6	41	4	37	0
7	CAL-B2	30	6	30	2	28	0
8	CAL-B3	30	2	68	4	64	0

^aPorcentaje de los compuestos calculado por HPLC.

Esta vez, un incremento de la temperatura de 45 a 60 °C no da como resultado un aumento de la conversión, sino que provoca una disminución en la regioselectividad de la reacción (entrada 2, Tabla 4). PSL1 y PSL2 también mostraron excelentes resultados de regioselectividad en la levulinilación del 3'-hidroxilo; sin embargo, ambas enzimas son menos activas y se obtienen conversiones más bajas en comparación con la PSL-IM (entradas 3 y 4, Tabla 4).

Por el contrario, todas las enzimas de CAL-B demostraron una alta selectividad durante la levulinilación del grupo hidroxilo primario de **1c**. Estos experimentos indicaron que la lipasa Novozym 435 da lugar a mayores conversiones (97%) durante un tiempo de reacción más corto (entrada 5, Tabla 4). En cambio, las reacciones con CAL-B1 y CAL-B2 proporcionaron un 30-41% de conversión (entradas 6 y 7, Tabla 4), mientras que con la CAL-B3 aumentó la conversión hasta el 68% en solo

2 h, pero el proceso no avanza aunque se alargue el tiempo de reacción (entrada 8, Tabla 4).

5. Levulinilación enzimática de *N*²-isobutiril-2'-desoxiguanosina

Cuando se intentó la acilación de la dG^{bu} (**1d**) con todas las PSL los resultados no fueron satisfactorios, probablemente debido a la baja solubilidad que presenta el nucleósido de partida en THF incluso a 60 °C. La PSL-IM dio lugar a una conversión del 33% con una pobre regioselectividad, y en el caso de la PSL1 y PSL2 no se observaron conversiones mayores al 5% después de largos tiempos de reacción.

El cambio de PSL a CAL-B mostró una mejora en el proceso de acilación y provocó un aumento en la velocidad de reacción a pesar de la baja solubilidad del nucleósido en el disolvente.

Los mejores resultados se obtuvieron nuevamente con la Novozym 435, que catalizó la levulinilación selectiva hacia la posición 5' con buena conversión a 30 °C. Después de 4.5 h se observó una conversión del 66%, y tras 22 h se logró un 75% (entrada 1, Tabla 5). El resto de las CAL-B solo fueron activas a tiempos de reacción muy cortos, y tras 2 h de reacción no se logró más de un 33% de conversión (entradas 2-4, Tabla 5).

Adicionalmente, se realizaron experimentos con Novozym 435 con el objetivo de mejorar su eficacia. En primer lugar, se probó a incorporar el enzima en tres porciones a diferentes tiempos, lo que dio como resultado una conversión más baja (entrada 5, Tabla 5). En segundo lugar, se evaluó el impacto de la temperatura, y se observó que el incremento de 30 a 45 °C y, posteriormente, a 60 °C origina un aumento de la conversión hasta el 84%, manteniendo una excelente selectividad (entradas 6 y 7, Tabla 5).

*Resultados y discusión***Tabla 5.** Levulinilación enzimática de dG^{lbu} (**1d**).

Entrada	Enzima	T (°C)	t (h)	Conv. (%) ^a	2d (%) ^a	3d (%) ^a	4d (%) ^a
1	Novozym 435	30	22	75	1	73	1
2	CAL-B1	30	2	19	1	18	0
3	CAL-B2	30	2	10	1	9	0
4	CAL-B3	30	2	33	0	33	0
5	Novozym 435 ^b	30	27	66	1	64	1
6	Novozym 435	45	9	64	0	64	0
7	Novozym 435	60	22	84	3	80	1
8	Novozym 435 ^c	60	22	67	1	65	1

^aPorcentaje de los compuestos calculado por HPLC. ^bEnzima añadido en porciones. ^cConcentración de 0.05M en lugar de 0.1M.

Por último, se estudió la influencia de la concentración. Con la intención de mejorar la solubilidad del nucleósido, este se diluyó en el doble de cantidad de disolvente. Sin embargo, la disminución de la concentración (0.05 M en lugar de 0.1 M) no proporcionó buenos resultados y originó una caída del 17% en la conversión (entrada 8, Tabla 5).

6. Influencia del grupo protector *N-tert*-butilfenoxiacetilo en la solubilidad de los nucleósidos

Los datos obtenidos en el apartado anterior con la dG^{lbu} (**1d**) sugieren que la solubilidad de los nucleósidos desempeña un papel determinante durante el proceso de acilación enzimática.

Una posible vía para aumentar la solubilidad del sustrato es utilizar un grupo protector en el amino exocíclico de la base que sea más hidrófobo, para que pueda disolverse mejor en disolventes orgánicos.

Resultados y Discusión

Entre una variedad disponible de grupos protectores, se eligió el 4-*tert*-butilfenoxiacetilo (Tac, ver Esquema 8) por las siguientes razones:

- El grupo Tac es más hidrófobo que los grupos protectores convencionales Ibu y Bz, por lo que a priori confiere una mayor solubilidad a los nucleósidos correspondientes.
- Bajo condiciones básicas, el grupo Tac se desprotege más rápido que los grupos Ibu y Bz.⁷⁵
- Facilita la síntesis de oligonucleótidos más frágiles, puesto que su ciclo de desprotección es más corto.

Así pues, se sintetizaron los nucleósidos dC, dA y dG protegidos con *N*-Tac siguiendo los protocolos descritos en la bibliografía.⁷⁶ Como cabía esperar, la solubilidad global de los nucleósidos dC^{Tac} (**1e**), dA^{Tac} (**1f**) y dG^{Tac} (**1g**) en THF aumentó con respecto a la de los nucleósidos con grupos protectores convencionales (Figura 18).

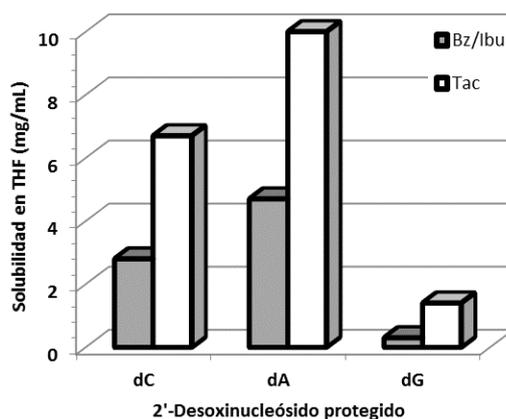


Figura 18. Influencia del grupo protector de la base en la solubilidad a 18 °C.

⁷⁵ H. Vu, C. McCollum, K. Jacobson, P. Theisen, P. Vinayak, E. Spiess, A. Andrus. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 7269-7252.

⁷⁶ N. D. Sinha, P. Davis, N. Usman, J. Perez, R. Hodges, J. Kremsky, R. Casale. *Biochimie* **1993**, *75*, 13-23.

Resultados y discusión

Viendo el importante aumento de la solubilidad que confiere este nuevo grupo protector, se analizó la acilación enzimática de los nucleósidos *N*-Tac protegidos (**1e-g**). Para su estudio se eligió exclusivamente la PSL-IM y la Novozym 435, ya que demostraron ser los mejores catalizadores en todos los procesos optimizados con anterioridad.

7. Levulinilación enzimática de *N*-*tert*-butilfenoxiacetil-2'-desoxinucleósidos

La levulinilación de dC^{Tac} (**1e**), dA^{Tac} (**1f**) y dG^{Tac} (**1g**) con PSL-IM no mostró una mejora significativa con respecto a la levulinilación de dC^{Bz}, dA^{Bz} y dG^{lbu}, aunque sí se observó una excelente regioselectividad para los dos primeros, pese a necesitar tiempos de reacción más largos (entradas 1-2, Tabla 6). En cambio, la levulinilación de dG^{Tac} con PSL-IM proporcionó una baja conversión sin ninguna selectividad, similar al comportamiento que presentaba la dG^{lbu} (entrada 3, Tabla 6).

Tabla 6. Levulinilación enzimática de dN^{Tac} (**1e-g**).

Entrada	Sustrato	Enzima	T (°C)	t (h)	Conv. (%)	2 (%)	3 (%)	4 (%)
1	1e	PSL-IM	45	24	69	69	0	0
2	1f	PSL-IM	45	24	85	84	1	0
3	1g	PSL-IM	60	26	20	11	9	0
4	1e	Novozym 435	30	1	98	0	98	0
5	1f	Novozym 435	30	1	97	4	93	0
6	1g	Novozym 435	30	4	89	0	89	0
7	1g	Novozym 435	45	7	98	1	96	1

^aPorcentaje de los compuestos calculado por HPLC.

Por otra parte, durante la levulinilación de **1e-g** con Novozym 435 se mejoraron tanto las conversiones como las velocidades de reacción, demostrando así la influencia de la solubilidad en el proceso de acilación de los nucleósidos (entradas 4-7, Tabla 6).

La enzima Novozym 435 catalizó la acilación casi cuantitativa de dC^{Tac} (**1e**) hacia el producto 5'-*O*-levulinil protegido **3e** en 1 h, manteniendo una completa regioselectividad, lo que supone una mejora notable en comparación con la acilación de dC^{Bz} catalizada por la misma lipasa.

La acilación de dA^{Tac} también ofreció unos buenos resultados en cuanto a conversión y selectividad, similares a los obtenidos con dA^{Bz} .

Por otra parte, la acilación del nucleósido dG^{Tac} proporciona una conversión del 98% después de 7 h a 45 °C, mientras que la reacción de acilación de dG^{Ibu} solo dio lugar a una conversión máxima del 84% tras 22 h a 60 °C (entrada 7, Tabla 5 vs entrada 7, Tabla 6).

Con los datos obtenidos de los nucleósidos *N*-Tac protegidos, podemos decir que la presencia de este grupo es beneficiosa para el resultado del proceso de acilación mediado por enzimas, proporcionando la selectividad deseada y un rendimiento excelente.

7.1. Elección del disolvente de reacción

Complementariamente, se investigó el impacto de varios disolventes durante la acilación de dG^{Tac} (**1g**) usando la enzima que ofrecía mejores resultados, es decir, la Novozym 435. Así pues, las reacciones se llevaron a cabo a 45 °C y se eligieron los siguientes disolventes alternativos: *N,N*-dimetilformamida (DMF), acetona, 1,4-dioxano, acetonitrilo (MeCN) y *tert*-butilmetil éter (TBME).

Resultados y discusión

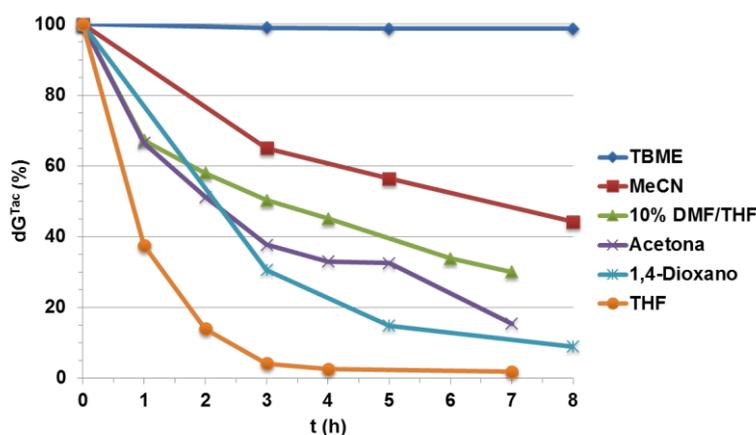


Figura 19. Influencia del disolvente en la acilación de dG^{Tac} con Novozym 435 a $45^{\circ}C$.

Como se puede observar en la Figura 19, ninguno de los disolventes estudiados mejora en conversión a los resultados obtenidos con THF. Se observó que la dG^{Tac} era muy soluble en DMF, pero no se detectó la formación de ningún producto. Este hecho puede ser debido a que la enzima Novozym 435 en DMF no adopta la conformación activa necesaria para dar lugar a la acilación.

Así, se probó un pequeño porcentaje de esta como cosolvente en THF, pues es el disolvente que ofrece los mejores resultados. Sin embargo, el uso de DMF al 10% en THF, aunque sí permitió la instantánea disolución del compuesto y la reacción del mismo, disminuyó considerablemente la velocidad de la reacción.

8. Proceso enzimático en flujo continuo

Con el objetivo de escalar la reacción, se diseñó un proceso mecanizado de flujo continuo en el que se utiliza una columna de vidrio empaquetada con la lipasa, lo que permite la posibilidad de su reciclaje y simplifica el trabajo. Como se observa en la Figura 20B, se hace uso de una bomba electromagnética para la recirculación de la disolución que contiene el nucleósido y el agente de acilación en THF.

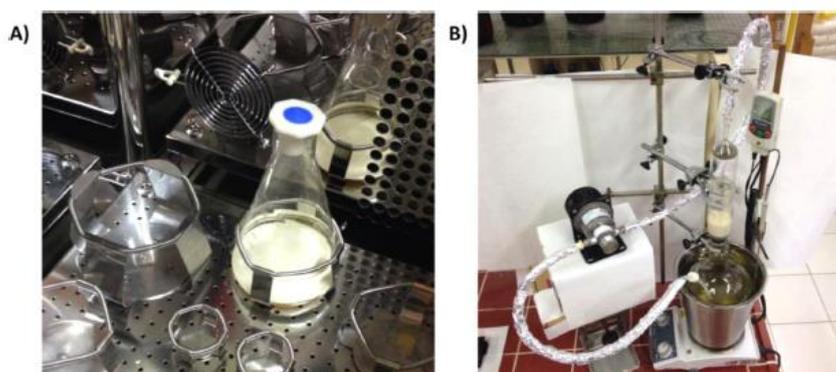


Figura 20. A) Proceso enzimático con agitación orbital. B) Proceso enzimático en flujo continuo.

Con el enfoque puesto en el escalado, es necesario comprender el impacto del agua en el THF utilizado como disolvente. Por tanto, para nuestros estudios se eligieron varios THF con diferentes grados de humedad: THF anhidro comercial (<100 ppm de agua), THF recién destilado sobre sodio y THF comercial de grado analítico (<0,03% de agua). En todos los casos se obtuvieron resultados similares y no se encontraron diferencias significativas en la conversión ni tampoco en la selectividad de las reacciones. De este modo, el disolvente elegido para llevar a cabo el escalado de las reacciones fue el THF de grado analítico, puesto que es el menos costoso al no precisar de ningún tratamiento previo a su utilización.

A continuación, se comparó la levulinilación de la timidina (**1a**) entre el método utilizando agitación orbital y el método en flujo continuo con Novozym 435 en THF comercial de grado analítico. Estos experimentos se realizaron con un gramo del sustrato de partida a una concentración 0.1 M, una relación 1:3 del agente acilante, 1:1 de la lipasa y un flujo de 22 mL/min. Los cromatogramas de HPLC del seguimiento de la reacción revelaron que la regioselectividad del proceso se mantiene también para el método en flujo continuo. La conversión cuantitativa se consiguió en ambos sistemas con excelente regioselectividad, proporcionando el

Resultados y discusión

derivado 5'-*O*-Lev-T (**3a**) con un 74% de rendimiento aislado y 99% de pureza (HPLC) sin necesidad de realizar una cromatografía de columna para su purificación. Si bien, el método en flujo continuo requirió tiempos un poco más largos para completarse la reacción que el método estándar de agitación orbital (Figura 20).

8.1. Reutilización de la enzima

Con el fin de hacer el proceso a gran escala más económico se estudió la posible reutilización de la lipasa. En la configuración del flujo continuo, la reutilización de la lipasa es más fácil y conveniente porque la columna puede usarse tal cual para sucesivas reacciones. De esta manera, se llevaron a cabo cinco ciclos consecutivos, obteniendo las mismas conversiones y selectividades sin tener que manipular la lipasa durante todo el reciclado (Tabla 7).

Tabla 7. Reciclado de la enzima durante la levulinilación de T (**1a**) con Novozym 435 en el proceso de flujo continuo en 6 h.^a

Ciclo	Conv. (%) ^b	1a (%) ^b	2a (%) ^b	3a (%) ^b	4a (%) ^b	Rdto (%) ^c	Pureza (%) ^d
1	>99		4	90	6	74	99
2 ^e	>99		4	90	6	75	99
3 ^e	>99		5	90	5	77	98
4 ^e	99	1	6	89	4	75	98
5 ^e	97	3	5	87	5	72	99

^aLa reacción se llevó a cabo con 1 g de T a 30 °C con una concentración 0.1 M, empleando una proporción 1:3 de agente acilante y 1:1 de la lipasa.

^bPorcentaje de los compuestos calculado por HPLC. ^cRendimientos aislados.

^dCalculado por HPLC. ^eEnzima reciclado a partir del ciclo anterior.

En la Tabla 7 queda patente que no se produce una disminución de la actividad después de 5 ciclos de reciclado, obteniéndose el producto aislado con rendimientos que oscilan entre el 72% y el 77% y manteniendo los mismos tiempos de reacción.

8.2 Levulinilación de 2'-desoxinucleósidos. Escalado de la reacción

Alentados por estos resultados, se aplicó el método en flujo continuo al resto de 2'-desoxinucleósidos a escala de un gramo de sustrato (Tabla 8). Así, la reacción de acilación enzimática de dC^{Bz} (**1b**) proporcionó un 86% del producto 5'-*O*-Lev-dC^{Bz} (**3b**) después de 18 h a 45 °C (entrada 1, Tabla 8).

En el caso de dA^{Bz} (**1c**), la reacción se detuvo después de 1 h con un 72% de conversión y no avanzó más (entrada 2, Tabla 8). Con el objetivo de llevar la reacción a su conversión máxima, se añadieron 1.5 equivalentes del agente acilante al comienzo del experimento y la misma cantidad tras 1 h de reacción. Bajo estas condiciones, el producto precipitó en la mezcla de reacción después de 2 h (entrada 3, Tabla 8), mostrando una conversión del 94% que fue monitorizada por HPLC. El derivado 5'-*O*-Lev **3c** se aisló fácilmente con un rendimiento del 61% y una pureza del 92% mediante una simple filtración y lavado del sólido.

Por otro lado, se observó un alto rendimiento y una excelente regioselectividad durante la acilación de los nucleósidos **1e-g** protegidos con Tac (entradas 4-6, Tabla 8). Al igual que ocurría con el método clásico de agitación orbital, los datos recogidos en la Tabla 8 indican que las conversiones obtenidas con Novozym 435 para dar los productos 5'-*O*-levulinil son mayores en los nucleósidos con el grupo *N*-Tac que en los que presentan los grupos *N*-benzoilo o *N*-isobutirilo.

Tabla 8. Levulinilación de dN^{GP} con Novozym 435 empleando el proceso de flujo continuo.

Entrada	1	T (°C)	t (h)	Conv. (%) ^b	1 (%) ^b	2 (%) ^b	3 (%) ^b	4 (%) ^b	Rdto (%) ^c	Pureza (%) ^d
1	dCBz	45	18	97	3	8	86	3	65	96
2	dABz	30	1-4	72	28	<4	68	<1		
3 ^e	dABz	30	2	94	6	8	85	<1	61	92
4	dCTac	30	3	98	2	0	98	0	89	98
5	dATac	30	1.5	97	3	4	93	0	87	93
6	dGTac	45	10	90	10	1	88	1	74	97

^aLa reacción se llevó a cabo con 1 g de dN a una concentración 0.1 M, empleando una proporción 1:3 de agente acilante y 1:1 de la lipasa. ^bPorcentaje de los compuestos calculado por HPLC. ^cRendimientos aislados. ^dCalculado por HPLC. ^e1.5 equiv de agente acilante al inicio y 1.5 equiv después de 1 h de reacción.

Como se resume en la Figura 21, se obtuvieron conversiones similares durante el proceso enzimático clásico en discontinuo (con agitación orbital) y el proceso enzimático en flujo continuo. En cambio, la productividad global se mejoró durante los experimentos en continuo, dada la facilidad de trabajo con este sistema de reacción y la capacidad de reutilizar la enzima en varios ciclos.

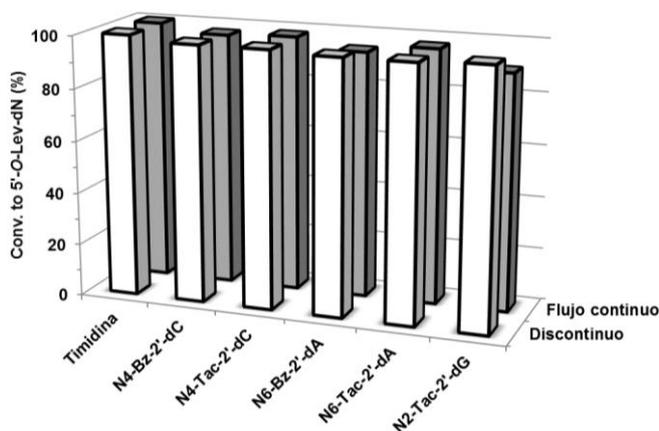


Figura 21. Comparación de procesos enzimáticos clásicos (agitación orbital) y de flujo continuo.

Para demostrar una mayor escalabilidad del método en flujo continuo, se sintetizó 5'-O-Lev-T (**3a**) en una escala de 10 g de sustrato de partida. El procedimiento se llevó a cabo con una relación T:enzima de 1:0.5 (p/p) en lugar de la 1:1 que se empleó a menor escala. Se obtuvieron resultados idénticos con la mitad de enzima, la reacción se completó también en 6 h y proporcionó el producto deseado con un rendimiento del 75% y una pureza del 99% (HPLC). Además, el exceso de agente acilante se recuperó y se recicló para minimizar el coste del proceso. Por último, se aumentó aún más la escala de la reacción hasta los 25 g de timidina, aislándose **3a** con un rendimiento del 94% y una pureza del 97%. Una purificación adicional por cristalización dió lugar al producto deseado con un rendimiento aislado del 70% y una pureza del 99% mediante HPLC.

Conclusiones

Se han sintetizado una serie de análogos 3'- y 5'-*O*-levulinilnucleósidos que suponen una importante demanda para la preparación de oligonucleótidos o de medicamentos basados en dichos compuestos.

Para ello, se ha desarrollado un procedimiento práctico, eficiente y a la vez sostenible basado en una reacción de acilación enzimática regioselectiva, empleando tanto el método tradicional con agitación orbital, como un método alternativo en flujo continuo para una posible implementación a nivel industrial.

Se estudió, por primera vez, la influencia que ejerce el grupo protector de la nucleobase en el proceso de acilación enzimática, observándose que tiene un efecto en la solubilidad del compuesto. Este hecho pone de manifiesto la importancia que presenta la solubilidad del nucleósido de partida, ya que un incremento de esta se traduce en una mayor reactividad. De este modo, la protección de la base con el grupo protector hidrófobo 4-*tert*-butilfenoxiacetilo proporcionó un excelente rendimiento en la obtención de nucleósidos protegidos selectivamente en la posición 5', con unos tiempos de reacción más cortos que si se utilizan los grupos protectores convencionales: benzoilo e isobutirilo.

También se demostró la robustez del proceso en flujo continuo, escalando la reacción hasta 25 g del sustrato de partida y manteniendo los buenos resultados que se obtuvieron a pequeña escala. Además, se mostró la facilidad de reutilizar la enzima debido al uso de un equipo de laboratorio simple que incluye una columna de vidrio empaquetada con la lipasa. Por otra parte, se recuperó el exceso de agente acilante.

Parte experimental

1. Condiciones de trabajo, disolventes y reactivos

Los disolventes fueron adquiridos a Merck, Prolabo y Panreac. Todos aquellos utilizados en las reacciones fueron sometidos previamente a un tratamiento de secado y destilados bajo atmósfera inerte. El THF, el TBME y el 1,4-dioxano se refluieron sobre hilos de sodio utilizando benzofenona como indicador. En cambio, el MeCN se refluó sobre hidruro cálcico, la DMF sobre óxido de bario y la acetona sobre Drierite (97% de CaSO₄ y 3% de CoCl₂).

La lipasa de *Candida antarctica* B (CAL-B) Novozym 435 (9120 PLU/g) ha sido adquirida a la compañía Novo Nordisk y está adsorbida en una resina Lewait E. Las lipasas de *C. antarctica* B, CAL-B1 (matriz: polímero DVD entrecruzado con base de ésteres metacrílicos, 10855 PLU/g), CAL-B2 (matriz: resina entrecruzada de poliestireno DVD, 7320 PLU/g) y CAL-B3 (matriz: resina acrílica, 2632 PLU/g) fueron adquiridas a SPRIN Technologies.

La lipasa de *Pseudomonas cepacia* inmovilizada sobre diatomitas (PSL-IM, 943 U/g) ha sido adquirida a Amano Enzyme, mientras que las lipasas de *Pseudomonas cepacia*, PSL1 (matriz: resina entrecruzada de poliestireno DVD, 229 U/g) y PSL2 (matriz: resina acrílica, 159 PLU/g) fueron adquiridas a SPRIN Technologies.

Los nucleósidos utilizados fueron proporcionados por la empresa Rasayan Inc. (Encinitas, CA, EE.UU.), mientras que el levulinato de

Parte experimental

acetoxima fue proporcionado por Sapala Organics Pvt. Ltd. (Hyderabad, India).

Los reactivos utilizados en la síntesis química de los compuestos diacilados como el ácido levulínico, la Et₃N, la DCC y la DMAP, fueron suministrados por Aldrich.

El seguimiento de las reacciones enzimáticas y el cálculo de los porcentajes de cada compuesto en el crudo de reacción se han realizado mediante HPLC (cromatógrafo HP 1100) a 254 nm. Se han empleado distintas columnas con un relleno de gel de sílice y diferentes eluyentes. Los métodos utilizados se describen a continuación:

- Acilación de la timidina (**1a**). Columna Lichrosorb Si 60 10 μm (15 x 0.46 cm); eluyente 5% MeOH/CH₂Cl₂; flujo 0.8 mL/min. Los tiempos de retención son: **1a** = 12.2; **2a** = 4.3; **3a** = 5.2; **4a** = 3.4 min.
- Acilación de dC^{Bz} (**1b**). Columna Spherisorb W 5 μm (25 x 0.46 cm); eluyente 4% MeOH/CH₂Cl₂ 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: **1b** = 23.1; **2b** = 10.4; **3b** = 17.3; **4b** = 7.3 min.
- Acilación de dA^{Bz} (**1c**). Columna Mediterranea Sea C18 5 μm (25 x 0.46 cm); eluyente 30% MeCN/H₂O 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: **1c** = 3.6; **2c** = 6.7; **3c** = 5.7; **4c** = 9.9 min.
- Acilación de dG^{Ibu} (**1d**). Columna Mediterranea Sea C18 5 μm (25 x 0.46 cm); 30% MeCN/H₂O 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: **1d** = 3.3; **2d** = 5.9; **3d** = 5.2; **4d** = 8.3 min.

- Acilación de dC^{Tac} (**1e**). Columna Mediterranea Sea C18 5 μ m (25 x 0.46 cm); eluyente 30% MeCN/H₂O 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: **1e** = 12.6; **2e** = 17.1; **3e** = 16.2; **4e** = 20.1 min.
- Acilación de dA^{Tac} (**1f**). Columna Mediterranea Sea C18 5 μ m (25 x 0.46 cm); eluyente 30% MeCN/H₂O 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: **1f** = 12.4; **2f** = 17.2; **3f** = 15.8; **4f** = 20.7 min.
- Acilación de dG^{Tac} (**1g**). Columna Mediterranea Sea C18 5 μ m (25 x 0.46 cm); eluyente 30% MeCN/H₂O 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: **1g** = 11.7; **2g** = 16.1; **3g** = 14.9; **4g** = 18.5 min.

Las cromatografías en capa fina (*Thin Layer Chromatography*, TLC) se realizaron en placas de aluminio cubiertas con gel de sílice 60 Å de 0.25 mm de espesor y con un revelador de ultravioleta incorporado (F₂₅₄), comercializadas por Merck. Los reveladores utilizados fueron el de *p*-anisaldehído (disolución de 2.5% de *p*-anisaldehído, 3% de ácido sulfúrico y 1% de ácido acético en etanol) o KMnO₄ (1% de KMnO₄, 5% de K₂CO₃ y un 5% de NaOH).

Para las cromatografías de columna se empleó gel de sílice 60 Å (230-400 mesh) comercializado por Merck. Como eluyentes se utilizaron mezclas de disolventes en las proporciones que se indican en los procedimientos experimentales.

2. Técnicas instrumentales

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) monodimensionales así como las correlaciones homonucleares (COSY, NOESY) y heteronucleares (HMBC, HSQC) se realizaron en los equipos de Bruker DPX-300 y AV-300 (^1H 300.13 MHz y ^{13}C 75.5 MHz). Se usaron como disolventes cloroformo, metanol y dimetilsulfóxido deuterados. Los desplazamientos químicos (δ) están expresados en partes por millón (ppm) referidos a la señal residual del disolvente. Las constantes de acoplamiento (J) se expresan en Hertzios (Hz). Las abreviaturas empleadas para indicar la multiplicidad de las señales son las siguientes: s, singulete; sa, singulete ancho; d, doblete; dd, doble doblete; t, triplete; dt, doble triplete; q, cuatriplete; m, multiplete.

Los espectros de masas (EM) se realizaron por la técnica de ionización de electrospray (ESI^+) o por ionización química (APCI^+ , nitrógeno como gas portador) en un espectrómetro Hewlett-Packard 1100 HPLC/EM (Agilent Technologies). Los espectros de masas de alta resolución (EMAR) se realizaron en un espectrómetro Bruker MicroTofQ por ESI^+ .

Los espectros de infrarrojo (IR) se adquirieron en un espectrómetro Varian 1000 FT-IR o en un espectrómetro FT-IR Paragon 1000 (Perkin Elmer), empleando pastillas de KBr para las muestras sólidas o ventanas de NaCl para los líquidos y aceites. Los valores indicados se refieren a ν_{max} y se expresan en cm^{-1} .

3. Procedimientos experimentales

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

Una suspensión del correspondiente nucleósido **1** (0.2 mmol), levulinato de acetoxima (0.6 mmol) y la lipasa en THF anhidro (2 mL) se agita a 250 rpm 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. La temperatura y el tiempo de reacción se indican en las tablas de la sección de resultados y discusión de este capítulo. Las reacciones se siguen por TLC (10% MeOH/CH₂Cl₂) y se monitorizan por HPLC. Una vez terminada la reacción, se filtra la enzima y se lava con CH₂Cl₂ y MeOH. A continuación, se concentran los disolventes a vacío y el residuo se lava con Et₂O para eliminar el exceso de éster de oxima. Finalmente, el crudo de reacción se purifica, si es necesario, por cromatografía flash al 5% MeOH/CH₂Cl₂.

3.2. Síntesis de los 5'-*O*-levulinil-2'-desoxinucleósidos 3a-g empleando un proceso en flujo continuo

A una disolución 0.1 M de **1** (1 g) en THF (comercial de grado analítico sin tratamiento previo, <0,03% de contenido de agua) se añade levulinato de acetoxima (3 equiv). La mezcla se hace pasar mediante una bomba electromagnética (flujo de 22 mL/min) a través de una columna de vidrio de 1.8 cm de diámetro con placa porosa (porosidad 0 correspondiente a un tamaño de poro nominal de 160-250 μm) cargada con 1 g de Novozym 435 hasta conversión completa (véase las Tablas 7 y 8 para temperaturas y tiempos de reacción). A continuación, el disolvente se concentra a vacío y el residuo se lava con Et₂O para eliminar el exceso de éster de oxima. Se requiere una extracción con NaHCO₃(aq)/CH₂Cl₂ si se observan restos del nucleósido de partida, excepto en la acilación de **1e**, **1f**

Parte experimental

y **1g**, que no se pudo eliminar el nucleósido sin reaccionar del crudo de reacción. Para la purificación de cada compuesto a esta escala, se diseñaron distintos protocolos:

- *Purificación de 5'-O-Lev-T (3a)*. El residuo se disuelve en CH₂Cl₂ y a la disolución se añade éter frío (4 °C). Se deja precipitar durante toda la noche en la nevera. El sólido se filtra y se lava con éter para aislar **3a** con un rendimiento del 72-75% y un 99% de pureza por HPLC.
- *Purificación de 5'-O-Lev-dC^{Bz} (3b)*. El residuo se recrystaliza en MeOH para dar **3b** con un 65% de rendimiento y una pureza del 96% medida por HPLC (se observa el derivado 3'-O-Lev).
- *Purificación de 5'-O-Lev-dA^{Bz} (3c)*. El crudo se obtiene con un 61% de rendimiento y un 92% de pureza por HPLC, siendo necesaria una columna cromatográfica (5% MeOH/CH₂Cl₂) para obtener una pureza >99%.
- *Purificación de 5'-O-Lev-dC^{Tac} (3e)*. Con el procedimiento general se obtiene el producto **3e** con 89% de rendimiento y un 98% de pureza por HPLC. Para eliminar las trazas del sustrato de partida y alcanzar una pureza >99% es necesaria una cromatografía de columna (5% *i*PrOH/ CH₂Cl₂).
- *Purificación de 5'-O-Lev-dA^{Tac} (3f)*. Al igual que el producto anterior, es necesaria una cromatografía de columna (5% *i*PrOH/ CH₂Cl₂) para eliminar los restos del sustrato de partida y el derivado 3'-acilado.
- *Purificación de 5'-O-Lev-dG^{Tac} (3g)*. El residuo se vierte sobre MeOH y la disolución lechosa se deja precipitar en la nevera. El sólido se filtra, obteniéndose **3g** con un rendimiento del 74% y una pureza del 97%, medida por HPLC.

3.3. Síntesis de 5'-*O*-levuliniltimidina **3a** a gran escala empleando un proceso en flujo continuo

Se sigue un procedimiento similar al indicado en el apartado 3.2., excepto que se utiliza una relación timidina:enzima de 1:0.5 (p/p).

3.4. Síntesis de 3',5'-*O*-levulinil-2'-desoxinucleósidos **4a-g**

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

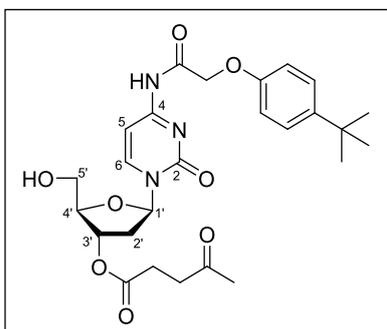
Sobre una mezcla bajo nitrógeno y en agitación de **1** (2 mmol) en Et₃N anhidra (1.7 mL, 12 mmol) y 1,4-dioxano anhidro (20 mL), se añade LevOH (1.21 g, 10.4 mmol), DCC (2.14 g, 10.4 mmol) y DMAP (20 mg, 0.16 mmol). La reacción se mantiene agitando a temperatura ambiente y se sigue por TLC (10% MeOH/CH₂Cl₂), hasta la desaparición del producto de partida **1**. Una vez finalizada la reacción, se filtra el crudo en placa y se evaporan los disolventes a presión reducida. El residuo resultante se extrae con NaHCO₃(aq)/CH₂Cl₂ y la fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄ anhidro y se filtra. Los disolventes se eliminan por destilación a presión reducida. Finalmente, el sólido obtenido se lava con Et₂O frío. Si el sólido presenta alguna impureza, este se purifica mediante una recristalización en AcOEt, aislándose los 3',5'-*O*-levulinil-2'-desoxinucleósidos **4a-g**.

4. Datos experimentales

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

Los siguientes derivados ya han sido previamente descritos: **2a** y **2d**,⁷² **2b** y **2c**,^{73f} **3a – 3d** y **4a – 4d**.⁷²

***N*⁴-(4-*tert*-Butilfenoxiacetil)-3'-*O*-levulinil-
-2'-desoxicitidina (2e)**



Sólido blanco

R_f: 0.44 (MeOH/CH₂Cl₂).

P_f: 135-137 °C.

Fórmula molecular: C₂₆H₃₃N₃O₈

Masa Molecular: 515.56 g/mol

IR (KBr): ν 3054, 2985, 2305, 1720, 1665 y 1555 cm⁻¹.

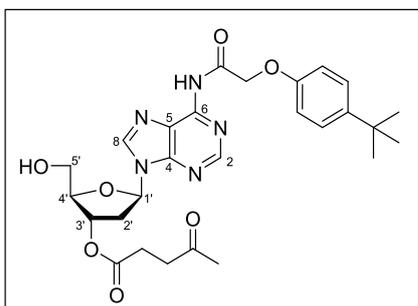
¹H-RMN (300.13 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.23 (s, 9H, *Me*-*t*Bu), 2.11 (s, 3H, *Me*-Lev), 2.20 (m, 1H, H_{2'}), 2.40 (m, 1H, H_{2'}), 2.50 (t solapado con la señal del DMSO, 2H, CH₂-Lev), 2.74 (t, 2H, CH₂-Lev, ³*J*_{HH} 6.4 Hz), 3.62 (m, 2H, H_{5'}), 4.08 (s, 1H, H_{4'}), 4.78 (s, 2H, CH₂-O), 5.19 (d, 1H, H_{3'}, ³*J*_{HH} 6.0 Hz), 6.13 (dd, 1H, H_{1'}, ³*J*_{HH} 7.7 Hz, ³*J*_{HH} 6.0 Hz), 6.83 (d, 2H, Ph, ³*J*_{HH} 8.9 Hz), 7.16 (d, 1H, H₅, ³*J*_{HH} 7.5 Hz), 7.29 (d, 2H, Ph, ³*J*_{HH} 8.9 Hz), 8.34 (d, 1H, H₆, ³*J*_{HH} 7.5 Hz) y 11.00 (sa, 1H, NH) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ 27.8 (CH₂-Lev), 29.5 (CH₃-Lev), 31.3 (CH₃-*t*Bu), 33.8 (C_{cuat}-*t*Bu), 37.4 (CH₂-Lev), 38.2 (C_{2'}), 61.1 (C_{5'}), 66.7 (CH₂O), 74.8 (C_{3'}), 85.6 (C_{4'}), 86.4 (C_{1'}), 95.6 (C₅), 113.9 (CH-Ph), 126.2 (CH-Ph), 143.4 (C_{ipso}), 145.3 (C₆), 154.3 (C₂), 155.4 (C_{ipso}), 162.0 (C₄), 169.4 (N-C=O), 172.0 (O-C=O) y 206.9 (C=O) ppm.

EM (ESI⁺, *m/z*): 516 [(M+H)⁺, 100%].

Parte experimental

**N⁶-(4-*tert*-Butilfenoxiacetil)-3'-O-levulinil-
-2'-desoxiadenosina (2f)**



Sólido blanco

R_f: 0.45 (5% MeOH/CH₂Cl₂)

P_f: 67-69 °C

Fórmula molecular: C₂₇H₃₃N₅O₇

Masa Molecular: 539.59 g/mol

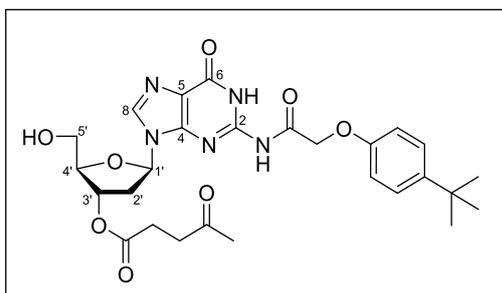
IR (KBr): ν 3054, 2965, 2306, 1740, 1719, 1613 y 1588 cm⁻¹.

¹H-RMN (300.13 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.21 (s, 9H, *Me*-*t*Bu), 2.11 (s, 3H, *Me*-Lev), 2.52 (t, 2H, CH₂-Lev, ³J_{HH} 6.0 Hz + 1H_{2'} solapado), 2.74 (t, 2H, CH₂-Lev, ³J_{HH} 6.0 Hz), 2.98 (m, 1H, H_{2'}), 3.60 (m, 2H, H_{5'}), 4.07 (m, 1H, H_{4'}), 4.97 (s, 2H, CH₂-O), 5.17 (sa, 1H, OH), 5.35 (d, 1H, H_{3'}, ³J_{HH} 6.0 Hz), 6.44 (dd, 1H, H_{1'}, ³J_{HH} 2.2 Hz, ³J_{HH} 6 Hz), 6.85 (d, 2H, Ph, ³J_{HH} 8.8 Hz), 7.27 (d, 2H, Ph, ³J_{HH} 8.8 Hz), 8.66 y 8.70 (2s, 2H, H₂ y H₈) y 10.90 (sa, 1H, NH) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ 27.7 (CH₂-Lev), 29.6 (CH₃-Lev), 31.3 (CH₃-*t*Bu), 33.8 (C_{cuat}-*t*Bu), 36.6 (C_{2'}), 37.5 (CH₂-Lev), 61.5 (C_{5'}), 67.3 (CH₂O), 75.0 (C_{3'}), 83.9 (C_{1'}), 85.4 (C_{4'}), 114.1 (CH-Ph), 123.4 (C_{5'}), 126.1 (CH-Ph), 142.9 (C₈), 143.3 (C_{ipso}), 149.1 (C₄), 151.5 (C₆), 151.7 (C₂), 155.6 (C_{ipso}), 167.5 (N-C=O), 172.0 (O-C=O) y 207.0 (C=O) ppm.

EM (ESI⁺, *m/z*): 541 [(M+H)⁺, 100%].

***N*²-(4-*tert*-Butilfenoxiacetil)-3'-*O*-levulinil-
-2'-desoxiguanosina (2g)**



Sólido blanco

***R*_f**: 0.6 (MeOH/CH₂Cl₂)

***P*_f**: 117-119 °C

Fórmula molecular: C₂₇H₃₃N₅O₈

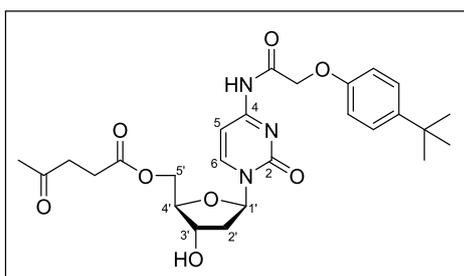
Masa Molecular: 555.59 g/mol

IR (KBr): ν 3473, 3100, 2958, 1713, 1685, 1608 y 1573 cm⁻¹.

¹H-RMN (300.13 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.23 (s, 9H, *Me*^{-t}Bu), 2.11 (s, 3H, *Me*-Lev), 2.47 (m, 1H, H_{2'}), 2.50 (t solapado con la señal del DMSO, 2H, CH₂-Lev), 2.77 (t, 2H, CH₂-Lev, ³*J*_{HH} 6.3 Hz), 2.86 (m, 1H, H_{2'}), 3.58 (m, 2H, H_{5'}), 4.02 (m, 1H, H_{4'}), 4.81 (s, 2H, CH₂-O), 5.11 (t, 1H, OH, ³*J*_{HH} 5.3 Hz), 5.29 (d, 1H, H_{3'}, ³*J*_{HH} 5.5 Hz), 6.21 (dd, 1H, H_{1'}, ³*J*_{HH} 5.7 Hz, ³*J*_{HH} 8.8 Hz), 6.87 (d, 2H, Ph, ³*J*_{HH} 8.8 Hz), 7.29 (d, 2H, Ph, ³*J*_{HH} 8.8 Hz), 8.27 (s, 1H, H₈) y 11.81 (sa, 2H, NH) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ 27.7 (CH₂-Lev), 29.6 (*Me*-Lev), 31.3 (CH₃-^tBu), 33.8 (C-^tBu), 36.6 (C_{2'}), 37.4 (CH₂-Lev), 61.4 (C_{5'}), 66.3 (CH₂O), 75.0 (C_{3'}), 83.0 (C_{1'}), 85.2 (C_{4'}), 114.0 (CH-Ph), 120.4 (C₅), 126.2 (CH-Ph), 137.6 (C₈), 143.6 (C_{ipso}), 147.4 (C₂), 148.4 (C₄), 154.9 (C₆), 155.4 (C_{ipso}), 171.2 (N-C=O), 172.0 (O-C=O) y 207.0 (C=O) ppm.

EM (ESI⁺, *m/z*): 556 [(M+H)⁺, 100%].

*Parte experimental****N*⁴-(4-*tert*-Butilfenoxiacetil)-5'-*O*-levulinil-
-2'-desoxicitidina (3e)**

Sólido blanco

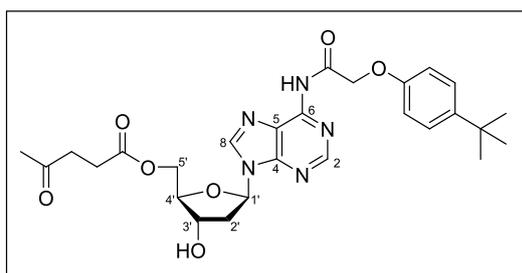
R*_f**: 0.4 (5% MeOH/CH₂Cl₂)P*_f**: 88-90 °C**Fórmula molecular:** C₂₆H₃₃N₃O₈**Masa Molecular:** 515.56 g/mol**IR** (KBr): ν 3054, 2986, 2305, 1720, 1664, 1667 y 1555 cm⁻¹.

¹H-RMN (300.13 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.23 (s, 9H, *Me*-*t*Bu), 2.08 (m, 4H, H_{2'} + *Me*-Lev), 2.31 (m, 1H, H₂), 2.46 (t solapado con la señal del DMSO, 2H, CH₂-Lev), 2.70 (t, 2H, CH₂-Lev, ³*J*_{HH} 6.3 Hz), 4.03 (m, 1H, H_{4'}), 4.20 (m, 3H, H_{3'} + 2H_{5'}), 4.78 (s, 2H, CH₂-O), 5.44 (sa, 1H, OH), 6.12 (t, 1H, H_{1'}, ³*J*_{HH} 6.3 Hz), 6.83 (d, 2H, Ph, ³*J*_{HH} 8.8 Hz), 7.16 (d, 1H, H₅, ³*J*_{HH} 7.4 Hz), 7.28 (d, 2H, Ph, ³*J*_{HH} 8.9 Hz), 8.11 (d, 1H, H₆, ³*J*_{HH} 7.4 Hz) y 10.98 (sa, 1H, NH) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ 27.5 (CH₂-Lev), 29.5 (*Me*-Lev), 31.3 (CH₃-*t*Bu), 33.8 (*C*-*t*Bu), 37.4 (CH₂-Lev), 39.3 (C_{2'}), 63.9 (C_{5'}), 66.6 (CH₂O), 70.1 (C_{3'}), 84.5 (C_{4'}), 86.4 (C_{1'}), 95.6 (C₅) 113.9 (CH-Ph), 126.1 (CH-Ph), 143.7 (C_{ipso}), 145.1 (C₆), 154.2 (C₂), 155.4 (C_{ipso}), 161.9 (C₄), 169.3 (N-C=O), 172.2 (O-C=O) y 206.8 (C=O) ppm.

EM (ESI⁺, *m/z*): 516 [(M+Na)⁺, 100%].

***N*⁶-(4-*tert*-Butilfenoxiacetil)-5'-*O*-levulinil-
-2'-desoxiadenosina (3f)**



Sólido blanco

R_f: 0.35 (5% MeOH/CH₂Cl₂)

P_f: 64-66 °C

Fórmula molecular: C₂₇H₃₃N₅O₇

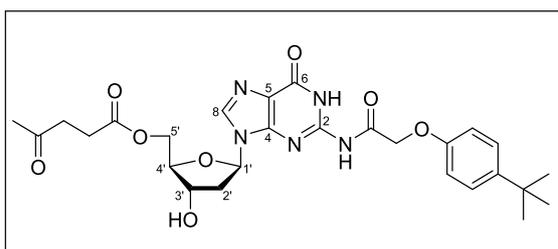
Masa Molecular: 539.59 g/mol

IR (KBr): ν 3054, 2986, 2306, 1740, 1718, 1613 y 1588 cm⁻¹.

¹H-RMN (300.13 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.21 (s, 9H, *Me*-*t*Bu), 2.04 (s, 3H, *Me*-Lev), 2.34 (m, 1H, H_{2'}), 2.40 (m, 2H, CH₂-Lev), 2.64 (t, 2H, CH₂-Lev, ³*J*_{HH} 6.8 Hz), 2.86 (dt, 1H, H₂, ²*J*_{HH} 13.04 Hz, ³*J*_{HH} 6.4 Hz), 3.99 (m, 1H, H_{4'}), 4.12 (dd, 1H, H_{5'}, ²*J*_{HH} 11.7 Hz, ³*J*_{HH} 6.0 Hz), 4.25 (dd, 1H, H_{5'}, ²*J*_{HH} 11.7 Hz, ³*J*_{HH} 4.1 Hz), 4.48 (m, 1H, H_{3'}), 4.96 (s, 2H, CH₂-O), 5.51 (sa, 1H, OH), 6.44 (t, 1H, H_{1'}, ³*J*_{HH} 6.5 Hz), 6.85 (d, 2H, Ph, ³*J*_{HH} 8.8 Hz), 7.27 (d, 2H, Ph, ³*J*_{HH} 8.9 Hz), 8.63 y 8.65 (2s, 2H, H₂+H₈) y 10.88 (sa, 1H, NH) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ 27.5 (CH₂-Lev), 29.5 (*Me*-Lev), 31.3 (CH₃-*t*Bu), 33.8 (*C*-*t*Bu), 37.4 (CH₂-Lev), 38.5 (C_{2'}), 64.0 (C_{5'}), 67.3 (CH₂O), 70.5 (C_{3'}), 83.6 (C_{1'}), 84.3 (C_{4'}), 114.0 (CH-Ph), 123.5 (C₅), 126.1 (CH-Ph), 143.1 (C₈), 143.3 (C_{ipso}), 149.0 (C₄), 151.4 (C₆), 151.7 (C₂), 155.6 (C_{ipso}), 167.5 (N-C=O), 172.2 (O-C=O) y 206.8 (C=O) ppm.

EM (ESI⁺, *m/z*): 577 [(M+Na)⁺, 100%].

*Parte experimental****N*²-(4-*tert*-Butilfenoxiacetil)-5'-*O*-levulinil-
-2'-desoxiguanosina (3g)**

Sólido blanco

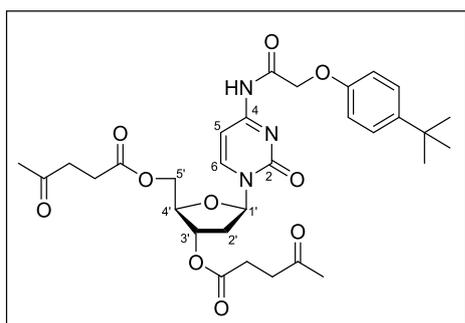
Pf: 88-91 °C***R_f***: 0.5 (10% MeOH/CH₂Cl₂)**Fórmula molecular**: C₂₇H₃₃N₅O₈**Masa Molecular**: 555.59 g/mol**IR** (KBr): ν 3474, 3101, 2958, 1713, 1685, 1608 y 1573 cm⁻¹.

¹H-RMN (300.13 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.21 (s, 9H, *Me*-*t*Bu), 2.06 (s, 3H, *Me*-Lev), 2.35 (m, 1H, H₂), 2.46 (t solapado con la señal del DMSO, 2H, CH₂-Lev), 2.66 (t, 2H, CH₂-Lev, ³*J*_{HH} 6.3 Hz + 1H_{2'} solapado), 3.96 (m, 1H, H_{4'}), 4.10 (dd, 1H, H_{5'}, ²*J*_{HH} 11.8 Hz, ³*J*_{HH} 5.9 Hz), 4.21 (dd, 1H, H_{5'}, ²*J*_{HH} 11.8 Hz, ³*J*_{HH} 4.1 Hz), 4.41 (sa, 1H, H_{3'}), 4.81 (s, 2H, CH₂-O), 5.47 (d, 1H, OH, ³*J*_{HH} 3.4 Hz), 6.21 (t, 1H, H_{1'}, ³*J*_{HH} 6.6 Hz), 6.87 (d, 2H, Ph, ³*J*_{HH} 8.8 Hz), 7.28 (d, 2H, Ph, ³*J*_{HH} 8.8 Hz), 8.18 (s, 1H, H₈) y 11.77 (sa, 2H, NH) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ 27.5 (CH₂-Lev), 29.6 (*Me*-Lev), 31.3 (CH₃-*t*Bu), 33.8 (C-*t*Bu), 37.4 (CH₂-Lev), 38.9 (C_{2'}), 64.0 (C_{5'}), 66.4 (CH₂O), 70.4 (C_{3'}), 83.0 (C_{1'}), 84.2 (C_{4'}), 114.0 (CH-Ph), 120.6 (C₅), 126.2 (CH-Ph), 137.8 (C₈), 143.6 (C_{ipso}), 147.3 (C₆), 148.2 (C₄), 154.9 (C₂), 155.4 (C_{ipso}), 171.1 (N-C=O), 172.2 (O-C=O), 206.8 (C=O) ppm.

EM (ESI⁺, *m/z*): 556 [(M+Na)⁺, 100%].

***N*⁴-(4-*tert*-Butilfenoxiacetil)-3',5'-di-*O*-levulinil-
-2'-desoxicitidina (4e)**



Sólido blanco

***R*_f**: 0.54 (5% MeOH/CH₂Cl₂)

***P*_f**: 54-56 °C

Fórmula molecular: C₃₁H₃₉N₃O₁₀

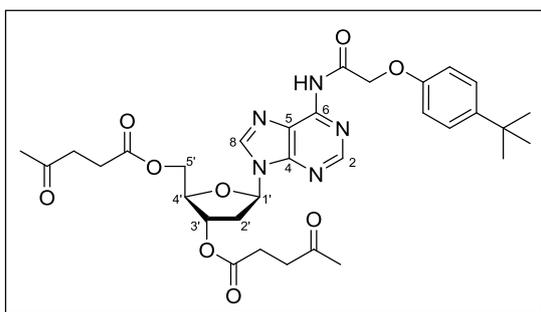
Masa Molecular: 613.26 g/mol

IR (KBr): ν 3054, 2985, 2305, 1741, 1719, 1667 y 1555 cm⁻¹.

¹H-RMN (300.13 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.22 (s, 9H, *Me*-*t*Bu), 2.06 (s, 3H, *Me*-Lev), 2.09 (s, 3H, *Me*-Lev), 2.31 (dt, 1H, H_{2'}, ²*J*_{HH} 14.3 Hz, ³*J*_{HH} 6.8 Hz), 2.48 (m, 5H, H_{2'} + 2CH₂-Lev), 2.72 (dt, 4H, 2CH₂-Lev, ²*J*_{HH} 12.3 Hz, ³*J*_{HH} 6.4 Hz), 4.26 (m, 3H, H_{4'}+2H_{5'}), 4.78 (s, 2H, CH₂-O), 5.18 (d, 1H, H_{3'}, ³*J*_{HH} 6.0 Hz), 6.12 (t, 1H, H_{1'}, ³*J*_{HH} 6.8 Hz), 6.82 (d, 2H, Ph, ²*J*_{HH} 8.7 Hz), 7.19 (d, 1H, H₅, ³*J*_{HH} 7.4 Hz), 7.29 (d, 2H, Ph, ³*J*_{HH} 8.7 Hz), 8.12 (d, 1H, H₆, ³*J*_{HH} 7.4 Hz) y 11.01 (sa, 1H, NH) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ 27.5 (CH₂-Lev), 27.7 (CH₂-Lev), 29.5 (*Me*-Lev), 31.3 (CH₃-*t*Bu), 33.8 (C-*t*Bu), 37.4 (CH₂-Lev + C_{2'}), 63.7 (C_{5'}), 66.7 (CH₂O), 74.3 (C_{3'}), 82.2, (C_{4'}), 86.8 (C_{1'}), 95.8 (C₅), 113.9 (CH-Ph), 126.1 (CH-Ph), 143.4 (C_{ipso}), 145.2 (C₆), 154.2 (C₂), 155.4 (C_{ipso}), 162.1 (C₄), 169.3 (N-C=O), 172.0 (O-C=O), 172.2 (O-C=O) y 206.9 (C=O) ppm.

EM (ESI⁺, *m/z*): 614 [(M+Na)⁺, 100%].

*Parte experimental***N⁶-(4-*tert*-Butilfenoxiacetil)-3',5'-di-*O*-levulinil-
-2'-desoxiadenosina (4f)**

Sólido blanco

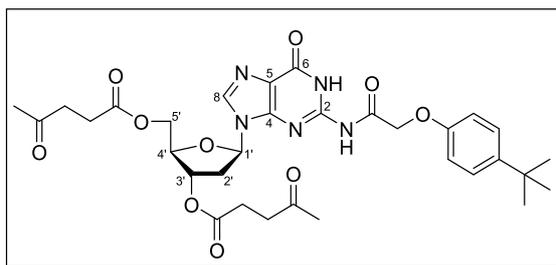
R_f: 0.5 (5% MeOH/CH₂Cl₂)**P_f**: 61-63 °C**Fórmula molecular:** C₃₂H₃₉N₅O₉**Masa Molecular:** 637.69 g/mol**IR** (KBr): ν 3054, 2985, 2306, 1740, 1718, 1613 y 1586 cm⁻¹.

¹H-RMN (300.13 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.21 (s, 9H, *Me*-^{*t*}Bu), 2.04 (s, 3H, *Me*-Lev), 2.10 (s, 3H, *Me*-Lev), 2.43 (m, 2H, *CH*₂-Lev), 2.51 (t, 2H, *CH*₂-Lev, ³*J*_{HH} 6.4 Hz), 2.57 (m, 1H, H_{2'}), 2.65 (t, 2H, *CH*₂-Lev, ³*J*_{HH} 6.8 Hz), 2.74 (t, 2H, *CH*₂-Lev, ³*J*_{HH} 6.4 Hz), 3.14 (m, 1H, H_{2'}), 4.23 (m, 3H, H_{4'}+2H_{5'}), 4.96 (s, 2H, *CH*₂-O), 5.38 (m, 1H, H_{3'}), 6.45 (dd, 1H, H_{1'}, ³*J*_{HH} 7.9 Hz, ³*J*_{HH} 6.2 Hz), 6.85 (d, 2H, Ph, ³*J*_{HH} 8.8 Hz), 7.27 (d, 2H, Ph, ³*J*_{HH} 8.9 Hz), 8.66 y 8.67 (2s, 2H, H₂+H₈) y 10.91 (sa, 1H, NH) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ 27.5 (*CH*₂-Lev), 27.7 (*CH*₂-Lev), 29.5 (*Me*-Lev), 29.6 (*Me*-Lev), 31.3 (*CH*₃-^{*t*}Bu), 33.8 (*C*-^{*t*}Bu), 35.4 (*C*₂), 37.4 (*CH*₂-Lev), 37.5 (*CH*₂-Lev), 63.6 (*C*_{5'}), 67.3 (*CH*₂O), 74.3 (*C*_{3'}), 81.8 (*C*_{4'}), 83.8 (*C*_{1'}), 114.1 (*CH*-Ph), 123.5 (*C*₅), 126.1 (*CH*-Ph), 143.1 (*C*₈), 143.3 (*C*_{ipso}), 149.1 (*C*₄), 151.5 (*C*₆), 151.8 (*C*₂), 155.6 (*C*_{ipso}), 167.5 (N-C=O), 172.05 (O-C=O), 172.11 (O-C=O), 206.8 (C=O) y 206.9 (C=O) ppm.

EM (ESI⁺, *m/z*): 639 [(M + Na)⁺, 100%].

***N*²-(4-*tert*-Butilfenoxiacetil)-3',5'-di-*O*-levulinil-
-2'-desoxiguanosina (4g)**



Sólido blanco

*P*_f: 75-77 °C

*R*_f: 0.75 (10% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₃₂H₃₉N₅O₁₀

Masa Molecular: 653.27 g/mol

IR (KBr): ν 3326, 2928, 2050, 1700, 1626 y 1574 cm⁻¹.

¹H-RMN (300.13 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.25 (s, 9H, *Me*-*t*Bu), 2.08 (s, 3H, *Me*-Lev), 2.10 (s, 3H, *Me*-Lev), 2.50 (m solapado con la señal del DMSO, 5H, H_{2'}+2CH₂-Lev), 2.70 (t, 2H, CH₂-Lev, ³*J*_{HH} 6.4 Hz), 2.77 (t, 2H, CH₂-Lev, ³*J*_{HH} 6.4 Hz), 2.99 (m, 1H, H_{2'}), 4.22 (m, 3H, H_{4'}+2H_{5'}), 4.83 (s, 2H, CH₂-O), 5.30 (d, 1H, H_{3'}, ³*J*_{HH} 5.6 Hz), 6.25 (dd, 1H, H_{1'}, ³*J*_{HH} 8.5 Hz, ³*J*_{HH} 5.9 Hz), 6.90 (d, 2H, Ph, ³*J*_{HH} 8.8 Hz), 7.30 (d, 2H, Ph, ³*J*_{HH} 8.8 Hz), 8.25 (s, 1H, H₈) y 11.82 (sa, 2H, NH) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ 27.5 (CH₂-Lev), 27.7 (CH₂-Lev), 29.5 (*Me*-Lev), 29.6 (*Me*-Lev), 31.3 (CH₃-*t*Bu), 33.8 (C-*t*Bu), 35.6 (C_{2'}), 37.37 (CH₂-Lev), 37.43 (CH₂-Lev), 63.6 (C_{5'}), 66.3 (CH₂O), 74.5 (C_{3'}), 81.7 (C_{4'}), 83.1 (C_{1'}), 114.0 (CH-Ph), 120.7 (C₅), 126.2 (CH-Ph), 137.7 (C₈), 143.6 (C_{ipso}), 147.4 (C₂), 148.4 (C₄), 154.9 (C₆), 155.4 (C_{ipso}), 171.1 (N-C=O), 172.1 (O-C=O), 172.2 (O-C=O), 206.8 (C=O) y 207.0 (C=O) ppm.

EM (ESI⁺, *m/z*): 654 [(M+Na)⁺, 100%].

Capítulo 2

*Síntesis quimioenzimática de (–)-Muscarina
y (+)-allo-Muscarina*

Antecedentes

A.1. Importancia de los metabolitos secundarios

Desde el inicio de la química orgánica en el siglo XIX, los productos naturales han adquirido una gran trascendencia para los químicos orgánicos, debido a que muchos de estos compuestos, que se aislaban de las plantas, resultaron ser potentes fármacos. De hecho, existen gran cantidad de productos naturales cuyo descubrimiento se remonta muchos años atrás y que siguen utilizándose en la actualidad en el campo de la medicina. Un ejemplo es la morfina, el primer producto natural aislado en 1817 por Sertürner, que a día de hoy se sigue utilizando como analgésico.⁷⁷ También la quinina y la artemisinina son compuestos que se conocen desde la medicina tradicional, donde hoy en día se utilizan para curar la malaria.⁷⁸

Durante el siglo XX la síntesis de productos naturales pasó a ser el principal objetivo de la química orgánica. Gracias al desarrollo de técnicas analíticas como la espectrometría de masas, el infrarrojo y la resonancia magnética nuclear, que revolucionaron en la década de los cincuenta la elucidación de las estructuras, así como el desarrollo de nuevas metodologías sintéticas, hicieron posible la preparación de compuestos

⁷⁷ F. Sertürner. *Ann. Phys.* **1817**, *55*, 56-89.

⁷⁸ a) J. Achan, A. O. Talisuna, A. Erhart, A. Yeka, J. K. Tibenderana, F. N. Baliraine, P. J. Rosenthal, U. D'Alessandro. *Malar. J.* **2011**, *10*, 144-156. b) H. Kalotka-Kreglewska. *Cent. Eur. J. Immunol.* **2011**, *36*, 100-103. c) C. J. Woodrow, R. K. Haynes, S. Krishna. *Postgrad. Med. J.* **2005**, *81*, 71-78.

Antecedentes

estructuralmente muy complejos, entre los que destacan la estricnina,⁷⁹ la cobalamina/vitamina B₁₂⁸⁰ y la palitoxina.⁸¹

Los productos naturales de fuentes biológicas, principalmente de las plantas más conocidas, han sido investigados a fondo por su contenido en metabolitos secundarios. En consecuencia, los científicos comenzaron a explotar el potencial de los metabolitos secundarios de hongos y bacterias cultivables, lo que condujo entre otras cosas al descubrimiento de potentes antibióticos como las penicilinas.⁸²

Los organismos fúngicos sintetizan una amplia gama de metabolitos secundarios, que debido a sus propiedades químicas y biológicas, tienen gran importancia biotecnológica, comercial y económica.⁸³ Por eso, no es de extrañar que la mayoría de los medicamentos descubiertos en los últimos años deriven de estos organismos,⁸⁴ a pesar de que los nuevos métodos para el diseño de fármacos, que no dependen de las fuentes naturales, sean cada vez más importantes.

En un sentido amplio, un producto natural es un compuesto que se origina en la naturaleza. En un sentido más restrictivo, un producto natural solo es un metabolito secundario. Por lo tanto, hablaremos aquí de productos naturales refiriéndonos fundamentalmente a estos metabolitos secundarios como moléculas que no son necesarias para el crecimiento y la reproducción de las plantas, pero que cumplen funciones muy importantes en el reino vegetal.

⁷⁹ R. B. Woodward, M. P. Cava, W. D. Ollis, A. Hunger, H. U. Daeniker, K. Schenker. *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*, 4749-4751.

⁸⁰ R. B. Woodward. *Pure Appl. Chem.* **1973**, *33*, 145-178.

⁸¹ E. M. Suh, Y. Kishi. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 11205-11206.

⁸² A. Fleming. *Br. J. Exp. Pathol.* **1929**, *10*, 226-236.

⁸³ S. Gutiérrez, J. Casqueiro, J. F. Martín. *Rev. Iberoam. Micol.* **2000**, *17*, S54-S60.

⁸⁴ D. J. Newman, G. M. Cragg. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 311-335.

A.2. Relevancia de las síntesis totales de productos naturales

Hoy en día, se estima que el número total de especies de hongos excede en gran medida al número de especies de plantas. Hasta el momento, se han descrito aproximadamente 100.000 especies de hongos; sin embargo, datos recientes estiman que el número total podría ser superior a 5 millones de especies.⁸⁵ Actualmente, en el mercado se encuentran disponibles unos 40 fármacos que derivan de metabolitos fúngicos,⁸⁶ entre los que destacan distintos derivados de la penicilina, que revolucionaron el tratamiento de muchas enfermedades infecciosas.⁸⁷

Como se ha puesto de manifiesto en el apartado anterior, los productos naturales pueden obtenerse de las distintas especies de hongos o de otros recursos naturales. No obstante, en muchos casos, estos productos naturales solamente están disponibles en cantidades limitadas de su fuente natural o bien tienen una escasa accesibilidad. Por estas razones, con frecuencia se requiere la síntesis total de los productos naturales para realizar diversas pruebas de su bioactividad.

Un ejemplo ilustrativo es el ácido acromélico A (Figura 22), una molécula altamente neuroexcitatoria que ha generado mucho interés como herramienta para estudios biológicos. Su abundancia natural en las especies fúngicas de *Clitocybe acromelalga* es tan baja que se requieren hasta 16 kg de estos hongos para aislar 110 µg del producto natural.⁸⁸ Debido a esto, ha sido necesaria una ruta sintética para suministrar suficiente material y llevar a cabo los estudios pertinentes.⁸⁹

⁸⁵ M. Blackwell. *Am. J. Bot.* **2011**, *98*, 426-438.

⁸⁶ A. M. Beekman, R. A. Barrow. *Aust. J. Chem.* **2014**, *67*, 827-843.

⁸⁷ M. Wainwright. *Fungal Biology Rev.* **2008**, *22*, 97-102

⁸⁸ K. Konno, H. Shirahama, T. Matsumoto. *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 939-942.

⁸⁹ a) H. Nakagawa, T. Sugahara, K. Ogasawara. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 4523-4526.
b) H. Ouchi, A. Asahina, T. Asakawa, M. Inai, Y. Hamashima, T. Kan. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 1980-1983.

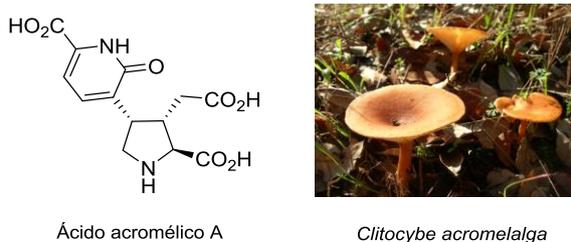


Figura 22. Estructura química del ácido acromélico A y su fuente natural.

A.3. Tipos de productos naturales. Alcaloides

Los productos naturales podrían clasificarse de manera genérica en las siguientes clases de compuestos: terpenoides, alcaloides y compuestos fenólicos.⁹⁰

Los alcaloides son una gran familia de más de 15.000 metabolitos secundarios y aunque no existe una definición exacta, se les pueden considerar como compuestos orgánicos de origen natural (generalmente vegetal), nitrogenados, derivados generalmente de aminoácidos, de carácter más o menos básico y con propiedades farmacológicas importantes a dosis bajas.⁹¹ La mayoría son compuestos heterocíclicos nitrogenados, aunque algunos son alifáticos, como la creatina (Figura 23).

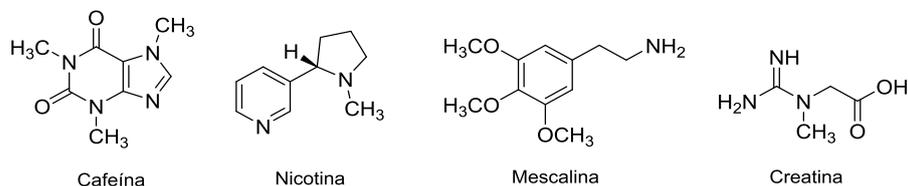


Figura 23. Ejemplos de los distintos tipos de alcaloides.

⁹⁰ J. N. Kabera, E. Semana, A. R. Mussa, X. He. *J. Pharm. Pharmacol.* **2014**, 2, 337-392.

⁹¹ W. C. Evans. *Trease and Evans Pharmacognosy*, 15th edn. (Ed); W. B. Saunders, Edinburgh, 2000, pp 407-413.

Dentro de los alcaloides, los derivados muscarínicos presentan una actividad biológica importante, por lo que ha seducido a los químicos durante muchos años y ha tenido una notable influencia en los esfuerzos por descubrir nuevos fármacos.⁹²

Los alcaloides de la muscarina se aislaron primero de la *Amanita muscaria*, un hongo que se encuentra en los bosques de pino y en algunas especies de setas venenosas (Figura 24),⁹³ principalmente como estereoisómeros del principio tóxico (+)-(2*S*,4*R*,5*S*)-muscarina (**5**, Figura 25).



Figura 24. *Amanita muscaria*, fuente natural de la (+)-muscarina.

El compuesto **5** ha generado mucho interés debido a su potente y específica actividad colinérgica,⁹⁴ es decir, el grado de función de las sinapsis o terminaciones nerviosas en las que la acetilcolina actúa como neurotransmisor. Además, puede causar una profunda activación psicodélica (alteración de la conciencia) y en dosis altas puede causar la muerte. Como esta molécula presenta tres centros estereogénicos, son posibles ocho estereoisómeros (Figura 25).⁹⁵

⁹² Z. Jin. *Nat. Prod. Rep.* **2013**, *30*, 869-915.

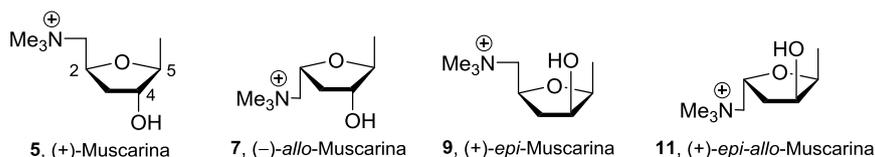
⁹³ C. H. Eugster, P. G. Waser. *Experientia* **1954**, *10*, 298-300.

⁹⁴ a) D. J. Triggle, C. R. Triggle. *Ligands Active at Cholinergic Receptors*, in *Chemical Pharmacology of the Synapse*, Academic Press, New York, **1976**, pp 315-335. b) R. Dahlbom. *Stereoselectivity of Cholinergic and Anticholinergic Agents*, in *Stereochemistry and Biological Activity of Drugs*, (Ed); E. J. Ariens, Blackwell Scientific, Oxford, 1983, pp 127-142.

⁹⁵ a) P. G. Waser. *Pharmacol. Rev.* **1961**, *13*, 465-515. b) S. Wilkinson. *Q. Rev. Chem. Soc.* **1961**, *15*, 153-171.

Antecedentes

Natural: Configuración (2*S*)



No natural: Configuración (2*R*)

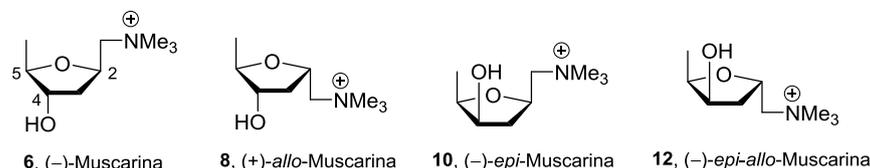


Figura 25. Lista de diastereoisómeros naturales y no naturales de alcaloides muscarínicos.

La preparación de homólogos de muscarina continúa generando interés debido a sus altos niveles de actividad.⁹⁶ La atracción por esta clase de compuestos se debe a su selectividad hacia receptores muscarínicos en el cerebro y al descubrimiento de su actividad en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas tales como el Parkinson o el Alzheimer y otros trastornos cognitivos.

A.4. Síntesis de derivados muscarínicos

La muscarina (**5**) ha tenido una tremenda influencia en la medicina, la farmacología y la química. Desde su descubrimiento por Schmiedeberg y Koppe en 1869,⁹⁷ se han esbozado innumerables síntesis de **5** y el interés continúa en la actualidad.

⁹⁶ a) B. Reck, P. Spiteller. *Synthesis* **2015**, 47, 2885-2911. b) G. Shapiro, D. Benchler, S. Henet. *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 5733-5736. c) G. Fronza, C. Fuganti, P. Grasseli. *Tetrahedron Lett.* **1978**, 19, 3941-3942.

⁹⁷ O. Schmiedeberg, R. Koppe. *Das Muscarin, das giftige Alkaloid des Fliegenpilzes*. In: F. C. W. Vogel (Ed:); Leipzig, **1869**.

En general, las síntesis descritas en la bibliografía son limitadas en versatilidad, siendo específicas para una única molécula concreta. Suelen requerir múltiples etapas de reacción en las que se utilizan costosos reactivos o materiales de partida, y donde el rendimiento suele ser bastante bajo dada la elevada complejidad que le confieren los tres estereocentros para obtener la isomería deseada.^{95a,98}

A continuación, se exponen algunos ejemplos de las síntesis de dos diastereoisómeros de la (+)-muscarina, centrándonos específicamente en los dos que se desarrollan dentro del apartado de resultados y discusión de este capítulo: la (-)-muscarina (**6**) y la (+)-*allo*-muscarina (**8**).

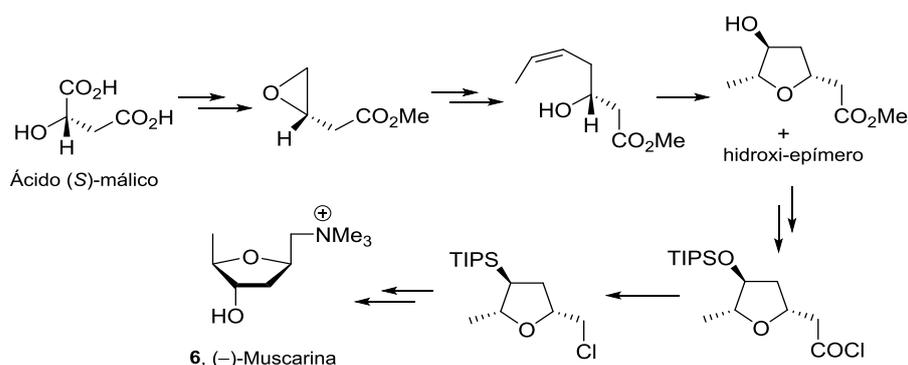
A.4.1. Síntesis de (-)-muscarina

En una de las síntesis descritas en la bibliografía se aplica una metodología de ciclación estereoselectiva como etapa clave en la obtención de la (-)-muscarina (Esquema 9).⁹⁹ Así, partiendo del ácido (*S*)-málico, este se convierte de manera eficiente en el (*S*)-3,4-epoxibutanoato de metilo utilizando el método de Larchevêque, que consiste en la preparación de β,γ -epoxiésteres enantioméricamente puros a partir de la apertura quimioselectiva de β -hidroxibutanolidas y posterior ciclación.

A continuación, la alquilación del epóxido obtenido con propino de litio bajo las condiciones de Yamaguchi-Hirao genera un alcohol homopropargílico, que tras una reducción de Lindlar proporciona el (*R,Z*)-3-hidroxihept-5-enoato de metilo. Por último, una ciclación mediada por yodo da lugar al derivado de tetrahidrofurano como mezcla epimérica.

⁹⁸ J. Boukouvalas, I.-I. Radu. *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 2971-2973.

⁹⁹ D. W. Knight, D. E. Shaw, E. R. Staples. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**. 1973-1982.



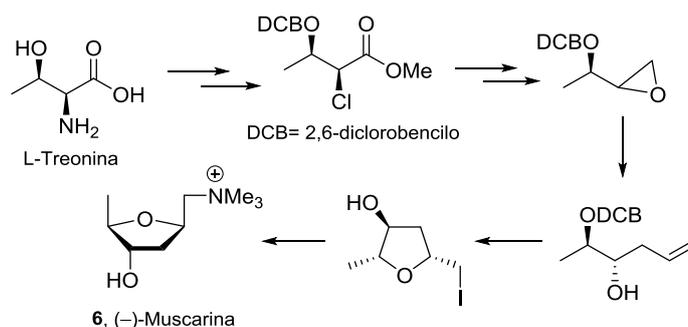
Esquema 9. Síntesis de la (-)-muscarina propuesta por Knight y col. a partir del ácido (S)-málico.

Una vez que se logra separar el furano deseado, se protege el alcohol, se saponifica el éster con hidróxido de potasio y se transforma el ácido resultante en el cloruro de acilo. Finalmente, la descarboxilación/halogenación de Barton-Hunsdiecker y la sustitución por trimetilamina condujeron al producto deseado. El derivado (-)-**6** se obtuvo con un 14% de rendimiento global tras doce etapas de reacción.

Otra síntesis para la obtención del mismo derivado es la descrita por Amouroux y col.¹⁰⁰ En este caso, el material de partida es uno de los 20 aminoácidos esenciales, la L-treonina (Esquema 10).

La primera etapa consiste en la transformación de la L-treonina en el ácido 3-cloro-2-hidroxi-butanoico, manteniendo la misma configuración, empleando un tratamiento con nitrito de sodio en ácido clorhídrico. A continuación, tienen lugar las siguientes secuencias de reacción: metilación del ácido carboxílico, protección selectiva del alcohol con 2,6-diclorobencilo (DCB) y la reducción del grupo éster a alcohol.

¹⁰⁰ R. G. Amouroux, B. Gerin, M. Chastrette. *Tetrahedron* **1985**, 41, 5321-5324.



Esquema 10. Síntesis de la (-)-muscarina realizada por Amouroux y col. a partir de L-treonina.

La clorhidrina obtenida después de esta secuencia se transforma en el correspondiente epoxiéter, que tras una apertura regioselectiva empleando bromuro de vinilmagnesio en presencia de CuI conduce a la formación del hexenodiol protegido del Esquema 10. La ciclación con yodo en MeCN proporciona la configuración *cis* del yoduro de tetrahidrofurano, que al tratarlo con un exceso de trietilamina en metanol proporciona la (-)-muscarina tras un total de 8 etapas de reacción y un 15% de rendimiento global.

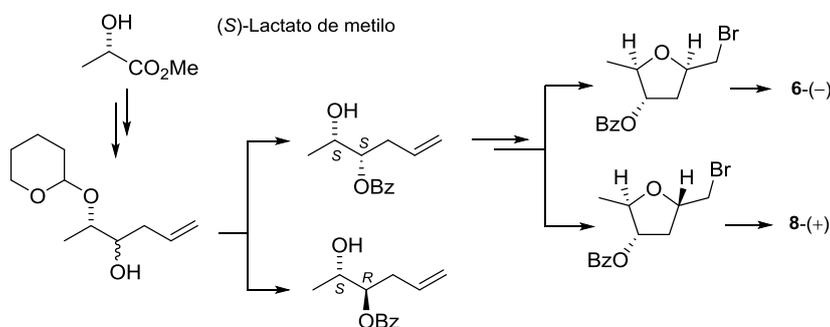
Otro método de ciclación para originar **6** y otros derivados fue el descrito por Hartung y Kneuer en 2003.¹⁰¹ Partiendo del (*S*)-lactato de metilo se lleva a cabo la protección del alcohol con el grupo tetrahidropiran-2-ilo, una reducción con DIBAL y una posterior alquilación de Grignard, lo que conduce a la formación del alcohol homoalílico como mezcla de diastereoisómeros (Esquema 11). Después de la protección de la mezcla diastereomérica con cloruro de benzoilo, se separan los dos diastereoisómeros mediante HPLC.

A continuación, el intermedio deseado se transforma en el correspondiente derivado de tiazoltiona, que tras someterse a condiciones de ciclación fotoquímica genera la mezcla diastereomérica del derivado de

¹⁰¹ J. Hartung, R. Kneuer. *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, 14, 3019-3031.

Antecedentes

tetrahidrofurano. Se separan ambos isómeros y la síntesis se continua con el compuesto (2*R*,3*S*,5*R*) que se detalla en el esquema. Para finalizar, son necesarias dos etapas adicionales en las que se desprotege el grupo benzoilo y se sustituye el halógeno por el grupo trimetilamonio. En definitiva, se consigue aislar (-)-**6** en 11 etapas y un rendimiento global del 4.2% (Esquema 11).



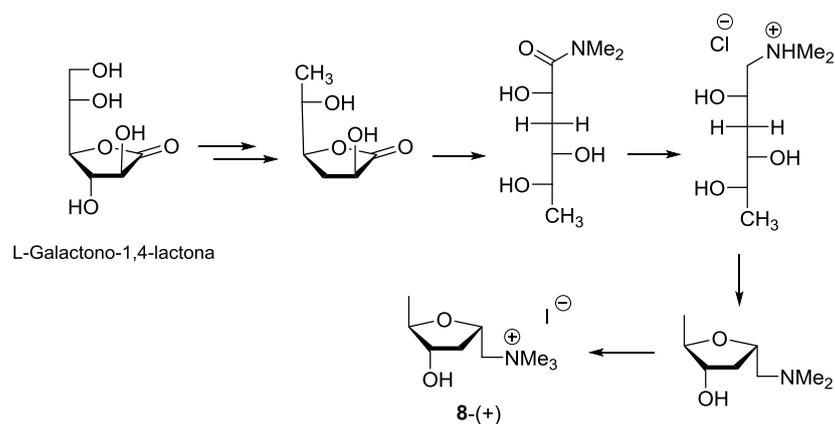
Esquema 11. Síntesis de derivados muscarínicos a partir del (*S*)-lactato de metilo.

A.4.2. Síntesis de (+)-*allo*-muscarina

Como se describe en el Esquema 11, los autores emplean la misma estrategia sintética para la preparación de la (+)-*allo*-muscarina. La diferencia radica en que para la obtención de **8**, una vez que se obtiene la mezcla diastereomérica de tetrahidrofuranos, se prosigue la síntesis con el derivado (2*R*,3*S*,5*S*). Así pues, se obtiene el producto deseado con un rendimiento mayor del 5.1%.

Otro ejemplo que se detalla a continuación es la síntesis desarrollada por Norrild y Pedersen.¹⁰² A partir de la L-galactono-1,4-lactona se obtiene en tres etapas la 3,6-didesoxigalactono-1,4-lactona que se muestra en el Esquema 12, donde la reacción de esta con dimetilamina en metanol forma el derivado de hexanoamida correspondiente.

¹⁰² J. C. Norrild, C. Pedersen. *Synthesis* **1997**, 1128-1130.



Esquema 12. Síntesis de la (+)-*allo*-muscarina a partir de la L-galactono-1,4-lactona.

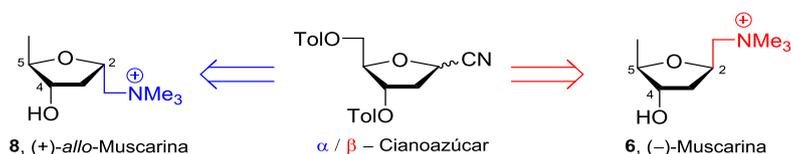
La consiguiente reducción de la hexanoamida con borano y dimetilsulfóxido en 1,4-dioxano proporciona el hidrocloreto de dimetilamino, que tras reaccionar con HF y ácido fórmico da lugar a la (+)-*allo*-normuscarina, es decir, el precursor del producto final con el grupo amino dimetilado. Por último, mediante una nueva alquilación con MeI en Et₂O se consigue obtener la (+)-*allo*-muscarina **8**, con un rendimiento final del 28% y necesitando un total de 7 etapas de reacción.

Objetivos

En los antecedentes se ha puesto de manifiesto la importancia que presentan los distintos análogos de la muscarina en campos como la química y la medicina. La combinación de la actual demanda creciente y la disponibilidad limitada de los derivados muscarínicos de fuentes naturales, ha obligado a la búsqueda de nuevas rutas sintéticas a partir de carbohidratos y no carbohidratos. Por tanto, en este capítulo nos planteamos como objetivo el diseño de una estrategia sintética quimioenzimática eficiente para la preparación de dos estereoisómeros: la (-)-muscarina y la (+)-allo-muscarina, ya que a diferencia de la (+)-muscarina, existen pocas síntesis descritas para la obtención de estos dos compuestos, siendo en general síntesis relativamente largas y con bajos rendimientos.

Resultados y discusión

Para la preparación de los análogos (-)-muscarina (**6**) y (+)-*allo*-muscarina (**8**), se eligieron como materiales de partida un β -cianoazúcar y un α -cianoazúcar, respectivamente (Esquema 13). Las razones por las que se optó por estos cianoazúcares son las siguientes: i) se pueden sintetizar fácilmente a partir de la 2'-desoxirribosa en pocas etapas de reacción;¹⁰³ ii) los centros quirales necesarios están predefinidos en la 2'-desoxirribosa; iii) el cianoazúcar está comercialmente disponible a gran escala.



Esquema 13. Retrosíntesis de los derivados (-)-muscarina y (+)-*allo*-muscarina.

Dada la experiencia previa de nuestro grupo de investigación en la hidrólisis regioselectiva enzimática de análogos nucleosídicos,^{71,104} se empleará dicho método para la desprotección selectiva del grupo toluoilo que está en el hidroxilo primario. Este es un paso importante y establece el escenario para las posteriores transformaciones que conducirán a la formación de los derivados muscarínicos.

¹⁰³ a) J. Kawakami, Z.-M. Wang, H. Fujiki, S. Izumi, N. Sugimoto. *Chem. Lett.* **2004**, 33, 1554-1555. b) K. Utimoto, Y. Wakabayashi, T. Horie, M. Inoue, Y. Shishiyama, M. Obayashi, H. Nozaki. *Tetrahedron* **1983**, 39, 967-973.

¹⁰⁴ A. Carnero, Y. S. Sanghvi, V. Gotor, S. Fernández, M. Ferrero, *Org. Process Res. Dev.* **2015**, 19, 701-709.

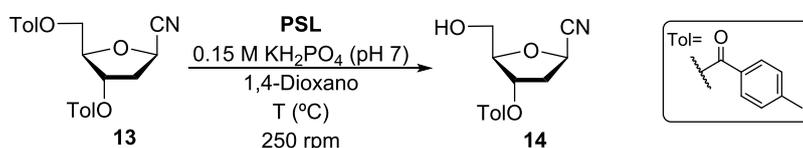
1. Síntesis de (-)-muscarina

1.1. Hidrólisis enzimática

Para llevar a cabo la desprotección del grupo hidroxilo primario, se realiza un estudio con las diferentes lipasas disponibles: *Candida antarctica* A, *Candida antarctica* B, *Pseudomonas cepacia*, *Thermomyces lanuginosus* y *Pseudomonas fluorescens*.

Cuando se emplearon tanto la CAL-A como la CAL-B, no se observó nada de conversión del sustrato de partida. En cambio, las otras enzimas seleccionadas mostraron una selectividad total hacia la hidrólisis del éster en la posición C5, siendo la PSL la enzima que ofreció mejores resultados en cuanto a conversión y velocidad de reacción.

Así pues, cuando se trató el compuesto protegido 3,5-di-*O*-toluilo **13** con el preparado enzimático no inmovilizado de *Pseudomonas cepacia* PSL-SD (2:1 p/p con respecto a **13**) en una disolución tampón fosfato 0.15 M (pH 7) y 18% de 1,4-dioxano a temperaturas de 30, 45 y 60 °C, los espectros de ¹H RMN indicaron la formación del éster 3-*O*-toluilo **14** como único producto, demostrando así la total selectividad que presenta dicha lipasa (Esquema 14).



Esquema 14. Hidrólisis enzimática regioselectiva del β-cianoazúcar **13**.

El aumento de la temperatura de 30 a 45 °C reduce el tiempo de reacción hasta llegar a la conversión completa, por lo que tras 14 h a 45 °C todo el sustrato de partida se consume y el producto deseado **14** se aísla con un 95% de rendimiento (Figura 26). El cambio de 45 a 60 °C no supone una mejora significativa en la velocidad de reacción.

Con vistas a su posible aplicación industrial, se lleva a cabo este proceso con la lipasa de *Pseudomonas cepacia* inmovilizada en tierra de diatomeas (PSL-IM). El seguimiento de la reacción indica que son necesarias 24 h a 45 °C para que se consuma el sustrato de partida, obteniéndose el compuesto deseado con un 94% de rendimiento. La proporción de enzima utilizado fue la misma, 2:1 (p/p) de lipasa respecto al material de partida, pero al estar inmovilizada presenta menos unidades por gramo, lo que explica que el tiempo de reacción sea más largo.

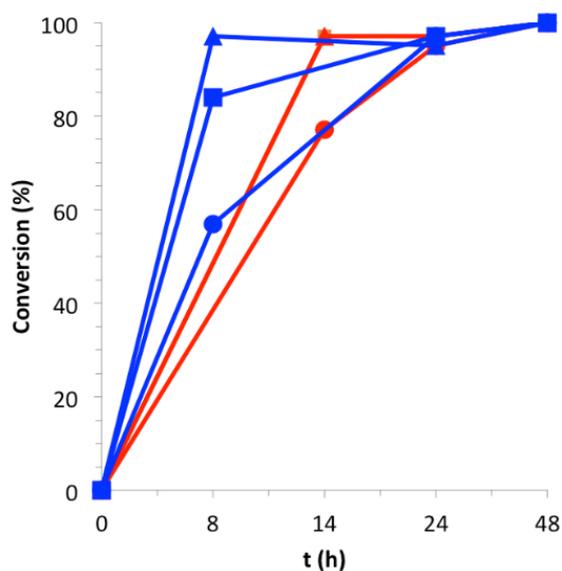
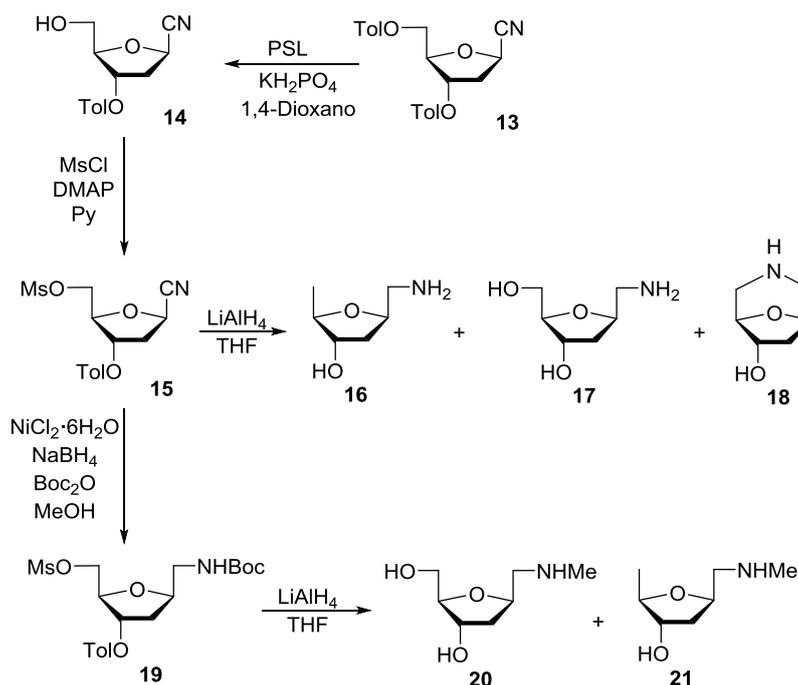


Figura 26. Hidrólisis de **13** con lipasas a diferentes temperaturas: PSL-SD 30 °C (●), PSL-SD 45 °C (■), PSL-SD 60 °C (▲), PSL-IM 30 °C (●), PSL-IM 45 °C (■) y PSL-IM 60 °C (▲).

Cabe destacar que, en el proceso de hidrólisis enzimática, el compuesto **14** se obtuvo con el suficiente grado de pureza sin necesidad de realizar una purificación por cromatografía de columna al crudo. Además, al utilizar una enzima inmovilizada, esta se puede reciclar y reutilizar varios ciclos para hacer más económico el proceso con vistas a un posible escalado de la reacción.

1.2. Hidrogenólisis de un derivado mesilado

La reacción del cianoalcohol **14** con el cloruro de metanosulfonilo, también denominado cloruro de mesilo (MsCl), en piridina y DMAP da lugar al mesilato **15** con un rendimiento del 88% (Esquema 15). El subsiguiente tratamiento con hidruro de litio y aluminio en THF a reflujo permitió llevar a cabo simultáneamente la hidrogenólisis, la reducción del grupo ciano a amina y la escisión del grupo toluoilo. Sin embargo, se obtuvo una mezcla de tres compuestos **16**, **17** y **18**, donde el producto deseado **16** se obtuvo como una mezcla inseparable junto al compuesto **18**.



Esquema 15

La formación del subproducto **18** podría explicarse debido a que la reducción del grupo ciano ocurriría en primer lugar, para acto seguido producirse el ataque del amino al C5 del alcohol mesilado, provocando la creación del bicyclo mediante una reacción de sustitución. Por otra parte,

la formación del diol **17** se debe a la escisión del enlace S-O durante el proceso de una reducción del éster sulfónico.

Con el fin de eludir la formación del biciclo **18**, se opta por una ruta alternativa en la que el grupo amino se protege con el grupo *tert*-butiloxicarbonilo (Boc). La síntesis en *one-pot* de la amina *N*-Boc protegida **19** se llevó a cabo mediante la reacción de **15** con dicarbonato de di-*tert*-butilo, NiCl₂·6H₂O y NaBH₄ en MeOH (55% de rendimiento). Sin embargo, la posterior reducción de **19** con LiAlH₄ a reflujo de THF proporcionó la mezcla de compuestos **20** y **21** en una relación 1:2, respectivamente (Esquema 15).

Como era de esperar, no se produjo la formación del biciclo como subproducto, ya que la amina estaba protegida. En cambio, los dos productos que se obtienen en esta reacción tienen el grupo amino monometilado, en lugar de poseer la amina libre. Esto es porque el exceso de hidruros en el medio de reacción origina, en primer lugar, el ataque al carbonilo del Boc, formando la correspondiente amida. Posteriormente, como el LiAlH₄ es muy reactivo y está en exceso, sumado a las condiciones de reacción (THF a reflujo), tiene lugar la reducción de la amida, formando así el grupo aminometil.

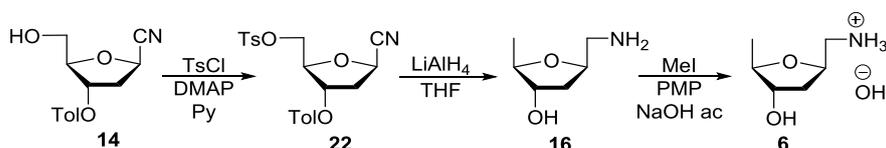
1.3. Hidrogenólisis de un derivado tosilado

En vista de los resultados obtenidos, se exploraron otras rutas sintéticas. Una alternativa puede ser el uso del grupo tosilo en lugar del mesilo, ya que se trata de otro buen grupo saliente ampliamente utilizado en síntesis orgánica.

Así, el derivado tosilado **22** se preparó a partir de **14** con un rendimiento del 85% por tratamiento con cloruro de tosilo (TsCl), en piridina y DMAP (Esquema 16). A continuación, el compuesto **22** se trató

Resultados y discusión

con LiAlH_4 en THF a reflujo. Afortunadamente, el empleo del tosilato evitó la formación de subproductos, aislándose exclusivamente el derivado deseado **16** con un rendimiento del 84%.



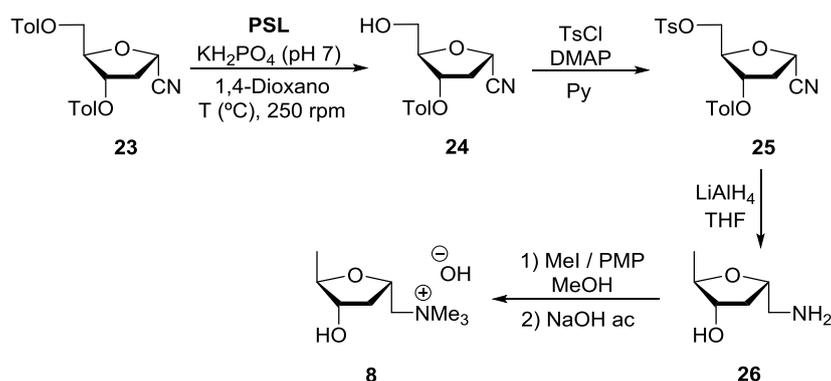
Esquema 16. Ruta sintética de la (-)-muscarina.

Cabe destacar que, en tan solo una etapa de reacción, se consigue transformar tres grupos simultáneamente con muy buen rendimiento y evitando la formación de distintos subproductos. Por último, el compuesto **16** se convirtió en la (-)-muscarina (**6**) mediante un tratamiento con MeI y 1,2,2,6,6-pentametilpiperidina (PMP), seguido de un intercambio iónico con una disolución de hidróxido de sodio. El rendimiento de esta etapa fue del 80%.

2. Síntesis de (+)-*allo*-muscarina

A continuación, se utilizó la estrategia anterior para la síntesis de la (+)-*allo*-muscarina (**8**). Para ello, se elige el α -cianoazúcar **23** como material de partida, que es accesible a gran escala.

El primer paso, que consiste en la desprotección selectiva del grupo toluoilo primario, se realizó por reacción de **23** con la lipasa PSL-SD a 45 °C en una disolución tampón KH_2PO_4 0.15 M (pH 7) y 18% de 1,4-dioxano, proporcionando el derivado 3-*O*-toluoilo **24** después de 4 días de reacción con un rendimiento del 90% (Esquema 17).



Al igual que ocurre en la hidrólisis del análogo β , no fue necesaria una purificación del crudo, puesto que se obtuvo el compuesto **24** con alta pureza. Bajo las mismas condiciones de reacción, se observó también la selectividad total que ofrece la lipasa inmovilizada PSL-IM. Sin embargo, la hidrólisis es mucho más lenta, ya que alcanza un máximo de 88% de conversión después de 7 días de reacción (Figura 27).

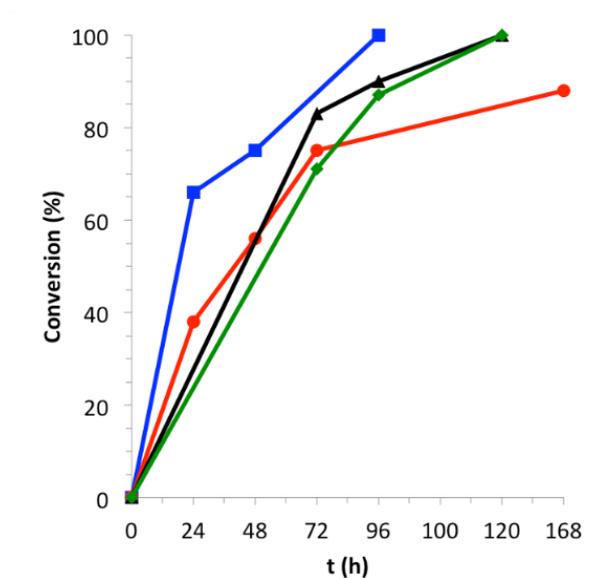


Figura 27. Hidrólisis de **23** a 45 °C con lipasas PSL-SD y PSL-IM con distintas relaciones enzima:**23** (p/p): PSL-SD 2:1 (■), PSL-IM 2:1 (●), PSL-IM 4:1 (▲) y PSL-IM 6:1 (◆).

Resultados y discusión

Para incrementar la velocidad de reacción, se evaluó la influencia que puede tener en la conversión la distinta relación enzima:sustrato. En este caso, se emplearon relaciones lipasa:**23** de 4:1 y 6:1 (p/p). Como se muestra en el gráfico de la Figura 27, los mejores resultados se lograron tras 5 días cuando se utilizó una relación de 4:1, obteniéndose el derivado 3-*O*-toluilo **24** con excelente regioselectividad y conversión. No se observan diferencias apreciables con una relación 6:1 en cuanto a rendimiento y tiempos de reacción.

Posteriormente, se llevó a cabo la tosilación de **24** con TsCl en presencia de DMAP y piridina para generar el compuesto **25** con un rendimiento del 75%.

Aplicando la misma secuencia de reacciones que en el caso del análogo β , el tratamiento del tosilato **25** con LiAlH_4 dio como resultado únicamente la formación del amino alcohol deseado **27** en tan solo una etapa. Finalmente, el grupo amino se cuaternizó al correspondiente hidróxido de (+)-*allo*-muscarina con un rendimiento del 76% utilizando un tratamiento con MeI y PMP seguido de un intercambio iónico con una disolución de hidróxido de sodio.

3. Escalado de la reacción y reutilización de la enzima

Todos los experimentos anteriores de hidrólisis mediados por la PSL-IM se llevaron a cabo con una relación enzimática 2:1 (p/p) de PSL-IM:**13** ó 4:1 (p/p) de PSL-IM:**23** para alcanzar las máximas conversiones. Con el fin de mostrar la utilidad industrial del proceso, se escaló la reacción de hidrólisis enzimática del β -cianoazúcar **13** y del α -cianoazúcar **23** para la obtención de los ciano alcoholes **14** y **24**, respectivamente.

La reacción se llevó a cabo con 10 g del sustrato de partida **13**, pero con una menor cantidad de enzima para conseguir una mayor rentabilidad del proceso, por eso se eligió una proporción de 1:1 (p/p) sustrato:enzima. Al tener menor carga enzimática, la reacción fue algo más lenta, tardando 24 h en completarse. El crudo de la reacción proporcionó el azúcar 3-*O*-toluoilciano **14** que se aisló con un rendimiento del 91%.

Con el fin de reducir también el coste del catalizador, se investigó la posible reutilización de la lipasa inmovilizada en varios ciclos de reacción (Tabla 9). Para ello, se analizaron tres reacciones secuenciales de cada análogo α y β . La enzima únicamente se filtra del medio de reacción, se lava con 1,4-dioxano (por ser el cosolvente de la reacción) y se seca adecuadamente para su posterior utilización en el siguiente ciclo.

El estudio se realizó con 2 g de sustrato de partida, y una relación enzima:sustrato que varía en función del análogo utilizado: para el β -derivado la relación enzima:**13** fue de 2:1 (p/p), mientras que para el α -derivado la relación PSL-IM:**23** fue de 4:1 (p/p).

Tanto para el β -ciano (entradas 1-3, Tabla 9) como para el α -ciano (entradas 4-6, Tabla 9) los resultados fueron prácticamente iguales durante los tres ciclos de reacción, lo que pone de manifiesto la eficiencia del proceso.

La reacción fue ligeramente más lenta en el tercer ciclo, debido tal vez a la pérdida de cierta cantidad de enzima tras cada filtrado, lavado y secado. Como la PSL-IM es un polvo muy fino, puede perderse parte de esta cantidad durante su secado en una línea de vacío. Es posible que, debido a esto, la relación enzima:sustrato haya disminuido con respecto al primer ciclo, lo que acarrea una pérdida en las unidades de la enzima y el consiguiente aumento del tiempo de reacción, necesitando más horas para alcanzar la máxima conversión.

Resultados y discusión

Tabla 9. Reciclado de la enzima durante la hidrólisis regioselectiva de **13** y **23** con PSL-IM a 45 °C y una escala de 2 g de sustrato.

Entrada	Sustrato	Ciclo	t (h)	Producto	Rdto (%) ^a
1	13	1°	24	14	97
2	13	2°	24	14	98
3	13	3°	32	14	91
4	23	1°	120	24	97
5	23	2°	120	24	89
6	23	3°	132	24	91

^aPorcentaje de los rendimientos aislados de 3-*O*-toluoil-cianoazúcares.

Conclusiones

Se ha descrito una estrategia quimioenzimática para acceder de manera sencilla a derivados no naturales de la (+)-muscarina empleando biocatalizadores comerciales, los cuales se han convertido en una herramienta atractiva y poderosa en síntesis orgánica debido a su alta selectividad y condiciones de reacción suaves.

La hidrólisis selectiva del grupo toluoilo en derivados diésteres mediante el uso de una enzima proporciona la regioselectividad necesaria para el desarrollo de la síntesis, que no se puede conseguir tan eficientemente mediante métodos químicos convencionales.

La utilización de un sustrato de partida con los centros quirales ya predefinidos permite una síntesis rápida y asequible de análogos modificados de muscarina para su desarrollo como agentes terapéuticos.

El atractivo de esta ruta sintética es que transcurre en cuatro etapas sencillas, donde los derivados (-)-muscarina y (+)-*allo*-muscarina se aíslan con rendimientos globales del 54% y 45%, respectivamente. Otra etapa clave es la ejecución de tres reacciones distintas en *one-pot* empleando un solo reactivo y obteniendo buenos rendimientos.

Además, se demostró que la ruta quimioenzimática descrita en este capítulo puede emplearse a gran escala, constituyendo una mejora con respecto a otros métodos descritos en la bibliografía para la síntesis de derivados muscarínicos.

Parte experimental

1. Condiciones de trabajo, disolventes y reactivos

Los reactivos y métodos generales han sido detallados en la parte experimental del Capítulo 1, con las siguientes excepciones:

- Las reacciones en atmósfera inerte se llevaron a cabo, salvo indicación específica, en tubos Schlenk, con agitación magnética y bajo atmósfera de argón.
- Los cianoazúcares de partida fueron proporcionados por la empresa Rasayan Inc. (Encinitas, CA, EE.UU.). El resto de reactivos utilizados se adquirieron del grado de pureza necesario a Sigma-Aldrich, Acros o Alfa Aesar y no necesitaron de ningún tratamiento previo a su utilización, excepto el MsCl y el TsCl.
 - Purificación del MsCl: destilado a 55 °C y posterior secado con óxido fosfórico (P₂O₅).
 - Purificación del TsCl: lavado con NaOH 1 N, posterior recristalización con AcOEt y secado a vacío en un horno de bolas a 45 °C durante 12 h (Glass Oven B-580, Büchi)
- Tratamiento de disolventes. El MeOH se refluó sobre CaH₂ y la piridina se destiló con NaOH.
- Los reveladores utilizados en las cromatografías en capa fina (TLC) fueron una disolución de KMnO₄ (ver Capítulo 1 para su preparación) o una disolución de ninhidrina al 3% en etanol.

Parte experimental

- La lipasa PSL-SD (24700 U/g), un preparado enzimático perteneciente a *Pseudomonas cepacia*, y la lipasa AK (22100 U/g), producida por la fermentación de una única cepa de *Pseudomonas fluorescens*, fueron adquiridas a Amano Enzyme. Por otra parte, la lipasa CAL-A (3000 TBU/g), perteneciente a *Candida antarctica*, fue adquirida a ChiralVision. La lipasa *Thermomyces lanuginosus* (TL, 81800 U/g) fue adquirida a Meito Sangyo Co.

2. Técnicas instrumentales

Las técnicas de análisis utilizadas han sido detalladas en la parte experimental del primer capítulo de esta memoria, con las siguientes excepciones:

- Para la medida de la rotación específica se utilizó un polarímetro Jasco P-1010 (unidades $10^{-1} \text{ cm}^2 \times \text{grado} \times \text{g}^{-1}$)
- Los puntos de fusión se midieron en tubos capilares abiertos en un aparato Gallemkamp y no fueron corregidos.
- El seguimiento de las reacciones de hidrólisis enzimática se realizó mediante espectroscopía de RMN en alícuotas tomadas del crudo de reacción. Se emplearon los mismos equipos que se usaron en la caracterización de los compuestos, Bruker DPX-300 y AV-300.

3. Procedimientos sintéticos y datos experimentales

A continuación, se describe de forma detallada el procedimiento seguido para la síntesis de cada uno de los productos que se han obtenido en este capítulo. También se recogen los datos experimentales que han permitido su caracterización.

3.1. Síntesis del hidróxido de (-)-muscarina (6)

Sobre una disolución en agitación de **16** (40 mg, 0.3 mmol) en AcOEt (1.3 mL) se adicionan 1,2,2,6,6-pentametilpiperidina (94.7 mg, 0.61 mmol) y MeI (187 μ L, 3 mmol). La reacción se deja agitando a temperatura ambiente durante 16 h. El precipitado blanco formado en el medio de reacción se filtra y se lava con AcOEt. Separado el sólido, este se disuelve en agua y se añade una disolución acuosa de NaOH 3 M hasta pH básico. Tras 15-20 min de agitación, se elimina el agua y el residuo se suspende en MeCN. Se filtra el sólido y el filtrado se evapora. Finalmente, el sólido resultante se lava con Et₂O y se filtra, obteniéndose el producto **6** como un sólido blanco higroscópico con un 80% de rendimiento.

3.2. Síntesis del hidróxido de (+)-allo-muscarina (8)

Sobre una disolución en agitación de **26** (32 mg, 0.24 mmol) en AcOEt (1.2 mL) se adicionan 1,2,2,6,6-pentametilpiperidina (74.5 mg, 0.48 mmol) y MeI (149.4 μ L, 2.4 mmol). La reacción se deja agitando a temperatura ambiente durante 16 h. A continuación, se elimina el disolvente y el crudo se lava con Et₂O. El sólido resultante se disuelve en agua y se añade una disolución acuosa de NaOH 3 M hasta pH básico. Tras 15-20 min de agitación, se elimina el agua y el residuo se suspende en MeCN. Se filtra el sólido y el filtrado se evapora. El sólido resultante se lava con Et₂O y se filtra, obteniéndose **8** como un sólido blanco higroscópico con un 76% de rendimiento.

3.3. Síntesis de 1 β -ciano-1,2-didesoxi-3-O-toluoil-D-ribosa (14)

A una disolución de **13** (2 g, 5.3 mmol) en 1,4-dioxano (9 mL) se añade una disolución tampón 0.15 M KH₂PO₄ de pH 7 (44 mL) y la lipasa PSL-IM (4 g). La reacción se agita a 250 rpm y 45 °C. Después de 24 h de

Parte experimental

reacción, se filtra la enzima en placa, se lava con CH_2Cl_2 y se eliminan los disolventes. El residuo se disuelve en una disolución acuosa saturada de NaHCO_3 y se extrae con CH_2Cl_2 . Las capas orgánicas se combinan, se secan con Na_2SO_4 y se evaporan a presión reducida, obteniéndose el producto **14** como un sólido blanco con un 94% de rendimiento.

3.3.1. Escalado del compuesto 14

Se utiliza el mismo procedimiento que en el apartado 3.3, pero se parte de 10 g de sustrato de partida y la enzima se utiliza en proporción 1:1 (p/p). Así pues, el experimento se realizó con 10 g (26.5 mmol) de **13** disueltos en 45 mL de 1,4-dioxano, 220 mL de 0.15 M KH_2PO_4 pH 7 y 10 g de PSL-IM.

3.3.2. Reutilización de la enzima

Se utiliza el procedimiento que se recoge en el apartado 3.3 con la excepción de que, una vez filtrada la enzima, se lava con 1,4-dioxano (en lugar de CH_2Cl_2) y se seca a vacío para su posterior utilización.

3.4. Síntesis de 1 β -ciano-1,2-didesoxi-5-O-metanosulfonil-3-O-toluoil-D-ribosa (15)

Sobre una disolución de **14** (140 mg, 0.54 mmol) en piridina anhidra (1.1 mL) a 0 °C, se añade MsCl (92.9 μL , 1.18 mmol) y DMAP (10 mg). Se quita el baño de hielo y se deja reaccionando a temperatura ambiente durante 16 h. Tras este tiempo, se añade una nueva porción de MsCl (46 μL , 0.59 mmol) hasta alcanzar las 24 h. La reacción se detiene con agua fría y se extrae con Et_2O . Las capas orgánicas se combinan, se secan con Na_2SO_4 y se evaporan a presión reducida. El crudo obtenido se purifica mediante cromatografía de columna (30% AcOEt/Hex) para obtener **15** como un sólido blanco y un rendimiento del 88%.

3.5. Síntesis de 1 β -aminometil-1,2,5-tridesoxi-D-ribosa (**16**)

A partir de **22**: A una disolución de **22** (180 mg, 0.43 mmol) en THF anhidro (2.8 mL) se le añade LiAlH₄ (132 mg, 3.47 mmol) y la reacción se deja agitando a reflujo durante 4 h. El exceso de agente reductor se descompone mediante la adición de AcOEt (8 mL) y MeOH (8 mL) con precaución. Se evapora el disolvente y el crudo se purifica por cromatografía de columna (100% MeOH), obteniendo el producto deseado **16** como un líquido viscoso ligeramente amarillento, y un rendimiento del 84%.

A partir de **15**: A una disolución de **15** (35 mg, 0.1 mmol) en THF anhidro (0.7 mL) se le añade LiAlH₄ (30.4 mg, 0.8 mmol) y la reacción se deja agitando a reflujo durante 4 h. El exceso de agente reductor se descompone mediante la adición de AcOEt (2 mL) y MeOH (2 mL) con precaución. Se eliminan los disolventes a presión reducida y el crudo se purifica mediante una cromatografía de columna (100% MeOH), aislándose el compuesto **17** y una mezcla inseparable de los productos **16** y **18**.

3.6. Síntesis de 1 β -N-(*tert*-butiloxicarbonil)aminometil-1,2-didesoxi-5-O-metanosulfonil-3-O-toluoil-D-ribosa (**19**)

Se añaden NiCl₂·6H₂O (5.7 mg, 0.024 mmol) y di-*tert*-butil dicarbonato (104.7 mg, 0.48 mmol) a una disolución de **15** (80 mg, 0.24 mmol) en MeOH anhidro (1.8 mL). A continuación, la mezcla se enfría a 0 °C y se adiciona NaBH₄ (63.6 mg, 1.68 mmol) en pequeñas porciones durante 15 min. Después, se deja que la reacción alcance temperatura ambiente agitando durante toda la noche. La suspensión se filtra en Celite[®], se eliminan los disolventes a presión reducida y se purifica el crudo mediante una cromatografía de columna (30% AcOEt/Hex). El producto final **19** se obtiene con un 55% de rendimiento.

Parte experimental

3.7. Síntesis de 1 β -N-(metil)aminometil-1,2-didesoxi-D-ribosa (20) y 1 β -N-(metil)aminometil-1,2,5-tridesoxi-D-ribosa (21)

Sobre una disolución de **19** (45 mg, 0.1 mmol) en THF anhidro (0.7 mL) se añade LiAlH₄ (30.4 mg, 0.8 mmol). Tras 4 h de reacción a reflujo, se destruye el exceso de agente reductor con EtOAc (2 mL) y MeOH (2 mL). Los disolventes se eliminan a presión reducida y el crudo se purifica mediante una columna cromatográfica (100% MeOH) para aislar los productos **20** y **21**.

3.8. Síntesis de 1 β -ciano-1,2-didesoxi-5-O-(p-toluensulfonil)-3-O-toluoil-D-ribosa (22)

Sobre una disolución en agitación constante de **14** (210 mg, 0.8 mmol) en piridina anhidra (1.6 mL) y a 0 °C, se adiciona TsCl (335 mg, 1.76 mmol) y DMAP (10 mg). Posteriormente, se deja alcanzar temperatura ambiente y tras 16 h se añade una nueva porción de TsCl (167 mg, 0.88 mmol) hasta llegar a las 24 h de reacción. La reacción se detiene con agua fría y se extrae con Et₂O. Las capas orgánicas se combinan, se secan con Na₂SO₄ y se evaporan a presión reducida. El crudo obtenido se purifica mediante cromatografía de columna (30% AcOEt/Hex) para dar **22** con un rendimiento del 85%.

3.9. Síntesis de 1 α -ciano-1,2-didesoxi-3-O-toluoil-D-ribosa (24)

Procedimiento similar al descrito para la síntesis de **14** en el apartado 3.3. A partir del sustrato de partida **23** y empleando la lipasa PSL-IM [proporción 4:1 (p/p) lipasa:**23**], se obtiene **24** con un rendimiento del 90% tras 5 días de reacción.

Nota: el matraz Erlenmeyer que contiene el compuesto **23** y 1,4-dioxano se calienta previamente en el agitador orgital 10 min a 60 °C para conseguir una mayor disolución del sustrato de partida.

3.9.1. Reutilización de la enzima

Se utiliza el procedimiento que se indica en el apartado 3.9, con la excepción de que una vez filtrada la enzima se lava con 1,4-dioxano (en lugar de CH₂Cl₂) y se seca a vacío para su posterior utilización.

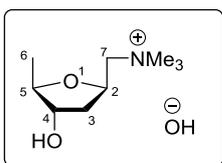
3.10. Síntesis de 1 α -ciano-1,2-didesoxi-5-*O*-(*p*-toluensulfonil)-3-*O*-toluol-D-ribosa (25**)**

Similar al procedimiento descrito para la obtención del compuesto **22**. Se parte de **24** para llegar al producto deseado **25** con un 75% de rendimiento.

3.11. Síntesis de 1 α -aminometil-1,2,5-tridesoxi-D-ribosa (26**)**

A partir de **25**, siguiendo el mismo procedimiento descrito para el compuesto **16**, se obtiene el producto deseado **26** con un 78% de rendimiento.

Hidróxido de (-)-Muscarina (6)



Sólido blanco higroscópico

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -14.1 \text{ (} c \text{ 1.0, EtOH)}$$

Fórmula molecular: C₉H₂₁NO₃

Masa Molecular: 191.27 g/mol

IR (KBr): ν 3424, 2970, 2919, 2850, 1275 cm⁻¹.

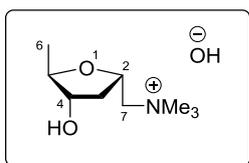
¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 1.23 (d, 3H, H₆, $J = 6.4$ Hz), 1.92 (m, 1H, H₃), 2.06 (ddd, 1H, H₃, $J = 13.2, 6.0, 2.5$ Hz), 3.29 (s, 9H, NMe₃), 3.51 (dd, 1H, H₇, $J = 13.6, 9.9$ Hz), 3.74 (dd, 1H, H₇, $J = 13.6, 1.4$ Hz), 3.97 (m, 2H, H₄+H₅), 4.63 (q, 1H, H₂, $J = 9.7$ Hz) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ 20.2 (CH₃), 39.6 (C₃), 54.97, 55.02, 55.07 (NMe₃), 71.5 (C₇), 73.1 (C₂), 76.6 (C₄), 85.3 (C₅) ppm.

EMAR (ESI⁺, m/z):

- Calculada para C₉H₂₀NO₂⁺ [M-OH]⁺: 174.1489
- Encontrada: 174.1488

Hidróxido de (+)-*allo*-Muscarina (8)



Sólido blanco higroscópico

$[\alpha]_D^{20} = +6.4$ (*c* 1.0, EtOH)

Fórmula molecular: C₉H₂₁NO₃

Masa Molecular: 191.27 g/mol

IR (KBr): 3397, 2970, 2923, 1266 cm⁻¹.

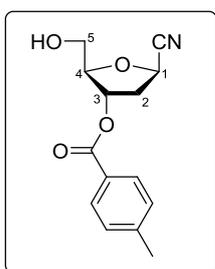
¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 1.19 (d, 3H, H₆, *J* = 6.3 Hz), 1.64 (m, 1H, H₃), 2.53 (ddd, 1H, H₃, *J* = 13.3, 7.9, 6.0 Hz), 3.24 (s, 9H, NMe₃), 3.49 (dd, 1H, H₇, *J* = 13.6, 1.7 Hz), 3.67 (dd, 1H, H₇, *J* = 13.6, 10.0 Hz), 3.99 (m, 2H, H₄+H₅), 4.69 (m, 1H, H₂) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ 19.0 (CH₃), 39.2 (C₃), 54.76, 54.81, 54.87 (NMe₃) 71.2 (C₇), 72.6 (C₂), 76.8 (C₄), 83.4 (C₅) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₉H₂₀NO₂⁺ [M-OH]⁺: 174.1489
- Encontrada: 174.1490

1 β -Ciano-1,2-didesoxi-3-O-toluoil-D-ribosa (14)



Sólido blanco

P_f: 88 - 90 °C

R_f: 0.29 (30% AcOEt/hexano)

Fórmula molecular: C₁₄H₁₅NO₄

Masa Molecular: 261.27 g/mol

IR (KBr): 3472, 2988, 2923, 2875, 1709, 1611, 1276, 1101 cm⁻¹.

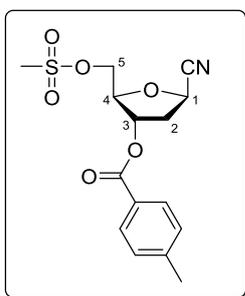
¹H-RMN (300.13 MHz, CDCl₃): δ 2.11 (sa, 1H, OH), 2.42 (s, 3H, Me-Tol), 2.59 (ddd, 1H, H₂, *J* = 13.8, 6.5, 1.8 Hz), 2.71 (ddd, 1H, H₂, *J* = 14.1, 9.3, 6.1 Hz), 3.87 (d, 2H, H₅, *J* = 3.7 Hz), 4.25 (q, 1H, H₄, *J* = 3.6 Hz), 4.87 (dd, 1H, H₁, *J* = 9.2, 6.6 Hz), 5.52 (d, 1H, H₃, *J* = 6.0 Hz), 7.25 (d, 2H, H_{orto}-Me, *J* = 7.8 Hz), 7.88 (d, 2H, H_{orto}-CO, *J* = 8.2 Hz) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): δ 21.8 (CH₃), 38.3 (C₂), 62.6 (C₅), 66.0 (C₁), 75.7 (C₃), 86.8 (C₄), 118.3 (CN), 126.5 (C_{ipso}-CO), 129.4 (2CH_{arom}), 129.8 (2CH_{arom}), 144.6 (C_{ipso}-Me), 166.1 (C=O) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₁₄H₁₅NNaO₄ [M+Na]⁺: 284.0893
- Encontrada: 284.0887

**1 β -Ciano-1,2-didesoxi-5-O-metanosulfonil-3-O-toluoil-
-D-ribosa (15)**



Sólido blanco

Pf: 78 - 80 °C

Rf: 0.19 (30% AcOEt/hexano)

Fórmula molecular: C₁₅H₁₇NO₆S

Masa Molecular: 339.36 g/mol

IR (KBr): 3472, 2988, 2923, 2875, 1709, 1611, 1276, 1101 cm⁻¹.

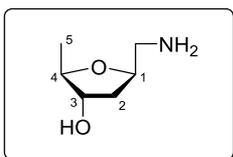
¹H-RMN (300.13 MHz, CDCl₃): δ 2.44 (s, 3H, *Me*-Tol), 2.69 (m, 2H, H₂), 3.14 (s, 3H, *Me*-Ms), 4.45 (m, 2H, H₄+ H₅), 4.53 (dd, 1H, H₅, *J* = 11.9, 4.3 Hz), 4.92 (dd, 1H, H₁, *J* = 8.6, 7.2 Hz), 5.54 (m, 1H, H₃), 7.27 (d, 2H, *Horto*-Me, *J* = 8.0 Hz), 7.90 (d, 2H, *Horto*-CO, *J* = 8.2 Hz) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): δ 21.8 (*Me*-Tol), 37.77 (C₂), 37.81 (*Me*-Ms), 66.3 (C₁), 68.3 (C₅), 75.1 (C₃), 83.7 (C₄), 117.8 (CN), 126.1 (Cipso-CO), 129.4 (2CHarom), 129.8 (2CHarom), 144.9 (Cipso-Me), 165.9 (C=O) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₁₅H₁₇NNaO₆S [M+Na]⁺: 362.0669
- Encontrada: 362.0664

1β-Aminometil-1,2,5-tridesoxi-D-ribosa (16)



Líquido viscoso ligeramente amarillento

R_f: 0.35 (1% NH₃/MeOH)

Fórmula molecular: C₆H₁₃NO₂

Masa Molecular: 131.17 g/mol

IR (NaCl): 3383, 3054, 2985, 1265 cm⁻¹.

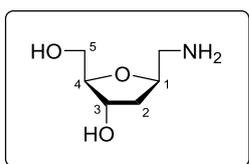
¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 1.20 (d, 3H, Me, *J* = 6.4 Hz), 1.86 (dd, 2H, H₂, *J* = 7.4, 4.7 Hz), 2.64 (dd, 1H, H₆, *J* = 13.2, 6.7 Hz), 2.76 (dd, 1H, H₆, *J* = 13.1, 4.1 Hz), 3.80 (m, 1H, H₄), 3.89 (q, 1H, H₃, *J* = 4.9 Hz), 4.10 (m, 1H, H₁) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ 19.9 (CH₃), 38.4 (C₂), 47.0 (C₆), 78.1 (C₃), 80.1 (C₁), 83.6 (C₄) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₆H₁₄NO₂ [M+H]⁺: 132.1019
- Encontrada: 132.1023

1 β -Aminometil-1,2-didesoxi-D-ribosa (17)



Aceite ligeramente amarillento

R_f: 0.25 (1% NH₃/MeOH)

Fórmula molecular: C₆H₁₃NO₃

Masa Molecular: 147.17 g/mol

IR (NaCl): 3420, 2953, 1644 cm⁻¹.

¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 1.88 (m, 2H, H₂), 2.74 (dd, 1H, H₆, $J = 13.2, 6.9$ Hz), 2.92 (dd, 1H, H₆, $J = 13.2, 3.5$ Hz), 3.53 (dd, 1H, H₅, $J = 11.7, 5.0$ Hz), 3.61 (dd, 1H, H₅, $J = 11.7, 4.1$ Hz), 3.81 (q, 1H, H₄, $J = 4.4$ Hz), 4.10 (m, 2H, H₁+ H₃) ppm.

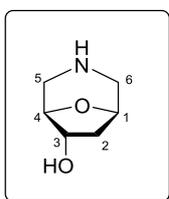
¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ 38.9 (C₂), 45.9 (C₆), 63.8 (C₅), 73.9 (C₃), 79.1 (C₁), 88.8 (C₄) ppm.

EMAR (ESI⁺, m/z):

- Calculada para C₆H₁₄NO₃ [M+H]⁺: 148.0968
- Encontrada: 148.0974

8-oxa-3-azabicyclo[3.2.1]octan-6-ol (18)

Se obtiene como mezcla con el compuesto **16**.



Aceite ligeramente amarillento

R_f : 0.38 (1% NH₃/MeOH)

Fórmula molecular: C₆H₁₁NO₂

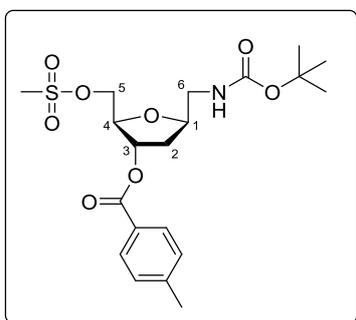
Masa Molecular: 129.16 g/mol

¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 1.89 (overlapped, 1H, H₂), 2.38 (dd, 1H, H₂, *J* = 13.5, 7.4 Hz), 2.50 – 3.10 (several signals, 2H₅ + 2H₆), 3.91, 4.39, 4.51 (H₁, H₃, H₄) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₆H₁₂NO₂ [M+H]⁺: 130.0863
- Encontrada: 130.0862

**1 β -N-(*tert*-Butiloxicarbonil)aminometil-1,2-didesoxi-
-5-O-metanosulfonil-3-O-toluoil-D-ribose (19)**



Sólido blanco

R_f: 0.35 (30% AcOEt/hexano)

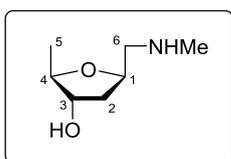
Fórmula molecular: C₂₀H₂₉NO₈S

Masa Molecular: 443.51.36 g/mol

¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 1.45 (s, 9H, *Me*-Boc), 2.00 (m, 1H, H₂), 2.16 (m, 1H, H₂), 2.41 (s, 3H, *Me*-Tol), 3.15 (s, 3H, *Me*-Ms), 3.32 (m, 2H, H₆ overlapped with MeOH-*d*₄), 4.26 (m, 2H, H₁+H₄), 4.41 (d, 2H, H₅, *J* = 3.9 Hz), 5.36 (d, 1H, H₃, *J* = 6.4 Hz), 7.30 (d, 2H, H_{orto}-Me, *J* = 8.2 Hz), 7.91 (d, 2H, H_{orto}-CO, *J* = 8.2 Hz) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ 21.7 (*Me*-Tol), 28.7 (3*Me*-Boc), 36.4 (C₂), 37.5 (*Me*-Ms), 44.4 (C₆), 70.9 (C₅), 77.8 (C₃), 79.9 (C₁), 80.3 (C-^{*t*}Bu), 83.9 (C₄), 128.2 (C_{ipso}-CO), 130.3 (2C_Harom), 130.7 (2C_Harom), 145.6 (C_{ipso}-Me), 158.5 (NH-C=O), 167.6 (O-C=O) ppm.

1 β -N-(Metil)aminometil-1,2,5-tridesoxi-D-ribosa (21)



Sólido aceitoso

R_f : 0.25 (1% NH₃/MeOH)

Fórmula molecular: C₇H₁₅NO₂

Masa Molecular: 145.20 g/mol

IR (NaCl): 3570, 3505, 2979, 2864, 1069 cm⁻¹.

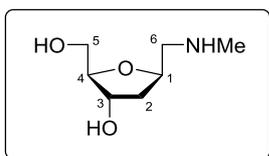
¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 1.21 (d, 3H, H₅, $J = 6.2$ Hz), 1.89 (m, 1H, H₂), 1.98 (ddd, 1H, H₂, $J = 13.2, 6.4, 3.1$ Hz), 2.60 (s, 3H, Me-NH), 2.81 (dd, 1H, H₆, $J = 12.5, 8.7$ Hz), 3.02 (dd, 1H, H₆, $J = 12.5, 3.1$ Hz), 3.84 (m, 1H, H₄), 3.93 (m, 1H, H₃), 4.32 (m, 1H, H₁) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ 19.9 (C₅), 34.7 (Me-NH), 39.0 (C₂), 55.6 (C₆), 75.5 (C₁), 77.8 (C₃), 84.2 (C₄) ppm.

EMAR (ESI⁺, m/z):

- Calculada para C₇H₁₆NO₂ [M+H]⁺: 146.1176
- Encontrada: 146.1176

1 β -N-(Metil)aminometil-1,2-didesoxi-D-ribosa (20)



Aceite amarillento

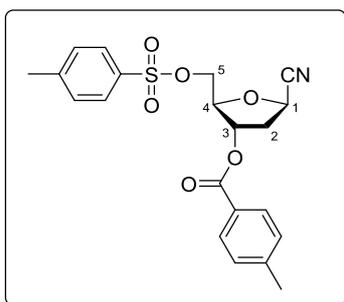
R_f: 0.21 (2% NH₃/MeOH)

Fórmula molecular: C₇H₁₅NO₃

Masa Molecular: 161.20 g/mol

¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 1.85 (m, 1H, H₂), 1.98 (ddd, 1H, H₂, $J = 13.1, 6.1, 2.5$ Hz), 2.62 (s, 3H, *Me*-NH), 2.89 (dd, 1H, H₆, $J = 12.5, 8.5$ Hz), 3.05 (dd, 1H, H₆, $J = 12.5, 3.0$ Hz), 3.54 (dd, 1H, H₅, $J = 11.8, 4.9$ Hz), 3.62 (dd, 1H, H₅, $J = 11.8, 4.9$ Hz), 3.84 (q, 1H, H₄, $J = 4.3$ Hz), 4.24 and 4.38 (2m, 2H, H₁, H₃) ppm.

1 β -Ciano-1,2-didesoxi-5-O-(*p*-toluenosulfonil)-3-O-toluoil-
-D-ribosa (22)



Sólido blanco

P_f: 132 - 134 °C

R_f: 0.35 (30% AcOEt/hexano)

Fórmula molecular: C₂₁H₂₁NO₆S

Masa Molecular: 415.46 g/mol

IR (KBr): 3038, 2951, 2925, 2253, 1715, 1611, 1338, 1271, 1185 cm⁻¹.

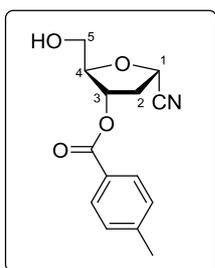
¹H-RMN (300.13 MHz, CDCl₃): δ 2.42 (s, 3H, *Me*-Tol), 2.45 (s, 3H, *Me*-Ts), 2.60 (m, 2H, H₂), 4.14 (m, 1H, H₅), 4.35 (m, 2H, H₄+ H₅), 4.80 (dd, 1H, H₁, *J* = 8.9, 7.1 Hz), 5.46 (m, 1H, H₃), 7.25 (d, 2H, *Horto*-*Me*-Tol, *J* = 8.7 Hz), 7.37 (d, 2H, *Horto*-*Me*-Ts, *J* = 8.1 Hz), 7.85 (2d, 4H, *Harom*) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): δ 21.8 (CH₃), 21.9 (CH₃), 37.79 (C₂), 66.1 (C₁), 68.6 (C₅), 75.3 (C₃), 83.6 (C₄), 117.5 (CN), 126.1 (Cipso-CO), 128.2 (2CH_{arom}), 129.4 (2CH_{arom}), 129.8 (2CH_{arom}), 130.2 (2CH_{arom}), 132.2 (Cipso-SO₃), 144.8 (Cipso-*Me*-Tol), 145.5 (Cipso-*Me*-Ts), 165.9 (C=O) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₂₁H₂₁NNaO₆S [M+Na]⁺: 438.0982
- Encontrada: 438.0980

1 α -Ciano-1,2-didesoxi-3-O-toluoil-D-ribosa (24)



Sólido blanco

Pf: 90 - 92 °C

Rf: 0.13 (30% AcOEt/hexano)

Fórmula molecular: C₁₄H₁₅NO₄

Masa Molecular: 261.27 g/mol

IR (KBr): 3466, 2973, 2923, 2882, 2237, 1712, 1611, 1271, 1096 cm⁻¹.

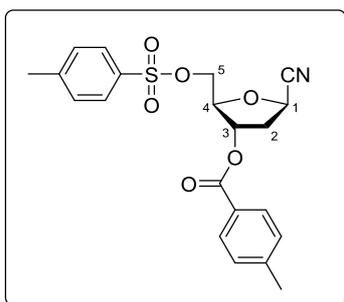
¹H-RMN (300.13 MHz, CDCl₃): δ 2.07 (s, 1H, OH), 2.43 (s, 3H, *Me*-Tol), 2.56 (d, 1H, H₂, *J* = 14.1 Hz), 2.68 (ddd, 1H, H₂, *J* = 14.2, 8.0, 6.3 Hz), 3.88 (d, 2H, H₅, *J* = 3.4 Hz), 4.41 (m, 1H, H₄), 5.05 (d, 1H, H₁, *J* = 7.0 Hz), 5.54 (d, 1H, H₃, *J* = 6.1 Hz), 7.28 (d, 2H, H_{orto}-Me, *J* = 8.1 Hz), 8.00 (d, 2H, H_{orto}-CO, *J* = 8.1 Hz) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): δ 21.8 (CH₃), 38.3 (C₂), 62.5 (C₅), 66.7 (C₁), 75.1 (C₃), 87.0 (C₄), 118.7 (CN), 126.5 (C_{ipso}-CO), 129.4 (2CH_{arom}), 130.0 (2CH_{arom}), 144.6 (C_{ipso}-Me), 166.5 (C=O) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₁₄H₁₅NNaO₄ [M+Na]⁺: 284.0893
- Encontrada: 284.0882

**1 α -Ciano-1,2-didesoxi-5-O-(*p*-toluenosulfonil)-3-O-toluoil-
-D-ribosa (25)**



Sólido blanco

P_f: 156 - 158 °C

R_f: 0.26 (30% AcOEt/hexano)

Fórmula molecular: C₂₁H₂₁NO₆S

Masa Molecular: 415.46 g/mol

IR (KBr): 2970, 2922, 2238, 1716, 1613, 1342, 1286, 1170 cm⁻¹.

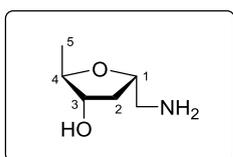
¹H-RMN (300.13 MHz, CDCl₃): δ 2.40 (s, 3H, *Me*-Tol), 2.45 (s, 3H, *Me*-Ts), 2.52 (d, 1H, H₂, *J* = 14.2 Hz), 2.61 (m, 1H, H₂), 4.25 (dd, 1H, H₅, *J* = 11.1, 2.8 Hz), 4.33 (dd, 1H, H₅, *J* = 11.1, 2.7 Hz), 4.44 (m, 1H, H₄), 4.93 (dd, 1H, H₁, *J* = 8.0, 1.3 Hz), 5.44 (d, 1H, H₃, *J* = 5.9 Hz), 7.25 (d, 2H, H_{orto}-*Me*-Tol, *J* = 7.8 Hz), 7.36 (d, 2H, H_{orto}-*Me*-Ts, *J* = 8.2 Hz), 7.79 (d, 2H, H_{orto}-SO₃-Ts, *J* = 8.3 Hz), 7.95 (d, 2H, H_{orto}-CO-Tol, *J* = 8.2 Hz) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): δ 21.8 (CH₃), 21.9 (CH₃), 37.9 (C₂), 66.9 (C₁), 69.0 (C₅), 74.9 (C₃), 84.1 (C₄), 118.4 (CN), 126.2 (C_{ipso}-CO), 128.1 (2CH_{arom}), 129.5 (2CH_{arom}), 130.1 (2CH_{arom}), 130.2 (2CH_{arom}), 132.3 (C_{ipso}-SO₃), 144.7 (C_{ipso}-*Me*-Tol), 145.5 (C_{ipso}-*Me*-Ts), 166.2 (C=O) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₂₁H₂₁NNaO₆S [M+Na]⁺: 438.0982
- Encontrada: 438.0982

1 α -Aminometil-1,2,5-tridesoxi-D-ribosa (26)



Líquido viscoso ligeramente amarillento

R_f : 0.28 (1% NH₃/MeOH)

Fórmula molecular: C₆H₁₃NO₂

Masa Molecular: 131.17 g/mol

IR (NaCl): 3383, 3054, 2985, 1265 cm⁻¹.

¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 1.16 (d, 3H, Me, $J = 6.2$ Hz), 1.60 (dt, 1H, H₂, $J = 13.0, 5.7$ Hz), 2.43 (m, 1H, H₂), 2.74 (d, 2H, H₆, $J = 5.2$ Hz), 3.89 (m, 2H, H₃+H₄), 4.11 (m, 1H, H₁) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ 18.9 (CH₃), 38.1 (C₂), 46.7 (C₆), 77.7 (C₁), 79.1, 82.4 (C₃+C₄) ppm.

EMAR (ESI⁺, m/z):

- Calculada para C₆H₁₄NO₂ [M+H]⁺: 132.1019
- Encontrada: 132.1017

Capítulo 3

Síntesis de 1'-homo-N-2'-desoxi- α -nucleósidos

Antecedentes

Como se ha puesto de manifiesto a lo largo de esta memoria, los análogos de nucleósidos se han identificado como una clase importante de compuestos activos en la búsqueda de fármacos para el tratamiento de tumores o infecciones virales.

Los nucleósidos naturales presentan el enlace *N*-glicosídico (Figura 28), resultado de la condensación entre el C1' del azúcar y uno de los nitrógenos de la base nitrogenada: el N1 si la base es pirimidínica o el N9 si es púrica.

Relacionado con la búsqueda de nuevos análogos de nucleósido, se han preparado derivados en los cuales se ha modificado dicho enlace, ya sea variando el átomo de unión de la base nitrogenada o bien mediante la elongación del enlace glicosídico a través de la inserción de distintos grupos de átomos.

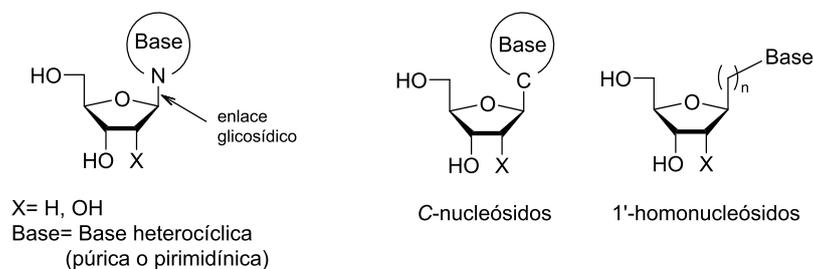


Figura 28. Estructura de los nucleósidos naturales, C-nucleósidos y 1'-homonucleósidos.

A.1. C-nucleósidos

Los C-nucleósidos, denominados también como C-glicósidos, son aquellos nucleósidos modificados que conectan el azúcar con la base heterocíclica nitrogenada mediante un enlace C-C en lugar del C-N natural.¹⁰⁵ Un ejemplo de este tipo de compuestos es la pseudouridina de la Figura 29, que fue el primer C-nucleósido en ser publicado en el año 1957.¹⁰⁶ Asimismo, uno de los más conocidos y que, curiosamente, nunca ha sido comercializado como agente terapéutico es la pirazofurina, citada por primera vez en 1975.¹⁰⁷

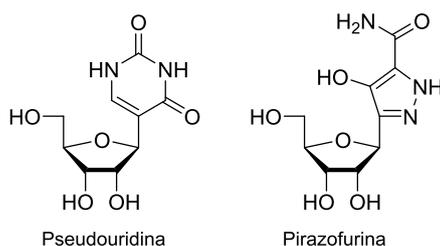


Figura 29. Nucleósidos con enlace C-glicosídico.

Al igual que ocurre con los análogos naturales, muchos de estos C-nucleósidos presentan propiedades antibióticas y algunos de ellos exhiben actividades anticancerígenas y antivirales.¹⁰⁸ Además, son buenos candidatos para su estudio como monómeros en oligonucleótidos y la consiguiente aplicación en terapia génica.¹⁰⁹

¹⁰⁵ a) M. H. D. Postema. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 8545-8599. b) E. D. Clercq. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 2301-2311.

¹⁰⁶ a) F. F. Davis, F. W. Allen. *J. Biol. Chem.* **1957**, *227*, 907-915. b) L. B. Townsend. *Chemistry of nucleosides and nucleotides* (Plenum Press, Nueva York) **1994**, 421-535.

¹⁰⁷ G. E. Gutowski, M. J. Sweeney, D. C. DeLong, R. L. Hamill, K. Gerzon, R. W. Dyke. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1975**, *255*, 544-551.

¹⁰⁸ a) P. S. Miller. *Antisense/Antigene Oligonucleotides*, in *Bioorganic Chemistry-Nucleic Acids*. (ed.); S. M. Hecht, Oxford University Press, **1996**, 347-374. b) J. Stambasky, M. Hocek, P. Kocovsky. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 6729-6764.

¹⁰⁹ R. V. Guntaka, B. R. Varma, K. T. Weber. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2003**, *35*, 22-31.

La característica más importante de este tipo de compuestos es la resistencia que presenta el enlace C-C frente a la hidrólisis y la degradación enzimática,¹¹⁰ evitando la escisión del enlace glicosídico.

A.2. Homonucleósidos

Otra clase de nucleósidos modificados son los llamados 1'-homonucleósidos, en los que el término *homo* hace referencia a la inserción de un grupo metileno entre el azúcar y la base nitrogenada.¹¹¹ Así, se hablará de un 1'-homo-*N*-nucleósido si la base está unida por el nitrógeno, o bien de 1'-homo-*C*-nucleósido si la base está unida por un átomo de carbono al correspondiente carbono C1' (Figura 30).

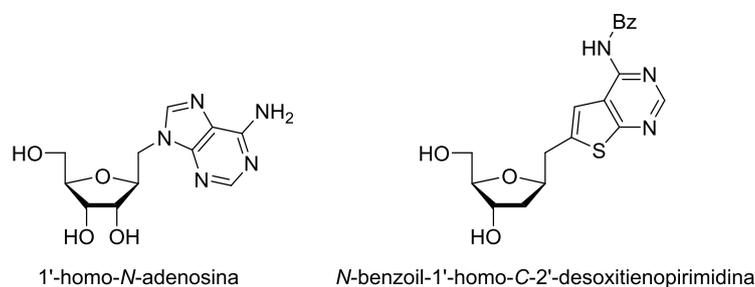


Figura 30. Estructuras de 1'-homo-*N*-nucleósido y 1'-homo-*C*-nucleósido.¹¹²

Estructuralmente, la inserción de una unidad de metileno entre el azúcar y la base dota de nuevas propiedades fisicoquímicas a los nucleósidos, afectando a las características estructurales de estas nuevas moléculas así como a su estabilidad y su actividad biológica.¹¹³

¹¹⁰ H. Togo, W. He, Y. Waki, M. Yokoyama. *Synlett* **1998**, 700-717.

¹¹¹ C. Lamberth. *Org. Prep. Proced. Int.* **2002**, *34*, 149-167.

¹¹² K Höfler, T. Zimmermann, D. P. Fuentes, C. Vogel, C. Meier. *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, *31*, 6841-6849.

¹¹³ M. Bobek, J. Farkas, F. Sorm. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1969**, *34*, 1684-1689.

Antecedentes

Cuando se compara con los nucleósidos naturales, la adición de un grupo metileno aumenta la separación entre el hidroxilo primario unido al C5' y los átomos de nitrógeno de la base heterocíclica. En otras palabras, disminuyen las interacciones estéricas y electrónicas entre la base y el anillo de azúcar, lo que proporciona una mayor libertad de rotación.

Estos homonucleósidos pueden ser fosforilados por las enzimas celulares e interactuar con otras bases para formar los correspondientes pares de bases de Watson y Crick. Al mismo tiempo, la incorporación de estos monómeros en oligonucleótidos reubica el espacio de apareamiento entre las bases debido a una mayor flexibilidad en la unidad CH₂-Base, lo que confiere en ocasiones una mayor estabilidad en los fragmentos de ADN en comparación con los fragmentos sintetizados con nucleósidos naturales.¹¹⁴ Por otra parte, al igual que ocurría con los C-nucleósidos, los homonucleósidos son resistentes a la hidrólisis por enzimas celulares.¹¹³

A.3. Síntesis de 1'-homo-N-nucleósidos

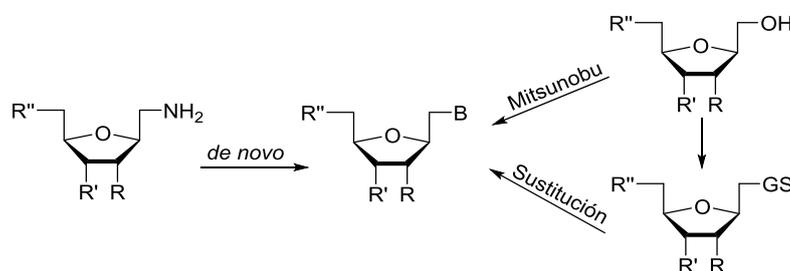
Respecto a la preparación de derivados homonucleosídicos, en la bibliografía se encuentran descritos numerosos métodos de síntesis. Se suelen emplear tres estrategias generales para la obtención de este tipo de compuestos, utilizando como material de partida sustratos que contienen el anillo de tetrahidrofurano funcionalizado en la posición C1' (Esquema 18).¹¹⁵

En el caso de los derivados 1'-aminometil, el átomo de nitrógeno formará parte del anillo de pirimidina (N1) o purina (N9). Esto se conoce como síntesis *de novo*, donde las bases nitrogenadas se construyen a partir del grupo amino.

¹¹⁴ Y. Okada, K. Shimada, Y. Kitano, K. Chiba. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, 7, 1371-1375.

¹¹⁵ A. E. Wróblewski, I. E. Glowacka, D. G. Piotrowska. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, 118, 121-142.

Por otro lado, los derivados que contienen un grupo 1'-hidroximetilo pueden convertirse en los correspondientes homonucleósidos a través de una reacción de Mitsunobu, en la que se introduce la base, o bien convertir el hidroxilo en un buen grupo saliente (GS) para realizar una posterior sustitución nucleófila con la nucleobase.

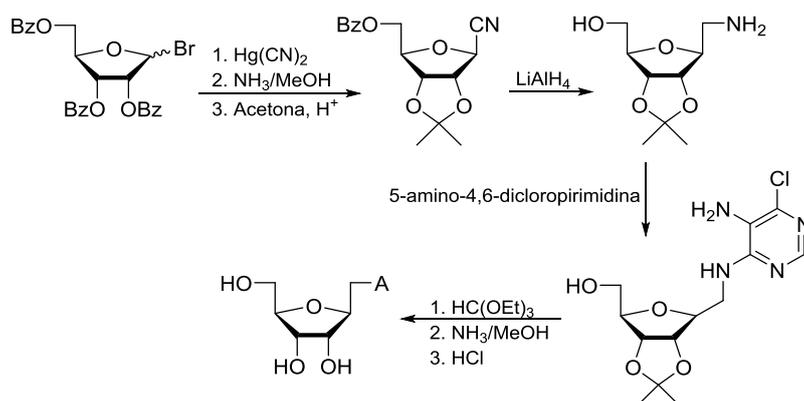


Esquema 18. Estrategias para la síntesis de homonucleósidos.

A continuación, se describen distintas rutas sintéticas para la preparación de 1'-homo- α/β -nucleósidos. Así, la preparación de 1'-homo-*N*- β -adenosina ha sido llevada a cabo por Montgomery y Hewson en 1970.¹¹⁶ Se trata de uno de los primeros métodos de síntesis de derivados de purina empleando la vía *de novo*.

Como se indica en el Esquema 19, el material de partida es el bromuro de la 2,3,5-tri-*O*-benzoil-D-ribosa, que se trata con cianuro de mercurio para sustituir el halógeno por el nitrilo. Posterior tratamiento con NH_3 en MeOH origina la desprotección de los alcoholes secundarios, para seguidamente proteger el 1,2-diol en forma de acetal cíclico. A continuación, la reducción del grupo nitrilo, la adición de una dicloropirimidina y la construcción final de la base de adenina conduce, tras la desprotección del diol con HCl, a la formación de 1'-homo-*N*- β -adenosina.

¹¹⁶ J. A. Montgomery, K. Hewson. *J. Heterocycl. Chem.* **1970**, 7, 443-445.

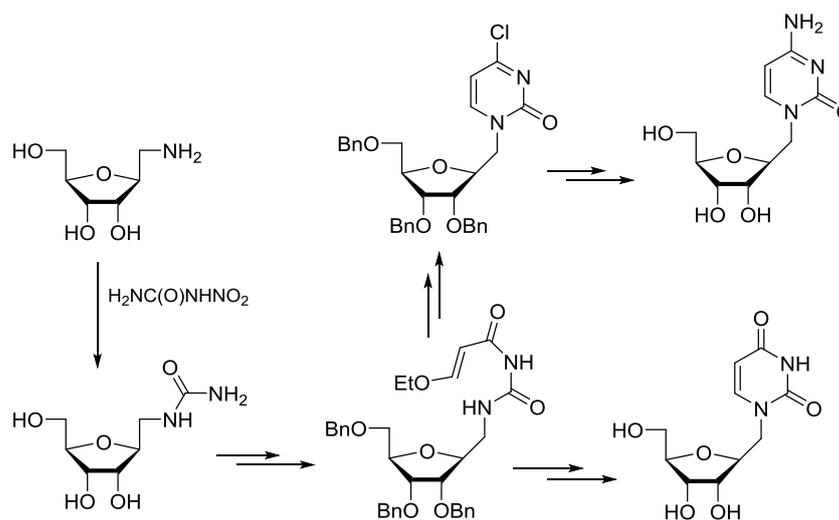


Esquema 19

Otra síntesis de derivados homo-pirimidínicos *vía de novo* es la descrita por Farkas en 1971,¹¹⁷ donde a partir del derivado 1-aminometil de la ribosa tiene lugar la formación de la correspondiente urea, como se indica en el Esquema 20. La protección de los grupos hidroxilo, seguida de una elongación de la cadena nitrogenada mediante una nueva alcanoilación, el cierre del ciclo en medio ácido y la desprotección de los alcoholes conduce a la 1'-homo-*N*- β -uridina.

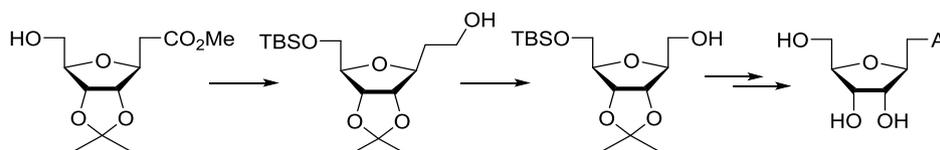
Para la obtención de la 1'-homo-*N*- β -citidina se emplea la misma síntesis, pero son necesarias dos etapas más de reacción, en las que el grupo carbonilo en C4 se transforma primero en cloro, mediante un tratamiento con SOCl_2 , y después en amino por reacción con NH_3 en MeOH .

¹¹⁷ J. Farkas. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1971**, 36, 3043-3046.



Esquema 20

La reacción de Mitsunobu también se ha utilizado en la preparación de un derivado de la 1'-homo-*N*- β -adenosina.¹¹⁸ A partir del éster metílico que se indica en el Esquema 21 (sintetizado a partir de la *D*-ribosa), se lleva a cabo la protección del grupo hidroxilo y la reducción del éster a alcohol. La transformación de este en mesilato, posterior eliminación formando un alqueno terminal, seguida de una ozonólisis y reducción del aldehído, dan lugar al alcohol que se indica en el esquema. A continuación, se introduce la adenina bajo las condiciones de Mitsunobu, obteniendo el derivado deseado tras la correspondiente desprotección de los grupos hidroxilo.



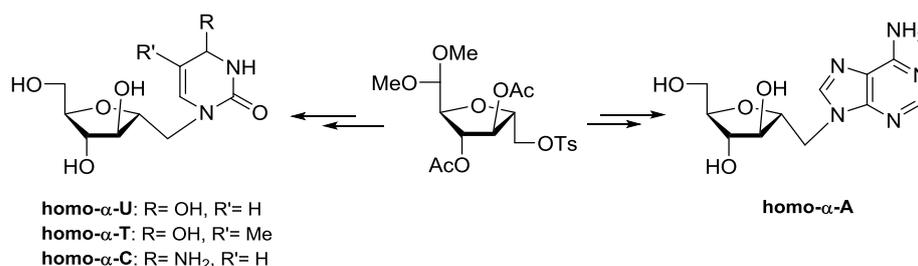
Esquema 21

¹¹⁸ J. Lee, S. U. Kang, S. Y. Kim, S. E. Kim, M. K. Kang, Y. J. Jo, S. Kim. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 961-964.

Antecedentes

En cuanto a la síntesis de derivados 1'-homo-*N*- α -nucleósidos también se encuentran descritas varias preparaciones, como la ruta propuesta por Winkley,¹¹⁹ el cual sigue un procedimiento *de novo*, muy parecido al descrito en el Esquema 19, para la obtención de distintos anómeros α .

En otra estrategia sintética, Angibeaud y col.¹²⁰ preparan, a partir de un intermedio tosilado, varios derivados 1'-homo-*N*- α -nucleósidos (Esquema 22).



Esquema 22

Por otra parte, en la bibliografía están descritas muy pocas rutas sintéticas para los 1'-homo-*N*-2'-desoxinucleósidos, estas son más escasas en comparación con los 1'-homo-*N*-nucleósidos anteriormente detallados. Así, Hossain y col.¹²¹ describen la preparación de 1'-homo-*N*-2'-desoxi- β -nucleósidos a partir de la 2'-desoxirribosa.

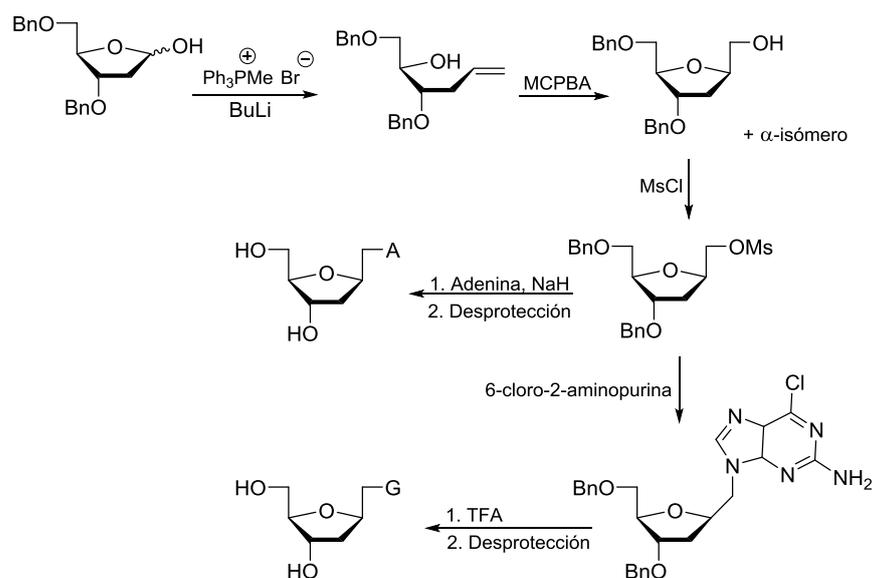
El proceso transcurre mediante la apertura del azúcar, generando un alqueno terminal, que se epoxida y tiene lugar el cierre del anillo, formándose el intermedio 1'-hidroximetil que se detalla en el Esquema 23. Al tratar este derivado con MsCl se obtiene el mesilato, que finalmente

¹¹⁹ M. W. Winkley. *Carbohydr. Res.* **1973**, *31*, 245-254.

¹²⁰ P. Angibeaud, J. Defaye, H. Franconie. *Carbohydr. Res.* **1980**, *78*, 195-204.

¹²¹ N. Hossain, N. Blaton, O. Peeters, J. Rozenski, P. A. Herdewijn. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 5563-5578.

experimenta la reacción de sustitución por la base nitrogenada, aislándose los correspondientes 1'-homo-*N*-2'-desoxi- β -nucleósidos.

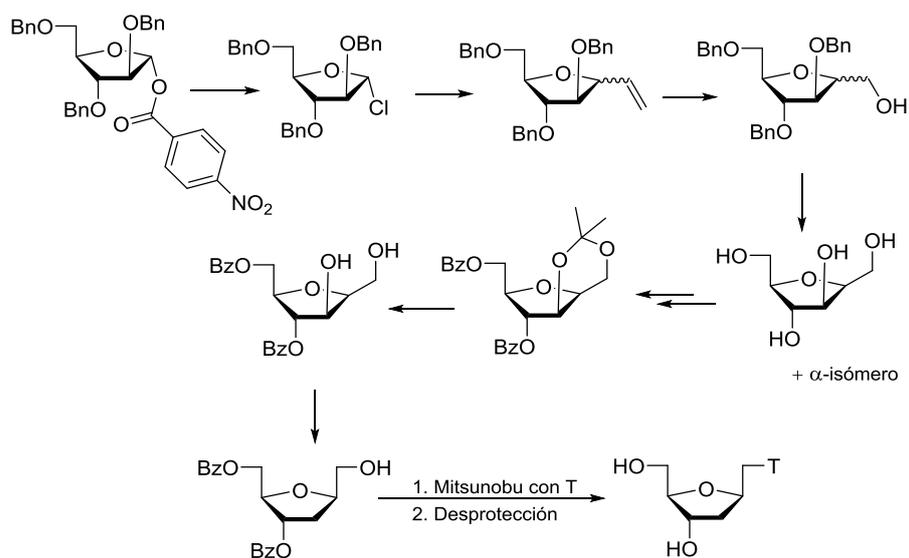


Esquema 23

Para la preparación de los derivados 1'-homo-*N*-2'-desoxinucleósidos también se ha utilizado como material de partida la ribosa (Esquema 24).¹²² Tras varias etapas de reacción se obtiene una mezcla epimérica α y β del intermedio tetrahidroxilado, en la que el epímero β presenta una configuración *cis* respecto al grupo hidroxilo de la posición C2'. De esta manera, se puede proteger el 1,3-diol en forma de acetal cíclico sólo del anómero β y así realizar la separación del isómero α .

La síntesis continúa con la deshidratación del alcohol en la posición 2' y la reacción de Mitsunobu con la timina, aislándose la 1'-homo-*N*- β -timidina.

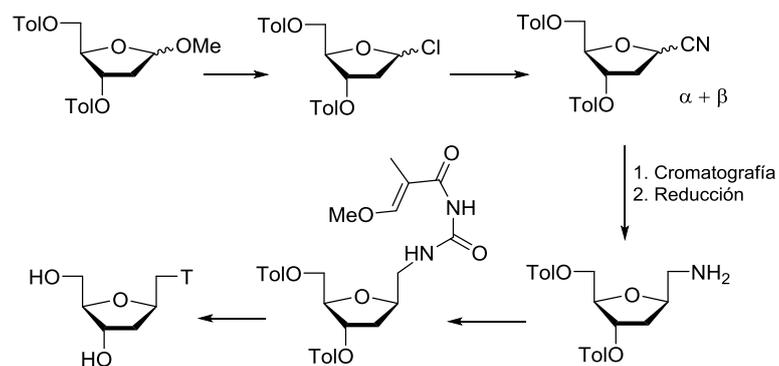
¹²² a) B. Doboszewski. *Nucleosides Nucleotides* **1997**, 16, 1049-1052. b) B. Doboszewski. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2009**, 28, 875-901.



Esquema 24

La preparación de la 1'-homo-*N*- α -timidina ha sido descrita por Boal y col.¹²³ Se trata de una síntesis *de novo* para la obtención de los anómeros α y β de 1'-homo-*N*-timidina (Esquema 25). El sustrato de partida se transforma en una mezcla equimolar de anómeros α y β del cianoazúcar correspondiente. Estos anómeros se separan por cromatografía de columna y se reduce selectivamente el grupo ciano para generar el derivado 1-aminometil. A continuación, con la formación del derivado de acrilourea y posterior ciclación, se accede a los análogos 1'-homo-*N*- α -timidina o 1'-homo-*N*- β -timidina.

¹²³ J. H. Boal, A. Wilk, C. L. Scremin, G. N. Gray, L. R. Phillips, S. L. Beaucage. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 8617-8626.



Esquema 25

Cabe destacar que es la única ruta sintética encontrada en la bibliografía para la preparación de 1'-homo-N-2'-desoxy- α -nucleósidos.

Objetivos

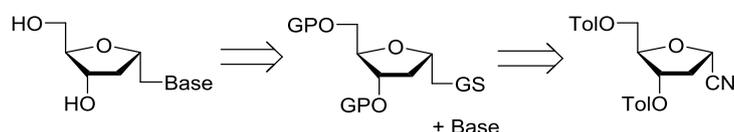
En vista del interés médico y farmacológico que presentan los 1'-homo-N-nucleósidos, en este capítulo nos planteamos como objetivo la síntesis de nuevos derivados de 1'-homo-N-2'-desoxi- α -nucleósidos a través de una ruta sencilla y que sea de aplicación general para todas las bases hererocíclicas.

Como ha quedado patente en los antecedentes, únicamente se ha descrito la síntesis de la 1'-homo-N- α -timidina. Por ello, será muy importante el desarrollo de una ruta sintética para la preparación de los distintos análogos 1'-homo-N-2'-desoxi- α -nucleósidos con las diferentes bases nitrogenadas naturales.

El estudio se centrará en la búsqueda de un procedimiento sintético general para la obtención de los anómeros α -homo, para utilizarlos posteriormente en estudios de sus actividades antitumorales o antivirales, así como para la preparación de oligonucleótidos con el propósito de analizar la influencia que tiene este cambio estructural en la formación de híbridos de ADN y ARN.

Resultados y discusión

Para sintetizar los análogos 1'-homo-*N*-2'-desoxinucleósidos, se utiliza una estrategia retrosintética (Esquema 26) basada en la introducción de las bases nitrogenadas, tanto púricas como pirimidínicas, mediante un proceso de sustitución nucleófila sobre un alcohol activado con un buen grupo saliente. Como material de partida se utilizará el mismo cianoazúcar que se usó en el Capítulo 2, ya que es comercialmente accesible y posee el grupo ciano en posición α , por lo que las consiguientes modificaciones no deben afectar a la configuración de dicho enlace.



Esquema 26. Retrosíntesis de 1'-homo-*N*-2'-desoxi- α -nucleósidos (GP= Grupo Protector; GS= Grupo Saliente).

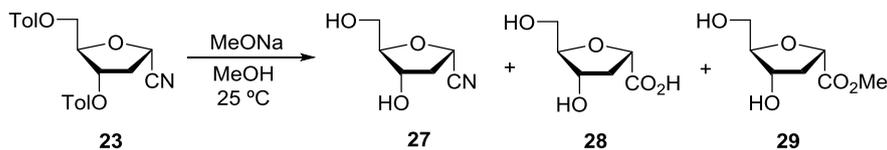
La ruta sintética constará de tres etapas fundamentales: 1) preparación del anillo del azúcar adecuado; 2) acoplamiento de las bases nitrogenadas al citado azúcar; y 3) desprotección de los grupos protectores para aislar los correspondientes 1'-homo-*N*-2'-desoxinucleósidos.

1. Modificaciones en el anillo de tetrahidrofurano

Aprovechando que los grupos hidroxilo del cianoazúcar de partida están protegidos como ésteres de toluilo (Tol), la primera idea es transformar el nitrilo en alcohol, pasando por un grupo éster, para posteriormente transformarlo en un buen grupo saliente.

Resultados y discusión

Para realizar la hidrólisis del grupo ciano, en primer lugar se utilizó un medio básico, tal como se había descrito previamente en otras síntesis de derivados de nucleósido.¹²⁴ Así, el tratamiento del 2-cianoazúcar **23** con MeONa/MeOH da lugar a una mezcla de tres compuestos que son consecuencia de la desprotección de los ésteres de toluoilo (producto **27**), hidrólisis adicional del nitrilo a ácido (derivado **28**) y formación del éster de metilo (compuesto **29**) (Esquema 27).



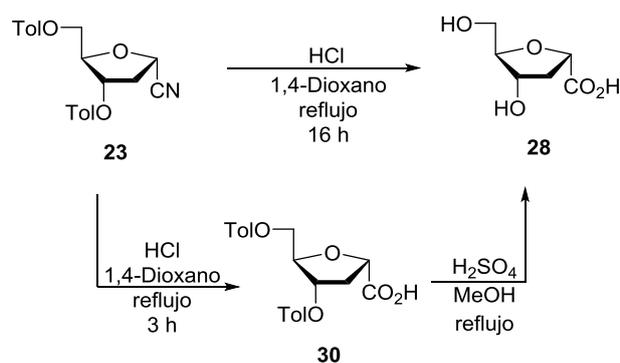
Esquema 27

Con el fin de evitar la desprotección de los grupos hidroxilos, se lleva a cabo la hidrólisis del grupo ciano en medio ácido. Esto supondrá una etapa adicional para obtener el éster correspondiente, que será el que utilizaremos posteriormente para reducirlo a alcohol. Así, utilizando las condiciones de Duca y col.,¹²⁵ es decir, HCl en 1,4-dioxano a reflujo, se obtiene al cabo de 3 h el ácido carboxílico **30** con un 85% de rendimiento. Tiempos más prolongados de reacción conducen al producto **28**, resultado de la desprotección de los grupos Tol (Esquema 28).

A continuación, se intenta transformar el ácido en el éster de metilo. Sin embargo, las condiciones estándar de esterificación de un ácido carboxílico, empleando ácido sulfúrico en metanol, no proporcionaron el éster deseado, sino que tuvo lugar la desprotección de los grupos hidroxilos, generando el dihidroxiácido **28**.

¹²⁴ a) Q. Dang, Z. Zhang, Y. Bai, R. Sun, J. Yin, T. Chen, S. Bogen, V. Girjavallabhan, D. B. Olsen, P. T. Meinke. *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 5576-5579. b) Y. Kitamura, K. Edayoshi, Y. Kitade. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 6987-6989.

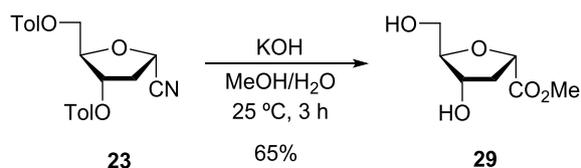
¹²⁵ M. Duca, V. Malnuit, F. Barbault, R. Benhida. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 6162-6164.



Esquema 28

Así pues, las condiciones utilizadas hasta el momento nos indican que el grupo toluoilo es susceptible de desprotección tanto en medios ligeramente básicos como en algunas condiciones ácidas. Por tanto, el uso de un nuevo grupo protector para los alcoholes en C3 y C5 es imprescindible.

Para la desprotección de los grupos toluoilo se aplican las condiciones previamente descritas en la bibliografía.¹²⁶ Así, el tratamiento del compuesto **23** con KOH en una mezcla MeOH/agua proporciona el correspondiente éster **29** con un 65% de rendimiento (Esquema 29). Cabe resaltar que es un buen rendimiento si se tiene en cuenta que se trata de 2 etapas de reacción, ya que además de la desprotección del toluoilo ha tenido lugar la transformación del ciano en el éster de metilo.

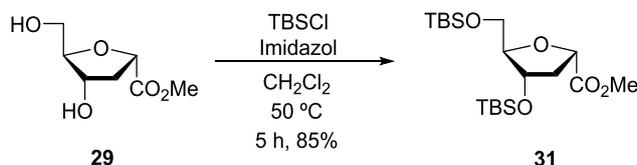


¹²⁶ C. L. Scremin, J. H. Boal, A. Wilk, L. R. Phillips, S. L. Beaucage. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 207-212.

Esquema 29

La siguiente etapa es la protección de los alcoholes para evitar interferencias de reactividad en las sucesivas etapas. Los éteres de silicio son grupos protectores estables en condiciones básicas y en determinados medios ácidos, necesitando para su desprotección selectiva una fuente de fluoruros (TBAF o ácido fluorhídrico). Para su formación se emplea el cloruro de *tert*-butildimetilsililo (TBSCl) en presencia de imidazol y DMF como disolvente. Tras 5 h de reacción a 50 °C, se consiguió la protección de ambos grupos hidroxilo con un 84% de rendimiento del producto deseado.

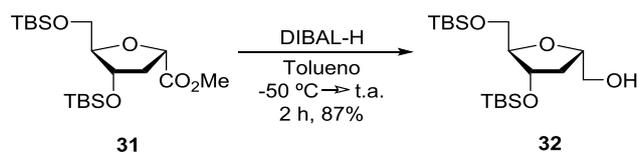
Debido a que la DMF es un disolvente con un punto de ebullición muy alto (153 °C), su completa eliminación una vez finalizada la reacción resulta complicada. Además, es un disolvente que se hidroliza con relativa facilidad en ácido fórmico y dimetilamina. Por todo esto, se estudia la reacción con un disolvente más fácil de eliminar y apto para dicha etapa, como por ejemplo el diclorometano (CH₂Cl₂). Como se puede ver en el Esquema 30, sustituyendo la DMF por CH₂Cl₂ anhidro, se obtiene el compuesto **31** con un 85% de rendimiento en el mismo tiempo de reacción.



Esquema 30. Protección de alcoholes utilizando TBSCl.

A continuación, se lleva a cabo la reducción del grupo éster a alcohol. Para ello, se emplea un agente reductor como el hidruro de diisobutilaluminio (DIBAL-H), que a pesar de ser un reductor para formar aldehídos, con un exceso de equivalentes se consigue la reducción total del éster. Así, el tratamiento de **31** con DIBAL-H (1.0 M en tolueno) y tolueno

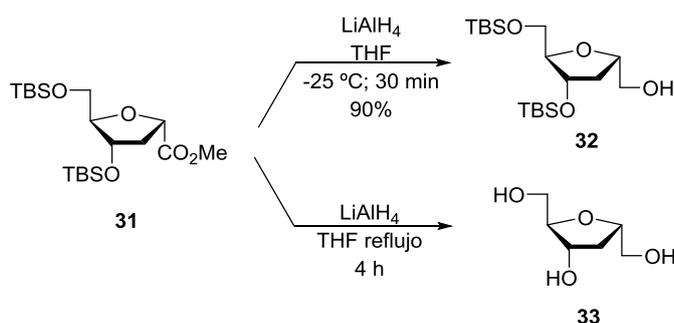
como disolvente, da lugar al alcohol **32** con un 87% de rendimiento en 2 h (Esquema 31).



Esquema 31. Reducción de un éster con DIBAL-H.

En esta etapa se observó que el control de la temperatura es un aspecto crucial, siendo necesario iniciar la reacción a -50 °C hasta alcanzar paulatinamente temperatura ambiente. Partiendo de temperaturas inferiores, -70 y -60 °C, la reacción se ralentizaba y no se obtenían conversiones completas; mientras que a temperaturas superiores se observó la formación de un subproducto que no pudo identificarse por RMN. Además, la utilización de otros disolventes en lugar del tolueno, como 1,4-dioxano o Et₂O, tampoco mejoraron los resultados obtenidos.

Pese a tener las condiciones optimizadas, se obtuvieron problemas de reproducibilidad, logrando en determinados casos excelentes rendimientos, y en otros, resultados menos satisfactorios. Por ello, se pensó en cambiar el agente reductor al LiAlH₄. En primer lugar, se probaron las condiciones que se usaron en el capítulo anterior, donde el LiAlH₄ se utiliza en THF a reflujo (66 °C). Estas fueron tan drásticas, que se desprotegieron incluso los éteres de silicio, proporcionando el triol **33** que se indica en el Esquema 32.



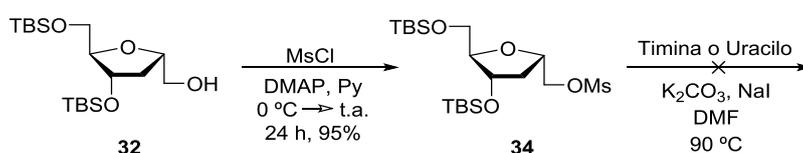
Esquema 32. Distintos productos en la reducción con LiAlH_4 .

Por consiguiente, se disminuyeron los equivalentes del agente reductor a la mitad (1.3 equiv), y también se disminuyó la temperatura de reacción hasta $-25\text{ }^\circ\text{C}$. Afortunadamente, en estas condiciones sí tuvo lugar la reducción del grupo éster sin verse afectados los grupos protectores. La reacción se completó en 30 min, obteniéndose el compuesto **32** con un rendimiento del 90%.

2. Acoplamiento de las bases

Una vez tenemos el alcohol **32**, nos planteamos las diferentes opciones para su acoplamiento con las bases heterocíclicas nitrogenadas. A continuación, se indican las estrategias propuestas y llevadas a cabo para dicho fin.

En primer lugar, se activa el alcohol como mesilato para que como buen grupo saliente, favorezca la sustitución del grupo mesilo por la base nitrogenada. Así, la transformación del alcohol **32** al mesilato **34** se obtiene de forma casi cuantitativa tras 24 h, empleando MsCl en presencia de DMAP y piridina como disolvente (Esquema 33).



Esquema 33

Para llevar a cabo el acoplamiento de las bases se aplican las condiciones de Saladino y col.,¹²⁷ en las que se introducen las bases timina y uracilo en 1'-homo-*N*-β-nucleósidos. De este modo, el mesilato **34** se hace reaccionar con carbonato potásico, yoduro de sodio y la base nitrogenada correspondiente (timina o uracilo) utilizando DMF como disolvente a 90 °C. Sin embargo, en nuestro caso prácticamente no se observa conversión.

En lugar de emplear K₂CO₃, se decide probar con otra base más fuerte, como el hidruro de sodio (NaH). Estas condiciones, que ya habían sido utilizadas por Swamy y col.¹²⁸ para distintos análogos nucleosídicos, tampoco resultaron adecuadas para nuestro sustrato, ya que no se observa acoplamiento con la timina.

Antes de descartar alguna de estas reacciones de acoplamiento, se valora la utilización de un éter corona en el medio de reacción. Estos éteres imitan el comportamiento de las enzimas, reconociendo los iones alcalinos y atrayendo la carga positiva del metal, lo que implica que funcione como un catalizador, haciendo posible algunas reacciones o incrementando el rendimiento de otras. Por tanto, se elige nuevamente el K₂CO₃ como base junto al éter 18-corona-6, ya que dentro de este tipo de éteres es el que presenta mayor afinidad por el catión K⁺.

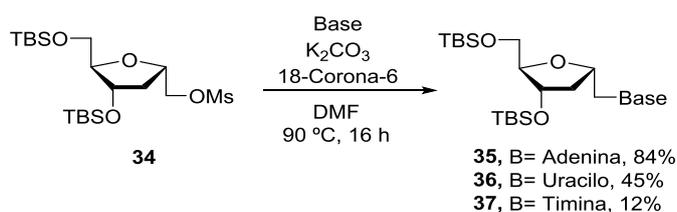
Bajo las condiciones que se detallan en el Esquema 34, los resultados que se obtuvieron fueron dispares dependiendo de la base nitrogenada. Cuando se intenta acoplar la adenina, se consiguió obtener la 1'-homo-*N*-2'-desoxi-α-adenosina protegida **35** con un 84% de rendimiento. Con el

¹²⁷ R. Saladino, V. Neri, P. Checconi, I. Celestino, L. Nencioni, A. T. Palamara, M. Crucianelli. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 2392-2404.

¹²⁸ N. R. Swamy, N. Suryakiran, P. P. Naidu, Y. Venkatesvarlu. *Carbohydr. Res.* **2012**, *352*, 191-196.

Resultados y discusión

uracilo, a pesar de producirse el acoplamiento, el rendimiento fue ligeramente inferior al 50%.



Esquema 34

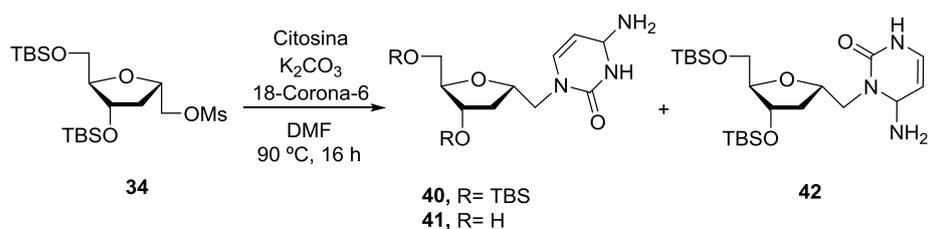
La disminución del rendimiento en el acoplamiento con uracilo se debe a que se forma como subproducto de la reacción el dímero **38**, integrado por dos moléculas del azúcar y una molécula de uracilo (Figura 31).



Figura 31. Dímero formado durante el acoplamiento de la timina y el uracilo.

La formación de este dímero también se observa cuando se pretende acoplar la timina como base nitrogenada. En las mismas condiciones, se obtiene alrededor de un 12% del producto deseado, mientras que un 55% se corresponde con el dímero **39**. Por otra parte, ligeras modificaciones en las condiciones no mejoraron la conversión de la reacción. Se comprobó que si se disminuye la temperatura hasta 70 °C, únicamente se aísla el dímero con un 60% de rendimiento.

Respecto al acoplamiento con la citosina, el método tampoco resultó ser positivo. Aunque no se produce la formación del dímero, se obtienen varios productos en el medio de reacción (Esquema 35).



Esquema 35. Acoplamiento con la citosina a través del azúcar-mesilato.

Así pues, en la reacción de acoplamiento de la citosina con el mesilato **34**, se aisló el producto deseado **40** con bajo rendimiento (en torno al 20%). También se observó la formación del producto acoplado desprotegido **41**, que al presentar el mismo R_f que la citosina no pudo separarse de esta por cromatografía de columna. Para la identificación de dicha estructura, esta mezcla se trató con TBSCl, separándose la citosina (que queda sin reaccionar) y del derivado **40**. En el proceso también se obtiene el compuesto **42**, un subproducto resultado del acoplamiento por la posición N3 de la citosina en lugar de la N1 habitual. La estructura de **42** se determinó mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear bidimensional. Así, en el espectro de HMBC (correlaciones entre carbono y protón separados dos o tres enlaces) del compuesto **40** (Figura 32), se observa un pico de cruce entre el protón H₆ y el CH₂ del enlace homo, mientras que para el compuesto **42** este punto de cruce no existe, ya que el H₆ se encuentra a más de tres enlaces de distancia del CH₂ (Figura 33).

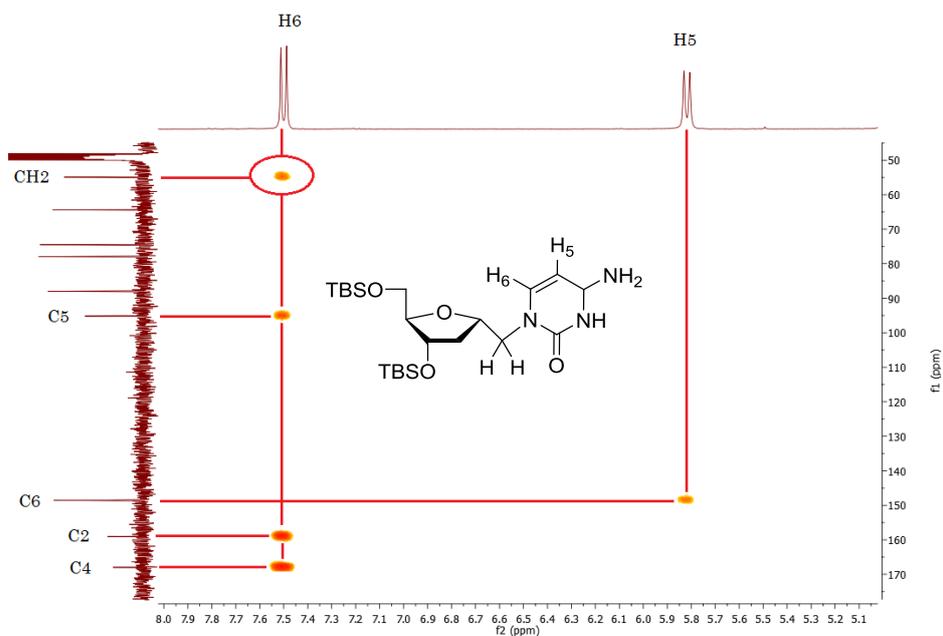


Figura 32. Ampliación del espectro de HMBC del compuesto 40.

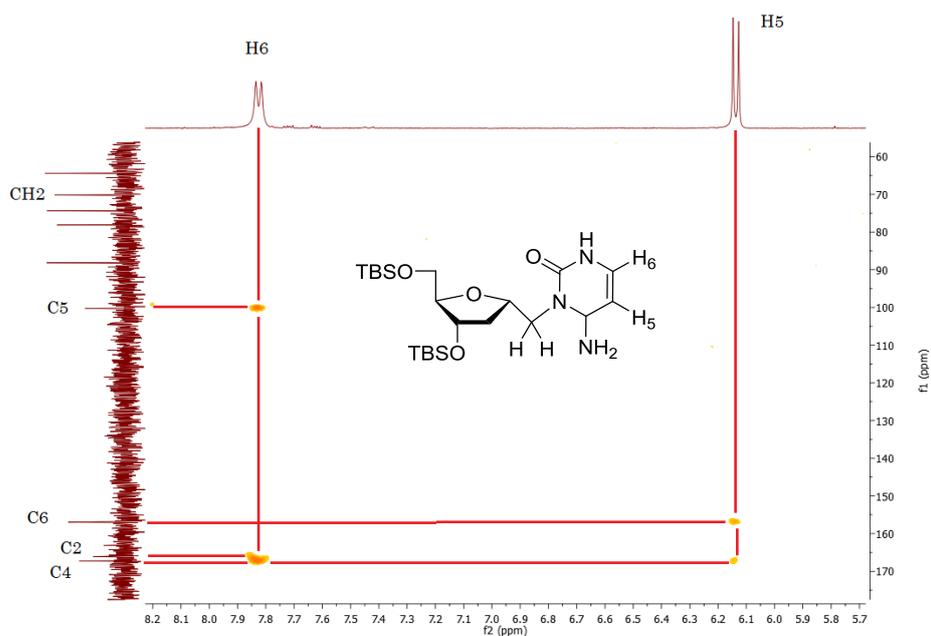
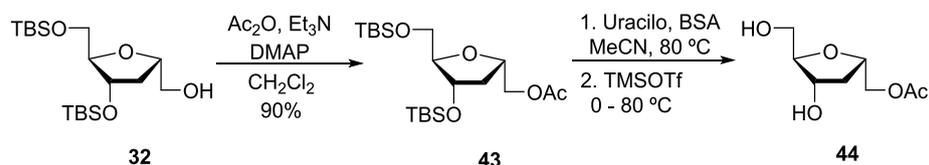


Figura 33. Ampliación del espectro de HMBC del compuesto 42.

Debido a los inconvenientes observados empleando un intermedio mesilado, y en nuestra búsqueda de una síntesis que sea apta para todas las bases nitrogenadas, se decide estudiar la reacción de acoplamiento a través de un intermedio acetilado.¹²⁹ La acetilación del alcohol **32** se lleva a cabo con anhídrido acético (Ac_2O), en presencia de Et_3N , DMAP y CH_2Cl_2 como disolvente. Después de 1.5 h a temperatura ambiente, se obtiene el acetato **43** con un 90% de rendimiento (Esquema 36).



Esquema 36

A continuación, se hace reaccionar **43** con el uracilo y con la *N,O*-bis(trimetilsilil)acetamida (BSA) en acetonitrilo a 80 °C durante 1 h y posterior adición de trimetilsilil trifluorometanosulfonato (TMSOTf) a 0 °C para finalmente alcanzar los 80 °C de temperatura. En estas condiciones no se obtiene el producto acoplado, sino el azúcar **44** resultado de la desprotección de los éteres de silicio.

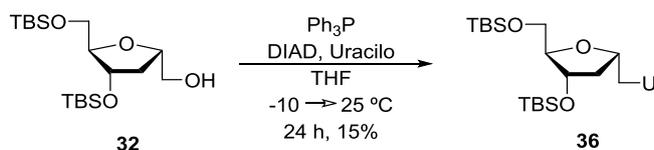
Descartada también la opción de emplear un intermedio acetilado, se decide aplicar las condiciones de Mitsunobu para el acoplamiento de las bases, pues se trata de una metodología ampliamente utilizada en la síntesis de derivados de nucleósido.¹³⁰

La reacción del alcohol **32** con el uracilo en presencia de Ph_3P y diisopropilazodicarboxilato (DIAD) proporciona el producto de

¹²⁹ a) V. K. Sharma, M. Kumar, D. Sharma, C. E. Olsen, A. K. Prasad. *J. Org. Chem.* **2014**, 79, 8516-8521. b) B. Kašnar, V. Škaric, B. Klaić, M. Žinić. *Tetrahedron Lett.* **1993**, 37, 4997-5000.

¹³⁰ U. S. Singh, R. C. Mishra, R. Shankar, C. K. Chu. *J. Org. Chem.* **2014**, 79, 3917-3923.

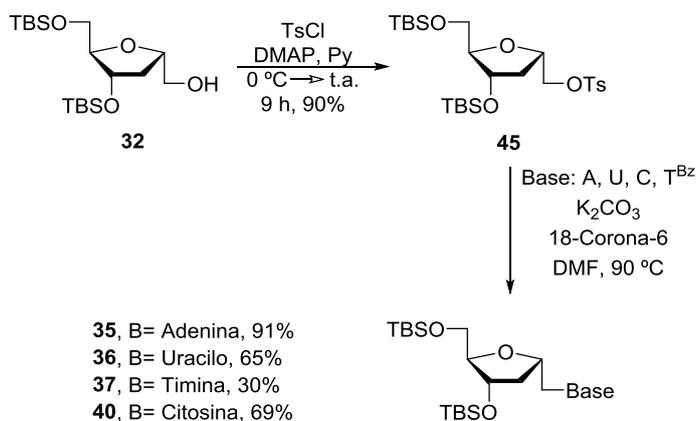
acoplamiento deseado **36**, aunque solo se aísla con un 15% de rendimiento debido a la formación de muchos subproductos que dificultaron el aislamiento del compuesto del crudo de reacción (Esquema 37).



Esquema 37

Los datos obtenidos hasta el momento reflejan que la estrategia que proporcionó mejores resultados ha sido el acoplamiento de las bases con un derivado mesilado del azúcar. Con el fin de incrementar el rendimiento de esta reacción se utiliza como alternativa un intermedio tosilado.

La tosilación del alcohol **32** se lleva a cabo con TsCl en presencia de DMAP y piridina como disolvente, aislándose el tosilato **45** tras 24 h con un 90% de rendimiento. Posteriormente, se estudió la unión de las distintas bases nitrogenadas (Esquema 38).



Esquema 38

El acoplamiento se realizó, en primer lugar, con la adenina, ya que era la que había proporcionado mejores resultados a través del mesilato. Por tanto, se emplearon las mismas condiciones: K_2CO_3 , 18-corona-6 y DMF como disolvente a una temperatura de 90 °C.

La reacción de **45** con adenina da lugar al compuesto acoplado **35** con excelentes rendimientos (91%). Aunque no hay mucha diferencia entre ambos métodos, sí se consigue mejorar ligeramente el rendimiento obtenido respecto al acoplamiento a través del mesilato.

Por otra parte, la citosina no se había logrado acoplar con éxito a través de los métodos anteriores. En las condiciones ya detalladas, se pudo obtener el derivado **40** con un 69% de rendimiento. Hay que mencionar que, pese a tratarse de un buen dato, este no es mayor porque existe una competencia hacia la formación del isómero **42**, correspondiente al ataque del N3 de la citosina. Se trata del mismo subproducto que se observó en la reacción a través del mesilato, pero con el tosilato se ha conseguido minimizar su presencia y, en consecuencia, se ha podido aumentar el rendimiento del producto deseado.

El acoplamiento con el uracilo proporcionó el derivado α -homo **36** con un 65% de rendimiento. Se observa una mejora significativa del rendimiento, ya que no se había conseguido superar el 45%. En este sentido, pese a variar ligeramente las condiciones de reacción (temperatura, equivalentes...), no se alcanzan mejores resultados, ya que siempre se observa la formación del dímero **38**, aunque en menor proporción.

Como ha quedado de manifiesto en los apartados anteriores, el uso de un intermedio tosilado ha ofrecido buenos resultados en el acoplamiento de la adenina, la citosina y el uracilo. Sin embargo, al utilizar esta ruta con la timina se obtiene nuevamente el dímero **39** como único producto de

Resultados y discusión

reacción. Se intentaron optimizar las condiciones (equivalentes, temperatura, base, etc.), pero siempre se obtuvo el mismo resultado.

Este hecho nos obligó a utilizar la timina protegida con el grupo benzoílo en posición N3. Para esta protección selectiva, los mejores resultados se dieron con las condiciones empleadas por Ludek y Meier,¹³¹ donde la timina se hace reaccionar con cloruro de benzoílo (BzCl) en una mezcla de acetonitrilo y piridina a temperatura ambiente. Tras 2 días de reacción, se obtiene la N3-benzoiltimina (T^{Bz}).

Como resultado del acoplamiento de **45** con la T^{Bz}, se aísla el derivado protegido 1'-homo-N- α -timidina **37** con un 30% de rendimiento. Es decir, al mismo tiempo que ha ocurrido el acoplamiento, también ha tenido lugar la desprotección del grupo benzoílo de la timina.

Cabe destacar que este rendimiento corresponde a las dos etapas de acoplamiento y desprotección de la base, por lo que no es un mal dato, teniendo en cuenta que se produce en una sola etapa.

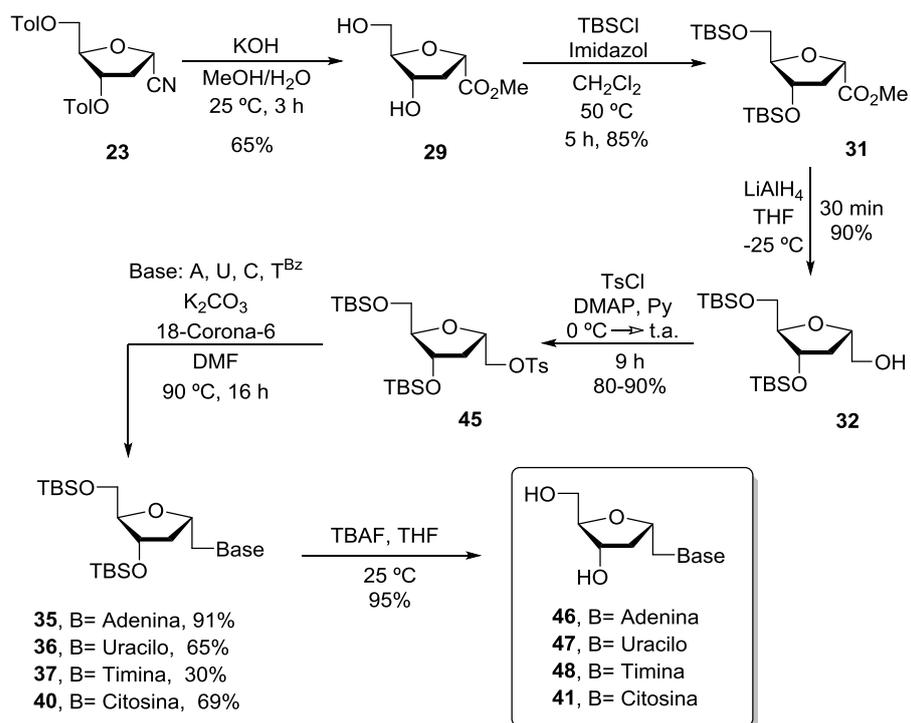
En último lugar, se intentó el acoplamiento de la guanina bajo las mismas condiciones en las que se consiguieron el resto de acoplamientos. Sin embargo, el crudo de reacción presentaba muchos subproductos que no pudieron aislarse ni identificarse.

3. Desprotección de los grupos hidroxilo

La desprotección de los grupos hidroxilo en los carbonos C3' y C5' tiene lugar mediante el empleo de fluoruro de tetrabutilamonio (TBAF) en THF a temperatura ambiente. La reacción tiene lugar en 2 h, aislándose los 1'-homo-N-2'-desoxi- α -nucleósidos con rendimientos casi cuantitativos

¹³¹ O. R. Ludek, C. Meier. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 4, 941-946.

para todas las bases estudiadas. La síntesis completa y optimizada queda resumida en el Esquema 39.



Esquema 39. Síntesis completa de 1'-homo-N-2'-desoxy- α -nucleósidos.

Conclusiones

En este capítulo, se ha descrito la síntesis de 1'-homo-*N*-nucleósidos, compuestos potencialmente muy importantes desde el punto de vista biológico, que presentan configuración α en el C1'.

La preparación de los α -homo-2'-desoxinucleósidos derivados de timina, uracilo, citosina y adenina, se ha llevado a cabo a través de una ruta sintética basada en el acoplamiento de las distintas bases nitrogenadas con un derivado del azúcar tosilado. Para la síntesis del precursor del azúcar se utiliza como sustrato de partida el α -cianoazúcar que ya se empleó en el Capítulo 2, pues se trata de un compuesto versátil que posee la estereoquímica requerida, además de ser accesible comercialmente.

Se han optimizado las condiciones de la reacción de acoplamiento, observándose que el derivado tosilado proporciona mejores resultados que el correspondiente mesilato en el proceso de sustitución con la base nitrogenada. Además, la presencia de un éter corona favorece el transcurso de la reacción.

Para sintetizar el derivado de timina, ha sido necesario proteger previamente la posición N3 de la base debido a la formación de un dímero a través de los dos nitrógenos libres presentes en la base nucleosídica.

La elucidación estructural de los distintos análogos se ha realizado mediante un exhaustivo estudio de RMN basado en el análisis de experimentos mono- y bidimensionales.

Parte experimental

1. Condiciones de trabajo, disolventes y reactivos

Los reactivos y métodos generales han sido detallados en la parte experimental de los Capítulos 1 y 2, con las siguientes excepciones:

- El CH₂Cl₂ se reflujo sobre hidruro cálcico.

2. Técnicas instrumentales

Las técnicas de análisis utilizadas han sido detalladas en la parte experimental del primer y segundo capítulo de esta memoria.

3. Procedimientos sintéticos y datos experimentales

A continuación, se describe de forma detallada el procedimiento seguido para la síntesis de cada uno de los productos que se han obtenido en este capítulo. También se recogen los datos experimentales que han permitido su caracterización.

El compuesto **30** ya ha sido previamente descrito.¹²⁵

3.1. Síntesis del éster de metilo 29

Sobre una disolución del α -cianoazúcar **23** (500 mg, 1.3 mmol) en MeOH (15 mL) se añaden 3.1 mL de una disolución de KOH 2.5 M (25% MeOH:H₂O). La reacción se agita a temperatura ambiente y se sigue por TLC (10% MeOH/CH₂Cl₂), necesitando 3 h hasta conversión completa. A continuación, se detiene la reacción mediante la adición de una resina DOWEX 50WX8 hasta neutralización del medio básico, comprobando el pH con papel indicador. Finalmente, se filtra la resina en placa y se evaporan los disolventes a presión reducida. Tras una purificación del crudo mediante cromatografía de columna en 5% MeOH/CH₂Cl₂, se obtiene **29** con un 65% de rendimiento.

3.2. Protección con TBSCl. Síntesis del derivado 31

A una disolución del éster **29** (210 mg, 1.2 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (4 mL) a temperatura ambiente y en atmósfera inerte, se añade imidazol (408.5 mg, 6 mmol) y TBSCl (904.3 mg, 6 mmol). A continuación, la mezcla se agita a 50 °C hasta conversión completa tras 5 h.

Una vez terminada, se añade agua/hielo a la mezcla de reacción y se realiza una extracción con CH₂Cl₂. La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄ se filtra y se concentra. El crudo se purifica, en caso de que fuera necesario, mediante columna cromatográfica utilizando como eluyente 10% AcOEt/hexano, aislándose **31** con un 85% de rendimiento.

3.3. Reducción con LiAlH₄. Síntesis del alcohol 32

Sobre una disolución de **31** (360 mg, 0.89 mmol) en THF anhidro (6 mL) a -25 °C y en atmósfera inerte, se añade LiAlH₄ (44 mg, 1.16 mmol) y se agita la reacción durante 30 min. A continuación, se añade AcOEt y MeOH, bajo agitación, para destruir el exceso de agente reductor y se filtra

sobre Celite[®]. Se eliminan disolventes y si se ha arrastrado algo de Celite[®] debido al MeOH, se añade CH₂Cl₂ y se vuelve a filtrar. El compuesto **32** se obtiene con rendimientos mayores del 90% y con la suficiente pureza para no requerir una purificación adicional.

3.4. Protección con MsCl. Síntesis del mesilato 34

Sobre una disolución de **32** (135 mg, 0.36 mmol) en piridina anhidra (0.65 mL) a 0 °C y en atmósfera inerte, se añade MsCl (62 µL, 0.8 mmol) y DMAP (catalítico). La reacción se completa tras 24 h. A continuación, se eliminan los disolventes a presión reducida y el crudo se disuelve en agua y se extrae con Et₂O. Las capas orgánicas se combinan, se secan con Na₂SO₄ y se evaporan a presión reducida, obteniéndose el producto **34** con un 95% de rendimiento. En caso, de no obtener el producto lo suficientemente puro, se purifica mediante columna cromatográfica adicional utilizando 20% AcOEt/hexano como eluyente.

3.5. Acoplamiento de 45 con las bases nitrogenadas. Síntesis de 35, 36, 37 y 40

Sobre una disolución de **45** en DMF anhidra a temperatura ambiente y en atmósfera inerte, se añade K₂CO₃, éter 18-corona-6 y la base nitrogenada correspondiente. La reacción se monitoriza por TLC (5% MeOH/CH₂Cl₂) hasta que se haya completado. Una vez terminada, se eliminan los disolventes bajo presión reducida y el crudo se purifica mediante cromatografía de columna utilizando 5% MeOH/CH₂Cl₂ como eluyente. A continuación, se indican las cantidades empleadas para cada base.

3.5.1. Acoplamiento con la adenina

Tosilato **45** (28 mg, 0.053 mmol) en DMF (0.53 mL), K₂CO₃ (11.1 mg, 0.08 mmol), éter 18-corona-6 (21.1 mg, 0.08 mmol), adenina (8.7 mg, 0.064 mmol). Tras 8 h se obtiene el compuesto deseado **35** con un 91% de rendimiento.

3.5.2. Acoplamiento con el uracilo

Tosilato **45** (20 mg, 0.038 mmol) en DMF (0.4 mL), K₂CO₃ (6.36 mg, 0.046 mmol), éter 18-corona-6 (15.1 mg, 0.057 mmol), uracilo (5.16 mg, 0.046 mmol). Tras 7 h se obtiene el compuesto deseado **36** con un 65% de rendimiento.

3.5.3. Acoplamiento con la citosina

Tosilato **45** (30 mg, 0.056 mmol) en DMF (0.56 mL), K₂CO₃ (11.75 mg, 0.085 mmol), éter 18-corona-6 (22.5 mg, 0.085 mmol), citosina (7.5 mg, 0.067 mmol). Tras 8 h se obtiene el compuesto deseado **40** con un 69% de rendimiento.

3.5.4. Acoplamiento con la timina (benzoilada)

Tosilato **45** (54 mg, 0.10 mmol) en DMF (1.0 mL), K₂CO₃ (29.6 mg, 0.214 mmol), éter 18-corona-6 (40.4 mg, 0.153 mmol), N³-benzoiltimina (28.1 mg, 0.12 mmol). Tras 8 h se obtiene el producto acoplado **37**, con la timina desprotegida, con un 30% de rendimiento.

La benzoilación de la timina se realizó siguiendo las condiciones descritas en el artículo *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, *4*, 941-946.

Sobre una suspensión de timina (252 mg, 2 mmol) en MeCN anhidro (3.3 mL), se añade piridina anhidra (728 μ L, 9 mmol) y BzCl (488 μ L, 4.2 mmol) gota a gota sobre la mezcla a 0 °C. Tras 10 min después de la adición, se alcanza temperatura ambiente y se deja reaccionando 48 h. A continuación, se añade MeOH (0.1 mL/mmol BzCl) y se deja una hora más. Después, se detiene la reacción y se evaporan los disolventes a presión reducida. El crudo obtenido se lava con tolueno y se vuelve a eliminar el disolvente (x 3). Se purifica mediante cromatografía de columna utilizando 50% Et₂O/hexano como eluyente, aislándose la T^{Bz} con un rendimiento del 55%.

3.6. Desprotección de los éteres de silicio. Síntesis de 41, 46, 47 y 48

A una disolución del correspondiente homonucleósido protegido **35**, **36**, **37** ó **40** (1 equiv) en THF anhidro (0.1 M) a 0 °C, se añaden 6 equiv de TBAF (1.0 M en THF). La reacción se deja agitando hasta alcanzar temperatura ambiente. Tras 2 h, se eliminan los disolventes y el crudo se purifica mediante columna cromatográfica (gradiente de eluyentes 15-20% MeOH/CH₂Cl₂). Los productos finales se obtienen con rendimientos del 95%.

3.7. Protección con Ac₂O. Síntesis del acetato 43

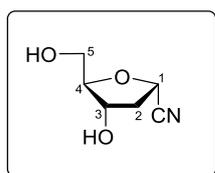
Sobre una disolución de **32** (44 mg, 0.12 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (1.2 mL) a temperatura ambiente y en atmósfera inerte, se adiciona Et₃N (50 μ L, 0.36 mmol), Ac₂O (170 μ L, 1.8 mmol) y DMAP (catalítico). La reacción se completa tras 2 h. A continuación, se eliminan los disolventes bajo presión reducida y el crudo se purifica mediante cromatografía de

columna utilizando 10% AcOEt/hexano como eluyente, aislándose el producto **43** con un 90% de rendimiento.

3.8. Protección con TsCl. Síntesis del tosilato 45

Sobre una disolución de **32** (100 mg, 0.26 mmol) en piridina anhidra (0.5 mL) a 0 °C y en atmósfera inerte, se añade TsCl (111.3 mg, 0.58 mmol) y DMAP (catalítico). La reacción se completa tras 9 h. A continuación, se eliminan los disolventes a presión reducida y el crudo se purifica mediante columna cromatográfica utilizando 10% Et₂O/hexano, obteniendo **45** con un 90% de rendimiento.

Cianuro de 2-desoxi- α -D-ribofuranosilo (27)



Líquido viscoso

R_f : 0.14 (50% MeOH/CH₂Cl₂)

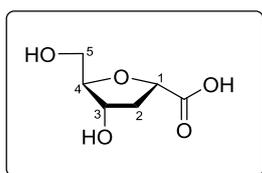
Fórmula molecular: C₆H₉NO₃

Masa Molecular: 143.14 g/mol

¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 2.01 (dt, 1H, H₂, $J = 13.0, 5.4$ Hz), 2.52 (ddd, 1H, H₂, $J = 13.1, 8.4, 6.6$ Hz), 3.53 (dd, 1H, H₅, $J = 11.7, 5.4$ Hz), 3.62 (dd, 1H, H₅, $J = 11.7, 4.0$ Hz), 3.99 (q, 1H, H₄, $J = 4.3$ Hz), 4.17 (dt, 1H, H₁, $J = 6.4, 4.6$ Hz), 4.43 (dd, 1H, H₃, $J = 8.4, 6.0$ Hz) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ 40.5 (C₂), 62.9 (C₅), 72.5 (C₁), 78.7 (C₃), 89.2 (C₄), 130.0 (CN) ppm.

Ácido 2-desoxi- α -D-ribofuranosilcarboxílico (28)



Líquido viscoso

R_f : 0.15 (20% MeOH/CH₂Cl₂)

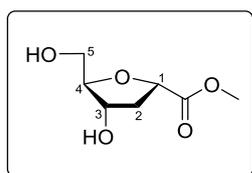
Fórmula molecular: C₆H₁₀O₅

Masa Molecular: 162.14 g/mol

¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 2.11 (dt, 1H, H₂, $J = 13.2, 3.9$ Hz), 2.49 (m, 1H, H₂), 3.59 (qd, 2H, H₅, $J = 11.9, 4.5$ Hz), 3.99 (q, 1H, H₄, $J = 4.1$ Hz), 4.24 (dt, 1H, H₁, $J = 6.7, 3.4$ Hz), 4.63 (dd, 1H, H₃, $J = 8.8, 4.2$ Hz) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ 39.6 (C₂), 63.1 (C₅), 72.7 (C₁), 77.3 (C₃), 88.5 (C₄), 175.7 (C=O) ppm.

2-Desoxi- α -D-ribofuranosilcarboxilato de metilo (29)



Líquido denso ligeramente amarillento

R_f : 0.22 (5% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₇H₁₂O₅

Masa Molecular: 176.07 g/mol

IR (NaCl): ν 3387, 2954 y 1738 cm⁻¹.

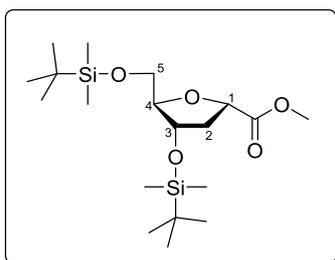
¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 2.11 (dt, 1H, H₂, $J = 13.2, 3.9$ Hz), 2.47 (ddd, 1H, H₂, $J = 13.2, 8.8, 6.2$ Hz), 3.59 (m, 2H, H₅), 3.73 (s, 3H, *Me*), 3.99 (q, 1H, H₄, $J = 4.2$ Hz), 4.23 (dt, 1H, H₁, $J = 6.3, 3.6$ Hz), 4.60 (dd, 1H, H₃, $J = 8.8, 4.2$ Hz) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ 39.7 (C₂), 52.5 (*Me*), 63.1 (C₅), 72.7 (C₁), 77.3 (C₃), 88.6 (C₄), 175.6 (C=O) ppm.

EM (ESI⁺, m/z):

- Calculada para C₇H₁₂NaO₅ [M+Na]⁺: 199.0577
- Encontrada: 199.0578

3,5-bis-O-(*tert*-Butildimetilsilil)-2-desoxi- α -D-
ribofuranosilcarboxilato de metilo (31)



Líquido viscoso

R_f : 0.65 (20% AcOEt/Hex)

Fórmula molecular: C₁₉H₄₀O₅Si₂

Masa Molecular: 404.69 g/mol

IR (NaCl): ν 2954, 2931, 2898, 2858, 1759 y 1737 cm⁻¹.

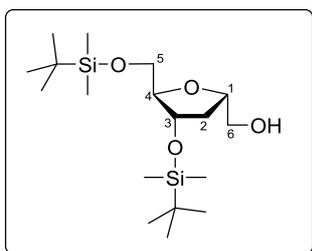
¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 0.08 (m, 12H, Si-*Me*), 0.87 (s, 9H, Si-*t*Bu), 0.92 (s, 9H, Si-*t*Bu), 2.16 (dt, 1H, H₂, $J = 13.0, 2.4$ Hz), 2.39 (ddd, 1H, H₂, $J = 13.0, 8.9, 5.2$ Hz), 3.53 (dd, 1H, H₅, $J = 11.0, 5.8$ Hz), 3.67 (dd, 1H, H₅, $J = 11.0, 3.8$ Hz), 3.71 (s, 3H, O-*Me*), 4.01 (ddd, 1H, H₄, $J = 5.7, 3.7, 2.0$ Hz), 4.36 (dt, 1H, H₁, $J = 5.2, 2.1$ Hz), 4.59 (dd, 1H, H₃, $J = 8.9, 2.7$ Hz) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ -5.3, -5.2 (2 Si-CH₃), -4.7, -4.6 (2 Si-CH₃), 18.7, 19.2 (2 Ccuat-*t*Bu), 26.2, 26.4 (6 *t*Bu-CH₃), 39.9 (C₂), 52.5 (Me), 64.3 (C₅), 74.2 (C₁), 77.7 (C₃), 89.5 (C₄), 175.4 (C=O) ppm.

EM (ESI⁺, m/z):

- Calculada para C₁₉H₄₀NaO₅Si₂ [M+Na]⁺: 427.2306
- Encontrada: 427.2302

3,5-bis-O-(*tert*-Butildimetilsilil)-2-desoxi- α -D-ribofuranosa
(32)



Líquido viscoso

R_f : 0.34 (20% AcOEt/Hex)

Fórmula molecular: $C_{18}H_{40}O_4Si_2$

Masa Molecular: 376.25 g/mol

IR (NaCl): ν 3456, 2955, 2930, 2887, 2858, 1472 y 1256 cm^{-1} .

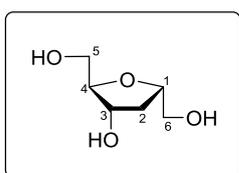
1H -RMN (300.13 MHz, MeOH- d_4): δ 0.08 (m, 6H, Si-Me), 0.10 (s, 6H, Si-Me), 0.91 (s, 9H, Si- t Bu), 0.92 (s, 9H, Si- t Bu), 1.73 (ddd, 1H, H₂, J = 12.8, 5.9, 4.8 Hz), 2.24 (ddd, 1H, H₂, J = 12.9, 7.5, 6.5 Hz), 3.54 (dd, 1H, H₆, J = 11.4, 4.6 Hz), 3.62 (m, 3H, 2H₅+H₆), 3.81 (q, 1H, H₄, J = 4.1 Hz), 4.13 (dtd, 1H, H₁, J = 7.5, 6.1, 4.6 Hz), 4.40 (ddd, 1H, H₃, J = 6.4, 4.7, 3.9 Hz) ppm.

^{13}C -RMN (75.5 MHz, MeOH- d_4): δ -5.3, -5.2 (2 Si-CH₃), -4.6, -4.5 (2 Si-CH₃), 18.8, 19.2 (2Ccuat- t Bu), 26.3, 26.4 (6 t Bu-CH₃), 37.9 (C₂), 64.4 (C₅), 66.0 (C₆), 74.4 (C₃), 80.9 (C₁), 87.9 (C₄) ppm.

EM (ESI⁺, m/z):

- Calculada para $C_{18}H_{40}NaO_4Si_2$ [M+Na]⁺: 399.2357
- Encontrada: 399.2358

2-Desoxi- α -D-ribofuranosa (33)



Líquido viscoso

R_f : 0.18 (20% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₆H₁₂O₄

Masa Molecular: 148.16 g/mol

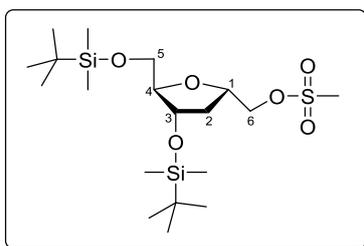
¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 1.74 (ddd, 1H, H₂, $J = 12.9, 6.4, 5.4$ Hz), 2.29 (dt, 1H, H₂, $J = 13.0, 7.2$ Hz), 3.52 (dd, 1H, H₅, $J = 11.7, 5.4$ Hz), 3.59 (m, 3H, H₅+2H₆), 3.82 (q, 1H, H₄, $J = 4.8$ Hz), 4.17 (m, 1H, H₁+H₃) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ 37.4 (C₂), 63.4 (C₅), 65.7 (C₆), 73.3 (C₃), 80.2 (C₁), 87.4 (C₄) ppm.

EM (ESI⁺, m/z):

- Calculada para C₆H₁₂NaO₄ [M+Na]⁺: 171.0628
- Encontrada: 171.0630

3,5-bis-O-(*tert*-Butildimetilsilil)-2-desoxi-1-metanosulfonil-
- α -D-ribofuranosa (34)



Líquido viscoso incoloro

R_f : 0.42 (20% AcOEt/Hex)

Fórmula molecular: $C_{19}H_{42}O_6SSi_2$

Masa Molecular: 454.77 g/mol

IR (NaCl): ν 2954, 2931, 2896, 2858, 1473, 1361 y 1256 cm^{-1} .

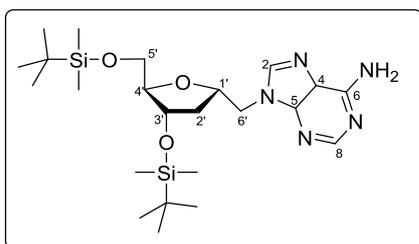
1H -RMN (300.13 MHz, MeOH- d_4): δ 0.08 (s, 6H, Si-*Me*), 0.11 (s, 6H, Si-*Me*), 0.92 (s, 18H, Si- tBu), 1.75 (dt, 1H, H₂, $J = 13.0, 3.9$ Hz), 2.32 (m, 1H, H₂), 3.09 (s, 3H, Ms-*Me*), 3.61 (qd, 2H, H₅, $J = 11.0, 4.6$ Hz), 3.89 (q, 1H, H₄, $J = 4.3$ Hz), 4.20 (m, 1H, H₆), 4.39 (m, 3H, H₁+ H₃+H₆) ppm.

^{13}C -RMN (75.5 MHz, MeOH- d_4): δ -5.3, -5.2 (2 Si-CH₃), -4.62, -4.57 (2 Si-CH₃), 18.8, 19.2 (2Ccuat- tBu), 26.3, 26.4 (6 tBu -CH₃), 37.5 (*Me*-Ms), 37.6 (C₂), 64.4 (C₅), 73.4 (C₆), 74.4 (C₃), 78.0 (C₁), 88.6 (C₄) ppm.

EM (ESI⁺, m/z):

- Calculada para $C_{19}H_{42}NaO_6SSi_2$ [M+Na]⁺: 477.2133
- Encontrada: 477.2134

3',5'-bis-O-(*tert*-Butildimetilsilil)-1'-homo-N-2'-desoxi-
- α -adenosina (35)



Sólido blanco

R_f : 0.32 (5% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₂₃H₄₃N₅O₃Si₂

Masa Molecular: 493.80 g/mol

IR (KBr): ν 2954, 2930, 2857, 2361, 2342, 1654, 1600 cm⁻¹.

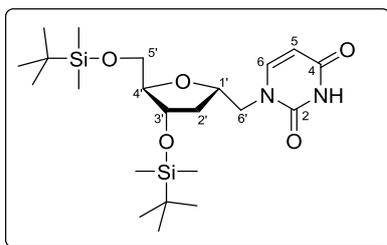
¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ -0.02 (s, 3H, Si-*Me*), 0.01 (s, 3H, Si-*Me*), 0.06 (s, 3H, Si-*Me*), 0.08 (s, 3H, Si-*Me*), 0.86 (s, 9H, Si-*t*Bu), 0.87 (s, 9H, Si-*t*Bu), 1.72 (dt, 1H, H_{2'}, $J = 13.1, 5.0$ Hz), 2.38 (dt, 1H, H_{2'}, $J = 13.4, 6.6$ Hz), 3.60 (d, 2H, H_{5'}, $J = 3.9$ Hz), 3.87 (q, 1H, H_{4'}, $J = 4.0$ Hz), 4.40 (m, 4H, H_{1'}+ H_{3'}+2H_{6'}), 8.09 (s, 1H, H₂) 8.20 (s, 1H, H₈) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ -5.3 (2 Si-CH₃), -4.6 (2 Si-CH₃), 18.9, 19.1 (2Ccuat-^tBu), 26.29, 26.34 (6 ^tBu-CH₃), 39.1 (C_{2'}), 48.9 (C_{6'}), 64.4 (C_{5'}), 74.6 (C_{3'}), 78.3 (C_{1'}), 88.3 (C_{4'}), 119.7 (C₄), 143.5 (C₂), 150.8 (C₅), 153.6 (C₈), 157.2 (C₆) ppm.

EM (ESI⁺, m/z):

- Calculada para C₂₃H₄₄N₅O₃Si₂ [M+H]⁺: 494.2977
- Encontrada: 494.2984

3',5'-bis-*O*-(*tert*-Butildimetilsilil)-1'-homo-*N*-2'-desoxi-
- α -uridina (36)



Sólido blanco

R_f : 0.49 (5% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₂₂H₄₂N₂O₅Si₂

Masa Molecular: 470.76 g/mol

IR (KBr): ν 2954, 2929, 2857, 1698, 1669 cm⁻¹.

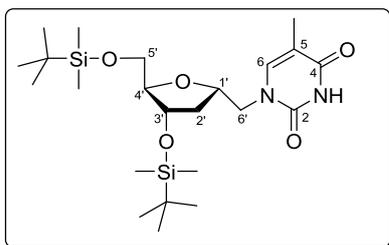
¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 0.05 (s, 3H, Si-*Me*), 0.06 (s, 3H, Si-*Me*), 0.11 (s, 6H, Si-*Me*), 0.90 (s, 9H, Si-*t*Bu), 0.92 (s, 9H, Si-*t*Bu), 1.70 (dt, 1H, H_{2'}, $J = 13.0, 4.9$ Hz), 2.32 (dt, 1H, H_{2'}, $J = 13.5, 6.9$ Hz), 3.62 (m, 2H, H_{5'}), 3.87 (m, 2H, H_{4'}+H_{6'}), 3.96 (dd, 1H, H_{6'}, $J = 14.1, 3.0$ Hz), 4.32 (m, 1H, H_{1'}), 4.43 (dt, 1H, H_{3'}, $J = 6.4, 3.8$ Hz), 5.62 (d, 1H, H₅, $J = 7.8$ Hz), 7.53 (d, 1H, H₆, $J = 7.9$ Hz) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ -5.3 (Si-CH₃), -5.2 (Si-CH₃), -4.6 (Si-CH₃), -4.5 (Si-CH₃), 18.9 (Ccuat-^tBu), 19.2 (Ccuat-^tBu), 26.3 (^tBu-CH₃), 26.4 (^tBu-CH₃), 38.9 (C_{2'}), 53.4 (C_{6'}), 64.4 (C_{5'}), 74.6 (C_{3'}), 78.1 (C_{1'}), 88.2 (C_{4'}), 101.6 (C₅), 148.4 (C₆), 152.9 (C₂), 166.8 (C₄) ppm.

EM (ESI⁺, m/z):

- Calculada para C₂₂H₄₂N₂NaO₅Si₂ [M+H]⁺: 493.2524
- Encontrada: 493.2529

3',5'-bis-*O*-(*tert*-Butildimetilsilil)-1'-homo-*N*- α -timidina
(37)



Sólido blanco

R_f : 0.16 (50% Et₂O/Hexano)

Fórmula molecular: C₂₃H₄₄N₂O₅Si₂

Masa Molecular: 484.78 g/mol

IR (KBr): ν 2954, 2930, 2857, 1689, 1672, 1471 cm⁻¹.

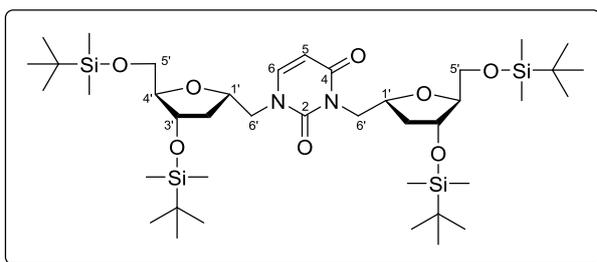
¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 0.05 (s, 3H, Si-*Me*), 0.06 (s, 3H, Si-*Me*), 0.11 (s, 6H, Si-*Me*), 0.90 (s, 9H, Si-*t*Bu), 0.92 (s, 9H, Si-*t*Bu), 1.70 (ddd, 1H, H_{2'}, $J = 12.9, 5.9, 4.5$ Hz), 1.86 (d, 3H, *Me*-H₅, $J = 1.1$ Hz), 2.32 (dt, 1H, H_{2'}, $J = 13.6, 6.6$ Hz), 3.62 (dd, 2H, H_{5'}, $J = 4.4, 1.9$ Hz), 3.88 (m, 3H, H_{4'}+2H_{6'}), 4.31 (m, 1H, H_{1'}), 4.41 (dt, 1H, H_{3'}, $J = 6.4, 4.4$ Hz), 7.37 (s, 1H, H₆) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ -5.3 (2 Si-CH₃), -4.6 (Si-CH₃), -4.5 (Si-CH₃), 12.3 (*Me*-C₅), 18.9 (Ccuat-^tBu), 19.2 (Ccuat-^tBu), 26.3 (^tBu-CH₃), 26.4 (^tBu-CH₃), 39.0 (C_{2'}), 53.1 (C_{6'}), 64.4 (C_{5'}), 74.6 (C_{3'}), 78.2 (C_{1'}), 88.2 (C_{4'}), 110.4 (C₅), 144.2 (C₆), 167.0 (C₂), 183.6 (C₄) ppm.

EM (ESI⁺, m/z):

- Calculada para C₂₃H₄₅N₂O₅Si₂ [M+H]⁺: 485.2861
- Encontrada: 485.2851

***N*¹,*N*³-bis-[3',5'-bis-*O*-(*tert*-Butildimetilsilil)-2'-desoxi- α -D-ribofuranosil]uridina (38)**



Sólido blanco

***R*_f**: 0.40 (20% AcOEt/Hex)

Fórmula molecular: C₄₀H₈₀N₂O₈Si₄

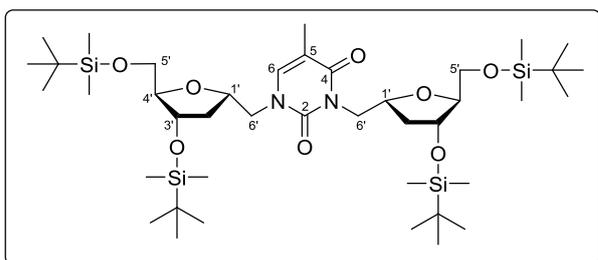
Masa Molecular: 829.43 g/mol

¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 0.04 (s, 6H, Si-*Me*), 0.05 (s, 3H, Si-*Me*), 0.06 (s, 3H, Si-*Me*), 0.11 (s, 12H, Si-*Me*), 0.89 (s, 9H, Si-*t*Bu), 0.90 (s, 9H, Si-*t*Bu), 0.92 (s, 9H, Si-*t*Bu), 0.93 (s, 9H, Si-*t*Bu), 1.74 (m, 2H, H_{2'}), 2.27 (m, 2H, H_{2'}), 3.60 (m, 4H, H_{5'}), 3.89 (m, 6H, 2H_{4'}+4H_{6'}), 4.38 (m, 4H, H_{1'}+ H_{3'}), 5.69 (d, 1H, H₅, *J* = 7.9 Hz), 7.51 (d, 1H, H₆, *J* = 7.9 Hz) ppm.

EM (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₄₀H₈₁N₂O₈Si₄ [M+H]⁺: 829.5064
- Encontrada: 829.5065

***N*¹,*N*³-bis-[3',5'-bis-*O*-(*tert*-Butildimetilsilil)-2'-desoxi- α -D-
-ribofuranosil]timina (39)**



Sólido blanco

***R*_f**: 0.50 (20% AcOEt/Hex)

Fórmula molecular: C₄₁H₈₂N₂O₈Si₄

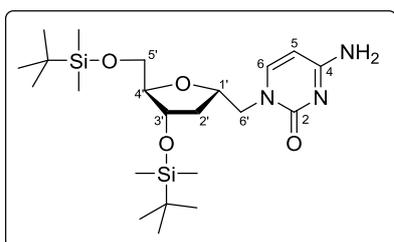
Masa Molecular: 843.45 g/mol

¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 0.04 (2s, 6H, Si-*Me*), 0.05 (2s, 6H, Si-*Me*), 0.11 (2s, 12H, Si-*Me*), 0.89 (2s, 18H, Si-*tBu*), 0.92 (s, 9H, Si-*tBu*), 0.93 (s, 9H, Si-*tBu*), 1.74 (m, 2H, H_{2'}), 1.89 (d, 3H, *Me*-C₅, *J* = 1.0 Hz), 2.27 (m, 2H, H_{2'}), 3.61 (m, 4H, H_{5'}), 3.87 (m, 6H, 2H_{4'}+4H_{6'}), 4.38 (m, 4H, H_{1'}+ H_{3'}), 7.37 (d, 1H, H₆, *J* = 1.0 Hz) ppm.

EM (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₄₁H₈₃N₂O₈Si₄ [M+H]⁺: 843.5221
- Encontrada: 843.5218

3',5'-bis-O-(*tert*-Butildimetilsilil)-1'-homo-N-2'-desoxi-
- α -citidina (40)



Sólido blanco

R_f : 0.22 (5% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₂₂H₄₃N₃O₄Si₂

Masa Molecular: 469.77 g/mol

IR (KBr): ν 2954, 2929, 2857, 1651, 1599 cm⁻¹.

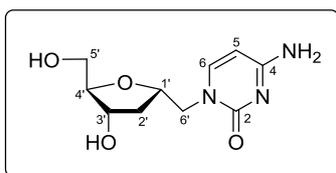
¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 0.04 (s, 3H, Si-*Me*), 0.05 (s, 3H, Si-*Me*), 0.11 (s, 6H, Si-*Me*), 0.89 (s, 9H, Si-*tBu*), 0.92 (s, 9H, Si-*tBu*), 1.68 (dt, 1H, H_{2'}, $J = 12.8, 5.2$ Hz), 2.32 (dt, 1H, H_{2'}, $J = 13.3, 6.8$ Hz), 3.61 (m, 2H, H_{5'}), 3.77 (dd, 1H, H_{6'}, $J = 13.7, 8.5$ Hz), 3.85 (q, 1H, H_{4'}, $J = 4.1$ Hz), 4.05 (dd, 1H, H_{6'}, $J = 13.8, 2.7$ Hz), 4.32 (m, 1H, H_{1'}), 4.41 (dt, 1H, H_{3'}, $J = 5.9, 4.2$ Hz), 5.82 (d, 1H, H₅, $J = 7.2$ Hz), 7.50 (d, 1H, H₆, $J = 7.2$ Hz) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ -5.3 (Si-CH₃), -5.2 (Si-CH₃), -4.6 (Si-CH₃), -4.5 (Si-CH₃), 18.9 (Ccuat-^tBu), 19.2 (Ccuat-^tBu), 26.3 (^tBu-CH₃), 26.4 (^tBu-CH₃), 39.0 (C_{2'}), 54.9 (C_{6'}), 64.4 (C_{5'}), 74.5 (C_{3'}), 78.0 (C_{1'}), 88.0 (C_{4'}), 95.2 (C₅), 148.5 (C₆), 159.0 (C₂), 168.0 (C₄) ppm.

EM (ESI⁺, m/z):

- Calculada para C₂₂H₄₄N₃O₄Si₂ [M+H]⁺: 470.2865
- Encontrada: 470.2868

1'-homo-N-2'-desoxi- α -citidina (41)



Sólido blanco higroscópico

R_f : 0.07 (15% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₁₀H₁₅N₃O₄

Masa Molecular: 241.25 g/mol

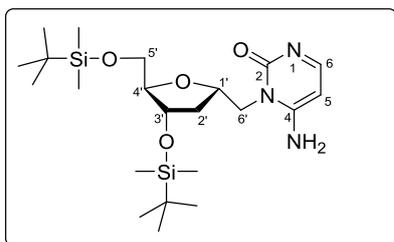
¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 1.68 (ddd, 1H, H_{2'}, $J = 13.1, 6.0, 5.2$ Hz), 2.33 (dt, 1H, H_{2'}, $J = 13.8, 7.0$ Hz), 3.50 (m, 1H, H_{5'}), 3.58 (dd, 1H, H_{5'}, $J = 11.8, 4.0$ Hz), 3.80 (m, 1H, H_{6'}), 3.84 (q, 1H, H_{4'}, $J = 4.5$ Hz), 4.04 (dd, 1H, H_{6'}, $J = 13.8, 3.1$ Hz), 4.24 (dt, 1H, H_{3'}, $J = 6.6, 4.9$ Hz), 4.36 (m, 1H, H_{1'}), 5.82 (d, 1H, H₅, $J = 7.2$ Hz), 7.58 (d, 1H, H₆, $J = 7.3$ Hz) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ 38.6 (C_{2'}), 54.7 (C_{6'}), 63.4 (C_{5'}), 73.3 (C_{3'}), 77.6 (C_{1'}), 87.4 (C_{4'}), 95.2 (C₅), 148.6 (C₆), 159.1 (C₂), 168.0 (C₄) ppm.

EM (ESI⁺, m/z):

- Calculada para C₁₀H₁₆N₃O₄ [M+H]⁺: 242.1135
- Encontrada: 242.1138

***N*³-bis-[3',5'-bis-*O*-(*tert*-Butildimetilsilil)-2'-desoxi- α -D-ribofuranosil]citidina (42)**



Sólido blanco

R_f: 0.48 (5% MeOH/CH₂Cl₂)

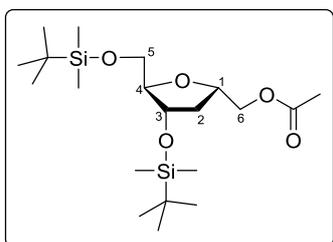
Fórmula molecular: C₂₂H₄₃N₃O₄Si₂

Masa Molecular: 469.77 g/mol

¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 0.07 (s, 3H, Si-*Me*), 0.08 (s, 3H, Si-*Me*), 0.09 (s, 3H, Si-*Me*), 0.10 (s, 3H, Si-*Me*), 0.90 (s, 9H, Si-^{*t*}*Bu*), 0.91 (s, 9H, Si-^{*t*}*Bu*), 1.86 (dt, 1H, H_{2'}, *J* = 12.9, 5.0 Hz), 2.31 (dt, 1H, H_{2'}, *J* = 13.4, 6.9 Hz), 3.62 (m, 2H, H_{5'}), 3.86 (q, 1H, H_{4'}, *J* = 4.0 Hz), 4.31 (m, 2H, H_{6'}), 4.42 (m, 2H, H_{1'}+ H_{3'}), 6.14 (d, 1H, H₅, *J* = 5.9 Hz), 7.83 (d, 1H, H₆, *J* = 5.8 Hz) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ -5.3 (Si-CH₃), -5.2 (Si-CH₃), -4.6 (Si-CH₃), -4.5 (Si-CH₃), 18.8 (Ccuat-^{*t*}*Bu*), 19.2 (Ccuat-^{*t*}*Bu*), 26.3 (^{*t*}*Bu*-CH₃), 26.4 (^{*t*}*Bu*-CH₃), 38.3 (C_{2'}), 64.4 (C_{5'}), 70.2 (C_{6'}), 74.4 (C_{3'}), 78.1 (C_{1'}), 88.2 (C_{4'}), 100.3 (C₅), 157.0 (C₆), 166.1 (C₂), 167.3 (C₄) ppm.

1-O-Acetil-3,5-bis-O-(*tert*-butildimetilsilil)-2-desoxi- α -D-
-ribofuranosa (43)



Sólido blanco

R_f : 0.65 (20% AcOEt/Hex)

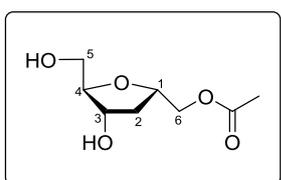
Fórmula molecular: C₂₀H₄₂O₅Si₂

Masa Molecular: 418.72 g/mol

¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 0.08 (2s, 6H, Si-*Me*), 0.10 (s, 6H, Si-*Me*), 0.91 (s, 9H, Si-*t*Bu), 0.92 (s, 9H, Si-*t*Bu), 1.71 (dt, 1H, H₂, $J = 13.1, 4.5$ Hz), 2.05 (s, 3H, OAc-*Me*), 2.28 (dt, 1H, H₂, $J = 13.6, 6.9$ Hz), 3.63 (m, 2H, H₅), 3.85 (q, 1H, H₄, $J = 3.9$ Hz), 4.05 (dd, 1H, H₆, $J = 10.9, 3.7$ Hz), 4.24 (m, 1H, H₆), 4.30 (m, 1H, H₁), 4.41 (dt, 1H, H₃, $J = 6.3, 3.7$ Hz) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ -5.3, -5.2 (2 Si-CH₃), -4.6, -4.5 (2 Si-CH₃), 18.8, 19.2 (2 Ccuat-*t*Bu), 20.8 (*Me*-Ac), 26.3, 26.4 (6 *t*Bu-CH₃), 38.1 (C₂), 64.4 (C₅), 68.1 (C₆), 74.4 (C₃), 78.1 (C₁), 88.4 (C₄), 172.6 (C=O) ppm.

1-O-Acetil-2-desoxi- α -D-ribofuranosa (44)



Sólido blanco

R_f: 0.22 (5% MeOH/CH₂Cl₂)

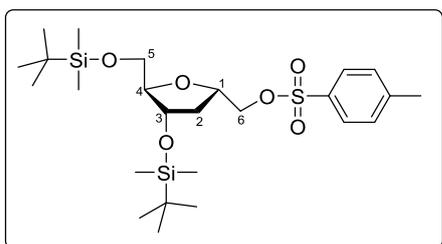
Fórmula molecular: C₈H₁₄O₅

Masa Molecular: 190.19 g/mol

¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 1.72 (ddd, 1H, H₂, *J* = 13.0, 6.4, 5.5 Hz), 2.06 (s, 3H, Ac-*Me*), 2.32 (dt, 1H, H₂, *J* = 13.1, 7.1 Hz), 3.57 (qd, 2H, H₅, *J* = 11.8, 4.5 Hz), 3.83 (q, 1H, H₄, *J* = 4.7 Hz), 4.08 (dd, 1H, H₆, *J* = 11.4, 3.9 Hz), 4.40-4.14 (m, 3H, H₁+ H₃+H₆) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ 20.7 (*Me-Ac*), 37.7 (C₂), 63.2 (C₅), 67.8 (C₆), 73.0 (C₃), 77.4 (C₁), 87.4 (C₄), 172.7 (C=O) ppm.

3,5-bis-*O*-(*tert*-Butildimetilsilil)-2-desoxi-1-(*p*-toluensulfonil)- α -D-ribofuranosa (45)



Líquido viscoso incoloro

R_f : 0.60 (20% AcOEt/Hex)

Fórmula molecular: $C_{25}H_{46}O_6SSi_2$

Masa Molecular: 530.87 g/mol

IR (NaCl): ν 2954, 2930, 2896, 2857, 1471, 1366 y 1255 cm^{-1} .

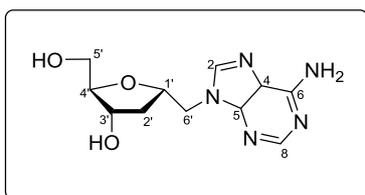
1H -RMN (300.13 MHz, MeOH- d_4): δ 0.04 (2s, 6H, Si-Me), 0.05 (s, 3H, Si-Me), 0.06 (s, 3H, Si-Me), 0.84 (s, 9H, Si- t Bu), 0.90 (s, 9H, Si- t Bu), 1.64 (dt, 1H, H₂, $J = 13.3, 3.4$ Hz), 2.21 (ddd, 1H, H₂, $J = 13.7, 8.1, 5.8$ Hz), 2.45 (s, 3H, Ts-Me), 3.46 (dd, 1H, H₅, $J = 10.9, 5.6$ Hz), 3.57 (dd, 1H, H₅, $J = 10.9, 3.8$ Hz), 3.69 (m, 1H, H₄), 3.98 (dd, 1H, H₆, $J = 10.0, 4.0$ Hz), 4.12 (dd, 1H, H₆, $J = 10.0, 7.6$ Hz), 4.21 – 4.35 (m, 2H, H₁+ H₃), 7.43 (d, 1H, Harom, $J = 8.5$ Hz), 7.79 (d, 1H, Harom, $J = 8.4$ Hz) ppm.

^{13}C -RMN (75.5 MHz, MeOH- d_4): δ -5.3, -5.2 (2 Si-CH₃), -4.6 (2 Si-CH₃), 18.7, 19.2 (2Ccuat- t Bu), 21.6 (Me-Ts), 26.3, 26.4 (6 t Bu-CH₃), 37.6 (C₂), 64.4 (C₅), 73.6 (C₆), 74.5 (C₃), 77.9 (C₁), 88.7 (C₄), 129.1 (2 CHarom), 131.0 (2 CHarom), 134.4 (Cipso), 146.3 (Cipso) ppm.

EM (ESI⁺, m/z):

- Calculada para $C_{25}H_{47}O_6SSi_2$ [M+H]⁺: 531.2626
- Encontrada: 531.2632

1'-homo-*N*-2'-desoxi- α -adenosina (46)



Sólido blanco

R_f : 0.18 (20% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₁₁H₁₅N₅O₃

Masa Molecular: 265.27 g/mol

IR (KBr): ν 2954, 2930, 2857, 2361, 2342, 1654, 1600 cm⁻¹.

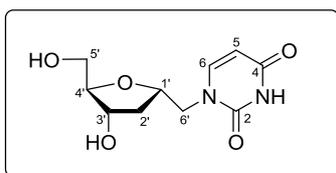
¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 1.69 (dt, 1H, H₂', $J = 13.1, 5.8$ Hz), 2.38 (dt, 1H, H₂', $J = 13.3, 6.7$ Hz), 3.50 (m, 1H, H₅'), 3.59 (dd, 1H, H₅', $J = 11.8, 3.9$ Hz), 3.85 (q, 1H, H₄', $J = 4.5$ Hz), 4.25 (dt, 1H, H₃', $J = 6.6, 5.2$ Hz), 4.38 (dd, 2H, H₆', $J = 6.3, 2.8$ Hz), 4.45 (m, 1H, H₁'), 8.16 (s, 1H, H₂) 8.20 (s, 1H, H₈) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ 38.5 (C₂'), 48.8 (C₆'), 63.3 (C₅'), 73.2 (C₃'), 77.8 (C₁'), 87.6 (C₄'), 119.7 (C₄), 143.6 (C₂), 150.8 (C₅), 153.6 (C₈), 157.2 (C₆) ppm.

EM (ESI⁺, m/z):

- Calculada para C₁₁H₁₆N₅O₃ [M+H]⁺: 266.1248
- Encontrada: 266.1251

1'-homo-N-2'-desoxi- α -uracilo (47)



Sólido blanco higroscópico

R_f : 0.13 (10% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₁₀H₁₄N₂O₅

Masa Molecular: 242.23 g/mol

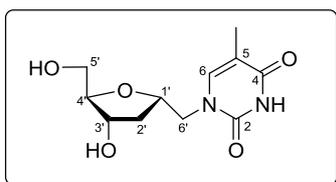
¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 1.70 (ddd, 1H, H_{2'}, $J = 13.1, 5.9, 4.9$ Hz), 2.33 (m, 1H, H_{2'}), 3.53 (m, 2H, H_{5'}), 3.87 (m, 2H, H_{4'}+H_{6'}), 3.96 (dd, 1H, H_{6'}, $J = 14.1, 3.4$ Hz), 4.25 (dt, 1H, H_{3'}, $J = 6.6, 4.6$ Hz), 4.34 (m, 1H, H_{1'}), 5.63 (d, 1H, H_{5'}, $J = 7.9$ Hz), 7.60 (d, 1H, H₆, $J = 7.9$ Hz) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ 38.4 (C_{2'}), 53.2 (C_{6'}), 63.3 (C_{5'}), 73.3 (C_{3'}), 77.7 (C_{1'}), 87.6 (C_{4'}), 101.6 (C₅), 148.5 (C₆), 153.0 (C₂), 166.9 (C₄) ppm.

EM (ESI⁺, m/z):

- Calculada para C₁₀H₁₄N₂NaO₅ [M+Na]⁺: 265.0795
- Encontrada: 265.0796

1'-homo-*N*- α -timidina (48)



Sólido blanco higroscópico

R_f : 0.40 (15% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₁₁H₁₆N₂O₅

Masa Molecular: 256.11 g/mol

¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 1.69 (m, 1H, H_{2'}), 1.87 (d, 3H, Me-H₅, $J = 1.1$ Hz), 2.33 (dt, 1H, H_{2'}, $J = 13.9, 7.1$ Hz), 3.55 (qd, 2H, H_{5'}, $J = 11.8, 4.6$ Hz), 3.87 (m, 3H, H_{4'}+2H_{6'}), 4.24 (dt, 1H, H_{3'}, $J = 6.6, 4.7$ Hz), 4.34 (m, 1H, H_{1'}), 7.44 (s, 1H, H₆, $J = 1.2$ Hz) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ 12.2 (CH₃), 38.5 (C_{2'}), 53.1 (C_{6'}), 63.4 (C_{5'}), 73.3 (C_{3'}), 77.7 (C_{1'}), 87.6 (C_{4'}), 110.4 (C₅), 144.3 (C₆), 153.1 (C₂), 167.0 (C₄) ppm.

EM (ESI⁺, m/z):

- Calculada para C₁₁H₁₇N₂O₅ [M+H]⁺: 257.1132
- Encontrada: 257.1134

Capítulo 4

Síntesis de oligonucleótidos con monómeros modificados de timidina que contienen un espaciador en el enlace glicosídico. Estudio de sus propiedades

Antecedentes

El descubrimiento de las propiedades que poseen los oligonucleótidos en el silenciamiento génico ha desencadenado grandes esfuerzos en el diseño de nuevas estructuras, con el fin de aumentar su resistencia a las nucleasas mientras se mantiene, o mejora, las propiedades de hibridación de los nuevos diseños de ADN o ARN miméticos.¹³²

Los oligomiméticos son moléculas de ADN o ARN químicamente modificadas que exhiben una estabilidad y eficacia mejoradas, por lo que son excelentes candidatos para aplicaciones clínicas. Sin embargo, es importante que retengan su afinidad y especificidad de unión al ADN y ARN, además de poseer un comportamiento farmacocinético adecuado.

1. Aspectos generales en la síntesis de oligonucleótidos

Actualmente, los oligonucleótidos se preparan a través de una síntesis en fase sólida usando el método del fosforoamidito para la unión de derivados de 2'-desoxinucleósidos (dA, dC, dG y T), ribonucleósidos (A, C, G y U) o nucleósidos químicamente modificados.

¹³² Y. S. Sanghvi. *Chem. Today* **2014**, 32, 10-15.

Antecedentes

Se trata de un proceso completamente automatizado en el que para obtener el oligonucleótido deseado se acoplan secuencialmente las bases a la cadena de nucleótidos en el orden requerido por la secuencia del producto (Figura 34). El éxito de este método se debe principalmente a la robustez, reproducibilidad y asequibilidad a la hora de ensamblar oligonucleótidos.¹³³



Figura 34. Sintetizador de ADN y ARN.

Al contrario que la replicación natural en las células, donde esta se produce en sentido 5'→3', la síntesis convencional de un oligonucleótido se ejecuta en la dirección 3'→5', ya que de esta forma se aprovecha la mayor reactividad del hidroxilo primario 5' de un nucleósido durante la etapa de acoplamiento.

En la química de los ácidos nucleicos, la síntesis ha de ser muy eficaz y la existencia de reacciones secundarias establece límites prácticos a la longitud de los oligonucleótidos sintéticos (hasta aproximadamente 200 residuos de nucleótidos), debido a que el número de errores se acumulan con la longitud del oligonucleótido sintetizado.¹³⁴

¹³³ S. L. Beaucage, M. H. Caruthers. *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22, 1859-1862.

¹³⁴ S. L. Beaucage, R. P. Iyer. *Tetrahedron* **1992**, 48, 2223-2311.

1.1. Grupos protectores en el fosforamidito

Un aspecto muy importante para la preparación de oligonucleótidos es la que se refiere a la protección de los grupos funcionales de los nucleótidos que componen la cadena oligonucleotídica, donde los fosforamiditos son los componentes clave que presentan una variedad de grupos protectores para evitar posibles reacciones laterales.

En términos generales, estos grupos protectores se pueden dividir en tres grupos: (i) protección del hidroxilo primario en 5', lábil en medio ácido; (ii) un grupo protector del amino exocíclico de la base nitrogenada, lábil en medio básico; y (iii) la protección con cianoetilo para el fósforo, lábil en medio básico.

Gilham y Khorana fueron los primeros en usar cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (DMT-Cl) para bloquear el grupo hidroxilo en la posición 5' durante la síntesis de nucleótidos.¹³⁵ Actualmente, el grupo DMT (Figura 35) sigue siendo uno de los más habituales, a pesar de que se encuentran descritos muchos otros grupos protectores en la bibliografía.¹³⁶

Las razones clave para el uso continuado del DMT se deben a la facilidad y selectividad que presenta el grupo hidroxilo primario durante su incorporación en oligonucleótidos; se desprotege rápida y cuantitativamente con ácido no acuoso; se genera un catión coloreado, útil para la monitorización de la destritolación durante la síntesis automatizada; además de tener una capacidad para inducir hidrofobicidad durante la purificación de oligonucleótidos cortos.

¹³⁵ P. T. Gilham, H. G. Khorana. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 6211-6222.

¹³⁶ H. Seliger. *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*. M. Egli, P. Herdewijn, A. Matsuda, Y. S. Sanghvi. (Eds.); John Wiley & Sons, 2000, pp 2.3.1-2.3.34.

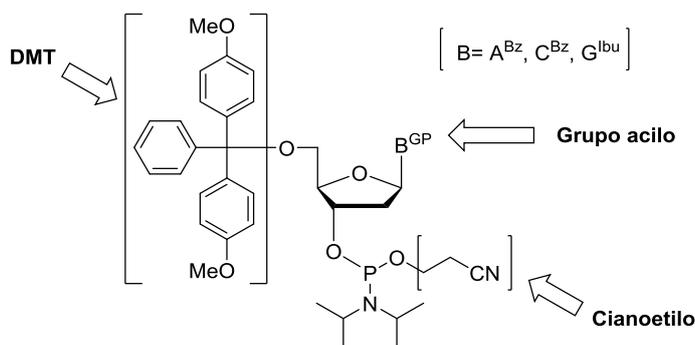


Figura 35. Protecciones de un monómero para su incorporación en oligonucleótidos.

Por otro lado, la mayoría de los fosforamiditos incorporan un grupo protector *N*-acilo para bloquear el grupo amino exocíclico de las nucleobases. Esto se debe principalmente a que: es fácil introducir un acilo como grupo protector en la base usando el protocolo de Jones,¹³⁷ es estable durante el ensamblaje de los nucleósidos, y la desprotección se lleva a cabo bajo condiciones suaves mientras se mantiene la integridad del oligonucleótido.

En definitiva, la naturaleza lábil básica del grupo *N*-acilo ofrece la condición ideal para que el grupo DMT se pueda eliminar selectivamente sin que se vea afectado el grupo *N*-acilo.

El uso de 2-cianoetilo (CE) como grupo protector del fosfato internucleotídico, descrita por Sinha y col.,¹³⁸ ha demostrado ser una gran contribución en el avance de la comercialización de la química de fosforamiditos. Estos monómeros protegidos con el grupo CE son relativamente fáciles y rápidos de sintetizar, además de ofrecer una rápida desprotección en condiciones básicas. De ahí que, incluso después de tres décadas, el grupo CE es el grupo protector preferido para el fósforo en la síntesis de amiditos.

¹³⁷ G. S. Ti, B. L. Gaffney, R. A. Jones. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 1316-1319.

¹³⁸ N. D. Sinha, J. Biernat, J. McManus, H. Köster. *Nucl. Acids Res.* **1984**, *12*, 4539-4557.

2. Monómeros modificados en la síntesis de oligonucleótidos

Como se ha destacado en la introducción de esta memoria, se han diseñado, sintetizado y evaluado análogos de nucleósido para la inhibición de la expresión génica mediante la estrategia *antisense*.¹³⁹ Los resultados más destacados son los que hacen referencia a la mejora de las propiedades de hibridación, estando representados por los ácidos nucleicos peptídicos (PNA)¹⁴⁰ y los ácidos nucleicos bloqueados (LNA).¹⁴¹

2.1. Restricción en la conformación de los nucleósidos

Los LNA son análogos de ácidos nucleicos conformacionalmente bloqueados que presentan una unión extra entre el hidroxilo en posición 2' y el C4' a través de un grupo metileno. En su estructura presentan un puente que bloquea la disposición de la ribosa, produciendo una configuración C3'-endo como la que se aprecia en la Figura 36.

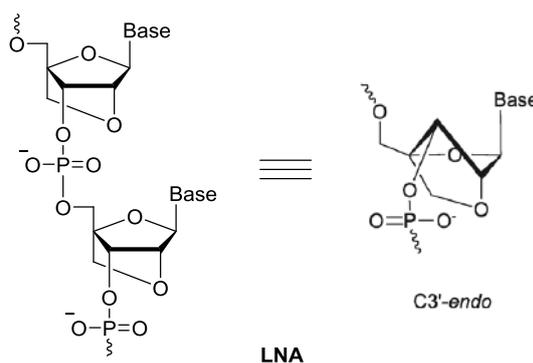


Figura 36. Estructura y conformación de un ácido nucleico bloqueado.

¹³⁹ J. H. Chan, S. Lim, W. S. Wong. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2006**, *33*, 533-540.

¹⁴⁰ B. Hyrup, P. E. Nielsen. *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 5-23.

¹⁴¹ J. S. Jepsen, M. D. Sørensen, J. Wengel. *Oligonucleotides* **2004**, *14*, 130-146.

La conformación de la ribosa bloqueada mejora las propiedades de apilamiento de las bases y la organización del esqueleto de azúcar fosfato, lo que hace aumentar significativamente las propiedades de hibridación del oligonucleótido, como la temperatura de desnaturalización.¹⁴²

Por otra parte, se han obtenido resultados interesantes con otros análogos de nucleósidos con una configuración también restringida, tales como los ácidos nucleicos de hexitol (HNA),¹⁴³ biciclo,¹⁴⁴ arabino (ANA),¹⁴⁵ y fluoroarabino (FANA) que se detallan en la Figura 37.¹⁴⁶

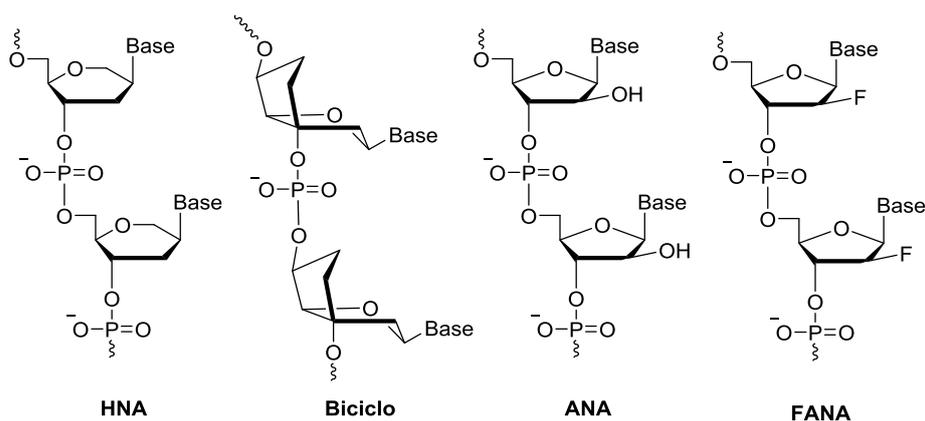


Figura 37. Estructura de derivados de ácidos nucleicos: HNA, biciclo, ANA y FANA.

2.2. Flexibilidad en la conformación de los nucleósidos

El descubrimiento del mecanismo de interferencia del ARN también proporciona una oportunidad para el diseño de nuevos derivados de ácidos

¹⁴² H. Kaur, J. Wengel, S. Maiti. *Biochemistry* **2008**, *47*, 1218-1227.

¹⁴³ D. D'Alonzo, A. Van Aerschot, A. Guaragna, G. Palumbo, G. Schepers, S. Capone, J. Rozenski, P. Herdewijn. *Chem.-Eur. J.* **2009**, *15*, 10121-10131.

¹⁴⁴ M. Bolli, H. U. Trafelet, C. Leumann. *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 4660-4667.

¹⁴⁵ C. J. Wilds, M. J. Damha. *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 299-305.

¹⁴⁶ N. Martín-Pintado, M. Yahyae-Anzahae, R. Campos-Olivas, A. M. Noronha, C. J. Wilds, M. J. Damha, C. González. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 9329-9339.

nucleicos con más flexibilidad estructural (Figura 38), como por ejemplo los derivados de ácidos nucleicos no bloqueados (UNA),¹⁴⁷ peptídicos (PNA),¹⁴⁸ de treoninol (aTNA),¹⁴⁹ y de serinol (SNA).¹⁵⁰ La presencia de estos compuestos en determinadas posiciones del siRNA ha supuesto una mejora en las propiedades de silenciamiento, así como la disminución de los efectos adversos.

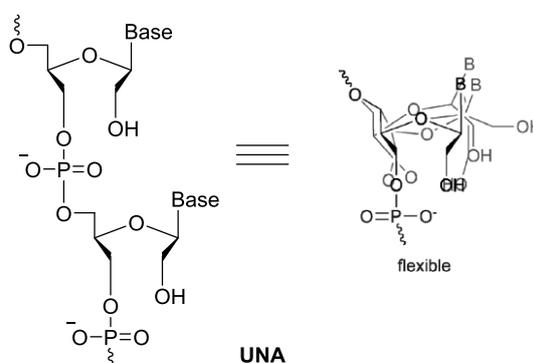


Figura 38. Estructura y conformación de un ácido nucleico no bloqueado.

Por ello, el desarrollo de análogos de nucleósidos flexibles ha generado un creciente interés por el impacto estructural y biológico de estos derivados de ácidos nucleicos, donde la mayor parte se han generado sustituyendo la ribosa por un derivado acíclico (Figura 39).

Sin embargo, se puede otorgar flexibilidad a los derivados de nucleósido sin modificar la ribosa. En su lugar, la modificación del enlace de unión entre el azúcar y la base nitrogenada permite también cambiar las propiedades de hibridación. Prueba de ello son los 2'-desoxirribósidos de metil/etil-timina, detallados con anterioridad en el Capítulo 3.^{123,126}

¹⁴⁷ M. A. Campbell, J. Wengel. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 5680-5689.

¹⁴⁸ B. Hyrup, P. E. Nielsen. *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, 4, 5-23.

¹⁴⁹ K. Murayama, H. Kashida, H. Asanuma. *Chem. Commun.* **2015**, 51, 6500-6503.

¹⁵⁰ Y. Kamiya, J. Takai, H. Ito, K. Murayama, H. Kashida, H. Asanuma. *ChemBioChem.* **2014**, 15, 2549-2555.

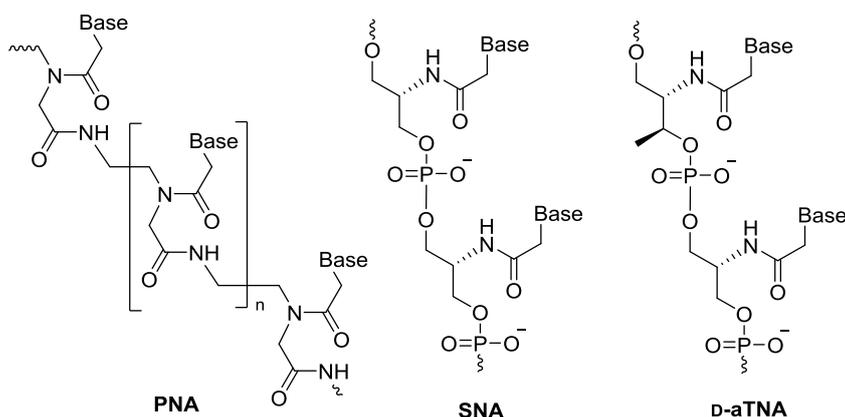


Figura 39. Estructura de derivados de ácidos nucleicos: PNA, SNA y aTNA.

3. Estructuras del ADN y el ARN

3.1. Apareamiento de las bases

Los enlaces por puentes de hidrógeno son los responsables del reconocimiento entre bases de los oligonucleótidos. Gracias a la complementariedad entre los grupos dadores y aceptores de las bases, estas forman pares y en consecuencia, las estructuras secundarias (Figura 40).¹⁵¹

Debido a que existen varios grupos dadores y aceptores en las bases, se forman muchos tipos de pares de bases que dan lugar a distintos tipos de estructuras secundarias. La clasificación se puede dividir en pares Watson-Crick, Hoogsteen (H),¹⁵² Watson-Crick reverso (rWC),¹⁵³ Hoogsteen reverso (rH)¹⁵⁴ y Wobble.¹⁵⁵

¹⁵¹ F. Crick, J. D. Watson. *Proc. R. Soc. Lond. A. Math. Phys.* **1954**, 223, 80-96.

¹⁵² K. Hoogsteen. *Acta Crystallogr.* **1963**, 16, 907-916.

¹⁵³ J. Donohue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1956**, 42, 60-65.

¹⁵⁴ P. P. Chan, P. M. Glazer. *J. Mol. Med.* **1997**, 75, 267-282.

¹⁵⁵ F. Crick. *J. Mol. Biol.* **1966**, 19, 548-555.

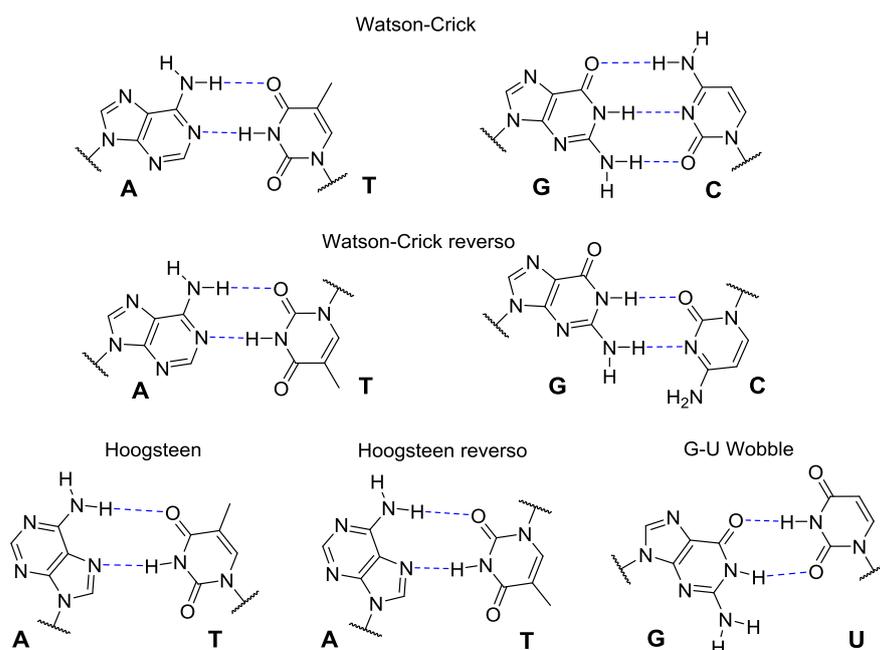


Figura 40. Tipos de pares de bases en oligonucleótidos.

3.2. Estructuras canónicas del ADN y el ARN

Las estructuras secundarias de los ácidos nucleicos, que se forman a partir de los apareamientos entre las bases, se pueden clasificar en dos grandes grupos: estructuras canónicas (constan de dos cadenas asociadas formando una estructura helicoidal) y estructuras no canónicas (se dan mediante otros tipos de asociación entre dos o más cadenas).¹⁵⁶

Entre las estructuras canónicas más importantes están los dúplex tipo A y los de tipo B (forma predominante en el ADN), que son dobles hélices dextrógiras formadas por apareamiento de cadenas complementarias y antiparalelas. Las bases se encuentran en el centro, perpendiculares al eje de la molécula, y apiladas en su misma dirección.

¹⁵⁶ S. Lemieux, F. Major. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 4250-4263.

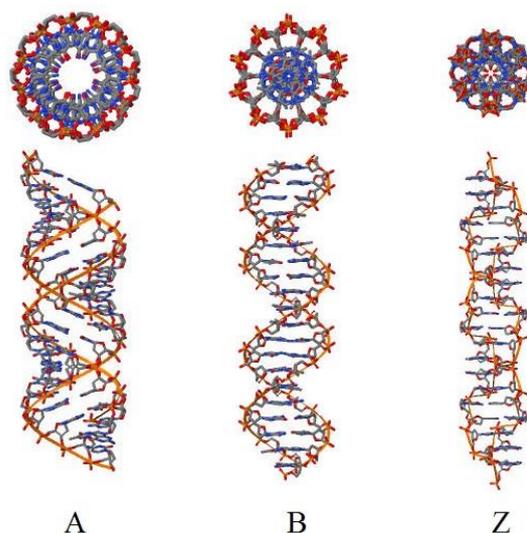


Figura 41. Representación esquemática de las dobles hélices de tipo A, B y Z.

Aunque estas características son comunes a las dobles hélices de ADN y ARN, los ácidos nucleicos pueden adoptar distintas conformaciones dependiendo de las condiciones del medio. Así, el ADN puede dar lugar al ADN de tipo A y B, mientras que el ARN adopta siempre la forma A.

La estructura tipo Z se confirmó también en el ARN.¹⁵⁷ Se trata de un dúplex antiparalelo donde la hélice es levógira (Figura 41).¹⁵⁸ El esqueleto es irregular comparado con las estructuras A y B, ya que los nucleótidos de citosina tienen una conformación C2'-endo y los de guanina tienen conformaciones C3'-endo. Esto provoca una distribución de los grupos fosfato en "zig-zag" que da lugar al nombre de Z.

¹⁵⁷ K. Hall, P. Cruz, I. Jr. Tinoco, T. M. Jovin, J. H. van de Sande. *Nature* **1984**, 311, 584-586.

¹⁵⁸ M. L. Bochman, K. Paeschke, V. A. Zakian. *Nat. Rev. Genet.* **2012**, 13, 770-780.

3.3. Desnaturalización del ADN. Temperatura de fusión

Cuando se rompen las fuerzas de unión entre las dos hebras del duplex de ADN, estas acaban por separarse. De este modo, el ADN desnaturalizado es de una sola hebra, por lo que la transición entre el estado nativo y el desnaturalizado se conoce como desnaturalización (Figura 42).

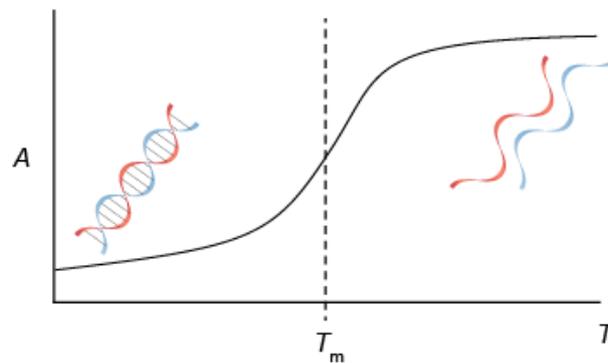


Figura 42. Curva de fusión de un duplex de ADN.

La gráfica de la Figura 42, que representa la medida de la absorbancia a 260 nm (A_{260}) en función de la temperatura, se denomina curva de fusión del ADN. Esta gráfica permite medir un parámetro muy útil para determinar la estabilidad: la temperatura de fusión (T_m). Este parámetro es la temperatura a la que se desnaturaliza la mitad del ADN de una muestra al calentarlo.

Por otra parte, se ha comprobado que la T_m aumenta con el contenido de pares $G \equiv C$, ya que al poseer tres enlaces por puente de hidrógeno (a diferencia de los dos que presenta el par $A = T$) se requiere una temperatura más alta para desnaturalizar el ADN.

3.5. ARN interferente

Uno de los mecanismos de inhibición de un gen se basa en activar el complejo multiproteico RISC a través de siRNAs.

Los siRNAs son dúplex de ARN de 21 nucleótidos por cadena, hibridados mediante pares de bases Watson y Crick, que poseen dos nucleótidos no apareados en cada extremo 3' de las hebras. Éstos se pueden generar en la célula de forma innata, o bien, ser introducidos en el organismo como terapias de silenciamiento de la expresión génica (Figura 44).

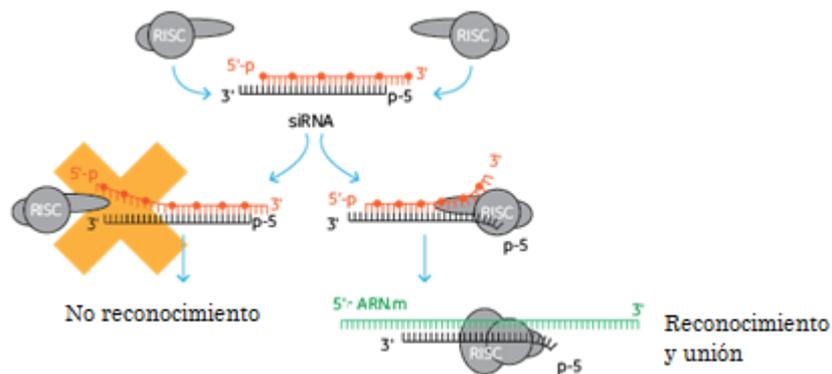


Figura 44. Representación esquemática de la acción de un siRNA.

En el siRNA una de las cadenas se denomina guía (*antisense*) y la complementaria se llama codificante o pasajera (*sense*). La cadena guía, a su vez, es complementaria al ARNm que se quiere hidrolizar y permitirá su reconocimiento por parte del complejo RISC. Una vez el siRNA se une al complejo RISC, este hidroliza la cadena pasajera, mientras que la cadena guía sigue intacta y unida al complejo. Esto permite el reconocimiento del ARNm por complementariedad de bases y la unión al complejo permitirá la hidrólisis del ARNm, inhibiendo así la expresión de la proteína.

Antecedentes

El mecanismo de acción del complejo RISC todavía no se conoce en su totalidad. Sin embargo, parece que la termodinámica del dúplex, la presencia del grupo fosfato en el extremo 5' y la secuencia en este mismo extremo (los nucleótidos U y A favorecen la interacción con respecto a C y G) son muy importantes a la hora de definir la hebra guía y la pasajera por parte del complejo RISC.¹⁶¹

En la célula, este mecanismo se observa generalmente en presencia de un dúplex de ARN con una estructura canónica tipo A. En cambio, los dúplex híbridos de ADN:ARN o ADN:ADN, con estructuras intermedias o tipo B, normalmente no activan el complejo RISC.

¹⁶¹ a) A. Khvorova, A. Reynolds, S. D. Jayasena. *Cell* **2003**, *115*, 209-216. b) F. Frank, N. Sonenberg, B. Nagar. *Nature* **2010**, *465*, 818-822.

Objetivos

A los derivados nucleosídicos con modificaciones tanto en el anillo del azúcar como en la base nitrogenada, se les añade aquellos que presentan modificaciones del enlace glicosídico. Entre ellos, destacan los que muestran la inserción de una cadena alquílica que de flexibilidad al enlace y a la vez pueda formar enlaces por puentes de hidrógeno extra. Esto se traducirá en distintas formas de hibridación con el ADN y el ARN, lo que conllevará diferentes respuestas biológicas.

Por ello, como primer objetivo de este capítulo, nos planteamos la síntesis de un monómero derivado de timidina con una modificación en el enlace glicosídico, introduciendo una cadena de metilacetamida entre el C1' de la 2'-desoxirribosa y la timina.

Puesto que este monómero puede otorgar, además de flexibilidad a la cadena del oligonucleótido, cierta rigidez, debido a una posible interacción por enlace de hidrógeno, también se sintetizarán distintos oligonucleótidos empleando el monómero modificado. Así, se llevará a cabo la preparación de duplex de ADN para estudiar la estabilidad de estos nuevos oligonucleótidos modificados frente a los naturales. Además, se realizará la síntesis de ARN para su estudio como interferente, analizando las propiedades de silenciamiento génico a través de la formación de siRNA con las modificaciones presentes en los extremos 3' de las cadenas.

Resultados y discusión

La síntesis del derivado nucleosídico, para su posterior incorporación en oligonucleótidos, se lleva a cabo a través de una estrategia basada en el acoplamiento del anillo de desoxirribosa con la base nitrogenada mediante una reacción de amidación.

Puesto que el derivado que se pretende sintetizar es un derivado de la timidina, donde únicamente varía el enlace glicosídico, nos vamos a referir a este monómero como T* (Figura 45).

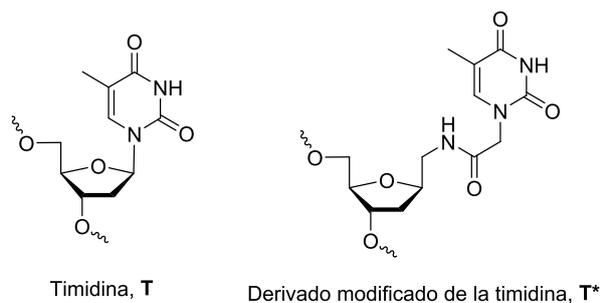


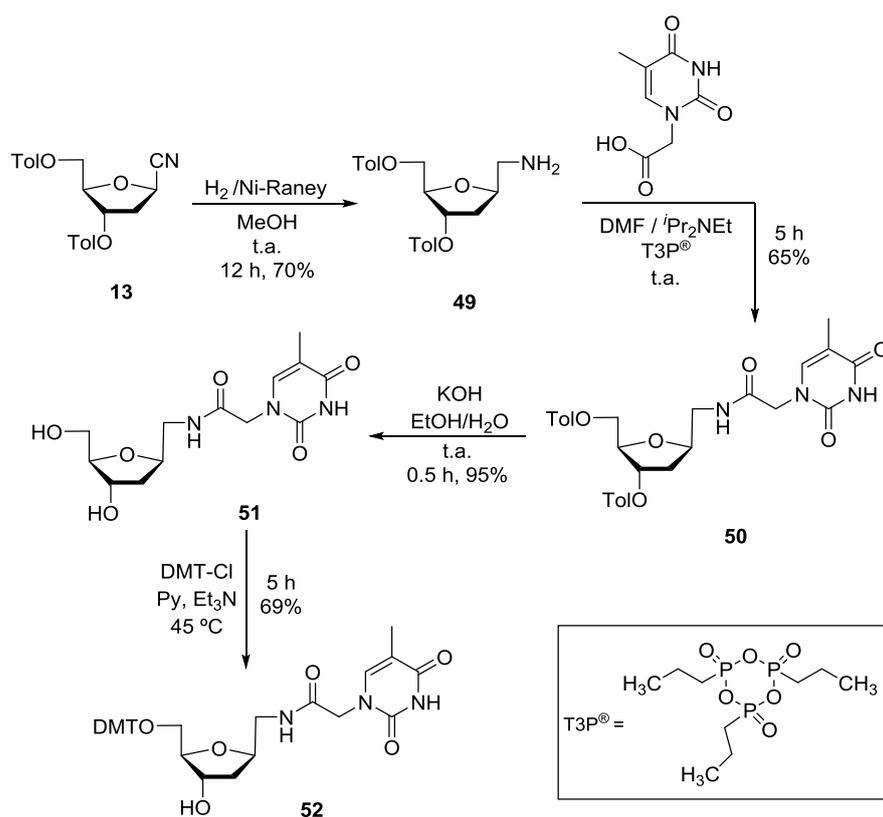
Figura 45. Derivado de la timidina con modificación en el enlace glicosídico.

Para la síntesis de T* se recurre nuevamente al β -cianoazúcar **13**, ya que es un producto comercial de alta versatilidad y con la funcionalidad y la estereoquímica adecuada en sus centros estereogénicos para ser utilizado como sustrato de partida.

1. Síntesis de la unidad monomérica T*

La preparación del derivado de la timidina requiere la introducción de un grupo *N*-metilacetamida en el enlace glicosídico que une el anillo de ribosa con la base nitrogenada, para dar lugar al derivado T*.

La reducción del nitrilo del sustrato de partida **13** se lleva a cabo mediante el uso de un globo de hidrógeno y nickel Raney, siguiendo las condiciones descritas por Stach y col.¹⁶² Tras 12 h de reacción, se obtiene el amino-azúcar **49** con un rendimiento del 70% (Esquema 40).



Esquema 40. Síntesis del monómero modificado.

¹⁶² J. Stach, J. Havlicek, L. Placek, S. Radl. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2008**, *73*, 229-246

A continuación, se realiza la etapa clave de acoplamiento de la base nitrogenada. Así, para realizar esta transformación se utilizan las condiciones que describen Alagia y col.,¹⁶³ necesitando un proceso en dos etapas. Inicialmente, se transforma el ácido de la *N*¹-carboximetiltimina en un éster mediante tratamiento con *p*-nitrofenol en piridina. La reacción del éster aromático correspondiente con la amina **49** en DMF, conduce a la amida deseada **50** con un 60% de rendimiento.

En un intento de mejorar el proceso, se hace reaccionar la amina **49** con la *N*¹-carboximetiltimina en presencia de diisopropiletilamina, anhídrido propilfosfónico (T3P[®]) y DMF como disolvente. La reacción se deja en agitación a temperatura ambiente y después de 5 h se obtiene el derivado nucleosídico **50** con un 65% de rendimiento.

Si comparamos ambos resultados, el segundo método, además de tener un rendimiento ligeramente superior al primero, requiere condiciones menos tediosas para llevar a cabo la reacción. Por tanto, se eligen estas últimas condiciones como las ideales para continuar con la síntesis.

La desprotección de los grupos toluoilos dio lugar al derivado **51**, que se aísla con un rendimiento prácticamente cuantitativo tras 30 min de reacción. Este proceso se realiza mediante la adición de una disolución de KOH en EtOH-H₂O seguida de una neutralización del pH con una resina Dowex 50WX8.

Una vez que tenemos el nucleósido con los grupos hidroxilos libres, se procede a la protección del alcohol en 5' con el grupo DMT. Así, el compuesto **51** se hace reaccionar con DMTCl en presencia de Et₃N y piridina como disolvente de la reacción. La mezcla se calienta a 45 °C y se deja en agitación bajo atmósfera de argón 5 h, obteniendo **52** con un 69%

¹⁶³ A. Alagia, M. Terrazas, R. Eritja. *Molecules* **2014**, *19*, 17872-17896.

de rendimiento tras purificación del crudo. Cabe destacar que esta reacción requiere condiciones completamente anhidras.

2. Síntesis de los oligonucleótidos

Dependiendo de la posición en la que se desee insertar el monómero modificado en el oligonucleótido, el hidroxilo libre en posición 3' que presenta el compuesto **52** requiere de distintas funcionalizaciones para su anclaje a la cadena oligomérica.

Así, si se quiere empezar la cadena por el monómero modificado (sentido 3'→5'), este ha de ser acoplado a una resina. Se trata de proporcionar un soporte sólido sobre el que se añadirán el resto de monómeros. En cambio, si se quiere incorporar el monómero modificado en cualquier otra posición en la cadena, se debe activar el alcohol secundario como fosforamidito.

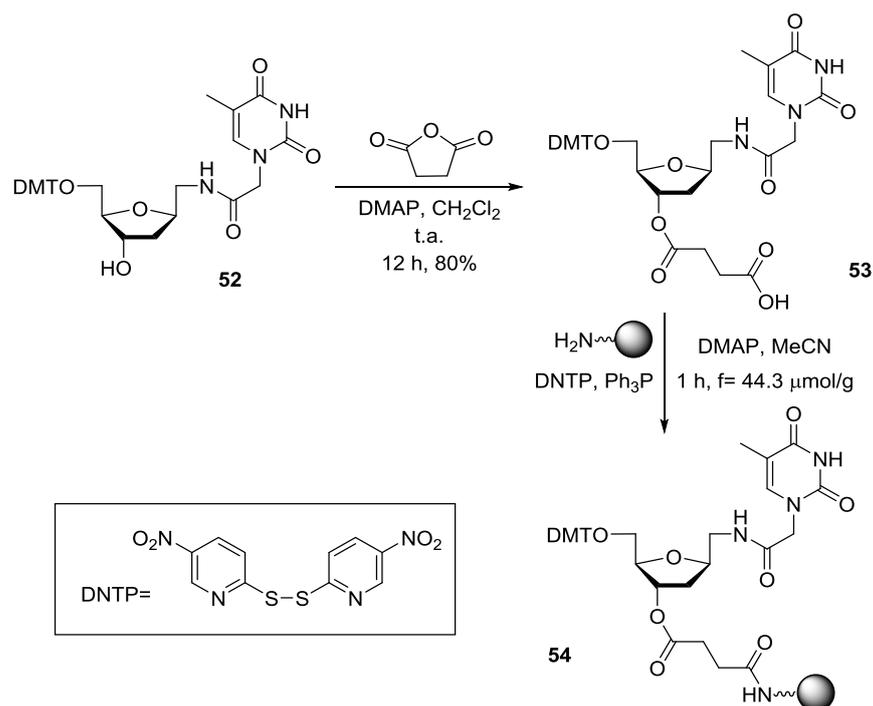
2.1. Síntesis del 3'-O-succinato de 52

Tal como se ha indicado en el párrafo anterior, para comenzar una secuencia sintética con la primera base modificada (T*) debemos anclar nuestro monómero a una resina, que consta de pequeñas esferas de vidrio de poro controlado (*Controlled-Pored Glass*, CPG) funcionalizadas con un espaciador aminoalquílico (*Long Chain AlkylAmine*, LCAA) y cuyo objetivo es alejar los sitios reactivos de la superficie.

Como se puede ver en el Esquema 41, el procedimiento consta de dos etapas. En primer lugar, se lleva a cabo la formación del hemisuccinato **53** a partir de **52** por tratamiento con anhídrido succínico en presencia de DMAP y CH₂Cl₂ como disolvente. Tras 12 h, se obtiene **53** con un 80%

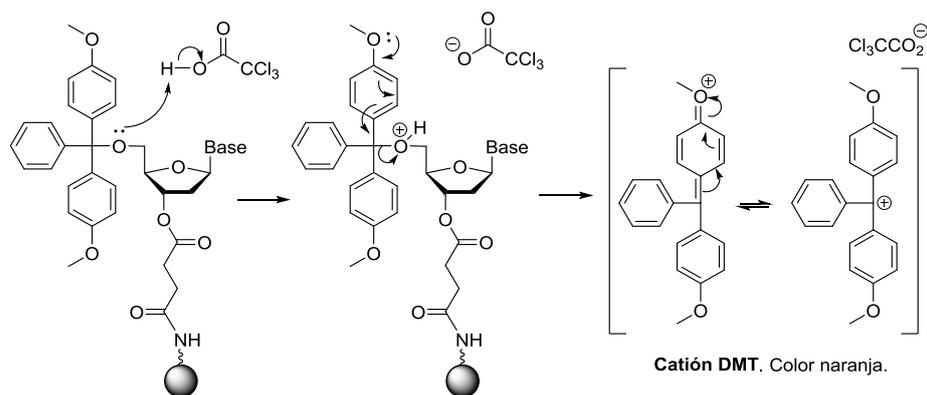
de rendimiento. Este crudo tiene la suficiente pureza para utilizarlo en la siguiente etapa sin necesidad de realizar una purificación adicional.

La segunda etapa consiste en la incorporación del hemisuccinato **53** al soporte sólido LCAA-CPG. Para ello, se añade una disolución de 2,2'-ditio-bis-(5-nitropiridina) en MeCN/CH₂Cl₂ (1:3) a una disolución del hemisuccinato **53** y DMAP en MeCN, y posterior adición de Ph₃P. Esta mezcla se añade al polímero LCAA-CPG, previamente acondicionado sobre un disco de polipropileno.



Esquema 41. Síntesis del 3'-*O*-hemisuccinato y posterior unión al soporte sólido.

La cantidad de compuesto que ha quedado retenido en la resina viene dada por el *grado de funcionalización* (f), que se mide mediante la cuantificación del catión dimetoxitritilo formado (Esquema 42).



Esquema 42. Formación del catión dimetoxitritilo (DMT⁺).

Así pues, el catión del DMT que se cuantifique equivaldrá a la cantidad de monómero que se ha quedado anclado a la resina. De tal manera que, al tratar una cantidad conocida de **54** con ácido tricloroacético (TCA), se produce la escisión del catión DMT, que presenta un color naranja característico. Midiendo la absorbancia que presenta el catión, se puede relacionar con el grado de funcionalización mediante la siguiente fórmula:

$$f = \frac{A \cdot V \cdot 10^6}{\epsilon \cdot l \cdot m}$$

- f = grado de funcionalización (μmol/g)
- A = Absorbancia
- V = Volumen (mL)
- ε = Coeficiente de absorción molar (M⁻¹·cm⁻¹)
- l = Longitud de la celda (cm)
- m = masa (mg)

Para ello, 5 mg (m) de la resina se trataron con ácido tricloroacético para romper el DMT. Se eliminaron los disolventes y el sólido obtenido se diluye con HClO₄ (70% EtOH) hasta los 25 mL (V). La absorbancia de la muestra que recoge el espectro UV (Figura 46) a 498 nm es de 0.6614. Sabiendo que el coeficiente de absorción molar (ε) del DMT es 71700 M⁻¹cm⁻¹, se obtiene un grado de funcionalización de la resina de 44.3 μmol/g.

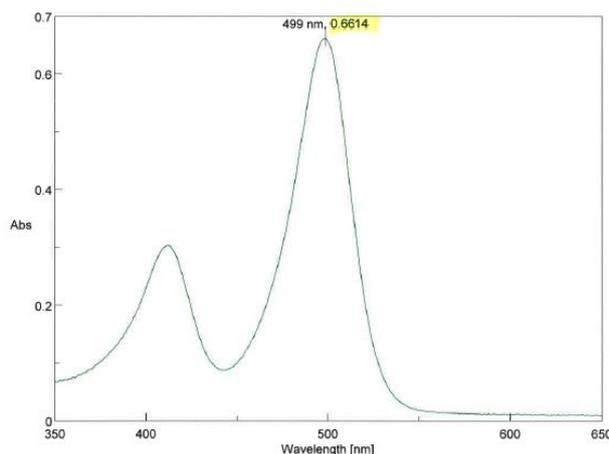
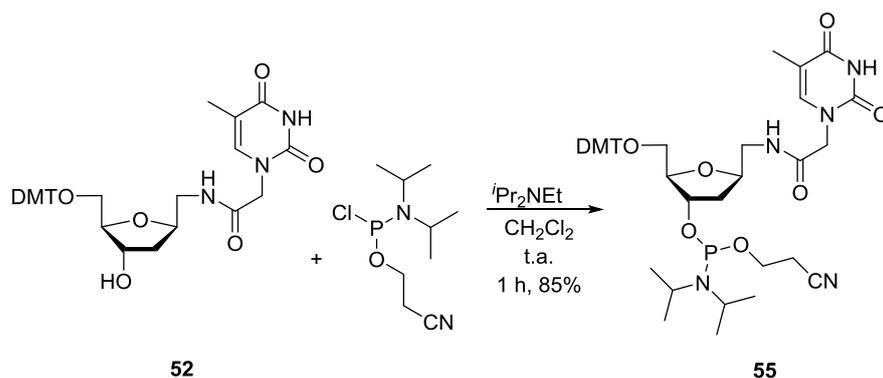


Figura 46. Espectro UV del catión DMT.

2.2. Síntesis del 3'-*O*-fosforamidito de **52**

Para la formación del 3'-*O*-fosforamidito a partir de **52** se utilizó como agente fosforilante 2-cianoetil-*N,N*-diisopropilclorofosforamidito. Se trata de un compuesto capaz de reaccionar directamente con el hidroxilo sin necesidad de ningún activante. Debido a la pérdida de ácido clorhídrico y con el fin de evitar reacciones secundarias tales como la pérdida del grupo DMT, la ruptura del enlace glicosídico o la protonación y posterior hidrólisis del fosforamidito recién formado, la reacción se realiza en presencia de una base no nucleófila, como por ejemplo la diisopropiletilamina (Esquema 43).

La reacción se realiza en CH_2Cl_2 como disolvente, obteniéndose el 3-*O*-fosforamidito **55** con un 85% de rendimiento tras 1 h. En este caso sí es necesaria la purificación del producto final mediante cromatografía de columna para su uso posterior en la síntesis de oligonucleótidos.



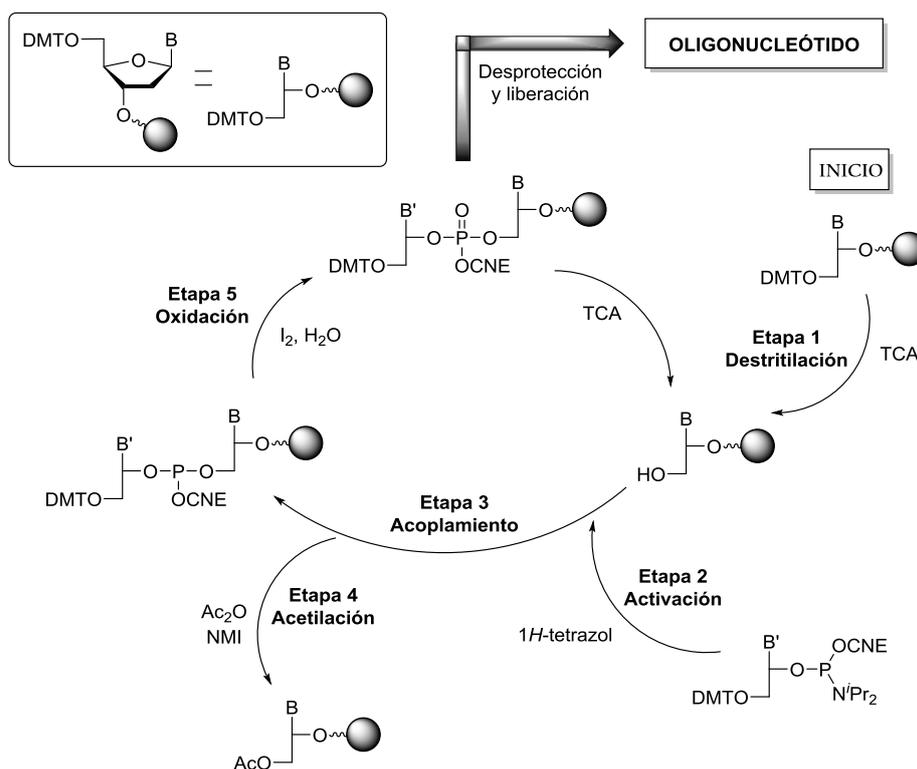
Esquema 43. Síntesis del derivado 3'-*O*-fosforamidito.

2.3. Metodología general para la síntesis de oligonucleótidos

La síntesis automática de oligonucleótidos, que tiene lugar desde el hidroxilo 3' al 5', se lleva a cabo en fase sólida mediante un ciclo de síntesis en el que se van añadiendo de manera secuencial los correspondientes nucleósidos de la cadena (Esquema 44). Como la cadena que está siendo sintetizada se mantiene unida al soporte, la separación de los reactivos en exceso y los disolventes empleados en cada etapa se realiza mediante una simple filtración.

- *Etapa 1*: Eliminación del dimetoxitritilo.

El proceso de destritolación se realiza mediante tratamiento con disoluciones diluidas de ácido tricloroacético. Se trata de un proceso muy sensible al medio ácido debido a la estabilidad del catión resultante, estabilizado por el carácter electrodonor de los sustituyentes de los anillos aromáticos. Además, estas condiciones son lo suficientemente suaves como para evitar una posible ruptura del enlace glicosídico (C1'-N), especialmente cuando la base nitrogenada es una purina.



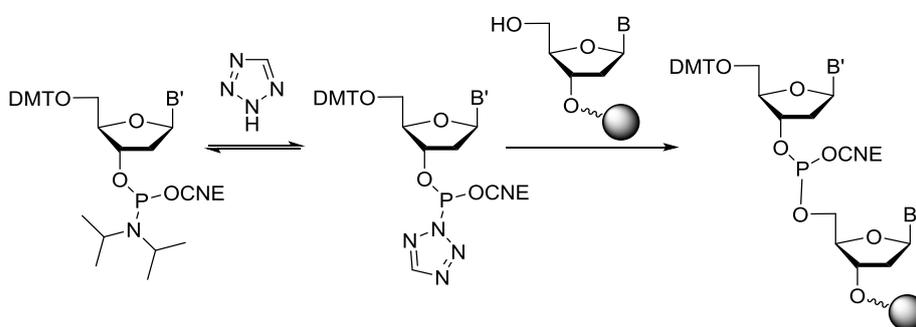
Esquema 44. Ciclo de síntesis de oligonucleótidos mediante el método del fosforamidito. Notas: TCA, ácido tricloroacético; NMI, *N*-metilimidazol.

- *Etapas 2 y 3:* Activación y acoplamiento del fosforamidito.

La activación es la etapa crucial del ciclo y tiene lugar al mezclar el fosforamidito con 1*H*-tetrazol en acetonitrilo. El mecanismo más aceptado es el que se muestra a continuación en el Esquema 45, donde el 1*H*-tetrazol protona el fosforamidito y el ión tetrazoluro generado desplaza al ión *N,N*-diisopropilamonio, dando lugar a un intermedio que reacciona rápidamente con el hidroxilo primario del nucleósido anclado sobre el soporte sólido.

Con el objetivo de aumentar la eficacia del acoplamiento hasta valores casi cuantitativos, se utiliza un exceso de fosforamidito (unos 10 equivalentes) con respecto al nucleósido soportado en la resina.

También se utiliza el 1*H*-tetrazol en exceso (40 equivalentes) a pesar de actuar como catalizador, para incrementar la cinética de la reacción y que el acoplamiento pueda realizarse en tiempos muy cortos (incluso inferiores a un minuto).



Esquema 45. Mecanismo de activación-acoplamiento del fosforamidito con 1*H*-tetrazol.

- *Etapa 4:* Acetilación.

A pesar del elevado rendimiento del acoplamiento, quedan algunas cadenas que no han reaccionado en dicha etapa. Por tanto, es necesario bloquear las cadenas sin reaccionar con anhídrido acético y limitar de este modo el número de secuencias erróneas.

- *Etapa 5:* Oxidación.

Finalmente, tiene lugar la oxidación del intermedio fosfito a fosfatotriéster por tratamiento con una disolución de yodo acuoso. Dado que en la reacción se genera yoduro de hidrógeno, se suelen utilizar bases como piridina o 2,6-lutidina para neutralizarlo.

El ciclo se va repitiendo hasta obtener el oligonucleótido de longitud y secuencia deseada. La eliminación de los grupos protectores de las nucleobases y del grupo fosfato, así como la liberación del oligonucleótido del soporte sólido, tiene lugar en una única etapa al realizar un tratamiento con una disolución acuosa de amoníaco.

2.4. Oligonucleótidos sintéticos

Los oligonucleótidos que se han preparado se encuentran recogidos en la Tabla 10. Se prepararon varias cadenas con una longitud de 15 bases (15Mer) que incluyen la base modificada T* en diferentes posiciones.

En el caso de 15Mer_T*(01) la modificación es única y en el centro de la cadena (entrada 1, Tabla 10). Los oligonucleótidos 15Mer_T*(02) y 15Mer_T*(03) presentan dos modificaciones no consecutivas y consecutivas, respectivamente (entradas 2 y 3, Tabla 10). En la entrada 4 de la Tabla 10 se indica el oligonucleótido equivalente sin modificación.

Tabla 10. Oligonucleótidos sintetizados en este estudio.

Entrada	Nombre	Secuencia
1	15Mer_T*(01)	5' d(TAG AGG CT*C CAT TGC) 3'
2	15Mer_T*(02)	5' d(TAG AGG CT*C CAT* TGC) 3'
3	15Mer_T*(03)	5' d(TAG AGG CTC CAT*T*GC) 3'
4	15Mer_UnMod	5' d(TAG AGG CTC CAT TGC) 3'
5	15MerA	5' d(GCA ATG GAG CCT CTA) 3'
6	15MerG	5' d(GCA ATG GGG CCT CTA) 3'
7	15MerC	5' d(GCA ATG GCG CCT CTA) 3'
8	15MerT	5' d(GCA ATG GTG CCT CTA) 3'
9	Mod_6T*	5' d(T*T*T* T*T*T* C) 3'
10	UnMod_6T	5' d(TTT TTT C) 3'
11	Antipar_6A	5' d(GAA AAA A) 3'
12	Paral_6A	5' d(AAA AAA G) 3'
13	Hairpin	5' d(CT ₁₀ A ₆ G) 3'
14	2T*-support	5' d(T*T*) 3'

Con el fin de estudiar los apareamientos erróneos con las otras bases se prepararon, además del oligonucleótido complementario de adenina (entrada 5, Tabla 10), los oligonucleótidos correspondientes a las bases guanina, citosina y timina, respectivamente (entradas 6-8, Tabla 10). Por otra parte, se prepararon oligómeros 7Mer y 18Mer para estudiar si un oligonucleótido con todas las bases modificadas podía formar duplex antiparalelos, paralelos o triplex (entradas 9-13, Tabla 10). También se preparó el dímero de timidina modificada para utilizarlo en la síntesis de oligonucleótidos de ARN modificados (entrada 14, Tabla 10).

Los oligonucleótidos modificados *15Mer_T** (01), (02) y (03) fueron sintetizados empleando una escala de 200 nmol en un soporte de poliestireno LV200®. Sin embargo, los oligonucleótidos *Mod_6T** y *2T*-support* se sintetizaron a una escala de 1 µmol. En todos los casos, los acoplamientos del fosforamidito modificado con los nucleótidos naturales comerciales fueron excelentes (>97%). El resto de oligonucleótidos no modificados, se sintetizaron siguiendo los protocolos estándar detallados en la parte experimental de este capítulo.

Una vez que están sintetizados los oligonucleótidos, se liberan del soporte sólido mediante tratamiento con una disolución de amoníaco concentrado. En estas condiciones también tiene lugar la desprotección de los grupos protectores de las bases adenina y citosina (Bz), y de la guanina (Ibu).

A continuación, se purifican los oligonucleótidos mediante los protocolos habituales empleando unos cartuchos específicos para dicho fin. Finalmente, se analizan los oligonucleótidos por espectrometría de masas MALDI-TOF y se comprueba su pureza por HPLC (Tabla 11).

Tabla 11. Análisis mediante HPLC y masas de los oligonucleótidos modificados.

Entrada	Nombre	t _R	λ _{máx}	M _w (calc.)	M _w (exp.) ^a
1	15Mer_T*(01)	6.3	260.7	4639.1	4639.1
2	15Mer_T*(02)	6.0	261.9	4710.2	4711.7
3	15Mer_T*(03)	6.1	261.9	4710.2	4709.6
4	Mod_6T*	12.7	271.3	2478.9	2478.4

^aEspectrometría de masas MALDI-TOF.

3. Estudios de desnaturalización de los duplex de ADN

La estabilidad de un dúplex de ADN se mide por la capacidad de mantener las dos hebras unidas mediante enlaces de hidrógeno cuando estas son sometidas a un proceso de desnaturalización por acción del calor.

La formación del dúplex de ADN se consigue mezclando dos cadenas de oligonucleótidos previamente sintetizadas. Cabe destacar que puede formarse un duplex erróneo en cuanto se mezclan las dos cadenas. Por ello, hay que calentar a una temperatura muy alta y permitir un enfriamiento lento con el fin de que se produzcan las uniones correctas, que serán las más favorecidas termodinámicamente.

En consecuencia, se forman los duplex de las cadenas modificadas *15Mer_T** y la no modificada con la complementaria *15MerA* para llevar a cabo un estudio comparativo. Los duplex sintetizados quedan resumidos en la Tabla 12 y los resultados de estabilidad analizados por espectroscopía visible-UV se muestran en la Figura 47.

Resultados y discusión

Tabla 12. Datos de T_m y ΔG a 298K para los duplex de ADN de *15Mer_T**.^a

Ent.	Nombre	T_m (°C)	ΔT_m (°C)	ΔG° (kcal/mol)	$\Delta\Delta G^\circ$ (kcal/mol)
1	15MerA. vs. 15Mer_UnMod	54.2	-	-13.9	-
2	15MerA. vs. 15Mer_T*(01)	41.7	-12.5	-9.3	-4.6
3	15MerA. vs. 15Mer_T*(02)	23.4	-30.8	-4.6	-9.3
4	15MerA. vs. 15Mer_T*(03)	39.2	-15.0	-8.3	-5.6

^a50 mM NaCl y 10 mM tampón fosfato de sodio a pH 7.0.

Los datos recogidos señalan que una única modificación en mitad de la cadena provoca una disminución de 12.5 °C en la temperatura de fusión, T_m (entradas 1 y 2, Tabla 12).

Cabe esperar que un mayor número de modificaciones desestabilice aún más la cadena de ADN, circunstancia que queda patente cuando se introducen dos modificaciones no consecutivas (entrada 3, Tabla 12). Sin embargo, cuando las modificaciones se encuentran juntas, la diferencia en la T_m respecto al duplex natural es menor, -15 °C (entrada 4, Tabla 12).

En definitiva, la temperatura de fusión disminuye a medida que aumentan las modificaciones. Además, si las modificaciones se encuentran en posiciones alejadas con otras bases naturales de por medio, producen dos veces más desestabilización que si están contiguas en la cadena (entradas 3 y 4, Tabla 12).

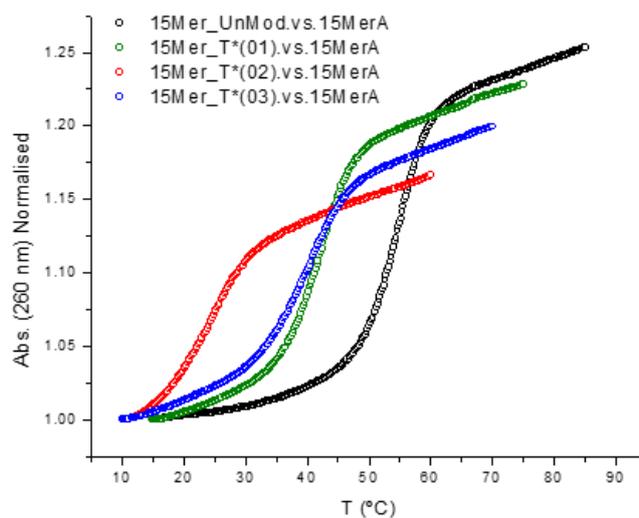


Figura 47. Curvas de fusión de los oligonucleótidos modificados con 15MerA.

3.1. Afinidad de T* en los apareamientos erróneos

A continuación, se estudian las propiedades de todos los pares de bases de T* evaluando la temperatura de fusión de los duplex formados, incluyendo todos los posibles apareamientos erróneos. Es decir, se compara la unión tanto de T como de T* frente al resto de bases: A, C, G y T. Los datos se encuentran representados en la Figura 48 y recogidos en la Tabla 13.

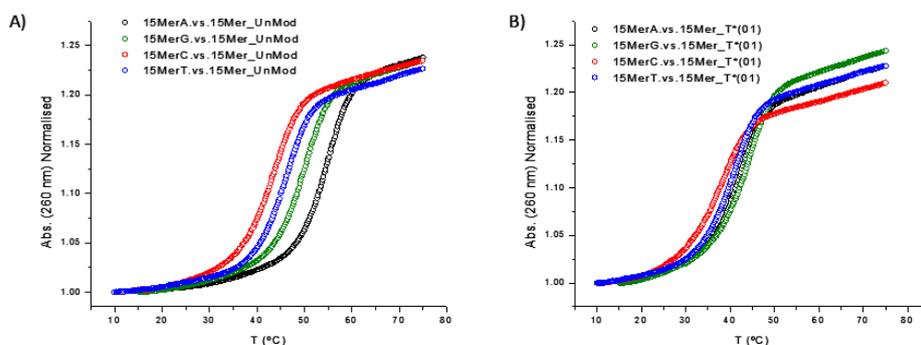


Figura 48. Curvas de fusión: (A) 15MerX vs. 15Mer_UnMod; (B) 15MerX vs. 15Mer_T*(01). X= A, G, C, T.

Resultados y discusión

Como cabría esperar, cuando se produce la formación de un par erróneo, la estabilidad disminuye y el valor de T_m experimenta un descenso. Para los oligonucleótidos sin modificaciones, se puede observar en la Figura 48-A que el par que presenta una mayor desestabilidad es el C:T (42.9 °C) en comparación con el par adecuado A:T (54.2 °C) (entradas 1 y 3, Tabla 13). Asimismo, los que se dan entre G:T (49.3 °C) y T:T (45.3 °C) son también menos estables que el par correcto (entradas 1, 2 y 4, Tabla 13).

Tabla 13. Datos de T_m y ΔG a 298K de los duplex con diferentes pares de bases.

Ent	Duplex	Pares X:Y	T_m (°C)	ΔT_m (1) ^a	ΔT_m (2) ^b	ΔG° (kcal/mol)	$\Delta\Delta G^\circ$ (1) ^a	$\Delta\Delta G^\circ$ (2) ^b
1	15MerA. vs. 15Mer_UnMod	A:T	54.2	---	---	-13.9	---	---
2	15MerG. vs. 15Mer_UnMod	G:T	49.3	-4.9	---	-11.8	-2.1	---
3	15MerC. vs. 15Mer_UnMod	C:T	42.9	-	11.3	-9.5	-4.4	---
4	15MerT. vs. 15Mer_UnMod	T:T	45.3	-8.9	---	-10.4	-3.5	---
5	15MerA. vs. 15Mer_T*(01)	A:T*	41.7	---	-	-9.3	---	-4.6
6	15MerG. vs. 15Mer_T*(01)	G:T*	43.2	---	-6.1	-9.5	---	-2.3
7	15MerC. vs. 15Mer_T*(01)	C:T*	37.0	---	-5.9	-7.7	---	-1.8
8	15MerT. vs. 15Mer_T*(01)	T:T*	39.8	---	-5.5	-8.6	---	-1.8

^a ΔT_m (1) and $\Delta\Delta G^\circ$ (1): en comparación con 15MerA. vs. 15Mer_UnMod. ^b ΔT_m (2) and $\Delta\Delta G^\circ$ (2): en comparación con el correspondiente duplex no modificado.

En general, la inserción de una cadena $-\text{CH}_2-\text{CONH}-\text{CH}_2-$ entre el carbohidrato y la nucleobase no es favorable para una buena alineación de las bases y formar la doble hélice estable de Watson y Crick.

Sin embargo, el alargamiento permite que se forme un par wobble G:T* como el que se indica en la Figura 49.

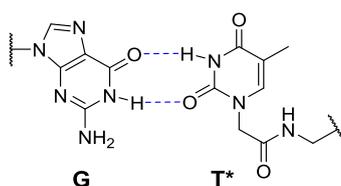


Figura 49. Representación esquemática del par G:T* wobble.

La modificación T* pierde la habilidad de distinguir entre A (apareamiento natural) y G, ya que los datos de T_m de los duplex que contienen los pares de bases A:T* y G:T* presentan valores muy similares. Así, el duplex que contiene el apareamiento G:T* posee una T_m mayor que el duplex que contiene A:T* (1.5 °C más alto). Este hecho es la primera vez que se describe, y solo se había observado con L-treoninol en un duplex ARN:ARN.¹⁶⁴

3.2. Oligonucleótidos 7Mer: formación de duplex paralelos y antiparalelos

Se pretende conocer si un oligonucleótido con un tramo de varias T* contiguas puede hibridarse con una cadena de ADN complementaria de forma antiparalela (*Mod_6T** vs. *Antipar_6A*) o bien de forma paralela (*Mod_6T** vs. *Paral_6A*).

Para ello, hacemos el experimento de hibridación con el oligonucleótido no modificado como referencia (Figura 50). Solo se observó una transición en la curva de fusión con *UnMod_6T*.vs.*Antipar_6A*, mostrando una T_m inferior a 25 °C (T_m cerca

¹⁶⁴ A. Alagia, M. Terrazas, R. Eritja. *Molecules* **2015**, 20, 7602-7619.

de 15 °C), mientras que para el *UnMod_6T.vs.Paral_6A* no se aprecia formación de duplex.

La falta de transición con el oligonucleótido *Mod_6T** indica la ausencia de formación de un duplex mixto ADN modificado/no modificado, algo coherente debido a la desestabilización que provoca el derivado T* modificado.

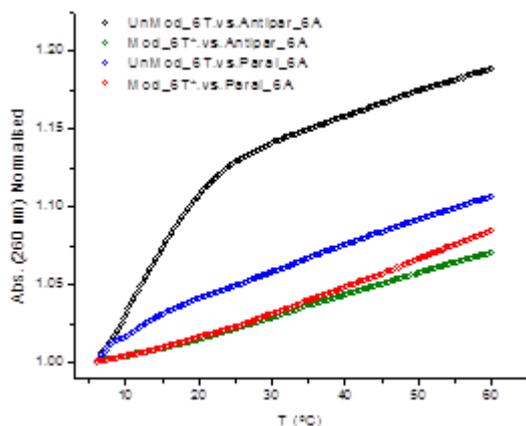


Figura 50. Curvas de fusión de los duplex con oligonucleótidos 7Mer.

3.3. Oligonucleótidos 7Mer: formación de triplex

Al mismo tiempo, queremos estudiar la capacidad del oligonucleótido modificado 7Mer para formar estructuras de triple hélice (triplex). Para ello, tratamos de hibridar *Mod_6T** con un dúplex intramolecular, *Hairpin* (entrada 13, Tabla 10).

En primer lugar, se realiza el experimento con el oligonucleótido no modificado (*UnMod_6T*), observándose las transiciones esperadas: una con una T_m por debajo de 20 °C (T_m cerca de 15 °C), correspondiente al despliegue del triplex, y la segunda, centrada a 60.5 °C, que correspondería al desdoblamiento del dúplex (Figura 51).

Sin embargo, en el experimento realizado con *Mod_6T** solo se observó la transición correspondiente al despliegue del dúplex, indicando la no formación de un triplex mixto (ADN modificado: ADN/ADN).

Aunque la transición esperada de triplex a dúplex es pequeña y se produce a baja temperatura, el resultado indica que muy probablemente el nuevo esqueleto no formará triplex más estables con dúplex de ADN no modificado.

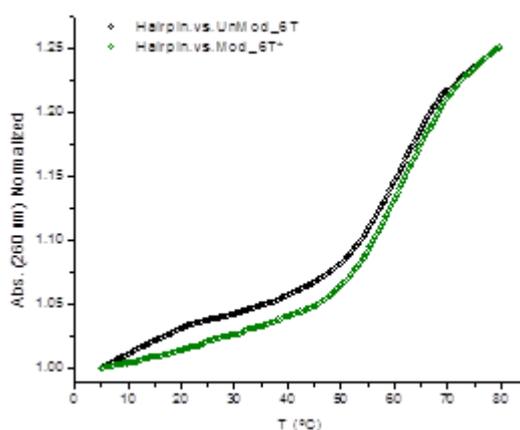


Figura 51. Curvas de fusión de los triplex con los oligonucleótidos 7Mer.

4. Oligonucleótidos modificados de ARN

A continuación, se preparan varias hebras de ARN que llevan incorporadas, o bien dos timidinas naturales, o dos unidades T* modificadas contiguas en el extremo 3' de la cadena oligonucleotídica (Tabla 14).

Resultados y discusión

Tabla 14. Secuencias y espectrometría de masas en oligonucleótidos de ARN.

Ent.	Nombre	Secuencia (5'→3')	Masa Molecular (calc)	Masa Molecular (exp) ^a
1	ASwt	UUUUUCUCCUUCUUCAGAUTT	6439	6434
2	SSwt	AUCUGAAGAAGGAGAAAAATT	6829 (Na ⁺)	6829 (Na ⁺)
3	ASmd	UUUUUCUCCUUCUUCAGAUT*T*	6581	6580
4	SSmd	AUCUGAAGAAGGAGAAAAAT*T*	6948	6946

^aEspectrometría de masas MALDI-TOF.

Con estas hebras, se crearon todas las posibles cadenas de ARN complementarias (Tabla 15), y los duplex de siRNA resultantes se usaron para estudiar el gen de la luciferasa de la *Renilla*.

Con el fin de evaluar la potencia de las moléculas modificadas de siRNA, se realizaron experimentos en células HeLa para estudiar la respuesta a la dosis. Para ello, se transfecta (se infecta) la célula con el vector psiCHECK-2 con concentraciones decrecientes de los duplex de siRNA (1; 0.3; 0.16; 0.06; 0.016; 0.008; 0.002 nM) y tras 24 h de incubación, se mide la expresión de la proteína de *Renilla*.

Como se muestra en la Tabla 15 y en la Figura 52, todos los siRNAs modificados fueron fuertes inhibidores de la luciferasa de *Renilla*. En particular, el siRNA ST3, modificado en sentido codificante o hebra pasajera (*Sense Strand*, SS), es significativamente más potente en comparación con el siRNA no modificado (*Wild Type*, WT).

Tabla 15. Secuencias de siRNA objetivo del ARNm de la luciferasa de la *Renilla* y valores de la inhibición de la concentración (IC₅₀).

Ent	siRNA	Nombre	Secuencias	IC ₅₀ (pM±SD)
1	WT	SSwt	TTAAAAAGAGGAAGAAGUCUA-5'	6.3±1.8
		ASwt	5'-UUUUUCUCCUUCUUCAGAU	
2	ST2	SSwt	TTAAAAAGAGGAAGAAGUCUA-5'	6.1±2.6
		ASmd	5'-UUUUUCUCCUUCUUCAGAUT*T*	
3	ST3	SSmd	T*T*AAAAAGAGGAAGAAGUCUA-5'	3.2±1.3
		ASwt	5'-UUUUUCUCCUUCUUCAGAU	
4	ST4	SSmd	T*T*AAAAAGAGGAAGAAGUCUA-5'	5.0±2.9
		ASmd	5'-UUUUUCUCCUUCUUCAGAUT*T*	

La actividad del siRNA ST2, que presenta las modificaciones en la hebra molde (*Antisense Strand*, AS), es comparable al siRNA no modificado WT.

Por otro lado, las diferentes actividades de silenciamiento entre los siRNAs ST2 y ST3 dependen, básicamente, del reconocimiento de los nucleótidos salientes no apareados del extremo 3' por la proteína Ago2, ya que son las principales proteínas que alteran la actividad (efectores) del ARNi. Por tanto, cuanto mejor sea la interacción entre el dominio PAZ de Ago2 y el saliente, más fuerte es la inhibición del ARNm objetivo. Analizando los resultados obtenidos, la modificación T* produce un siRNA más activo cuando se introduce en la hebra codificante (ST3).

Además, la equivalencia entre los siRNAs antisentido modificado (ST2) y no modificado (WT) sugiere que la alteración T* es tan reconocida como la T natural por el dominio PAZ.

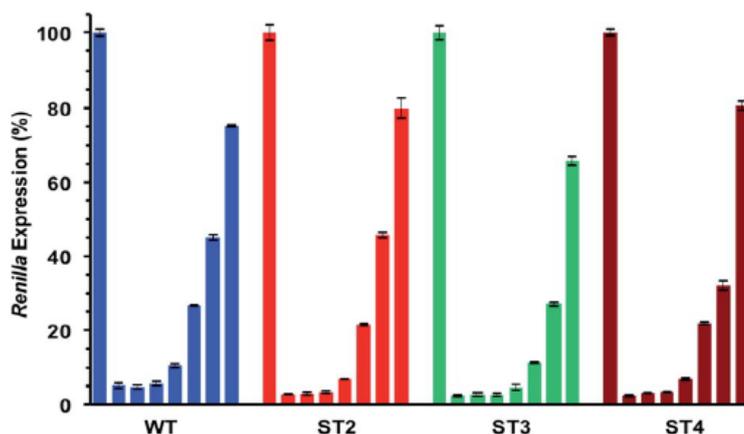


Figura 52. Medidas de IC_{50} de moléculas de ARN empleando el ensayo de la luciferasa. Curvas de dosis-respuesta de siRNA no modificado (WT) y T*-modificado (ST2, ST3, ST4). Concentraciones decrecientes (nM): 1, 0.3; 0.16; 0.06; 0.016; 0.008; 0.002.

La aplicación terapéutica basada en los siRNAs está obstaculizada por sus numerosos efectos de desactivación, siendo uno de los más relevantes la selección de la hebra incorrecta por el RISC. Como se ha demostrado que la carga de la hebra se basa en la estabilidad termodinámica de los dos extremos del duplex de siRNA, se pensó en comparar la activación-desactivación de los T* modificados siRNAs (ST2 y ST3) con el siRNA no modificado (WT). Para ello, se usan dos vectores diferentes de psiCHECK-2, uno codificante para un ARNm complementario a la cadena antisentido (AS) y otro para la cadena guía (SS).

Así pues, se infectan las células HeLa con cualquiera de los vectores AS o SS y dos concentraciones de siRNA (1 nM y 16 pM). Después de 24 h de incubación se miden los niveles de expresión de la proteína de *Renilla*.

Este estudio, que evalúa de manera independiente las capacidades de silenciamiento de cada hebra, proporciona una estimación rápida y fiable

de la eficiencia en la inhibición mediada por el siRNA, tanto para la cadena antisentido (AS) como para la codificante (SS).

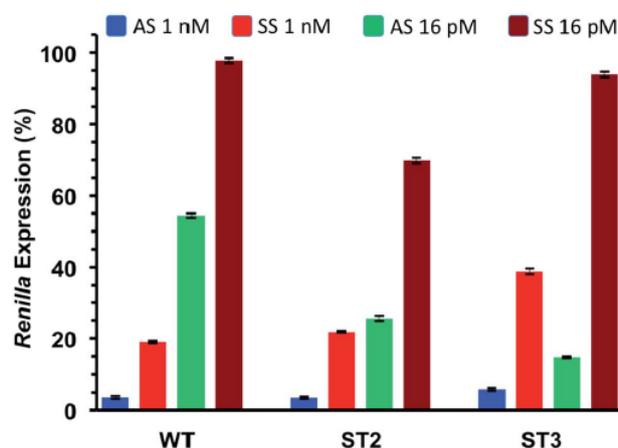


Figura 53. Silenciamiento de los siRNA modificados con T* a concentraciones finales de 1 nM y 16 pM. WT, ST2 y ST3 fueron infectados con sensores psiCHECK-2 (AS y SS) en células HeLa. ST2 lleva la modificación en la hebra antisentido y ST3 la lleva en la hebra codificante.

Como se aprecia en la Figura 53, todos los siRNAs empleados en el estudio (WT, ST2 y ST3) revelaron un pobre equilibrio entre las actividades de activación/desactivación a la concentración más alta (1 nM), obteniéndose el mejor resultado con el siRNA ST3. Por otra parte, a concentraciones más bajas (16 pM), el siRNA ST3 es prácticamente inactivo hacia el ARNm fuera de diana (SS), manteniendo un 80% de inhibición como diana del ARNm (AS).

Analizando todos estos resultados, podemos concluir que la modificación de T* es totalmente compatible con la maquinaria del ARN interferente, y puede proporcionar mayor eficiencia y selectividad que el siRNA no modificado cuando la modificación se introduce en el extremo 3' de la cadena codificante pasajera (SS).

Conclusiones

En este capítulo se describe la síntesis de un nuevo monómero derivado de la timidina (T*) que presenta, entre el C1' del azúcar y el N1 de la base nitrogenada, una cadena metilacetamida. Para la construcción de esta funcionalidad se utilizó como etapa clave un acoplamiento entre la 1-aminometil-2-desoxirribosa y la N¹-carboximetiltimina. Este nucleósido modificado se ha utilizado en la síntesis de oligonucleótidos para estudiar las propiedades de unión y silenciamiento génico que otorga el cambio introducido.

Se ha comprobado que una única modificación en el medio de una cadena 15Mer de ADN provoca una disminución de 12.5 °C en la T_m respecto al ADN que no presenta modificaciones en ninguna base. Además, dos modificaciones contiguas en una hebra del duplex son menos desestabilizantes que cuando estas se encuentran separadas.

Un hecho que no había sido descrito hasta el momento es que la modificación pierde la capacidad de distinguir el apareamiento entre las bases A y G, ya que los valores de T_m de los duplex que contienen los pares de bases A:T* y G:T* son similares, siendo incluso esta última, la no natural, ligeramente mayor.

Un oligonucleótido 7Mer formado completamente por monómeros modificados no estabiliza un heteroduplex paralelo ni antiparalelo. Tampoco forma un heterotriplex paralelo con homólogos de ADN no modificados, debido a la desestabilización provocada por tantas T*.

Conclusiones

La introducción de T* en el extremo 3' de cualquiera de las dos hebras del siRNA es tolerada por la maquinaria RISC, ofreciendo valores de IC₅₀ similares o mejores que el siRNA no modificado. Además, en caso de tener la modificación T* en la hebra de pasajeros (*Sense*), los efectos no diana están disminuidos. Por estas razones, la introducción de estos monómeros en el extremo 3' de la cadena pasajera (SS) genera siRNAs modificados que son inhibidores más potentes y selectivos en la expresión génica para el mecanismo de interferencia del ARN.

Parte experimental

1. Condiciones de trabajo, disolventes y reactivos

Los reactivos y métodos generales han sido detallados en las partes experimentales de los capítulos anteriores. Las excepciones se van detallando a medida que aparecen en los procedimientos experimentales.

2. Técnicas instrumentales

Las técnicas de análisis utilizadas en este capítulo, salvo indicación contraria, han sido detalladas en la parte experimental de los capítulos anteriores de esta memoria. Las técnicas empleadas en la síntesis de oligonucleótidos que no se haya visto hasta el momento se detallan junto a su procedimiento experimental.

3. Procedimientos sintéticos y datos experimentales

A continuación, se describe de forma detallada el procedimiento seguido para la síntesis de cada uno de los productos que se han obtenido en este capítulo. También se recogen los datos experimentales que han permitido su caracterización.

3.1. Síntesis de 1 β -Aminometil-1,2-didesoxi-3,5-di-*O*-toluoil-D-ribosa (49)

Sobre una mezcla de Ni RANEY® (100 mg, quitando todo agua posible) y el β -cianoazúcar **13** (100 mg, 0.26 mmol) en MeOH (3 mL), se crea una atmósfera de vacío para posteriormente introducir un globo portador de hidrógeno. La reacción se deja con una fuerte agitación magnética 16 h bajo la atmósfera de hidrógeno. A continuación, se filtra el crudo sobre Celite® y se elimina el disolvente a presión reducida. El residuo obtenido se purifica mediante cromatografía de columna (3% MeOH/CH₂Cl₂), obteniéndose **49** con un 70% de rendimiento.

3.2. Síntesis de 1,2-Didesoxi-1 β -[N-(1-timinilacetil)aminometil]-3,5-di-*O*-toluoil-D-ribosa (50)

A una disolución de **49** (50 mg, 0.13 mmol) en DMF anhidra (0.3 mL), bajo atmósfera de nitrógeno y agitación magnética, se añade *N*¹-carboximetiltimina (18.4 mg, 0.1 mmol), anhídrido propilfosfónico (59.5 mg, 0.1 mmol) y ⁱPr₂NEt (35 μ L, 0.2 mmol). La reacción se deja agitando a temperatura ambiente 5 h y se sigue por TLC hasta conversión completa. A continuación, se añade la disolución sobre un matraz que contiene agua/hielo y NaHCO₃ en proporción 7:1, aproximadamente. Se deja reposando en la nevera toda la noche y el sólido obtenido se filtra. Es necesaria una purificación del crudo mediante cromatografía de columna (2% MeOH/ CH₂Cl₂) para obtener el producto deseado **50** con un 65% de rendimiento.

3.3. Síntesis de 1,2-Didesoxi-1 β -[N-(1-timinilacetil)aminometil]-D-ribosa (**51**)

Sobre una disolución de **50** (20 mg, 0.04 mmol) en EtOH (0.4 mL), se añaden 0.08 mL de una disolución de KOH (12 mg, 0.21 mmol) en EtOH:H₂O (3:1). La reacción se deja agitando a temperatura ambiente hasta conversión completa después de 30 min. Posteriormente, se añade una resina de intercambio iónico (Dowex® 50WX8 *hydrogen form*) para neutralizar el medio básico. Con un pH neutro, se filtra la resina y se eliminan los disolventes a presión reducida. Finalmente, el crudo se purifica mediante cromatografía de columna empleando una mezcla 5% MeOH/CH₂Cl₂, aislándose **51** como un sólido blanco con un rendimiento mayor del 95%.

3.4. Síntesis de 1,2-Didesoxi-5-O-(4,4'-dimetoxitritil)-1-[N-(1-timinilacetil) aminometil]-D-ribosa (**52**)

Sobre una disolución de DMTCl (81.3 mg, 0.24 mmol) en piridina anhidra (0.8 mL), se añade Et₃N (46 μ L, 0.32 mmol) en atmósfera de argón y bajo agitación magnética. Seguidamente, se adiciona **51** (50 mg, 0.16 mmol) y la mezcla se calienta a 45 °C. La reacción se sigue por TLC hasta conversión completa (5 h). A continuación, se eliminan los disolventes a presión reducida y el residuo se purifica mediante cromatografía de columna empleando como eluyente 10% MeOH/CH₂Cl₂. Se obtiene **52** como un sólido blanco con un 69% de rendimiento.

3.5. Síntesis del derivado 3'-O-hemisuccinato DMT-T* (53)

El derivado **52** (50 mg, 0.08 mmol) se co-evapora dos veces en MeCN anhidro y se seca durante 30 min en un desecador a vacío. Una vez seco, el compuesto se disuelve en CH₂Cl₂ anhidro (5 mL) bajo atmósfera de argón. Posteriormente, se añaden anhídrido succínico (11 mg, 0.11 mmol) y DMAP (13 mg, 0.11 mmol) y la disolución se deja en agitación durante una noche a temperatura ambiente. A continuación, se añade CH₂Cl₂ (15 mL) a la disolución y esta se lava con NaH₂PO₄ (0.1 M) y NaCl acuoso saturado (2 x 20 mL). Se combinan las fases orgánicas, se secan sobre MgSO₄, se filtra y se evaporan los disolventes hasta sequedad. El hemisuccinato obtenido (80% de rendimiento) se utiliza en la siguiente etapa sin la necesidad de una purificación adicional.

3.6. Funcionalización del soporte sólido con succinil DMT-T*.

Preparación del 3'-O-succinato **54**

El derivado de hemisuccinato **53** se incorpora a un soporte de vidrio de poro controlado con cadenas largas de alquilamino (*Long-chain alkylamine-controlled pore glass*, LCAA-CPG). Para ello, se coloca el H₂N-LCAA-CPG (CPG New Jersey, 150 mg, 73 μmol de amino por g) en una jeringa de polipropileno provista de un disco de polipropileno, se lava secuencialmente con MeOH, CH₂Cl₂ y MeCN (2 x 5 mL con cada disolvente) y se seca a vacío.

Por otra parte, se añade 2,2'-ditio-bis(5-nitropiridina) (DTNP) (20 mg, 0.06 mmol) disuelto en 200 μL de una mezcla de MeCN/CH₂Cl₂ (1:3) sobre una disolución de **53** (23 mg, 0.03 mmol) y DMAP (8 mg, 0.06 mmol) en MeCN (500 mL). Posteriormente, se adiciona Ph₃P (17 mg, 0.06 mmol) y la mezcla se agita en un vortex durante unos segundos. Acto seguido, la mezcla se añade sobre el soporte y se deja reaccionar durante 1 h. Tras este tiempo, se realiza un lavado con MeOH, CH₂Cl₂ y MeCN

(2 x 5 mL con cada disolvente) y se seca a vacío. Finalmente, el soporte sólido se trata con una mezcla de Ac₂O/DMF (1:1, 500 mL) durante 30 min para restringir los grupos amino libres. La funcionalidad de la resina se determinó mediante la cuantificación de DMT (44.3 μmol/g).

3.7. Síntesis del derivado 3'-*O*-fosforamidito DMT-T* (55)

El derivado **52** (150 mg, 0.24 mmol) se co-evapora dos veces en MeCN anhidro y se seca durante 30 min en un desecador a vacío. Posteriormente, se disuelve el compuesto en CH₂Cl₂ anhidro (10 mL) y se añade ⁱPr₂NEt (230 mL, 1.32 mmol) bajo atmósfera de argón. A continuación, se enfría la disolución en un baño de hielo y se añade gota a gota con una jeringa 2-cianoetil-*N,N*-diisopropilclorofosforamidito (114 μL, 0.48 mmol), dejando la disolución en agitación a temperatura ambiente durante 1 h. Se añade CH₂Cl₂ (15 mL) a la mezcla de reacción y esta se extrae con una disolución acuosa saturada de NaCl (15 mL). Tras secar las fases orgánicas con MgSO₄, se eliminan los disolventes y el crudo se purifica mediante una cromatografía de columna.

La sílice de la columna se neutraliza con una disolución de 10% Et₃N en AcOEt:Hex (1:1), utilizando como eluyente un gradiente de AcOEt:Hex (1:1) hasta AcOEt puro. Se obtiene el compuesto **55** como un sólido blanco con un 85% de rendimiento.

3.8. Procedimiento general para la síntesis y purificación de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados en este estudio se resumen en la Tabla 10 del apartado de resultados y discusión.

Los oligonucleótidos modificados 15Mer_T* (01), (02) y (03) se prepararon en un sintetizador de ADN (Applied Biosystems 3400

Parte experimental

Foster City, CA, EE.UU.) usando una escala de 200 nmol con soportes de poliestireno LV200®. En todos los casos los rendimientos de acoplamiento del fosforamido modificados fueron >97%. Los oligonucleótidos no modificados se sintetizaron siguiendo los protocolos estándar o se adquirieron comercialmente. El último DMT se dejó al final del ciclo de síntesis (DMT-ON).

Tras la unión secuencial de los monómeros, los soportes se trataron con NH₃ concentrado a temperatura ambiente durante 12 h, y 1 h a 55°C, para separar los oligonucleótidos de la resina y llevar a cabo la desprotección de los grupos Bz e Ibu de las bases.

Los oligonucleótidos se purificaron mediante el empleo de un cartucho (cartucho de purificación de ADN Glen-Pak™) de Glen Research. A continuación, se eliminaron cadenas truncadas o pequeñas moléculas orgánicas mediante filtración con Sephadex G-25 (IllustraNAP-10 o NAP-5 columnas, de GE Healthcare Life Sciences). Finalmente, se analizaron por espectrometría de masas (MALDI-TOF) y HPLC.

Condiciones del HPLC. Disolvente A: MeCN al 5% en acetato de trietilamonio 100 mM (TEAA) (pH 7) y disolvente B: MeCN al 70% en TEAA 100 mM (pH 7). Columna: XBridge™ OST C18; (4.6 x 50 mm, 2.5 µm). Flujo: 1 mL/min. Condiciones: 10 min de gradiente lineal de 0 a 20% de B, para los 15Mer modificados.

➤ *Protocolo Glen-Pak™*

Se acondiciona el cartucho con un lavado de 0.5 mL de MeCN y 1 mL de acetato de trietilamonio 2 M. Después, se produce la carga del oligonucleótido (2 mL) en el cartucho: se mezcla 1 mL del oligonucleótido con 1 mL de una disolución de NaCl (100 mg/mL). A continuación, se lava el cartucho con 2 mL de una disolución de NaCl (100 mg/mL) que contiene 5% MeCN. Posteriormente, se rompe el DMT con 2 mL de TFA al 2% en agua y luego se lava con 2 mL más de agua. Finalmente, se recoge el

oligonucleótido purificado al pasar una mezcla de 0.5% de NH₄OH en H₂O:MeCN (1:1).

➤ Síntesis de ARN modificado

Se elaboró una base con 2 unidades de T* a una escala de 1 μmol usando el soporte sólido modificado y el fosforamidito apropiado. A continuación, el resto de la secuencia de ARN se ensambló utilizando protocolos de síntesis de ARN estándar y monómeros de ARN protegidos con TBS (A^{Bz}, G^{dmf}, C^{Ac} y U) en una escala de 0.2 μmol. Se usaron las siguientes disoluciones: 1*H*-tetrazol en MeCN 0.4 M (activación); 3% de Cl₃CCO₂H en CH₂Cl₂ (destritilación), Ac₂O/Py/THF (1:1:8) (capado A), *N*-metilimidazol al 10% en THF (capado B) y una disolución de yodo en THF/Py/H₂O (7:2:1) 0.01 M para la etapa de oxidación. El tiempo de acoplamiento fue de 15 min.

Todos los oligonucleótidos se sintetizaron en modo DMT-ON. Después de la síntesis en fase sólida, el soporte se transfirió a un vial de vidrio y se incubó a 55 °C durante 1 h con 1.5 mL de una disolución acuosa de NH₃ (33%) y 0.5 mL de EtOH. El vial se enfrió sobre hielo y el sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf de 2 mL. El soporte sólido y el vial se enjuagaron con EtOH al 50% (2 x 0.25 mL). La disolución obtenida se evaporó hasta sequedad utilizando una centrifuga de evaporación.

El residuo obtenido se disolvió en 0.15 mL de trietilamina·tris(hidrofluoruro)/Et₃N/*N*-metilpirrolidona (4:3:6) durante 2.5 h a 65 °C para eliminar los grupos TBS. Los oligonucleótidos se purificaron usando un cartucho de purificación de oligonucleótidos (Glen Research) y HPLC. Los rendimientos (síntesis de escala de 0.2 μmol) oscilaron entre 10 y 15 unidades OD a 260 nm.

3.9. Estudios de desnaturalización

Los experimentos de fusión se realizaron con un instrumento Jasco V-650 equipado con un soporte para celdillas termorregulado. Estos se llevaron a cabo por duplicado a una concentración de 3 μ M de oligonucleótido. Las muestras se prepararon usando una disolución de NaCl 50 mM y un tampón fosfato sódico 10 mM (pH 7.0). Las concentraciones de todos los oligonucleótidos se estimaron mediante la absorción UV-Vis a 50 °C empleando los valores ϵ_{260} calculados para el duplex de ADN.

Las muestras se calentaron a 90 °C durante 5 min, se dejaron enfriar lentamente a temperatura ambiente y se mantuvieron durante la noche en un refrigerador. Las curvas de fusión se registraron controlando la absorbancia a 260 nm. Las muestras se calentaron desde una temperatura de 10 °C hasta 75-80 °C, a una velocidad constante de 1 °C/min. Las cubetas utilizadas fueron de cuarzo con una longitud de trayectoria de 1 cm, y un orificio en la parte superior para adaptar un tapón de PTFE. Con ello se consigue tapar la cubeta para evitar la posible evaporación durante la adquisición.

Cuando la temperatura estaba por debajo de 25 °C, se circuló nitrógeno por el sistema para evitar la condensación del agua. Se prepararon, al menos, dos muestras diferentes para cada experimento de fusión. Los datos termodinámicos se calcularon a partir de las curvas de fusión mediante ajuste por ordenador usando el software de Meltwin 3.5.

3.10. Células

Las células HeLa (ATCC) fueron cultivadas en el medio de cultivo Dulbecco modificado por Eagle medium (DMEM) (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.), suplementado con 10% de suero

fetal bovino inactivado al calor (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.) y una disolución de penicilina/estreptomicina (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.). Las células se incubaron a 37 °C en un ambiente humidificado con 5% de CO₂ y comprobando periódicamente la presencia de contaminación por micoplasma. La viabilidad celular se monitorizó mediante el ensayo de exclusión Blue Trypan y fue superior al 95% en todos los experimentos.

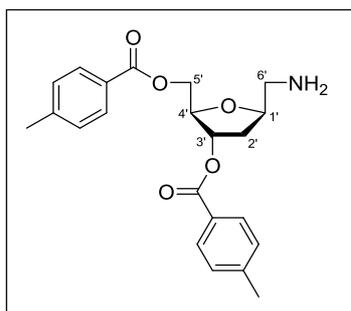
3.11. Ensayo y transfección de luciferasa

Para el ensayo de luciferasa de siRNA, las células HeLa fueron depositadas en placas de cultivo de 24 pocillos a densidad de 1×10^5 células por pozo 24 h antes de la transfección. En respuesta a la dosis, 1 mg de psiCHECK-2 (AS) o psiCHECK-2 (SS) y siRNAs a diferentes concentraciones fueron co-transfectadas con Lipofectamine 2000 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) según las instrucciones del fabricante.

Se midió el efecto inhibitorio de los siRNAs en la expresión de la proteína luciferasa de *Renilla* en lisados recogidos 24 h después de la transfección mediante el sistema Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega Biotech Ibérica, Madrid, España) y un luminómetro GloMax Discover (Promega Biotech Ibérica, Madrid, España).

El cociente de las actividades de la luciferasa de *Renilla* (hRluc) y la proteína *Photinus* luciferasa (hluc+) se normalizó para fijar la transfección y se asignó el valor de 100%. El análisis estadístico fue realizado usando GraphPad Prism software (GraphPad, San Diego, CA, USA). La determinación de IC₅₀ se realizó mediante análisis de regresión no lineal (log [inhibidor] vs respuesta normalizada).

1 β -Aminometil-1,2-didesoxi-3,5-di-O-toluoil-D-ribosa (49)



Líquido viscoso amarillo

R_f: 0.2 (5% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₂₂H₂₅NO₅

Masa Molecular: 383.44 g/mol

IR (NaCl): ν 3407, 3055, 2987, 1718, 1266 cm⁻¹.

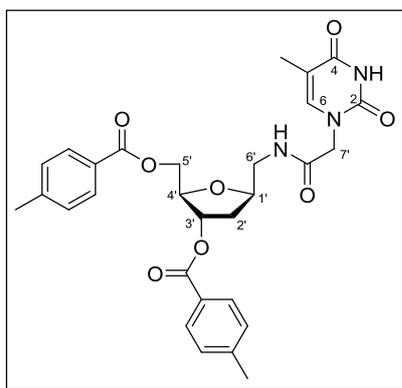
¹H-RMN (300.13 MHz, CDCl₃): δ 2.15 (m, 2H, H_{2'}), 2.38 (s, 3H, *Me*-Tol), 2.40 (s, 3H, *Me*-Tol), 2.84 (dd, 1H, H_{6'}, $J = 12.9, 6.0$ Hz), 3.06 (overlapped, 1H, H_{6'}), 3.14 (br s, 2H, NH₂), 4.38 (m, 2H, H_{4'}+H_{1'}), 4.51 (m, 2H, H_{5'}), 5.48 (m, 1H, H_{3'}), 7.22 (2d, 4H, H_{orto}-Me), 7.91 (2d, 4H, H_{orto}-CO) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): δ 21.8 (2CH₃), 35.5 (C_{2'}), 45.0 (C_{6'}), 64.7 (C_{5'}), 76.9 (C_{3'}), 79.5 (C_{1'}), 82.8 (C_{4'}), 127.0 (Cipso-CO), 127.1 (Cipso-CO), 129.27 (2C_{orto}-Me), 129.30 (2C_{orto}-Me), 129.8 (4C_{orto}-CO), 144.0 (Cipso-Me), 144.2 (Cipso-Me), 166.2 (C=O), 166.6 (C=O) ppm.

EMAR (ESI⁺, m/z):

- Calculada para C₂₂H₂₆NO₅ [M+H]⁺: 384.1805
- Encontrada: 384.1808

1,2-Didesoxi-1β-[N-(1-timinilacetil)aminometil]-3,5-di-O-toluoil-D-ribose (50)



Sólido blanco

R_f: 0.32 (5% MeOH/CH₂Cl₂)

P_f: 183-184 °C

Fórmula molecular: C₂₉H₃₁N₃O₈

Masa Molecular: 549.58 g/mol

IR (KBr): ν 3551, 3478, 3412, 3333, 2993, 1718, 1665, 1612, 1556 cm⁻¹.

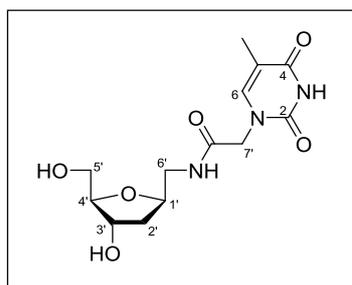
¹H-RMN (300.13 MHz, CDCl₃): δ 1.81 (sa, 1H, NH), 1.91 (s, 3H, *Me*-C₅), 2.12 (m, 2H, H_{2'}), 2.40 (s, 3H, *Me*-Tol), 2.41 (s, 3H, *Me*-Tol), 3.44 (dt, 1H, H_{6'}, *J* = 14.1, 3.1 Hz), 3.64 (ddd, 1H, H_{6'}, *J* = 13.9, 7.5, 3.8 Hz), 4.26 (d, 1H, H_{7'}, *J* = 15.8 Hz), 4.35 – 4.48 (m, 4H, H_{1'}+H_{4'}+ H_{5'}+H_{7'}), 4.73 (dd, 1H, H_{5'}, *J* = 12.2, 8.1 Hz), 5.42 (d, 1H, H_{3'}, *J* = 5.3 Hz), 7.01 (s, 1H, H_{6'}), 7.24 (2d, 4H, H_{orto}-Me), 7.92 (2d, 4H, H_{orto}-CO), 8.86 (sa, 1H, NH) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): δ 12.5 (CH₃-C₅), 21.9 (2CH₃-Tol), 34.3 (C_{2'}), 41.2 (C_{6'}), 50.7 (C_{7'}), 64.9 (C_{5'}), 77.4 (C_{3'}), 78.4 (C_{1'}), 83.6 (C_{4'}), 110.9 (C₅), 126.9 (C_{ipso}-CO), 127.1 (C_{ipso}-CO), 129.3 (2C_{orto}-Me), 129.4 (2C_{orto}-Me), 129.8 (2C_{orto}-CO), 130.0 (2C_{orto}-CO), 141.1 (C₆), 144.4 (2C_{ipso}-Me), 151.1 (C₂), 164.2 (C₄), 166.3 (O=C-C_{7'}), 167.2 (C=O), 167.3 (C=O) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₂₉H₃₁N₃NaO₈ [M+Na]⁺: 572.2003
- Encontrada: 572.2001

1,2-Didesoxi-1 β -[N-(1-timinilacetil)aminometil]-
-D-ribosa (51)



Sólido blanco

R_f: 0.1 (10% MeOH/CH₂Cl₂)

P_f: 133-135 °C

Fórmula molecular: C₁₃H₁₉N₃O₆

Masa Molecular: 313.31 g/mol

IR (KBr): ν 3427, 2975, 2941, 2676, 1667, 1574, 1476 cm⁻¹.

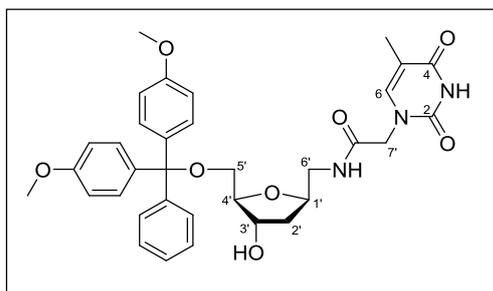
¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 1.83 (m, 2H, H_{2'}), 1.88 (s, 3H, Me-C₅), 3.38 (d, 2H, H_{6'}, *J* = 4.8 Hz), 3.53 (dd, 1H, H_{5'}, *J* = 11.7, 5.2 Hz), 3.60 (dd, 1H, H_{5'}, *J* = 11.7, 4.2 Hz), 3.78 (q, 1H, H_{4'}, *J* = 4.3 Hz), 4.22 (m, 2H, H_{1'+}H_{3'}), 4.40 (s, 2H, H_{7'}), 7.37 (d, 1H, H₆, *J* = 1.1 Hz) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ 12.2 (CH₃), 38.8 (C_{2'}), 44.1 (C_{6'}), 51.1 (C_{7'}), 63.7 (C_{5'}), 73.7 (C_{3'}), 78.4 (C_{1'}), 88.7 (C_{4'}), 111.0 (C₅), 143.7 (C₆), 153.0 (C₂), 167.0 (C₄), 169.8 (O=C-C_{7'}) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₁₃H₁₉N₃NaO₆ [M+Na]⁺: 336.1166
- Encontrada: 336.1166

1,2-Didesoxi-5-O-(4,4'-dimetoxitritil)-1-
-[N-(1-timinilacetil)aminometil]-D-ribosa (52)



Sólido blanco anaranjado

R_f: 0.45 (10% MeOH/CH₂Cl₂)

P_f: 107-109 °C

Fórmula molecular: C₃₄H₃₇N₃O₈

Masa Molecular: 615.68 g/mol

IR (KBr): ν 3540, 3473, 3415, 2961, 2932, 1680, 1617, 1508 cm⁻¹.

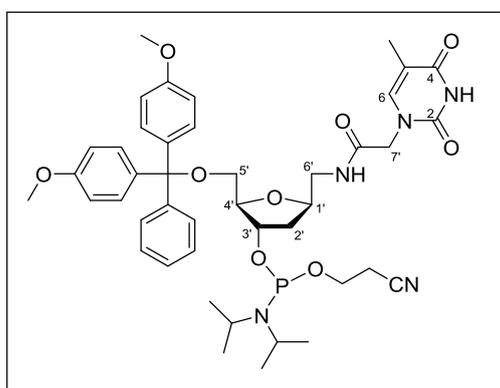
¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 1.77 (s, 3H, Me-C₅), 1.84 (m, 2H, H_{2'}), 3.11 (d, 2H, H_{5'}, *J* = 4.9 Hz), 3.29 (solapado con MeOH-*d*₄, 1H, H_{6'}), 3.46 (dd, 1H, H_{6'}, *J* = 14.0, 7.0 Hz), 3.74 (s, 6H, Me-DMT), 3.91 (m, 1H, H_{4'}), 4.25 (m, 4H, H_{1'}+H_{3'}+2H_{7'}), 6.84 (d, 4H, Harom, *J* = 8.9 Hz), 7.11 (s, 1H, H₆), 7.14-7.50 (m, 9H, Harom) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ 12.2 (CH₃-C₅), 39.1 (C_{2'}), 44.4 (C_{6'}), 51.0 (C_{7'}), 55.7 (2 O-CH₃), 65.7 (C_{5'}), 74.5 (C_{3'}), 78.5 (C_{1'}), 87.4 (C-DMT), 87.7 (C_{4'}), 110.9 (C₅), 114.1 (4CH_{arom}), 127.8 (CH_{arom}), 128.8 (2CH_{arom}), 129.4 (2CH_{arom}), 131.3 (4CH_{arom}), 137.3 (2C_{ipso}), 143.6 (C₆), 146.5 (C_{ipso}), 152.9 (C₂), 160.1 (2C_{ipso}), 167.0 (C₄), 169.5 (O=C-C₇) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₃₄H₃₇N₃NaO₈ [M+Na]⁺: 638.2473
- Encontrada: 638.2474

1,2-Didesoxi-5-O-(4,4'-dimetoxitritil)-
3[(2cianoetil)diisopropilfosforamidito]-1-[N-(1-
timinilacetil)aminometil]-D-ribosa (55)



Sólido blanco

R_f: 0.36 y 0.30 (100% AcOEt)

Fórmula molecular: C₄₃H₅₄N₅O₉P

Masa Molecular: 815.37 g/mol

³¹P-RMN (162 MHz, CDCl₃): δ 148.02, 147.92 ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₄₃H₅₅N₅O₉P [M+H]⁺: 816.3732
- Encontrada: 816.3706

- Calculada para C₄₃H₅₄N₅NaO₉P [M+Na]⁺: 838.3551
- Encontrada: 838.3527