



Universidad de Oviedo

Departamento de Química Orgánica e Inorgánica

Programa de Doctorado en Síntesis y Reactividad Química

**SÍNTESIS DE NUCLEÓSIDOS Y OLIGONUCLEÓTIDOS
CON POTENCIAL ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA**

Tesis Doctoral

Virginia Martín Nieves



Universidad de Oviedo

Departamento de Química Orgánica e Inorgánica

Programa de Doctorado en Síntesis y Reactividad Química

**SÍNTESIS DE NUCLEÓSIDOS Y OLIGONUCLEÓTIDOS
CON POTENCIAL ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA**

**Memoria presentada para optar al
grado de Doctora en Química por
Virginia Martín Nieves**



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Síntesis de nucleósidos y oligonucleótidos con potencial actividad farmacológica	Synthesis of nucleosides and oligonucleotides with potential pharmacological activity
2.- Autor	
Nombre: VIRGINIA MARTÍN NIEVES	DNI/Pasaporte/NIE:
Programa de Doctorado: SÍNTESIS Y REACTIVIDAD QUÍMICA	
Órgano responsable: CENTRO INTERNACIONAL DE POSTGRADO	

RESUMEN (en español)

Los nucleósidos son los monómeros precursores de los ácidos nucleicos, los cuales ejercen un papel fundamental en los procesos genéticos de todos los organismos vivos. Por ello, los nucleósidos naturales representan un excelente punto de partida para el diseño de fármacos y, en la actualidad, existen más de treinta análogos de nucleósidos y nucleótidos aprobados para el tratamiento de cánceres e infecciones virales. Por otro lado, el potencial terapéutico de los oligonucleótidos sintéticos, especialmente después del descubrimiento del mecanismo del ARN de interferencia y del ARN no codificante, ha desencadenado grandes esfuerzos para el desarrollo de ácidos nucleicos miméticos.

Esta Tesis Doctoral está dividida en cuatro capítulos, cada uno de los cuales aborda el estudio de diferentes análogos de nucleósidos y oligonucleótidos desde una perspectiva sintética, mostrando en algunos casos los resultados de su evaluación biológica.

En el primer capítulo, se han sintetizado nuevos 1'-homo-*N*-2'-desoxi- α -nucleósidos de A, C, T, U, 5-FU y 5-IU a través del acoplamiento de una nucleobase y un precursor de azúcar tosilado. Además, se han obtenido dímeros derivados resultantes del acoplamiento del azúcar en las posiciones N-1 y N-3 de la base. Se ha evaluado la actividad biológica de estos compuestos como antivirales y se han realizado estudios de citotoxicidad.

En el segundo capítulo, se han sintetizado varios 2',3'-didesoxinucleósidos y 2',3'-dideshidro-2',3'-didesoxinucleósidos antivirales mediante un método general a partir de los correspondientes ribonucleósidos. Este nuevo protocolo es simple, económico, seguro e industrialmente benigno para las síntesis a gran escala de estos análogos.

En el tercer capítulo, se describe la síntesis y la aplicación de oligonucleótidos funcionalizados que presentan nuevas moléculas enlazadoras basadas en azúcares derivados de aminometil y mercaptometil. Se han preparado seis nuevos fosforamiditos a partir de un precursor de cianoazúcar común. El derivado de aminometil se ha protegido con dos grupos ortogonales que permiten la introducción de dos ligandos diferentes en un único oligonucleótido.

En el cuarto capítulo, se han sintetizado análogos de L-nucleósidos de C, U, 5-IU y 5-CF₃-T con residuos 2'-*O*-alquilo (2'-*O*-metilo y 2'-*O*-metoxietilo) a partir de L-arabinosa, un azúcar barato disponible en la naturaleza. Las modificaciones 2'-*O*-Me y 2'-*O*-MOE son utilizadas frecuentemente en el diseño de D-oligonucleótidos terapéuticos. Los derivados sintetizados se utilizarán para la preparación de L-oligonucleótidos.

Parte de los resultados obtenidos a lo largo de esta Tesis Doctoral han sido publicados en los siguientes artículos:

"Novel 1'-homo-*N*-2'-deoxy- α -nucleosides: synthesis, characterization and biological activity". A. Carnero, V. Martín-Nieves, Y. S. Sanghvi, O. O. Russel, L. Bassit, R. F. Schinazi, S. Fernández, M. Ferrero. *RSC Adv.* **2020**, *10*, 15815-15824.

"Oligonucleotides Containing 1-Aminomethyl or 1-Mercaptomethyl-2-deoxy-D-ribofuranoses: Synthesis, Purification, Characterization, and Conjugation with Fluorophores and Lipids". V. Martín-Nieves, C. Fàbrega, M. Guasch, S. Fernández, Y. S. Sanghvi, M. Ferrero, R. Eritja. *Bioconjugate Chem.* **2021**, *32*, 350-366.



RESUMEN (en Inglés)

Nucleosides are building-blocks of nucleic acids, which play a key role in the genetic process of all living organisms. For that reason, the naturally occurring nucleosides represent a unique starting point for drug design and, currently, there are more than thirty nucleoside and nucleotide analogues on the market approved for the treatment of cancer and viral infections. On the other hand, the therapeutic potential of synthetic oligonucleotides, especially after discovery of the RNA interference mechanism and noncoding RNA, has triggered a large research effort in the development of nucleic acids mimics.

This PhD Thesis comprises four chapters, in which different nucleoside and oligonucleotides analogs have been studied from a synthetic perspective, showing in some cases the results of their biological evaluation.

In the first chapter, novel 1'-homo-*N*-2'-deoxy- α -nucleoside analogs of A, C, T, U, 5-FU, and 5-IU have been synthesized *via* coupling of a nucleobase and a tosylated intermediate sugar precursor. Additionally, dimer derivatives resulting from the coupling of the sugar moiety at the N-1 and N-3 positions of the base have been obtained. The biological activity of these compounds as antivirals and cytotoxic studies has been measured.

In the second chapter, several 2',3'-dideoxynucleoside and 2',3'-dideoxy-2',3'-dideoxynucleoside antiviral derivatives have been synthesized through a general method from the corresponding ribonucleosides. This new synthetic protocol is simple, inexpensive, safe and industrially benign for the large-scale syntheses of these analogs.

In the third chapter, the synthesis and application for oligonucleotide functionalization of novel tethers based on aminomethyl and mercaptomethyl sugar derivatives has been described. Six novel phosphoramidites have been prepared from a common cyano sugar precursor. The aminomethyl sugar has been protected with two orthogonal groups enabling the introduction of two different ligands in a single oligonucleotide.

In the fourth chapter, L-nucleoside analogs of C, U, 5-IU and 5-CF₃-T with 2'-*O*-alkyl residues (2'-*O*-methyl and 2'-*O*-methoxyethyl) have been synthesized from L-arabinose, a cheap natural L-sugar. 2'-*O*-Me and 2'-*O*-MOE modifications are commonly used in the design of therapeutic D-oligonucleotides and therefore these synthesized derivatives will be used as building-blocks to prepare L-oligonucleotides.

Part of the results obtained along this PhD Thesis have been published in:

"Novel 1'-homo-*N*-2'-deoxy- α -nucleosides: synthesis, characterization and biological activity". A. Carnero, V. Martín-Nieves, Y. S. Sanghvi, O. O. Russel, L. Bassit, R. F. Schinazi, S. Fernández, M. Ferrero. *RSC Adv.* **2020**, *10*, 15815-15824.

"Oligonucleotides Containing 1-Aminomethyl or 1-Mercaptomethyl-2-deoxy-D-ribofuranoses: Synthesis, Purification, Characterization, and Conjugation with Fluorophores and Lipids". V. Martín-Nieves, C. Fàbrega, M. Guasch, S. Fernández, Y. S. Sanghvi, M. Ferrero, R. Eritja. *Bioconjugate Chem.* **2021**, *32*, 350-366.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

----- *Abreviaturas y acrónimos*

(-)-CSA	Ácido canforsulfónico
3TC	Lamivudina
5-FU	5-Fluorouracilo
5-IU	5-Iodouracilo
A	Adenina/Adenosina
ACHN	1,1'-Azobis(ciclohexanocarbonitrilo)
ADA	Adenosina desaminasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIBN	2,2'-Azobis(isobutironitrilo)
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ASO	Oligonucleótido antisentido
AZT	3'-Azido-3'-desoxitimidina (zidovudina)
C	Citosina/Citidina
CAL-B	<i>Candida antarctica</i> B
CNE	2-cianoetilo
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
d4T	2',3'-Didehidro-3'-desoxitimidina (estavudina)
dA	2'-Desoxiadenosina
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno
dC	2'-Desoxicitidina

Abreviaturas y acrónimos -----

ddC	2',3'-Didesoxicitina (zalcitabina)
ddI	2',3'-Didesoxiinosina (didanosina)
dG	2'-Desoxiguanosina
DIAD	Azodicarboxilato de diisopropilo
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropiletilamina
DMAP	<i>N,N</i> -dimetilaminopiridina
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMT	4,4'-dimetoxitritilo
dU	2'-Desoxiuridina
EC ₅₀	Concentración efectiva media
EM	Espectrometría de masas
EMA	Agencia Europea del Medicamento
EMAR	Espectrometría de masas de alta resolución
equiv	Equivalentes
ESI ⁺	Ionización por electrospray
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
G	Guanina/Guanosina
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
IC ₅₀	Concentración inhibitoria media
IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
Lev	Levulinilo
MOE	Metoxietilo
MM	Masa molecular

----- *Abreviaturas y acrónimos*

MMT	Monometoxitritilo
Ms	Mesilo
NPEC	1-(2-nitrofenil)etoxicarbonil
NRTIs	Derivados nucleosídicos inhibidores de la transcriptasa inversa
OMS	Organización Mundial de la Salud
p/p	Relación de peso
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
P _f	Punto de fusión
ppm	Partes por millón
PSL-IM	Lipasa de <i>Pseudomonas cepacia</i> inmovilizada sobre diatomita
Py	Piridina
R _f	Factor de retención
RISC	<i>RNA Induced Silencing Complex</i>
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RNasa H	Ribonucleasa H
RT	Transcriptasa inversa
T	Timina/Timidina/Temperatura
t.a.	Temperatura ambiente
TBAF	Fluoruro de tetrabutilamonio
TBS	<i>tert</i> -butildimetilsililo
TCA	Ácido tricloroacético
THF	Tetrahidrofurano
TLC	<i>Thin Layer Chromatography</i>
TMSOTf	Trimetilsilil trifluorometanosulfonato
Tol	Toluido

Abreviaturas y acrónimos -----

Ts	Tosilo
U	Uracilo/Uridina
UV	Ultravioleta
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
δ	Desplazamiento químico

ÍNDICE

RESUMEN	1
SUMMARY	5
INTRODUCCIÓN	9
I.1. Importancia de los ácidos nucleicos	11
I.2. Estructura de los nucleósidos	15
I.3. Nucleósidos modificados como agentes terapéuticos	17
I.3.1. Mecanismo bioquímico de los análogos de nucleósido	19
I.3.1.1. Final de la elongación de la cadena	20
I.3.1.2. Daños en el ADN	21
I.3.1.3. Alteración en los mecanismos de reparación del ADN.	21
I.3.1.4. Inhibición enzimática	22
I.3.2. Nucleósidos como antivirales	22
I.3.2.1. Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)	23
I.3.2.2. Virus de la hepatitis B	27
I.3.2.3. Virus de la hepatitis C	29
I.3.2.4. Virus del Ébola	30
I.3.2.5. SARS-CoV-2	31
I.3.2.6. Otros virus	32
I.3.3. Nucleósidos como antitumorales	33
I.4. Oligonucleótidos con actividad terapéutica	35
I.4.1. Oligonucleótidos antisentido	38
I.4.2. ARN de interferencia (ARNi)	39
I.4.3. Ribozimas	41
I.4.4. Aptámeros	42
I.4.5. Oligodesoxinucleótidos Citosina-Guanina (CpG)	43
I.4.6. Vacunas de ARNm	45
I.5. Modificaciones químicas en oligonucleótidos	46
I.5.1. Derivatización química	46
I.5.1.1. Oligonucleótidos de primera generación	46

Índice -----

I.5.1.2. Oligonucleótidos de segunda generación	47
I.5.1.3. Oligonucleótidos de tercera generación.....	48
I.5.2. Métodos de síntesis de oligonucleótidos	51
I.5.2.1. Síntesis en fase sólida	52
I.5.2.2. Síntesis en disolución	53
I.5.3. Oligonucleótidos conjugados	54
I.5.3.1. Estrategias de conjugación	55
I.5.3.2. Tipos principales de oligonucleótidos conjugados	57
CAPÍTULO 1. SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE 1'-HOMO-N-2'-DESOXI-α-NUCLEÓSIDOS.....	61
Antecedentes	63
1. α -Nucleósidos	66
1.1. Síntesis de α -nucleósidos	67
2. 1'-Homonucleósidos	71
2.1. Síntesis de 1'-homo-N-nucleósidos	73
2.1.1. Síntesis de 1'-homo-N-ribonucleósidos	74
2.1.2. Síntesis de 1'-homo-N-2'-desoxinucleósidos	78
3. Consideraciones generales de ensayos biológicos <i>in vitro</i>	81
3.1. Ensayo de actividad antiviral	81
3.2. Ensayo MTT de citotoxicidad.....	81
Objetivos.....	83
Resultados y discusión.....	87
1. Síntesis de 1'-homo-N-nucleósidos	90
1.1. Síntesis del derivado de desoxirribosa con C-6' activado	90
1.2. Síntesis de 1'-homo-N-nucleósidos con las distintas bases nitrogenadas.....	92
1.2.1. Mesilato.....	93
1.2.2. Acetato.....	97

1.2.3. Tosilato	98
1.2.4. Desprotección de los grupos hidroxilo.....	101
2. Cristalografía de rayos X	103
3. Evaluación biológica <i>in vitro</i>	104
3.1. Estudios de actividad antiviral frente al VIH	104
3.2. Estudios de actividad antiviral frente al VHB.....	105
3.3. Estudios de citotoxicidad.....	106
Conclusiones	107
Parte experimental.....	111
1. Condiciones de trabajo, disolventes y reactivos	113
2. Técnicas instrumentales	114
3. Procedimientos experimentales.....	115
4. Ensayos biológicos <i>in vitro</i>	119
5. Datos experimentales	121
CAPÍTULO 2. SÍNTESIS DE 2',3'-DIDESOXINUCLEÓSIDOS Y 2',3'-DIDESHIDRO-2',3'-DIDESOXINUCLEÓSIDOS	149
Antecedentes.....	151
1. Síntesis de 2',3'dideshidro-2',3'-didesoxinucleósidos y/o 2',3'-didesoxinucleósidos	155
1.1. Síntesis a partir de carbohidratos.....	156
1.2. Síntesis a partir de nucleósidos.....	157
1.2.1. Desoxigenación de Eastwood.....	157
1.2.2. Síntesis de Corey-Winter	158
1.2.3. Desoxigenación de Barton-McCombie.....	158
1.2.4. Reacción de Garegg-Samuelsson	160
1.2.5. Desoxigenación fotoinducida	161
1.2.6. Eliminación reductiva.....	161
1.2.7. Otros métodos.....	163
Objetivos	165

Índice -----

Resultados y discusión	169
1. Estrategia quimioenzimática: síntesis del bisxantato.....	171
2. Síntesis de 2',3'-dideshidro-2',3'-didesoxinucleósidos.....	176
2.1. Protección del hidroxilo primario como éter de silicio.....	176
2.2. Reacción de formación de bisxantatos.....	176
2.3. Reducción radicalaria.....	179
2.4. Desprotección del grupo hidroxilo.....	181
3. Síntesis de 2',3'-didesoxinucleósidos.....	183
3.1. Síntesis de didanosina por desaminación enzimática.....	184
4. Escalado del proceso sintético	184
Conclusiones	187
Parte experimental	191
1. Condiciones de trabajo, disolventes y reactivos	193
2. Técnicas instrumentales	193
3. Procedimientos experimentales	194
4. Datos experimentales	197

CAPÍTULO 3. SÍNTESIS DE OLIGONUCLEÓTIDOS QUE CONTIENEN 1-AMINOMETIL O 1-MERCAPTOMETIL-2-DESOXI-D-RIBOFURANOSA: PURIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y CONJUGACIÓN CON LÍPIDOS Y FLUORÓFOROS.....237

Antecedentes	239
1. Síntesis de oligonucleótidos mediante el método del fosforamidito.....	242
1.1. Grupos protectores en el fosforamidito.....	243
1.2. Ciclo de síntesis	245
2. Estrategia gapmer	248
3. Grupos reactivos en la síntesis de oligonucleótidos conjugados ..	249
3.1. Grupo amino	249

3.2. Grupo tiol.....	253
3.3. Química click.....	255
4. Ligandos conjugados con oligonucleótidos	256
4.1. Ácidos grasos.....	256
4.2. Moléculas fluorescentes	258
Objetivos	261
Resultados y discusión	265
1. Síntesis de los derivados 2-desoxi-D-ribofuranosa 1-funcionalizados	267
1.1. Síntesis de los fosforamiditos 2-desoxi-D-ribofuranosa 1-funcionalizados	268
1.1.1. Fosforamiditos derivados de N-(trifluoroacetil)aminometil	268
1.1.2. Fosforamiditos con grupo protector fotolábil para el grupo amino	274
1.1.3. Fosforamiditos derivados de acetiltiometil	276
1.2. Síntesis de los soportes sólidos con derivados 2-desoxi-D-ribofuranosa 1-funcionalizados	278
2. Síntesis, purificación y caracterización de los oligonucleótidos con monómeros 1-funcionalizados	279
3. Eliminación de los grupos protectores de los oligonucleótidos	281
3.1. Eliminación del grupo protector fotolábil	285
4. Preparación de oligonucleótidos conjugados	286
Conclusiones	293
Parte experimental.....	297
1. Condiciones de trabajo, disolventes y reactivos	299
2. Técnicas instrumentales	299
3. Síntesis de fosforamiditos y otros derivados.....	301
4. Síntesis, purificación y caracterización de oligonucleótidos	308
5. Conjugación de oligonucleótidos	312
6. Datos experimentales	314

**CAPÍTULO 4. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE L-NUCLEÓSIDOS
2'-SUSTITUIDOS357**

Antecedentes 359

- 1. L-Nucleósidos 361
 - 1.1. Síntesis a partir de L-arabinosa 364
 - 1.2. Síntesis a partir de L-xilosa 367
 - 1.3. Síntesis a partir de D-ribosa y D-glucosa..... 368
- 2. L-Oligonucleótidos..... 369
 - 2.1. Spiegelmers 371
 - 2.2. Otras aplicaciones 373
- 3. Oligonucleótidos 2'-modificados 374

Objetivos..... 377

Resultados y discusión..... 381

- 1. Síntesis de $O^{2,2'}$ -anhidro-L-uridina..... 384
- 2. Apertura del anhidronucleósido mediante S_N2 384
 - 2.1. Síntesis de 2'-*O*-metil-L-uridina 384
 - 2.2. Síntesis de 2'-*O*-metoxietil-L-uridina 386
- 3. Transformación de la base nitrogenada. Síntesis de derivados de citidina 387
- 4. Síntesis de L-nucleósidos modificados en la posición 5 de la base nitrogenada..... 393
 - 4.1. Derivados de L-5-iodouridina 393
 - 4.2. Derivados de L-5-trifluorometiluridina 396
- 5. Síntesis de 5'-*O*-dimetoxitritil-L-nucleósidos 2'-modificados 396

Conclusiones..... 399

Parte experimental 403

- 1. Condiciones de trabajo, disolventes y reactivos 405
- 2. Técnicas instrumentales 405
- 3. Procedimientos experimentales 405
- 4. Datos experimentales 411

RESUMEN

Los nucleósidos son los monómeros precursores de los ácidos nucleicos, los cuales ejercen un papel fundamental en los procesos genéticos de todos los organismos vivos. Por ello, los nucleósidos naturales representan un excelente punto de partida para el diseño de fármacos y, en la actualidad, existen más de treinta análogos de nucleósidos y nucleótidos aprobados para el tratamiento de cánceres e infecciones virales. Por otro lado, el potencial terapéutico de los oligonucleótidos sintéticos, especialmente después del descubrimiento del mecanismo del ARN de interferencia y del ARN no codificante, ha desencadenado grandes esfuerzos para el desarrollo de ácidos nucleicos miméticos.

Esta Tesis Doctoral está dividida en cuatro capítulos, cada uno de los cuales aborda el estudio de diferentes análogos de nucleósidos y oligonucleótidos desde una perspectiva sintética, mostrando en algunos casos los resultados de su evaluación biológica.

En el primer capítulo, se han sintetizado nuevos 1'-homo-*N*-2'-desoxi- α -nucleósidos de A, C, T, U, 5-FU y 5-IU a través del acoplamiento de una nucleobase y un precursor de azúcar tosilado. Además, se han obtenido dímeros derivados resultantes del acoplamiento del azúcar en las posiciones N-1 y N-3 de la base. Se ha evaluado la actividad biológica de estos compuestos como antivirales y se han realizado estudios de citotoxicidad.

En el segundo capítulo, se han sintetizado varios 2',3'-didesoxinucleósidos y 2',3'-dideshidro-2',3'-didesoxinucleósidos

Resumen -----

antivirales mediante un método general a partir de los correspondientes ribonucleósidos. Este nuevo protocolo es simple, económico, seguro e industrialmente benigno para las síntesis a gran escala de estos análogos.

En el tercer capítulo, se describe la síntesis y la aplicación de oligonucleótidos funcionalizados que presentan nuevas moléculas enlazadoras basadas en azúcares derivados de aminometil y mercaptometil. Se han preparado seis nuevos fosforamiditos a partir de un precursor de cianoazúcar común. El derivado de aminometil se ha protegido con dos grupos ortogonales que permiten la introducción de dos ligandos diferentes en un único oligonucleótido.

En el cuarto capítulo, se han sintetizado análogos de L-nucleósidos de C, U, 5-IU y 5-CF₃-T con residuos 2'-*O*-alquilo (2'-*O*-metilo y 2'-*O*-metoxietilo) a partir de L-arabinosa, un azúcar barato disponible en la naturaleza. Las modificaciones 2'-*O*-Me y 2'-*O*-MOE son utilizadas frecuentemente en el diseño de D-oligonucleótidos terapéuticos. Los derivados sintetizados se utilizarán para la preparación de L-oligonucleótidos.

Parte de los resultados obtenidos a lo largo de esta Tesis Doctoral han sido publicados en los siguientes artículos:

“Novel 1'-homo-*N*-2'-deoxy- α -nucleosides: synthesis, characterization and biological activity”. A. Carnero, V. Martín-Nieves, Y. S. Sanghvi, O. O. Russel, L. Bassit, R. F. Schinazi, S. Fernández, M. Ferrero. *RSC Adv.* **2020**, *10*, 15815-15824.

“Oligonucleotides Containing 1-Aminomethyl or 1-Mercaptomethyl-2-deoxy-D-ribofuranoses: Synthesis, Purification, Characterization, and Conjugation with Fluorophores and Lipids”. V. Martín-Nieves, C. Fàbrega, M. Guasch, S. Fernández, Y. S. Sanghvi, M. Ferrero, R. Eritja. *Bioconjugate Chem.* **2021**, *32*, 350-366.

SUMMARY

Nucleosides are building-blocks of nucleic acids, which play a key role in the genetic process of all living organisms. For that reason, the naturally occurring nucleosides represent a unique starting point for drug design and, currently, there are more than thirty nucleoside and nucleotide analogues on the market approved for the treatment of cancer and viral infections. On the other hand, the therapeutic potential of synthetic oligonucleotides, especially after discovery of the RNA interference mechanism and noncoding RNA, has triggered a large research effort in the development of nucleic acids mimics.

This PhD Thesis comprises four chapters, in which different nucleoside and oligonucleotides analogs have been studied from a synthetic perspective, showing in some cases the results of their biological evaluation.

In the first chapter, novel 1'-homo-*N*-2'-deoxy- α -nucleoside analogs of A, C, T, U, 5-FU, and 5-IU have been synthesized *via* coupling of a nucleobase and a tosylated intermediate sugar precursor. Additionally, dimer derivatives resulting from the coupling of the sugar moiety at the N-1 and N-3 positions of the base have been obtained. The biological activity of these compounds as antivirals and cytotoxic studies has been measured.

In the second chapter, several 2',3'-dideoxynucleoside and 2',3'-dideoxy-2',3'-dideoxynucleoside antiviral derivatives have been synthesized through a general method from the corresponding

Summary -----

ribonucleosides. This new synthetic protocol is simple, inexpensive, safe and industrially benign for the large-scale syntheses of these analogs.

In the third chapter, the synthesis and application for oligonucleotide functionalization of novel tethers based on aminomethyl and mercaptomethyl sugar derivatives has been described. Six novel phosphoramidites have been prepared from a common cyano sugar precursor. The aminomethyl sugar has been protected with two orthogonal groups enabling the introduction of two different ligands in a single oligonucleotide.

In the fourth chapter, L-nucleoside analogs of C, U, 5-IU and 5-CF₃-T with 2'-*O*-alkyl residues (2'-*O*-methyl and 2'-*O*-methoxyethyl) have been synthesized from L-arabinose, a cheap natural L-sugar. 2'-*O*-Me and 2'-*O*-MOE modifications are commonly used in the design of therapeutic D-oligonucleotides and therefore these synthesized derivatives will be used as building-blocks to prepare L-oligonucleotides.

Part of the results obtained along this PhD Thesis have been published in:

“Novel 1'-homo-*N*-2'-deoxy- α -nucleosides: synthesis, characterization and biological activity”. A. Carnero, V. Martín-Nieves, Y. S. Sanghvi, O. O. Russel, L. Bassit, R. F. Schinazi, S. Fernández, M. Ferrero. *RSC Adv.* **2020**, *10*, 15815-15824.

“Oligonucleotides Containing 1-Aminomethyl or 1-Mercaptomethyl-2-deoxy-D-ribofuranoses: Synthesis, Purification, Characterization, and Conjugation with Fluorophores and Lipids”. V. Martín-Nieves, C. Fàbrega, M. Guasch, S. Fernández, Y. S. Sanghvi, M. Ferrero, R. Eritja. *Bioconjugate Chem.* **2021**, *32*, 350-366.

INTRODUCCIÓN

I.1. Importancia de los ácidos nucleicos

Las moléculas que mejor representan el nexo de unión entre la Química y la Biología Molecular son los ácidos nucleicos. Son moléculas esenciales para el funcionamiento de la célula y su función principal es almacenar y transmitir la información genética. Desde el punto de vista estructural, los ácidos nucleicos son polímeros lineales con un esqueleto formado por azúcares pentacarbonados unidos entre sí formando ésteres con ácido fosfórico. Además, a lo largo del esqueleto poseen anillos heterocíclicos nitrogenados unidos a las moléculas de azúcar. En todas las células existen dos tipos de ácidos nucleicos: el ADN (ácido desoxirribonucleico), cuya unidad de azúcar es la desoxirribosa, y el ARN (ácido ribonucleico), formado por anillos de ribosa.

Las investigaciones fundamentales que condujeron al descubrimiento de los ácidos nucleicos fueron realizadas en 1869 por el suizo Friedrich Miescher.¹ Mientras estudiaba las proteínas de los leucocitos en muestras de pus de materiales quirúrgicos, aisló del núcleo una sustancia desconocida a la que denominó nucleína. Esta sustancia no podía ser una proteína o un lípido, ya que era resistente a la acción de las proteasas. Analizó su composición elemental y observó que contenía una gran cantidad de fósforo. A pesar de la reticencia de los investigadores de la época, consiguió publicar sus observaciones en 1871.² Pero no fue hasta

¹ R. Dahm. *Dev. Biol.* **2005**, 278, 274-288.

² F. Miescher. *Med.-Chem. Unters.* **1871**, 4, 441-460.

Introducción -----

finales de los años 1880 cuando se separaron los grupos proteico y prostético de la nucleína y, a este último, Richard Altmann denominó ácido nucleico.

Los estudios pioneros de Albrecht Kossel³ y, posteriormente, los de Phoebus Levene⁴ permitieron establecer que los ácidos nucleicos están formados por unidades repetidas que contienen ácido fosfórico, una pentosa y una base nitrogenada.

A finales de los años 1940, Erwin Chargaff observó que la composición de las bases del ADN varía entre especies y que, independientemente de la especie, la cantidad de bases púricas y pirimidínicas siempre es la misma. Además, determinó que el número de bases de adenina es igual al número de bases de timina y que el número de bases de guanina es igual que el de citosina, estableciendo de esta forma lo que se conoce como la *ley de equivalencia de bases de Chargaff*.⁵

En 1953, James Watson y Francis Crick publicaron en la revista *Nature* el famoso modelo de doble hélice del ADN (Figura 1).⁶ Para desarrollar esta estructura se sirvieron de la *ley de equivalencia de bases de Chargaff* y de los estudios de rayos X de ADN realizados previamente por Rosalind Franklin⁷ y Maurice Wilkins.⁸

³ a) A. Kossel. *Physiol. Chem.* **1879**, 3, 284-291; b) A. Kossel. *DuBois-Reymond's Arch.* **1891**, 181, 181-186.

⁴ a) P. A. Levene, W. A. Jacobs. *Ber. Deutsch. Chem. Ges.* **1908**, 41, 2703; b) P. A. Levene, W. A. Jacobs. *J. Biol. Chem.* **1912**, 12, 411.

⁵ 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.

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

⁷ R. E. Franklin, R. G. Gosling. *Nature* **1953**, 171, 740-741.

⁸ M. H. Wilkins, A. R. Stokes, H. R. Wilson. *Nature* **1953**, 171, 738-740.

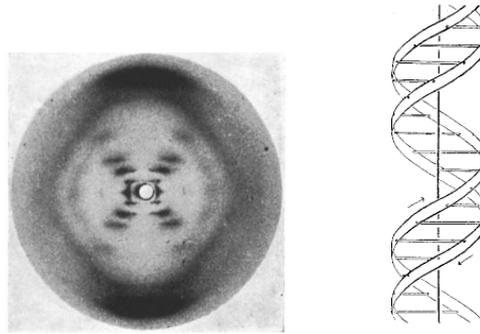


Figura 1. Estructura de rayos X de la sal de ADN tomada por R. Franklin y la doble hélice de ADN propuesta por J. Watson y F. Crick.

El ADN es la molécula portadora de la información hereditaria y en 1957 Crick⁹ postuló por primera vez el dogma de la Biología Molecular basado en el flujo unidireccional de información del ADN a la proteína: el ADN se transcribe a ARN, y este, proporciona la secuencia correcta de aminoácidos para la síntesis de proteínas en un proceso denominado traducción (Figura 2). Años más tarde, basándose en los nuevos descubrimientos relacionados con virus,¹⁰ se publicó el dogma central modificado de la biología molecular.¹¹



Figura 2. Dogma central de la Biología Molecular modificado. En color azul las bases propuestas en 1957, y en verde, las modificaciones incluidas en 1970.

Desde el descubrimiento de la estructura del ADN se ha recorrido un largo camino en la historia de esta molécula. En la Tabla 1 se recogen algunos de los principales hitos.

⁹ F. H. Crick. *Symposia of the Society for Experimental Biology* **1958**, 12, 138-163.

¹⁰ a) H. M. Temin, S. Mizutani. *Nature* **1970**, 226, 1211-1213; b) D. Baltimore. *Nature* **1970**, 226, 1209-1211.

¹¹ F. H. Crick. *Nature* **1970**, 227, 561-563.

Tabla 1. Principales hitos en la historia de los ácidos nucleicos.

1869	F. Miescher aísla ADN por primera vez.
1871	Primera publicación describiendo ADN (nucleína).
1882	W. Flemming describe los cromosomas.
1885	A. Kossel indentifica las nucleobases.
1889	R. Altmann introduce el término “ácido nucleico” para referirse a la parte no proteica de la nucleína.
1902	Se propone que las unidades genéticas están localizadas en los cromosomas.
1909	W. Johannsen utiliza la palabra gen para describir las unidades hereditarias.
1928	F. Griffith postula que un “principio de transformación” hace que las propiedades de un tipo de bacterias se transmitan a otras.
1909-1929	P. Levene identifica las partes que forman el ADN, incluyendo las cuatro bases nitrogenadas (A, C, G y T).
1930	Se establecen las diferencias entre ácido ribonucleico y ácido desoxirribonucleico.
1938	Se demuestra la existencia de ARN fuera del núcleo celular.
1941	Hipótesis de “un gen, una enzima”.
1944	Se demuestra que el “principio de transformación” de Griffith no es una proteína sino el ADN.
1949-1950	E. Chargaff descubre que la relación entre adeninas y timinas siempre es la misma, al igual que la de citosinas y guaninas.
1953	R. Franklin y M. Wilkins demostraron mediante rayos X que el ADN es una estructura helicoidal repetida.
1953	J. Watson y F. Crick descubrieron la estructura molecular del ADN, una doble hélice con pares A:T y C:G.
1955	S. Ochoa descubre la ARN polimerasa, enzima que cataliza la síntesis de ARN.
1956	A. Kornberg descubre la ADN polimerasa, enzima encargada de la replicación del ADN.
1957	F. Crick propone el “dogma central” de la biología molecular.
1960-1961	Descubrimiento del ARN mensajero.
1963-1964	Se descifra el código genético.
1970	F. Crick postula el “dogma central” de la biología molecular modificado.
1972	Primer ADN recombinante.
1975	F. Sanger desarrolla un método de secuenciación del ADN.
1983	K. Mullis inventa la PCR para amplificar ADN o ARN in vitro.
1990	Comienza la secuenciación del genoma humano, “Proyecto Genoma Humano”.
1990s	Se inician los estudios de las terapias de ARN.
2003	Se publica la secuencia completa del genoma humano.

I.2. Estructura de los nucleósidos

Desde un punto de vista estructural, los ácidos nucleicos son polímeros formados por la repetición de monómeros, los nucleótidos, que se unen por un enlace fosfodiéster. Cada nucleótido está formado por tres unidades: un azúcar (ribosa en el ARN o 2'-desoxirribosa en el ADN), una base nitrogenada y uno o varios grupos fosfato. Dentro de los nucleótidos existe una subunidad menor, los nucleósidos, formados por la unión del azúcar y la base nitrogenada mediante un enlace *N*-glicosídico (Figura 3). Los ácidos nucleicos forman cadenas largas con una parte idéntica en todas ellas, el esqueleto azúcar-fosfato, y otra variable, las bases unidas a las pentosas. Por ello, estos polímeros se representan a nivel de estructura primaria por la composición de las bases y siempre del extremo 5' al 3'.

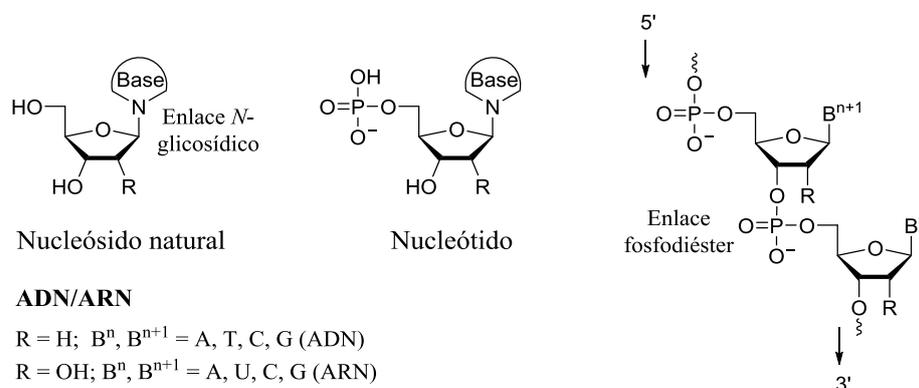


Figura 3. Estructura química de los nucleósidos, nucleótidos y ácidos nucleicos.

Las bases nitrogenadas son estructuras heterocíclicas aromáticas y planas que, en función de su estructura, se clasifican en dos grupos: bases púricas (derivadas de la purina) y bases pirimidínicas (derivadas de la pirimidina). La unión entre el azúcar y la base heterocíclica es a través de uno de sus átomos de nitrógeno, el *N*-1 si la base es pirimidínica o el *N*-9 si es púrica. Las bases nitrogenadas más comunes son adenina (A), guanina (G), citosina (C), timina (T) y uracilo (U) (Figura 4). Las tres

Introducción -----

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

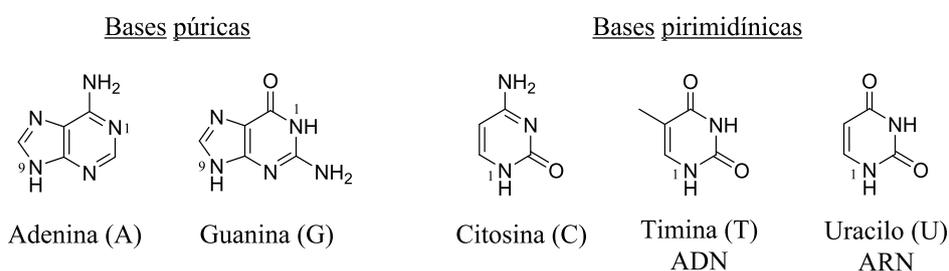


Figura 4. Estructura de las principales bases heterocíclicas.

Teniendo en cuenta la posición de la base nitrogenada respecto al grupo $-CH_2OH$ exocíclico, los nucleótidos y nucleósidos presentan dos isomerías (Figura 5): β , en la que la base de C-1' es *cis* respecto al grupo hidroximetil en C-4', y α , donde los dos grupos se encuentran en disposición *trans*. A estos diastereoisómeros se les denomina anómeros debido a que la diferencia entre ellos es en torno al carbono anomérico (C-1'). Además, considerando su configuración espacial, existen dos estereoisómeros para este tipo de moléculas, D y L. La gran mayoría de los nucleósidos presentes en la naturaleza son β -D-nucleósidos.

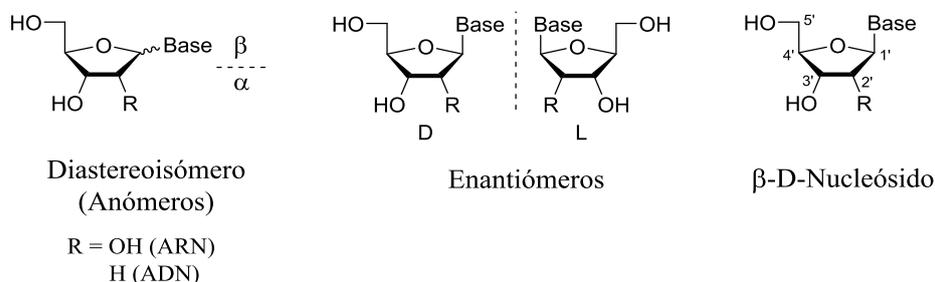


Figura 5. Isomería de los nucleósidos.

I.3. Nucleósidos modificados como agentes terapéuticos

Los nucleótidos y nucleósidos son compuestos endógenos que participan en procesos celulares importantes como la síntesis de ADN y ARN, la señalización celular, la regulación enzimática o en los procesos metabólicos. Los análogos de nucleótidos y nucleósidos son derivados sintéticos que se han desarrollado introduciendo modificaciones químicas para imitar a sus homólogos. Desde hace más de 50 años, estos análogos se han utilizado con fines terapéuticos y se han convertido en pilares fundamentales para el tratamiento de algunos cánceres o infecciones víricas.¹² Estas moléculas sintéticas han sido diseñadas basándose en sus homólogos naturales con el fin de explotar su potencial metabólico y que, de esta manera, puedan ser incorporados en el ADN y el ARN para inhibir la división celular y la replicación vírica, así como inhibir e interactuar con enzimas humanas esenciales o polimerasas virales.

En la búsqueda de análogos efectivos, selectivos y poco citotóxicos, las principales modificaciones (Figura 6) se han realizado en el grupo fosfato, en el anillo de azúcar, en la base nitrogenada y/o en el enlace glicosídico que une la pentosa con la base heterocíclica.¹³ Estas alteraciones pueden ser por adición de un sustituyente a la base o al azúcar, por reemplazamiento de un átomo, por movimiento de un átomo a una posición distinta, por variaciones en el enlace glicosídico, etc. De este modo, las modificaciones pueden darse en combinación originando una amplia diversidad estructural de análogos.

¹² P. E. Morris, P. V. Kamat. *Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine*; Wiley-VCH, 2008.

¹³ a) E. Ichikawa, K. Kato. *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 385-423; b) S. Mahmoud, S. Hasabelnaby, S. F. Hammad, T. M. Sakr. *J. Adv. Pharm. Res.* **2018**, *2*, 73-88.

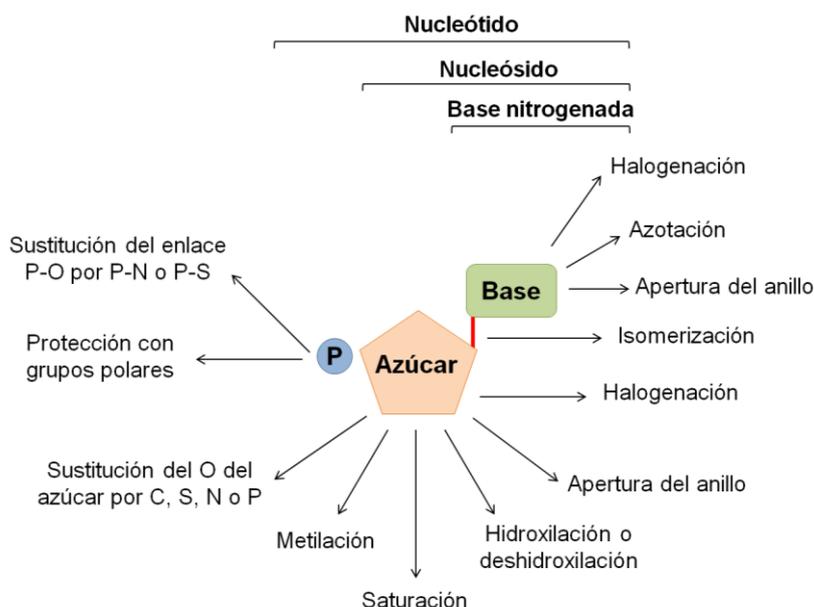


Figura 6. Modificaciones de análogos de nucleósidos y nucleótidos respecto a los naturales.

Algunos de estos análogos se presentan de forma general en la Figura 7 y se profundizará con ejemplos concretos a lo largo de esta memoria. Considerando el átomo de la base nitrogenada que participe en la unión a la pentosa, existen los *C*-nucleósidos, donde el carbono anomérico del azúcar está unido a un átomo de carbono de la base. Teniendo en cuenta modificaciones en el anillo de azúcar, el reemplazamiento del oxígeno del anillo de pentosa por otro heteroátomo da lugar a diferentes subgrupos: carbanucleósidos (carbono), azanucleósidos (nitrógeno), tionucleósidos (azufre) o fosfonucleósidos (fósforo). La apertura del anillo de azúcar genera los nucleósidos acíclicos, o la deshidroxilación en el azúcar da lugar a los didesoxinucleósidos. Variaciones en torno al enlace *N*-glicosídico origina α -nucleósidos u homonucleósidos, donde la unión entre el azúcar y la base es a través de un puente metileno. Otro grupo importante es el que forman los *L*-nucleósidos, enantiómeros de los *D*-nucleósidos naturales.

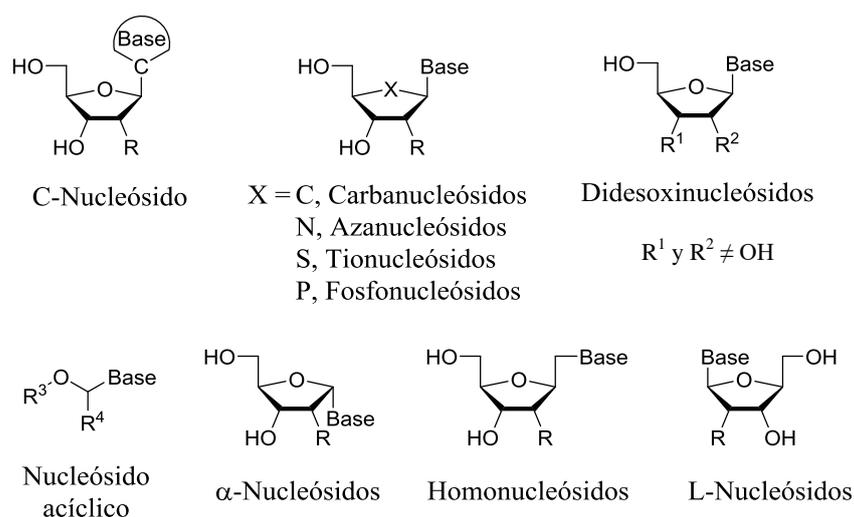


Figura 7. Estructura general de algunos análogos de nucleósidos.

I.3.1. Mecanismo bioquímico de los análogos de nucleósido

Las bases nitrogenadas y los análogos de nucleósidos son profármacos y requieren de una transformación metabólica para convertirse en la forma activa (Figura 8). Estos derivados son normalmente moléculas hidrofílicas y necesitan transportadores proteicos especiales para entrar en la célula.¹⁴ Después de que atraviesan la membrana plasmática sufren un proceso de fosforilación efectuado por quinasas o, si son análogos de bases heterocíclicas, primero una ribosilación y después una fosforilación, dando lugar a nucleótidos 5'-monofosfato. Esta primera fosforilación es la etapa limitante en la transformación hacia los metabolitos activos, ya que el producto final de la reacción enzimática puede actuar inhibiendo la enzima.¹⁵ Posteriormente, los nucleótidos monofosfato son convertidos en las formas di- y trifosfato por la acción de varias quinasas celulares. Los nucleótidos 5'-trifosfato son los metabolitos activos y pueden incorporarse en las cadenas de ADN y

¹⁴ P. C. Soldado, M. P. Anglada. *Med. Res. Rev.* **2011**, 32, 428-457.

¹⁵ C. Smal, D. Vertommen, L. Bertrand, S. Ntamashimikiro, M. H. Rider, E. Van Den Neste, F. Bontemps. *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 4887-4893.

ARN en formación compitiendo con los nucleótidos endógenos, lo que puede inducir el final de la síntesis, daños y acumulación de mutaciones en la cadena, y apoptosis. Además, estas formas activas del fármaco pueden inhibir el crecimiento celular inhibiendo enzimas involucradas en el metabolismo de los nucleós(t)idos como enzimas virales, polimerasas humanas o la ribonucleótido reductasa.¹⁶

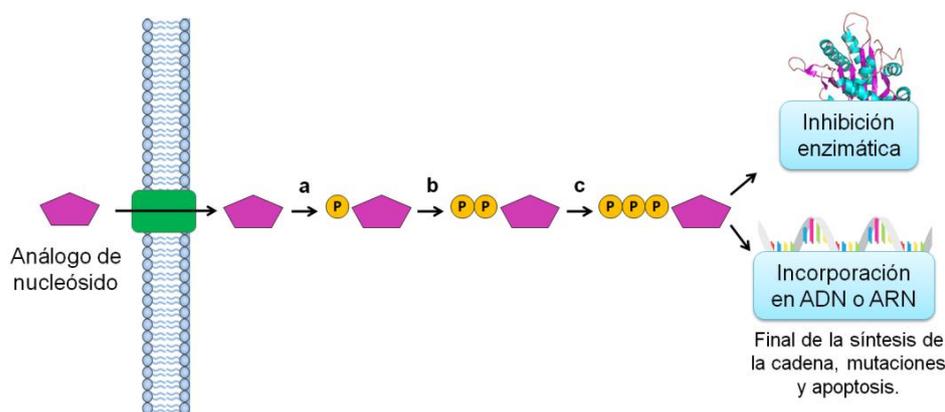


Figura 8. Mecanismo de acción de los análogos de nucleósidos: a) Nucleósido quinasa. b) Nucleósido monofosfato quinasa. c) Nucleósido difosfato quinasa.

1.3.1.1. Final de la elongación de la cadena

La incorporación de análogos nucleotídicos en las cadenas de ADN y ARN está íntimamente relacionada con su afinidad por las polimerasas. La ausencia de un grupo hidroxilo en la posición 3' del análogo impide la formación del enlace fosfodiéster con el siguiente nucleótido que fuera a incorporarse a la cadena, resultando en el final de la síntesis de la hebra de ADN o ARN. También se ha observado que algunos nucleósidos anticancerígenos con un grupo hidroxilo en la posición 3', como la gemcitabina,¹⁷ desarrollan su actividad al ser reconocidos como no

¹⁶ L. P. Jordheim, D. Durantel, F. Zoulim, C. Dumontent. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2013**, *12*, 447-464.

¹⁷ P. Huang, S. Chubb, L. W. Hertel, G. B. Grindey, W. Plunkett. *Cancer Res.* **1991**, *51*, 6110-6117.

naturales, lo que detiene la síntesis. Para los virus que tienen una etapa de transcripción inversa (síntesis de ADN a partir de ARN), la terminación de la cadena puede ocurrir durante la formación de ADN a partir de ARN o durante la transcripción de ADN a ARN.¹⁸ Además, las polimerasas virales son menos específicas que las humanas y son más propensas a incorporar los análogos.

1.3.1.2. Daños en el ADN

Existen fármacos que tras incorporarse en la cadena de ADN o ARN permiten la elongación de la misma, pero el desajuste que producen puede conducir a la inestabilidad de la estructura o mutagénesis.¹⁹ Algunos investigadores²⁰ han descrito que el fármaco antiviral ribavirina (Figura 13) induce mutaciones letales en el genoma viral que impiden la replicación del virus.

1.3.1.3. Alteración en los mecanismos de reparación del ADN

Las células cuentan con mecanismos de reparación del ADN que corrigen errores producidos durante la replicación. Si estos errores no pueden repararse, la célula experimenta apoptosis para evitar que el ADN defectuoso se herede. Algunos análogos de nucleósidos al incorporarse en la cadena de ADN deshacen estas reparaciones o impiden que los mecanismos de reparación actúen, induciendo por ejemplo la reexpresión de un gen aberrante silenciado, lo que detiene el crecimiento celular y causa la apoptosis en las células tumorales.²¹

¹⁸ D. D. Richman. *Nature* **2001**, *410*, 995-1001.

¹⁹ N. Suzuki, F. Nakagawa, M. Nukatsuka, M. Fukushima. *Exp. Ther. Med.* **2011**, *2*, 393-397.

²⁰ a) P. Leyssen, E. De Clercq, J. Neyts. *Antiviral Res.* **2008**, *78*, 9-25; b) C. C. Broder, *Curr. Opin. Virol.* **2012**, *2*, 176-187.

²¹ a) S. B. Baylin. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* **2005**, *2*, S4-S11; b) P. Karran. *Br. Med. Bull.* **2006**, *79-80*, 153-170; c) C. Stresemann, F. Lyko. *Int. J. Cancer* **2008**, *123*, 8-13.

I.3.1.4. Inhibición enzimática

Algunos fármacos antivirales derivados de nucleósidos actúan inhibiendo enzimas clave en el ciclo de replicación del virus, impidiendo así la infección.²² Otros fármacos actúan sobre enzimas humanas esenciales en el metabolismo de los nucleótidos como las ADN o ARN polimerasas,²³ la ribonucleótido reductasa,²⁴ que elimina el grupo hidroxilo de la posición 2' generando 2'-desoxirribonucleósidos difosfato, o la purina nucleósido fosforilasa,²⁵ que participa en el metabolismo de nucleósidos derivados de purina.

I.3.2. Nucleósidos como antivirales

A pesar del éxito de los programas de vacunación y de la existencia de tratamientos efectivos para algunas infecciones virales, estamos viviendo en primera persona como los virus continúan suponiendo un gran riesgo para la humanidad. En los últimos tiempos, nos enfrentamos a una explosión de nuevas y emergentes enfermedades víricas, como nuevas cepas de hepatitis y virus del herpes, virus del oeste del Nilo, virus del Zika, recientes brotes del virus del Ébola, coronavirus asociado al SARS (*Severe Acute Respiratory Syndrome*), al MERS (*Middle East Respiratory Syndrome*) o el más reciente y actual, virus de la COVID-19, causante de la pandemia existente. En la actualidad, un gran número de análogos de nucleótidos y nucleósidos están aprobados por las distintas agencias de medicamentos como agentes antivirales.

²² M. Rumlova, T. Ruml. *Biotechnol. Adv.* **2018**, *36*, 557-576.

²³ L. A. Hammond-Thelin, M. B. Thomas, M. Iwasaki, J. L. Abbruzzese, Y. Lassere, C. A. Meyers, P. Hoff, J. de Bono, J. Norris, H. Matsushita et al. *Invest. New Drugs* **2012**, *30*, 316-326.

²⁴ A. J. Bitonti, T. L. Bush, M. T. Lewis, P. S. Sunkara. *Anticancer Res.* **1995**, *15*, 1179-1182.

²⁵ G. A. Kicska, L. Long, H. Horig, C. Fairchild, P. C. Tyler, R. H. Furneaux, V. L. Schramm, H. L. Kaufman. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 4593-4598.

1.3.2.1. Virus de inmunodeficiencia humana (VIH)

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es un patógeno que causa una pérdida progresiva de linfocitos T CD4⁺ y una debilitación del sistema inmunitario, dando lugar al sida (síndrome de inmunodeficiencia adquirida) en la etapa más avanzada de la infección. Esta enfermedad afecta a más de 38 millones de personas y es una de las principales causas de mortalidad en el mundo. El hallazgo de una vacuna que permita combatir el virus está resultando complicado debido a su gran facilidad de mutación. El tratamiento actual para la enfermedad es la terapia antirretroviral, la cual es altamente efectiva pero no curativa, por lo que si el tratamiento cesa, el virus se recupera.²⁶ Para poder diseñar fármacos eficaces es necesario entender el mecanismo de infección del virus y, de este modo, encontrar las dianas terapéuticas sobre las que actuar.

El VIH es un retrovirus perteneciente a la subfamilia de los lentivirus que tiene dos tipos principales de cepas: VIH-1 y VIH-2, la primera es la cepa más dominante y patogénica y es la responsable de la gran mayoría de los casos. Como cualquier otro retrovirus, el VIH posee un genoma de ARN de cadena simple que depende de una sola enzima, la transcriptasa inversa (*Reverse Transcriptase*, RT), para convertir su ARN genómico en ADN que es posteriormente integrado en el genoma celular. El VIH consta de una envoltura con diferentes proteínas de membrana fundamentales para la fusión del virus con las células diana. Por debajo de la envoltura se encuentra la cápside proteica, y en su interior, el material necesario para componer el provirus: las dos cadenas idénticas de ARN, un par de iniciadores de ARN transferente y las proteínas virales, entre las que se encuentra la RT.²⁷

²⁶ G. S. Deeks, J. Overbaugh, A. Phillips, S. Buchbinder. *Nature Rev.* **2015**, *1*, 1-22.

²⁷ A. Santana, C. Domínguez, A. Lemes, T. Molero, E. Salido. *Rev. Diagn. Biol.* **2003**, *52*, 7-18.

Introducción -----

En el ciclo vital del VIH (Figura 9), después de que el virus alcanza la célula diana y logra penetrar a través de la membrana plasmática, la RT convierte el ARN viral en ADN de doble cadena. El ADN retrotranscrito es transportado al núcleo e integrado al ADN celular, tras lo cual, utiliza la maquinaria celular para expresar el ARN viral. El ARN se traduce a largas cadenas peptídicas, que la proteasa del VIH corta en cadenas más pequeñas, dando lugar a los componentes virales del nuevo virus. El ARN genómico, junto a las proteínas virales, son ensamblados en la partícula viral, que sale de la célula e infecta nuevas células mediante la unión a receptores celulares específicos.

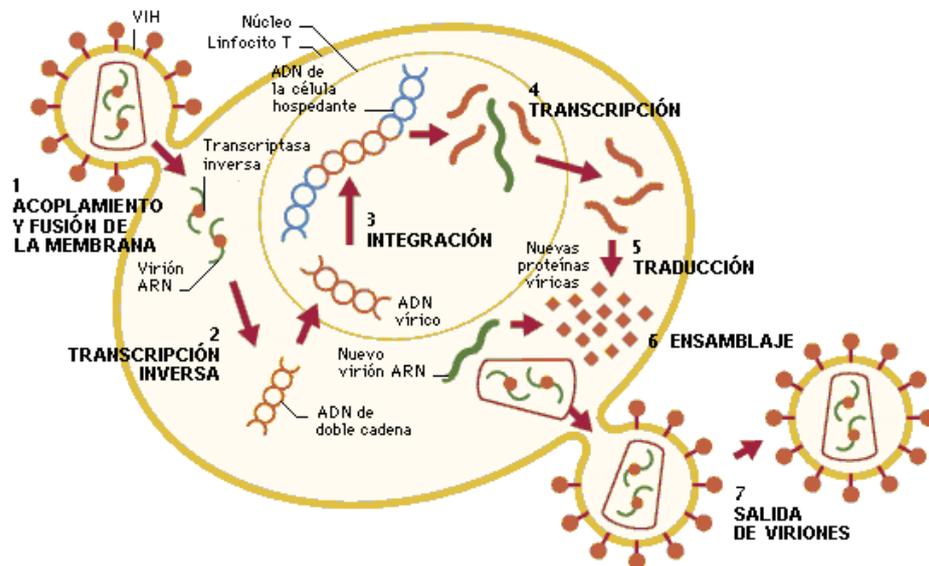


Figura 9. Ciclo vital del VIH.

Con este mecanismo de infección, el objetivo de la terapia antirretroviral es actuar sobre alguna de las etapas clave del ciclo vírico. En función de la etapa en la que actúen los fármacos y de su naturaleza química, los fármacos anti-VIH se dividen en cinco grupos:

- Derivados nucleosídicos inhibidores de la transcriptasa inversa (*Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors*, NRTIs). Bloquean la

RT. Al ser análogos de los nucleósidos y nucleótidos naturales, se incorporan en el ADN vírico provocando el fin de la retrotranscripción.

- Derivados no nucleosídicos inhibidores de la transcriptasa inversa (*Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors*, NNRTIs). Actúan uniéndose cerca del centro activo de la RT, provocando un cambio conformacional de la enzima y su inhibición.

- Inhibidores de transferencia de la cadena de integrasa (*Integrase Strand Transfer Inhibitors*, INSTI). Se unen al centro activo de la integrasa viral, bloqueando el proceso de integración del ADN vírico al ADN del hospedador.

- Inhibidores de la proteasa (*Protease Inhibitors*, PIs). Bloquean la maduración de las largas cadenas polipéptídicas en proteínas funcionales.

- Inhibidores de entrada. Evitan la entrada del virus en la célula.

Los NRTIs constituyen un elemento esencial en el tratamiento de la infección por VIH.²⁸ El primer análogo aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*) fue la zidovudina (3'-desoxi-3'-azidotimidina, AZT, Figura 10), en 1987,²⁹ seguido de la didanosina (ddI) y la zalcitabina (ddC). A pesar de la eficacia de estos fármacos contra el VIH, no están exentos de inconvenientes, como la toxicidad irreversible que pueden causar en los pacientes o la resistencia que presentan algunas cepas del virus, debida principalmente a la mutación de uno o más residuos en el sitio de unión de la RT. Estos problemas hicieron plantearse nuevas alternativas y en 1996 surgió la terapia antirretroviral altamente activa (*Highly Active Antiretroviral Therapy*, HAART), que

²⁸ 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.

²⁹ 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 -----

consiste en la combinación de tres fármacos, dos de tipo nucleosídico y un tercero perteneciente a otro de los tipos.³⁰ Aunque no supone la cura de la enfermedad ayuda a retrasar el comienzo de los síntomas y aumenta la supervivencia de las personas diagnosticadas con sida. Sin embargo, también presenta inconvenientes como el desarrollo de resistencia precoz ante el tratamiento temprano o la toxicidad a largo plazo de las terapias prolongadas.

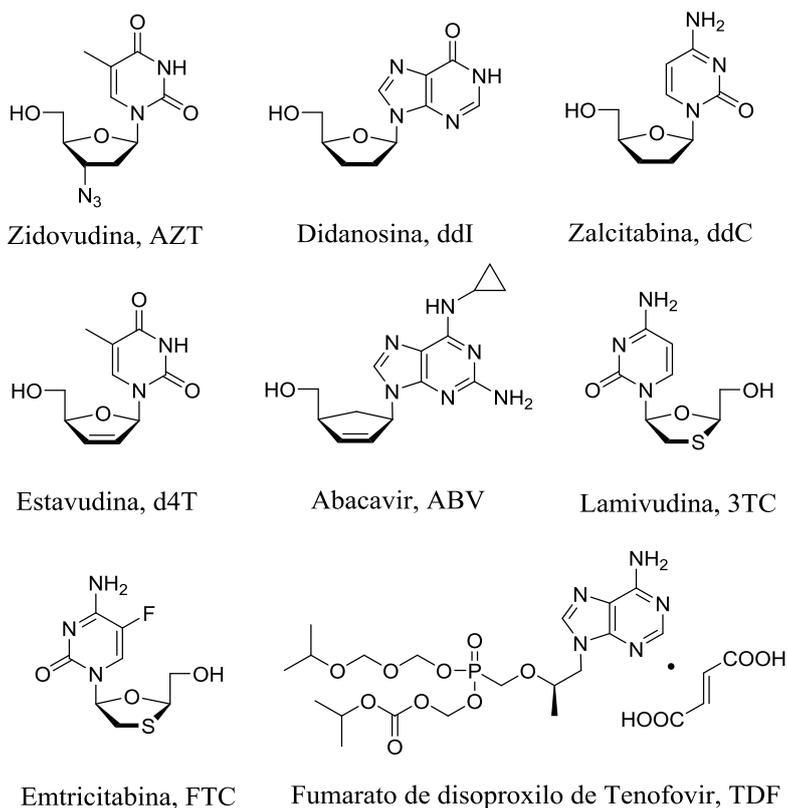


Figura 10. Análogos nucleosídicos aprobados contra el VIH.

Actualmente, son ocho los fármacos derivados de nucleósidos aprobados contra el VIH (Figura 10), donde a excepción del tenofovir, el resto de los análogos son 2',3'-didesoxinucleósidos. El principal

³⁰ G. S. Deeks, J. Overbaugh, A. Phillips, S. Buchbinder. *Nature Rev.* **2015**, *1*, 1-22.

mecanismo de acción de estos fármacos es la detención de la retrotranscripción debido a la ausencia del hidroxilo en posición 3’.

I.3.2.2. Virus de la hepatitis B

El virus de la hepatitis B (VHB) es un patógeno que puede causar una infección transitoria o crónica en humanos debilitando su sistema inmunitario. Las infecciones transitorias están relacionadas con una hepatitis aguda; sin embargo, los infectados crónicos corren el riesgo de desarrollar enfermedades hepáticas como hepatitis crónica activa, cirrosis o carcinoma hepatocelular. Actualmente, un 3.5% de la población mundial está crónicamente infectada por VHB, aunque la incidencia del virus está disminuyendo gracias a la vacunación y a las terapias antirretrovirales que reducen la carga viral en pacientes crónicos.³¹

El VHB es un virus de la familia de los *Hepadnaviridae* y su material genético es ADN relajado circular (ADNrc) parcialmente bicatenario. El ciclo de replicación implica una etapa de retrotranscripción, por lo que está relacionado con los retrovirus, aunque los mecanismos de replicación son distintos; entre otras cosas, el ADN del VHB no se integra en el genoma de la célula hospedadora, sino que actúa como otro cromosoma. Una vez que el virus entra en las células hepáticas a través de receptores específicos, la cápside es transportada al núcleo. Allí, el ADN viral (ADNrc) es transformado en ADN circular covalentemente cerrado (ADNccc) por enzimas virales y celulares (Figura 11). Mediante la maquinaria celular, el ADNccc se transcribe a distintas especies de ARNm que salen al citoplasma, donde dirigen la síntesis de las proteínas que darán lugar a las nuevas partículas virales.

³¹ a) A. S. F. Lok, B. J McMahon. *Hepatology* **2004**, 39, 857-861; b) C. Trépo, H. L. Y. Chan, A. Lok. *Lancet* **2014**, 384, 2053-2063.

Introducción -----

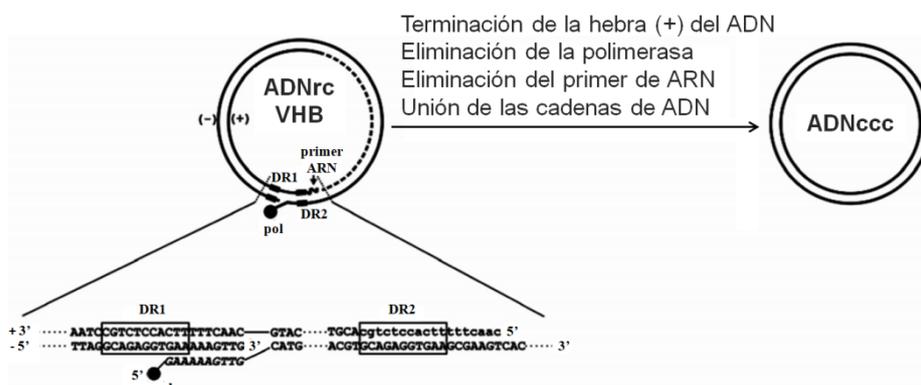


Figura 11. Transformación del ADN viral (ADNrc) en ADNccc en el núcleo celular.

En la actualidad, existen siete fármacos aprobados para el tratamiento de la hepatitis B crónica: dos tipos de α -interferón y cinco análogos de nucleos(t)ido. El desarrollo de estos últimos ha supuesto uno de los mayores avances en el tratamiento de la enfermedad, ya que son inhibidores competitivos de la polimerasa del VHB. Desde que en 1998 se aprobó la lamiduvina³² (Figura 10), otros cuatro derivados han sido aprobados: adefovir, entecavir, telbivudina (Figura 12) y tenofovir (Figura 10). También existe una combinación de emtricitabina y tenofovir (Figura 10), usada para la infección por VIH, y con eficacia demostrada frente al VHB.³³ La mayor limitación de estos análogos es el desarrollo de cepas de VHB resistentes a los fármacos cuando el tratamiento es prolongado.

³² C. L. Lai, R. N. Chien, N. W. Y. Leung, T. T. Chang, R. Guan, D. I. Tai. *N. Engl. J. Med.* **1998**, 339, 61-68.

³³ B. E. Korba, R. F. Schinazi, P. Cote, B. C Tennant, J. L. Gerin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, 44, 1757-1760.

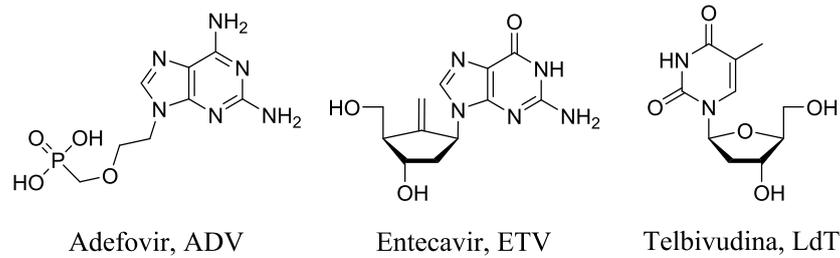


Figura 12. Derivados de nucleósidos y nucleótidos contra el VHB.

1.3.2.3. Virus de la hepatitis C

El virus de la hepatitis C (VHC) es un patógeno transmitido por la sangre que, como el VHB, causa daño progresivo en el hígado. Sin un tratamiento, la mayoría de las infecciones se convierten en crónicas y generan enfermedades como cirrosis o carcinoma hepatocelular. En torno a un 3% de la población mundial está infectada por VHC, y según la OMS (Organización Mundial de la Salud), cada año aparecen 3-4 millones de nuevos casos. En los países desarrollados, la principal vía de contagio está relacionada con el abuso de drogas intravenosas, mientras que en los países subdesarrollados el contagio se produce por procedimientos invasivos o por inyecciones con material contaminado.³⁴

El VHC es un virus de ARN que pertenece a la familia *Flaviviridae* y que presenta una enorme diversidad genética; han sido descritos 7 genotipos y 67 subtipos. El ciclo viral no es totalmente conocido, aunque se sabe que durante la replicación del virus la ARN polimerasa carece de un mecanismo de corrección de errores, lo que se traduce en la formación de cuasiespecies de VHC estrechamente relacionadas, pero genéticamente distintas.³⁵ En las últimas dos décadas, han tenido lugar importantes avances en el tratamiento de las infecciones con VHC y el

³⁴ C. W. Spearman, G. M. Dusheiko, M. Hellard, M. Sonderup. *Lancet* **2019**, 394, 1451-1466.

³⁵ V. A. Morozov, S. Lagaye. *World J. Hepatol.* **2018**, 10, 186-212; b) U. Saeed, Y. Waheed, M. Ashraf. *Asian Pac. J. Trop. Dis.* **2014**, 4, 88-96.

Introducción -----

desarrollo de fármacos que actúan directamente sobre proteínas virales ha supuesto una revolución en el tratamiento de la hepatitis C crónica. La combinación de interferón α y el derivado nucleosídico ribavirina (Figura 13) muestran una respuesta moderada dependiente del genotipo del virus. El sofosbuvir³⁶ es un derivado nucleosídico inhibidor de la ARN polimerasa aprobado en 2013 por la FDA que ha mostrado alta efectividad en todos los genotipos de VHC y suele administrarse en combinación con otro agente de actuación directa. Aunque en la actualidad se dispone de terapias antivirales efectivas para combatir el virus, no existen vacunas para prevenir su infección debido a la compleja diversidad genética del VHC, a la creación de cuasiespecies diferentes y al desconocimiento del mecanismo por el que el virus sorte el sistema inmunitario.

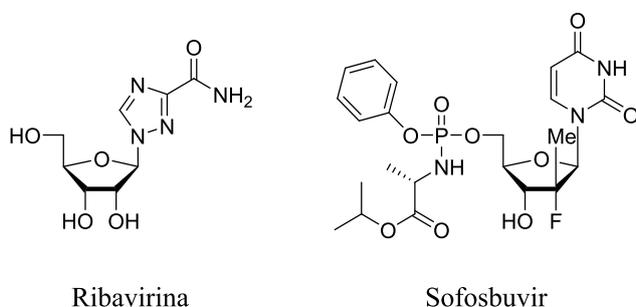


Figura 13. Derivados nucleosídicos contra el VHC.

1.3.2.4. Virus del Ébola

El Ébola es una enfermedad grave causada en humanos por el virus del Ébola (EBOV) y caracterizada por un sangrado intenso e insuficiencia orgánica, que en muchos casos ocasiona la muerte. El huésped natural del virus es un tipo de murciélago de la fruta y la

³⁶ M. J. Sofia, D. Bao, W. Chang, J. Du, D. Nagarathnam, S. Rachakonda, G. P. Reddy, B. S. Ross, P. Wang, H-R. Zhang, S. Bansal, C. Espiritu, M. Keilman, A. M. Lam, H. M. Micolochick Steuer, C. Niu, M. J. Otto, P. A. Furman. *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 7202-7218.

transmisión a la población se produce por el contacto directo con fluidos biológicos de los animales infectados o de material contaminado. El primer brote sucedió en 1976, pero el ocurrido en 2013-2016 en África Occidental ha sido el más extenso y complejo desde que se descubrió el virus, siendo tal la magnitud de la epidemia que ha producido una alarma mundial.

El EBOV es un virus de ARN de una sola cadena que pertenece a la familia *Filoviridae*, dentro de la cual también se encuentran otros virus (Marburgo, Sudán o Bundibugyo) que al igual que el EBOV causan fiebres hemorrágicas. Tras el último brote, se han evaluado en ensayos clínicos diferentes agentes anti-Ébola, entre ellos algunos derivados de nucleósidos como favipiravir, brincidofovir, galidesivir³⁷ o remdesivir³⁸ (Figura 14). Los ensayos clínicos con este último análogo mostraron resultados prometedores para el tratamiento de la infección, siendo utilizado como terapia de emergencia hasta 2019, cuando otros tratamientos³⁹ mostraron mayor efectividad.

1.3.2.5. SARS-CoV-2

En diciembre de 2019 empezaron a detectarse en China casos de una neumonía de origen vírico causada por un nuevo coronavirus. La OMS denominó a la enfermedad COVID-19 (*coronavirus disease 2019*) y el virus causante de la misma ha sido clasificado como coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo grave (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2, SARS-CoV-2*). Debido a la alta tasa de mortalidad y al grave problema de salud pública a nivel global, ha surgido la necesidad

³⁷ T. K. Warren, J. Wells, R. G. Panchal, K. S. Stuthman, N. L. Garza, S. A. Van Tongeren, L. Dong, C. J. Retterer, B. P. Eaton, G. Pegoraro et al. *Nature* **2014**, 508, 402-405.

³⁸ D. Siegel, H. C. Hui, E. Doeffler, M. O. Clarke, K. Chun, L. Zhang, S. Neville, E. Carra, W. Lew, B. Ross et al. *J. Med. Chem.* **2017**, 60, 1648-1661.

³⁹ S. Mulangu, L. E. Dodd, R. T. Davery Jr, O. Tshiani Mbaya, M. Proschan, D. Mukadi, M. Lusakibanza Manzo, D. Nzolo, A. Tshomba Oloma, A. Ibanda et al. *N. Engl. J. Med.* **2019**, 381, 2293-2303.

de un tratamiento inmediato para paliar los efectos de la enfermedad. Uno de los campos más estudiados es la reutilización de antivirales comercializados para otras enfermedades víricas, donde los análogos de nucleósido juegan un papel importante.⁴⁰ El remdesivir (Figura 14) es el antiviral nucleosídico que ha mostrado mejores resultados en los ensayos clínicos y preclínicos recientes contra la COVID-19.⁴¹ Se ha autorizado su utilización, primero en EE.UU y Japón, y después en Europa, para el tratamiento de pacientes adultos con COVID-19 grave que requieren oxígeno suplementario. Aunque la aprobación de este fármaco es una señal muy alentadora, su eficacia clínica parece ser relativamente modesta según la evidencia disponible.⁴²

I.3.2.6. Otros virus

Los derivados nucleosídicos también se utilizan como terapia frente a otros tipos de virus. Para el virus del herpes simple (VHS) o el virus de la varicela zoster (VVZ) se emplean derivados acíclicos de guanósina como aciclovir o valaciclovir.⁴³ La ribavirina (Figura 13) se utiliza para el tratamiento del virus de la gripe. Además, se ha descubierto el efecto

⁴⁰ a) K. Zandi, F. Amblard, K. Musall, J. Downs-Bowen, R. Kleinbard, A. Oo, D. Cao, B. Liang, O. O. Russell, T. McBrayer et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2021**, *65*, e01652-20; b) R. M. Cox, J. D. Wolf, R. K. Plemper. *Nat. Microbiol.* **2021**, *6*, 11-18; c) A. Simonis, S. J. Theobald, G. Fätkenheuer, J. Rybniker, J. J. Malin. *EMBO Mol. Med.* **2021**, *13*, e13105.

⁴¹ a) B. N. Williamson, F. Feldmann, B. Schwarz, K. Meade-White, D. P. Porter, J. Schulz, N. van Doremalen, I. Leighton, C. K. Yinda, L. Pérez-Pérez et al. *Nature* **2020**, *585*, 273-276. b) E. de Wit, F. Feldmann, J. Cronin, R. Jordan, A. Okumura, T. Thomas, D. Scott, T. Cihlar, H. Feldmann. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **2020**, *117*, 6771-6776.

⁴² a) Y. Wang, D. Zhang, G. Du, R. Du, J. Zhao, Y. Jin, S. Fu, L. Gao, Z. Cheng, Q. Lu et al. *Lancet* **2020**, *395*, 1569-1578; b) J. D. Goldman, D. C. B. Lye, D. S. Hui, K. M. Marks, R. Bruno, R. Montejano, C. D. Spinner, M. Galli, M. Y. Ahn, R. G. Nahass et al. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *383*, 1827-1837.

⁴³ J. Colin, O. Prisant, B. Cochener, O. Lescale, B. Rolland, T. Hoang-Xuan. *Ophthalmology* **2000**, *107*, 1507-1511.

inhibitorio del valganciclovir, otro derivado acíclico de guanosina, y de la estavudina (Figura 10) sobre el virus del dengue.⁴⁴

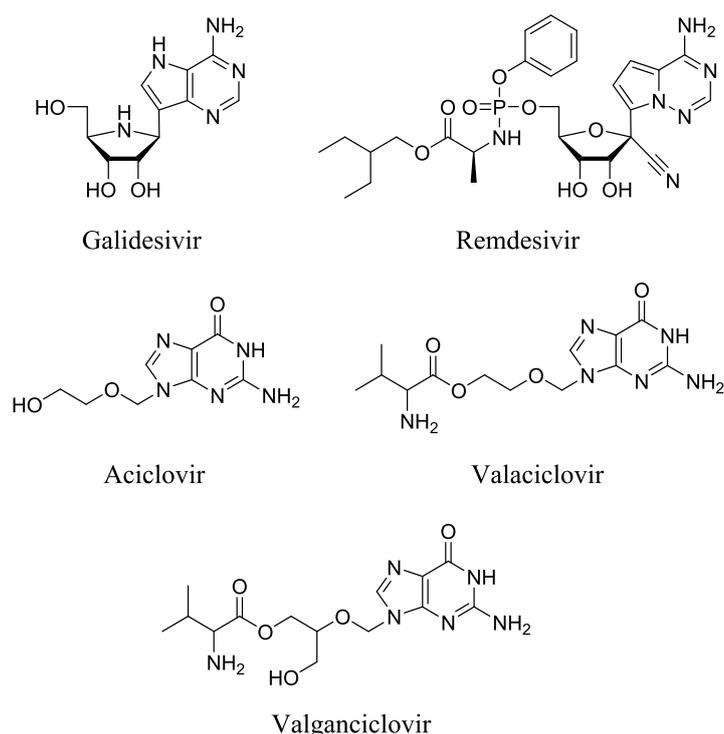


Figura 14. Derivados nucleosídicos contra VHS, VVZ y virus del Ébola.

I.3.3. Nucleósidos como antitumorales

El cáncer es una de las principales causas de mortandad a nivel mundial y abarca un amplio rango de enfermedades en las que las células se comportan de forma “anormal” durante el ciclo celular, creciendo de forma descontrolada. Los avances en los tratamientos oncológicos han aumentado considerablemente el número de supervivientes de esta enfermedad. El tratamiento estándar para el cáncer incluye cirugía,

⁴⁴ K. Pillai, V. Pilay, M. Jasamai, R. Thayan, J. Santhanam, S. S. Hassan, W. B. Yap. *Med. Chem. Res.* **2017**, 26, 1382-1387.

radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal, inmunoterapia y terapia dirigida.

Durante décadas, además de su uso como antivirales, los análogos de nucleósidos han sido una piedra angular en los tratamientos de quimioterapia tanto de tumores sólidos como de enfermedades de la sangre. Desde que en 1969 se aprobara la citarabina⁴⁵ (Figura 15) para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda, un gran número de análogos han sido evaluados para el tratamiento de distintos tipos de cáncer. En la actualidad, existen 15 derivados de nucleósido anticancerígenos aprobados por la FDA y por la Agencia Europea del Medicamento (*European Medicines Agency, EMA*), lo que supone un alto porcentaje en el total de fármacos comercializados para tratar la enfermedad. Además, se están investigando muchos otros análogos en ensayos clínicos como monoterapia o terapia combinada para cánceres múltiples.⁴⁶

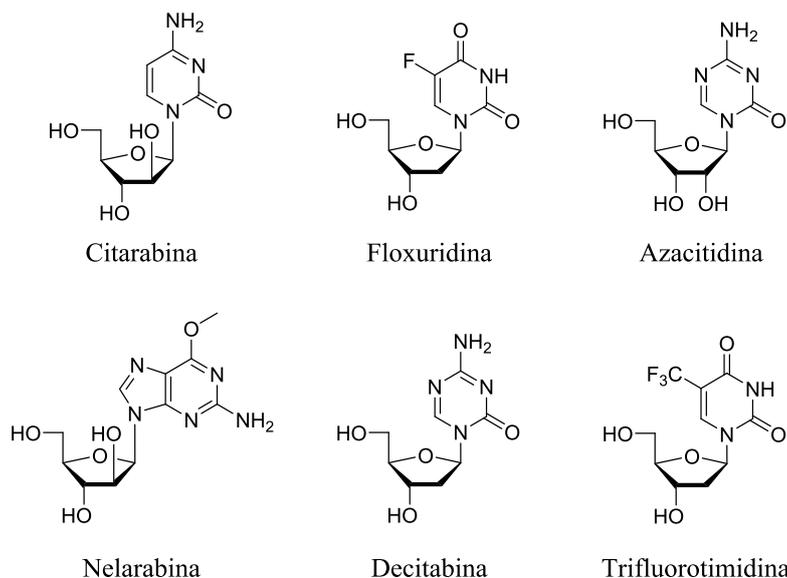


Figura 15. Algunos fármacos nucleosídicos aprobados como terapia antitumoral.

⁴⁵ S. Cohen. *Perspect. Biol. Med.* **1963**, 6, 215-227.

⁴⁶ A. Z. Mirza. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2019**, 38, 836-857.

El mecanismo por el que los análogos de nucleósidos desarrollan su actividad antitumoral es mediante la inhibición del crecimiento celular. Cuando se convierten en la forma activa, los nucleótidos, son sustratos de las ADN y ARN polimerasas y pueden incorporarse en las cadenas de ADN o ARN provocando un daño irreversible en la célula al ser resistentes a la maquinaria de reparación de la misma, lo cual induce la apoptosis.⁴⁷ Además, algunos derivados anticancerígenos desarrollan su actividad inhibiendo enzimas que participan en la síntesis de ácidos nucleicos.

I.4. Oligonucleótidos con actividad terapéutica

Existen determinadas enfermedades en las que algún gen no es capaz de expresarse de la forma correcta, dando lugar a proteínas erróneas que pueden no ser funcionales o desempeñar su función de forma incorrecta provocando alteraciones en la célula. En muchos casos existe tratamiento farmacológico para esas enfermedades pero tienen una eficacia moderada. La terapia génica⁴⁸ es un tratamiento alternativo que consiste en modificar la dotación genética de una célula para corregir un defecto genético o para dotar a las células de una nueva función. Esta terapia engloba un conjunto de técnicas que permiten introducir secuencias de oligonucleótidos sintéticos (ADN o ARN) en el interior de células diana, con el objetivo de modular la expresión de determinadas proteínas que generen una transformación biológica.

La transcripción es el proceso por el que la ARN polimerasa II transcribe un gen del ADN a ARN mensajero (ARNm) en el núcleo. A continuación, el ARNm sale al citoplasma y en los ribosomas se traduce

⁴⁷ G. Achanta, H. Pelicano, L. Feng, W. Plunkett, P. Huang. *Cancer Res.* **2001**, 61, 8723-8729.

⁴⁸ G. Novelli, D. C. Gruenert. *Pharmacogenomics* **2002**, 3, 15-18; b) D. Kim. *Molecular Therapy* **2005**, 11, 493-493.

Introducción ----

a una cadena polipeptídica que se pliega dando lugar a una proteína. Es en la etapa de traducción donde la terapia génica ejerce su acción, bien inhibiendo la síntesis de proteínas a través de la hibridación con un ARNm diana que impida su traducción, o bien induciendo la síntesis de una proteína que origine una respuesta en el organismo.

En los últimos 20 años, los oligonucleótidos con actividad terapéutica se han convertido en una de las nuevas áreas del desarrollo farmacéutico gracias a los avances en investigación biomédica que han mejorado la estabilidad de degradación del fármaco, su unión a las dianas y la farmacocinética, dando lugar a tratamientos más selectivos y menos tóxicos que los habituales. En la actualidad, existen 16 fármacos oligonucleotídicos (Tabla 2) aprobados por alguna de las agencias de medicamentos para el tratamiento de infecciones virales, hiperlipemias y enfermedades neurológicas.⁴⁹ Los principales inconvenientes que presenta esta técnica son la necesidad de conocer la secuencia de ARNm y la forma de introducir el material genómico foráneo en la célula.

Existen diferentes estrategias terapéuticas clasificadas por su mecanismo de acción que incluyen oligonucleótidos antisentido (*Antisense Oligonucleotides*, ASOs) que bloquean la traducción del ARNm, oligonucleótidos antisentido que involucran a las RNasa H, oligonucleótidos que funcionan por la vía del ARN de interferencia (ARNi), moléculas de ARN que se comportan como enzimas (ribozimas) y oligonucleótidos que se unen a proteínas y otras moléculas celulares (aptámeros). Además, otros enfoques terapéuticos incluyen oligodesoxinucleótidos CpG no metilados o vacunas que emplean ARNm.

⁴⁹ a) S. T. Crooke, J. L. Witztum, C. F. Bennett, B. F. Baker. *Cell. Metab.* **2018**, 27, 714-739; b) S. Sharad. *Antisense Therapy: An Overview*. In: *Antisense Therapy*. S. Sharad, S. Kapur. Eds.; IntechOpen, USA, 2019.

Tabla 2. Oligonucleótidos comerciales.

Año ^a	Fármaco (Nombre comercial)	Enfermedad	Tipo
1998	Fomivirsen (Vitravene TM)	Retinitis por citomegalovirus en pacientes con sida	ASO vía RNasa H
2004	Pegaptanib (Macugen [®])	Degeneración macular asociada con la edad	Aptámero
2013	Mipomersen (Kynamro [®])	Hipercolesterolemia familiar	ASO vía RNasa H
2016	Defibrotide (Defitelio [®])	Enfermedad veno oclusiva hepática	Aptámero
2016	Eteplirsen (Exondys 51 [®])	Distrofia muscular de Duchenne	ASO vía exón skipping
2016	Nusinersen (Spinraza [®])	Atrofia muscular espinal	ASO vía exón inclusión
2017	Heplisav-B (adyuvante vacuna hepatitis B)	Hepatitis B	Oligodesoxinucleótido CpG
2018	Patisiran (Onpattro TM)	Amiloidosis hereditaria mediada por transtiretina	siARN
2018	Inotersen (Tegsedì TM)	Amiloidosis hereditaria mediada por transtiretina	ASO
2019	Givosiran (Givlaari TM)	Porfiria hepática aguda	siARN
2019	(Waylivra [®])	Síndrome de Quilomicronemia familiar	ASO
2019	Golodirsen (Vyondys 53 TM)	Distrofia muscular de Duchenne	ASO
2020	Vitolarsen (Vilepso TM)	Distrofia muscular de Duchenne	ASO
2020	Inclisiran (Leqvio [®])	Hipercolesterolemia y dislipidemia mixta	siRNA
2020	BNT162b2 (Comirnaty [®])	COVID-19	ARNm
2020	mRNA-1273	COVID-19	ARNm

^aEl año corresponde con la primera fecha de aprobación realizada por alguna de las agencias de medicamentos.

I.4.1. Oligonucleótidos antisentido

Los oligonucleótidos antisentido son análogos de ADN o ARN de cadena simple y corta, sintetizados químicamente, que se unen específicamente al ARNm por hibridaciones de Watson-Crick. Una secuencia determinada del ARNm es la diana de los ASOs, y estas son elegidas en función de la accesibilidad. De acuerdo con esto, las secuencias ideales son las terminales y las que forman horquillas, bucles o protuberancias de 10 o más bases.⁵⁰

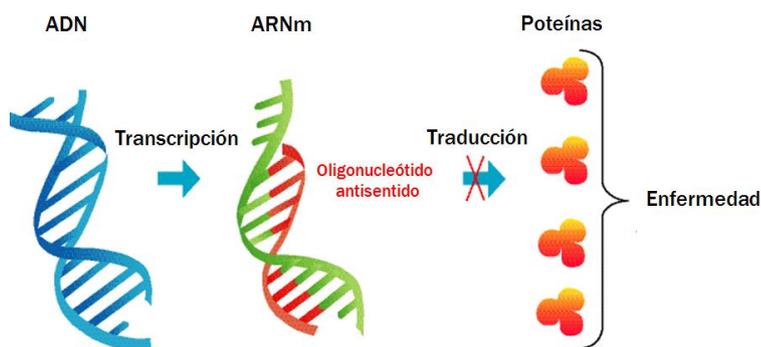


Figura 16. Mecanismo de acción de los oligonucleótidos antisentido.

Los principales mecanismos por los que los ASOs producen el silenciamiento génico son:⁵¹

a) Inhibición de la formación de la caperuza 5' del ARN, imprescindible para la formación de ARNm estables y maduros.

b) Bloqueo estérico de la traducción de proteínas. Este bloqueo suele ocurrir con ASOs diseñados para unirse cerca o en el codón que inicia la traducción, lo que dificulta la unión de la maquinaria de traducción.

c) Alteración del corte y empalme del ARNm (*splice-switching*).⁵² El ADN se transcribe a un pre-ARNm que se transforma en el ARNm al

⁵⁰ J. H. P. Chan, S. Lim, W. S. F. Wong. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2006**, 33, 533-540.

⁵¹ S. T. Crooke. *Biochim. Biophys. Acta, Gene Struct. Expression* **1999**, 1489, 31-34.

retirarse intrones no codificantes y unirse los exones. Algunas enfermedades ocurren por alteraciones de este mecanismo de maduración y los ASOs actúan impidiendo que esta maquinaria elimine secuencias de forma incorrecta y que se formen secuencias de ARN erróneas.

d) Activación de la ribonucleasa H (RNasa H). La RNasa H reconoce los dúplex ARN-ASO y degrada el ARN dejando el ASO intacto para que se una a otra molécula de ARN.

I.4.2. ARN de interferencia (ARNi)

El ARNi es un proceso natural utilizado por las células para regular la expresión génica que puede silenciar un gen por un mecanismo postranscripcional.⁵³ Además, también es un procedimiento involucrado en la respuesta inmune contra ácidos nucleicos procedentes de virus y bacterias. Se trata de un mecanismo complejo en el que moléculas de ARN de doble cadena (dsARN) pequeñas, de 20 a 25 nucleótidos de longitud, silencian el ARNm complementario. Existen tres tipos de dsARNs pequeños que pueden silenciar el ARNm mediante este mecanismo: piARN (*piwi-interacting RNA*), miARN (microARN) y siARN (*small interfering RNA*);⁵⁴ y pueden generarse en la célula de forma innata o introducirse en el organismo como terapias.⁵⁵

A continuación, se describe brevemente el mecanismo por el que se produce la regulación génica mediada por el ARNi (Figura 17-A). En el citoplasma, las cadenas de dsARN son procesadas en fragmentos más pequeños (siARN, miARN o piARN) por un complejo proteico (DICER) con actividad nucleasa. Posteriormente, un complejo de ribonucleoproteínas llamado RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*)

⁵² N. N. Singh, D. Luo, R. N. Singh. *Methods Mol. Biol.* **2018**, 1828, 415-437.

⁵³ S. M. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, T. Tuschl. *Nature* **2001**, 411, 494-498.

⁵⁴ M. Jinek, J. Doudna. *Nature*. **2009**, 457, 405-412.

⁵⁵ M. K. Montgomery, A. Fire. *Trends Genet.* **1998**, 14, 255-258.

reconoce una secuencia del siARN, ambas moléculas se unen y una de las hebras es hidrolizada (*sense* o pasajera). La otra hebra (*antisense* o guía) sigue unida a RISC y por complementariedad de bases se une al ARNm diana. El complejo hidroliza el ARNm y así se inhibe la expresión de la proteína.⁵⁶

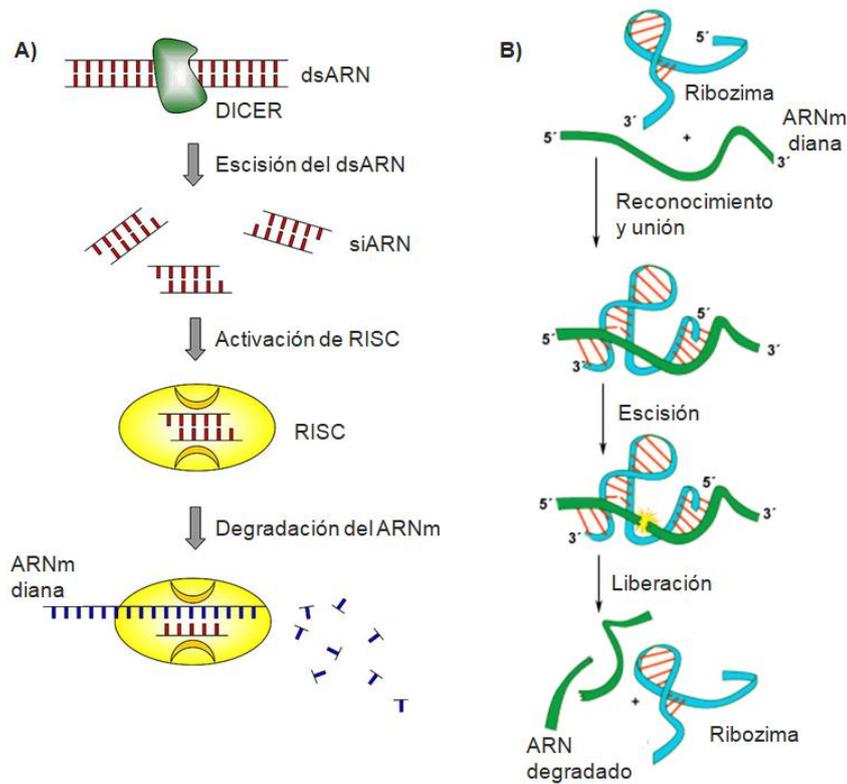


Figura 17. A) Mecanismo del ARN de interferencia. B) Mecanismo de una ribozima frente a un ARNm diana.

⁵⁶ 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 Fougères, H. P. Vornlocher, J. Maraganore, J. Lieberman. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, 6, 443-453; d) A. J. Pratt, I. J. MacRae. *J. Biol. Chem.* **2009**, 284, 17897-17901.

Diversos estudios han demostrado que ciertos siARNs inducen respuesta autoinmune en el huésped⁵⁷ y la introducción de modificaciones químicas en estas moléculas podría evitarlo. Sin embargo, es necesario prestar especial atención a la hora de diseñar estos siARNs modificados químicamente, ya que las modificaciones pueden reducir su afinidad por el RISC.

I.4.3. Ribozimas

Son moléculas de ARN que debido a su estructura terciaria muestran actividad enzimática, siendo capaces de cortar y pegar fragmentos de ARN en sitios específicos en la propia molécula o sobre otros sustratos de ARN. Desde que se descubrió la RNasa P como la primera ribozima,⁵⁸ se han realizado muchos estudios sobre la capacidad catalítica del ARN que han llevado al descubrimiento de diferentes tipos de ribozimas naturales.

Gracias a la habilidad que presentan las ribozimas para unirse a sitios específicos y a su capacidad de escisión catalítica, suponen una herramienta importante en la terapia antisentido, pudiendo diseñarse ácidos nucleicos artificiales que combinen la actividad ribonucleasa con el reconocimiento de secuencias de ARNm diana mediante el apareamiento de bases (Figura 17-B).⁵⁹ De esta forma, si se dirigen a los ARNm involucrados en procesos tumorales, las ribozimas pueden retardar o inhibir el crecimiento canceroso. Además, en los virus ARN, pueden degradar al ARN genómico vírico antes de su integración o a los ARNm involucrados en la generación de nuevos viriones.⁶⁰ Esta terapia presenta las ventajas de ser específica y poco inmunogénica, aunque sus

⁵⁷ M. Sioud. *Methods Mol. Biol.* **2009**, 487, 41-59.

⁵⁸ C. Guerrier-Takada, K. Gardiner, T. March, N. Pace, S. Altman. *Cell* **1983**, 35, 849-857.

⁵⁹ S. Bagheri, M. Kashani-Sabet. *Curr. Mol. Med.* **2004**, 4, 489-506.

⁶⁰ S. G. Mansfield, J. Kole, M. Puttaraju, C. C. Yang. *Gene Ther.* **2000**, 7, 1885-1895; A. Peracchi. *Rev. Med. Virol.* **2004**, 14, 47-64.

principales inconvenientes son la baja estabilidad y la dificultad para dirigir la ribozima hacia la secuencia diana.

I.4.4. Aptámeros

Son pequeñas moléculas de ADN o ARN de una sola cadena que forman una estructura tridimensional determinada y que tienen la capacidad de unirse específicamente a pequeñas moléculas químicas, proteínas o nucleótidos (Figura 18). Al igual que los anticuerpos, actúan por el principio de llave-cerradura, pero a diferencia de ellos, los aptámeros se sintetizan de forma química mediante un método denominado SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment*). En comparación con los anticuerpos, los aptámeros son menos inmunogénicos y tienen una mayor afinidad y especificidad hacia una gran variedad de dianas y, además, como su síntesis es relativamente sencilla, se pueden introducir modificaciones que permitan adaptarlos a diferentes aplicaciones.⁶¹ El principal inconveniente de estas moléculas es su corta semivida en la sangre debida a que su pequeño tamaño promueve su eliminación renal y su degradación por nucleasas.⁶²

Las aplicaciones más importantes de los aptámeros son en diagnóstico clínico, para la detección de dianas relacionadas con enfermedades como infecciones víricas o bacterianas, cáncer, etc., y su capacidad terapéutica al poder actuar sobre dianas causantes de una enfermedad. En la actualidad existen dos aptámeros terapéuticos aprobados por las agencias de medicamentos (Tabla 2) y un gran número en ensayos clínicos para el tratamiento de desórdenes de coagulación, cáncer o inflamación.

⁶¹ a) G. Mayer. *Angew. Chem. Int.* **2009**, *48*, 2672-2689; b) O. Kadioglu, A. H. Malczyk, H. J. Greten, T. Efferth. *Investig. New Drugs.* **2015**, *33*, 513-520.

⁶² M. Famulok, J. S. Hartig, G. Mayer. *G. Chem. Rev.* **2007**, *107*, 3715-3743.

Además, los aptámeros podrían convertirse en una valiosa herramienta terapéutica antiinfecciosa en un futuro próximo.⁶³

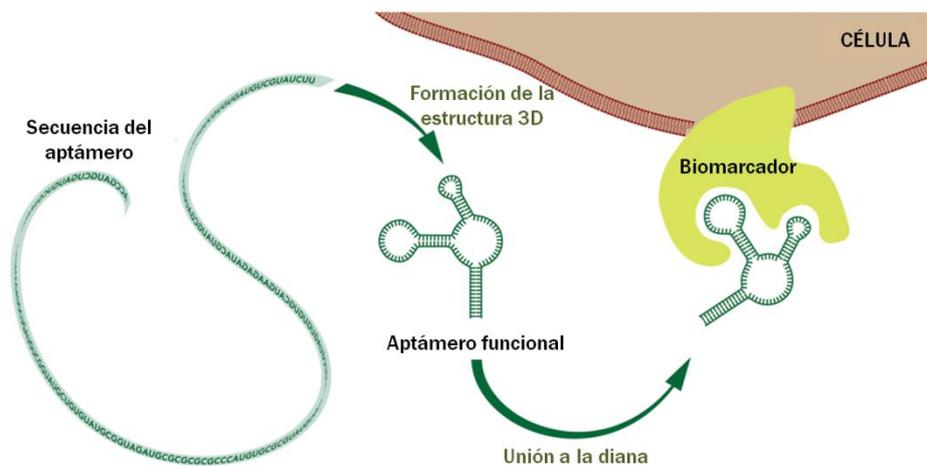


Figura 18. Unión del aptámero a su diana.

I.4.5. Oligodesoxinucleótidos Citosina-Guanina (CpG)

Con un enfoque terapéutico distinto a lo mencionado hasta el momento, los oligodesoxinucleótidos CpG tienen un importante potencial como adyuvantes de vacunas (agentes que potencian o dirigen la respuesta inmunológica frente a un antígeno). Las vacunas han contribuido a salvar millones de vidas al prevenir enfermedades infecciosas induciendo una respuesta inmune contra el patógeno causante de la enfermedad, a través de una respuesta innata y/o adaptativa del sistema inmune. El sistema inmune innato responde rápidamente a los patógenos iniciando su eliminación, mientras que las respuestas inmunes adaptativas se desarrollan más lentamente pero son altamente específicas y proporcionan memoria a largo plazo. Tras una infección, el sistema inmune innato se activa cuando unos receptores denominados TLR (*Toll-*

⁶³ S. Afrasiabi, M. Pourhajibagher, R. Raoofian, M. Tabar zad, A. Bahador. *J. Biomed. Sci.* **2020**, *27*, 6.

Introducción -----

Like Receptor) reconocen unas estructuras moleculares (PAMS, *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) expresadas por el patógeno que han sido conservadas en la evolución⁶⁴ y que son esenciales para desarrollar la posterior inmunidad adaptativa, por lo que su utilización como adyuvantes es muy interesante.

Los motivos CpG, secuencias de ADN que contienen dinucleótidos CpG no metilados, presentan una alta frecuencia en bacterias y virus de ADN y son reconocidos a través de un TLR (TLR9), desencadenando una activación rápida del sistema inmune innato y, por ende, induciendo una respuesta inmune adaptativa.⁶⁵ Debido a estas características y a su fuerte inmunogenicidad, los oligodesoxinucleótidos CpG (moléculas de ADN sintético con un motivo CpG) tienen un gran interés para ser utilizados como adyuvantes de vacunas.⁶⁶ Además, distintos ensayos clínicos han demostrado la seguridad de estos adyuvantes para vacunas dirigidas a enfermedades infecciosas,⁶⁷ alergias⁶⁸ y cáncer.⁶⁹ La vacuna contra la Hepatitis B HEPLISAV-B[®], aprobada por la FDA en 2017 y por la EMA en 2021, tiene como adyuvante un oligodesoxinucleótido CpG.⁷⁰

⁶⁴ a) C. A. Janeway, R. Medzhitov, *Annu. Rev. Immunol.* **2002**, *20*, 197-216; b) S. Akira, K. Takeda. *Nat. Rev. Immunol.* **2004**, *4*, 499-511.

⁶⁵ H. Hemmi, O. Takeuchi, T. Kawai, T. Kaisho, S. Sato, H. Sanjo, M. Matsumoto, K. Hoshino, H. Wagner, K. Takeda, S. Akira. *Nature* **2000**, *408*, 740-745.

⁶⁶ D. M. Klinman. *Nat. Rev. Immunol.* **2004**, *4*, 249-258.

⁶⁷ a) S. A. Halperin, S. Dobson, S. McNeil, J. M. Langley, B. Smith, R. McCall-Sani, D. Levitt, G. V. Nest, D. Gennevois, J. J. Eiden. *Vaccine* **2006**, *24*, 20-26; b) R. D. Ellis, Y. Wu, L. B. Martin, D. Shaffer, K. Miura, J. Aebig, A. Orcutt, R. Kelly, D. Zhu, A. Mogensen et al. *PLOS ONE* **2012**, *7*, e46094.

⁶⁸ G. K. Gupta, D. K. Agrawal. *Bio. Drugs.* **2010**, *24*, 225-235.

⁶⁹ A. M. Krieg. *Curr. Oncol. Rep.* **2004**, *6*, 88-95.

⁷⁰ J. D. Campbell. *Methods Mol. Biol.* **2017**, *1494*, 15-27.

I.4.6. Vacunas de ARNm

Durante la última década, la importante innovación tecnológica y la inversión en investigación han permitido que el ARNm se convierta en una herramienta terapéutica prometedora en el campo del desarrollo de vacunas.⁷¹ A pesar de los beneficios que estas vacunas presentan frente a las convencionales como su alta potencia, capacidad de desarrollo rápido, bajo coste de fabricación o administración segura, los problemas de inestabilidad y distribución *in vivo* han limitado su uso. Esta herramienta se basa en la administración *in vivo* de los transcritos que codifican para un antígeno, de forma que este ARNm activa células del sistema inmune innato por estimulación de TLRs específicos (TLR3, TLR7 y TLR8),⁷² produciendo una respuesta inmunitaria.

La búsqueda de una solución a la pandemia sin precedentes de la COVID-19 ha hecho resurgir este tipo de terapia, colocándola como un recurso prometedor para combatir el virus. A principios de 2021, se han aprobado dos vacunas: una desarrollada por Pfizer-BioNtech (BNT162b2)⁷³ y la otra por Moderna (mRNA-1273),⁷⁴ que consisten en un ARN modificado que codifica para una proteína clave del SARS-CoV-2 en su infección (glicoproteína S involucrada en la entrada del virus en la célula huésped) y que se han formulado con nanopartículas lipídicas.

⁷¹ a) S. Pascolo. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2008**, *183*, 221-235; b) N. Pardi, M. J. Hogan, F. W. Porter, D. Weissman. *Nat. Rev.* **2018**, *17*, 261-279.

⁷² F. Heil, H. Hemmi, H. Hochrein, F. Ampenberger, C. Kirschning, S. Akira, G. Lipford, H. Wagner, S. Bauer. *Science* **2004**, *303*, 1526-1529.

⁷³ F. P. Polack, S. J. Thomas, N. Kitchin, J. Absalon, A. Gurtman, S. Lockhart, J. L. Perez, G. Pérez Marc, E. D. Moreira, C. Zerbini et al. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *383*, 2603-2615.

⁷⁴ L. A. Jackson, E. J. Anderson, N. G. Rouphael, P. C. Roberts, M. Makhene, R. N. Coler, M. P. McCullough, J. D. Chappell, M. R. Denison, L. J. Stevens et al. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *383*, 1920-1931.

I.5. Modificaciones químicas en oligonucleótidos

Los oligonucleótidos terapéuticos de simple o doble cadena normalmente no poseen las cualidades apropiadas para ser utilizados como fármacos efectivos. Carecen de estabilidad metabólica en fluidos extracelulares o intracelulares, o no tienen unas propiedades farmacocinéticas adecuadas. Además, algunos ácidos nucleicos también pueden activar mecanismos biológicos que producen efectos inmunomoduladores no deseados.⁷⁵ Para solventar estas limitaciones, la Química Médica introduce distintas modificaciones o estrategias de formulación que permitan utilizar estas moléculas tan prometedoras como agentes terapéuticos.

I.5.1. Derivatización química

Las modificaciones para mejorar las propiedades de los análogos de ácidos nucleicos se han realizado en el esqueleto fosfato, en la unidad de azúcar y/o en las bases nitrogenadas, de forma que las síntesis de los oligonucleótidos han ido evolucionando dando lugar a tres generaciones de moléculas que se detallan a continuación.

I.5.1.1. Oligonucleótidos de primera generación

Las primeras modificaciones que se aplicaron en estas moléculas son las que dieron lugar a los oligonucleótidos fosforotioatos.⁷⁶ La transformación consiste en sustituir el oxígeno que no forma parte del puente internucleotídico por un átomo de azufre (Figura 19). Esta sustitución podría parecer mínima, pero aporta a la molécula carga negativa y alta solubilidad, provoca variaciones en el radio de Van der Waals y da lugar a un fósforo quiral, lo que se traduce en dos

⁷⁵ K. Takahasi, M. Yoneyama, T. Nishihori, R. Hirai, H. Kumeta, R. Narita, M. Gale, J. F. Inagaki, T. Fujita. *Mol. Cell.* **2008**, 29, 428-440.

⁷⁶ C. Stein, J. Cohen. *Oligodeoxynucleotides: Antisense Inhibitors of Gene Expression*; J. Cohen. Ed.; CRC Press: Boca Raton, **1989**; pp. 94-117.

diastereoisómeros posibles que pueden interactuar de manera diferente con las enzimas. Uno de los medicamentos antisentido aprobados por las agencias de medicamentos (Tabla 2), el fomivirsen (Vitravene),⁷⁷ para el tratamiento de una retinitis vírica, es un oligonucleótido completamente de fosfortioato. Las principales ventajas que presentan estas moléculas son un método de síntesis sencillo,⁷⁸ la capacidad para activar la RNasa H y una notable estabilidad enzimática en comparación con los oligonucleótidos sin modificaciones. Sin embargo, los fosfortioatos por si solos no protegen completamente de las nucleasas, su eficacia *in vivo* requiere la administración repetida de dosis altas y pierden afinidad de unión por el ARNm objetivo.

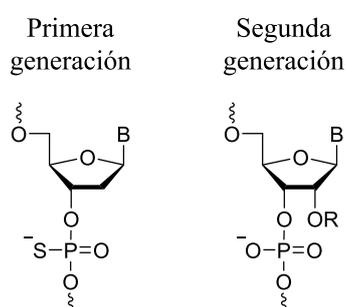


Figura 19. Estructura de oligonucleótidos de primera y segunda generación.

1.5.1.2. Oligonucleótidos de segunda generación

Con el objetivo de lograr una mayor estabilidad y afinidad se han introducido modificaciones en el anillo del azúcar que han dado lugar a los oligonucleótidos de segunda generación, los 2'-*O*-alquiloligonucleótidos (Figura 19).⁷⁹ Las modificaciones 2'-*O*-metil ocurren de forma natural en el ARN, mejorando la afinidad de unión y la

⁷⁷ B. Roehr. *J. Int. Assoc. Physicians AIDS Care* **1998**, *4*, 14-16; b) P. Piascik. *J. Am. Pharm. Assoc.* **1999**, *39*, 84.

⁷⁸ F. Eckstein. *Annu. Rev. Biochem.* **1985**, *54*, 367-402.

⁷⁹ a) P. Martin. *Helv. Chim. Acta* **1995**, *78*, 486-504; b). K. H. Altmann, P. Martin, N. M. Dean, B. P. Monia. *Nucleosides Nucleotides* **1997**, *16*, 917-926; c) M. Grotti, M. Douglas, R. Eritja, B. S. Sproat. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 5899-5914.

resistencia frente a las nucleasas,⁸⁰ así como, reduciendo la estimulación del sistema inmune.⁸¹ Con los 2'-*O*-metiloligonucleótidos como punto de partida, se han estudiado diversos sustituyentes 2'-*O*-alquilo, siendo el 2'-*O*-metoxietil (MOE) uno de los más utilizados.⁸² Dos de los fármacos antisentido aprobados por las agencias de medicamentos (Tabla 2) presentan modificaciones 2'-*O*-MOE en su estructura: el mipomersen,⁸³ para el tratamiento de la hipercolesterolemia familiar, que desarrolla su actividad vía RNasa H, y el nusinersen, para el tratamiento de la atrofia muscular espinal, que modula el mecanismo de empalme del ARN. El principal inconveniente de los oligonucleótidos de segunda generación es el elevado coste de su síntesis debido a la dificultad de preparación de los monómeros precursores (2'-*O*-alquilribonucleósidos).

1.5.1.3. Oligonucleótidos de tercera generación

Esta tercera generación abarca una gran variedad estructural de oligonucleótidos de ADN y ARN, algunos ejemplos se recogen en la Figura 20. Una de las modificaciones estudiadas es la introducción de átomos de flúor en la posición 2' que da lugar a los FANA (2'-*Fluoro-Arabino Nucleic Acid*).⁸⁴ Esta modificación incrementa la afinidad de unión por el ARN diana, confiere estabilidad frente a las nucleasas y debido al pequeño tamaño del átomo de flúor pueden incluirse en las dos

⁸⁰ B. P. Monia, J. F. Johnston, H. Sasmor, L. L. Cummins. *J. Biol Chem.* **1996**, *271*, 14533-14540.

⁸¹ M. Robbins, A. Judge, L. Liang, K. McClintock, E. Yaworski, I. MacLachlan. *Mol. Ther.* **2007**, *15*, 1663-1669.

⁸² a) P. Martin. *Helv. Chim. Acta.* **1995**, *78*, 486-504; b) M. Egli, G. Minasov, V. Tereshko, P. S. Pallan, M. Teplova, G. B. Inamati, E. A. Lesnik, S. R. Owens, B. S. Ross, T. P. Prakash et al. *Biochemistry* **2005**, *44*, 9045-9057.

⁸³ F. J. Raal, R. D. Santos, D. J. Blom, A. D. Marais, M. J. Chang, W. C. Cromwell, R. H. Lachmann, D. Gaudet, J. L. Tan, S. Chasan-Taber et al. *Lancet* **2010**, *375*, 998-1006.

⁸⁴ a) A. M. Kawasaki, M. D. Casper, S. M. Freier, E. A. Lesnik, M. C. Zounes, L. L. Cummins, C. Gonzalez, P. D. Cook. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 831-841; b) M. Manoharan, A. Akinc, R. K. Pandey, J. Qin, P. Hadwiger, M. John, K. Mills, K. Charisse, M. A. Maier, L. Nechev et al. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2011**, *50*, 2284-2288.

hebras de un siARN. Otras alteraciones son las que presentan los oligonucleótidos N3'→P5' fosforamidatos,⁸⁵ en los que un 3'-OH es sustituido por un 3'-NH₂, o los oligonucleótidos con enlace formacetalico.⁸⁶

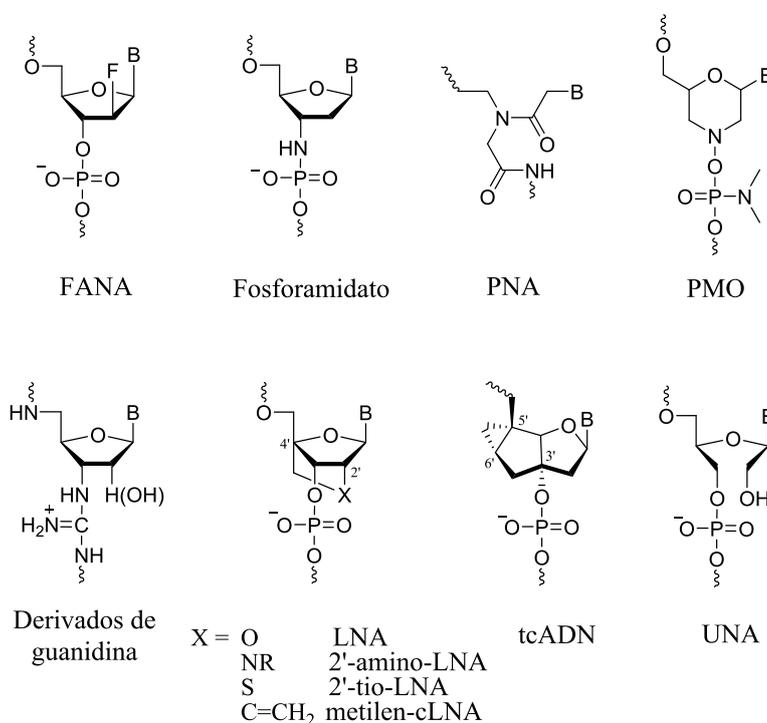


Figura 20. Estructura de oligonucleótidos de tercera generación.

Además, se han analizado distintas alternativas a los esqueletos cargados negativamente que han dado lugar a los ácidos nucleicos peptídicos (*Peptide Nucleic Acid*, PNA),⁸⁷ en los que el esqueleto azúcar-fosfato se ha sustituido por enlaces de poliamida, a los morfolino-

⁸⁵ S. M. Gryaznov, D. M. Lloyd, J. K. Chen, R. G. Schultz, L. A. Dedionisio, L. Ratmeyer, W. D. Wilson. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 5798-5802.

⁸⁶ A. Kolarovic, E. Schweizer, E. Greene, A. Gironda, P. S. Pallan, M. Egli, E. Rozners. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 14932-14937.

⁸⁷ a) P. E. Nielse, M. Egholm, R. H. Berg O. Buchardt O. *Science* **1991**, 254, 1497-1500; b) A. Elayadi, D. Corey. *Curr. Opin. Investigational Drugs* **2001**, 2, 558-561; c) P. Nielsen. *Mol. Biotechnol.* **2004**, 26, 233-248.

Introducción -----

fosforodiamiditos (*Phosphorodiamidate Morpholino Oligomer*, PMO),⁸⁸ con un anillo de morfolina, o a los oligonucleótidos de guanidina⁸⁹ cargados positivamente. Tanto los PNA como los PMO tienen esqueletos con carga neutra, forman dúplex estables con los ácidos nucleicos diana y no se degradan por las nucleasas, pero tienen baja capacidad para activar la RNasa H. Aunque el principal inconveniente de los PNA es su baja solubilidad en agua. Algunos PMO han mostrado actividad en la modulación de la maduración del ARNm, inhibiendo la traducción; es el caso del compuesto eteplirsén (Tabla 2), aprobado para el tratamiento de la enfermedad de Duchenne.

En esta tercera generación también se ha estudiado la reducción de la flexibilidad conformacional con los ácidos nucleicos restringidos (*Locked Nucleic Acid*, LNA)⁹⁰ o los triciclos-ADN (*Tricyclo-DNA*, tcADN),⁹¹ observándose en ambos una elevada estabilidad de hibridación con la secuencia diana. Los LNA presentan una unión extra entre las posiciones C-2' y C-4' que convierte un anillo de furanosa flexible en un biciclo rígido con la ribosa en configuración C3'-*endo*; una conformación bloqueada que mejora las propiedades de apilamiento de las bases y la organización del esqueleto.⁹² Estos oligonucleótidos presentan gran resistencia frente a las nucleasas y un enorme poder discriminatorio entre secuencias complementarias y no complementarias del ARN diana. En los tcADN se introduce una unidad de etileno entre las posiciones 3' y 5'

⁸⁸ a) R. M. Hudziak, E. Barofsky, D. F. Barofsky, D. L. Weller, S. B. Huang, D. D. Weller. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **1996**, *6*, 267-272; b) J. Summerton, D. Weller. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **1997**, *7*, 187-195; c) J. Heasman. *Dev. Biol.* **2002**, *243*, 209-214.

⁸⁹ M. Park, D. Canzio, T. C. Bruice. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 2377-2384.

⁹⁰ a) S. K. Singh SK, P. Nielsen, A. A. Koshkin, J. Wengel. *Chem. Commun.* **1998**, 455-456. b) P. H. Hagedorn, R. Persson, E. D. Funder, N. Albæk, S. L. Diemer, D. J. Hansen, H. F. Hansen, M. R. Moller, N. Papargyri, H. Christiansen et al. *Drug Discov. Today* **2018**, *23*, 101-114.

⁹¹ a) R. Steffens, C. J. Leumann. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11548-11549. b) P. Aupy, L. Echevarría, K. Relizani, A. Goyenvalle. *Biomedicines* **2018**, *6*, 2-15.

⁹² H. Kaur, J. Wengel, S. Maiti. *Biochemistry* **2008**, *47*, 1218-1227.

del azúcar, con una unidad adicional de ciclopropil exocíclica en 5' y 6', obteniéndose ácidos nucleicos restringidos. Las propiedades únicas de estas moléculas, como una mayor hidrofobicidad y estabilidad, las hacen muy interesantes para su utilización terapéutica.⁹³

Además de oligonucleótidos restringidos, también se ha sustituido la ribosa por un derivado acíclico para dar lugar a derivados con mayor flexibilidad estructural que los naturales. Ejemplos de estas modificaciones son los derivados de ácidos nucleicos no bloqueados (*Unlocked Nucleic Acid*, UNA)⁹⁴ o los PNA.

I.5.2. Métodos de síntesis de oligonucleótidos

La síntesis de oligonucleótidos consiste en la unión de nucleósidos en un orden específico por esterificación del ácido fosfórico con el 3'-OH de uno y el 5'-OH del otro nucleósido. Normalmente, el 3'-OH se esterifica primero con un derivado apropiado de ácido fosfórico y la molécula resultante se hace reaccionar con el 5'-OH del siguiente residuo de la cadena. Se puede utilizar una estrategia lineal o convergente, pero la síntesis lineal desde el extremo 3' al 5' es la más utilizada.⁹⁵ La formación de enlaces internucleotídicos puede llevarse a cabo en fase sólida o en disolución.⁹⁶ La síntesis en fase sólida ha sido la estrategia elegida en las últimas décadas y en concreto, el método del fosforamidito. Sin embargo, en los últimos años se han investigado métodos que combinan las ventajas de la fase sólida y de la síntesis en disolución que se espera tengan la posibilidad de aplicarse en la industria.

⁹³ K. Relizani, G. Griffith, L. Echevarría, F. Zarrouki, P. Facchinetti, C. Vaillend, C. Leumann, L. Garcia, A. Goyenvale. *Mol. Ther. Nucleic Acids*. **2017**, 8, 144-157.

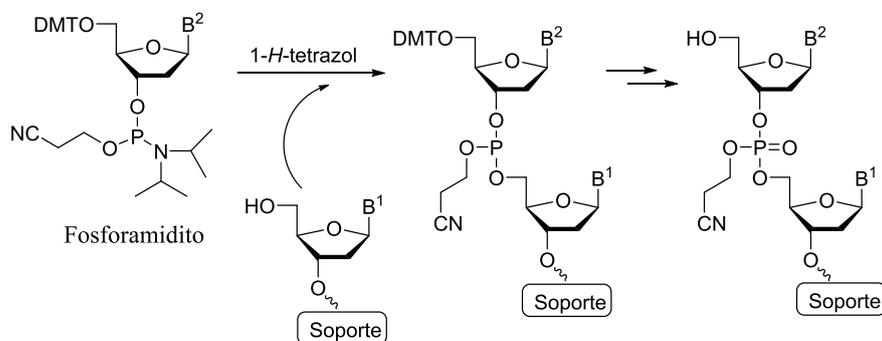
⁹⁴ M. A. Campbell, J. Wengel. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 5680-5689.

⁹⁵ T. Abramova. *Molecules* **2013**, 18, 1063-1075.

⁹⁶ C. B. Reese. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 3851-3868.

I.5.2.1. Síntesis en fase sólida

Las investigaciones de Becauge y Caruthers⁹⁷ en 1981 supusieron el verdadero avance en la síntesis química de oligonucleótidos. Desde entonces, el método del fosforamidito en fase sólida ha sido el más empleado desde escala de laboratorio hasta escala industrial del orden de kilogramos, mediante la utilización de sintetizadores totalmente automatizados.⁹⁸ Consiste en el acoplamiento de un nucleósido 5'-*O*-(4,4-dimetoxitritil)-3'-fosforamidito, que se encuentra en disolución, con la posición 3' del nucleósido anclado al soporte sólido por 3'. A continuación, tiene lugar una oxidación del fosfito triéster [P(III) → P(V)] y una desprotección del grupo dimetoxitritilo (DMT) de la posición 5', repitiéndose las etapas de forma cíclica en función del tamaño deseado de la cadena.



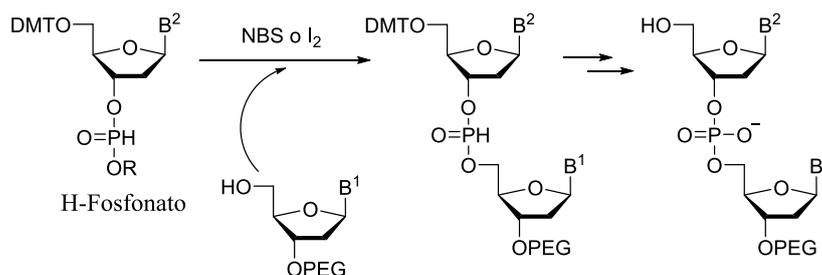
Esquema 1. Método del fosforamidito en fase sólida.

⁹⁷ S. L. Becauge, M. H. Caruthers. *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22, 1859-1862.

⁹⁸ Y. S. Sanghvi. *A Status Update of Modified Oligonucleotides for Chemotherapeutics Applications*. In: *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*. Eds.; Wiley, 2011; Vol. 46, 4.1.1.-4.1.22.

I.5.2.2. Síntesis en disolución

Uno de los métodos de síntesis en disolución es el del H-fosfonato (Esquema 2),⁹⁹ que se basa en el acoplamiento entre un nucleósido protegido en la posición 5' con DMT y un grupo H-fosfonato en la posición 3', y un nucleósido anclado a un soporte polimérico (Polietilenglicol, PEG) 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.



Esquema 2. Método del H-fosfonato.

En los últimos años, debido a los elevados costes de la síntesis en fase sólida, la síntesis en disolución está recibiendo gran interés como alternativa tanto para la síntesis de oligonucleótidos en el laboratorio a escala de gramos como para la preparación industrial a una mayor escala, sin ningún equipo especial.¹⁰⁰ Uno de los métodos desarrollados consiste en la utilización de un soporte soluble posteriormente en el medio de reacción. Las principales ventajas que se plantean al desarrollar este método son un proceso de alargamiento de la cadena más sencillo, la ausencia de soportes sólidos caros y la posibilidad de caracterizar la

⁹⁹ a) C. B. Reese, Q. Song. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, 7, 2787-2792; b) C. B. Reese, Q. Song. *Nucleic Acids Res.* **1999**, 27, 963-971; c) K. J. Padiya, M. M. Salunkhe. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, 8, 337-342.

¹⁰⁰ a) M. C. De Koning, A. B. T. Ghisaidoobe, H. I. Duynstee, P. B. W. Ten Kortenaar, D. V. Filippov, G. A. van der Marel. *Org. Process Res. Dev.* **2006**, 10, 1238-1245; b) J. F. Kim, P. R. J. Gaffney, I. B. Valtcheva, G. Williams, A. M. Buswell, M. S. Anson, A. G. Livingston. *Org. Process Res. Dev.* **2016**, 20, 1439-1452.

cadena en crecimiento por espectrometría de masas o resonancia magnética nuclear (RMN) después de cada acoplamiento, aunque no sería posible con todos los soportes solubles. Sin embargo, el principal desafío que presenta esta técnica es la separación de la cadena oligonucleotídica, anclada al soporte en disolución, de los reactivos de pequeño tamaño después de cada ciclo de acoplamiento; una etapa que en fase sólida puede llevarse a cabo por un simple lavado.

I.5.3. Oligonucleótidos conjugados

Aunque las modificaciones químicas introducidas en la estructura han mejorado eficientemente la estabilidad de los oligonucleótidos, no proporcionan una biodisponibilidad adecuada. Los ácidos nucleicos terapéuticos presentan una farmacocinética deficiente que, en muchos casos, causa problemas de toxicidad,¹⁰¹ carencia de permeabilidad en la membrana plasmática¹⁰² o efectos importantes en moléculas no objetivo.¹⁰³ Para abordar los problemas que no soluciona la derivatización, los oligonucleótidos naturales o sintéticos se conjugan (unión covalente por métodos químicos o biológicos) con moléculas (ligandos) como anticuerpos o sus fragmentos, hormonas, toxinas, componentes liposomales, lípidos, hidratos de carbono, proteínas y péptidos, fluoróforos o sondas fluorescentes, enzimas, inhibidores, factores de crecimiento y vitaminas. La formación de estos conjugados permite mejorar la biodistribución en una región específica o tipo de célula, promover la liberación endosómica, aumentar el transporte mediado por receptores o aumentar la lipofilia.

¹⁰¹ M. Dirin, J. Winkler. *Expert Opin. Biol. Ther.* **2013**, 13, 875-888.

¹⁰² P. L. Iversen, S. Zhu, A. Meyer, G. Zon. *Antisense Res. Dev.* **1992**, 2, 211-222.

¹⁰³ M. Stessl, C. R. Noe, J. Winkler. *Off-target effects and safety aspects of phosphorothioate oligonucleotides*. In: *Nucleic Acids Sequences to Molecular Medicine, RNA Technologies*, V. A. Erdmann, J. Barciszewski, J. Eds.; Springer Verlag, **2012**; 67-83.

1.5.3.1. Estrategias de conjugación

Al igual que la síntesis de oligonucleótidos, los métodos de preparación de conjugados se dividen en dos categorías: fase sólida y disolución.

1- Conjugación en fase sólida

Esta conjugación se lleva a cabo en oligonucleótidos unidos a un soporte sólido. Dentro de esta categoría se pueden distinguir tres métodos:

a) Incorporación durante la síntesis automática del oligonucleótido de monómeros modificados con ligandos (Figura 21-A). A pesar de la comodidad del método, sus principales limitaciones son la estabilidad de los monómeros modificados en las condiciones sintéticas y de desprotección, y la necesidad de disponer de ellos en grandes cantidades, no siendo comerciales en la mayoría de los casos y teniendo que prepararse en el laboratorio.

b) Unión del ligando al oligonucleótido anclado al soporte (Figura 21-B). Tras la síntesis del oligonucleótido, la cadena unida al soporte se elonga por el extremo 5' con un carbohidrato o un péptido. La principal ventaja de este método es la facilidad de purificación del conjugado. Sin embargo, el conjugado debe ser estable en las condiciones de desprotección.

c) Incorporación de monómeros con grupos funcionales reactivos (Figura 21-C). Durante la síntesis automática del oligonucleótido se incorpora un monómero con un grupo reactivo protegido (enlazador). Tras esta síntesis y manteniendo el oligonucleótido anclado al soporte, se elimina el grupo protector y se hace reaccionar con un grupo funcional complementario del ligando. El conjugado es obtenido después de su escisión del soporte, desprotección de las bases y purificación.

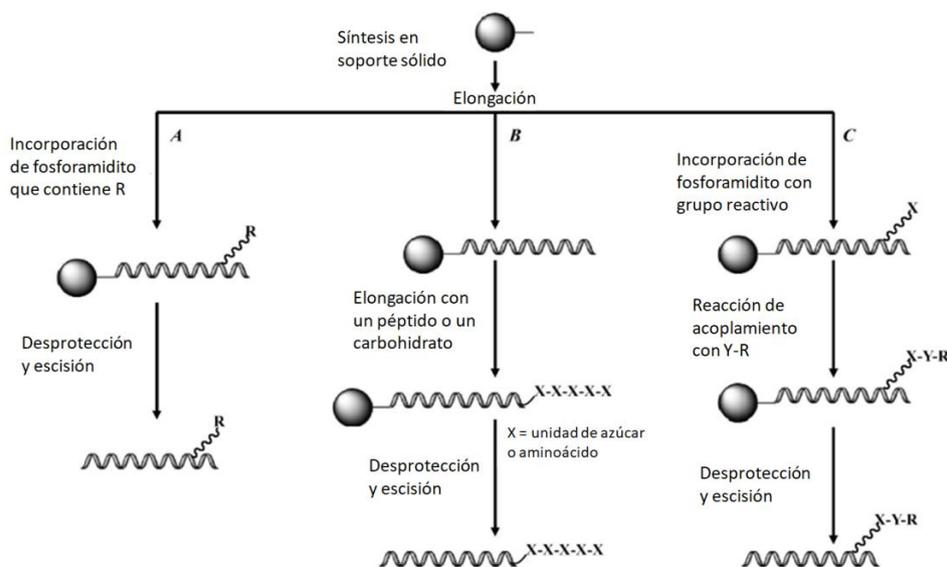


Figura 21. Métodos de conjugación en fase sólida.

2- Conjugación en disolución

A diferencia de la conjugación en fase sólida, en este caso se lleva a cabo primero la síntesis del oligonucleótido que contiene residuos con grupos reactivos (enlazadores) y su purificación. A continuación, tiene lugar la reacción de conjugación con el ligando en disolución, originando enlaces covalentes reversibles o irreversibles. La principal ventaja de este método es la posibilidad de conjugar moléculas con químicas incompatibles con los grupos protectores presentes cuando el oligonucleótido está unido al soporte. Sus principales limitaciones son la necesidad de una purificación exhaustiva tras la conjugación, que puede disminuir el rendimiento, y la distinta solubilidad del ligando y del oligonucleótido; mientras los oligonucleótidos son solubles en disoluciones acuosas, los ligandos no suelen serlo. Se ha utilizado una gran variedad de enlaces (Figura 22) para la conjugación en disolución, permitiendo acoplar casi todo tipo de ligandos.

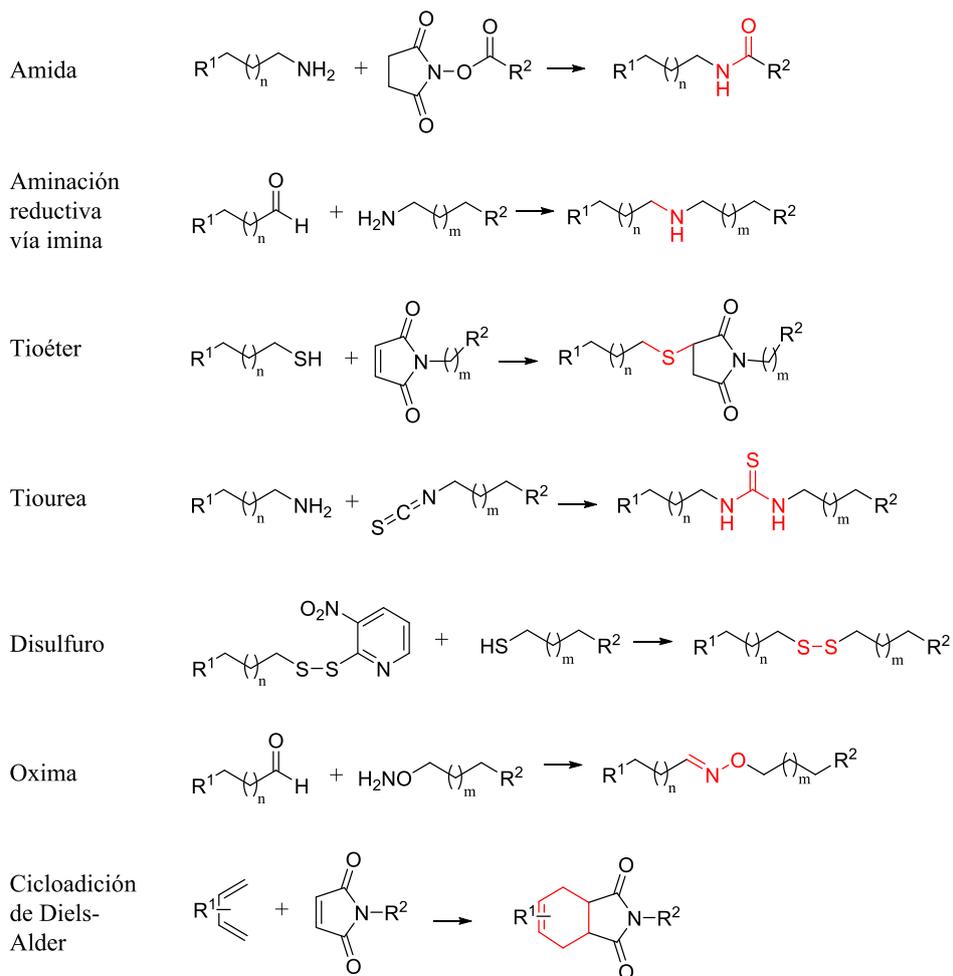


Figura 22. Algunos enlaces utilizados en conjugación.

1.5.3.2. Tipos principales de oligonucleótidos conjugados

Se han sintetizado conjugados de oligonucleótidos con un amplio abanico de ligandos. A continuación, solo se recogen unos ejemplos de los mismos.

1- Moléculas lipofílicas

La membrana plasmática es una barrera selectiva que regula la entrada de moléculas en la célula. Se trata principalmente de bicapas

fosfolípicas altamente hidrófobas que impiden la entrada de moléculas hidrofílicas, como los oligonucleótidos, fuertemente hidrófilos debido al esqueleto azúcar-fosfato. Su carácter polianiónico incrementa la hidrofiliidad y aunque las estrategias de derivatización disminuyen la carga negativa, no es suficiente para la transferencia de estas moléculas a través de la membrana plasmática. Por ello, se conjugan moléculas lipofílicas que reducen el carácter hidrofílico de los oligonucleótidos y además, muchos de estos ligandos, como el colesterol, promueven la interacción del oligonucleótido con la albúmina y lipoproteínas séricas, favoreciendo su transporte y su absorción en el tejido.¹⁰⁴

2- Hidratos de carbono

La mayoría de los mecanismos para el reconocimiento celular se basan en interacciones proteína-carbohidrato. Las lectinas son proteínas presentes en muchas superficies celulares que reconocen e internalizan mediante endocitosis glucoproteínas con fragmentos de carbohidratos específicos. Los oligonucleótidos conjugados con carbohidratos permiten mejorar la especificidad celular o tisular en la liberación de oligonucleótidos a través de endocitosis mediada por un receptor. Recientemente, se ha utilizado la química “click” para la preparación de varios tipos de oligonucleótidos glucoconjugados, incluidos oligosacáridos ramificados bastante complicados.¹⁰⁵

3- Moléculas fluorescentes

La detección fluorescente es una herramienta muy útil en una gran variedad de estudios. El emparejamiento de las bases en los ácidos nucleicos, una de las formas de reconocimiento biomolecular más fuerte y específica, ha supuesto la base para el desarrollo de las sondas de

¹⁰⁴ A. Gissot, M. Camplo, M. W. Grinstaff, P. Barthelemy. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 1324-1333.

¹⁰⁵ A. Kiviniemi, P. Virta, M. S. Drenichev, S. N. Mikhailov, H. Lonnberg. *Bioconjug. Chem.* **2011**, *22*, 1249-1255.

hibridación fluorescentes, fragmentos de ADN o ARN de cadena simple marcados que permiten detectar la presencia de una secuencia complementaria en el genoma de una muestra. Es por ello que los nucleósidos y oligonucleótidos fluorescentes desempeñan un papel fundamental en secuenciación de ADN, ciencia forense y análisis genéticos.

4- Péptidos

El interés de los conjugados peptídicos es debido a la existencia de ciertos péptidos que poseen la capacidad para translocarse a través de las membranas celulares mediante un mecanismo que no involucra endocitosis mediada por receptores, por lo que podrían mejorar la distribución del oligonucleótido.¹⁰⁶ Sin embargo, la formación de oligonucleótidos conjugados con péptidos es complicada debido a que la química de ambas moléculas es muy diferente, lo que dificulta encontrar unas condiciones adecuadas de reacción. Un punto clave en la síntesis de estos conjugados es la utilización de una molécula enlazadora entre el péptido y el oligonucleótido que permite flexibilidad y evita interacciones no específicas entre los dos fragmentos.

5- Nanopartículas

Se han desarrollado oligonucleótidos conjugados con nanopartículas donde se combinan las propiedades catalíticas y de reconocimiento altamente selectivas de las biomoléculas con las características electrónicas, fotónicas y catalíticas únicas de las nanopartículas. Estos conjugados tienen aplicación tanto en diagnóstico,¹⁰⁷ constituyendo una alternativa a las moléculas fluorescentes, como en terapia,¹⁰⁸ favoreciendo la liberación del ácido nucleico para el silenciamiento génico.

¹⁰⁶ M. J. Gait. *Cell. Mol. Life Sci.* **2003**, *60*, 844-853.

¹⁰⁷ P. Jamdagni, P. Khatri, J. S. Rana. *Int. Nano Lett.* **2016**, *6*, 139-146.

¹⁰⁸ F. F. Sahle, T. L. Lowe. *Drug Discov. Today* **2020**, *25*, 73-88.

6- Biosensores de ADN¹⁰⁹

Los biosensores son dispositivos que utilizan propiedades biológicas de reconocimiento para bioanálisis selectivos, constituyendo instrumentos muy poderosos de diagnóstico. Los “chips” de ADN consisten en superficies de vidrio que presentan distintas secuencias de oligonucleótidos. Estas secuencias se hibridan con las secuencias complementarias presentes en la muestra de estudio, produciendo una señal electroquímica o fluorescente detectable. De esta forma, es posible controlar el nivel de expresión de varios genes en paralelo y detectar la presencia o ausencia de genes específicos.

¹⁰⁹ V. Kavita. *J. Bioeng. Biomed. Sci.* **2017**, 7, 2.

CAPÍTULO 1

Síntesis, caracterización y evaluación biológica
de 1'-homo-*N*-2'-desoxi- α -nucleósidos

Antecedentes

Teniendo en cuenta las funciones fundamentales que desempeñan los nucleótidos, y por tanto los nucleósidos, en los procesos biológicos, constituyen un grupo importante de moléculas en el diseño de nuevos agentes terapéuticos.

Los nucleósidos naturales presentan un enlace *N*-glicosídico (Figura 23), resultado de la unión entre el C-1' del azúcar y uno de los nitrógenos de la base heterocíclica: el N-1 si la base es pirimidínica o el N-9 si es púrica. El enlace *N*-glicosídico se forma cuando un hemiacetal intramolecular reacciona con un grupo amino liberándose una molécula de agua.

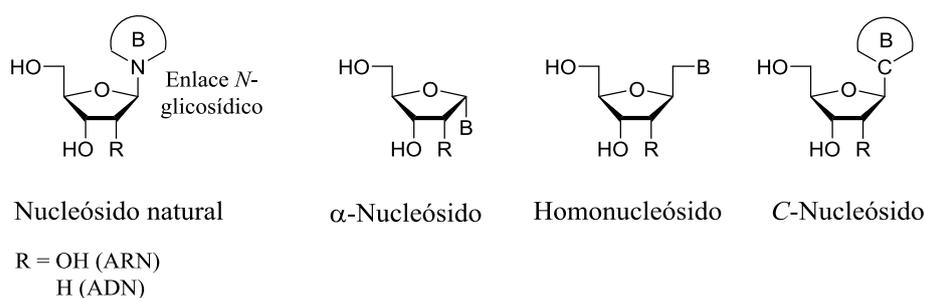


Figura 23. Estructura de los nucleósidos naturales, α -nucleósidos, homonucleósidos y C-nucleósidos.

En la búsqueda de nuevos análogos con actividad farmacéutica la Química y la Biología trabajan de la mano. En el caso de los nucleósidos, la Química Orgánica ha servido para introducir modificaciones en el anillo de azúcar, en la base heterocíclica y/o en el enlace de unión entre

ambas unidades con el objetivo de mejorar las propiedades respecto a los nucleósidos naturales. Una vez obtenidos los análogos modificados, son evaluados en una serie de ensayos farmacológicos *in vitro* para analizar las actividades biológicas de los mismos, que, de resultar positivas, conducen a la selección de un compuesto final para su desarrollo a nivel de estudios clínicos.

1. α -Nucleósidos

Los anómeros α son muy poco frecuentes en la naturaleza. La primera evidencia de uno de ellos se remonta a 1955, cuando Kaplan *et al.*¹¹⁰ descubrieron un derivado α en el dinucleótido de adenina y nicotinamida (NAD). Solo se han encontrado unos cuantos ejemplos más de α -derivados naturales en bacterias¹¹¹ o vitaminas.¹¹²

En los últimos años, la síntesis de α -derivados ha atraído la atención de los investigadores debido a sus propiedades únicas e interesantes tanto de α -nucleósidos como de α -oligonucleótidos. Teniendo en cuenta la degradación enzimática celular, un punto importante a tener en cuenta en el diseño de fármacos, los α -nucleósidos son más estables que los β -nucleósidos naturales. Diversos estudios han demostrado que los isómeros α poseen una mayor estabilidad frente a desaminasas,¹¹³ nucleosidasas¹¹⁴ o nucleasas,¹¹⁵ entre otras. Además, el apareamiento de

¹¹⁰ N. O. Kaplan, M. M. Ciotti, F. E. Stolzenbach, N. R. Bachur. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, 77, 815-816.

¹¹¹ a) S. Suzuki, K. Suzuki, T. Imai, N. Suzuki, S. Okuda. *J. Biol. Chem.* **1965**, 240, 554-556; b) F. Dinglinger and P. Renz. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1971**, 352, 1157-1161.

¹¹² R. Bonnett. *Chem. Rev.* **1963**, 63, 573-605.

¹¹³ J. J. Fox, M. Hoffer, I. Wempfen, N. C. Yung. *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, 83, 4066-4070.

¹¹⁴ A. Hatano, A. Harano, Y. Takigawa, Y. Naramoto, K. Toda, Y. Nakagomi, H. Yamada. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16, 3866-3870.

los oligonucleótidos en la formación de los dúplex se produce de una forma especial. Mientras las cadenas de α o β -oligonucleótidos se aparean de forma antiparalela siguiendo el modelo de Watson-Crick, los dúplex híbridos α - β lo hacen de manera paralela.¹¹⁶ Se ha observado que los oligonucleótidos que alternan residuos α y β en su estructura forman dúplex con una temperatura de fusión menor que el correspondiente ADN nativo debido a zonas de apareamiento paralelo y antiparalelo en la misma molécula.¹¹⁷ En relación a las propiedades bioquímicas, también hay diferencias de toxicidad,¹¹⁸ selectividad¹¹⁹ o efecto inhibitorio¹²⁰ entre los anómeros β y α que hacen a estos últimos atractivos en la búsqueda de nuevos fármacos.

1.1. Síntesis de α -nucleósidos

En cuanto a la preparación de α -derivados, los primeros anómeros α se obtuvieron como subproductos de reacciones en las que se pretendía optimizar los métodos de obtención de los isómeros β . La mayoría de las síntesis consisten en una condensación entre un azúcar activado y un precursor de la base heterocíclica, o en reacciones que involucran azúcares derivados de oxazolina que se transforman en diferentes etapas en la base nitrogenada correspondiente (síntesis *de novo*). También

¹¹⁵ N. T. Thuong, U. Asseline, V. Roig, M. Takasugi, C. Helene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1987**, *84*, 5129-5133.

¹¹⁶ a) J. S. Sun, U. Asseline, D. Rouzard, T. Montenay-Garestier, N. T. Thuong, C. Helene. *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 6149-6158; b) D. Praseuth, L. Perrouault, T. L. Doan, M. Chassignol, N. Thuong, C. Helene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1988**, *85*, 1349-1353.

¹¹⁷ a) M. Koga, A. Wilk, M. F. Moore, C. L. Scremin, L. Zhou, S. L. Beaucage. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 1520-1530; b) M. W. Germann, J. M. Aramini, B. W. Kalisch, R. T. Pon, J. H. Van de Sande. *Nucleosides Nucleotides* **1997**, *16*, 1481-1485.

¹¹⁸ E. M. Acton, R. N. Goerner, H. S. Uh, K. J. Ryan, D. W. Henry, C. E. Cass, G. A. Lepage. *J. Med. Chem.* **1979**, *22*, 518-525.

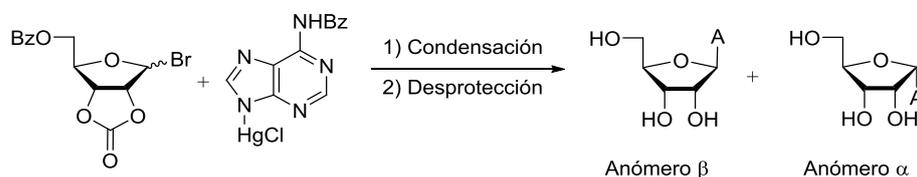
¹¹⁹ M. Bretner, T. Kulikowski, J. M. Dzik, M. Balinska, W. Rode, D. Shugar. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 3611-3617.

¹²⁰ I. Van Daele, H. Munier-Lehmann, M. Froeyen, J. Balzarini, S. Van Calenbergh. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 5281-5292.

Antecedentes -----

existen ejemplos de reacciones de transglicosilación en las que los isómeros β se transforman en los α .¹²¹

El primer nucleósido α sintético fue obtenido por Wright *et al.*¹²² en 1958 mediante una condensación entre bromuro de 5-*O*-benzoil-D-ribofuranosa-2,3-carbonato y cloruro de (6-benzamido-9*H*-purin-9-il)mercurio(II), que tras una etapa de desprotección da lugar a la α - y β -adenosina con bajo rendimiento (Esquema 3). De una forma similar, otros autores han preparado α -desoxiadenosina¹²³ y α -desoxicitidina.¹²⁴ Sin embargo, el descubrimiento de la toxicidad de los iones de mercurio en las funciones biológicas¹²⁵ hizo plantearse nuevos procedimientos para la obtención de estos isómeros.



Esquema 3. Condensación mediante el método del mercurio.

En esta búsqueda, Nishimura *et al.*¹²⁶ aislaron los anómeros α de timina y uracilo como subproductos de una reacción de Hilbert-Johnson cuyos sustratos de partida son un haloazúcar electrófilo y una base heterocíclica sililada. Siguiendo esta estrategia sintética, pero partiendo

¹²¹ a) V. W. Armstrong, J. K. Dattagupta, F. Eckstein, W. Saenger. *Nucleic Acids Res.* **1976**, 3, 1791-1810; b) T. Yamaguchi, M. Saneyoshi. *Chem. Pharm. Bull.* **1984**, 32, 1441-1450; c) Y. Sato, G. Tateno, K. Seio, M. Sekine. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 3251-3254.

¹²² R. S. Wright, G. M. Tener, H. G. Khorana. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, 80, 2004-2006.

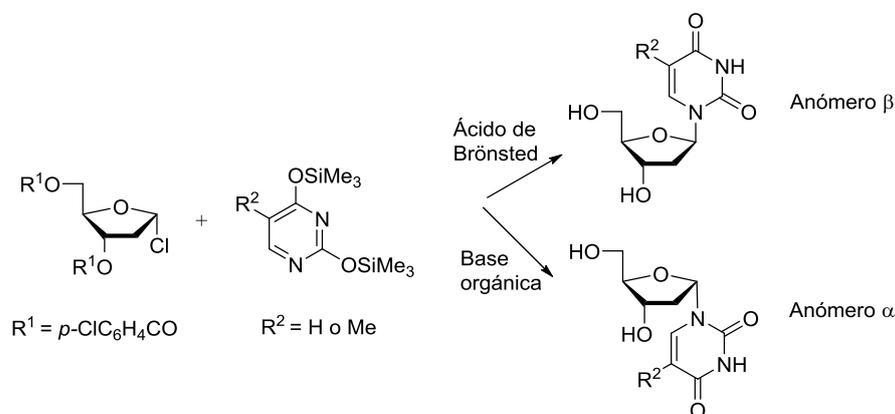
¹²³ R. K. Ness, H. G. Fletcher. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, 82, 3434-3437.

¹²⁴ J. J. Fox, M. Hoffer, I. Wempfen, N. C. Yung. *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, 83, 4066-4070.

¹²⁵ J. J. K. Novak, F. Sorm. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1962**, 27, 902-905.

¹²⁶ T. Nishimura, B. Shimizu, I. Iwai. *Chem. Pharm. Bull.* **1964**, 12, 1471-1478.

del haloazúcar con isomería α , Aoyama¹²⁷ realizó una síntesis estereoselectiva (Esquema 4). Observó que cuando la condensación ocurre en presencia de un ácido de Brönsted se obtiene el isómero β , mientras que si la condensación ocurre en presencia de una base orgánica se obtiene el isómero α , en ambos casos, con altos rendimientos.



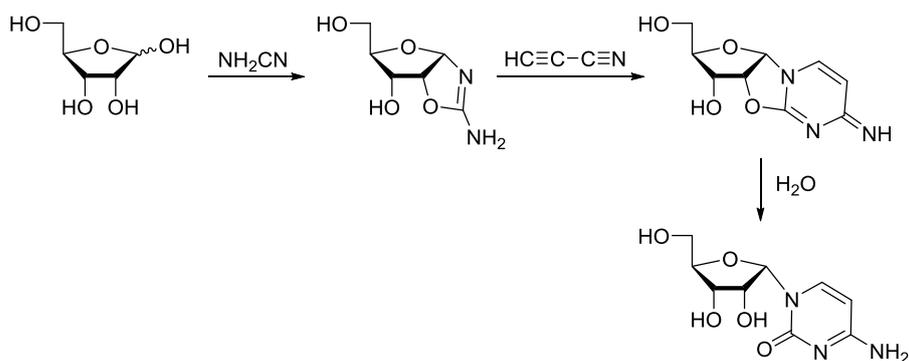
Esquema 4. Síntesis estereoselectiva mediante la reacción de Hilbert-Johnson.

Otras rutas estereoselectivas encontradas en la bibliografía para la obtención de α -ribonucleósidos consisten en síntesis *de novo*, donde un azúcar derivado de oxazolina se va transformando en diferentes etapas en la base heterocíclica.¹²⁸ En el Esquema 5 se muestra la síntesis de α -citidina, en la que se hace reaccionar D-ribosa con cianamida para dar el correspondiente derivado de aminooxazolina. Un tratamiento posterior con cianoacetileno da lugar a la $O^{2,2'}$ -anhidrocitidina, cuya hidrólisis final proporciona la α -citidina.

¹²⁷ H. Aoyama. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1987**, 60, 2073-2077.

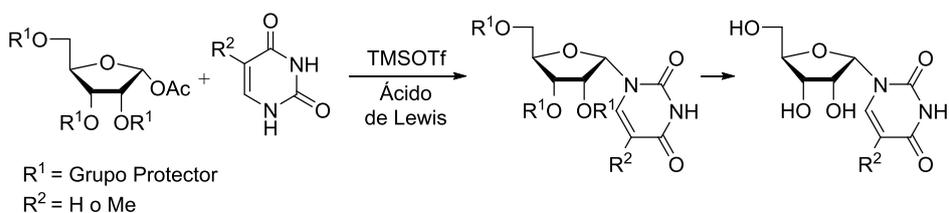
¹²⁸ a) R. A. Sanchez, L. E. Orgel. *J. Mol. Biol.* **1970**, 47, 531-543; b) G. Gosselin, M. C. Bergogne, J. L. Imbach. *Nucleosides Nucleotides* **1990**, 9, 81-87.

Antecedentes -----



Esquema 5. Síntesis de α -citidina.

También se ha utilizado como método sintético de α -nucleósidos la clásica glicosilación de Vorbrüggen (Esquema 6), una extensión de la reacción de Hilbert-Johnson para la preparación de *N*-glucósidos mediante la reacción de un azúcar acetilado y una base heterocíclica sililada en presencia de un ácido de Lewis.¹²⁹

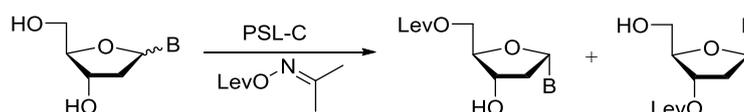


Esquema 6. Glicosilación de Vorbrüggen.

García *et al.*¹³⁰ describen un protocolo para la síntesis y separación de α -2'-desoxinucleósidos 3' y/o 5' protegidos mediante un proceso regioselectivo de acilación/hidrólisis catalizado por enzimas. A través de una acilación regioselectiva catalizada por la lipasa de *Pseudomonas cepacia* (PSL-C) se separan mezclas de α/β -nucleósidos difíciles de aislar por otras técnicas (Esquema 7).

¹²⁹ a) S. Janardhanam, K. P. Nambiar. *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 3657-3660; b) Z. W. Wang, C. J. Rizzo, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 8177-8180.

¹³⁰ J. Garcia, A. Diaz-Rodriguez, S. Fernandez, Y. S. Sanghvi, M. Ferrero, V. Gotor. *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 9765-9771.



Esquema 7. Separación de anómeros α/β catalizada por PSL-C.

2. 1'-Homonucleósidos

Los análogos de nucleósido denominados 1'-homonucleósidos son un grupo de derivados en los que la unión entre el carbono anomérico del azúcar y la base heterocíclica no se produce directamente a través de un enlace glicosídico sino mediante un puente metileno.

Comparando los 1'-homonucleósidos con los nucleósidos naturales, la introducción del puente metileno afecta tanto a las propiedades estructurales como a las propiedades biológicas.¹³¹ Estructuralmente, la separación entre el grupo hidroxilo primario de la posición 5' y el átomo de nitrógeno de la base (N-1 o N-9) que forma el enlace glicosídico será mayor, lo cual supondrá menores interacciones estéricas y electrónicas entre la base y el azúcar y, con ello, mayor libertad de rotación y un ligero aumento de su lipofilicidad. En cuanto a las propiedades biológicas, estos análogos son sustratos de las quinasas celulares y pueden ser incorporados a las dobles cadenas oligonucleotídicas formando pares de Watson-Crick.¹³² La inserción de 1'-homonucleósidos en la doble cadena y el emparejamiento de las bases complementarias conlleva una ligera reubicación del azúcar en el espacio, posible por la mayor flexibilidad que otorga la unidad CH₂-Base. En ocasiones esto

¹³¹ A. E. Wróblewski, I. E. Glowacka, D. G. Piotrowska. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *118*, 121-142.

¹³² a) J. H. Boal, A. Wilk, C. L. Scremin, G. N. Gray, L. R. Phillips, S. L. Beaucage. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 8617-8626; b) N. Hossain, C. Hendrix, E. Lescrinier, A. Van Aerschot, R. Busson, E. De Clercq, P. A. Herdewijn. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 1465-1468.

Antecedentes -----

confiere una mayor estabilidad respecto a los fragmentos de ADN formados por nucleósidos naturales. Por otra parte, debido a la ausencia del enlace *N*-glicosídico natural, estos análogos son más estables frente a la actividad hidrolítica de las nucleasas.

Además de los homonucleósidos con anillos de ribosa o desoxirribosa, se han sintetizado y estudiado homo-derivados introduciendo distintas modificaciones en el anillo del azúcar (Figura 24). La sustitución del oxígeno por nitrógeno, 1'-homoazanucleósidos,¹³³ o azufre¹³⁴ no proporciona compuestos activos. Sin embargo, cambios en el azúcar que dan lugar a compuestos carbocíclicos¹³⁵ han resultado en derivados con una actividad interesante como anticancerígenos o antivirales.¹³⁶

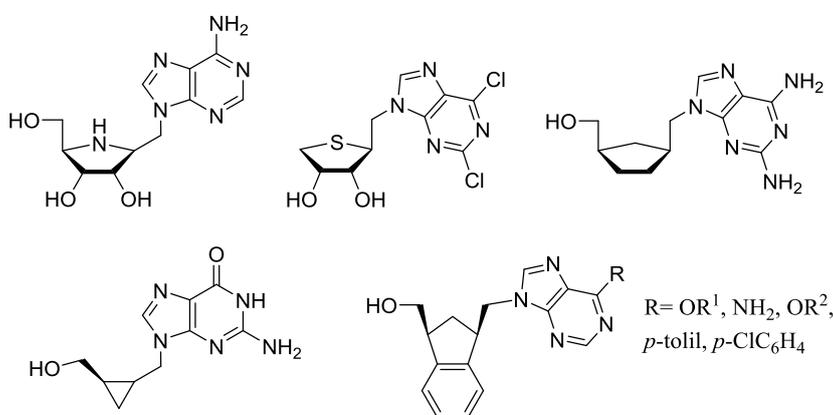


Figura 24. Estructura de homonucleósidos.

¹³³ a) A. Rinaldo-Matthis, C. Wing, M. Ghanem, H. Deng, P. Wu, P. C. Tyler, G. B. Evans, R. H. Furneaux, S. C. Almo, C. C. Wang, et al. *Biochemistry* **2007**, *46*, 659-668; b) J. Gotkowska, J. Balzarini, D.G. Piotrowska. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 7097-7100.

¹³⁴ H. W. Lee, H. O. Kim, W. J. Choi, S. Choi, J. H. Lee, S. Park, L. Loo, K. A. Jacobson, L. S. Jeong. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 7015-7021.

¹³⁵ M. C. Balo, F. Fernandez, E. Lens, C. Lopez. *Nucleosides Nucleotides* **1996**, *15*, 1335-1346.

¹³⁶ C. I. Tanase, C. Draghici, A. Hanganu, L. Pintilie, M. Maganu, A. Volobueva, E. Sinegubova, V. V. Zarubaev, J. Neyts, D. Jochmans, et al. *Molecules*, **2019**, *24*, 2446-2466.

En la actualidad, están comercializados o en fase de estudio distintos análogos de nucleósidos que presentan en su estructura ausencia del enlace *N*-glicosídico. En la Figura 25 se muestran tres fármacos aprobados para el tratamiento de enfermedades víricas:¹³⁷ dos homonucleósidos con azúcar acíclico, cidofovir (VIH) y fumarato de disoproxilo de tenofovir (VIH y VHB); y un carbanucleósido, abacavir (VIH). Además se incluye otro carbanucleósido, pevonedistat,¹³⁸ que se está estudiando como agente anticancerígeno.

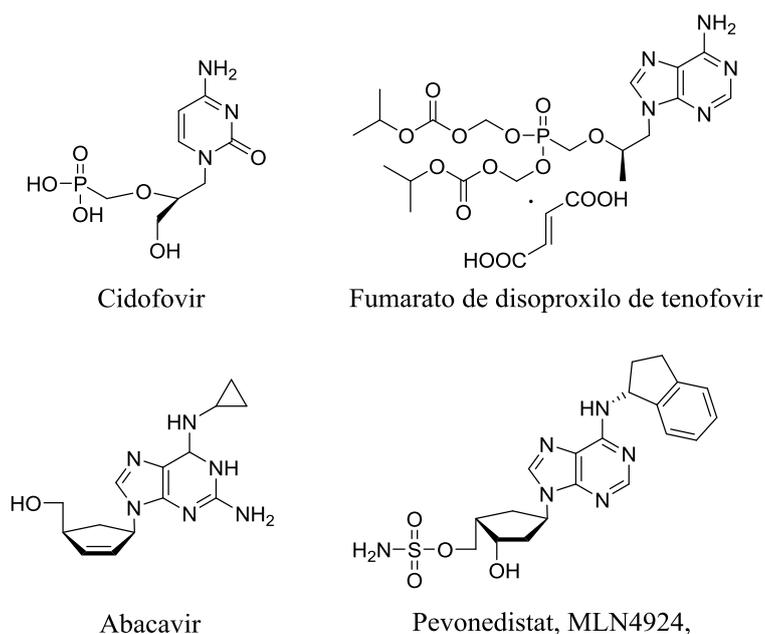


Figura 25. Análogos de nucleósido antivirales y antitumorales sin enlace *N*-glicosídico.

2.1. Síntesis de 1'-homo-*N*-nucleósidos

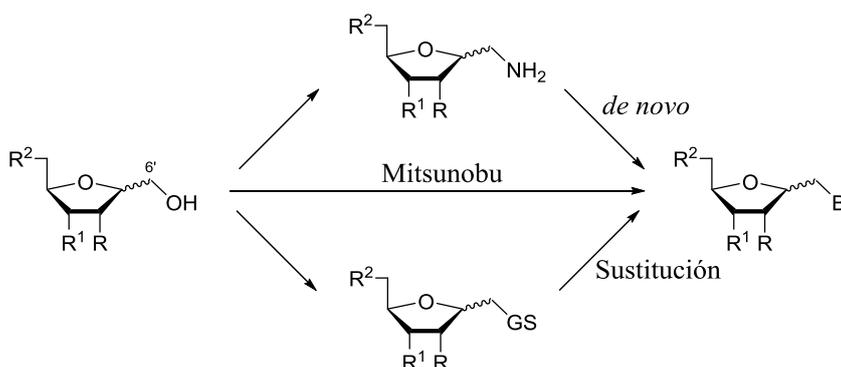
En la preparación de estos análogos se han empleado principalmente tres métodos sintéticos que parten de un derivado con un grupo 1'-

¹³⁷ S. Mahmoud, S. Hasabelnaby, S. F. Hammad, T. M. Sakr. *J. Adv. Pharm. Res.* **2018**, 2, 73-88.

¹³⁸ R. T. Swords, S. Coutre, M. B. Maris, J. F. Zeidner, J. M. Foran, J. Cruz, H. P. Erba, J. G. Berdeja, T. Wayne, S. Vardhanabhuti, et al. *Blood* **2018**, 131, 1415-1424.

Antecedentes -----

hidroximetilo (Esquema 8).¹³⁹ Por un lado, mediante una síntesis *de novo*, construyendo la base por reacciones de condensación a partir de un derivado de pentanofuranosil metilamino. Por otro lado, a través de una única transformación mediante una reacción de Mitsunobu,¹⁴⁰ donde la sustitución del alcohol primario por la base heterocíclica proporciona el derivado deseado. Y por último, mediante una sustitución nucleofílica en el carbono 6' exocíclico activado con un buen grupo saliente (GS).



Esquema 8. Tres métodos de preparación de 1'-homo-*N*-nucleósidos.

Utilizando estos procedimientos, y como se comentará a continuación, se han descrito en la bibliografía tanto las síntesis de α como de β 1'-homo-*N*-ribonucleósidos. Sin embargo, el número de ejemplos disponibles de 1'-homo-*N*-2'-desoxinucleósidos es bastante menor.

2.1.1. Síntesis de 1'-homo-*N*-ribonucleósidos

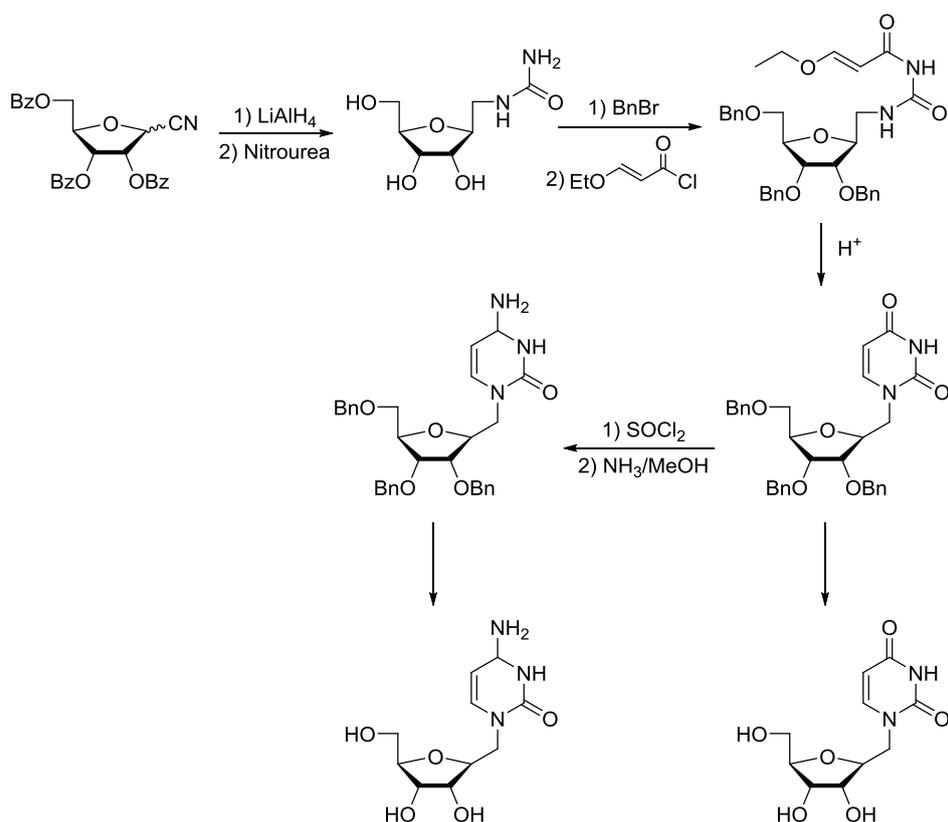
Una de las primeras síntesis de compuestos homo-pirimidínicos es la descrita por Bobek y Farkas,¹⁴¹ basada en una síntesis *de novo* (Esquema 9). El sustrato de partida de este método es el cianuro de 2,3,5-tri-*O*-benzoil-D-ribosilo, que tras una primera reducción con LiAlH_4 y una

¹³⁹ C. Lamberth. *Org. Prep. Proced. Int.* **2002**, *34*, 149-167.

¹⁴⁰ K. C. K. Swamy, N. N. B. Kumar, E. Balaraman, K. V. P. P. Kumar. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2551-2651.

¹⁴¹ M. Bobek, J. Farkas. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1969**, *34*, 1684-1689.

segunda etapa con nitrourea proporciona el derivado correspondiente. Una elongación posterior de la cadena nitrogenada, previa protección de los grupos hidroxilo, y un tratamiento ácido da lugar al cierre del anillo y a la formación del derivado de 1'-homo-*N*-uridina. Este derivado puede transformarse en la 1'-homo-*N*-citidina en un proceso de dos etapas, con una primera transformación del carbonilo C-4 con SOCl₂ seguido de un segundo tratamiento con NH₃ en MeOH.



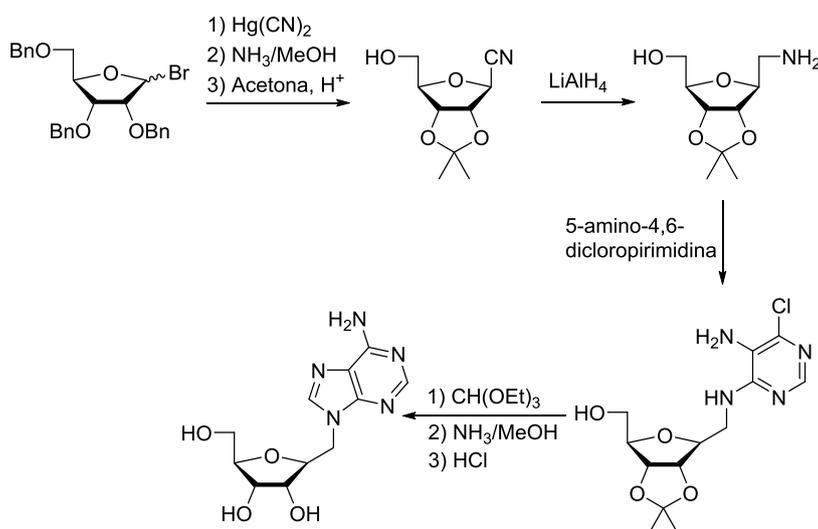
Esquema 9. Síntesis de nucleósidos homo-ribopirimidínicos.

Para la 1'-homo-*N*-adenosina una de las primeras síntesis es la descrita por Montgomery *et al.*,¹⁴² basada también en una síntesis *de novo* (Esquema 10) y con algunos intermedios similares al procedimiento

¹⁴² J. A. Montgomery, K. Hewson. *J. Heterocycl. Chem.* **1970**, 7, 443-445.

Antecedentes -----

anterior. El sustrato de partida es el bromuro de 2,3,5-tri-*O*-bencil-D-ribosilo, que se trata con cianuro de mercurio para sustituir el halógeno por el nitrilo en β . El tratamiento con NH_3 en MeOH desprotege los alcoholes y, posteriormente, se protegen los hidroxilos en las posiciones 2' y 3' en forma de acetal cíclico. A continuación, se reduce el grupo nitrilo a amino, se hace reaccionar con 5-amino-4,6-dicloropirimidina y se construye la base de adenina.



Esquema 10. Síntesis *de novo* de 1'-homo-*N*- β -adenosina.

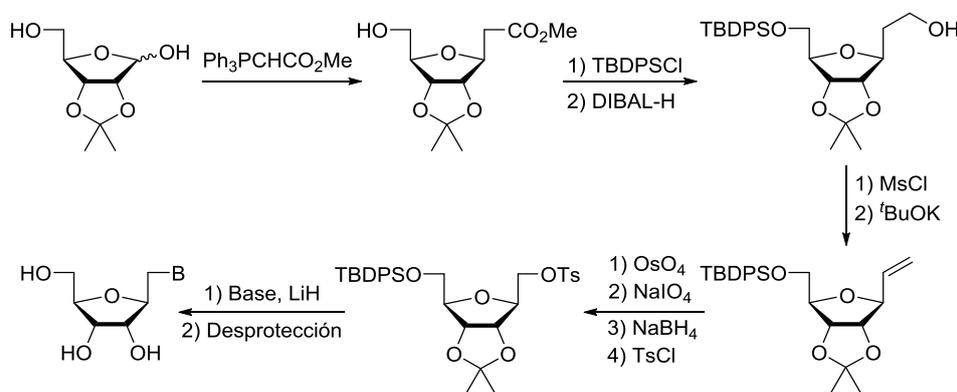
En la bibliografía se describe la síntesis de 1'-homo-*N*- α -nucleósidos realizada por Winkley.¹⁴³ Se basa en los métodos anteriores, pero con la introducción de una separación cromatográfica de la mezcla de epímeros resultante tras la reducción con LiAlH_4 que permite el acceso a los isómeros α tanto de bases púricas como pirimidínicas.

Otra estrategia explorada involucra una especie con el carbono 6' exocíclico activado con un buen grupo saliente. Angiebeaud *et al.*¹⁴⁴ han

¹⁴³ M. W. Winkley. *Carbohydr. Res.* **1973**, *31*, 245-254.

¹⁴⁴ P. Angiebeaud, J. Defaye, H. Franconie. *Carbohydr. Res.* **1980**, *78*, 195-204.

preparado varios derivados 1'-homo-*N*- α -nucleósidos a partir del correspondiente intermedio tosilado. Más recientemente, Pryde *et al.*¹⁴⁵ han descrito un método general basado también en la sustitución del tosilato con una base heterocíclica (Esquema 11). En el producto de partida se introduce una cadena carbonada en la posición 1' mediante una olefinación de Wittig con un cierre estereoespecífico del anillo de tetrahidrofurano.¹⁴⁶ La protección posterior del grupo hidroxilo y una reducción del éster de metilo proporcionan el alcohol primario correspondiente. La transformación del alcohol en mesilato, seguida de eliminación, da lugar a un alqueno terminal. Esta olefina, tras una oxidación, en la que se produce la eliminación del carbono extra introducido, y una reducción posterior, conduce al análogo de homorribosa, que tras la activación como tosilato y el desplazamiento del mismo con la base heterocíclica da lugar a los homo-derivados.



Esquema 11. Obtención de 1'-homonucleósidos a través de la activación de C-6'.

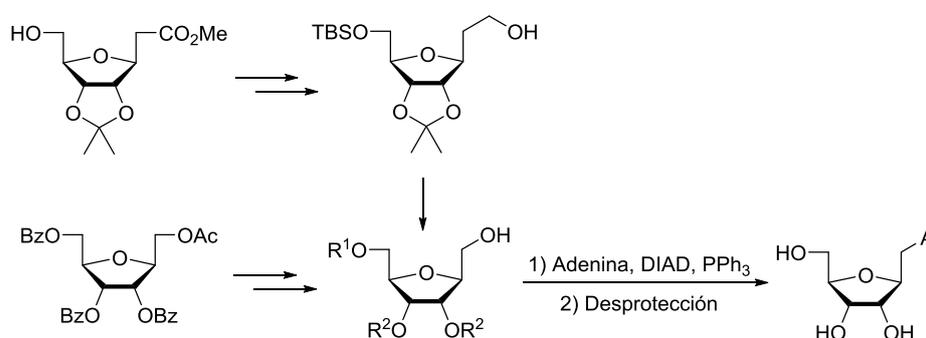
De la misma manera, se ha empleado la reacción de Mitsunobu para la síntesis de estos derivados de nucleósidos. Un ejemplo es el que se indica

¹⁴⁵ D. C. Pryde, D. S. Middleton, P. T. Stephenson, P. Wainwright, A. Maddaford, X. Zhang, D. Leese, R. Glen, J. Hart, N. Forrest, T. Guyot. *Tetrahedron Lett.* **2011**, 52, 6415-6419.

¹⁴⁶ H. Ohri, G. H. Jones, J. G. Moffatt, L. M. Maddox, A. T. Christensen, S. K. Byram, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, 97, 4602-4613.

Antecedentes -----

en el Esquema 12 para la síntesis de 1'-homo-*N*-β-adenosina.¹⁴⁷ El sustrato de partida adecuado se transforma en el correspondiente alcohol derivado de homorribosa para, a continuación, introducir la adenina en las condiciones de Mitsunobu.



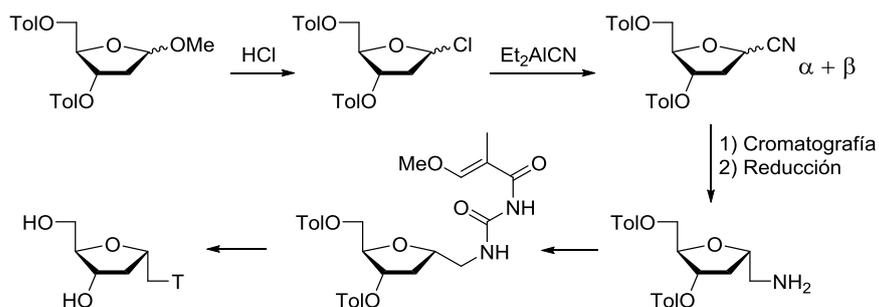
Esquema 12. Síntesis de 1'-homo-*N*-β-adenosina mediante una reacción de Mitsunobu.

2.1.2. Síntesis de 1'-homo-*N*-2'-desoxinucleósidos

Como se ha comentado anteriormente, en la bibliografía solo se han descrito unos cuantos ejemplos de síntesis de 1'-homo-*N*-2'-desoxinucleósidos, siendo la propuesta de Boal *et al.* (Esquema 13)¹⁴⁸ la única existente para anómeros α y solamente realizada para la timina. Este procedimiento consiste en una síntesis *de novo* en la que el sustrato de partida es transformado en la mezcla α/β del cianoazúcar correspondiente, que se separa por columna cromatográfica, seguido de la reducción de cada uno de los anómeros a amina. Finalmente, tras la formación del derivado de acilurea y su ciclación, se obtienen los isómeros 1'-homo-*N*-2'-desoxi-α-timidina y 1'-homo-*N*-2'-desoxi-β-timidina.

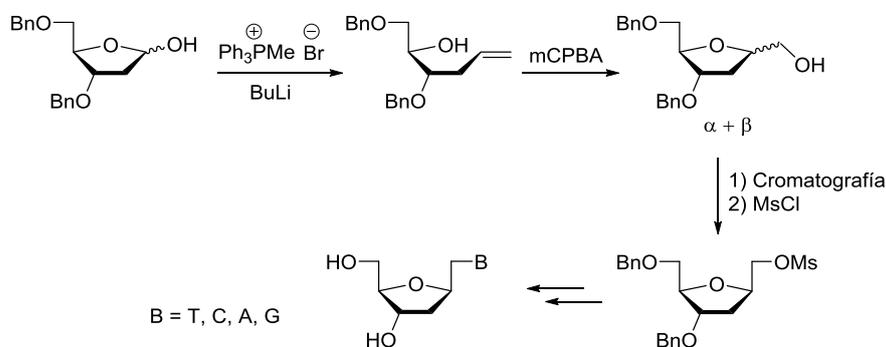
¹⁴⁷a) J. Lee, S. U. Kang, S. Y. Kim, S. E. Kim, M. K. Kang, Y. J. Jo, S. Kim. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 961-964; b) H. W. Lee, W. J. Choi, K. A. Jacobson, L. S. Jeong, *Bull. Korean Chem. Soc.* **2011**, *32*, 1620-1624.

¹⁴⁸ 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 13. Síntesis *de novo* de 1'-homo-N-2'-desoxi- α -timidina.

Como ocurría con los 1'-homorribonucleósidos, para los derivados de 2'-desoxirribosa también se ha aplicado la estrategia de introducir la nucleobase por desplazamiento de un grupo saliente en el metilo exocíclico en C-1' del azúcar (Esquema 14).¹⁴⁹ Partiendo de un derivado de 2'-desoxi-D-ribosa, se incorpora la unidad metilénica por una reacción de Wittig que proporciona la olefina resultante de la apertura del anillo. A continuación, una epoxidación con ácido *m*-cloroperbenzoico conduce a la formación del derivado 1'-hidroximetil como una mezcla α/β . Tras una separación cromatográfica, el anómero β se transforma en mesilato para el posterior desplazamiento con la base nitrogenada (T, C, A y G) y una última etapa de desprotección.

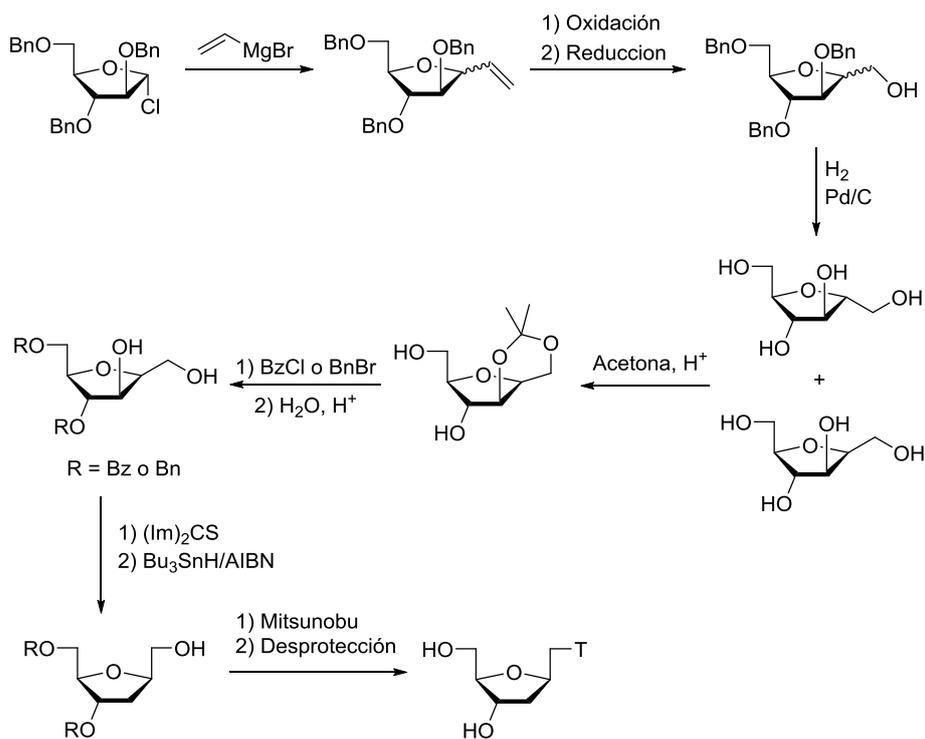


Esquema 14

¹⁴⁹ N. Hossain, N. Blaton, O. Peeters, J. Rozenski, P. Herdewijn. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 5563-5578.

Antecedentes -----

Asimismo, Doboszewski¹⁵⁰ ha utilizado las condiciones de Mitsunobu para la obtención de 1'-homo-*N*-2'-desoxi- β -timidina. El sustrato de partida de esta síntesis es un derivado de D-arabinofuranosa que se transforma en el derivado 2'-desoxi-1'-hidroximetil, como se muestra en el Esquema 15. A continuación, este compuesto reacciona con la timina en las condiciones de Mitsunobu. Cabe destacar la etapa regioselectiva de formación del acetal cíclico que permite separar los isómeros α y β .



Esquema 15

¹⁵⁰ a) B. Doboszewski. *Nucleosides Nucleotides* **1997**, *16*, 1049-1052; b) B. Doboszewski. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2009**, *28*, 875-901.

3. Consideraciones generales de ensayos biológicos *in vitro*

3.1. Ensayo de actividad antiviral

Como se ha puesto de manifiesto en la introducción, los nucleósidos y nucleótidos constituyen un amplio grupo de compuestos antivirales. El objetivo actual en el diseño de fármacos antivirales es inhibir dianas esenciales para la replicación del virus. Por ello, y también debido a la amplia variedad de virus, existen multitud de ensayos *in vitro* enfocados a los distintos estadios del ciclo vírico. Un grupo importante son los métodos que evalúan las polimerasas, enzimas esenciales en la replicación de todos los virus.¹⁵¹ Se dispone de numerosos kits comerciales para la cuantificación de productos tanto de las ADN como de las ARN polimerasas, incluyendo la transcriptasa inversa. La PCR cuantitativa a tiempo real es el método preferido para monitorizar la actividad de las ADN polimerasas en presencia de inhibidores y la *Reverse transcriptase* PCR (RT-PCR) cuantitativa a tiempo real se ha convertido en el método estándar en el análisis de inhibidores de la ARN polimerasa vírica.

3.2. Ensayo MTT de citotoxicidad

La citotoxicidad es una alteración de las funciones celulares básicas que dirige a un daño que puede ser detectado. Diferentes autores han desarrollado baterías de pruebas *in vitro* para predecir los efectos tóxicos de compuestos químicos utilizando distintas líneas celulares. Uno de los ensayos clásicos de citotoxicidad es el de reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT).

¹⁵¹ M. Rumlova, T. Ruml. *Biotechnol. Adv.* **2018**, *36*, 557-576.

Antecedentes -----

Se trata de un método colorimétrico rápido basado en la formación de un compuesto coloreado por una reacción que tiene lugar en las mitocondrias.¹⁵² El MTT (color amarillo) es captado por las células viables y reducido a formazan (color morado) por la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial. El formazan es insoluble y queda retenido en las células, pero puede ser liberado por solubilización y cuantificarse mediante un método colorimétrico que permite conocer la cantidad de MTT reducido.

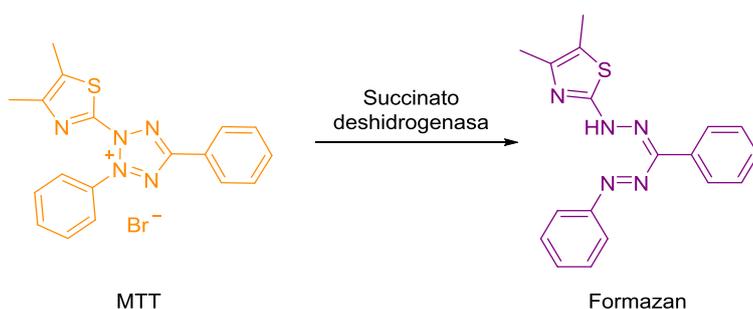


Figura 26

La actividad funcional de las mitocondrias es una medida de la viabilidad celular, por ello, la capacidad de las células para reducir MTT después de su exposición a un compuesto proporciona información sobre la toxicidad de la molécula evaluada.

¹⁵² a) T. Mosmann. *J. Immunol. Methods* **1983**, 65, 55-63; b) L. M. Green, J. L. Reade, C. F. Ware. *J. Immunol. Methods* **1984**, 70, 257-268; c) D. Gerlier. *J. Immunol. Methods* **1986**, 94, 57-63.

Objetivos

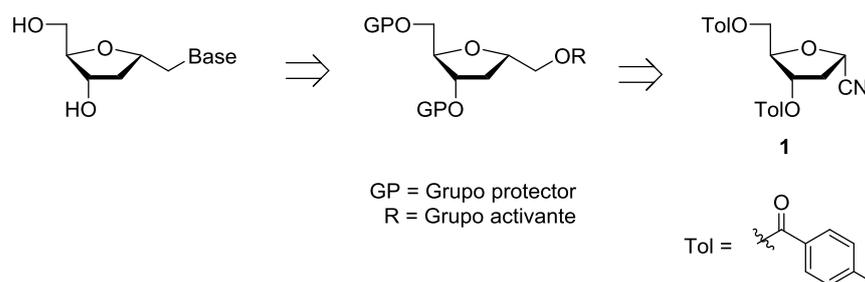
Nuestro interés por el diseño y la síntesis de nuevos análogos de nucleósido, nos ha llevado a plantearnos la síntesis de 1'-homo-*N*-2'-desoxi- α -nucleósidos, unos análogos muy poco estudiados y que incorporan dos modificaciones en una sola molécula.

Como ha quedado patente en los antecedentes, aunque se han descrito distintas rutas para la preparación de α y β 1'-homo-*N*-ribonucleosidos, se conocen escasos ejemplos relacionados con los 1'-homo-*N*-2'-desoxinucleósidos. En concreto, para anómeros α , únicamente se ha descrito la síntesis con una nucleobase, la timina. Por esta razón, nuestro objetivo es diseñar una ruta sintética que sea sencilla y accesible para la preparación de distintos 1'-homo-*N*-2'-desoxi- α -nucleósidos con bases heterocíclicas tanto púricas como pirimidínicas.

Teniendo en cuenta el potencial biológico de estos análogos, el estudio se completará con la evaluación como antivirales de los derivados sintetizados, así como el estudio de su citotoxicidad.

Resultados y discusión

En este capítulo se muestra la primera ruta sintética general que permite preparar 1'-homo-*N*-2'-desoxi- α -nucleósidos, basada en la introducción de las bases heterocíclicas mediante una sustitución nucleofílica de un alcohol activado presente en el grupo metilo exocíclico situado en C-1' del anillo de pentofuranosa (Esquema 16). Como material de partida se utiliza el α -cianoazúcar **1**, un intermedio de accesibilidad comercial que se prepara de forma eficiente a partir de 2'-desoxirribosa¹⁵³ y que presenta un carbono exocíclico (C-6') y la isomería adecuada para el objetivo deseado.



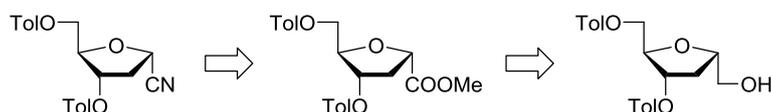
Esquema 16. Análisis retrosintético.

¹⁵³ a) K. Utimoto, Y. Wakabayashi, T. Horiie, M. Inoue, Y. Shishiyama, M. Obayashi, H. Nozaki. *Tetrahedron* **1983**, 39, 967-973; b) J. Kawakami, Z.-M. Wang, H. Fujiki, S. Izumi, N. Sugimoto. *Chem. Lett.* **2004**, 33, 1554-1555.

1. Síntesis de 1'-homo-*N*-nucleósidos

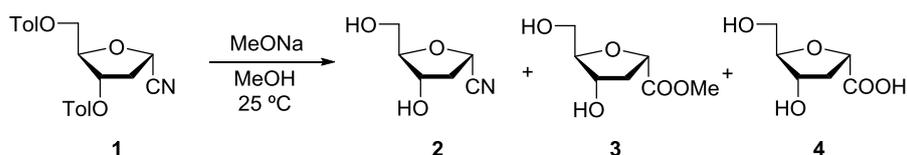
1.1. Síntesis del derivado de desoxirribosa con C-6' activado

Aprovechando la protección de los grupos hidroxilo con toluilo (Tol) en el sustrato de partida, se plantea la transformación del grupo ciano en alcohol (Esquema 17).



Esquema 17

Utilizando las condiciones básicas descritas previamente en otras síntesis de nucleósidos,¹⁵⁴ el compuesto **1** (Esquema 18) se trata con MeONa/MeOH a temperatura ambiente, dando como resultado una mezcla de tres compuestos, todos ellos con los grupos hidroxilo desprotegidos.

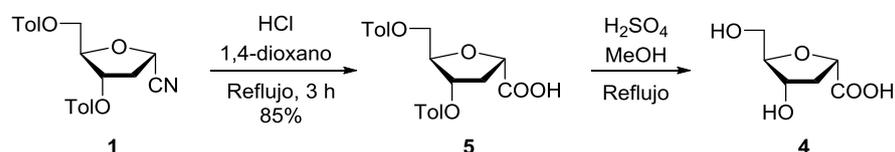


Esquema 18

Para evitar la formación de subproductos y la desprotección de los grupos hidroxilo, se plantea como alternativa una hidrólisis en medio ácido, aunque esto suponga una etapa adicional de esterificación (Esquema 19). Para ello, se hace reaccionar **1** con HCl en 1,4-dioxano a

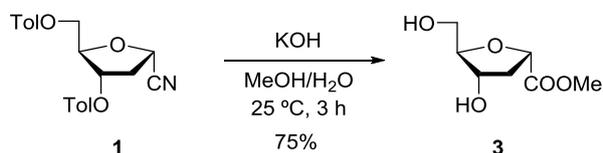
¹⁵⁴ a) Y. Kitamura, K. Edayoshi, Y. Kitade. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 6987-6989; b) Q. Dang, Z. Zhang, Y. Bai, R. Sun, J. Yin, T. Chen, S. Bogen, V. Girijavallabhan, D. B. Olsen, P. T. Meinke. *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 5576-5579.

reflujo¹⁵⁵ y tras 3 h se obtiene el ácido correspondiente con un 85% de rendimiento. A continuación, el compuesto **5** se somete a una esterificación en las condiciones estándar, ácido sulfúrico en metanol. Sin embargo, no se obtiene el éster deseado, sino que tiene lugar la desprotección de los grupos hidroxilo, generándose el dihidroxiácido **4**.



Esquema 19

A la vista de los resultados obtenidos, se decide utilizar otro grupo protector debido a la labilidad del grupo toluilo en las condiciones ácidas o básicas necesarias para la hidrólisis del grupo ciano. Así, en las condiciones descritas por Beauce y col.,¹⁵⁶ el nitrilo **1** se convierte en el éster de metilo **3** por tratamiento con KOH en MeOH/H₂O con un rendimiento aislado de un 75% (Esquema 20). Es un protocolo eficiente comparado con los métodos recogidos en la bibliografía para el isómero β¹⁵⁷ y teniendo en cuenta que en una única etapa se producen tres transformaciones: desprotección de los grupos toluilo, hidrólisis del grupo ciano y esterificación *in situ*.



Esquema 20

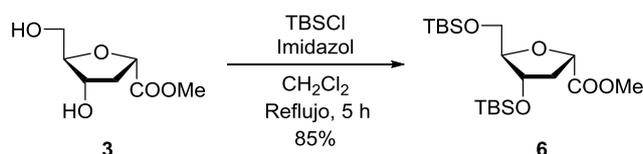
¹⁵⁵ M. Duca, V. Malnuit, F. Barbault, R. Benhida. *Chem. Commun.* **2010**, 46, 6162-6164.

¹⁵⁶ C. L. Scremin, J. H. Boal, A. Wilk, L. R. Phillips, S. L. Beaucage. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, 6, 207-212.

¹⁵⁷ T. H. Smith, M. A. Kent, S. Muthini, S. J. Boone, P. S. Nelson, *Nucleosides Nucleotides*, **1996**, 15, 1581-1594.

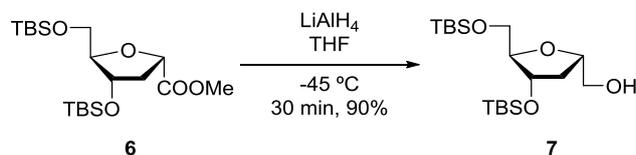
Resultados y discusión -----

A continuación, se protegen los hidroxilos con un grupo protector menos lábil que el toluilo; para ello, se elige un éter de silicio, cuya desprotección precisa de una fuente de fluoruros (Esquema 21). Las condiciones para esta protección son cloruro de *tert*-butildimetilsililo (TBSCl) en presencia de imidazol y diclorometano como disolvente y, tras 5 h de reacción a reflujo, se obtiene el compuesto **6** con un 85% de rendimiento.



Esquema 21

La siguiente etapa es la reducción del éster a alcohol (Esquema 22). Se utiliza LiAlH_4 como agente reductor en THF como disolvente y tras 30 min de reacción a $-45\text{ }^\circ\text{C}$ se obtiene el derivado **7** con un 90% de rendimiento. El control de la temperatura es un punto clave para esta transformación, ya que temperaturas superiores conducen a la desprotección de los grupos sililo.



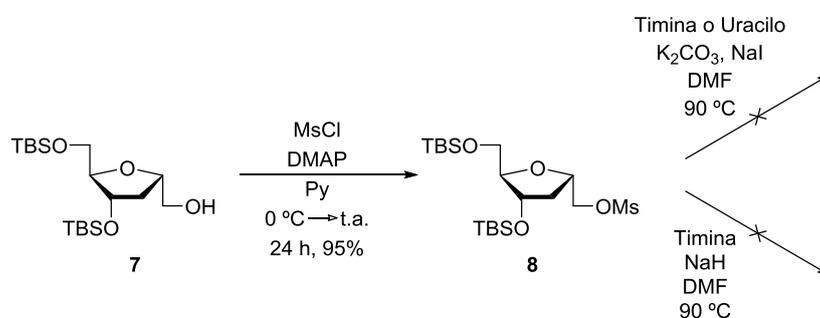
Esquema 22

1.2. Síntesis de 1'-homo-*N*-nucleósidos con las distintas bases nitrogenadas

Una vez que se ha transformado el α -cianoazúcar de partida en el correspondiente alcohol protegido **7**, se procede a acoplar la base heterocíclica en la posición C-6'.

1.2.1. Mesilato

En primer lugar, se activa el alcohol, formando un mesilato en esa posición mediante reacción con cloruro de mesilo (MsCl) y 4-dimetilaminopiridina (DMAP) catalítico en piridina, aislándose **8** con un rendimiento casi cuantitativo tras 24 h (Esquema 23).

**Esquema 23**

Para el acoplamiento de la base nitrogenada se utilizan las condiciones de Saladino y col.¹⁵⁸ para la síntesis de β -homonucleósidos de timina y uracilo. Así, se hace reaccionar el mesilato **8** con carbonato potásico, yoduro de sodio y timina o uracilo en DMF a 90 °C. Sin embargo, no se observa el producto de acoplamiento.

Se decide sustituir el carbonato potásico por una base más fuerte como el NaH, condiciones que fueron empleadas por otros autores¹⁵⁹ con isómeros β para el mismo fin. Sin embargo, en nuestro caso, tampoco se obtuvieron los compuestos esperados.

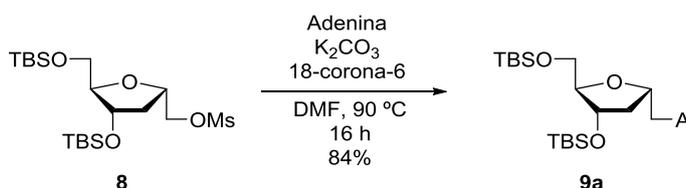
En vista de estos resultados, se añade un éter corona al medio de reacción. Estas moléculas son poliéteres cíclicos que actúan como bases

¹⁵⁸ R. Saladino, V. Neri, P. Checconi, I. Celestino, L. Nencioni, A. T. Palamara, M. Crucianelli. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 2392-2404.

¹⁵⁹ N. R. Swamy, N. Suryakiran, P. P. Naidu, Y. Venkatesvarlu. *Carbohydr. Res.* **2012**, *352*, 191-196.

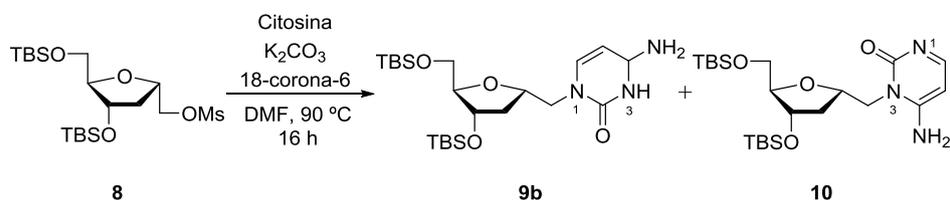
Resultados y discusión -----

de Lewis, complejando fuertemente iones metálicos en función de la afinidad de tamaño entre el hueco y el ion. El éter corona más empleado es el 18-corona-6, cuya cavidad es perfecta para complejar iones K^+ , y es el que se utilizará en combinación con K_2CO_3 (Esquema 24). El tratamiento del derivado **8** con K_2CO_3 , 18-corona-6 y adenina en DMF a $90\text{ }^\circ\text{C}$ da lugar al homonucleósido deseado **9a** con un 84% de rendimiento tras la cromatografía de columna.



Esquema 24

Puesto que estas condiciones han permitido el acoplamiento buscado, se extienden a otras bases heterocíclicas para la obtención de otros 1'-homo-*N*-2'-desoxi- α -nucleósidos (Esquema 25). Cuando la base nitrogenada es citosina, la reacción con el mesilato **8** origina una mezcla de dos productos: además del compuesto deseado **9b** (rendimiento 20%), donde la citosina se acopla al azúcar a través de N-1, se obtiene **10**, resultado del acoplamiento a través de N-3.



Esquema 25

Las estructuras de los dos derivados han sido determinadas por experimentos bidimensionales de RMN homonucleares (COSY) y heteronucleares (HSQC, HMBC). Así, en el experimento ^{13}C - ^1H HMBC

de **9b** (Figura 27) se observa un pico de cruce entre el protón H₆ de la base y el carbono metilénico (C_{6'}). Este pico no existe para el compuesto **10** (Figura 28), ya que ambas posiciones se encuentran a una distancia de cinco enlaces.

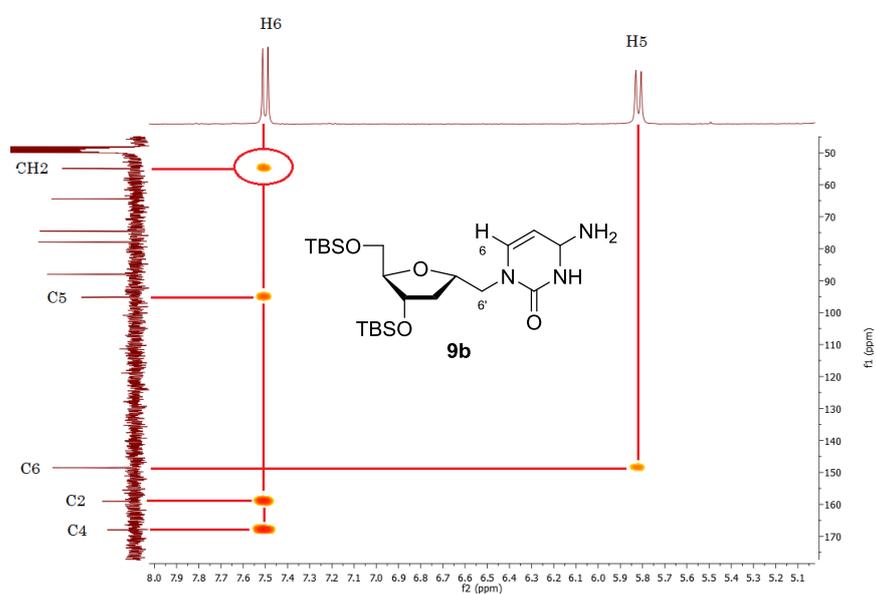


Figura 27. Ampliación del espectro de HMBC del compuesto **9b** donde se observa el pico de cruce que permite distinguirlo del compuesto **10**.

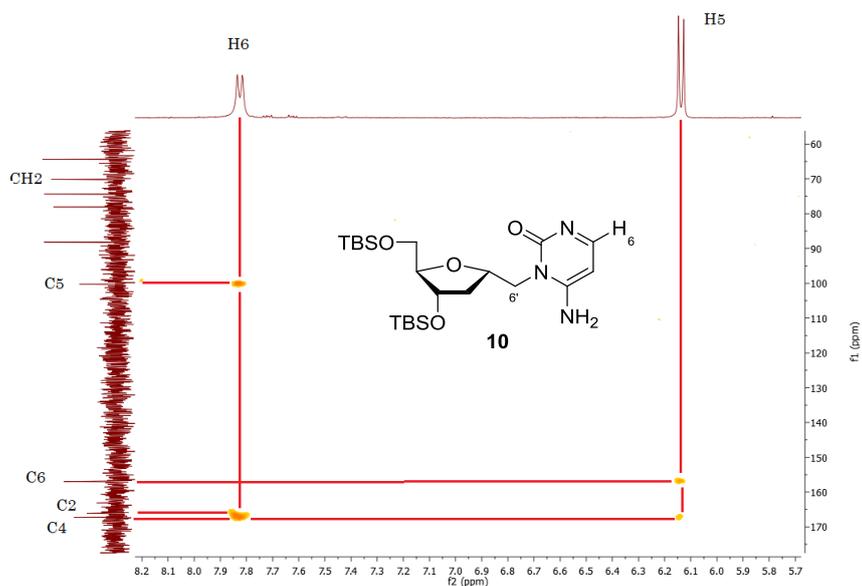
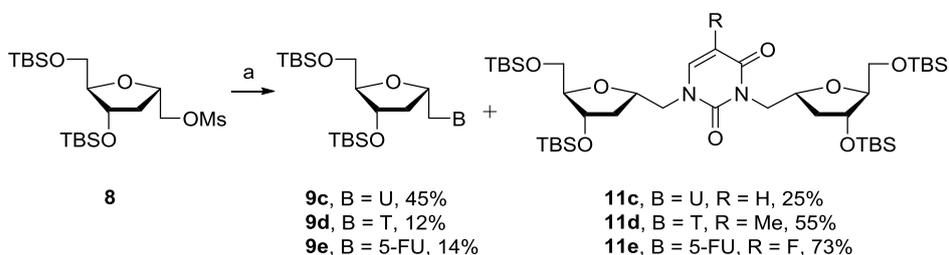


Figura 28. Ampliación del espectro de HMBC del compuesto **10**.

Resultados y discusión -----

La síntesis de 1'-homo-*N*-2'-desoxi- α -uridina también resulta complicada debido a la formación de dos compuestos (Esquema 26): el derivado de uracilo deseado **9c**, que se aísla con un 45% de rendimiento, y un segundo compuesto, que se caracteriza como el dímero **11c**, resultante del acoplamiento de dos anillos de desoxirribosa en las posiciones N-1 y N-3 de una molécula de uracilo. Ligeras modificaciones en las condiciones de reacción no mejoran los resultados; de hecho, la disminución de la temperatura a 70 °C conduce únicamente a la formación del dímero.

El mismo resultado se observa cuando el acoplamiento de **8** se lleva a cabo con otra base pirimidínica, la timina. Se obtiene tanto el homonucleósido deseado **9d** como el dímero **11d**, con rendimientos de 12% y 55%, respectivamente. Una situación similar sucede cuando la base es 5-fluorouracilo, el análogo deseado **9e** se obtiene con un 14% de rendimiento, siendo el dímero **11e** el producto mayoritario de la reacción con un 73% de rendimiento. En la bibliografía solo se recogen dos ejemplos de este tipo de dímeros: Prystas y Sorm¹⁶⁰ describen la formación del derivado de *N*¹,*N*³-dirribofuranosil como un subproducto de la ribosilación de 6-metil-4-metoxi-2(1*H*)-pirimidinona, y Zhang y col.¹⁶¹ aíslan un derivado similar durante la síntesis de isonucleósidos.



Esquema 26. a) Base (U, T, 5-FU), K₂CO₃, 18-corona-6, DMF, 90 °C, 16 h.

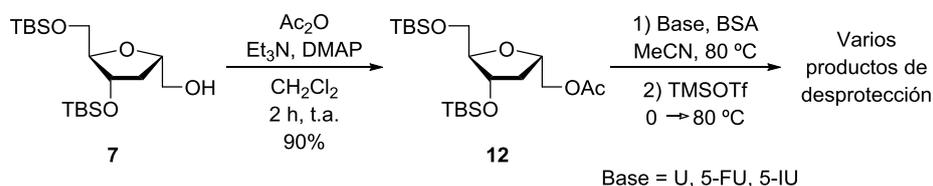
¹⁶⁰ M. Prystas, F. Sorm, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **1969**, *34*, 2316-2347.

¹⁶¹ Z. J. Yang, H. W. Yu, J. M. Min, L. T. Ma, L. H. Zhang, *Tetrahedron Asymmetry*, **1997**, *8*, 2739-2747.

1.2.2. Acetato

En un intento por mejorar el rendimiento de los α -homonucleósidos con bases pirimidínicas, se han probado otras estrategias. Las condiciones de glicosilación de Vorbrüggen han sido ampliamente utilizadas en la síntesis de nucleósidos. Esta reacción consiste en el tratamiento de un azúcar acetilado y una base heterocíclica sililada en presencia de un ácido de Lewis.

La primera etapa implica la formación de un acetato, de manera que se hace reaccionar el alcohol **7** con anhídrido acético (Ac_2O) en presencia de Et_3N , DMAP y CH_2Cl_2 como disolvente. Tras 2 h de reacción a temperatura ambiente, se obtiene el acetato **12** con un 90% de rendimiento (Esquema 27). A continuación, este acetato se hace reaccionar con la base nitrogenada (uracilo, 5-fluorouracilo o 5-iodouracilo) y el agente de sililación, *N,O*-bis(trimetilsilil)acetamida (BSA), a 80 °C, y después, con trimetilsilil trifluorometanosulfonato (TMSOTf) a 0 °C hasta alcanzar 80 °C. En estas condiciones no se obtiene el producto de acoplamiento deseado sino varios compuestos resultado de la desprotección de los éteres de silicio.



Esquema 27

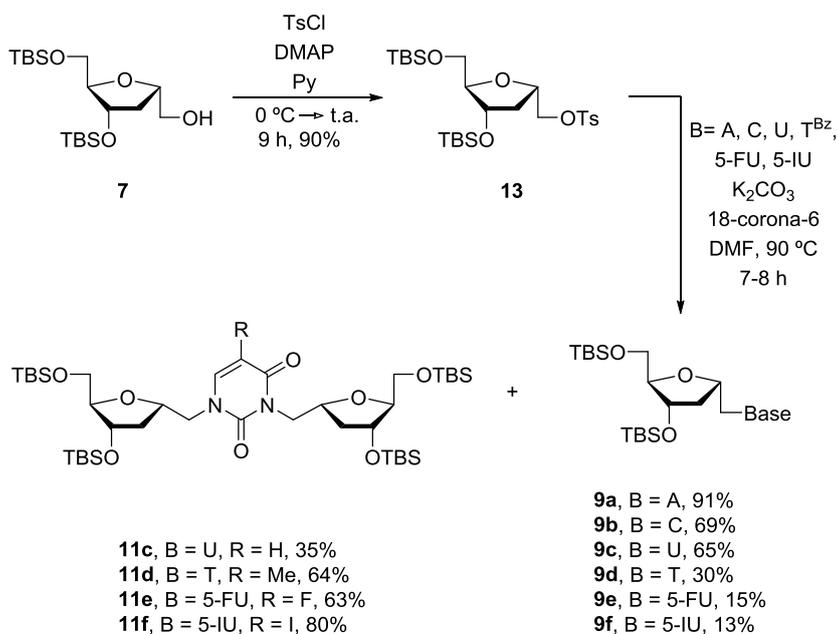
Tampoco se incrementa el rendimiento de la reacción cuando se introduce la base nucleosídica mediante la reacción de Mitsunobu.

1.2.3. Tosilato

Teniendo en cuenta que las distintas alternativas de acoplamiento no han proporcionado mejores resultados que el protocolo que transcurre a través del intermedio mesilado, con el objetivo de mejorar la eficiencia del acoplamiento y los rendimientos, se decide reemplazar el mesilo por otro grupo saliente, el tosilo.

El alcohol **7** se trata con cloruro de tosilo (TsCl) y DMAP en piridina a 0 °C y se deja reaccionar durante 9 h a temperatura ambiente, aislándose el derivado tosilado **13** con un 90% de rendimiento (Esquema 28).

A continuación, se lleva a cabo la reacción de acoplamiento entre el derivado **13** y la correspondiente base nitrogenada, utilizando las mismas condiciones que con el mesilato: K₂CO₃, 18-corona-6 y DMF a 90 °C.



Esquema 28. Síntesis de los derivados **9** por el método del tosilato.

La reacción entre **13** y la adenina da lugar al producto acoplado **9a** con un 91% de rendimiento. Como se puede apreciar, se ha mejorado ligeramente el rendimiento respecto al método del mesilato, obteniéndose en esta ocasión rendimientos excelentes.

Cuando el proceso se realiza con citosina como base, se consigue mejorar considerablemente los resultados, aislándose el derivado **9b** con un 69% de rendimiento frente al 20% obtenido anteriormente. Con esta base heterocíclica, al igual que ocurría con el intermedio mesilato, existe competencia entre la formación de **9b** y el isómero **10** en el que el acoplamiento es a través de N-3, aunque con el tosilato la presencia del subproducto es menor.

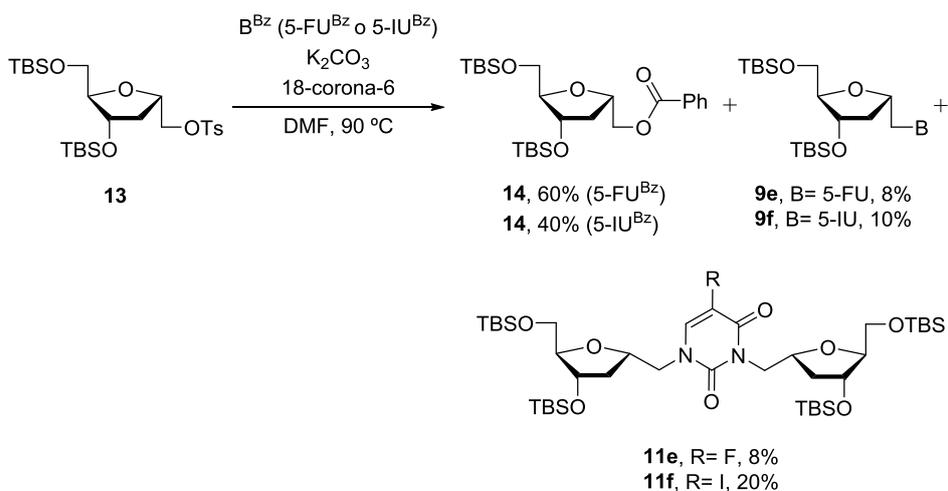
En el caso del acoplamiento del uracilo, también se observa un aumento del rendimiento, con un 65% en comparación con el 45% conseguido a través del mesilato **8**. Sin embargo, no se logra evitar la formación del dímero **11c**.

El acoplamiento del derivado tosilado **13** con timina proporciona únicamente el dímero **11d**, por lo que se decide proteger la posición N-3 de la timina. Para ello, se sigue el procedimiento descrito por Ludek y Meier¹⁶² y la timina se trata con cloruro de benzoilo en acetonitrilo-piridina. La reacción del derivado **13** con *N*³-benzoiltimina, bajo las condiciones anteriores, da lugar al compuesto **9d**, que presenta la base desprotegida, con un 30% de rendimiento. Inesperadamente, el producto mayoritario de la reacción sigue siendo el dímero **11d**, que se obtiene con un 64% de rendimiento. Estos resultados nos llevan a pensar que la timina benzoilada se desprotege en las condiciones de acoplamiento. A pesar de ello, se ha mejorado considerablemente la formación del α -homonucleósido **9d** cuando se protege la posición N-3 de la timina.

¹⁶² O. R. Ludek, C. Meier, *Eur. J. Org. Chem.*, **2006**, 941-946.

Resultados y discusión -----

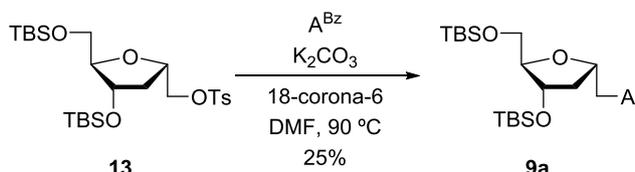
Asimismo, se ha realizado el acoplamiento de 5-fluorouracilo y 5-iodouracilo con el derivado **13**. En ambos casos, se obtiene el dímero como producto mayoritario, aunque los homonucleósidos **9e** y **9f** se aíslan con un 15% y un 13% de rendimiento, respectivamente. Para estas dos bases, la protección de la posición N-3 con benzoílo¹⁶³ no proporciona una mejora de los resultados, ya que se obtienen mezclas de tres compuestos (Esquema 29): el dímero, el compuesto de acoplamiento con la base desprotegida y el azúcar con el grupo benzoílo incorporado. Con estos resultados se puede confirmar que el grupo benzoílo se desprotege en las condiciones de reacción utilizadas.



Esquema 29

Con el objetivo de conocer qué sucede cuando se utiliza la base protegida, se han realizado pruebas adicionales con adenina benzoilada (Esquema 30). El compuesto acoplado con la base benzoilada no se obtiene y únicamente se aísla el compuesto **9a** con la base desprotegida con un 25% de rendimiento.

¹⁶³ a) N. M. Luckey, J. E. McCormick, R. S. McElhinney. *J. Chem. Soc. Perkin Trans I*, **1990**, 795-802; b) O. R. Ludek, C. Meier. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 4, 941-946.



Esquema 30

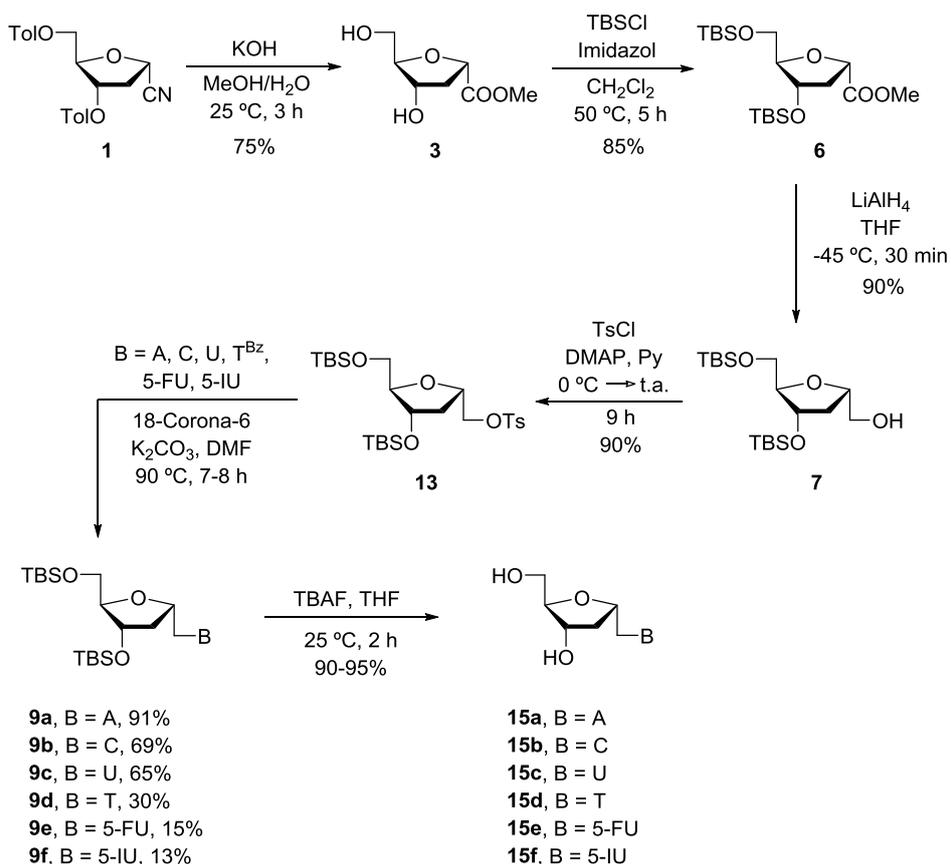
Además de los acoplamientos con las bases heterocíclicas A, C, U, T^{Bz}, 5-FU y 5-IU, también se han estudiado otras bases tales como guanina, 2,6-dicloropurina y 5-trifluorotimina. En ninguno de los casos se ha aislado el producto de acoplamiento en las condiciones anteriores ni haciendo variaciones de las mismas (tiempo, temperatura, etc.). Adicionalmente, en la base 5-trifluorotimina se ha llevado a cabo una protección de la posición N-3 con benzoílo con el objetivo de facilitar el ataque nucleofílico y el acoplamiento. Sin embargo, tampoco se observa evolución de la reacción. No obstante, sería interesante considerar reacciones de modificación de la base heterocíclica a partir del derivado 1'-homo-*N*-2'-desoxi- α -uridina que posibiliten la obtención de análogos cuyo acoplamiento no se ha producido o que permitan la preparación del derivado con un mejor rendimiento.¹⁶⁴

1.2.4. Desprotección de los grupos hidroxilo

Como etapa final para obtener los 1'-homo-*N*-2'-desoxi- α -nucleósidos se lleva a cabo la desprotección de los éteres de silicio en las posiciones 3' y 5'. El tratamiento de **9a-f** con fluoruro de tetrabutilamonio (TBAF) en THF a temperatura ambiente proporciona los homonucleósidos deseados **15a-f** con rendimientos de 90-95% para todas las bases nitrogenadas. En el Esquema 31 se resume el método sintético completo.

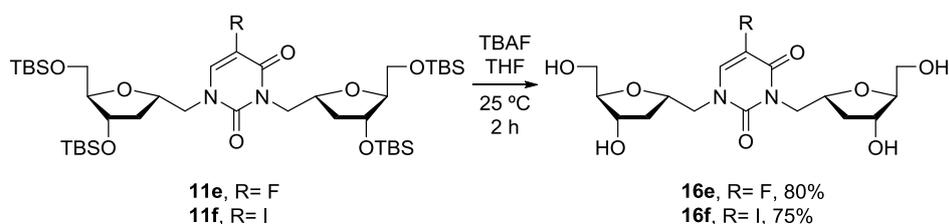
¹⁶⁴ a) W. W. Sy. *Synth. Commun.* **1990**, *20*, 3391-3394; b) Y. Ji, T. Brueckl, R. D. Baxter, Y. Fujiwara, I. B. Seiple, S. Su, D. G. Blackmond, P. S. Baran. *PNAS* **2011**, *108*, 14411-14415.

Resultados y discusión -----



Esquema 31

La obtención de los dímeros (**11c**, **11d**, **11e**, **11f**) es importante desde el punto de vista sintético, ya que en la bibliografía este tipo de compuestos solo se han obtenido como subproductos. Con el fin de estudiar la importancia de los mismos, se evaluará su actividad biológica. Para ello, se ha realizado la desililación de **11e** y **11f** con TBAF en THF, aisándose los derivados **16e** y **16f** con un 80% y 75% de rendimiento, respectivamente (Esquema 32).



Esquema 32

2. Cristalografía de rayos X

La estructura de los 1'-homo-*N*-2'-desoxi- α -nucleósidos sintetizados ha sido determinada mediante experimentos de RMN mono- y bidimensionales. Además, se ha confirmado por cristalografía de rayos X para el análogo de adenosina. La 1'-homo-*N*-2'-desoxi- α -adenosina ha cristalizado en forma de cristales pequeños incoloros y los datos de difracción del rayo X son los que se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Datos cristalográficos para 1'-homo-*N*-2'-desoxi- α -adenosina (**15a**).

Fórmula	C ₁₁ H ₁₅ N ₅ O ₃
Peso molecular	265.28
Sistema de cristal	Monoclínico
Grupo espaciador	<i>P</i> 2 ₁
<i>a</i> , Å	15.8711 (6)
<i>b</i> , Å	8.04111 (18)
<i>c</i> , Å	16.4342 (5)
<i>Z</i>	6
R Final	0.035
Reflexiones	4865

Resultados y discusión -----

La representación de Chimera,¹⁶⁵ un programa para la visualización interactiva de una estructura molecular, de la Figura 29 corresponde a la unidad asimétrica de los estudios de difracción de rayos X del compuesto **15a**. Es importante destacar que la conformación del azúcar es de tipo norte con configuraciones 2'-*exo* y 3'-*endo*. La estructura muestra tres moléculas por cada unidad asimétrica, unidas mediante enlaces de hidrógeno, lo que se traduce en seis moléculas por cristal.

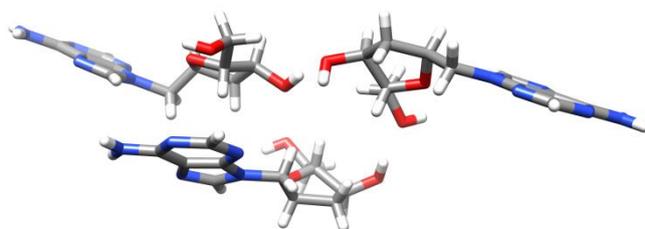


Figura 29. Estructura de rayos X de 1'-homo-N-2'-desoxi- α -adenosina (**15a**).

3. Evaluación biológica *in vitro*

3.1. Estudios de actividad antiviral frente al VIH

Los seis análogos sintetizados y dos de los dímeros obtenidos han sido evaluados frente al VIH, en concreto, contra el VIH-1 LAI, una de las primeras cepas aisladas de este virus y utilizada para estudios *in vitro*. La actividad se expresa como la concentración necesaria para inhibir la replicación del virus en un 50% (EC_{50}). Para ello, se han analizado los compuestos en células humanas mononucleares de sangre periférica (*peripheral blood mononuclear*, PBM) y se ha utilizado como control la 3'-azido-3'-desoxitimidina (AZT, zidovudina). Este control positivo ha exhibido la actividad esperada, con una EC_{50} de 0.006 μ M, mientras que

¹⁶⁵ Los gráficos y análisis moleculares se han realizado con el paquete UCSF Chimera (<http://www.rbvi.ucsf.edu/chimera>). Chimera se ha desarrollado por los Recursos de Biocomputación, Visualización e Informática de la Universidad de California, San Francisco (con el apoyo de NIGMS P41-GM103311).

ninguno de los seis homonucleósidos **15a-f** ni los dos dímeros analizados **16e** y **16f** han presentado actividad anti-VIH, obteniéndose para todos ellos valores de EC₅₀ superiores a 10 µM (Tabla 4).

Tabla 4. Resultados de actividad antiviral en valores de EC₅₀ en µM.

Compuesto	VIH-1	VHB
15a	> 10	> 10
15b	≥ 10	> 10
15c	> 10	> 10
15d	> 10	> 10
15e	> 10	> 10
15f	> 10	> 10
16e	> 10	> 10
16f	> 10	> 10
AZT	0.006	-
3TC	-	< 10 ^a

^a97% de inhibición a 10 µM.

3.2. Estudios de actividad antiviral frente al VHB

De la misma manera, estos seis análogos y los dos dímeros han sido sometidos a ensayos de actividad frente al VHB en células HepAD38,¹⁶⁶ una línea celular que replica el virus de la hepatitis B bajo condiciones que pueden ser reguladas por tetraciclina. Como control se ha empleado lamivudina (3TC) que presenta una EC₅₀ < 10 µM y un 97% de inhibición del ADN vírico para concentraciones de 10 µM. Ninguno de los ocho compuestos testados ha presentado actividad anti-VHB, obteniéndose valores de EC₅₀ superiores a 10 µM (Tabla 4).

¹⁶⁶ S. K. Ladner, M. J. Otto, C. S. Barker, K. Zaifert, G. H. Wang, J. T. Guo, C. Seeger, R. W. King. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **1997**, *41*, 1715-1720.

3.3. Estudios de citotoxicidad

La citotoxicidad de los ocho compuestos ha sido evaluada mediante el ensayo colorimétrico de MTT en cuatro líneas celulares: PBM humanas, CEM (un tipo de células T linfoblásticas), Vero (*African green monkey kidney*) y HepG2 (células hepáticas). Como control se ha utilizado cicloheximida, compuesto que inhibe la síntesis de proteínas en células eucariotas produciendo la consecuente toxicidad. Los resultados se muestran en la Tabla 5 y son dados en términos de IC₅₀ (μM), concentración de compuesto que inhibe la proliferación celular en un 50%. Todos ellos han mostrado valores IC₅₀ > 100 μM, lo que significa que son necesarias concentraciones superiores a este valor para producir toxicidad en la célula.

Tabla 5. Citotoxicidad de los homonucleósidos en valores de IC₅₀ en μM.

Compuesto	PBM	CEM	Vero	HepG2
15a	> 100	> 100	> 100	> 100
15b	> 100	> 100	> 100	> 100
15c	> 100	> 100	> 100	> 100
15d	> 100	> 100	> 100	> 100
15e	> 100	> 100	> 100	> 100
15f	> 100	> 100	> 100	> 100
16e	> 100	> 100	> 100	> 100
16f	> 100	> 100	> 100	> 100
AZT	> 100	-	-	-
3TC	> 100	> 100	> 100	> 100
Cicloheximida	0.6	0.08	0.5	0.8

Conclusiones

En este capítulo se ha descrito un proceso sintético para 1'-homo-*N*-2'-desoxi- α -nucleósidos con distintas bases nitrogenadas (A, C, U, T, 5-FU y 5-IU) a partir del acoplamiento entre la base heterocíclica y un precursor tosilado del azúcar. El sustrato de partida de esta ruta sintética es un α -cianoazúcar disponible comercialmente. La reacción de acoplamiento tiene lugar en presencia de K_2CO_3 y 18-corona-6 en DMF a 90 °C.

La estructura de todos los derivados ha sido establecida mediante un estudio exhaustivo de RMN con experimentos mono- y bidimensionales. Además, ha sido confirmada por cristalografía de rayos X tomando como modelo la 1'-homo-*N*-2'-desoxi- α -adenosina.

Esta metodología sintética constituye el único método general para la obtención de 1'-homo-*N*-2'-desoxi- α -nucleósidos hasta el momento, ya que en la bibliografía solo se ha descrito el derivado de timina a través de una ruta más compleja. Es importante destacar que, además de los análogos deseados, se han obtenido con alto rendimiento dímeros derivados de U, T, 5-FU y 5-IU por un acoplamiento de dos unidades del azúcar en las posiciones N-1 y N-3 de la base. Se conocen escasos ejemplos de estos dímeros y normalmente como subproductos.

Se ha evaluado la actividad como antivirales frente al VIH-1 y VHB de los seis α -homonucleósidos y dos de los dímeros, no exhibiendo ninguno de ellos actividad para estos virus. Sin embargo, cabe señalar que tampoco han presentado actividad citotóxica para las cuatro líneas celulares ensayadas.

Parte Experimental

1. Condiciones de trabajo, disolventes y reactivos

Las reacciones en atmósfera inerte se han realizado en tubos Schlenk, con agitación magnética y bajo atmósfera de argón.

El cianoazúcar de partida ha sido proporcionado por la empresa Rasayan Inc. (Encinitas, CA, EE.UU.). El resto de reactivos utilizados han sido adquiridos del grado de pureza necesario a Merck, Acros o Alfa Aesar y no han necesitado tratamiento previo a su utilización, excepto el TsCl y el BzCl.

- Purificación de TsCl: lavado con NaOH 1 N y posterior recristalización en AcOEt.
- Purificación de BzCl: destilación a presión reducida sin superar los 20 °C.

Los disolventes utilizados han sido suministrados por Merck, Prolabo y Panreac. Cuando se trabaja en condiciones anhidras se han sometido previamente a un tratamiento de secado y destilado bajo atmósfera inerte. Los agentes desecantes han sido los siguientes: CaH₂ para el CH₂Cl₂ y el CH₃CN, hilos de sodio para el THF y tolueno, con benzofenona como indicador, y NaOH para la piridina. La DMF se seca sobre óxido de bario y, posteriormente, se destila a presión reducida.

Las cromatografías en capa fina (*Thin Layer Chromatography*, TLC) se han realizado en placas de aluminio cubiertas con gel de sílice 60 Å de

Parte Experimental -----

0.25 mm de espesor y con un revelador de ultravioleta incorporado (F₂₅₄), comercializadas por Merck. Los reveladores utilizados han sido el de KMnO₄ (disolución acuosa de 1% de KMnO₄, 5% de K₂CO₃ y un 5% de NaOH) o nihidrina al 3% en etanol.

Para las cromatografías de columna se ha empleado gel de sílice 60 Å (230-400 mesh) comercializado por Merck. Como eluyentes se han utilizado 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) y heteronucleares (HMBC, HSQC) se han realizado en los equipos de Bruker DPX-300 y AV-300 (¹H 300.13 MHz y ¹³C 75.5 MHz). Se han usado 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, doblete; ddd, doblete de dobletes; t, triplete; dt, doblete triplete; q, cuatriplete; m, multiplete.

Los espectros de masas de alta resolución (EMAR) han sido realizados por la técnica de ionización de electrospray (ESI⁺) en un espectrómetro Bruker MicroTofQ.

Los espectros de infrarrojo (IR) se han adquirido en un espectrómetro Bruker Alpha FT-IR, 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} .

Los puntos de fusión se han medido en tubos capilares abiertos en un aparato Gallemkamp y no han sido corregidos.

El experimento de difracción de rayos X (RX) se ha realizado en un difractor de monocristal Xcalibur Nova, con una fuente de rayos X de tipo Nova (microfoco y óptica con radiación de cobre) y un detector tipo Onyx (165 mm).

3. Procedimientos experimentales

A continuación, se describe de forma detallada cada uno de los procedimientos utilizados en la preparación de los productos de este capítulo.

3.1. Síntesis del éster de metilo 3

Sobre una disolución del cianoazúcar comercial **1** (500 mg, 1.3 mmol) en MeOH (15 ml) a temperatura ambiente se añade 3.1 ml de una disolución 2.5 M KOH (25% MeOH/H₂O). El progreso de la reacción es monitorizado por TLC (10% MeOH/CH₂Cl₂) hasta conversión completa (3 h). A continuación, la mezcla de reacción se neutraliza con DOWEX 50WX8 hydrogen form (50-100 mesh). Tras eliminar la resina mediante filtración, la disolución se evapora a presión reducida y el residuo se purifica por cromatografía en columna (5% MeOH/CH₂Cl₂), obteniéndose el compuesto **3** con un 75% de rendimiento.

3.2. Protección con TBSCl. Síntesis de 6

Sobre una disolución del compuesto **3** (290 mg, 1.76 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (5.5 ml) se añade imidazol (560 mg, 8.8 mmol) y TBSCl

Parte Experimental -----

(1.24 g, 8.8 mmol). La mezcla de reacción se agita a reflujo durante 5 h. A continuación, se añade agua/hielo y se extrae con CH₂Cl₂. Las fases orgánicas se combinan, se secan (Na₂SO₄) y se evaporan a vacío. El residuo resultante es purificado en columna cromatográfica (10% AcOEt/Hexano), aislándose el compuesto **6** con un 85% de rendimiento.

3.3. Reducción con LiAlH₄. Síntesis de **7**

Sobre una disolución de **6** (450 mg, 1.11 mmol) en THF anhidro (7.4 ml) a -45 °C se añade LiAlH₄ (217 mg, 5.72 mmol) y la reacción se mantiene en agitación durante 30 min a la misma temperatura. A continuación, la mezcla es diluida con THF y el exceso de LiAlH₄ se destruye con MeOH. El residuo es filtrado en Celite[®] y purificado mediante columna cromatográfica (20% AcOEt/Hexano), obteniéndose el compuesto **7** con un 90% de rendimiento.

3.4. Protección con MsCl. Síntesis de **8**

Sobre una disolución de **7** (170 mg, 0.45 mmol) en piridina anhidra (0.80 ml) a 0 °C se añade MsCl (77 µl, 0.99 mmol) y DMAP (catalítico). La disolución se mantiene en agitación a temperatura ambiente durante 24 h. A continuación, se elimina el disolvente a presión reducida, el residuo se disuelve en agua y se extrae con Et₂O. Las fases orgánicas se combinan, se secan (Na₂SO₄) y se evaporan a vacío. El crudo resultante se purifica mediante columna cromatográfica (20% AcOEt/Hexano), obteniéndose el compuesto **8** con un 95% de rendimiento.

3.5. Acoplamiento de **13** con las nucleobases. Síntesis de **9** y **11**

Sobre una disolución del compuesto **13** en DMF anhidra (0.1 M) se añade K₂CO₃ (1.5 equiv para A, C, 5-FU y 5-IU; 1.2 equiv para U; y 2.1 equiv para T^{Bz}), 18-corona-6 (1.5 equiv) y la base nitrogenada (1.2 equiv para A, U, C y T^{Bz}; y 1.5 equiv para 5-FU y 5-IU). La mezcla se agita a

90 °C y el progreso de la reacción se monitoriza mediante TLC (5% MeOH/CH₂Cl₂) hasta conversión completa (7-8 h). Se eliminan los disolventes y el residuo resultante se purifica por cromatografía en columna (5% MeOH/CH₂Cl₂). A continuación, se detallan cantidades de reactivos y rendimientos según la base acoplada.

3.5.1. Acoplamiento con adenina. Síntesis de 9a

Compuesto **13** (28 mg, 0.05 mmol) en DMF (0.53 ml), K₂CO₃ (11 mg, 0.08 mmol), éter 18-corona-6 (21 mg, 0.08 mmol), adenina (9 mg, 0.06 mmol). Tras 8 h se obtiene el compuesto **9a** con un 91% de rendimiento.

3.5.2. Acoplamiento con citosina. Síntesis de 9b

Compuesto **13** (30 mg, 0.06 mmol) en DMF (0.6 ml), K₂CO₃ (12 mg, 0.09 mmol), éter 18-corona-6 (23 mg, 0.09 mmol), citosina (8 mg, 0.07 mmol). Tras 8 h se obtiene el compuesto **9b** con un 69% de rendimiento.

3.5.3. Acoplamiento con uracilo. Síntesis de 9c y 11c

Compuesto **13** (20 mg, 0.04 mmol) en DMF (0.40 ml), K₂CO₃ (6 mg, 0.05 mmol), éter 18-corona-6 (15 mg, 0.06 mmol), uracilo (5 mg, 0.05 mmol). Tras 7 h se obtiene los compuestos **9c** y **11c** con 65% y 35% de rendimiento, respectivamente.

3.5.4. Acoplamiento con timina (benzoilada). Síntesis de 9d y 11d

Compuesto **13** (54 mg, 0.10 mmol) en DMF (1.0 ml), K₂CO₃ (30 mg, 0.20 mmol), éter 18-corona-6 (40 mg, 0.15 mmol), N³-benzoiltimina (28 mg, 0.12 mmol). Tras 8 h se obtiene el compuesto **9d** con un 30% de rendimiento y el dímero **11d** con un 64% de rendimiento.

La benzoilación de la timina se lleva a cabo según el procedimiento descrito por Ludek y Meier.^{163b} Sobre una suspensión de timina (500 mg, 3.97 mmol) en CH₃CN anhidro (4 ml) a 0 °C, se añade piridina anhidra (1.6 ml, 19.85 mmol) y BzCl destilado (1.0 ml, 8.73 mmol) gota

Parte Experimental -----

a gota. La reacción se agita a temperatura ambiente durante 48 h. A continuación, se añade MeOH (0.1 ml/mmol BzCl) y se deja en agitación durante 1 h. Se eliminan los disolventes a vacío y el residuo se co-evapora 3 veces con tolueno. El crudo se purifica mediante cromatografía en columna (2% MeOH/CH₂Cl₂), obteniéndose la T^{Bz} con un 55% de rendimiento.

3.5.5. Acoplamiento con 5-fluorouracilo. Síntesis de 9e y 11e

Compuesto **13** (86 mg, 0.16 mmol) en DMF (1.6 ml), K₂CO₃ (33 mg, 0.24 mmol), éter 18-corona-6 (63 mg, 0.24 mmol), 5-fluorouracilo (31 mg, 0.24 mmol). Tras 8 h se obtienen los compuestos **9e** y **11e** con 15% y 63% de rendimiento, respectivamente.

3.5.6. Acoplamiento con 5-iodouracilo. Síntesis de 9f y 11f

Compuesto **13** (60 mg, 0.11 mmol) en DMF (1.1 ml), K₂CO₃ (23 mg, 0.17 mmol), éter 18-corona-6 (45 mg, 0.17 mmol), 5-iodouracilo (40 mg, 0.17 mmol). Tras 8 h se obtienen los compuestos **9f** (13% de rendimiento) y **11f** (80% de rendimiento).

3.6. Protección con Ac₂O. Síntesis de 12

Sobre una disolución de **7** (75 mg, 0.20 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (2 ml) a temperatura ambiente se adiciona Et₃N (84 µl, 0.60 mmol), Ac₂O (283 µl, 3.00 mmol) y DMAP (catalítico). La reacción se mantiene en agitación durante 2 h. Posteriormente, se evaporan los disolventes y el residuo se purifica por cromatografía en columna (10% AcOEt/Hexano), obteniéndose el compuesto **12** con un 90% de rendimiento.

3.7. Protección con TsCl. Síntesis de 13

Sobre una disolución de **7** (200 mg, 0.53 mmol) en piridina anhidra (1 ml) a 0 °C se añade TsCl (245 mg, 1.2 mmol) y DMAP (catalítico). La disolución se mantiene en agitación a temperatura ambiente durante 9 h.

A continuación, se añade HCl 1 M y se extrae con Et₂O. Las fases orgánicas se combinan, se secan con Na₂SO₄ y se evaporan a presión reducida. El residuo resultante se purifica mediante columna cromatográfica (20% AcOEt/Hexano), obteniéndose el compuesto **13** con un 90% de rendimiento.

3.8. Desprotección de los éteres de silicio. Síntesis de 15

Sobre una disolución en THF anhidro (0.1 M) del homonucleósido **9a-f** a 0 °C se añade TBAF (6 equiv, 1.0 M in THF) gota a gota. Tras 5 min, se elimina el baño de hielo y la reacción se mantiene en agitación a temperatura ambiente durante 2 h. A continuación, se eliminan los disolventes y el residuo se purifica por cromatografía en columna (gradiente de eluyente 15-20% MeOH/CH₂Cl₂ para **15a-d**; y gradiente de eluyente 5-20% MeOH/CH₂Cl₂ para **15e** y **15f**), aislándose los compuestos **15** con un 90-95% de rendimiento.

3.9. Desprotección de los éteres de silicio. Síntesis de 16

Se sigue el mismo procedimiento que para la síntesis de **15**, utilizando como sustrato de partida **11e,f**. El crudo se purifica por cromatografía en columna (20% MeOH/CH₂Cl₂), obteniéndose los dímeros **16e** y **16f** con 80% y 75% de rendimiento, respectivamente.

4. Ensayos biológicos *in vitro*

4.1. Ensayo frente al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)

Este ensayo se ha llevado a cabo siguiendo la metodología descrita en la bibliografía¹⁶⁷ con algunas modificaciones también reportadas.¹⁶⁸ De

¹⁶⁷ a) R. F. Schinazi, J.-P. Sommadossi, V. Saalman, D. L. Cannon, M.-W. Xie, G. C. Hart, G. A. Smith, E. F. Hahn. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1990**, *34*, 1061-1067; b)

Parte Experimental -----

forma breve, los nucleósidos sintetizados se han sometido a ensayos *in vitro* frente al VIH-1 (más común que el VIH-2) en células humanas de tipo PBM (*peripheral blood mononuclear cells*). Estas células se han estimulado con fitohemaglutinina (PHA) e interleucina-2 (IL-2) durante 2 días y después han sido infectadas con la cepa HIV-1 LAI (MOI 0.1). El cultivo se ha mantenido durante 6 días en presencia de AZT (control) o de los compuestos testados (**15a-f**, **16e** y **16f**) en distintas concentraciones y por triplicado. Tras ese tiempo, las células PBM se han separado del sobrenadante por centrifugación, esos sobrenadantes se han evaluado mediante el ensayo de transcriptasa inversa (RT) y las RT VIH-1 se han cuantificado mediante modelos matemáticos previamente descritos.¹⁶⁹ Los resultados (Tabla 4) se han expresado en valores de EC₅₀, concentración efectiva para inhibir la replicación del virus en un 50%.

4.2. Ensayo frente al virus de la hepatitis B (VHB)

También se comprueba la actividad *in vitro* de los nucleósidos sintetizados frente al VHB. Para ello, se han sembrado células HepAD38 (células que expresan VHB bajo un promotor inducible de tetraciclina)¹⁶⁶ en placas de 96 pocillos recubiertos de colágeno con una densidad de 50000 células/pocillo. A continuación, se añaden a las células HepAD38 los compuestos evaluados (**15a-f**, **16e** y **16f**) y el 3TC (control) hasta tener una concentración final de 10 µM. Todos los ensayos se han realizado por triplicado. El ADN del VHB se amplifica durante siete días mediante PCR a tiempo real utilizando LightCycler 480 (Roche), como

R. F. Schinazi, A. McMillan, D. Cannon, R. M. Mathis, R. M. Lloyd, A. Peck, J.-P. Sommadossi, M. St. Clair, J. Wilson, P. A. Furman, et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1992**, *36*, 2423-2431.

¹⁶⁸ L. J. Stuyver, S. Lostia, M. Adams, J. S. Mathew, B. S. Pai, J. Grier, P. M. Tharnish, Y. Choi, Y. Chong, H. Choo, et al. *Antimicrob Agents Chemother.* **2002**, *46*, 3854-60.

¹⁶⁹ M. S. Belen'kii, R. F. Schinazi, *Antiviral Res.* **1994**, *25*, 1-11.

se ha descrito con anterioridad.¹⁷⁰ El séptimo día, el ADN total se separa del sobrenadante y se cuantifica utilizando un kit comercial (DNeasy 96 Blood & Tissue kit, Qiagen). Los resultados de la Tabla 4, expresados en valores de EC₅₀, se han determinado por regresión lineal.

4.3. Estudios de citotoxicidad

Se ha estudiado la toxicidad celular de los compuestos mediante el ensayo de MTT y los resultados se expresan en valores de IC₅₀, concentración de compuesto que inhibe la proliferación celular en un 50%. Los ensayos se han realizado en cuatro tipos de células: PBM, CEM (un tipo de células T linfoblásticas), Vero (*African green monkey kidney*) y HepG2 (células hepáticas). Estas células se han sembrado en placas de 96 pocillos en presencia de los compuestos ensayados (**15a-f**, **16e** y **16f**) e incubadas a 37 °C con un 5% de CO₂. Posteriormente, se ha realizado el ensayo de proliferación celular utilizando el kit CellTiter 96® (Promega). Los resultados de IC₅₀ (Tabla 5) se han calculado mediante el método de Chou y Talalay.¹⁷¹

5. Datos experimentales

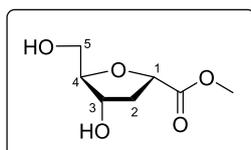
A continuación se recogen los datos experimentales que han permitido la caracterización de los compuestos que no habían sido previamente descritos. La numeración empleada en la asignación de los espectros de resonancia magnética nuclear está indicada en la figura que acompaña a cada compuesto.

¹⁷⁰ L. J. Stuyver, S. Lostia, M. Adams, J. S. Mathew, B. S. Pai, J. Grier, P. M. Tharnish, Y. Choi, Y. Chong, H. Choo, C. K. Chu, M. J. Otto, R. F. Schinazi. *Antimicrob Agents Chemother.* **2002**, *46*, 3854-60.

¹⁷¹ T.-C. Chou, P. Talalay. *Adv. Enzyme Regul.* **1984**, *22*, 27-55.

Parte Experimental -----

1,2-Didesoxi-1 α -(metoxicarbonil)-D-ribofuranosa (3)



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.

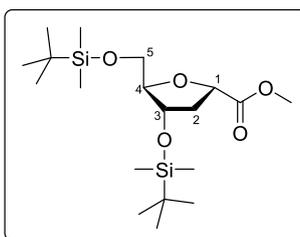
¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ 39.7 (C₂), 52.5 (*Me*), 63.1 (C₅), 72.7 (C₃), 77.3 (C₁), 88.6 (C₄), 175.6 (C=O) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

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

- Encontrada: 199.0578

3,5-Bis-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)-1,2-didesoxi-1 α -(metoxicarbonil)-D-ribofuranosa (6)



Líquido viscoso

R_f: 0.65 (20% AcOEt/Hexano)

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 0.088 (s, 3H, Si-*Me*), 0.095 (s, 3H, Si-*Me*), 0.098 (s, 3H, Si-*Me*), 0.102 (s, 3H, 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, H₃, $J = 5.2, 2.1$ Hz), 4.59 (dd, 1H, H₁, $J = 8.9, 2.7$ Hz) ppm.

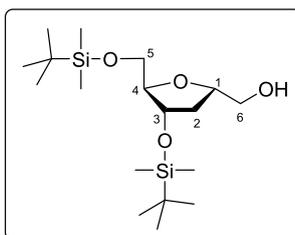
¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ -5.3 (Si-CH₃), -5.2 (Si-CH₃), -4.7 (Si-CH₃), -4.6 (Si-CH₃), 18.7 (SiCMe₃), 19.2 (SiCMe₃), 26.2 (3 CH₃-*t*Bu), 26.4 (3 CH₃-*t*Bu), 39.9 (C₂), 52.5 (Me), 64.3 (C₅), 74.2 (C₃), 77.7 (C₁), 89.5 (C₄), 175.4 (C=O) ppm.

EMAR (ESI⁺, m/z):

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

Parte Experimental -----

3,5-Bis-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)-1,2-didesoxi-1 α -(hidroximetil)-D-ribofuranosa (7)



Líquido viscoso

R_f: 0.34 (20% AcOEt/Hexano)

Fórmula molecular: C₁₈H₄₀O₄Si₂

Masa Molecular: 376.25 g/mol

IR (NaCl): ν 3456, 2955, 2930, 2887, 2858, 1472 y 1256 cm⁻¹.

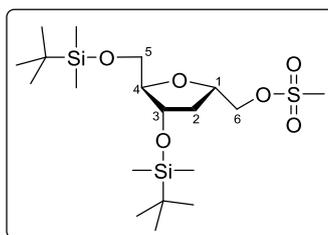
¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 0.082 (s, 3H, Si-*Me*), 0.084 (s, 3H, Si-*Me*), 0.10 (s, 6H, Si-*Me*), 0.91 (s, 9H, Si-*tBu*), 0.92 (s, 9H, Si-*tBu*), 1.73 (ddd, 1H, H₂, *J* = 12.8, 5.9, 4.8 Hz), 2.24 (ddd, 1H, H₂, *J* = 12.9, 7.5, 6.5 Hz), 3.54 (dd, 1H, H₆, *J* = 11.4, 4.6 Hz), 3.62 (m, 3H, 2H₅ + H₆), 3.81 (q, 1H, H₄, *J* = 4.1 Hz), 4.13 (m, 1H, H₁), 4.40 (ddd, 1H, H₃, *J* = 6.4, 4.7, 3.9 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), 18.8 (SiCMe₃), 19.2 (SiCMe₃), 26.3 (3 CH₃-*tBu*), 26.4 (3 CH₃-*tBu*), 37.9 (C₂), 64.4 (C₅), 66.0 (C₆), 74.4 (C₃), 80.9 (C₁), 87.9 (C₄) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₁₈H₄₀NaO₄Si₂ [M+Na]⁺: 399.2357
- Encontrada: 399.2358

**3,5-Bis-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)-1,2-didesoxi-1 α -
(((metilsulfonil)oxi)metil)-D-ribofuranosa (8)**



Líquido viscoso incoloro

R_f: 0.42 (20% AcOEt/Hexano)

Fórmula molecular: C₁₉H₄₂O₆SSi₂

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-*Bu*), 1.75 (dt, 1H, H₂, $J = 13.0, 3.9$ Hz), 2.32 (m, 1H, H₂), 3.09 (s, 3H, Ms-*Me*), 3.61 (dq, 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.

¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ -5.3 (Si-CH₃), -5.2 (Si-CH₃), -4.62 (Si-CH₃), -4.57 (Si-CH₃), 18.8 (SiCMe₃), 19.2 (SiCMe₃), 26.3 (3 CH₃-*Bu*), 26.4 (3 CH₃-*Bu*), 37.5 (Ms-*Me*), 37.6 (C₂), 64.4 (C₅), 73.4 (C₆), 74.4 (C₃), 78.0 (C₁), 88.6 (C₄) ppm.

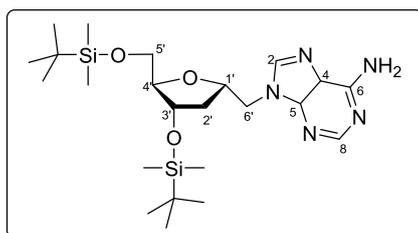
EMAR (ESI⁺, m/z):

- Calculada para C₁₉H₄₂NaO₆SSi₂ [M+Na]⁺: 477.2133

- Encontrada: 477.2134

Parte Experimental -----

**3',5'-Bis-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)-1'-homo-*N*-2'-desoxi- α -adenosina
(9a)**



Sólido blanco

R_f: 0.32 (5% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₂₃H₄₃N₅O₃Si₂

Masa Molecular: 493.80 g/mol

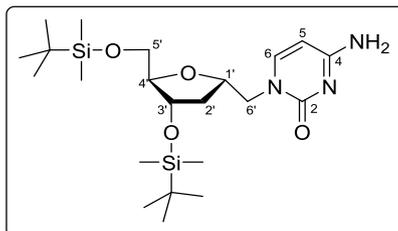
IR (KBr): ν 2954, 2930, 2857, 2361, 2342, 1654, 1600 cm⁻¹.

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-*tBu*), 0.87 (s, 9H, Si-*tBu*), 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 (m, 2H, H_{5'}), 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 (SiCMe₃), 19.1 (SiCMe₃), 26.29 (3 CH₃-*tBu*), 26.34 (3 CH₃-*tBu*), 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.

EMAR (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 -citidina (9b)

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, H_{5'}, *J* = 7.2 Hz), 7.50 (d, 1H, H_{6'}, *J* = 7.2 Hz) ppm.

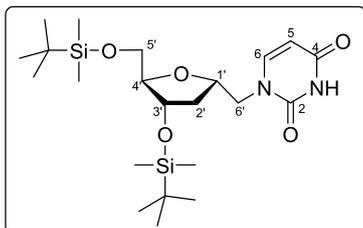
¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ -5.3 (Si-CH₃), -5.2 (Si-CH₃), -4.6 (Si-CH₃), -4.5 (Si-CH₃), 18.9 (SiCMe₃), 19.2 (SiCMe₃), 26.3 (3 CH₃-*tBu*), 26.4 (3 CH₃-*tBu*), 39.0 (C_{2'}), 54.9 (C_{6'}), 64.4 (C_{5'}), 74.5 (C_{3'}), 78.0 (C_{1'}), 88.0 (C_{4'}), 95.2 (C₅), 148.5 (C₆), 159.0 (C₂), 168.0 (C₄) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

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

Parte Experimental -----

3',5'-Bis-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)-1'-homo-*N*-2'-desoxi- α -uridina (9c)



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.

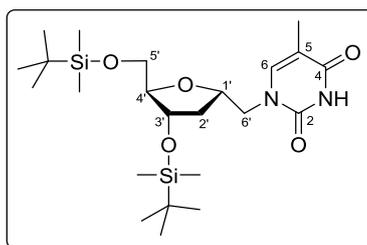
¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 0.05 (s, 3H, Si-*Me*), 0.06 (s, 3H, Si-*Me*), 0.11 (s, 6H, Si-*Me*), 0.90 (s, 9H, Si-*t*-*Bu*), 0.92 (s, 9H, Si-*t*-*Bu*), 1.70 (dt, 1H, H_{2'}, $J = 13.0, 4.9$ Hz), 2.32 (dt, 1H, H_{2'}, $J = 13.5, 6.9$ Hz), 3.62 (m, 2H, H_{5'}), 3.87 (m, 2H, H_{4'} + H_{6'}), 3.96 (dd, 1H, H_{6'}, $J = 14.1, 3.0$ Hz), 4.32 (m, 1H, H_{1'}), 4.43 (m, 1H, H_{3'}), 5.62 (d, 1H, H_{5'}, $J = 7.8$ 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 (SiCMe₃), 19.2 (SiCMe₃), 26.3 (3 CH₃-*t*-*Bu*), 26.4 (3 CH₃-*t*-*Bu*), 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.

EMAR (ESI⁺, m/z):

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

**3',5'-Bis-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)-1'-homo-*N*-2'-desoxi- α -timidina
(9d)**



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-*Bu*), 0.92 (s, 9H, Si-*Bu*), 1.70 (ddd, 1H, H_{2'}, *J* = 12.9, 5.9, 4.5 Hz), 1.86 (d, 3H, *Me*-C₅, *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 (m, 1H, H_{3'}), 7.37 (s, 1H, H₆) ppm.

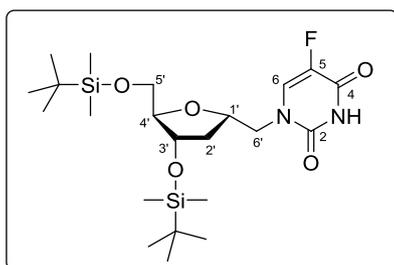
¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ -5.30 (Si-CH₃), -5.26 (Si-CH₃), -4.6 (Si-CH₃), -4.5 (Si-CH₃), 12.3 (CH₃-C₅) 18.9 (SiCMe₃), 19.2 (SiCMe₃), 26.3 (3 CH₃-*t*Bu), 26.4 (3 CH₃-*t*Bu), 39.0 (C_{2'}), 53.1 (C_{6'}), 64.4 (C_{5'}), 74.6 (C_{3'}), 78.2 (C_{1'}), 88.2 (C_{4'}), 110.4 (C₅), 144.2 (C₆), 152.9 (C₂), 167.0 (C₄) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₂₃H₄₅N₂O₅Si₂ [M+H]⁺: 485.2862
- Encontrada: 485.2851

Parte Experimental -----

3',5'-Bis-O-(*tert*-butildimetilsilil)-1'-homo-N-2'-desoxi- α -5-fluorouridina (9e)



Sólido blanco

P_f: 134-136 °C

R_f: 0.57 (5% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₂₂H₄₁FN₂O₅Si₂

Masa molecular: 488.74 g/mol

IR (NaCl): ν 3416, 2929, 2857, 1725, 1661, 1371, 1256, 1112 cm⁻¹.

¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 0.05 (s, 3H, Si-*Me*), 0.07 (s, 3H, Si-*Me*), 0.10 (s, 3H, Si-*Me*), 0.11 (s, 3H, Si-*Me*), 0.90 (s, 9H, Si-*Bu*), 0.91 (s, 9H, Si-*Bu*), 1.70 (ddd, 1H, H_{2'}, *J* = 13.0, 5.7, 4.4 Hz), 2.34 (dt, 1H, H_{2'}, *J* = 13.7, 7.0 Hz), 3.62 (dd, 2H, H_{5'}, *J* = 4.3, 1.7 Hz), 3.88 (m, 3H, H_{4'} + 2H_{6'}), 4.33 (m, 1H, H_{1'}), 4.42 (m, 1H, H_{3'}), 7.74 (d, 1H, H₆, *J* = 6.3 Hz) ppm.

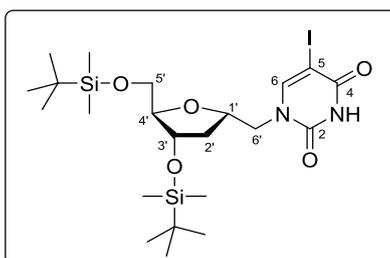
¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ -5.31 (Si-CH₃), -5.26 (Si-CH₃), -4.6 (Si-CH₃), -4.55 (Si-CH₃), 18.9 (SiCMe₃), 19.2 (SiCMe₃), 26.3 (CH₃-*Bu*), 26.4 (CH₃-*Bu*), 38.9 (C_{2'}), 53.2 (C_{6'}), 64.4 (C_{5'}), 74.6 (C_{3'}), 78.2 (C_{1'}), 88.2 (C_{4'}), 132.3 (d, C₆, *J* = 33.5 Hz), 141.2 (d, C₅, *J* = 131.5 Hz), 151.6 (C₂), 159.9 (d, C₄, *J* = 25.3 Hz) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₂₂H₄₂FN₂O₅Si₂ [M+H]⁺: 489.2611
- Encontrada: 489.2635

- Calculada para C₂₂H₄₁FN₂NaO₅Si₂ [M+Na]⁺: 511.2430
- Encontrada: 511.2456

3',5'-Bis-O-(*tert*-butildimetilsilil)-1'-homo-N-2'-desoxi- α -5-iodouridina (9f)



Sólido blanco

R_f: 0,63 (5% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₂₂H₄₁IN₂O₅Si₂

Masa molecular: 596,65 g/mol

IR (NaCl): ν 3400, 2929, 2857, 1693, 1614, 1254, 1112, 736 cm⁻¹.

¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 0.05 (s, 3H, Si-*Me*), 0.07 (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* = 13.0, 5.9, 4.4 Hz), 2.33 (ddd, 1H, H_{2'}, *J* = 13.5, 7.6, 6.4 Hz), 3.62 (dd, 2H, H_{5'}, *J* = 4.4, 1.6 Hz), 3.90 (m, 3H, H_{4'} + 2H_{6'}), 4.30 (m, 1H, H_{1'}), 4.42 (m, 1H, H_{3'}), 7.98 (s, 1H, H₆) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ -5.2 (2 Si-CH₃), -4.56 (Si-CH₃), -4.52 (Si-CH₃), 18.9 (SiCMe₃), 19.2 (SiCMe₃), 26.37 (CH₃-*t*Bu), 26.42 (CH₃-*t*Bu), 38.9 (C_{2'}), 53.2 (C_{6'}), 64.4 (C_{5'}), 67.2 (C_{5'}), 74.7 (C_{3'}), 78.0 (C_{1'}), 88.3 (C_{4'}), 152.6 (C₆), 152.7 (C₂), 163.4 (C₄) ppm.

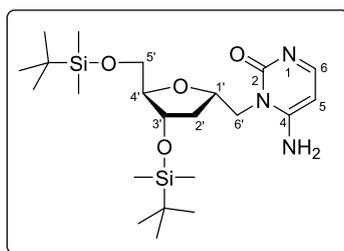
EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₂₂H₄₂IN₂O₅Si₂ [M+H]⁺: 597.1671
- Encontrada: 597.1684

- Calculada para C₂₂H₄₁IN₂NaO₅Si₂ [M+Na]⁺: 619.1491
- Encontrada: 619.1504

Parte Experimental -----

**Análogo N^3 de 3',5'-bis-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)-1'-homo-*N*-2'-
desoxi- α -citidina (10)**



Sólido blanco

R_f: 0.48 (5% MeOH/CH₂Cl₂)

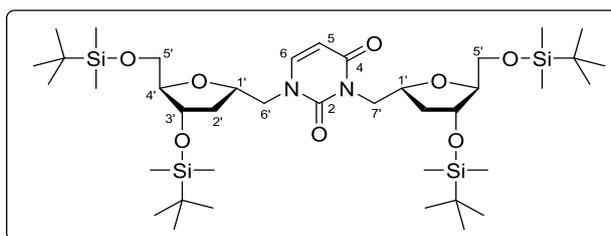
Fórmula molecular: C₂₂H₄₃N₃O₄Si₂

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-*tBu*), 0.91 (s, 9H, Si-*tBu*), 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 (SiCMe₃), 19.2 (SiCMe₃), 26.3 (SiCMe₃), 26.4 (SiCMe₃), 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.

***N*¹,*N*³-Bis-[3',5'-bis-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)-1',2'-didesoxi- α -ribofuranosilmetil]uracilo (11c)**



Aceite transparente

R_f: 0,40 (20% AcOEt/Hexano)

Fórmula molecular: C₄₀H₈₀N₂O₈Si₄

Masa molecular: 829,41 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'}), 3.78 (dd, 1H, H_{7'}, *J* = 12.9, 3.9 Hz), 3.92 (m, 4H, 2H_{4'} + 2H_{6'}), 4.38 (m, 4H, 2H_{1'} + 2H_{3'}), 4.56 (dd, 1H, H_{7'}, *J* = 12.9, 8.8 Hz), 5.69 (d, 1H, H_{5'}, *J* = 7.9 Hz), 7.51 (d, 1H, H_{6'}, *J* = 7.9 Hz) ppm.

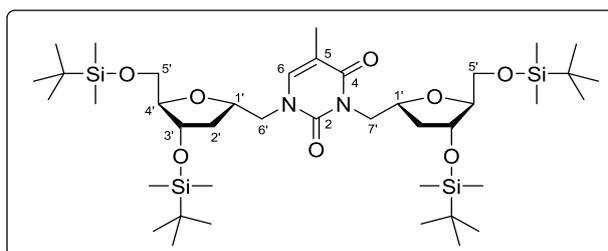
¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ -5.3 (2 Si-CH₃), -5.2 (2 Si-CH₃), -4.6 (2 Si-CH₃), -4.5 (2 Si-CH₃), 18.8 (SiCMe₃), 18.9 (SiCMe₃), 19.2 (2 SiCMe₃), 26.36 (2 CH₃-*t*-*Bu*), 26.42 (CH₃-*t*-*Bu*), 26.44 (CH₃-*t*-*Bu*), 39.0 (C_{2'}), 39.8 (C_{2'}), 46.2 (C_{7'}), 54.5 (C_{6'}), 64.4 (2C, C_{5'}), 74.6 (C_{3'}), 74.7 (C_{3'}), 77.4 (C_{1'}), 78.1 (C_{1'}), 88.0 (C_{4'}), 88.2 (C_{4'}), 101.0 (C₅), 146.4 (C₆), 153.2 (C₂), 165.7 (C₄) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

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

Parte Experimental -----

***N*¹,*N*³-Bis-[3',5'-bis-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)-1',2'-didesoxi- α -ribofuranosilmetil]timina (11d)**



Aceite transparente

R_f: 0,50 (20% AcOEt/Hexano)

Fórmula molecular: C₄₁H₈₂N₂O₈Si₄

Masa molecular: 843,44 g/mol

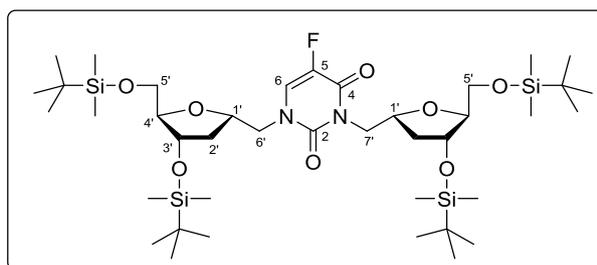
¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 0.04 (s, 6H, Si-*Me*), 0.049 (s, 3H, Si-*Me*), 0.054 (s, 3H, Si-*Me*), 0.108 (s, 6H, Si-*Me*), 0.114 (s, 6H, Si-*Me*), 0.893 (s, 9H, Si-*t*Bu), 0.891 (s, 9H, Si-*t*Bu), 0.92 (s, 9H, Si-*t*Bu), 0.93 (s, 9H, Si-*t*Bu), 1.74 (m, 2H, H_{2'}), 1.89 (d, 3H, *Me*-H₅, *J* = 0.8 Hz), 2.27 (m, 2H, H_{2'}), 3.60 (m, 4H, H_{5'}), 3.79 (dd, 1H, H_{7'}, *J* = 13.0, 3.9 Hz), 3.90 (m, 4H, 2H_{4'} + 2H_{6'}), 4.36 (m, 4H, H_{1'} + H_{3'}), 4.58 (dd, 1H, H_{7'}, *J* = 13.0, 8.8 Hz), 7.37 (d, 1H, H₆, *J* = 1.0 Hz) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ -5.3 (2 Si-CH₃), -5.2 (2 Si-CH₃), -4.6 (2 Si-CH₃), -4.5 (2 Si-CH₃), 13.1 (CH₃), 18.8 (SiCMe₃), 18.9 (SiCMe₃), 19.2 (2 SiCMe₃), 26.36 (2 CH₃-*t*Bu), 26.42 (2 CH₃-*t*Bu), 39.0 (C_{2'}), 39.9 (C_{2'}), 46.5 (C_{7'}), 54.2 (C_{6'}), 64.4 (C_{5'}), 64.5 (C_{5'}), 74.6 (C_{3'}), 74.7 (C_{3'}), 77.5 (C_{1'}), 78.2 (C_{1'}), 88.0 (C_{4'}), 88.1 (C_{4'}), 109.6 (C₅), 142.4 (C₆), 153.2 (C₂), 166.0 (C₄) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

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

***N*¹,*N*³-Bis-[3',5'-bis-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)-1',2'-didesoxi- α -ribofuranosilmetil]-5-fluorouracilo (11e)**



Aceite transparente

R_f: 0,50 (20% AcOEt/Hexano)

Fórmula molecular: C₄₀H₇₉FN₂O₈Si₄

Masa molecular: 847,40 g/mol

IR (NaCl): ν 2930, 2858, 1720, 1666, 1372, 1254, 1113 cm⁻¹.

¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 0.039 (s, 3H, Si-*Me*), 0.041 (s, 3H, Si-*Me*), 0.05 (s, 3H, Si-*Me*), 0.06 (s, 3H, Si-*Me*), 0.10 (s, 6H, Si-*Me*), 0.113 (s, 3H, Si-*Me*), 0.115 (s, 3H, Si-*Me*), 0.890 (s, 9 H, Si-*t*Bu), 0.892 (s, 9 H, Si-*t*Bu), 0.91 (s, 9H, Si-*t*Bu), 0.93 (s, 9H, Si-*t*Bu), 1.75 (m, 2H, H_{2'}), 2.28 (m, 2H, H_{2'}), 3.58 (m, 4H, H_{5'}), 3.77 (dd, 1H, H_{7'}, *J* = 13.1, 3.7 Hz), 3.92 (m, 4H, 2H_{4'} + 2H_{6'}), 4.38 (m, 4H, 2H_{1'} + 2H_{3'}), 4.62 (dd, 1H, H_{7'}, *J* = 12.9, 9.1 Hz), 7.75 (d, 1H, H₆, *J* = 5.9 Hz) ppm.

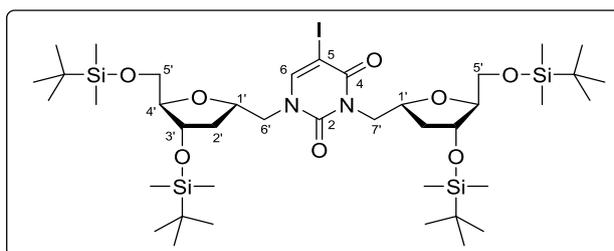
¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ -5.24 (2 Si-CH₃), -5.17 (1 Si-CH₃), -5.1 (1 Si-CH₃), -4.54 (2 Si-CH₃), -4.48 (2 Si-CH₃), 18.8 (SiCMe₃), 18.9 (SiCMe₃), 19.2 (2 SiCMe₃), 26.38 (2 CH₃-*t*Bu), 26.43 (CH₃-*t*Bu), 26.5 (CH₃-*t*Bu), 39.0 (C_{2'}), 39.7 (C_{2'}), 46.9 (C_{7'}), 54.3 (C_{6'}), 64.4 (C_{5'}), 64.5 (C_{5'}), 74.6 (C_{3'}), 74.8 (C_{3'}), 77.3 (C_{1'}), 78.1 (C_{1'}), 88.1 (2C, C_{4'}), 130.6 (d, C₆, *J* = 33.3 Hz), 140.8 (d, C₅, *J* = 229.4 Hz), 151.7 (C₂), 159.5 (d, C₄, *J* = 25.2 Hz) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₄₀H₇₉FN₂NaO₈Si₄ [M+Na]⁺: 869.4790
- Encontrada: 869.4762

Parte Experimental -----

***N*¹,*N*³-Bis-[3',5'-bis-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)-1',2'-desoxi- α -ribofuranosilmetil]-5-iodouracilo (11f)**



Aceite transparente

R_f: 0,56 (20% AcOEt/Hexano)

Fórmula molecular: C₄₀H₇₉IN₂O₈Si₄

Masa molecular: 955,31 g/mol

IR (NaCl): ν 2930, 2857, 1710, 1620, 1255, 1113, 778 cm⁻¹.

¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 0.04 (s, 3H, Si-*Me*), 0.050 (s, 3H, Si-*Me*), 0.052 (s, 3H, Si-*Me*), 0.07 (s, 3H, Si-*Me*), 0.108 (s, 6H, Si-*Me*), 0.114 (s, 6H, 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), 1.73 (m, 2H, H_{2'}), 2.28 (m, 2H, H_{2'}), 3.62 (m, 4H, H_{5'}), 3.82 (dd, 1H, H_{7'}, *J* = 13.1, 3.7), 3.89 (m, 2H, 2H_{4'}), 3.96 (m, 2H, 2H_{6'}), 4.38 (m, 4H, 2H_{1'} + 2H_{3'}), 4.63 (dd, 1H, H_{7'}, *J* = 13.0, 9.0), 7.99 (s, 1H, H₆) ppm.

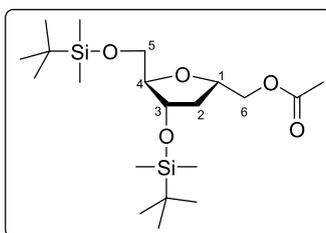
¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ -5.24 (1 Si-CH₃), -5.19 (1 Si-CH₃), -5.1 (2 Si-CH₃), -4.5 (4 Si-CH₃), 18.8 (SiCMe₃), 18.9 (SiCMe₃), 19.2 (2 SiCMe₃), 26.4 (2 CH₃-*t*Bu), 26.5 (2 CH₃-*t*Bu), 38.9 (C_{2'}), 39.8 (C_{2'}), 47.8 (C_{7'}), 54.4 (C_{6'}), 64.4 (2C, C_{5'}), 66.5 (C₅), 74.6 (C_{3'}), 74.7 (C_{3'}), 77.4 (C_{1'}), 78.0 (C_{1'}), 88.0 (C_{4'}), 88.3 (C_{4'}), 150.9 (C₆), 152.9 (C₂), 162.4 (C₄) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₄₀H₈₀IN₂O₈Si₄ [M+H]⁺: 955.4031. Encontrada: 955.4033

- Calculada para C₄₀H₇₉IN₂NaO₈Si₄ [M+Na]⁺: 977.3850. Encontrada: 977.3851

1 α -O-Acetil-3,5-bis-O-(*tert*-butildimetilsilil)-1,2-didesoxi-D-ribofuranosa (12)



Líquido viscoso

R_f: 0.65 (20% AcOEt/Hexano)

Fórmula molecular: C₂₀H₄₂O₅Si₂

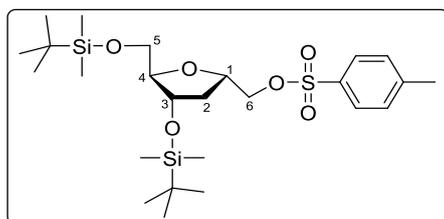
Masa Molecular: 418.72 g/mol

¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 0.081 (s, 3H, Si-*Me*), 0.085 (s, 3H, 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, Ac-*Me*), 2.28 (dt, 1H, H₂, *J* = 13.6, 6.9 Hz), 3.63 (qd, 2H, H₅, *J* = 11.0, 4.5 Hz), 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), 4.27 (m, 1H, H₁), 4.40 (dt, 1H, H₃, *J* = 6.2, 3.9 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), 18.8 (SiCMe₃), 19.2 (SiCMe₃), 20.8 (Ac-CH₃), 26.3 (3 CH₃-*t*Bu), 26.4 (3 CH₃-*t*Bu), 38.1 (C₂), 64.4 (C₅), 68.1 (C₆), 74.4 (C₃), 78.1 (C₁), 88.4 (C₄), 172.6 (C=O) ppm.

Parte Experimental -----

3,5-Bis-O-(*tert*-butildimetilsilil)-1,2-didesoxi-1 α -[(tosiloxi)metil]-D-ribofuranosa (13)



Líquido viscoso incoloro

R_f: 0.60 (20% AcOEt/Hexano)

Fórmula molecular: C₂₅H₄₆O₆SSi₂

Masa Molecular: 530.87 g/mol

IR (NaCl): ν 2954, 2930, 2896, 2857, 1471, 1366 y 1255 cm⁻¹.

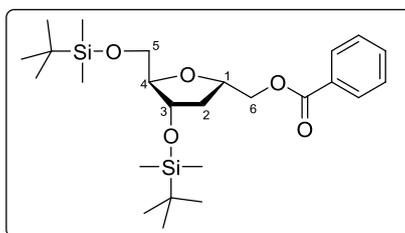
¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 0.040 (s, 3H, Si-*Me*), 0.042 (s, 3H, Si-*Me*), 0.05 (s, 3H, Si-*Me*), 0.06 (s, 3H, Si-*Me*), 0.84 (s, 9H, Si-*t*Bu), 0.90 (s, 9H, Si-*t*Bu), 1.64 (dt, 1H, H₂, *J* = 13.3, 3.4 Hz), 2.21 (ddd, 1H, H₂, *J* = 13.7, 8.1, 5.8 Hz), 2.45 (s, 3H, Ts-*Me*), 3.46 (dd, 1H, H₅, *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), 4.27 (m, 1H, H₁), 4.33 (m, 1H, H₃), 7.43 (d, 2H, H_{arom}, *J* = 8.5 Hz), 7.79 (d, 2H, H_{arom}, *J* = 8.4 Hz) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ -5.3 (Si-CH₃), -5.2 (Si-CH₃), -4.6 (2 Si-CH₃), 18.7 (SiCMe₃), 19.2 (SiCMe₃), 21.6 (CH₃-Ts), 26.3 (3 CH₃-*t*Bu), 26.4 (3 *t*Bu-CH₃), 37.6 (C₂), 64.4 (C₅), 73.6 (C₆), 74.5 (C₃), 77.9 (C₁), 88.7 (C₄), 129.1 (2CH_{arom}), 131.0 (2CH_{arom}), 134.4 (C_{arom}), 146.3 (C_{arom}) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₂₅H₄₇O₆SSi₂ [M+H]⁺: 531.2626
- Encontrada: 531.2632

**1 α -O-Benzoil-3,5-bis-O-(*tert*-butildimetilsilil)-1,2-didesoxi-D-
-ribofuranosa (14)**



Líquido viscoso

R_f: 0.83 (20% AcOEt/Hexano)

Fórmula molecular: C₂₅H₄₄O₅Si₂

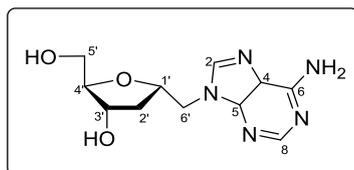
Masa Molecular: 480.78 g/mol

¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 0.08 (s, 6H, Si-*Me*), 0.11 (s, 6H, Si-*Me*), 0.91 (s, 9H, Si-*t*Bu), 0.92 (s, 9H, Si-*t*Bu), 1.84 (dt, 1H, H₂, *J* = 12.9, 4.5 Hz), 2.36 (dt, 1H, H₂, *J* = 12.9, 6.6 Hz), 3.64 (m, 2H, H₅), 3.91 (q, 1H, H₄, *J* = 4.1 Hz), 4.34 (m, 1H, H₁), 4.45 (m, 3H, H₃ + H₆), 7.48 (t, 2H, H_{arom}, *J* = 7.6 Hz), 7.60 (m, 1H, H_{arom}), 8.05 (m, 2H, H_{arom}) 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 (SiCMe₃), 19.2 (SiCMe₃), 26.3 (3 CH₃-*t*Bu), 26.4 (3 CH₃-*t*Bu), 38.1 (C₂), 64.4 (C₅), 68.5 (C₆), 74.4 (C₃), 78.1 (C₁), 88.4 (C₄), 129.6 (2 CH_{arom}), 130.6 (2 CH_{arom}), 131.4 (C_{arom}), 134.3 (CH_{arom}), 167.9 (C=O) ppm.

Parte Experimental -----

1'-Homo-N-2'-desoxi- α -adenosina (15a)



Sólido blanco

R_f: 0.18 (20% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₁₁H₁₅N₅O₃

Masa Molecular: 265.27 g/mol

IR (KBr): ν 3373, 3231, 3110, 2921, 1680, 1610, 1577 cm⁻¹.

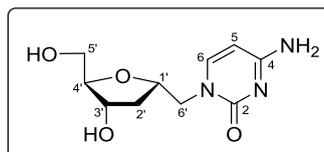
¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 1.69 (dt, 1H, H_{2'}, *J* = 13.1, 5.8 Hz), 2.38 (dt, 1H, H_{2'}, *J* = 13.3, 6.7 Hz), 3.50 (m, 1H, H_{5'}), 3.59 (dd, 1H, H_{5'}, *J* = 11.8, 3.9 Hz), 3.85 (q, 1H, H_{4'}, *J* = 4.5 Hz), 4.25 (dt, 1H, H_{3'}, *J* = 6.6, 5.2 Hz), 4.38 (m, 2H, H_{6'}), 4.45 (m, 1H, H_{1'}), 8.16 (s, 1H, H₂) 8.20 (s, 1H, H₈) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ 38.5 (C_{2'}), 48.8 (C_{6'}), 63.3 (C_{5'}), 73.2 (C_{3'}), 77.8 (C_{1'}), 87.6 (C_{4'}), 119.7 (C₄), 143.6 (C₂), 150.8 (C₅), 153.6 (C₈), 157.2 (C₆) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₁₁H₁₆N₅O₃ [M+H]⁺: 266.1248
- Encontrada: 266.1251

1'-Homo-N-2'-desoxi- α -5-citidina (15b)



Sólido blanco higroscópico

R_f: 0.07 (15% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₁₀H₁₅N₃O₄

Masa Molecular: 241.25 g/mol

IR (KBr): ν 3351, 3124, 2962, 2914, 2872, 1676, 1622 cm⁻¹

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 (m, 1H, H_{4'}), 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.

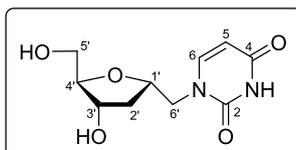
EMAR (ESI⁺, *m/z*):

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

- Encontrada: 242.1138

Parte Experimental -----

1'-Homo-N-2'-desoxi- α -uridina (15c)



Sólido blanco higroscópico

R_f: 0.13 (10% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₁₀H₁₄N₂O₅

Masa Molecular: 242.23 g/mol

IR (KBr): ν 3332, 3102, 2962, 2923, 1667 cm⁻¹

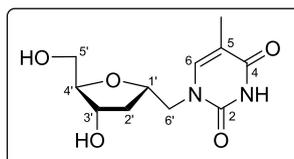
¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 1.70 (ddd, 1H, H_{2'}, *J* = 13.1, 5.9, 4.9 Hz), 2.33 (m, 1H, H_{2'}), 3.53 (m, 2H, H_{5'}), 3.87 (m, 2H, H_{4'} + H_{6'}), 3.96 (dd, 1H, H_{6'}, *J* = 14.1, 3.4 Hz), 4.25 (dt, 1H, H_{3'}, *J* = 6.6, 4.6 Hz), 4.34 (m, 1H, H_{1'}), 5.63 (d, 1H, H_{5'}, *J* = 7.9 Hz), 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.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₁₀H₁₄N₂NaO₅ [M+Na]⁺: 265.0795
- Encontrada: 265.0796

1'-Homo-N-2'-desoxi- α -timidina (15d)



Sólido blanco higroscópico

R_f: 0.40 (15% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₁₁H₁₆N₂O₅

Masa Molecular: 256.11 g/mol

IR (KBr): ν 3324, 3054, 2987, 2963, 2923, 1666 cm⁻¹

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.

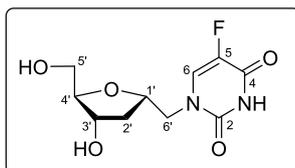
¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ 12.2 (CH₃), 38.5 (C_{2'}), 53.1 (C_{6'}), 63.4 (C_{5'}), 73.3 (C_{3'}), 77.7 (C_{1'}), 87.6 (C_{4'}), 110.4 (C₅), 144.3 (C₆), 153.1 (C₂), 167.0 (C₄) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₁₁H₁₇N₂O₅ [M+H]⁺: 257.1132
- Encontrada: 257.1134

Parte Experimental -----

1'-Homo-N-2'-desoxi- α -5-fluorouridina (15e)



Sólido blanco

R_f: 0,29 (15% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₁₀H₁₃FN₂O₅

Masa molecular: 260,22 g/mol

¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 1.70 (ddd, 1H, H_{2'}, *J* = 13.2, 5.9, 4.8 Hz), 2.34 (dt, 1H, H_{2'}, *J* = 12.0, 6.0 Hz), 3.55 (m, 2H, H_{5'}), 3.88 (m, 3H, H_{4'} + 2H_{6'}), 4.24 (m, 1H, H_{3'}), 4.35 (m, 1H, H_{1'}), 7.81 (d, 1H, H₆, *J* = 6.4 Hz) ppm.

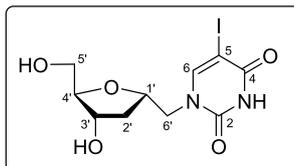
¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ 38.4 (C_{2'}), 53.2 (C_{6'}), 63.3 (C_{5'}), 73.3 (C_{3'}), 77.7 (C_{1'}), 87.6 (C_{4'}), 132.4 (d, C₆, *J* = 33.5 Hz), 141.3 (d, C₅, *J* = 231.1 Hz), 151.7 (C₂), 159.9 (d, C₄, *J* = 25.7 Hz) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₁₀H₁₄FN₂O₅ [M+H]⁺: 261.0881
- Encontrada: 261.0874

- Calculada para C₁₀H₁₃FN₂NaO₅ [M+Na]⁺: 283.0701
- Encontrada: 283.0695

1'-Homo-N-2'-desoxi- α -5-iodouridina (15f)



Sólido blanco

R_f: 0,47 (15% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₁₀H₁₃IN₂O₅

Masa molecular: 368,13 g/mol

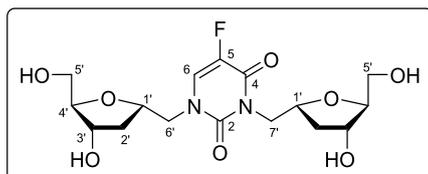
¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 1.69 (dt, 1H, H_{2'}, *J* = 13.1, 5.6 Hz), 2.33 (dt, 1H, H_{2'}, *J* = 13.9, 7.3 Hz), 3.54 (m, 2H, H_{5'}), 3.89 (m, 3H, H_{4'} + 2H_{6'}), 4.25 (m, 1H, H_{3'}), 4.33 (m, 1H, H_{1'}), 8.05 (s, 1H, H₆) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₁₀H₁₄IN₂O₅ [M+H]⁺: 368.9942
- Encontrada: 368.9943
- Calculada para C₁₀H₁₃IN₂NaO₅ [M+Na]⁺: 390.9761
- Encontrada: 390.9764

Parte Experimental -----

***N*¹, *N*³-Bis-(1',2'-didesoxi- α -ribofuranosilmetil)-5-fluorouracilo (16e)**



Aceite transparente

R_f: 0,15 (15% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₁₆H₂₃FN₂O₈

Masa molecular: 390,36 g/mol

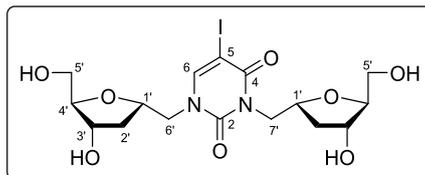
¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 1.74 (m, 2H, H_{2'}), 2.33 (m, 2H, H_{2'}), 3.54 (m, 4H, H_{5'}), 3.90 (m, 5H, 2H_{4'} + 2H_{6'} + 1H_{7'}), 4.22 (m, 2H, H_{3'}), 4.39 (m, 2H, H_{1'}), 4.50 (dd, 1H, H_{7'}, *J* = 12.6, 8.8), 7.84 (d, 1H, H₆, *J* = 6 Hz) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ 38.4 (C_{2'}), 39.3 (C_{2'}), 46.6 (C_{7'}), 54.2 (C_{6'}), 63.2 (C_{5'}), 63.4 (C_{5'}), 73.3 (C_{3'}), 73.4 (C_{3'}), 76.7 (C_{1'}), 77.7 (C_{1'}), 87.1 (C_{4'}), 87.7 (C_{4'}), 130.9 (d, C₆, *J* = 33.5 Hz), 140.8 (d, C₅, *J* = 229 Hz), 151.9 (C₂), 159.6 (d, C₄, *J* = 25 Hz) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₁₆H₂₄FN₂O₈ [M+H]⁺: 391.1511
- Encontrada: 391.1526

- Calculada para C₁₆H₂₃FN₂NaO₈ [M+Na]⁺: 413.1331
- Encontrada: 413.1345

N^1, N^3 -Bis-(1',2'-didesoxi- α -ribofuranosilmetil)-5-iodouracilo (16f)

Aceite transparente

R_f: 0,24 (15% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₁₆H₂₃IN₂O₈

Masa molecular: 498,27 g/mol

¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 1.73 (m, 2H, H_{2'}), 2.32 (m, 2H, H_{2'}), 3.53 (m, 4H, H_{5'}), 3.89 (m, 3H, 2H_{4'} + 1H_{7'}), 3.96 (m, 2H, H_{6'}), 4.23 (m, 2H, H_{3'}), 4.39 (m, 2H, H_{1'}), 4.52 (dd, 1H, H_{7'}, $J = 12.9, 8.7$), 8.08 (s, 1H, H₆) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ 38.4 (C_{2'}), 39.3 (C_{2'}), 47.6 (C_{7'}), 54.4 (C_{6'}), 63.2 (C_{5'}), 63.3 (C_{5'}), 66.4 (C₅), 73.4 (2C, C_{3'}), 76.7 (C_{1'}), 77.6 (C_{1'}), 87.0 (C_{4'}), 87.8 (C_{4'}), 151.2 (C₆), 153.1 (C₂), 162.5 (C₄) ppm.

EMAR (ESI⁺, m/z):

- Calculada para C₁₆H₂₄IN₂O₈ [M+H]⁺: 499.0572

- Encontrada: 499.0577

- Calculada para C₁₆H₂₃IN₂NaO₈ [M+Na]⁺: 521.0391

- Encontrada: 521.0397

CAPÍTULO 2

Síntesis de 2',3'-didesoxinucleósidos y
2',3'-dideshidro-2',3'-didesoxinucleósidos

Antecedentes

Los virus continúan siendo una amenaza para la salud pública mundial. Entre ellos, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), que ataca al sistema inmunitario aumentando el riesgo de contraer enfermedades como cánceres e infecciones oportunistas, ha causado ya casi 33 millones de muertes en todo el mundo. Desde la primera muestra humana con VIH en 1959 se ha conseguido una importante evolución en el desarrollo de tratamientos eficaces que permiten mantener controlado el virus y prevenir la transmisión a otras personas. Sin embargo, no existe cura disponible debido a la facilidad de mutación del virus, por lo que las personas seropositivas necesitan un tratamiento antirretroviral de forma permanente que les permite llevar una vida larga y saludable.

A pesar de los enormes avances en prevención, diagnóstico y tratamiento, las infecciones por VIH tienen una gran incidencia en países subdesarrollados de África y Asia, y en 2019 costaron la vida a 690.000 personas y causaron 1,7 millones de nuevos infectados,¹⁷² cifras que se han visto afectadas negativamente por la pandemia de la COVID-19. Las deficiencias en las respuestas al VIH y las consecuentes infecciones y muertes relacionadas con el sida suelen estar ligadas a factores sociales y legales que aumentan el riesgo de contagio y dificultan el acceso a servicios asequibles y de calidad. Solo el 20% de los países de ingresos medios y bajos que necesitan estos medicamentos pueden acceder a ellos.

¹⁷² <https://www.who.int/es/news/item/06-07-2020-who-access-to-hiv-medicines-severely-impacted-by-covid-19-as-aids-response-stalls>. Visitada el 15/07/2021

Antecedentes -----

Existe un gran abanico de fármacos anti-VIH que se clasifican en función de su naturaleza química y de su mecanismo de acción, entre los que se encuentran los derivados nucleosídicos inhibidores de la transcriptasa inversa (NRTIs, Figura 30).

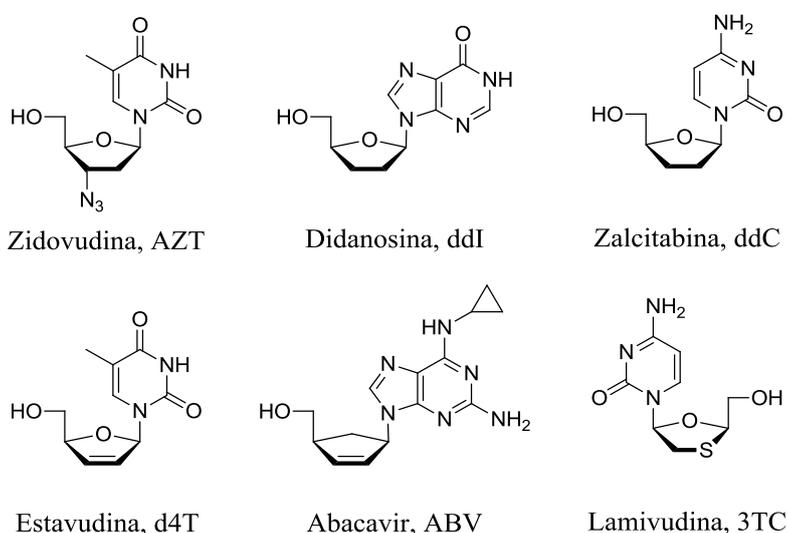


Figura 30. Algunos NRTIs aprobados contra el VIH.

Desde que Mitsuya *et al.*¹⁷³ identificaron la 2'-desoxi-3'-azidotimidina (AZT, zidovudina) como un potente agente antiviral contra el VIH-1, se han desarrollado otros derivados de nucleósido que también han mostrado actividad contra este virus, tales como ddI, ddC, d4T, ABV y 3TC (Figura 30). La mayoría de estos compuestos son 2',3'-didesoxinucleósidos o sus análogos 2',3'-insaturados, y se caracterizan por carecer de grupos hidroxilo en las posiciones 2' y 3'.

El principal mecanismo por el que los NRTIs actúan tras su fosforilación por quinasas celulares, es por competencia con los nucleótidos naturales durante la síntesis de ADN vírico realizada por la

¹⁷³ 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.

transcriptasa inversa (Figura 31). La ausencia del grupo hidroxilo en la posición 3' provoca una interrupción de la elongación de la cadena en formación, realizada en sentido 5'→3', cuando un derivado es incorporado, de forma que se concluye la síntesis del ADN viral.

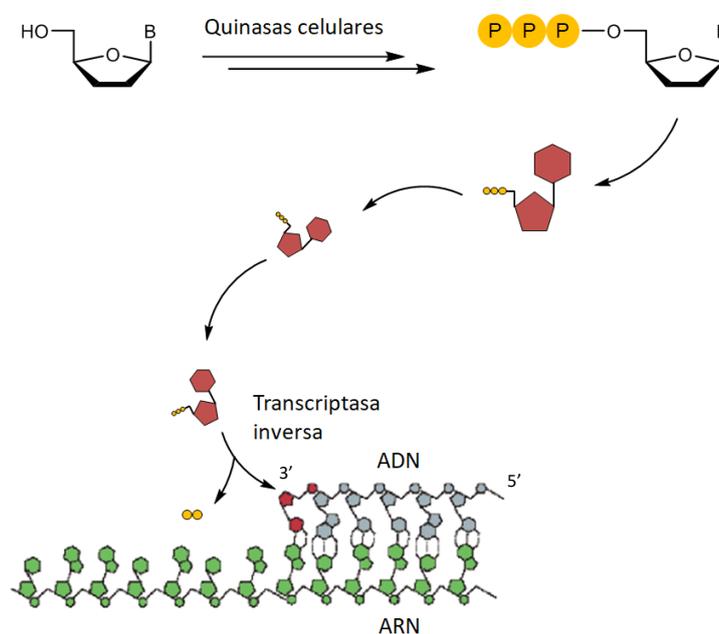


Figura 31. Mecanismo de acción de los NRTIs.

1. Síntesis de 2',3'-dideshidro-2',3'-didesoxinucleósidos y/o 2',3'-didesoxinucleósidos

Debido a la importancia farmacológica tanto de los 2',3'-dideshidro-2',3'-didesoxinucleósidos como de los 2',3'-didesoxinucleósidos, en la bibliografía se han descrito métodos que promuevan su síntesis de una forma general y económica. Además de su importante poder antiviral, los 2',3'-didesoxinucleósidos presentan un valor añadido al ser también sustratos clave utilizados en el método de secuenciación de ADN de Sanger. A menudo se estudian transformaciones que permiten la

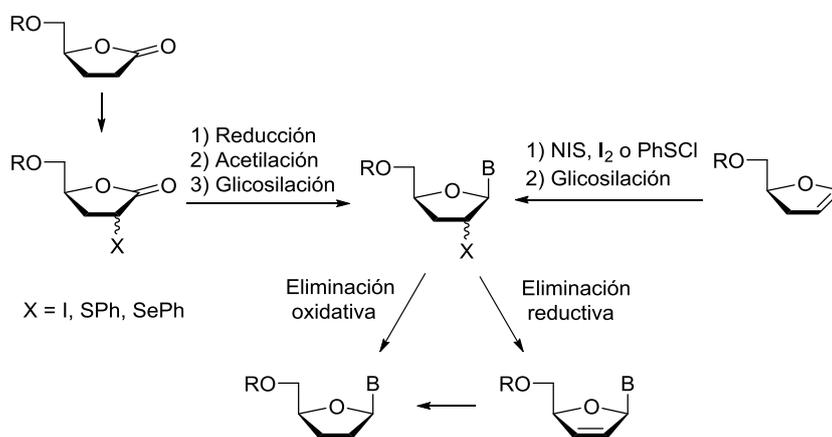
Antecedentes -----

obtención de los análogos olefínicos, los cuales dan acceso a los correspondientes nucleósidos saturados a través de una reacción sencilla.

Los procedimientos sintéticos se pueden dividir en dos grupos: por un lado, los métodos basados en el acoplamiento de un azúcar adecuadamente modificado con la base nitrogenada, y por otro, los protocolos cuyo sustrato de partida es un nucleósido intacto que se va modificando. A continuación, se mencionan algunos de los ejemplos recogidos en la bibliografía.

1.1. Síntesis a partir de carbohidratos

Las síntesis a partir de carbohidratos¹⁷⁴ incluyen una etapa de formación del enlace glicosídico entre un anillo de azúcar y una base heterocíclica (Esquema 33).



Esquema 33

¹⁷⁴ a) L. J. Wilson, D. Liotta. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 1815-1818; b) C. K. Chu, J. R. Babu, J. W. Beach, S. K. Ahn, H. Huang, L. S. Jeong, S. J. Lee. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 1418-1420; c) J. W. Beach, H. O. Kim, L. S. Jeong, S. Nampalli, Q. Islam, S. K. Ahn, J. R. Babu, C. K. Chu. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 3887-3894; d) F. E. McDonald, M. M. Gleason. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 350-352; e) Y. Diaz, A. El-Laghdach, M. S. Matheu, S. Castillon. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 1501-1505; f) U. Chiacchio, A. Rescifina, D. Iannazzo, G. Romeo. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 28-36; g) L. Álvarez de Cienfuegos, A. J. Mota, C. Rodriguez, R. Robles. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 469-473.

La mayoría de los métodos de glicosilación convencionales implican la formación de un carbocatión intermedio y, en ausencia de sustituyentes en la posición 2, dan mezclas equimolares de nucleósidos α/β . Aunque los grupos voluminosos fácilmente eliminables, como yodo, fenilsulfenilo o fenilselenilo, en la posición 2 del anillo de furanosa han permitido cierto control de la diastereoselectividad, la formación del anómero α continúa disminuyendo el rendimiento general y aumentando el coste del anómero β deseado al ser necesaria una etapa de separación cromatográfica.

1.2. Síntesis a partir de nucleósidos

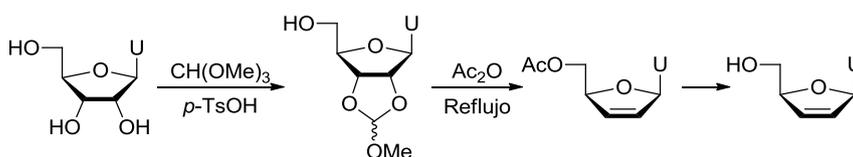
La mayoría de estos procedimientos utilizan los ribonucleósidos como sustratos de partida, aprovechando su estructura de díoles vecinales y siendo las desoxigenaciones y las eliminaciones reductivas las estrategias sintéticas más empleadas.

1.2.1. Desoxigenación de Eastwood

Algunos autores¹⁷⁵ recogen la síntesis de 2',3'-dideshidro-2',3'-didesoxiuridina mediante un proceso que involucra una desoxigenación de Eastwood modificada. De manera que la uridina se transforma en el correspondiente 2-alcoxi-1,3-dioxolano por tratamiento con ortoformiato de metilo y una cantidad catalítica de ácido *p*-toluensulfónico (Esquema 34). A continuación, el calentamiento a reflujo de anhídrido acético proporciona el alqueno correspondiente.

¹⁷⁵ a) H. Shiragamai, Y. Irie, H. Shirae, K. Yokozeki, N. Yasuda. *J. Org. Chem.* **1988**, 53, 5170-5173; b) M. M. Mansuri, J. E. Starrett, J. A. Wos, D. R. Tortolani, P. R. Brodfuehrer, H. G. Howell, J. C. Martin. *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 4780-4785.

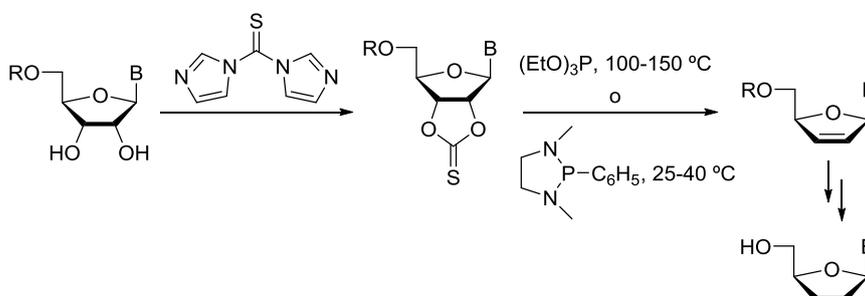
Antecedentes -----



Esquema 34

1.2.2. Síntesis de Corey-Winter¹⁷⁶

Algunos métodos recogidos en la bibliografía transforman ribonucleósidos protegidos en 5' en tionocarbonatos cíclicos por reacción con tiocarbonildiimidazol (Im_2CS) (Esquema 35). Posteriormente, el tratamiento con trimetilfosfito o trietilfosfito a alta temperatura, o con 2-fenil-1,3-dimetil-1,3,2-diazafosfolidina a 25-40 °C, origina los 2',3'-dideshidro-2',3'-didesoxinucleósidos.¹⁷⁷



Esquema 35

1.2.3. Desoxigenación de Barton-McCombie

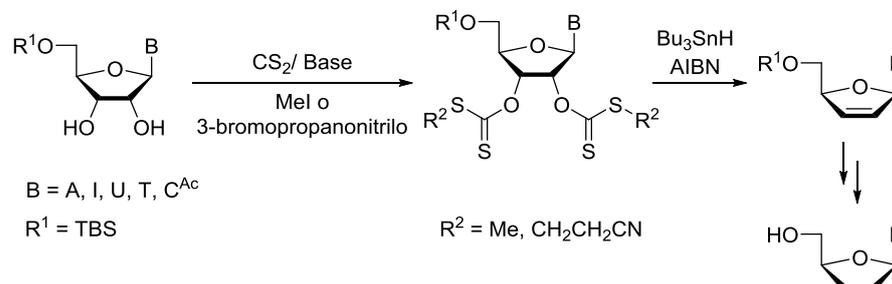
Otro procedimiento al que se ha recurrido en la bibliografía es la desoxigenación de Barton-McCombie, que consiste en la fragmentación

¹⁷⁶ a) E. J. Corey, R. A. E. Winter. *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, 85, 2677-2678; b) E. J. Corey, P. B. Hopkins. *Tetrahedron Lett.*, **1982**, 23, 1979-1982.

¹⁷⁷ a) C. K. Chu, V. S. Bhadti, B. Doboszewski, Z. P. Gu, Y. Kosugi, K. C. Pullaiah, P. Van Roey. *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 2217-2225; b) L. W. Dudycz. *Nucleosides Nucleotides*, **1989**, 8, 35-41; c) P. S. Manchand, P. S. Belica, M. J. Holman, T. N. Huang, H. Maehr, S. Y. K. Tam, R. T. Yang. *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 3473-3478.

radicalaria con un hidruro de estaño de dos xantatos vecinales obtenidos a partir de un diol vecinal.

Chu *et al.*,^{177a} además de la reacción de Corey-Winter, también describen la síntesis de 2',3'-didesoxinucleósidos mediante esta estrategia (Esquema 36). En primer lugar, los ribonucleósidos 5'-*O*-protegidos se transforman en los correspondientes 2',3'-bisxantatos a través de una reacción con CS₂, una base y un agente alquilante (MeI o 3-bromopropanonitrilo). A continuación, la eliminación radicalaria con Bu₃SnH en presencia de 2,2'-azobis(isobutironitrilo) (AIBN) como iniciador de radicales, da lugar a los 2',3'-didesoxinucleósidos.

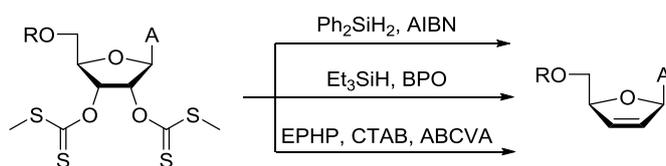


Esquema 36

Algunos autores¹⁷⁸ han estudiado alternativas al hidruro de tributilestaño y al AIBN para la síntesis de 2',3'-dideshidro-2',3'-didesoxiadenosina (Esquema 37). Ejemplo de ello es la utilización de difenilsilano y AIBN, trietilsilano y peróxido de benzoílo (BPO), o hipofosfito de *N*-etilpiperidina (EHPH) y 4,4'-azobis(ácido 4-cianoaléxico) (ABCVA). Para este último, es necesario un agente de transferencia de fase, bromuro de cetiltrimetilamonio (CTBA), ya que el iniciador de radicales es soluble en agua.

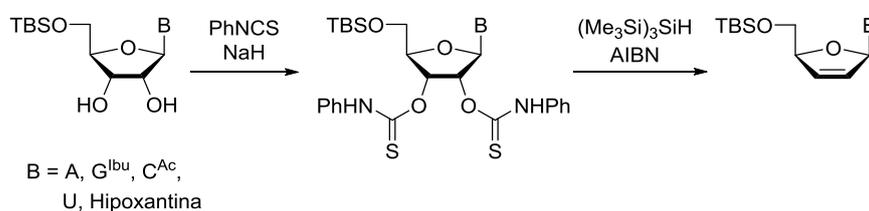
¹⁷⁸ a) D. H. R. Barton, D. O. Jang, J. C. Jaszberenyi. *Tetrahedron Lett.*, **1991**, 32, 2569-2572; b) D. H. R. Barton, D. O. Jang, J. C. Jaszberenyi. *Tetrahedron Lett.*, **1991**, 32, 7187-7190; c) D. O. Jang, D. H. Cho. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 5921-5924.

Antecedentes -----



Esquema 37

Oba *et al.*¹⁷⁹ transforman dioles vecinales en alquenos a través de bis-*O*-tioxocarbamatos. La reacción entre los ribonucleósidos 5'-*O*-protegidos e isotiocianato de fenilo en presencia de NaH genera los derivados 2',3'-bis-*O*-tioxocarbamato (Esquema 38). A continuación, la desoxigenación radicalaria con tris(trimetilsilil)silano en presencia de AIBN da lugar a los 2',3'-dideshidro-2',3'-didesoxinucleósidos 5'-*O*-sililados.



Esquema 38

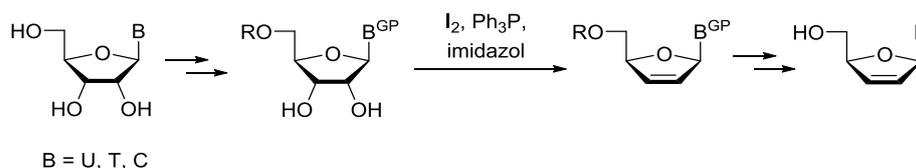
1.2.4. Reacción de Garegg-Samuelsson

Luzzio y Menes¹⁸⁰ llevan a cabo una síntesis de 2',3'-dideshidro-2',3'-didesoxinucleósidos con base pirimidínica aplicando la reacción de Garegg-Samuelsson, donde se promueve la desoxigenación de los hidroxilos 2' y 3' vecinales por un tratamiento con I₂/Ph₃P/imidazol (Esquema 39). Aunque la transformación del diol en el alqueno transcurre en una única etapa sintética son necesarias etapas de protección/desprotección adicionales tanto del grupo hidroxilo primario

¹⁷⁹ M. Oba, M. Suyama, A. Shimamura, K. Nishiyama, K. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 4027-4029.

¹⁸⁰ F. A. Luzzio, M. E. Menes. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 7267-7272.

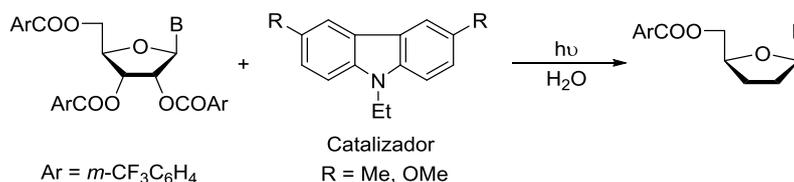
como de los grupos amino de las bases heterocíclicas para evitar la formación de anhidronucleósidos.



Esquema 39

1.2.5. Desoxigenación fotoinducida

En la bibliografía¹⁸¹ también se han descrito desoxigenaciones fotoinducidas que han permitido la síntesis de 2',3'-didesoxinucleósidos. Esta eliminación de alcoholes secundarios protegidos aromáticamente se consigue mediante un mecanismo por transferencia de electrones fotoinducido que utiliza derivados de carbazol como fotosensibilizadores (Esquema 40). Los fotosensibilizadores son moléculas que al ser irradiadas con luz pasan a un estado electrónicamente excitado, y que por sí mismas o por transferencia de energía, electrones o átomos de H a otro sustrato, generan especies altamente reactivas.



Esquema 40

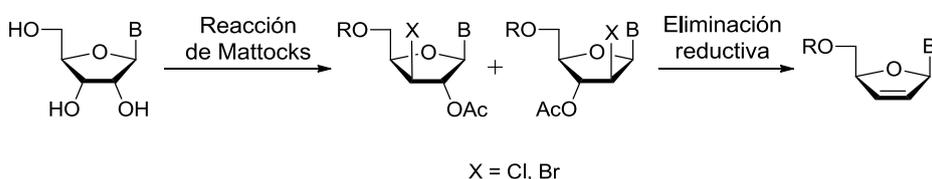
1.2.6. Eliminación reductiva

Una de las metodologías más utilizadas para la síntesis de 2',3'-dideshidro-2',3'-didesoxinucleósidos se basa en una transformación de

¹⁸¹ a) I. Saito, H. Ikehira, R. Kasatani, M. Watanabe, T. Matsuura. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 3115-3117; b) B. Shen, M. W. Bedore, A. Sniady, T. F. Jamison. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 7444-7446.

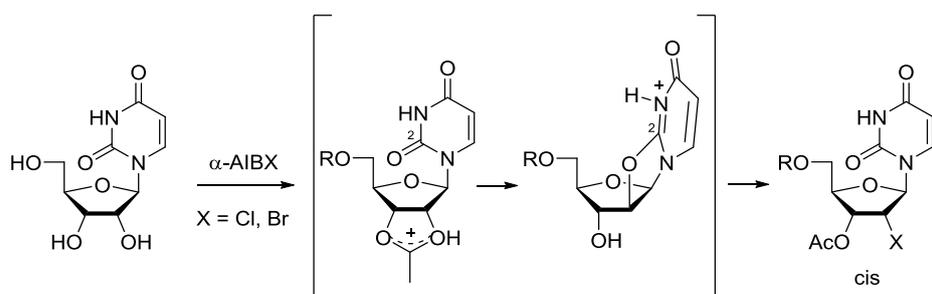
Antecedentes -----

Mattocks, que consiste en la reacción entre un diol y un haluro de α -acetoxiisobutirilo (α -AIBX) para dar lugar al correspondiente haloacetato con inversión de la configuración de uno de los átomos de carbono.^{175b,182} Posteriormente, una eliminación reductiva proporciona el alqueno (Esquema 41).



Esquema 41

El mecanismo de la reacción de Mattocks involucra la formación de un ion $2',3'$ -*O*-acetoxonio y si la base es pirimidínica se produce una reacción con el grupo carbonilo C-2 que origina una isomería *cis* inusual.



Esquema 42

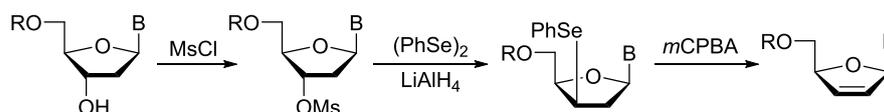
Después de la formación del derivado haloacetato, una eliminación reductiva *cis* o *trans* permite acceder al alqueno correspondiente. El

¹⁸² a) S. Greenberg, J. G. Moffatt. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95, 4016-4025; b) A. F. Russell, S. Greenberg, J. G. Moffatt, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95, 4025-4030; c) T. C. Jain, I. D. Jenkins, A. F. Russell, J. P. H. Verheyden, J. G. Moffatt. *J. Org. Chem.* **1974**, 39, 30-34; d) M. J. Robins, J. S. Wilson, D. Madej, N. H. Low, F. Hansske, S. F. Wnuk. *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 7902-7908, e) H. Shiragami, T. Ineyama, Y. Uchida, K. Izawa. *Nucleosides Nucleotides*, **1996**, 15, 47-58.

empleo de zinc o zinc/cobre para realizar esta transformación ha sido recurrente en la bibliografía.^{175b,183} Asimismo, también se han utilizado técnicas electroquímicas¹⁸⁴ o sales de cromo.¹⁸⁵ Sin embargo, con frecuencia se ha observado una descomposición parcial del nucleósido a través de un proceso de retroadición que termina con la pérdida de la base pirimidínica.

1.2.7. Otros métodos

Vial *et al.*¹⁸⁶ (Esquema 43) han sintetizado 2',3'-dideshidro-2',3'-didesoxinucleósidos mediante un método que parte de un 2'-desoxinucleósido con la función 5' protegida que se transforma con cloruro de mesilo en el derivado 3'-*O*-mesilato. A continuación, el grupo mesilo se desplaza con el ion PhSe^- , obtenido de la reacción entre $(\text{PhSe})_2$ y LiAlH_4 , dando lugar al derivado de fenilseleno. Este se oxida con ácido *m*-cloroperbenzoico formando un selenóxido que, tras una eliminación, proporciona el alqueno. Otros autores¹⁸⁷ han aplicado esta metodología pero formando el derivado de fenilseleno en α a partir del 2,3'-anhidronucleósido.



Esquema 43

¹⁸³ a) B. C. Chen, S. L. Quinlan, D. R. Stark, J. G. Reid, V. H. Audia, J. G. George, E. Eisenreich, S. P. Brundidge, S. Racha, R. H. Spector. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 7957-7960; b) B. C. Chen, S. L. Quinlan, J. G. Reid, R. H. Spector. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 729-732.

¹⁸⁴ a) R. Mengel, J. M. Seifert. *Tetrahedron Lett.* **1977**, 48, 4203-4206; b) Z. Guo, Y. S. Sanghvi, L. E. Brammer Jr, T. Hudlicky. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **2001**, 20, 1263-1266.

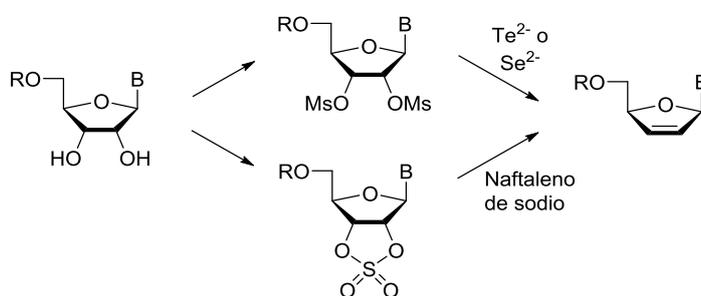
¹⁸⁵ T. C. Jain, I. D. Jenkins, A. F. Russell, J. P. H. Verheyden, J. G. Moffatt. *J. Org. Chem.* **1974**, 39, 30-38.

¹⁸⁶ J. M. Vial, P. Agback, J. Chattopadhyaya. *Nucleosides Nucleotides*, **1990**, 9, 245-258.

¹⁸⁷ a) N. D. P. Cosford, R. F. Schinazi. *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 2161-2165; b) B. V. Joshi, T. S. Rao, C. B. Reese. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1992**, 2537-2544.

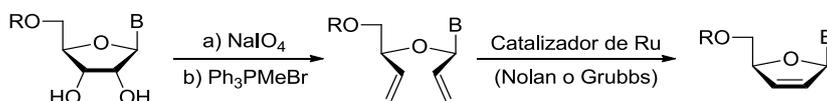
Antecedentes -----

Por otra parte, se han sintetizado 2',3'-dideshidronucleósidos a través de la transformación de ribonucleósidos en ésteres de 2',3'-*O*-sulfonilo¹⁸⁸ o 2',3'-sulfatos cíclicos¹⁸⁹ seguida de una eliminación reductiva con aniones metálicos o naftaleno de sodio (Esquema 44).



Esquema 44

Otras estrategias estudiadas para la síntesis de los derivados pirimidínicos han sido las reacciones de metátesis (Esquema 45).¹⁹⁰ El proceso sintético implica la formación de nucleósidos insaturados acíclicos cuyo tratamiento con catalizadores de rutenio permite la obtención de los compuestos deseados. No obstante, el elevado precio de estos catalizadores encarece considerablemente este tipo de métodos.



Esquema 45

¹⁸⁸ a) D. L. J. Clive, P. L. Wickens, P. W. M. Sgarbi. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 7426-7437; b) D. L. J. Clive, P. W. M. Sgarbi, P. L. Wickens. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 3751-3753.

¹⁸⁹ M. J. Robins, E. Lewandowska, S. F. Wnuk. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 7375-7381.

¹⁹⁰ a) I. Gillaizeau, I. M. Lagoja, S. P. Nolan, V. Aucagne, J. Rozenski, P. Herdewijn, L. A. Agrofoglio. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 666-671; b) D. F. Ewing, V. Glaçon, G. Mackenzie, D. Postelb, C. Len. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 941-945.

Objetivos

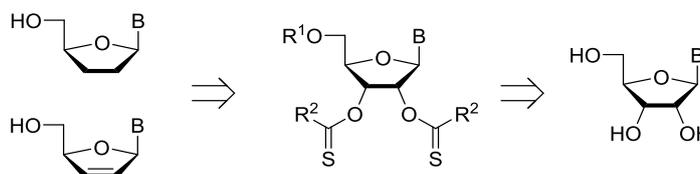
Considerando el problema de salud pública que suponen las infecciones por VIH en los países subdesarrollados, donde este virus sigue causando un alto porcentaje de mortalidad, se plantea el diseño de protocolos sintéticos mejorados respecto a los descritos en la bibliografía para la síntesis de nucleósidos comercializados para el tratamiento del VIH tales como estavudina, didanosina y zalcitabina.

El objetivo de este capítulo es el desarrollo de un proceso sintético general que permita la preparación tanto de 2',3'-dideshidro-2',3'-didesoxinucleósidos como de 2',3'-didesoxinucleósidos, de forma que se puedan obtener los tres fármacos anteriores y otros análogos nucleosídicos derivados de distintas bases heterocíclicas. El estudio se centrará en la puesta a punto de un procedimiento general, sencillo, económico y más sostenible con el propósito de facilitar el acceso de la población más vulnerable de países pobres de Asia y África a medicamentos efectivos para el tratamiento de la enfermedad.

Resultados y discusión

A lo largo de este capítulo se han presentado varios métodos para la síntesis de 2',3'-dideshidro-2',3'-didesoxinucleósidos y/o 2',3'-didesoxinucleósidos. Algunos de ellos se han desarrollado para una base heterocíclica concreta y otros de forma general para varias bases. Sin embargo, los reactivos empleados resultan poco adecuados para el objetivo del capítulo debido a su elevado precio y/o toxicidad.

A continuación, se presenta la puesta a punto de una ruta sintética que permite la obtención de dichos derivados de nucleósidos con distintas nucleobases a través de un procedimiento que implica una transformación de Barton-McCombie y que utiliza ribonucleósidos como sustratos de partida.



Esquema 46. Análisis retrosintético.

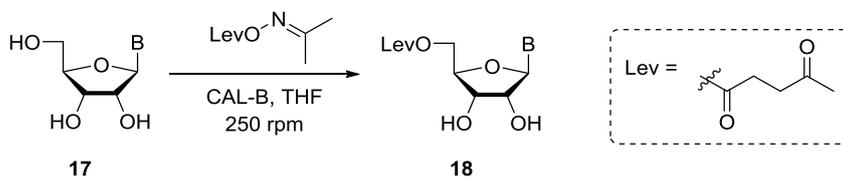
1. Estrategia quimioenzimática: síntesis del bisxantato

Para llevar a cabo la transformación de los grupos hidroxilo en las posiciones 2' y 3' del nucleósido, es necesario proteger previamente de manera selectiva el grupo hidroxilo primario en la posición 5'.

Resultados y discusión -----

Entre los grupos protectores disponibles, el levulinilo se utiliza con frecuencia para proteger los hidroxilos de las posiciones 3' y/o 5' de los nucleósidos. Entre otras razones, debido a su estabilidad y a que se puede escindir selectivamente sin afectar a otros grupos protectores presentes en la misma molécula.

Teniendo en cuenta la experiencia del grupo de investigación en la acilación enzimática regioselectiva de nucleósidos,¹⁹¹ se decide emplear el levulinilo como grupo protector para la posición 5' de los ribonucleósidos **17**. Para ello, se utiliza la lipasa de *Candida antártica* B (CAL-B), una enzima que ha mostrado una excelente regioselectividad para catalizar la acilación del grupo hidroxilo primario de varios derivados nucleosídicos (Esquema 47). Como agente de acilación se emplea levulinato de acetoxima, el cual se ha sintetizado a partir de acetoxima y ácido levulínico según las condiciones descritas.^{191a} Las reacciones se llevan a cabo en THF a 250 rpm, variando los equivalentes del donador de acilo, la temperatura y la concentración de sustrato en función del nucleósido de partida (Tabla 6). Esta protección se ha llevado a cabo tanto con sustratos estudiados previamente como con otros nuevos derivados de interés para el objetivo de este proyecto.



B = U (a), T (b), C (c), C^{Bz} (d), A (e), Hipoxantina (f)

Esquema 47

¹⁹¹ a) J. García, S. Fernández, M. Ferrero, Y. S. Sanghvi, V. Gotor. *Tetrahedron: Assymetry*. **2003**, *14*, 3533-3540; b) S. Martínez-Montero, S. Fernández, Y. S. Sanghvi, V. Gotor, M. Ferrero. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 6605-6613.

Tabla 6. Acilación enzimática regioselectiva de ribonucleósidos.

Entrada	Sustrato	T (°C)	conc (M)	t (h)	17 (%) ^a	18 (%) ^{a,b}	Otros compuestos acilados (%) ^a
1	17a ^c	30	0.1	2	-	>97 (80)	-
2	17b ^c	30	0.1	2.5	-	>97 (78)	-
3	17c ^d	55	0.025	54	26	53 (50)	21
4	17d ^d	55	0.025	24	-	>97 (93)	-
5	17e ^d	55	0.025	48	10	70 (42)	20
6	17f ^d	55	0.025	90	-	87 (40)	13

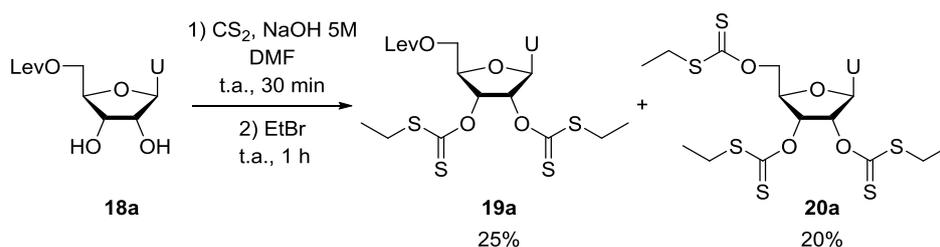
^aPorcentaje de compuestos calculado por ¹H RMN. ^bRendimiento aislado mostrado en cursiva entre paréntesis. ^c3 equiv de levulinato de acetoxima y relación de **17**:CAL-B, 1:1 (p/p). ^d9 equiv de levulinato de acetoxima y relación de **17**:CAL-B, 1:2 (p/p).

La acilación enzimática de uridina (**17a**) y 5-metiluridina (**17b**) con 3 equiv de levulinato de acetoxima en presencia de CAL-B, a 30 °C, proporciona los ésteres 5'-*O*-levulinilo **18a** y **18b** con excelente regioselectividad y altos rendimientos en tiempos de reacción cortos (entradas 1 y 2, Tabla 6). Sin embargo, la reacción con citidina (**17c**) es más lenta y no se consigue una conversión completa, a pesar de utilizar tiempos de reacción largos, una temperatura más elevada, condiciones más diluídas, gran exceso de agente acilante (9 frente a 3 equiv) y mayor relación de sustrato:CAL-B, 1:2 (p/p); además, se observa la acilación de los hidroxilos secundarios (entrada 3, Tabla 6). Esta baja reactividad probablemente se deba a la escasa solubilidad del nucleósido de partida en el medio de reacción, de manera que se lleva a cabo la reacción de acilación enzimática de la citidina protegida en el grupo amino de la base heterocíclica con el grupo benzoílo. La CAL-B cataliza regioselectivamente la acilación de **17d**, aislándose el ester **18d** tras 24 h de reacción a 55 °C con un 93% de rendimiento (entrada 4, Tabla 6). También se ha observado (entrada 5, Tabla 6) una selectividad moderada y ausencia de conversión completa cuando el sustrato es adenosina (**17e**), que se ha atribuido igualmente a la baja solubilidad de este compuesto en

Resultados y discusión -----

el medio de reacción. En el caso de la inosina (**17f**) se necesitan tiempos largos de reacción para obtener una conversión completa, y aunque la formación de otros productos de acilación ocurre en baja proporción (entrada 7, Tabla 6), se obtiene con bajo rendimiento el éster **18f** tras su purificación mediante cromatografía de columna.

A continuación, se estudia la transformación de los 5'-*O*-levulinilribonucleósidos **18** en los correspondientes bisxantatos por reacción con CS₂, seguida de alquilación con bromoetano (EtBr), un reactivo más seguro y barato que otros agentes de alquilación utilizados previamente por otros autores como MeI o 3-bromopropanonitrilo. Para ello, sobre una disolución del compuesto **18a** en DMF se añade CS₂ y NaOH 5 M y se agita durante 30 min a temperatura ambiente (Esquema 48). A continuación, se añade EtBr y se agita durante 1 h. Se obtiene el bisxantato deseado **19a** con un rendimiento bajo del 25% debido a que se forma como subproducto el compuesto **20a**, resultante de la reacción del hidroxilo primario, que se ha desprotegido en las condiciones de reacción.



Esquema 48

Para evitar la desprotección del grupo levulinilo se decide modificar la base y emplear una más voluminosa, *tert*-butóxido de potasio (^tBuOK). Así, se añade una disolución acuosa de ^tBuOK sobre una disolución de **18a** y CS₂ en DMF, seguida de la adición de EtBr. En estas condiciones, se observa una mezcla de productos que no se consigue separar e

identificar. Por ello, se considera añadir el ^tBuOK sólido directamente al medio, sin formar una disolución previa, pero no se observa evolución de la reacción, debido a la baja solubilidad de esta base en la DMF utilizada como disolvente. Otra base estudiada ha sido K₂CO₃, con la que tampoco se percibe evolución de la reacción, recuperándose inalterado el sustrato de partida.

Puesto que las bases inorgánicas anteriores no han proporcionado los resultados deseados, se decide emplear dos bases orgánicas no nucleofílicas: *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA), con la que no se observa ninguna transformación, y 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU), que origina mezclas complejas de compuestos que no se consiguen separar ni identificar.

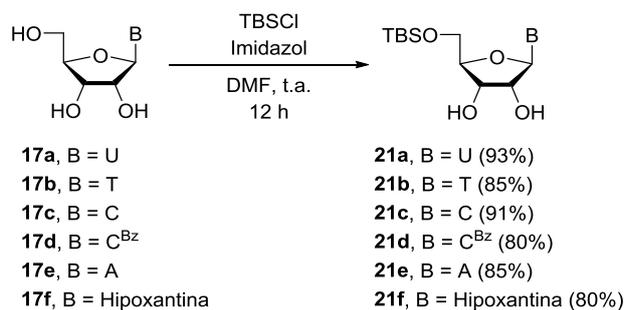
En vista de estos resultados, se plantea la utilización de un derivado imidazoiltiocarbonil para llevar a cabo la reacción de desoxigenación de Barton-McCombie, esperando que su formación sea compatible con el grupo levulinilo presente en el hidroxilo primario. Así, sobre una disolución de **18a** en THF se añade 1,1'-ticarbonildiimidazol (TCDI). A pesar de que tras 12 h no se observa sustrato de partida, se obtienen mezclas de productos que no se consiguen identificar.

Teniendo en cuenta las dificultades encontradas tanto en la acilación enzimática de algunos sustratos nucleosídicos como en la formación de los derivados bisxantatos, se descarta la utilización del levulinilo como grupo protector de la posición 5'.

2. Síntesis de 2',3'-dideshidro-2',3'-didesoxinucleósidos

2.1. Protección del hidroxilo primario como éter de silicio

El empleo de TBSCl para la protección regioselectiva del hidroxilo primario en nucleósidos ha sido ampliamente utilizado en la bibliografía.¹⁹² Así, los ribonucleósidos **17** se tratan con TBSCl e imidazol en DMF y se dejan reaccionar durante 12 h a temperatura ambiente (Esquema 49). Los derivados **21** se obtienen con rendimientos de muy buenos a excelentes y con la pureza suficiente para llevar a cabo la siguiente etapa sin necesidad de columna cromatográfica.



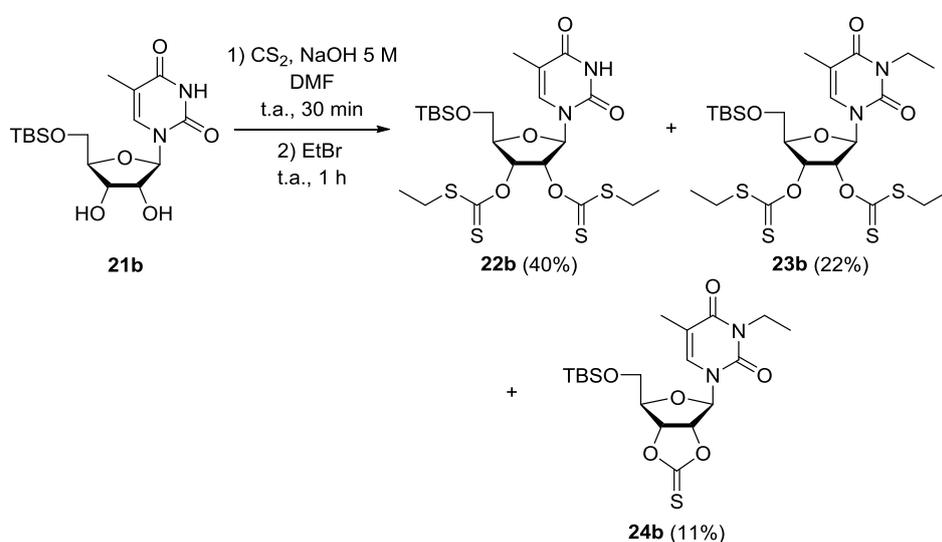
Esquema 49

2.2. Reacción de formación de bisxantatos

La siguiente etapa de la estrategia sintética consiste en la formación de los correspondientes bisxantatos por reacción con CS₂, seguida de alquilación con EtBr. En primer lugar, se realiza esta transformación con el derivado de 5-metiluridina **21b** disuelto en DMF, sobre el que se añaden 14 equiv de CS₂ y NaOH 5 M. Se agita durante 30 min a temperatura ambiente y, a continuación, se añaden 25 equiv de EtBr y se agita durante 1 h. El resultado es el aislamiento de tres productos

¹⁹² a) S. Debarge, J. Balzarini, A. R. Maguire. *J. Org. Chem.* **2011**, 76, 105-126; b) J.-L. Panayides, V. Mathieu, L. M. Y. Banuls, H. Apostolellis, N. Dahan-Farkas, H. Davids, L. Harmse, M. E. C. Rey, I. R. Green, S. C. Pelly. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, 24, 2716-2724.

(Esquema 50): el bisxantato deseado **22b**, que se aísla con un rendimiento del 40%; el bisxantato **23b**, resultado de la alquilación en la posición N-3 (22% de rendimiento), y el tionocarbonato **24b** con el grupo etilo en N-3 (11% de rendimiento).



Esquema 50

Debido a esta alquilación secundaria en la posición N-3 de la base heterocíclica, se decide realizar un estudio exhaustivo de las condiciones de reacción para minimizar la formación de los subproductos (Tabla 7).

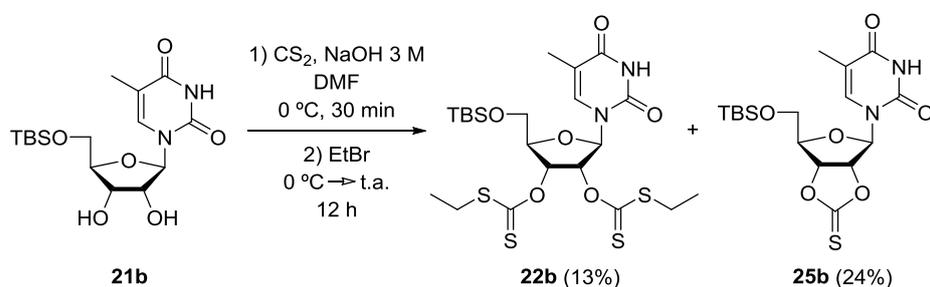
Tabla 7. Reacción de **21b** con CS₂/NaOH/EtBr.

Ent	Etapa 1		Etapa 2		Compuestos (%) ^{e,f}				
	NaOH (eq)	CS ₂ (eq)	EtBr (eq)	t (min)	21b	22b	23b	24b	25b
1 ^{a,c}	4.5	14	25	60	-	40	22	11	-
2 ^{b,c}	4.5	14	25	60	-	40	15	7	-
3 ^{b,d}	3	14	25	60	-	56	13	4	-
4 ^{b,d}	2	14	25	720	40	13	-	-	24
5 ^{b,d}	3	7	15	45	-	62	38	-	-
6 ^{b,d}	3	7	15	30	-	87	13	-	-
7 ^{b,d}	3	7	15	20	-	>97 (81)	-	-	-

^aPrimera etapa y adición de EtBr a t.a. ^bPrimera etapa y adición de EtBr a 0 °C. ^cConcentración 5 M de NaOH. ^dConcentración 3 M de NaOH. ^ePorcentaje de compuestos calculado por ¹H RMN. ^fRendimiento aislado mostrado en cursiva.

Resultados y discusión -----

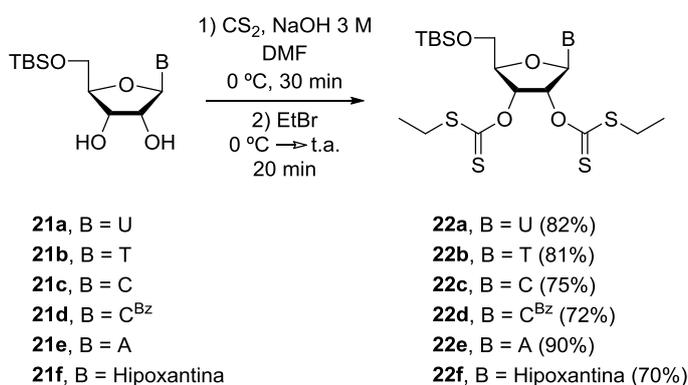
La disminución de la temperatura a 0 °C tanto en la primera etapa como en la adición del EtBr, reduce la formación de los subproductos (entrada 2, Tabla 7). Esta modificación junto con la disminución de la concentración de la disolución acuosa de NaOH, de 5 M a 3 M, y del número de equivalentes añadidos (3 frente a 4.5 equiv) permite optimizar ligeramente la formación de **22b**, que se aísla con un 56% de rendimiento (entrada 3, Tabla 7). Sin embargo, cuando se utilizan 2 equiv de NaOH 3 M no se obtiene conversión completa y se forma, además de **22b**, el tionocarbonato **25b** (Esquema 51), independientemente de que se prolongue el tiempo de reacción (entrada 4, Tabla 7). Con este resultado se decide fijar el empleo de 3 equiv de NaOH 3 M y modificar otros parámetros.



Esquema 51

La disminución de la cantidad de CS₂ (7 equiv) y de EtBr (15 equiv), y del tiempo de reacción de la segunda etapa, conllevan una mejora de los resultados (entradas 5-7, Tabla 7). De manera que tras 20 min de reacción con EtBr se observa conversión completa y ausencia de subproductos, obteniéndose **22b** con 81% de rendimiento. Si se disminuyen aún más los equiv de los reactivos y/o el tiempo de reacción se obtiene **25b** como subproducto y no conduce a conversión completa.

Estas condiciones optimizadas se han extendido a derivados con otras bases heterocíclicas, originándose los correspondientes bisxantatos **22a-f** con altos rendimientos (Esquema 52).



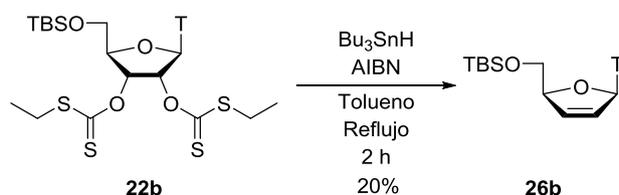
Esquema 52

Es importante destacar que los compuestos **22a-f** se aíslan con el grado de pureza suficiente para llevar a cabo la siguiente etapa mediante un lavado exhaustivo con heptano, no siendo necesaria una purificación posterior mediante cromatografía en columna.

2.3. Reducción radicalaria

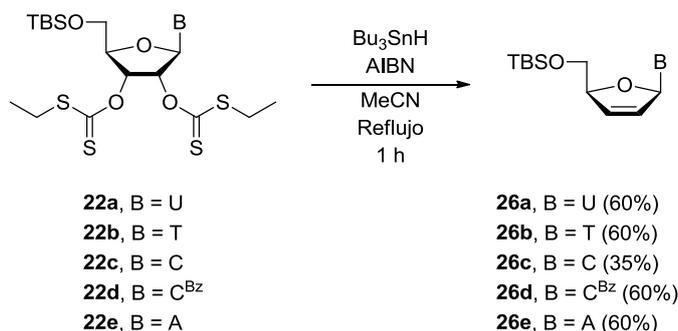
Los hidruros de organoestaño, especialmente el hidruro de tributilestaño (Bu_3SnH), han desempeñado un papel importante como fuentes de hidrógeno radicalario ($\text{H}\cdot$). Por ello, la reducción de los bisxantatos **22** se lleva a cabo utilizando Bu_3SnH y 2,2'-azobis(isobutironitrilo) (AIBN) como iniciador de radicales. Así, el tratamiento de **22b** con Bu_3SnH y AIBN en tolueno a reflujo durante 2 h da lugar a **26b**, pero con un rendimiento bajo del 20% (Esquema 53).

Resultados y discusión -----



Esquema 53

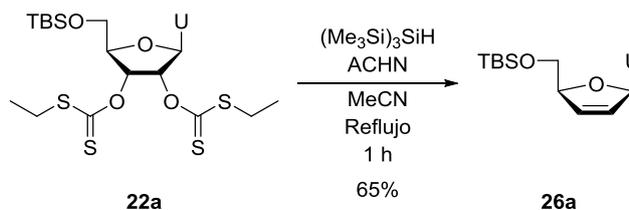
Se obtienen mejores resultados cuando se utiliza MeCN en lugar de tolueno como disolvente de la reacción, obteniéndose el 2',3'-dideshidronucleósido **26b** con un 60% de rendimiento tras 1 h de reacción (Esquema 54).



Esquema 54

Se ha extendido esta reacción al resto de los análogos. La reducción del derivado de uracilo **22a** también conduce al 2',3'-dideshidronucleósido **26a** con un rendimiento de 60%. Para el caso de los derivados de citidina **22c** y **22d**, se obtienen mejores resultados cuando la base está protegida (35% de rendimiento para **26c** frente a 60% para **26d**), por lo que resulta más conveniente continuar el procedimiento sintético con el análogo protegido **26d**. La reacción con el derivado de adenosina **22e** proporciona resultados similares. Sin embargo, no ha sido posible llevar a cabo la reducción del derivado de inosina **22f**, ya que se genera una mezcla de productos que no se consigue identificar.

Con vistas a una futura aplicación industrial de nuestro método sintético y con el fin de hacer el proceso más sostenible, se busca una alternativa a la utilización de Bu_3SnH y, así, evitar la formación de compuestos orgánicos de estaño tóxicos y difíciles de eliminar, que suponen un inconveniente para la industria farmacéutica. Se plantea la utilización de un organosilano, tris(trimetilsilil)silano $[(\text{Me}_3\text{Si})_3\text{SiH}]$,¹⁹³ como agente reductor radicalario. También se decide considerar la sustitución de AIBN por otro iniciador de radicales térmico, el 1,1'-azobis(ciclohexanocarbonitrilo) (ACHN), que presenta una vida media más larga. Para ello, se emplea como sustrato modelo el derivado de uridina **22a**, cuyo tratamiento con $(\text{Me}_3\text{Si})_3\text{SiH}$ y ACHN en MeCN a reflujo proporciona el 2',3'-dideshidronucleósido **26a** con un 65% de rendimiento, ligeramente superior al obtenido con el protocolo anterior (Esquema 55). Teniendo en cuenta este resultado, la utilización de estos reactivos supone una mejora considerable en la estrategia sintética propuesta para la síntesis de estos análogos de nucleósido.



Esquema 55

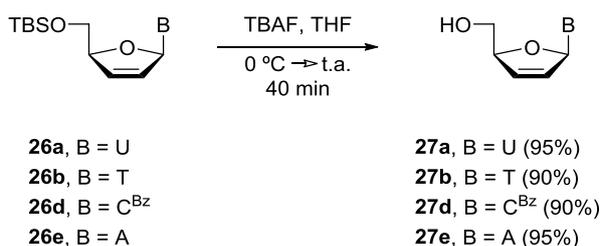
2.4. Desprotección del grupo hidroxilo

Para obtener los 2',3'-dideshidro-2',3'-didesoxinucleósidos es necesaria la desprotección del éter de silicio de la posición 5'. El tratamiento de los derivados **26** con fluoruro de tetrabutilamonio (TBAF) en THF a temperatura ambiente da lugar a los análogos **27** con 90-95%

¹⁹³ C. Chatgililoglu. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 2310-2320.

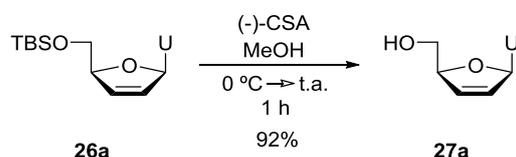
Resultados y discusión -----

de rendimiento (Esquema 56). Cabe destacar que el compuesto **27b** es el fármaco estavudina (d4T), utilizado en el tratamiento del VIH.



Esquema 56

Con el objetivo de enmarcar el procedimiento sintético dentro de la química sostenible se plantea una desprotección alternativa utilizando ácido canforsulfónico [(-)-CSA],¹⁹⁴ un ácido derivado del alcanfor, con baja sensibilidad al aire, compatible con el agua y respetuoso con el medio ambiente. Así, se emplea el derivado de uridina **26a** como sustrato modelo (Esquema 57). Su tratamiento con (-)-CSA en MeOH conduce al 2',3'-dideshidro-2',3'-didesoxinucleósido **27a** con un 92% de rendimiento. Este protocolo supone una alternativa de desprotección del grupo TBS para aplicar al resto de derivados.

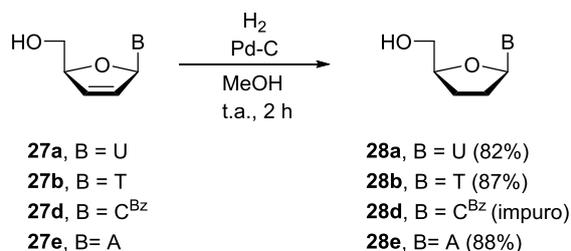


Esquema 57

¹⁹⁴ a) G. Brahmachari, K. Nurjamal, I. Karmakar, M. Mandal. *Curr. Organocatal.* **2018**, 5, 165-181; b) M. Fehr, A. Appl, D. J. Esdaile, S. Naumann, M. Schulz, I. Dahms. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **2020**, 858-860, 503257.

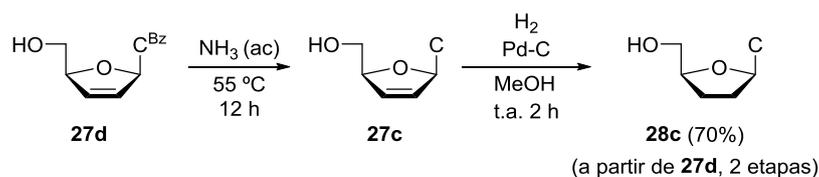
3. Síntesis de 2',3'-didesoxinucleósidos

Una vez que se han sintetizado los 2',3'-dideshidro-2',3'-didesoxinucleósidos **27**, su hidrogenación utilizando paladio sobre carbono (Pd-C) como catalizador y metanol como disolvente, permite la obtención de los correspondientes 2',3'-didesoxinucleósidos **28a,b,e** con excelentes rendimientos (Esquema 58).



Esquema 58

La reacción de hidrogenación del derivado de *N*⁴-benzoilcitidina **27d** tiene lugar en las condiciones indicadas, pero no ha sido posible aislar el derivado saturado **28d** puro, observándose en el espectro de ¹H-RMN mezclas del compuesto deseado y el azúcar libre. Por ello, se decide invertir el orden de las etapas consideradas en un primer momento para la preparación del fármaco zalcitabina (**28c**, Esquema 59). De manera que se realiza primero la desprotección del grupo benzoílo mediante el tratamiento de **27d** con una disolución de amoníaco acuoso a 55 °C para, posteriormente, llevar a cabo la hidrogenación en las condiciones anteriores, obteniéndose **28c** con un 70% de rendimiento.

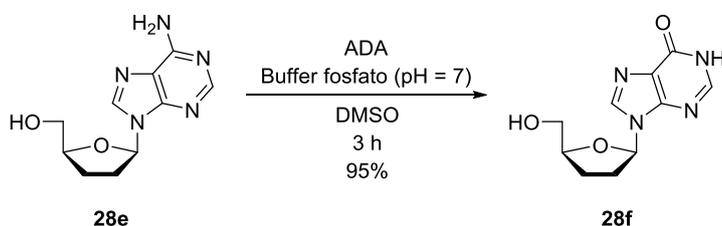


Esquema 59

3.1. Síntesis de didanosina por desaminación enzimática

La adenosina desaminasa (ADA) es una enzima que interviene en el metabolismo de las purinas en nuestro organismo, catalizando la desaminación de la adenosina y la desoxiadenosina a inosina y desoxiinosina, respectivamente.

A pesar de que la metodología sintética propuesta en este capítulo no ha sido aplicable cuando la base heterocíclica es hipoxantina, se ha podido acceder al fármaco ddI (**28f**) a través de la desaminación enzimática del análogo de adenosina.¹⁹⁵ Así, el tratamiento de **28e** con ADA en una disolución tampón fosfato 0.10 M (pH 7) y 3% de DMSO proporciona el 2',3'-didesoxinucleósido **28f** con un rendimiento casi cuantitativo tras 3 h de reacción a 250 rpm (Esquema 60).

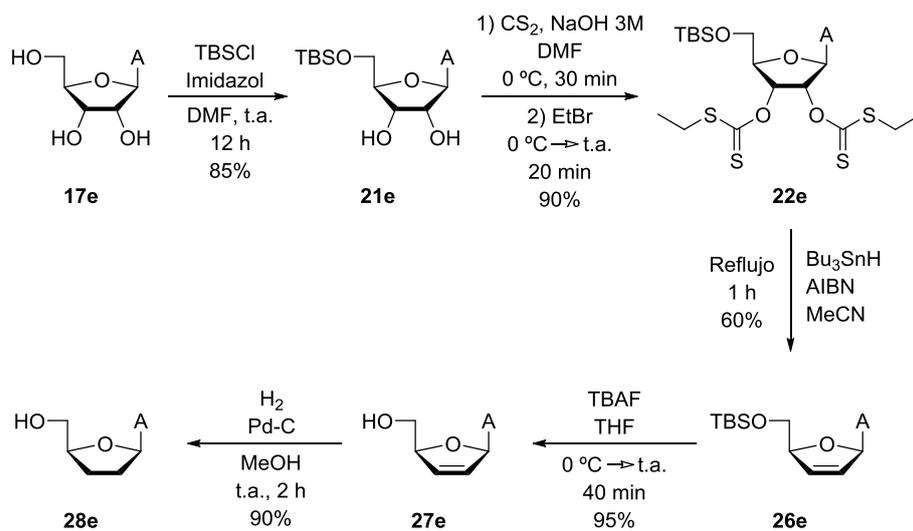


Esquema 60

4. Escalado del proceso sintético

Con el objetivo de estudiar la escalabilidad del proceso sintético desarrollado, se han sintetizado 2',3'-dideshidro-2',3'-didesoxiadenosina (**27e**) y 2',3'-didesoxiadenosina (**28e**) en una escala de 5 g de sustrato de partida. Como se recoge en el Esquema 61, se reproducen los resultados obtenidos a pequeña escala.

¹⁹⁵ E. Santaniello, P. Ciuffreda, L. Alessandrini. *Synthesis* **2005**, 509-526.



Esquema 61. Síntesis de los derivados de adenosina **27e** y **28e**.

Conclusiones

Se describe la puesta a punto de un procedimiento sintético general que permite la obtención de 2',3'-dideshidro-2',3'-didesoxinucleósidos y 2',3'-didesoxinucleósidos con distintas bases heterocíclicas.

Esta ruta sintética utiliza los ribonucleósidos como sustratos de partida, aprovechando su estructura de dioles vecinales para llevar a cabo una desoxigenación *via* bisxantatos que proporciona los 2',3'-dideshidro-2',3'-didesoxinucleósidos, los cuales pueden hidrogenarse fácilmente para dar lugar a los correspondientes 2',3'-didesoxinucleósidos.

Se han estudiado reactivos más respetuosos con el medio ambiente para la hidrogenación radicalaria y para la desprotección del grupo hidroxilo primario como éter de silicio, que podrían ser aplicables para todos los derivados y que emplazan el proceso dentro de la química sostenible.

A pesar de que el procedimiento no ha sido adecuado cuando la base es hipoxantina, la 2',3'-didesoxiinosina se ha podido preparar con un rendimiento prácticamente cuantitativo y tiempo corto de reacción a partir de una desaminación enzimática del derivado de adenosina con la enzima adenosina desaminasa.

Resulta importante destacar que, además de otros derivados, se ha conseguido la síntesis de los tres fármacos anti-VIH objetivo: estavudina (d4T), zalcitabina (ddC) y didanosina (ddI).

Conclusiones -----

También se ha demostrado la escalabilidad del proceso, utilizando la adenosina como sustrato modelo e iniciando la ruta sintética con 5 g, reproduciéndose los resultados que se habían obtenido a pequeña escala.

Parte Experimental

1. Condiciones de trabajo, disolventes y reactivos

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

- 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.
- La adenosina desaminasa (ADA) (2-5 unidades/mg) ha sido adquirida a Creative Enzymes y se utiliza como una preparación liofilizada a partir de intestino vacuno.
- Las reacciones enzimáticas se han llevado a cabo en agitadores orbitales a 250 rpm.
- En las reacciones enzimáticas, el cálculo de los porcentajes de cada compuesto en el crudo de reacción se ha realizado mediante ^1H -RMN.

2. Técnicas instrumentales

Las técnicas utilizadas en la realización de este capítulo han sido detalladas en el capítulo anterior.

3. Procedimientos experimentales

En este apartado se describen con detalle los procedimientos empleados en la síntesis de los compuestos de este capítulo.

3.1. Acilación enzimática. Síntesis de 18

Bajo nitrógeno, se adiciona THF anhidro a un erlenmeyer que contiene el ribonucleósido **17** (0.2 mmol), levulinato de acetoxima y CAL-B (relación de agente acilante, relación de enzima, concentración, temperatura y tiempo se indican en la Tabla 6). La reacción se agita a 250 rpm y se sigue mediante TLC (10% MeOH/CH₂Cl₂). La enzima se filtra, se lava con CH₂Cl₂ y MeOH, y los disolventes se eliminan a presión reducida. El crudo de reacción se purifica por cromatografía en columna (gradiente de eluyentes 2-5% MeOH/CH₂Cl₂), obteniéndose los correspondientes ribonucleósidos acilados **18a-f** (rendimientos indicados en la Tabla 6).

3.2. Protección con TBSCl. Síntesis de 21

Sobre una disolución del ribonucleósido **17** (0.4 M para **17a,b**, y 0.2 M para **17c-f**) en DMF anhidra, se añade imidazol (2.4 equiv) y TBSCl (1.2 equiv). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 12 h. A continuación, se adiciona AcOEt y se lava con agua; la fase orgánica se seca con Na₂SO₄, se filtra y se evapora a presión reducida. Los compuestos **21** se obtienen con los siguientes rendimientos: 93% para **21a**, 85% para **21b**, 91% para **21c**, 80% para **21d**, 85% para **21e** y 80% para **21f**. En caso de no obtener el producto lo suficientemente puro, se purifica mediante columna cromatográfica adicional utilizando como eluyente un gradiente (5-10% MeOH/CH₂Cl₂).

3.3. Formación de los bisxantatos **22**

Sobre una disolución de **21** y CS₂ (7 equiv) en DMF (0.4 M) a 0 °C, se añade gota a gota NaOH 3 M (3 equiv) y se agita durante 30 min a esta temperatura. A continuación, se añade lentamente EtBr (15 equiv) a 0 °C y se agita a temperatura ambiente durante 20 min. Posteriormente, se añade AcOEt y el residuo se lava con agua; la fase orgánica se seca con Na₂SO₄, se filtra y los disolventes se eliminan a presión reducida. El sólido resultante se lava exhaustivamente con heptano, siendo el crudo de la reacción lo suficientemente puro para llevar a cabo la siguiente etapa sin necesidad de una purificación posterior mediante cromatografía en columna. Los compuestos **22** se obtienen con los siguientes rendimientos: 82% para **22a**, 81% para **22b**, 75% para **22c**, 72% para **22d**, 90% para **22e** y 70% para **22f**.

3.4. Desoxigenación con Bu₃SnH. Síntesis de **26**

Sobre una disolución de **22** en MeCN anhidro (0.13 M) a reflujo, se añade gota a gota una disolución de Bu₃SnH (4 equiv) y AIBN (0.4 equiv) en MeCN anhidro (0.5 M). La reacción se agita a reflujo durante 1 h. A continuación, el disolvente se elimina a presión reducida y el crudo se purifica por cromatografía en columna utilizando los siguientes gradientes de eluyentes: 40-50% AcOEt/Hexano para **26a,b**; 70-100% AcOEt/Hexano para **26d**; y 2-5% MeOH/CH₂Cl₂ para **26c** y **26e**. Los análogos **26a**, **26b**, **26d** y **26e** se aíslan con un 60% de rendimiento y el análogo **26c** con un 35% de rendimiento.

3.5. Desoxigenación con (Me₃Si)₃SiH. Síntesis de **26a**

Sobre una disolución de **22a** (40 mg, 0.07 mmol) en MeCN anhidro (0.5 ml) a reflujo, se añade gota a gota una disolución de (Me₃Si)₃SiH (54 µl, 0.18 mmol) y 1,1'-azobis(ciclohexanocarbonitrilo) (7 mg, 0.03 mmol) en MeCN anhidro (0.5 ml). La reacción se mantiene en agitación

Parte Experimental -----

a reflujo durante 1 h. A continuación, el disolvente se elimina a presión reducida y el crudo se purifica mediante columna cromatográfica utilizando como eluyente un gradiente de 40-50% AcOEt/Hexano. El compuesto **26a** se aísla con un 65% de rendimiento.

3.6. Desprotección del éster de silicio con TBAF. Síntesis de 27

Sobre una disolución de **26** en THF anhidro (0.1 M) a 0 °C se añaden 2 equiv de TBAF (1.0 M en THF). La reacción se deja agitando hasta alcanzar temperatura ambiente. Tras 40 min, se eliminan los disolventes a presión reducida y el crudo se purifica mediante columna cromatográfica utilizando como eluyente 5% MeOH/CH₂Cl₂ para **27a**, **27b** y **27d**, y 15% MeOH/CH₂Cl₂ para **27e**. Los compuestos **27** se aíslan con los siguientes rendimientos: 95% para **27a,e** y 90% para **27b,d**.

3.7. Desprotección del éster de silicio con (-)-CSA. Síntesis de 27a

Sobre una disolución de **26a** (30 mg, 0.06 mmol) en MeOH anhidro (1 ml) a 0 °C se añade (-)-CSA (14 mg, 0.06 mmol). La mezcla se agita durante 5 min a esta temperatura y después se deja a temperatura ambiente durante 1 h. A continuación, se añade NaHCO₃ sólido y se mantiene en agitación durante 5 min. Se evapora el disolvente a presión reducida y el residuo se purifica por cromatografía de columna utilizando como eluyente 5% MeOH/CH₂Cl₂, aislándose **26a** con un 92% de rendimiento.

3.8. Hidrogenación del doble enlace. Síntesis de 28

Sobre una mezcla del compuesto **27** y 10% Pd/C (0.1 equiv) en MeOH anhidro (0.02 M), se crea vacío para posteriormente introducir un globo portador de hidrógeno. La reacción se mantiene con una fuerte agitación magnética durante 2 h bajo la atmósfera de hidrógeno. El residuo se filtra sobre Celite[®] y se elimina el disolvente a presión

reducida. A continuación, el crudo se purifica mediante cromatografía de columna utilizando un gradiente de eluyentes 2-10% MeOH/CH₂Cl₂. Los didesoxinucleósidos **28** se obtienen con los siguientes rendimientos: 82% para **28a**, 87% para **28b** y 88% para **28e**.

3.9. Síntesis de zalcitabina (**28c**)

Una suspensión de **27d** (50 mg, 0.16 mmol) en una disolución acuosa al 32% de NH₃ (2.5 ml) se agita a 55 °C durante 12 h. Se elimina el disolvente a presión reducida. A continuación, sobre una mezcla del residuo resultante y 10% Pd/C (17 mg) en MeOH anhidro (8 ml), se crea vacío y se introduce un globo portador de hidrógeno. La reacción se mantiene con una fuerte agitación magnética durante 2 h bajo la atmósfera de hidrógeno. El residuo se filtra sobre Celite[®] y se elimina el disolvente a presión reducida. Posteriormente, el crudo se purifica mediante cromatografía de columna utilizando 20% MeOH/CH₂Cl₂ como eluyente. La columna se empaqueta previamente con sílica gel neutralizada con una disolución de 10% Et₃N en MeOH:CH₂Cl₂ (2:8, v:v). El didesoxinucleósido **28c** se aísla con un 70% de rendimiento.

3.10. Desaminación enzimática. Síntesis de didanosina (**28f**)

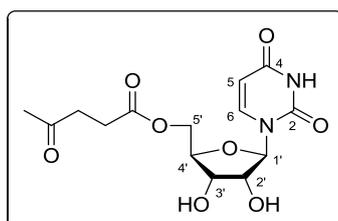
Sobre una suspensión de **28e** (40 mg, 0.17 mmol) en un tampón fosfato pH 7 (0.8 ml) y un 3% de DMSO, para favorecer la disolución del sustrato, se añaden 2 mg de ADA disuelta en el mismo tampón (0.2 ml). La reacción se agita a 250 rpm y 30 °C durante 3 h. El crudo se purifica mediante columna cromatográfica utilizando como eluyente 10% MeOH/CH₂Cl₂, aislándose **28f** con un 95% de rendimiento.

4. Datos experimentales

A continuación se recogen los datos experimentales que han permitido la caracterización de los compuestos sintetizados en este capítulo.

Parte Experimental -----

5'-*O*-Levulinil- β -D-uridina (18a)



Sólido blanco

P_f: 60-62 °C

R_f: 0.32 (10% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₁₄H₁₈N₂O₈

Masa molecular: 342.30 g/mol

IR (KBr): 3172, 2920, 2850, 1650, 1460 cm⁻¹.

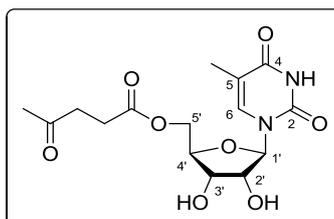
¹H-RMN (300.13 MHz, CDCl₃): δ 2.18 (s, 3H, *Me*-Lev), 2.58 (t, 2H, CH₂-Lev, *J* = 6.2 Hz), 2.78 (t, 2H, CH₂-Lev, *J* = 6.0 Hz), 4.19 (m, 1H, H_{3'}), 4.27 (m, 2H, H_{2'} + H_{4'}), 4.36 (m, 2H, H_{5'}), 5.78 (d, 1H, H₅, *J* = 8.1 Hz), 5.82 (d, 1H, H_{1'}, *J* = 3.6 Hz), 7.66 (d, 1H, H₆, *J* = 8.1 Hz) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): δ 28.0 (CH₂-Lev), 29.9 (CH₃-Lev), 38.0 (CH₂-Lev), 63.6 (C_{5'}), 70.3 (C_{3'}), 75.0 (C_{2'}), 82.3 (C_{4'}), 90.6 (C_{1'}), 102.7 (C₅), 140.5 (C₆), 151.4 (C₂), 164.2 (C₄), 172.8 (CO-Lev), 207.6 (CO-Lev) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₁₄H₁₉N₂O₈ [M+H]⁺: 343.1136. Encontrada: 343.1131
- Calculada para C₁₄H₁₈N₂NaO₈ [M+Na]⁺: 365.0955. Encontrada: 365.0954
- Calculada para C₁₄H₁₈KN₂O₈ [M+K]⁺: 381.0695. Encontrada: 381.0694

5'-O-Levulinil-β-D-5-metiluridina (18b)



Sólido blanco

P_f: 134-136 °C

R_f: 0.33 (10% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₁₅H₂₀N₂O₈

Masa molecular: 356.33 g/mol

¹H-RMN (300.13 MHz, CDCl₃): δ 1.88 (s, 3H, *Me*), 2.19 (s, 3H, *Me*-Lev), 2.59 (t, 2H, CH₂-Lev, *J* = 6.3), 2.80 (t, 2H, CH₂-Lev, *J* = 6.3), 4.19 (m, 1H, H_{3'}), 4.23-4.37 (varios m, 3H, H_{2'} + H_{4'} + H_{5'}), 4.45 (dd, 1H, H_{5'}, *J* = 12.3, 3.7 Hz), 5.84 (d, 1H, H_{1'}, *J* = 3.7 Hz), 7.41 (s, 1H, H₆) ppm.

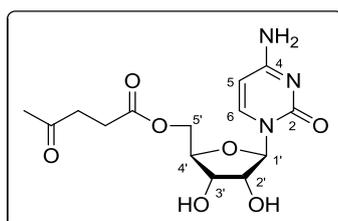
¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ 12.5 (CH₃), 28.9 (CH₂-Lev), 29.6 (CH₃-Lev), 38.6 (CH₂-Lev), 64.8 (C_{5'}), 71.3 (C_{3'}), 74.9 (C_{2'}), 83.1 (C_{4'}), 91.1 (C_{1'}), 111.8 (C₅), 138.0 (C₆), 152.5 (C₂), 166.3 (C₄), 174.2 (CO-Lev), 209.5 (CO-Lev) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₁₅H₂₁N₂O₈ [M+H]⁺: 357.1292. Encontrada: 357.1279
- Calculada para C₁₅H₂₀N₂NaO₈ [M+Na]⁺: 379.1112. Encontrada: 379.1098
- Calculada para C₁₅H₂₀KN₂O₈ [M+K]⁺: 395.0851. Encontrada: 395.0837

Parte Experimental -----

5'-*O*-Levulinil- β -D-citidina (18c)



Sólido blanco

P_f: 53-55 °C

R_f: 0.35 (20% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₁₄H₁₉N₃O₇

Masa molecular: 341.32 g/mol

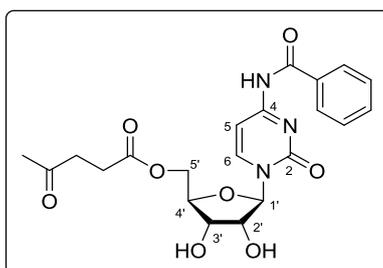
¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 2.17 (s, 3H, *Me*-Lev), 2.59 (t, 2H, CH₂-Lev, *J* = 5.9 Hz), 2.84 (t, 2H, CH₂-Lev, *J* = 6.8 Hz), 4.08 (dd, 1H, H₃, *J* = 6.3, 5.3 Hz), 4.16 (m, 2H, H₂ + H₄), 4.33 (dd, 1H, H₅, *J* = 12.3, 4.1 Hz), 4.40 (dd, 1H, H₅, *J* = 12.4, 2.9 Hz), 5.84 (d, 1H, H₅, *J* = 3.2 Hz), 5.95 (d, 1H, H₁, *J* = 7.5 Hz), 7.81 (d, 1H, H₆, *J* = 7.5 Hz) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ 28.8 (CH₂-Lev), 29.6 (CH₃-Lev), 38.6 (CH₂-Lev), 64.5 (C₅'), 71.0 (C₃'), 75.9 (C₂'), 82.7 (C₄'), 92.6 (C₁'), 96.2 (C₅), 142.5 (C₆), 158.2 (C₂), 167.6 (C₄), 174.2 (CO-Lev), 209.5 (CO-Lev) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₁₄H₂₀N₃O₇ [M+H]⁺: 342.1296. Encontrada: 342.1295
- Calculada para C₁₄H₁₉N₃NaO₇ [M+Na]⁺: 364.1115. Encontrada: 364.1115

***N*⁴-Benzoil-5'-*O*-levulinil-β-*D*-citidina (18d)**



Sólido blanco

P_f: 193-195 °C

R_f: 0.47 (10% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₂₁H₂₃N₃O₈

Masa molecular: 445.43 g/mol

¹H-RMN (300.13 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2.12 (s, 3H, *Me*-Lev), 2.54 (t, 2H, CH₂-Lev, *J* = 6.3 Hz), 2.75 (t, 2H, CH₂-Lev, *J* = 6.3 Hz), 3.97 (m, 1H, H_{4'}), 4.09 (m, 2H, H_{2'} + H_{3'}), 4.25 (dd, 1H, H_{5'}, *J* = 12.2, 5.1 Hz), 4.35 (dd, 1H, H_{5'}, *J* = 12.1, 2.3 Hz), 5.82 (d, 1H, H_{1'}, *J* = 2.7 Hz), 7.38 (d, 1H, H₅, *J* = 7.5 Hz), 7.51 (m, 2H, H_{arom}), 7.63 (m, 1H, H_{arom}), 8.01 (m, 2H, H_{arom}), 8.16 (d, 1H, H₆, *J* = 7.5 Hz) ppm.

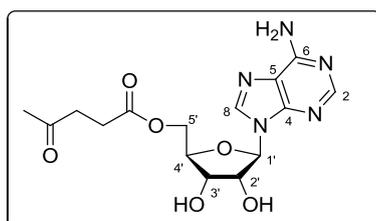
¹³C-RMN (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ 28.0 (CH₂-Lev), 30.0 (CH₃-Lev), 37.9 (CH₂-Lev), 63.9 (C_{5'}), 69.7 (C_{4'}), 74.3 (C_{2'}), 81.3 (C_{3'}), 91.4 (C_{1'}), 96.9 (C₅), 128.9 (4CH_{arom}), 133.2, 133.6 (CH_{arom} + C_{arom}), 145.5 (C₆), 154.9 (C₂), 163.5 (C₄), 168.0 (C=O), 172.2 (CO-Lev), 207.4 (CO-Lev) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₂₁H₂₄N₃O₈ [M+H]⁺: 446.1563. Encontrada: 446.1564

Parte Experimental -----

5'-O-Levulinil- β -D-adenosina (18e)



Sólido blanco

R_f: 0.26 (10% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₁₅H₁₉N₅O₆

Masa molecular: 365.34 g/mol

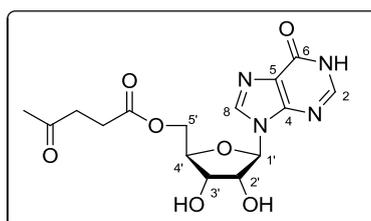
¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 2.14 (s, 3H, *Me*-Lev), 2.56 (t, 2H, CH₂-Lev, *J* = 6.4 Hz), 2.78 (m, 2H, CH₂-Lev, *J* = 6.4 Hz), 4.25 (q, 1H, H_{4'}, *J* = 4.7 Hz), 4.37 (m, 3H, H_{3'} + H_{5'}), 4.74 (t, 2H, H_{2'}, *J* = 4.9 Hz), 6.03 (d, 1H, H_{1'}, *J* = 4.5 Hz), 8.21 (s, 1H, H₂), 8.31 (s, 1H, H₈) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ 28.8 (CH₂-Lev), 29.6 (CH₃-Lev), 38.6 (CH₂-Lev), 64.8 (C_{5'}), 71.8 (C_{3'}), 75.2 (C_{2'}), 83.5 (C_{4'}), 90.2 (C_{1'}), 120.5 (C₅, pico de cruce con H₈ en HMBC), 141.2 (C₈), 150.6 (C₄), 153.9 (C₂), 157.3 (C₆), 174.2 (CO-Lev), 209.5 (CO-Lev) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₁₅H₂₀N₅O₆ [M+H]⁺: 366.1408. Encontrada: 366.1406
- Calculada para C₁₅H₁₉N₅NaO₆ [M+Na]⁺: 388.1228. Encontrada: 388.1225
- Calculada para C₁₅H₁₉KN₅O₆ [M+K]⁺: 404.0967. Encontrada: 404.0964

5'-O-Levulinil-β-D-inosina (18f)



Sólido blanco

P_f: 54-56 °C

R_f: 0.44 (20% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₁₅H₁₈N₄O₇

Masa molecular: 366.33 g/mol

¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 2.15 (s, 3H, *Me*-Lev), 2.57 (t, 2H, *CH*₂-Lev, *J* = 6.4 Hz), 2.80 (t, 2H, *CH*₂-Lev, *J* = 6.4 Hz), 4.25 (q, 1H, H₄, *J* = 4.3 Hz), 4.37 (m, 3H, H₃ + H₅), 4.70 (t, 2H, H₂, *J* = 4.8 Hz), 6.03 (d, 1H, H₁, *J* = 4.6 Hz), 8.07 (s, 1H, H₂), 8.27 (s, 1H, H₈) ppm.

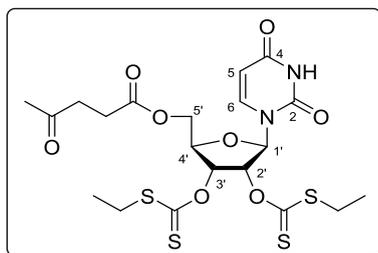
¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ 28.8 (*CH*₂-Lev), 29.6 (*CH*₃-Lev), 38.6 (*CH*₂-Lev), 64.8 (C₅'), 71.7 (C₃'), 75.5 (C₂'), 83.7 (C₄'), 90.4 (C₁'), 125.9 (C₅), 140.7 (C₈), 146.8 (C₂), 149.9 (C₄, pico de cruce con H₁' en HMBC), 158.9 (C₆), 174.2 (CO-Lev), 209.5 (CO-Lev) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₁₅H₁₉N₄O₇ [M+H]⁺: 367.1248. Encontrada: 367.1253
- Calculada para C₁₅H₁₈N₄NaO₇ [M+Na]⁺: 389.1068. Encontrada: 389.1073
- Calculada para C₁₅H₁₈KN₄O₇ [M+K]⁺: 405.0807. Encontrada: 405.0813

Parte Experimental -----

2',3'-Bis-O-[(etiltio)tiocarbonil]-5'-O-levulinil-β-D-uridina (19a)



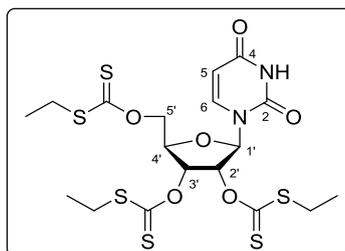
Sólido blanco

R_f: 0.41 (50% AcOEt/Hexano)

Fórmula molecular: C₂₀H₂₆N₂O₈S₄

Masa molecular: 550.67 g/mol

¹H-RMN (300.13 MHz, CDCl₃): δ 1.35 (t, 3H, CH₂-Me, *J* = 7.4 Hz), 1.38 (t, 3H, CH₂-Me, *J* = 7.4 Hz), 2.20 (s, 3H, Me-Lev), 2.57-2.93 (varios m, 4H, CH₂-Lev), 3.12 (q, 2H, S-CH₂, *J* = 7.4 Hz), 3.16 (q, 2H, S-CH₂, *J* = 7.4 Hz), 4.41 (dd, 1H, H_{5'}, *J* = 12.3, 3.8 Hz), 4.49 (dd, 1H, H_{5'}, *J* = 12.3, 2.4 Hz), 4.57 (q, 1H, H_{4'}, *J* = 3.7 Hz), 5.88 (d, 1H, H_{5'}, *J* = 8.1 Hz), 6.16-6.36 (varios m, 3H, H_{1'} + H_{2'} + H_{3'}), 7.44 (d, 1H, H₆, *J* = 8.1 Hz) ppm.

2',3',5'-Tris-O-[(etiltio)tiocarbonil]-β-D-uridina (20a)

Sólido blanco

R_f: 0.42 (30% AcOEt/Hexano)

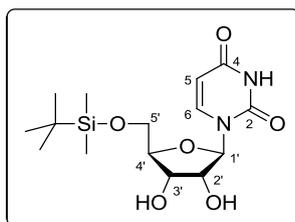
Fórmula molecular: C₁₈H₂₄N₂O₆S₆

Masa molecular: 556.76 g/mol

¹H-RMN (300.13 MHz, CDCl₃): δ 1.35 (m, 9H, CH₂-Me), 3.13 (q, 2H, S-CH₂, *J* = 7.5 Hz), 3.17 (q, 2H, S-CH₂, *J* = 7.4 Hz), 3.19 (q, 2H, S-CH₂, *J* = 7.4 Hz), 4.70 (q, 1H, H_{4'}, *J* = 2.7 Hz), 4.89 (dd, 1H, H_{5'}, *J* = 12.0, 2.6 Hz), 4.95 (dd, 1H, H_{5'}, *J* = 12.1, 3.5 Hz), 5.82 (d, 1H, H_{5'}, *J* = 8.1 Hz), 6.26 (m, 3H, H_{1'} + H_{2'} + H_{3'}), 7.34 (d, 1H, H₆, *J* = 8.1 Hz) ppm.

Parte Experimental -----

5'-O-(*tert*-Butildimetilsilil)- β -D-uridina (21a)



Sólido blanco

P_f: 94-96 °C

R_f: 0.41 (10% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₁₅H₂₆N₂O₆Si

Masa molecular: 358.46 g/mol

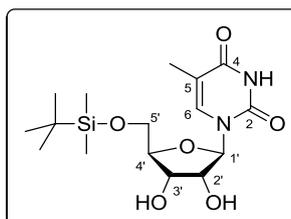
¹H-RMN (300.13 MHz, CDCl₃): δ 0.10 (s, 6H, Si-Me), 0.91 (s, 9H, Si-*t*Bu), 3.83 (dd, 1H, H_{5'}, $J = 11.7, 1.5$ Hz), 4.01 (dd, 1H, H_{5'}, $J = 11.8, 1.8$ Hz), 4.12 (m, 1H, H_{4'}), 4.23 (m, 2H, H_{2'} + H_{3'}), 5.64 (d, 1H, H₅, $J = 8.1$ Hz), 5.90 (d, 1H, H_{1'}, $J = 2.2$ Hz), 8.05 (d, 1H, H₆, $J = 8.1$ Hz) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): δ -5.4 (Si-CH₃), 18.6 (SiCMe₃), 26.1 (*t*Bu-CH₃), 62.0 (C_{5'}), 69.5 (C_{2'}), 75.8 (C_{3'}), 85.1 (C_{4'}), 90.3 (C_{1'}), 102.3 (C₅), 140.6 (C₆), 151.5 (C₂), 164.1 (C₄) ppm.

EMAR (ESI⁺, m/z):

- Calculada para C₁₅H₂₇N₂O₆Si [M+H]⁺: 359.16329. Encontrada: 359.16332

5'-O-(*tert*-Butildimetilsilil)-β-D-5-metiluridina (21b)



Sólido blanco

P_f: 197-198 °C

R_f: 0.35 (10% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₁₆H₂₈N₂O₆Si

Masa molecular: 372.49 g/mol

¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 0.15 (s, 3H, Si-*Me*), 0.16 (s, 3H, Si-*Me*), 0.97 (s, 9H, Si-*t*Bu), 1.88 (d, 3H, Me, *J* = 1.1 Hz), 3.85 (dd, 1H, H_{5'}, *J* = 11.6, 2.7 Hz), 3.94 (dd, 1H, H_{5'}, *J* = 11.6, 2.3 Hz), 4.02 (q, 1H, H_{4'}, *J* = 2.6 Hz), 4.13 (m, 2H, H_{2'} + H_{3'}), 5.95 (d, 1H, H_{1'}, *J* = 5.0 Hz), 7.58 (d, 1H, H₆, *J* = 1.1 Hz) ppm.

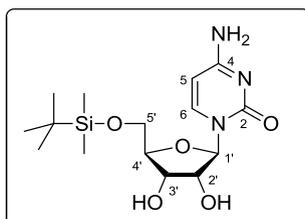
¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ -5.2 (Si-CH₃), 12.6 (CH₃), 19.4 (SiCMe₃), 26.5 (*t*Bu-CH₃), 64.3 (C_{5'}), 71.7 (C_{2'}), 75.7 (C_{3'}), 86.4 (C_{4'}), 89.6 (C_{1'}), 111.6 (C₅), 137.4 (C₆), 152.6 (C₂), 166.2 (C₄) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₁₆H₂₉N₂O₆Si [M+H]⁺: 373.1789. Encontrada: 373.1790

Parte Experimental -----

5'-O-(*tert*-Butildimetilsilil)- β -D-citidina (21c)



Espuma incolora

R_f: 0.52 (10% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₁₅H₂₇N₃O₅Si

Masa molecular: 357.48 g/mol

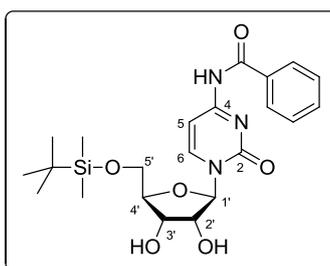
¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 0.15 (s, 6H, Si-*Me*), 0.96 (s, 9H, Si-*t*Bu), 3.87 (dd, 1H, H_{5'}, $J = 12.0, 2.1$ Hz), 4.02-4.16 (varios m, 4H, H_{2'} + H_{3'} + H_{4'} + H_{5'}), 5.85 (d, 1H, H_{5'}, $J = 7.6$ Hz), 5.88 (d, 1H, H_{1'}, $J = 2.7$ Hz), 8.11 (d, 1H, H₆, $J = 7.5$ Hz) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ -5.39 (Si-CH₃), -5.36 (Si-CH₃), 19.3 (SiCMe₃), 26.5 (*t*Bu-CH₃), 63.0 (C_{5'}), 70.1 (C_{2'}), 76.8 (C_{3'}), 85.3 (C_{4'}), 91.8 (C_{1'}), 95.71 (C₅), 142.4 (C₆), 158.4 (C₂), 167.6 (C₄) ppm.

EMAR (ESI⁺, m/z):

- Calculada para C₁₅H₂₈N₃O₅Si [M+H]⁺: 358.1798. Encontrada: 358.1791

***N*⁴-Benzoil-5'-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)-β-*D*-citidina (21d)**



Sólido blanco

P_f: 86-88 °C

R_f: 0.47 (10% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₂₂H₃₁N₃O₆Si

Masa molecular: 461.58 g/mol

¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 0.17 (s, 3H, Si-*Me*), 0.19 (s, 3H, Si-*Me*), 0.99 (s, 9H, Si-*tBu*), 3.91 (dd, 1H, H_{5'}, *J* = 12.2, 2.1 Hz), 4.15 (varios m, 4H, H_{2'}+ H_{3'}+ H_{4'}+ H_{5'}), 5.90 (d, 1H, H_{1'}, *J* = 1.5 Hz), 7.58 (m, 4H, H₅ + H_{arom}), 7.98 (m, 2H, H_{arom}), 8.64 (d, 1H, H₆, *J* = 7.5 Hz) ppm.

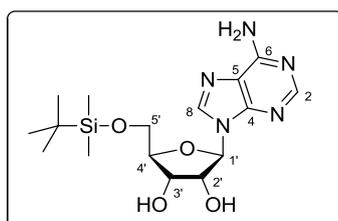
¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ -5.3 (Si-CH₃), 19.4 (SiCMe₃), 26.5 (*t*Bu-CH₃), 62.6 (C_{5'}), 69.5 (C_{2'}), 76.8 (C_{3'}), 85.5 (C_{4'}), 92.9 (C_{1'}), 98.1 (C₅), 129.2 (CH_{arom}), 129.8 (CH_{arom}), 134.1 (CH_{arom}), 134.7 (C_{arom}), 146.3 (C₆), 157.9 (C₂), 164.8 (C₄), 169.2 (C=O) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₂₂H₃₁N₃O₆Si [M+H]⁺: 462.2055. Encontrada: 462.2048
- Calculada para C₂₂H₃₁N₃NaO₆Si [M+Na]⁺: 484.1874. Encontrada: 484.1867
- Calculada para C₂₂H₃₁N₃KO₆Si [M+K]⁺: 500.1614. Encontrada: 500.1603

Parte Experimental -----

5'-O-(*tert*-Butildimetilsilil)- β -D-adenosina (21e)



Sólido blanco

P_f: 178-179 °C

R_f: 0.33 (10% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₁₆H₂₇N₅O₄Si

Masa molecular: 381.50 g/mol

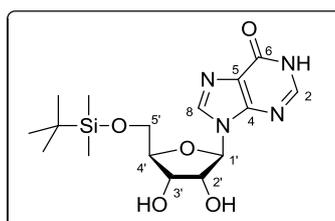
¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 0.11 (s, 6H, Si-*Me*), 0.92 (s, 9H, Si-*t*Bu), 3.87 (dd, 1H, H_{5'}, *J* = 11.6, 3.0 Hz), 4.01 (dd, 1H, H_{5'}, *J* = 11.6, 3.0 Hz), 4.13 (m, 1H, H_{4'}), 4.36 (t, 1H, H_{3'}, *J* = 5.0 Hz), 4.56 (t, 1H, H_{2'}, *J* = 4.6 Hz), 6.05 (d, 1H, H_{1'}, *J* = 4.2 Hz), 8.20 (s, 1H, H₂), 8.38 (s, 1H, H₈) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ -5.33 (Si-CH₃), -5.31 (Si-CH₃), 19.3 (SiCMe₃), 26.5 (*t*Bu-CH₃), 63.8 (C_{5'}), 71.3 (C_{3'}), 76.3 (C_{2'}), 86.3 (C_{4'}), 90.1 (C_{1'}), 120.4 (C₅), 140.7 (C₈), 150.5 (C₄), 153.9 (C₂), 157.3 (C₆) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₁₆H₂₈N₅O₄Si [M+H]⁺: 382.1911. Encontrada: 382.1902

5'-O-(tert-Butildimetilsilil)-β-D-inosina (21f)



Sólido blanco

P_f: 229-230 °C

R_f: 0.17 (10% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₁₆H₂₆N₄O₅Si

Masa molecular: 382.49 g/mol

¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 0.10 (s, 6H, Si-*Me*), 0.91 (s, 9H, Si-*t*Bu), 3.86 (dd, 1H, H_{5'}, *J* = 11.6, 3.1 Hz), 3.99 (dd, 1H, H_{5'}, *J* = 11.6, 3.0 Hz), 4.14 (m, 1H, H_{4'}), 4.36 (t, 1H, H_{3'}, *J* = 4.8 Hz), 4.56 (t, 1H, H_{2'}, *J* = 4.8 Hz), 6.07 (d, 1H, H_{1'}, *J* = 4.5 Hz), 8.07 (s, 1H, H₂), 8.31 (s, 1H, H₈) ppm.

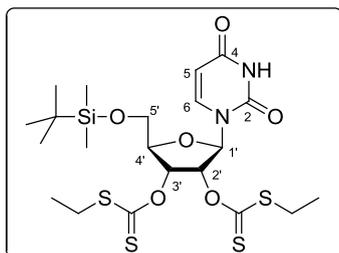
¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ -5.33 (Si-CH₃), -5.29 (Si-CH₃), 19.3 (SiCMe₃), 26.5 (*t*Bu-CH₃), 63.9 (C_{5'}), 71.5 (C_{3'}), 76.6 (C_{2'}), 86.6 (C_{4'}), 90.0 (C_{1'}), 125.6 (C₅), 140.1 (C₈), 146.8 (C₂), 149.9 (C₄), 158.9 (C₆) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₁₆H₂₇N₄O₅Si [M+H]⁺: 383.1745. Encontrada: 383.1743
- Calculada para C₁₆H₂₆N₄NaO₅Si [M+Na]⁺: 405.1565. Encontrada: 405.1564
- Calculada para C₁₆H₂₆N₃KO₅Si [M+K]⁺: 421.1304. Encontrada: 421.1303

Parte Experimental -----

5'-O-(*tert*-Butildimetilsilil)-2',3'-bis-O-[(etiltio)tiocarbonil]- β -D-uridina (22a)



Sólido blanco

P_f: 102-104 °C

R_f: 0.45 (40% AcOEt/Hexano)

Fórmula y masa moleculares: C₂₁H₃₄N₂O₆S₄Si y 566,85 g/mol

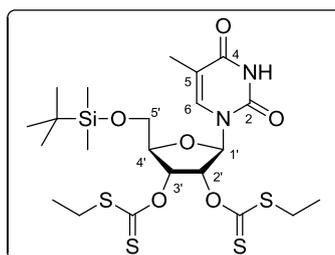
¹H-RMN (300.13 MHz, CDCl₃): δ 0.15 (s, 3H, Si-Me), 0.17 (s, 3H, Si-Me), 0.95 (s, 9H, Si-^tBu), 1.35 (t, 3H, SCH₂-Me, *J* = 7.4 Hz), 1.37 (t, 3H, SCH₂-Me, *J* = 7.4 Hz), 3.13 (m, 4H, S-CH₂), 3.92 (dd, 1H, H_{5'}, *J* = 11.4, 1.7 Hz), 4.03 (dd, 1H, H_{5'}, *J* = 11.4, 1.5 Hz), 4.44 (m, 1H, H_{4'}), 5.75 (d, 1H, H₅, *J* = 8.2 Hz), 6.07 (dd, 1H, H_{2'}, *J* = 7.4, 5.7 Hz), 6.22 (dd, 1H, H_{3'}, *J* = 5.6, 1.1 Hz), 6.56 (d, 1H, H_{1'}, *J* = 7.4 Hz), 7.87 (d, 1H, H₆, *J* = 8.2 Hz), 9.09 (sa, 1H, NH) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): δ -5.5 (Si-CH₃), -5.2 (Si-CH₃), 13.3 (SCH₂-CH₃), 13.5 (SCH₂-CH₃), 18.5 (SiCMe₃), 26.1 (^tBu-CH₃), 30.8 (S-CH₂), 63.5 (C_{5'}), 78.9 (C_{3'}), 79.6 (C_{2'}), 84.6 (C_{4'}), 85.4 (C_{1'}), 103.6 (C₅), 139.7 (C₆), 150.4 (C₂), 163.0 (C₄), 213.7 (C=S), 214.1 (C=S) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₂₁H₃₅N₂O₆S₄Si [M+H]⁺: 567.1142. Encontrada: 567.1133
- Calculada para C₂₁H₃₄N₂NaO₆S₄Si [M+Na]⁺: 589.0961. Encontrada: 589.0951
- Calculada para C₂₁H₃₄KN₂O₆S₄Si [M+K]⁺: 605.0701. Encontrada: 605.0690

5'-O-(*tert*-Butildimetilsilil)-2',3'-bis-O-[(etiltio)tiocarbonil]-β-D-5-metiluridina (22b)



Sólido blanco

P_f: 131-132 °C

R_f: 0.50 (40% AcOEt/Hexano)

Fórmula y masa moleculares: C₂₂H₃₆N₂O₆S₄Si y 580,88 g/mol

¹H-RMN (300.13 MHz, CDCl₃): δ 0.19 (s, 6H, Si-*Me*), 0.98 (s, 9H, Si-*t*Bu), 1.35 (t, 3H, SCH₂-*Me*, *J* = 7.4 Hz), 1.37 (t, 3H, SCH₂-*Me*, *J* = 7.4 Hz), 1.94 (d, 3H, Me, *J* = 1.1 Hz), 3.14 (m, 4H, S-CH₂), 3.93 (dd, 1H, H_{5'}, *J* = 11.4, 1.7 Hz), 4.07 (dd, 1H, H_{5'}, *J* = 11.4, 1.7 Hz), 4.42 (m, 1H, H_{4'}), 6.03 (dd, 1H, H_{2'}, *J* = 7.8, 5.6 Hz), 6.22 (dd, 1H, H_{3'}, *J* = 5.6, 1.0 Hz), 6.56 (d, 1H, H_{1'}, *J* = 7.9 Hz), 7.54 (d, 1H, H₆, *J* = 1.2 Hz), 8.16 (sa, 1H, NH) ppm.

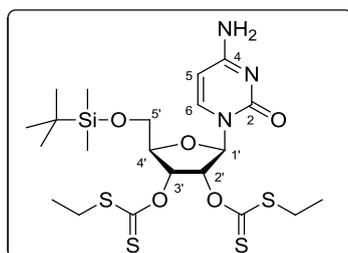
¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): δ -5.3 (Si-CH₃), -4.9 (Si-CH₃), 12.6 (CH₃), 13.4 (SCH₂-CH₃), 13.5 (SCH₂-CH₃), 18.6 (SiCMe₃), 26.2 (*t*Bu-CH₃), 30.79 (S-CH₂), 30.83 (S-CH₂), 63.5 (C_{5'}), 78.7 (C_{3'}), 79.1 (C_{2'}), 84.4 (C_{4'}), 84.7 (C_{1'}), 112.2 (C₅), 134.9 (C₆), 150.5 (C₂), 163.5 (C₄), 213.7 (C=S), 214.2 (C=S) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₂₂H₃₇N₂O₆S₄Si [M+H]⁺: 581.1298. Encontrada: 581.1292
- Calculada para C₂₂H₃₆N₂NaO₆S₄Si [M+Na]⁺: 603.1118. Encontrada: 603.1110
- Calculada para C₂₂H₃₆KN₂O₆S₄Si [M+K]⁺: 619.0857. Encontrada: 619.0851

Parte Experimental -----

5'-O-(*tert*-Butildimetilsilil)-2',3'-bis-O-[(etiltio)tiocarbonil]- β -D-citidina (22c)



Sólido blanco

P_f: 99-101 °C

R_f: 0.35 (10% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula y masa moleculares: C₂₁H₃₅N₃O₅S₄Si y 565.87 g/mol

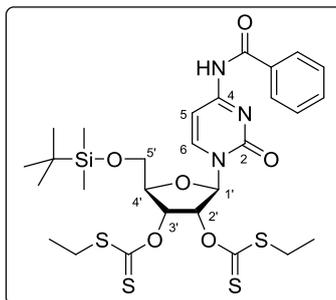
¹H-RMN (300.13 MHz, CDCl₃): δ 0.14 (s, 3H, Si-Me), 0.15 (s, 3H, Si-Me), 0.94 (s, 9H, Si-*t*Bu), 1.33 (t, 3H, SCH₂-Me, *J* = 6.1 Hz), 1.35 (t, 3H, SCH₂-Me, *J* = 6.1 Hz), 3.13 (m, 4H, S-CH₂), 3.92 (dd, 1H, H_{5'}, *J* = 11.3, 1.8 Hz), 4.01 (dd, 1H, H_{5'}, *J* = 11.3, 1.7 Hz), 4.41 (m, 1H, H_{4'}), 5.76 (d, 1H, H₅, *J* = 7.4 Hz), 6.04 (dd, 1H, H_{2'}, *J* = 7.0, 5.6 Hz), 6.24 (dd, 1H, H_{3'}, *J* = 5.5, 2.0 Hz), 6.67 (d, 1H, H_{1'}, *J* = 7.0 Hz), 7.84 (d, 1H, H₆, *J* = 7.4 Hz) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): δ -5.4 (Si-CH₃), -5.2 (Si-CH₃), 13.4 (SCH₂-CH₃), 13.6 (SCH₂-CH₃), 18.5 (SiCMe₃), 26.2 (*t*Bu-CH₃), 30.66 (S-CH₂), 30.71 (S-CH₂), 63.4 (C_{5'}), 78.8 (C_{3'}), 80.4 (C_{2'}), 83.9 (C_{4'}), 86.1 (C_{1'}), 95.6 (C₅), 141.3 (C₆), 155.8 (C₂), 165.7 (C₄), 213.7 (C=S), 214.1 (C=S) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₂₁H₃₆N₃O₅S₄Si [M+H]⁺: 566.1302. Encontrada: 566.1295
- Calculada para C₂₁H₃₅N₃NaO₅S₄Si [M+Na]⁺: 588.1121. Encontrada: 588.1116
- Calculada para C₂₁H₃₅KN₃O₅S₄Si [M+K]⁺: 604.0860. Encontrada: 604.0855

***N*⁴-Benzoil-5'-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)-2',3'-bis-*O*-
[(etiltio)tiocarbonil]-β-*D*-citidina (22d)**



Sólido blanco

P_f: 140-141 °C

R_f: 0.25 (40% AcOEt/Hexano)

Fórmula y masa moleculares: C₂₈H₃₉N₃O₆S₄Si y 669,97 g/mol

¹H-RMN (300.13 MHz, CDCl₃): δ 0.18 (s, 6H, Si-*Me*), 0.97 (s, 9H, Si-*Bu*), 1.34 (t, 3H, SCH₂-*Me*, *J* = 6.1 Hz), 1.37 (t, 3H, SCH₂-*Me*, *J* = 6.1 Hz), 3.14 (m, 4H, S-CH₂), 3.98 (dd, 1H, H_{5'}, *J* = 11.5, 1.8 Hz), 4.05 (dd, 1H, H_{5'}, *J* = 11.5, 1.6 Hz), 4.49 (m, 1H, H_{4'}), 6.15 (dd, 1H, H_{2'}, *J* = 6.8, 5.6 Hz), 6.27 (dd, 1H, H_{3'}, *J* = 5.5, 1.8 Hz), 6.74 (d, 1H, H_{1'}, *J* = 6.9 Hz), 7.50 (m, 3H, H₅ + H_{arom}), 7.61 (m, 1H, H_{arom}), 7.91 (m, 2H, H_{arom}), 8.30 (d, 1H, H₆, *J* = 7.6 Hz), 8.69 (sa, 1H, NH) ppm.

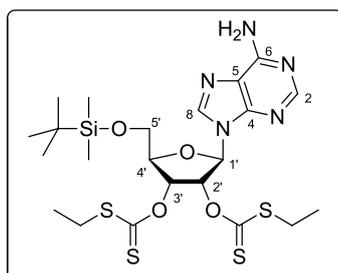
¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): δ -5.4 (Si-CH₃), -5.2 (Si-CH₃), 13.3 (SCH₂-CH₃), 13.5 (SCH₂-CH₃), 18.5 (SiCMe₃), 26.1 (*t*Bu-CH₃), 30.65 (S-CH₂), 30.74 (S-CH₂), 63.2 (C_{5'}), 78.8 (C_{3'}), 80.7 (C_{2'}), 84.6 (C_{4'}), 86.5 (C_{1'}), 97.8 (C₅), 127.8 (CH_{arom}), 129.1 (CH_{arom}), 133.2 (C_{arom}), 133.3 (CH_{arom}), 144.4 (C₆), 154.6 (C₂), 162.5 (C₄), 167.1 (C=O), 213.6 (C=S), 214.0 (C=S) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₂₈H₄₀N₃O₆S₄Si [M+H]⁺: 670.1564. Encontrada: 670.1558
- Calculada para C₂₈H₃₉N₃NaO₆S₄Si [M+Na]⁺: 692.1383. Encontrada: 692.1376
- Calculada para C₂₈H₃₉KN₃O₆S₄Si [M+K]⁺: 708.1123. Encontrada: 708.1118

Parte Experimental -----

5'-O-(*tert*-Butildimetilsilil)-2',3'-bis-O-[(etiltio)tiocarbonil]- β -D-adenosina (22e)



Sólido blanco

P_f: 164-165 °C

R_f: 0.18 (50% AcOEt/Hexano)

Fórmula y masa moleculares: C₂₂H₃₅N₅O₄S₄Si y 589.89 g/mol

¹H-RMN (300.13 MHz, CDCl₃): δ 0.16 (s, 6H, Si-*Me*), 0.95 (s, 9H, Si-*t*Bu), 1.29 (t, 3H, SCH₂-*Me*, *J* = 7.4 Hz), 1.37 (t, 3H, SCH₂-*Me*, *J* = 7.4 Hz), 3.07 (q, 2H, S-CH₂, *J* = 7.4 Hz), 3.17 (q, 2H, S-CH₂, *J* = 7.3 Hz), 3.95 (dd, 1H, H_{5'}, *J* = 11.4, 2.1 Hz), 4.05 (dd, 1H, H_{5'}, *J* = 11.3, 2.1 Hz), 4.52 (m, 1H, H_{4'}), 6.14 (sa, 2H, NH₂), 6.41 (dd, 1H, H_{3'}, *J* = 5.4, 1.9 Hz), 6.48 (dd, 1H, H_{2'}, *J* = 6.8, 5.5 Hz), 6.60 (d, 1H, H_{1'}, *J* = 6.9 Hz), 8.22 (s, 1H, H₈), 8.35 (s, 1H, H₂) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): δ -5.3 (Si-CH₃), -5.1 (Si-CH₃), 13.3 (SCH₂-CH₃), 18.6 (SiCMe₃), 26.2 (*t*Bu-CH₃), 30.8 (S-CH₂), 63.4 (C_{5'}), 78.8 (C_{3'}), 80.7 (C_{2'}), 84.7 (C_{1'} + C_{4'}), 119.6 (C₅), 138.5 (C₈), 150.3 (C₄), 153.4 (C₂), 155.7 (C₆), 213.6 (C=S), 214.0 (C=S) ppm.

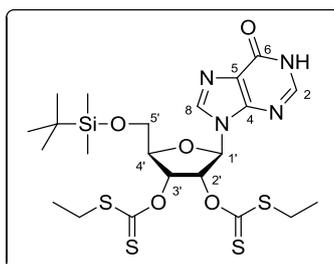
EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₂₂H₃₆N₅O₄S₄Si [M+H]⁺: 590.1414. Encontrada: 590.1409

- Calculada para C₂₂H₃₅N₅NaO₄S₄Si [M+Na]⁺: 612.1233. Encontrada: 612.1231

- Calculada para C₂₂H₃₅KN₅O₄S₄Si [M+K]⁺: 628.0973. Encontrada: 628.0982

**5'-O-(*tert*-Butildimetilsilil)-2',3'-bis-O-[(etiltio)tiocarbonil]-β-D-
inosina (22f)**



Sólido blanco

P_f: 201-103 °C

R_f: 0.36 (10% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula y masa moleculares: C₂₂H₃₄N₄O₅S₄Si y 590.87 g/mol

¹H-RMN (300.13 MHz, CDCl₃): δ 0.17 (s, 6H, Si-Me), 0.96 (s, 9H, Si-*t*Bu), 1.31 (t, 3H, SCH₂-Me, *J* = 7.4 Hz), 1.39 (t, 3H, SCH₂-Me, *J* = 7.4 Hz), 3.09 (q, 2H, S-CH₂, *J* = 7.4 Hz), 3.18 (q, 2H, S-CH₂, *J* = 7.4 Hz), 3.97 (dd, 1H, H_{5'}, *J* = 11.4, 2.0 Hz), 4.06 (dd, 1H, H_{5'}, *J* = 11.4, 2.0 Hz), 4.55 (m, 1H, H_{4'}), 6.40 (dd, 1H, H_{3'}, *J* = 5.3, 2.0 Hz), 6.46 (m, 1H, H_{2'}), 6.53 (d, 1H, H_{1'}, *J* = 6.7 Hz), 8.20 (s, 1H, H₂), 8.24 (s, 1H, H₈), 13.10 (sa, 1H, NH) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): δ -5.3 (Si-CH₃), -5.1 (Si-CH₃), 13.3 (SCH₂-CH₃), 13.4 (SCH₂-CH₃), 18.6 (SiCMe₃), 26.2 (*t*Bu-CH₃), 30.86 (S-CH₂), 30.93 (S-CH₂), 63.3 (C_{5'}), 78.7 (C_{3'}), 80.9 (C_{2'}), 84.9 (C_{4'}), 85.2 (C_{1'}), 124.9 (C₅), 138.3 (C₈), 145.6 (C₂), 149.3 (C₄), 159.3 (C₆), 213.4 (C=S), 214.0 (C=S) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

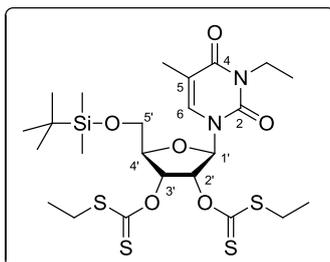
- Calculada para C₂₂H₃₆N₄O₅S₄Si [M+H]⁺: 591.1254. Encontrada: 591.1239

- Calculada para C₂₂H₃₄N₄NaO₅S₄Si [M+Na]⁺: 613.1074. Encontrada: 613.1056

- Calculada para C₂₂H₃₄KN₄O₅S₄Si [M+K]⁺: 629.0813. Encontrada: 629.0797

Parte Experimental -----

5'-O-(*tert*-Butildimetilsilil)-N³-etil-2',3'-bis-O-[(etiltio)tiocarbonil]-β-D-5-metiluridina (23b)



Sólido higroscópico

R_f: 0.75 (40% AcOEt/Hexano)

Fórmula molecular: C₂₄H₄₀N₂O₆S₄Si

Masa molecular: 608.93 g/mol

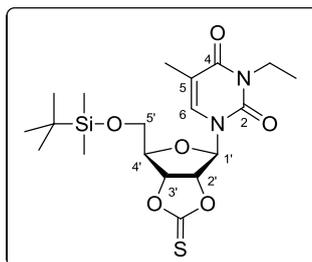
¹H-RMN (300.13 MHz, CDCl₃): δ 0.18 (s, 6H, Si-*Me*), 0.97 (s, 9H, Si-*Bu*), 1.20 (t, 3H, CH₂-*Me*, *J* = 7.0 Hz), 1.35 (t, 3H, SCH₂-*Me*, *J* = 7.5 Hz), 1.38 (t, 3H, SCH₂-*Me*, *J* = 7.5 Hz), 1.94 (d, 3H, Me, *J* = 1.1 Hz), 3.13 (m, 4H, S-CH₂), 3.93 (dd, 1H, H_{5'}, *J* = 11.4, 1.6 Hz), 4.02 (q, 2H, CH₂, *J* = 7.1 Hz), 4.08 (dd, 1H, H_{5'}, *J* = 11.5, 1.8 Hz), 4.42 (m, 1H, H_{4'}), 6.02 (dd, 1H, H_{2'}, *J* = 7.8, 5.6 Hz), 6.22 (dd, 1H, H_{3'}, *J* = 5.6, 1.1 Hz), 6.63 (d, 1H, H_{1'}, *J* = 7.8 Hz), 7.49 (d, 1H, H₆, *J* = 1.1 Hz) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): δ -5.3 (Si-CH₃), -5.0 (Si-CH₃), 12.9 (CH₂CH₃), 13.4 (CH₃), 13.5 (SCH₂-CH₃), 13.57 (SCH₂-CH₃), 18.62 (SiCMe₃), 26.2 (*t*Bu-CH₃), 30.7 (SC-H₂), 36.8 (CH₂-Me), 63.5 (C_{5'}), 78.8 (C_{3'}), 79.2 (C_{2'}), 84.2 (C_{4'}), 85.3 (C_{1'}), 111.5 (C₅), 132.8 (C₆), 151.1 (C₂), 163.2 (C₄), 213.7 (C=S), 214.0 (C=S) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₂₄H₄₁N₂O₆S₄Si [M+H]⁺: 609.1611. Encontrada: 609.1588

5'-O-(*tert*-Butildimetilsilil)-N³-etil-2',3'-O-tionocarbonil-β-D-5-metiluridina (24b)



Aceite transparente

R_f: 0.63 (40% AcOEt/Hexano)

Fórmula molecular: C₁₉H₃₀N₂O₆SSi

Masa molecular: 442.60 g/mol

¹H-RMN (300.13 MHz, CDCl₃): δ 0.06 (s, 6H, Si-Me), 0.88 (s, 9H, Si-*t*Bu), 1.20 (t, 3H, CH₂-Me, *J* = 7.1 Hz), 1.94 (d, 3H, Me, *J* = 1.1 Hz), 3.84 (d, 2H, H_{5'}, *J* = 5.6 Hz), 3.96 (m, 2H, CH₂), 4.46 (m, 1H, H_{4'}), 5.54 (dd, 1H, H_{3'}, *J* = 7.2, 3.3 Hz), 5.64 (d, 1H, H_{1'}, *J* = 1.3 Hz), 5.72 (dd, 1H, H_{2'}, *J* = 7.2, 1.3 Hz), 7.05 (d, 1H, H₆, *J* = 1.1 Hz) ppm.

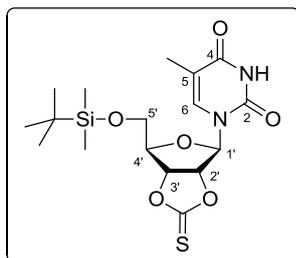
¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): δ -5.3 (Si-CH₃), 12.9 (CH₃), 13.3 (CH₂-CH₃), 18.4 (SiCMe₃), 25.9 (*t*Bu-CH₃), 36.7 (CH₂-Me), 62.7 (C_{5'}), 86.0 (C_{3'}), 87.9 (C_{4'}), 88.7 (C_{2'}), 95.7 (C_{1'}), 111.3 (C₅), 136.1 (C₆), 150.6 (C₂), 163.0 (C₄), 189.7 (C=S) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₁₉H₃₁N₂O₆SSi [M+H]⁺: 443.1643. Encontrada: 443.1667

Parte Experimental -----

**5'-O-(*tert*-Butildimetilsilil)-2',3'-O-tionocarbonil- β -D-5-metiluridina
(25b)**



Aceite transparente

R_f: 0.36 (40% AcOEt/Hexano)

Fórmula molecular: C₁₇H₂₆N₂O₆SSi

Masa molecular: 414.55 g/mol

¹H-RMN (300.13 MHz, CDCl₃): δ 0.07 (s, 6H, Si-*Me*), 0.89 (s, 9H, Si-*Bu*), 1.94 (d, 3H, Me, $J = 1.0$ Hz), 3.84 (d, 2H, H_{5'}, $J = 5.5$ Hz), 4.44 (dt, 1H, H_{4'}, $J = 5.4, 3.6$ Hz), 5.51 (dd, 1H, H_{3'}, $J = 6.8, 3.4$ Hz), 5.70 (m, 2H, H_{1'} + H_{2'}), 7.09 (d, 1H, H₆, $J = 1.1$ Hz), 8.80 (sa, 1H, NH) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): δ -5.3 (Si-CH₃), 12.5 (CH₃), 18.4 (SiCMe₃), 25.9 (*t*Bu-CH₃), 62.6 (C_{5'}), 85.7 (C_{3'}), 87.6 (C_{4'}), 88.3 (C_{2'}), 94.8 (C_{1'}), 112.03 (C₅), 138.1 (C₆), 150.1 (C₂), 163.5 (C₄), 189.5 (C=S) ppm.

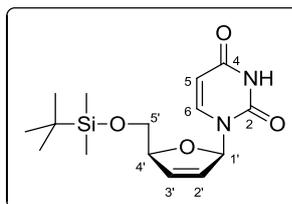
EMAR (ESI⁺, m/z):

- Calculada para C₁₇H₂₇N₂O₆SSi [M+H]⁺: 415.1354. Encontrada: 415.1347

- Calculada para C₁₇H₂₆N₂NaO₆SSi [M+Na]⁺: 437.1173. Encontrada: 437.1166

- Calculada para C₁₇H₂₆KN₂O₆SSi [M+K]⁺: 453.0912. Encontrada: 453.0906

5'-O-(*tert*-Butildimetilsilil)-2',3'-dideshidro-2',3'-didesoxi-β-D-uridina (26a)



Sólido blanco

P_f: 166-168 °C

R_f: 0.16 (40% AcOEt/Hexano)

Fórmula molecular: C₁₅H₂₄N₂O₄Si

Masa molecular: 324.45 g/mol

¹H-RMN (300.13 MHz, DMSO-*d*₆): δ 0.03 (s, 6H, Si-*Me*), 0.85 (s, 9H, Si-*t*Bu), 3.75 (dd, 1H, H_{5'}, *J* = 11.7, 3.7 Hz), 3.81 (dd, 1H, H_{5'}, *J* = 11.7, 3.0 Hz), 4.82 (m, 1H, H_{4'}), 5.52 (d, 1H, H_{5'}, *J* = 8.0 Hz), 5.95 (dt, 1H, H_{2'}, *J* = 6.0, 1.8 Hz), 6.39 (dt, 1H, H_{3'}, *J* = 6.0, 1.6 Hz), 6.80 (m, 1H, H_{1'}), 7.63 (d, 1H, H₆, *J* = 8.0 Hz), 11.35 (sa, 1H, NH) ppm.

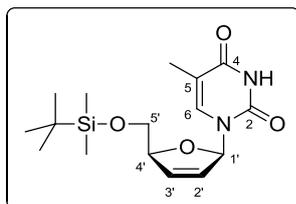
¹³C-RMN (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ -5.43 (Si-CH₃), -5.38 (Si-CH₃), 18.2 (SiCMe₃), 25.8 (*t*Bu-CH₃), 64.3 (C_{5'}), 86.9 (C_{4'}), 89.1 (C_{1'}), 101.6 (C₅), 126.2 (C_{2'}), 134.5 (C_{3'}), 140.8 (C₆), 150.7 (C₂), 163.1 (C₄) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₁₅H₂₅N₂O₄Si [M+H]⁺: 325.1578. Encontrada: 325.1573
- Calculada para C₁₅H₂₄N₂NaO₄Si [M+Na]⁺: 347.1398. Encontrada: 347.1392
- Calculada para C₁₅H₂₄KN₂O₄Si [M+K]⁺: 363.1137. Encontrada: 363.1131

Parte Experimental -----

**5'-O-(*tert*-Butildimetilsilil)-2',3'-dideshidro-3'-desoxi-β-D-5-timidina
(26b)**



Sólido blanco

P_f: 169-171 °C

R_f: 0.29 (40% AcOEt/Hexano)

Fórmula molecular: C₁₆H₂₆N₂O₄Si

Masa molecular: 338.47 g/mol

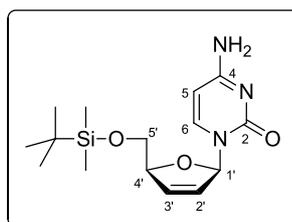
¹H-RMN (300.13 MHz, DMSO-*d*₆): δ 0.03 (s, 6H, Si-*Me*), 0.85 (s, 9H, Si-*t*Bu), 1.75 (d, 3H, Me, *J* = 0.9 Hz), 3.72 (dd, 1H, H_{5'}, *J* = 11.5, 4.6 Hz), 3.80 (dd, 1H, H_{5'}, *J* = 11.6, 3.2 Hz), 4.78 (m, 1H, H_{4'}), 5.96 (dt, 1H, H_{2'}, *J* = 6.0, 2.0 Hz), 6.38 (dt, 1H, H_{3'}, *J* = 6.0, 1.6 Hz), 6.78 (m, 1H, H_{1'}), 7.28 (d, 1H, H₆, *J* = 1.2 Hz), 11.36 (sa, 1H, NH) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ -5.3 (Si-CH₃), -5.2 (Si-CH₃), 12.2 (CH₃), 18.3 (SiCMe₃), 25.9 (*t*Bu-CH₃), 64.7 (C_{5'}), 86.7 (C_{4'}), 89.2 (C_{1'}), 109.4 (C₅), 126.2 (C_{2'}), 134.4 (C_{3'}), 135.9 (C₆), 150.8 (C₂), 163.8 (C₄) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₁₆H₂₇N₂O₄Si [M+H]⁺: 339.1735. Encontrada: 339.1729
- Calculada para C₁₆H₂₆N₂NaO₄Si [M+Na]⁺: 361.1554. Encontrada: 361.1547
- Calculada para C₁₆H₂₆KN₂O₄Si [M+K]⁺: 377.1293. Encontrada: 377.1286

5'-O-(*tert*-Butildimetilsilil)-2',3'-dideshidro-2',3'-didesoxi-β-D-citidina (26c)



Sólido blanco

P_f: 176-178 °C

R_f: 0.52 (10% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₁₅H₂₅N₃O₃Si

Masa molecular: 323.46 g/mol

¹H-RMN (300.13 MHz, CDCl₃): δ 0.066 (s, 3H, Si-Me), 0.070 (s, 3H, Si-Me), 0.90 (s, 9H, Si-*t*Bu), 3.83 (dd, 1H, H_{5'}, *J* = 11.6, 2.8 Hz), 3.92 (dd, 1H, H_{5'}, *J* = 11.5, 3.0 Hz), 4.90 (m, 1H, H_{4'}), 5.62 (d, 1H, H₅, *J* = 7.4 Hz), 5.91 (m, 1H, H_{2'}), 6.14 (dt, 1H, H_{3'}, *J* = 6.0, 1.6 Hz), 7.07 (m, 1H, H_{1'}), 7.94 (d, 1H, H₆, *J* = 7.4 Hz) ppm.

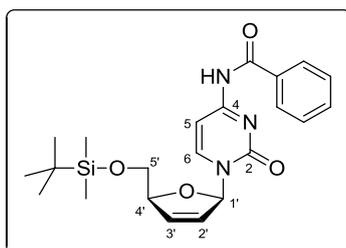
¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): δ -5.3 (Si-CH₃), -5.2 (Si-CH₃), 18.6 (SiCMe₃), 26.1 (*t*Bu-CH₃), 64.5 (C_{5'}), 87.3 (C_{4'}), 91.0 (C_{1'}), 94.0 (C₅), 128.2 (C_{2'}), 132.7 (C_{3'}), 142.8 (C₆), 156.3 (C₂), 165.6 (C₄) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₁₅H₂₆N₃O₃Si [M+H]⁺: 324.1738. Encontrada: 324.1743
- Calculada para C₁₅H₂₅N₃NaO₃Si [M+Na]⁺: 346.1557. Encontrada: 346.1563
- Calculada para C₁₅H₂₅KN₃O₃Si [M+K]⁺: 362.1297. Encontrada: 362.1303

Parte Experimental -----

***N*⁴-Benzoil-5'-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)-2',3'-
didesoxi-β-D-citidina (26d)**



Sólido blanco

P_f: 137-138 °C

R_f: 0.19 (40% AcOEt/Hexano)

Fórmula molecular: C₂₂H₂₉N₃O₄Si

Masa molecular: 427.57 g/mol

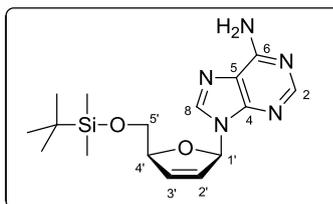
¹H-RMN (300.13 MHz, CDCl₃): δ 0.08 (s, 3H, Si-*Me*), 0.10 (s, 3H, Si-*Me*), 0.90 (s, 9H, Si-*tBu*), 3.86 (dd, 1H, H_{5'}, *J* = 11.7, 2.6 Hz), 3.99 (dd, 1H, H_{5'}, *J* = 11.7, 2.7 Hz), 4.99 (m, 1H, H_{4'}), 6.02 (d, 1H, H_{2'}, *J* = 5.7 Hz), 6.18 (dt, 1H, H_{3'}, *J* = 6.0, 1.4 Hz), 7.03 (m, 1H, H_{1'}), 7.49 (m, 3H, H₅ + H_{arom}), 7.60 (m, 1H, H_{arom}), 7.93 (d, 2H, H_{arom}, *J* = 7.3 Hz), 8.40 (d, 1H, H₆, *J* = 7.5 Hz), 8.71 (sa, 1H, NH) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): δ -5.4 (Si-CH₃), -5.2 (Si-CH₃), 18.6 (SiCMe₃), 26.0 (*t*Bu-CH₃), 64.2 (C_{5'}), 88.0 (C_{4'}), 91.8 (C_{1'}), 96.9 (C₅), 127.67 (C_{2'}), 127.71 (CH_{arom}), 129.1 (CH_{arom}), 133.0 (C_{3'}), 133.2 (CH_{arom}), 133.4 (C_{arom}), 145.7 (C₆), 155.1 (C₂), 162.3 (C₄), 167.3 (C=O) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₂₂H₃₀N₃O₄Si [M+H]⁺: 428.2000. Encontrada: 428.1993
- Calculada para C₂₂H₂₉N₃NaO₄Si [M+Na]⁺: 450.1820. Encontrada: 450.1812
- Calculada para C₂₂H₂₉KN₃O₄Si [M+K]⁺: 466.1559. Encontrada: 466.1554

5'-O-(*tert*-Butildimetilsilil)-2',3'-dideshidro-2',3'-didesoxi-β-D-adenosina (26e)



Sólido blanco

P_f: 118-120 °C

R_f: 0.48 (10% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₁₆H₂₅N₅O₂Si

Masa molecular: 347.49 g/mol

¹H-RMN (300.13 MHz, CDCl₃): δ 0.03 (s, 3H, Si-Me), 0.04 (s, 3H, Si-Me), 0.87 (s, 9H, Si-*t*Bu), 3.81 (d, 2H, H_{5'}, *J* = 3.8 Hz), 4.97 (m, 1H, H_{4'}), 5.95 (sa, 2H, NH₂), 6.03 (dt, 1H, H_{2'}, *J* = 6.0, 1.9 Hz), 6.38 (dt, 1H, H_{3'}, *J* = 6.0, 1.6 Hz), 7.09 (m, 1H, H_{1'}), 8.09 (s, 1H, H₈), 8.34 (s, 1H, H₂) ppm.

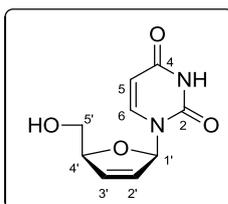
¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): δ -5.3 (Si-CH₃), -5.2 (Si-CH₃), 18.7 (SiCMe₃), 26.1 (*t*Bu-CH₃), 64.9 (C_{5'}), 87.9 (C_{4'}), 88.4 (C_{1'}), 119.2 (C₅), 125.7 (C_{2'}), 134.7 (C_{3'}), 139.4 (C₈), 149.7 (C₄), 152.9 (C₂), 155.7 (C₆) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₁₆H₂₆N₅O₂Si [M+H]⁺: 348.1850. Encontrada: 348.1848
- Calculada para C₁₆H₂₅N₅NaO₂Si [M+Na]⁺: 370.1670. Encontrada: 370.1667
- Calculada para C₁₆H₂₅KN₅O₂Si [M+K]⁺: 386.1409. Encontrada: 386.1407

Parte Experimental -----

2',3'-Dideshidro-2',3'-didesoxi-β-D-uridina (27a)



Sólido blanco

P_f: 154-155 °C

R_f: 0.40 (10% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₉H₁₀N₂O₄

Masa molecular: 210.19 g/mol

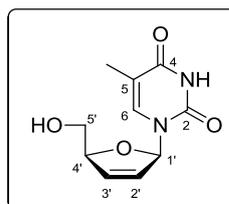
¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 3.73 (m, 2H, H_{5'}), 4.87 (m, 1H, H_{4'}), 5.65 (d, 1H, H₅, *J* = 8.1 Hz), 5.92 (m, 1H, H_{2'}), 6.41 (dt, 1H, H_{3'}, *J* = 6.0, 1.7 Hz), 6.94 (dt, 1H, H_{1'}, *J* = 3.1, 1.5 Hz), 7.89 (d, 1H, H₆, *J* = 8.1 Hz) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): 63.8 (C_{5'}), 89.1 (C_{4'}), 91.3 (C_{1'}), 102.5 (C₅), 127.0 (C₂), 136.1 (C_{3'}), 143.1 (C₆), 152.7 (C₂), 166.3 (C₄) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₉H₁₀N₂NaO₄ [M+Na]⁺: 233.0533. Encontrada: 233.0537
- Calculada para C₉H₁₀KN₂O₄ [M+K]⁺: 249.0272. Encontrada: 249.0278

2',3'-Dideshidro-3'-desoxi-β-D-5-timidina (27b)



Sólido blanco

P_f: 165-166 °C

R_f: 0.42 (10% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₁₀H₁₂N₂O₄

Masa molecular: 224.21 g/mol

¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 1.84 (d, 3H, Me, *J* = 1.1 Hz), 3.76 (m, 2H, H_{5'}), 4.86 (debajo de H₂O, 1H, H_{4'}), 5.90 (dt, 1H, H_{2'}, *J* = 6.0, 2.0 Hz), 6.40 (dt, 1H, H_{3'}, *J* = 6.0, 1.7 Hz), 6.95 (dt, 1H, H_{1'}, *J* = 3.4, 1.7 Hz), 7.75 (d, 1H, H₆, *J* = 1.2 Hz) ppm.

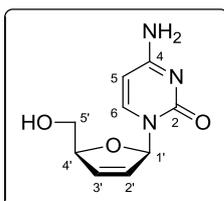
¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ 12.4 (CH₃), 63.8 (C_{5'}), 89.0 (C_{4'}), 91.0 (C_{1'}), 111.2 (C₅), 127.3 (C_{2'}), 135.9 (C_{3'}), 138.9 (C₆), 152.9 (C₂), 166.6 (C₄) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₁₀H₁₃N₂O₄ [M+H]⁺: 225.0870. Encontrada: 225.0873

Parte Experimental -----

2',3'-Dideshidro-2',3'-didesoxi-β-D-citidina (27c)



Sólido blanco

P_f: 167-169 °C

R_f: 0.27 (20% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₉H₁₁N₃O₃

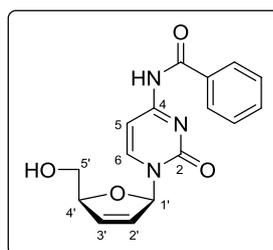
Masa molecular: 209.20 g/mol

¹H-RMN (300.13 MHz, D₂O): δ 3.73 (m, 2H, H_{5'}), 4.99 (m, 1H, H_{4'}), 5.98 (d, 1H, H_{2'}, *J* = 6.3 Hz), 6.00 (d, 1H, H₅, *J* = 7.7 Hz), 6.44 (d, 1H, H_{3'}, *J* = 6.0 Hz), 6.95 (m, 1H, H_{1'}), 7.74 (d, 1H, H₆, *J* = 7.5 Hz) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, D₂O): 62.3 (C_{5'}), 87.4 (C_{4'}), 91.0 (C_{1'}), 96.0 (C₅), 125.6 (C_{2'}), 134.2 (C_{3'}), 142.4 (C₆), 158.1 (C₂), 166.3 (C₄) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₉H₁₂N₃O₃ [M+H]⁺: 210.0879. Encontrada: 210.0884

***N*⁴-Benzoil-2',3'-dideshidro-2',3'-didesoxi-β-D-citidina (27d)**

Sólido blanco

P_f: 280 °C descompone

R_f: 0.66 (10% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₁₆H₁₅N₃O₄

Masa molecular: 313.31 g/mol

¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 3.78 (m, 2H, H_{5'}), 4.99 (m, 1H, H_{4'}), 6.05 (m, 1H, H_{2'}), 6.41 (dt, 1H, H_{3'}, *J* = 6.0, 1.6 Hz), 7.00 (dt, 1H, H_{1'}, *J* = 2.9, 1.4 Hz), 7.54 (m, 3H, H₅ + H_{arom}), 7.64 (m, 1H, H_{arom}), 7.97 (m, 2H, H_{arom}), 8.46 (d, 1H, H₆, *J* = 7.5 Hz) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): 63.7 (C_{5'}), 89.9 (C_{4'}), 93.4 (C_{1'}), 98.5 (C₅), 127.6 (C_{2'}), 129.2 (CH_{arom}), 129.8 (CH_{arom}), 134.1 (CH_{arom}), 134.7 (C_{arom}), 135.5 (C_{3'}), 147.3 (C₆), 158.3 (C₂), 165.0 (C₄), 169.1 (C=O) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

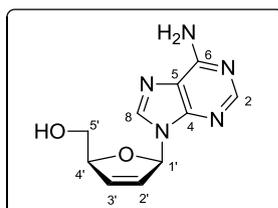
- Calculada para C₁₆H₁₆N₃O₄ [M+H]⁺: 314.1135. Encontrada: 314.1140

- Calculada para C₁₆H₁₅N₃NaO₄ [M+Na]⁺: 336.0955. Encontrada: 336.0958

- Calculada para C₁₆H₁₅KN₃O₄Si [M+K]⁺: 352.0694. Encontrada: 352.0699

Parte Experimental -----

2',3'-Dideshidro-2',3'-didesoxi-β-D-adenosina (27e)



Sólido blanco

P_f: 185-186 °C

R_f: 0.24 (10% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₁₀H₁₁N₅O₂

Masa molecular: 233.23 g/mol

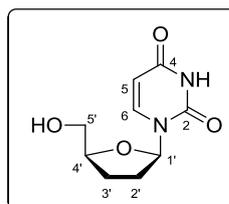
¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 3.75 (m, 2H, H_{5'}), 5.01 (m, 1H, H_{4'}), 6.13 (m, 1H, H_{2'}), 6.48 (dt, 1H, H_{3'}, *J* = 6.0, 1.7 Hz), 7.04 (dt, 1H, H_{1'}, *J* = 3.2, 1.7 Hz), 8.20 (s, 1H, H₂), 8.28 (s, 1H, H₈) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ 64.2 (C_{5'}), 89.8 (C_{1'}), 90.3 (C_{4'}), 120.2 (C₅), 126.8 (C_{2'}), 135.7 (C_{3'}), 141.3 (C₈), 150.3 (C₄), 153.8 (C₂), 157.4 (C₆) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₁₀H₁₂N₅O₂ [M+H]⁺: 234.0986. Encontrada: 234.0984
- Calculada para C₁₀H₁₁N₅NaO₂ [M+Na]⁺: 256.0805. Encontrada: 256.0804
- Calculada para C₁₀H₁₁KN₅O₂ [M+K]⁺: 272.0544. Encontrada: 272.0543

2',3'-Didesoxi-β-D-uridina (28a)



Sólido blanco

P_f: 116-117 °C

R_f: 0.42 (10% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₉H₁₂N₂O₄

Masa molecular: 212.20 g/mol

¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 1.96 (m, 2H, H_{3'}), 2.08 (m, 1H, H_{2'}), 2.40 (m, 1H, H_{2'}), 3.68 (dd, 1H, H_{5'}, *J* = 12.2, 4.0 Hz), 3.86 (dd, 1H, H_{5'}, *J* = 12.2, 3.1 Hz), 4.14 (m, 1H, H_{4'}), 5.66 (d, 1H, H₆, *J* = 8.1 Hz), 6.04 (dd, 1H, H_{1'}, *J* = 6.8, 3.4 Hz), 8.08 (d, 1H, H₆, *J* = 8.1 Hz) ppm.

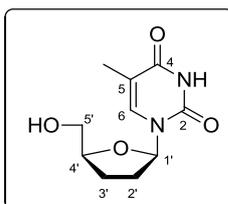
¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ 25.9 (C_{3'}), 33.5 (C_{2'}), 63.7 (C_{5'}), 83.5 (C_{4'}), 87.7 (C_{1'}), 101.9 (C₅), 142.6 (C₆), 152.2 (C₂), 166.4 (C₄) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₉H₁₃N₂O₄ [M+H]⁺: 213.0870. Encontrada: 213.0875
- Calculada para C₉H₁₁N₂NaO₄ [M+Na]⁺: 235.0689. Encontrada: 235.0694
- Calculada para C₉H₁₁KN₂O₄ [M+K]⁺: 251.0429. Encontrada: 251.0434

Parte Experimental -----

3'-Desoxi- β -D-5-timidina (28b)



Sólido blanco

P_f: 155-156 °C

R_f: 0.44 (10% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₁₀H₁₄N₂O₄

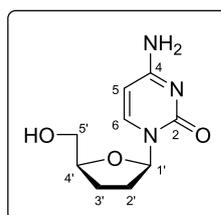
Masa molecular: 226.23 g/mol

¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 1.88 (d, 3H, Me, $J = 1.1$ Hz), 1.98 (m, 2H, H_{3'}), 2.07 (m, 1H, H_{2'}), 2.38 (m, 1H, H_{2'}), 3.68 (dd, 1H, H_{5'}, $J = 12.2, 3.8$ Hz), 3.88 (dd, 1H, H_{5'}, $J = 12.2, 2.9$ Hz), 4.13 (m, 1H, H_{4'}), 6.05 (dd, 1H, H_{1'}, $J = 6.8, 3.5$ Hz), 7.92 (d, 1H, H₆, $J = 1.1$ Hz) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ 12.4 (CH₃), 25.9 (C_{3'}), 33.3 (C_{2'}), 63.7 (C_{5'}), 83.2 (C_{4'}), 87.3 (C_{1'}), 110.8 (C₅), 138.4 (C₆), 152.4 (C₂), 166.6 (C₄) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₁₀H₁₅N₂O₄ [M+H]⁺: 227.1026. Encontrada: 227.1032
- Calculada para C₁₀H₁₄N₂NaO₄ [M+Na]⁺: 249.0846. Encontrada: 249.0851
- Calculada para C₁₀H₁₄KN₂O₄ [M+K]⁺: 265.0585. Encontrada: 265.0591

2',3'-Didesoxi-β-D-citidina (28c)

Sólido blanco

P_f: 208-210 °C

R_f: 0.27 (20% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₉H₁₃N₃O₃

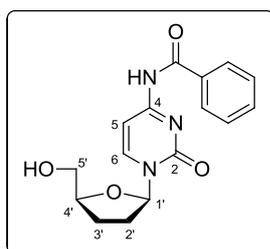
Masa molecular: 211.22 g/mol

¹H-RMN (300.13 MHz, D₂O): δ 1.78 (m, 1H, H_{3'}), 2.05 (m, 2H, H_{2'} + H_{3'}), 2.45 (m, 1H, H_{2'}), 3.72 (dd, 1H, H_{5'}, *J* = 12.4, 5.4 Hz), 3.87 (dd, 1H, H_{5'}, *J* = 12.4, 3.1 Hz), 4.23 (m, 1H, H_{4'}), 6.00 (d, 1H, H_{5'}, *J* = 7.5 Hz), 6.05 (dd, 1H, H_{1'}, *J* = 7.0, 2.7 Hz), 7.89 (d, 1H, H₆, *J* = 7.5 Hz) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, D₂O): δ 24.7 (C_{3'}), 31.9 (C_{2'}), 62.6 (C_{5'}), 82.2 (C_{4'}), 87.0 (C_{1'}), 95.5 (C₅), 141.6 (C₆), 157.3 (C₂), 165.9 (C₄) ppm.

Parte Experimental -----

***N*⁴-Benzoil-2',3'-didesoxi-β-D-citidina (28d)**



Sólido blanco

R_f: 0.66 (10% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₁₆H₁₇N₃O₄

Masa molecular: 315.32 g/mol

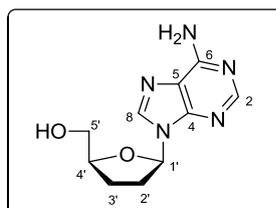
¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 1.94 (m, 2H, H_{3'}), 2.15 (m, 1H, H_{2'}), 2.53 (m, 1H, H_{2'}), 3.75 (dd, 1H, H_{5'}, *J* = 12.4, 3.7 Hz), 3.96 (dd, 1H, H_{5'}, *J* = 12.3, 2.9 Hz), 4.24 (m, 1H, H_{4'}), 6.05 (dd, 1H, H_{1'}, *J* = 6.7, 2.2 Hz), 7.57 (m, 4H, H₅ + H_{arom}), 7.97 (m, 2H, H_{arom}), 8.70 (d, 1H, H₆, *J* = 7.5 Hz) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ 25.0 (C_{3'}), 34.5 (C_{2'}), 63.2 (C_{5'}), 84.7 (C_{4'}), 89.6 (C_{1'}), 97.8 (C₅), 129.1 (CH_{arom}), 129.8 (CH_{arom}), 134.1 (CH_{arom}), 134.8 (C_{arom}), 146.7 (C₆), 157.9 (C₂), 164.7 (C₄), 169.1 (C=O) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₁₆H₁₈N₃O₄ [M+H]⁺: 316.1292. Encontrada: 316.1296
- Calculada para C₁₆H₁₇N₃NaO₄ [M+Na]⁺: 338.1111. Encontrada: 338.1116
- Calculada para C₁₆H₁₇KN₃O₄ [M+K]⁺: 354.0851. Encontrada: 354.0856

2',3'-Didesoxi-β-D-adenosina (28e)



Sólido blanco

P_f: 186-188 °C

R_f: 0.33 (10% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₁₀H₁₃N₅O₂

Masa molecular: 235.24 g/mol

¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 2.15 (m, 2H, H_{3'}), 2.51 (m, 2H, H_{2'}), 3.67 (dd, 1H, H_{5'}, *J* = 12.2, 3.9 Hz), 3.87 (dd, 1H, H_{5'}, *J* = 12.2, 3.0 Hz), 4.27 (m, 1H, H_{4'}), 6.28 (dd, 1H, H_{1'}, *J* = 5.8, 4.8 Hz), 8.18 (s, 1H, H₂), 8.41 (s, 1H, H₈) ppm.

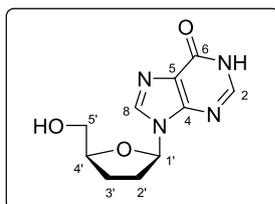
¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ 26.5 (C_{3'}), 33.7 (C_{2'}), 64.5 (C_{5'}), 83.6 (C_{4'}), 87.4 (C_{1'}), 120.5 (C₅), 141.0 (C₂), 149.8 (C₄), 153.5 (C₈), 157.3 (C₆) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₁₀H₁₄N₅O₂ [M+H]⁺: 236.1142. Encontrada: 236.1148
- Calculada para C₁₀H₁₃N₅NaO₂ [M+Na]⁺: 258.0961. Encontrada: 258.0968
- Calculada para C₁₀H₁₃KN₅O₂ [M+K]⁺: 274.0701. Encontrada: 274.0707

Parte Experimental -----

2',3'-Didesoxi-β-D-inosina (28f)



Sólido blanco

P_f: 160-163 °C

R_f: 0.28 (10% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₁₀H₁₂N₄O₃

Masa molecular: 236.23 g/mol

¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 2.12 (m, 2H, H_{3'}), 2.52 (m, 2H, H_{2'}), 3.67 (dd, 1H, H_{5'}, *J* = 12.1, 4.2 Hz), 3.84 (dd, 1H, H_{5'}, *J* = 12.1, 3.2 Hz), 4.26 (m, 1H, H_{4'}), 6.31 (dd, 1H, H_{1'}, *J* = 6.5, 3.5 Hz), 8.04 (s, 1H, H₂), 8.39 (s, 1H, H₈) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ 26.4 (C_{3'}), 33.9 (C_{2'}), 64.3 (C_{5'}), 83.9 (C_{4'}), 87.3 (C_{1'}), 125.7 (C₅), 140.4 (C₈), 146.6 (C₂), 149.3 (C₄), 159.0 (C₆) ppm.

CAPÍTULO 3

Síntesis de oligonucleótidos que contienen 1-aminometil o 1-mercaptometil-2-desoxi-D-ribofuranosa: purificación, caracterización y conjugación con lípidos y fluoróforos

Antecedentes

La terapia génica constituye una alternativa muy prometedora en el desarrollo de fármacos más selectivos dirigidos al origen de la enfermedad. El descubrimiento de las propiedades que poseen los oligonucleótidos en el silenciamiento génico ha desencadenado grandes esfuerzos en la preparación de estructuras miméticas de ADN o ARN.

Sin embargo, aunque el concepto de terapia génica es muy simple y racional, un número limitado de moléculas (Introducción, Tabla 2) han sido aprobadas por las distintas agencias de medicamentos como agentes terapéuticos. La estabilidad frente a nucleasas, la afinidad de unión o la farmacocinética son las principales barreras a las que se enfrenta la Química Médica en el desarrollo de oligonucleótidos terapéuticos o de diagnóstico.

Con el objetivo de superar estos obstáculos, se han investigado, por un lado, modificaciones químicas que aumenten la estabilidad metabólica frente a la acción de las nucleasas mientras se mantienen, o mejoran, las propiedades de hibridación. Y por otro, se han realizado importantes estudios para mejorar las propiedades farmacocinéticas y la absorción celular de estas moléculas.

1. Síntesis de oligonucleótidos mediante el método del fosforamidito

La necesidad de preparar oligonucleótidos con estructuras definidas dio lugar al desarrollo de distintas técnicas de síntesis,¹⁹⁶ aunque no fue hasta la década de los años 70 cuando se desarrollaron los protocolos de fase sólida, los ciclos sintéticos se automatizaron y el HPLC comenzó a utilizarse para la purificación de oligonucleótidos. Como se ha indicado en la introducción, la técnica del fosforamidito en fase sólida es la más utilizada para la preparación de oligonucleótidos, permitiendo la unión de derivados de 2'-desoxinucleósidos (dA, dC, dG y T), ribonucleósidos (A, C, G y U) o nucleósidos químicamente modificados, con enlaces fosfodiéster naturales o con fosfatos modificados como los fosforotioatos. Al contrario que la replicación natural en las células, que se produce en sentido 5'→3', la síntesis convencional de un oligonucleótido se realiza en la dirección 3'→5', comenzando por un nucleósido unido a un soporte sólido, a través de un conector, en el extremo 3' y aprovechando la mayor reactividad del hidroxilo primario en 5' durante el acoplamiento al siguiente nucleósido.

El éxito de la técnica del fosforamidito en fase sólida se debe a que ha podido ser adaptada a un instrumento completamente automatizado (Figura 32) en el que los residuos se acoplan de forma secuencial en el orden requerido para formar el oligonucleótido deseado. Se trata de una técnica robusta, reproducible y asequible que permite la síntesis de cadenas de gran tamaño (hasta 200 residuos). Aunque la síntesis de oligonucleótidos especializados de gran tamaño es muy interesante, a medida que la longitud comienza a superar las 100 nucleobases, el rendimiento de los productos deseados se ve limitado por reacciones secundarias e incluso las pequeñas ineficiencias en el acoplamiento

¹⁹⁶ R. L. Letsinger, V. Mahadevan. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *80*, 6212–6222.

conlleven grandes efectos. Además del acoplamiento imperfecto (aproximadamente 98.5-99.5%), la exposición química de las cadenas supone otra limitación, ya que produce mutagénesis incontrolada.¹⁹⁷

Los estudios biológicos de alto rendimiento que involucran miles de genes han obligado a una evolución de la síntesis en fase sólida, fomentando el desarrollo de sistemas multicanal que permiten sintetizar entre 100 y 200 oligonucleótidos en una sola ejecución.¹⁹⁸



Figura 32. Sintetizador de ADN y ARN.

1.1. Grupos protectores en el fosforamidito

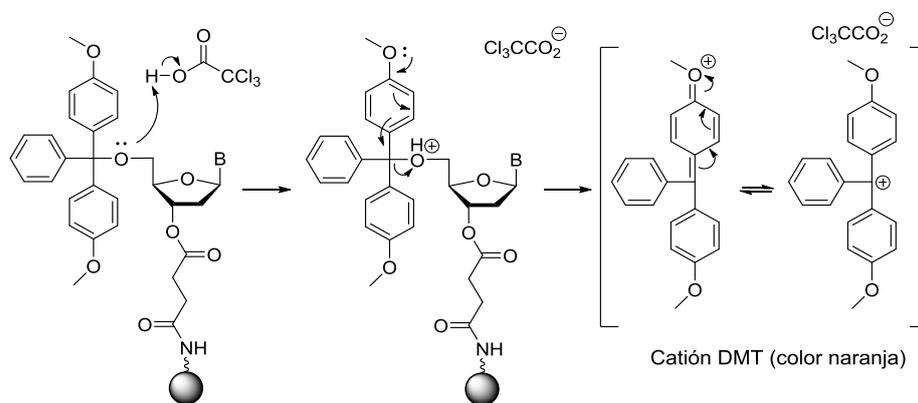
Uno de los aspectos más importantes de la técnica del fosforamidito es la utilización de distintos grupos protectores que evitan las posibles reacciones secundarias que pudieran producirse durante la preparación de los oligonucleótidos. En líneas generales, estos grupos protectores se pueden dividir en tres tipos: protección del hidroxilo primario en 5', protección del grupo amino exocíclico de la base nitrogenada y protección del fósforo con cianoetilo.

¹⁹⁷ S. Rayner, S. Brignac, R. Bumeister, Y. Belosludtsev, T. Ward, O. Grant, K. O'Brien, G. A. Evans, H. R. Garner. *Genome. Res.* **1998**, 8, 741-747.

¹⁹⁸ a) D. A. Lashkari, S. P. Hunicke-Smith, R. M. Norgren, R. W. Davis, T. Brennan. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 7912-7915; b) S. Rayner, S. Brignac, R. Bumeister, Y. Belosludtsev, T. Ward, O. Grant, K. O'Brien, G. A. Evans, H. R. Garner. *Genome Res.* **1998**, 8, 741-747.

Antecedentes -----

a) Aunque se ha descrito una gran variedad de grupos¹⁹⁹ para la protección del hidroxilo en 5' de los monómeros durante la síntesis de los oligonucleótidos, el más empleado es el dimetoxitritilo (DMT), que fue utilizado por primera vez para este fin por Gilham y Khorana.²⁰⁰ Su éxito es debido a tres aspectos principales: la facilidad de síntesis, gracias a la gran selectividad que presenta el grupo hidroxilo primario; la desprotección rápida y cuantitativa con ácido en medio no acuoso para dar lugar a un catión coloreado, el cual es útil para la monitorización de la destrilación durante la síntesis automatizada, y la hidrofobicidad que otorga a las cadenas debido a su gran tamaño, muy útil en la purificación de oligonucleótidos cortos.



Esquema 62. Desprotección del grupo dimetoxitritilo.

b) La mayoría de los fosforamiditos incorporan un grupo protector *N*-acilo para bloquear el grupo amino exocíclico de las nucleobases. La utilización de este grupo se debe a la facilidad para introducirlo mediante el protocolo de Jones,²⁰¹ a su estabilidad durante el ensamblaje de los

¹⁹⁹ 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.

²⁰⁰ P. T. Gilham, H. G. Khorana. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 6212-6222.

²⁰¹ G. S. Ti, B. L. Gaffney, R. A. Jones. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 1316-1319.

nucleósidos, y a su desprotección bajo condiciones básicas suaves mientras se mantiene la integridad del oligonucleótido.

c) El grupo protector preferido para el fosfato internucleotídico es el 2-cianoetilo (CNE), descrito por Sinha *et al.*,²⁰² que ha supuesto una gran contribución en la evolución de la química de fosforamiditos. Las razones para su uso son la relativa sencillez y rapidez sintética de derivados con este grupo, su estabilidad durante la unión de los monómeros y su simple desprotección en condiciones básicas.

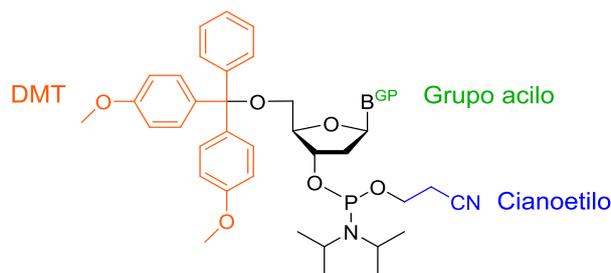


Figura 33. Grupos protectores del fosforamidito.

1.2. Ciclo de síntesis

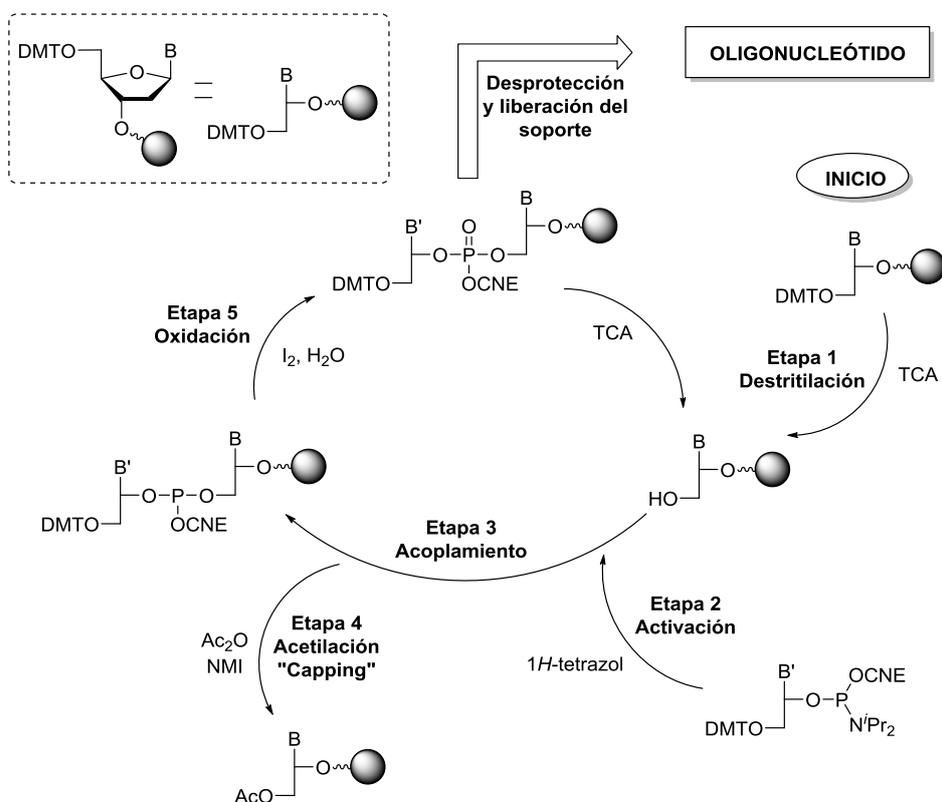
La síntesis química de los oligonucleótidos se basa en una adición consecutiva de residuos de nucleótido en el extremo 5' de la cadena en formación, donde cada unión supone un ciclo sintético constituido por cinco etapas (Esquema 63).

La primera etapa consiste en la eliminación del grupo protector de la posición 5' (destritilación) mediante un tratamiento con una disolución diluida de ácido tricloroacético (TCA). Esta desprotección es muy susceptible al medio ácido, ya que el catión generado presenta una gran estabilidad debida al carácter electrodonor de los sustituyentes de los

²⁰² N. D. Sinha, J. Biernat, J. McManus, H. Köster. *Nucl. Acids Res.* **1984**, *12*, 4539-4557.

Antecedentes -----

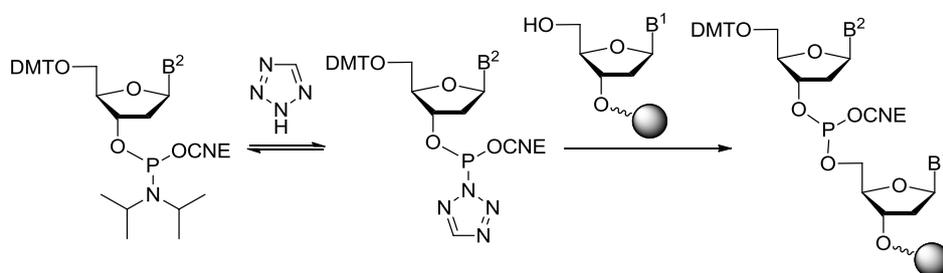
anillos aromáticos. Además, estas condiciones son lo suficientemente suaves como para evitar la depurinación, es decir, la ruptura del enlace glicosídico (C1'-N) cuando la base nitrogenada es púrica.



Esquema 63. Ciclo de síntesis de oligonucleótidos mediante el método del fosforamidito. Notas: TCA, ácido tricloroacético; NMI, *N*-metilimidazol; CNE, 2-cianoetilo.

La posterior etapa se basa en la activación con 1*H*-tetrazol del siguiente fosforamidito que se va a incorporar a la cadena. El mecanismo más aceptado para esta fase (Esquema 64) consiste en una protonación del fosforamidito que origina un anión tetrazoluro, el cual desplaza al ión *N,N*-diisopropilamonio y da lugar a un intermedio activado que reacciona con el hidroxilo primario del último residuo incorporado a la cadena. Se utiliza un exceso de fosforamidito (unos 10 equivalentes) con respecto al

nucleósido soportado en la resina, con el fin de aumentar la eficacia del acoplamiento hasta valores casi cuantitativos. De la misma manera, a pesar de actuar como catalizador, se utiliza exceso de 1*H*-tetrazol (40 equivalentes) para incrementar la cinética de la reacción y que el acoplamiento ocurra en tiempos cortos (incluso inferiores a un minuto).



Esquema 64

En la cuarta etapa se lleva a cabo un proceso de “capping” con anhídrido acético, que consiste en el bloqueo de las cadenas que no han reaccionado en la etapa anterior, de forma que se evita la unión del siguiente fosforamidito que se incorpore, limitando así el número de secuencias erróneas.

Por último, tiene lugar la oxidación del intermedio fosfito a fosfatotriéster por el tratamiento con una disolución de yodo acuoso. Como en esta reacción se genera yoduro de hidrógeno, se suelen utilizar bases como piridina o 2,6-lutidina para neutralizarlo.

El ciclo se repite tantas veces como sea necesario hasta obtener la longitud y la secuencia deseada en el oligonucleótido generado. La eliminación de los grupos protectores de las nucleobases y del grupo fosfato, así como la liberación del oligonucleótido del soporte sólido, se llevan a cabo en una única etapa final mediante el tratamiento con una disolución acuosa de amoníaco a 55 °C.

2. Estrategia gapmer

Como se ha plasmado a lo largo de esta memoria, uno de los objetivos de la química de los ácidos nucleicos es la introducción de modificaciones estructurales que mejoren sus propiedades y permitan su empleo como fármacos que inhiban la expresión génica.

Algunos oligonucleótidos producen silenciamiento génico por un mecanismo que involucra la activación de enzimas RNasas que cortan la hebra de ARN diana en los híbridos ADN/ARN.

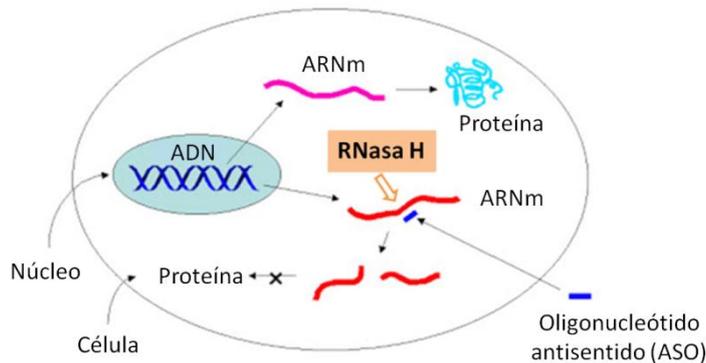


Figura 34. Traducción normal del ARNm (color rosa) versus degradación del ARNm (color rojo) mediante una RNasa que reconoce el dúplex ARN-ASO.

Sin embargo, la RNasa es muy sensible a las modificaciones estructurales introducidas en el ácido nucleico sintético y para que desarrolle su actividad catalítica es necesario un tramo de desoxirribonucleótidos complementarios, denominado “gap”, que forme el heterodúplex con el ARN objetivo. Por esta razón, en la síntesis de oligonucleótidos se recurre a la estrategia “gapmer”, que consiste en preparar cadenas híbridas donde la parte central (6-10 residuos) tiene una estructura de ADN complementaria al ARN y adecuada para la RNasa H, y en las regiones terminales se introducen ribonucleótidos con modificaciones químicas que confieren una alta afinidad por el ARNm

diana y resistencia contra la digestión de las nucleasas.²⁰³ La mayoría de los medicamentos antisentido aprobados son de tipo gapmer y, además, existe un gran número de ellos en fase de ensayos clínicos.

3. Grupos reactivos en la síntesis de oligonucleótidos conjugados

Un aspecto clave en los oligonucleótidos conjugados es el diseño y la síntesis de moléculas con determinadas funcionalidades que permitan conectar los ligandos al oligonucleótido. Con este fin, se han desarrollado varios derivados nucleosídicos y no-nucleosídicos.²⁰⁴ Una de las estrategias más convencional es introducir un grupo reactivo en alguna posición del oligómero para su posterior funcionalización. En la mayoría de los casos, estos grupos se introducen en las zonas 3' o 5' terminales debido a la facilidad de acceso de estas regiones y al menor impacto del ligando en las propiedades de hibridación que en una posición interna. Algunos de los grupos reactivos más comunes son los grupos amino y tiol,²⁰⁵ aunque también se han descrito varias reacciones basadas en la química click.

3.1. Grupo amino

El grupo amino reacciona fácilmente con derivados de ácidos carboxílicos, dando lugar a amidas, y con isotiocianatos, formando tioureas. A pesar de que las bases nucleotídicas presentan funciones

²⁰³ a) S. Shibahara, S. Mukai, T. Nishihara, H. Inoue, E. Ohtsuka, H. Morisawa. *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 4403-4415; b) B. P. Monia, E. A. Lesnik, C. Gonzalez, W. F. Lima, D. McGee, C. J. Guinosso, A. M. Kawasaki, P. D. Cook, S. M. Freier. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 14514-14522; c) M. Shimojo, Y. Kasahara, M. Inoue, S. Tsunoda, Y. Shudo, T. Kurata, S. Obika. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 7618-7927.

²⁰⁴ a) H. Lönnberg. *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 1065-1094; b) J. Winkler. *Ther. Delivery* **2013**, *4*, 791-809.

²⁰⁵ M. M. Greenberg. *Curr. Protoc. Nucleic. Acid. Chem.* **2000**, *2*, 4.5.1-4.5.19.

Antecedentes -----

amino, son grupos aromáticos con baja reactividad. Por eso, es posible introducir ligandos en los oligonucleótidos utilizando aminas primarias. Se han descrito varios enlazadores de grupo amino en la bibliografía, aunque el diseño de los mismos es distinto si se considera el extremo 5' o el 3'.

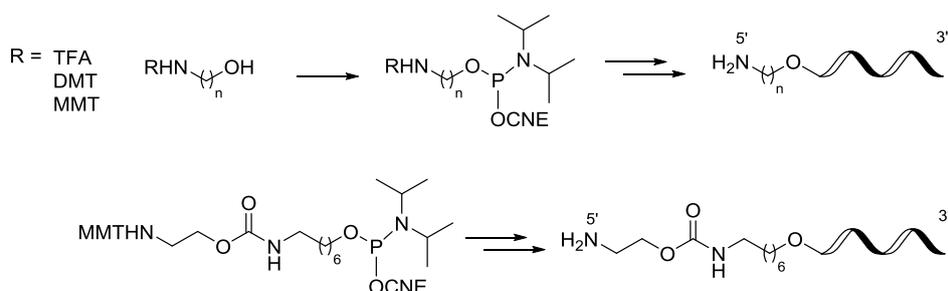
Para añadir posiciones amino reactivas a los extremos 5' de las secuencias se ha recurrido tanto a derivados de aminoalcoholes como a derivados de nucleósido. Se han estudiado distintas longitudes y estructuras de aminoalcoholes (Esquema 65). Así, Coull *et al.*²⁰⁶ y Connolly²⁰⁷ describen la preparación de oligonucleótidos con un grupo amino en el extremo 5', insertado mediante un derivado aminoalcohol (aminoetanol y 3-aminopropanol, respectivamente) adecuado. No obstante, el aminohexil amidito²⁰⁸ es el aminoalcohol alifático más utilizado para introducir esta funcionalidad en la posición 5'. Komatsu *et al.*²⁰⁹ describen la síntesis de oligonucleótidos con un grupo amino en el extremo 5' introducido a través de un aminoetil carbamato. Por otra parte, se ha demostrado que la presencia de una función éter en posición β al grupo amino incrementa la nucleofilia y permite reacciones de conjugación más eficientes.

²⁰⁶ J. M. Coull, H. L. Weith, R. Bischoff. *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 3991-3994.

²⁰⁷ B. A. Connolly. *Nucleic Acids Res.* **1987**, 15, 3131-3139.

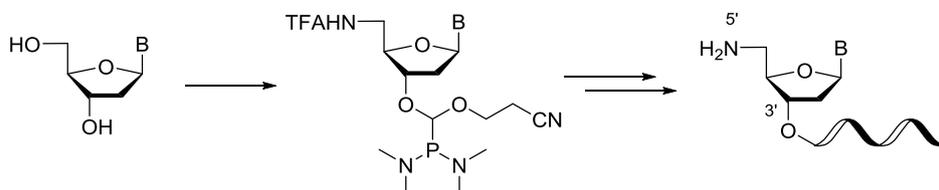
²⁰⁸ P. C. Emson, H. Arai, S. Agrawal, C. Christodoulou, M. J. Gait. *Methods Enzymol.* **1989**, 168, 753-761.

²⁰⁹ a) Y. Komatsu, N. Kojima, M. Sugino, A. Mikami, K. Nonaka, Y. Fujinawa, T. Sugimoto, K. Sato, K. Matsubarab, E. Ohtsuka. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16, 941-949.
b) N. Kojima, T. Takebayashi, A. Mikami, E. Ohtsuka, Y. Komatsu. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 2144-2147.



Esquema 65. 5'-Aminoalcoholes derivados. Notas: TFA, trifluoroacetato; DMT, dimetoxitritilo; MMT, monometoxitritilo; CNE, 2-cianoetilo.

Sproat *et al.*²¹⁰ llevan a cabo la síntesis de 5'-amino-2',5'-didesoxinucleosido-3'-*O*-fosforamiditos a partir de los correspondientes 2'-desoxinucleósidos, dando lugar a 5'-amino-oligodesoxinucleótidos (Esquema 66).



Esquema 66

Para la introducción de grupos amino en el extremo 3' o en posiciones internas se ha recurrido a la utilización de aminoalquildioles acíclicos (Esquema 67). Nelson *et al.*²¹¹ realizan la síntesis de un derivado de 3-amino-1,2-propanodiol, pero su incorporación a una posición interna de la cadena disminuye la distancia del fosfato internucleotídico afectando a las propiedades de hibridación del dúplex. Para solventarlo, llevan a cabo la síntesis de un derivado de 2-aminobutil-1,3-propanodiol²¹² que permite conservar la distancia internucleotídica natural. A pesar de ello, como

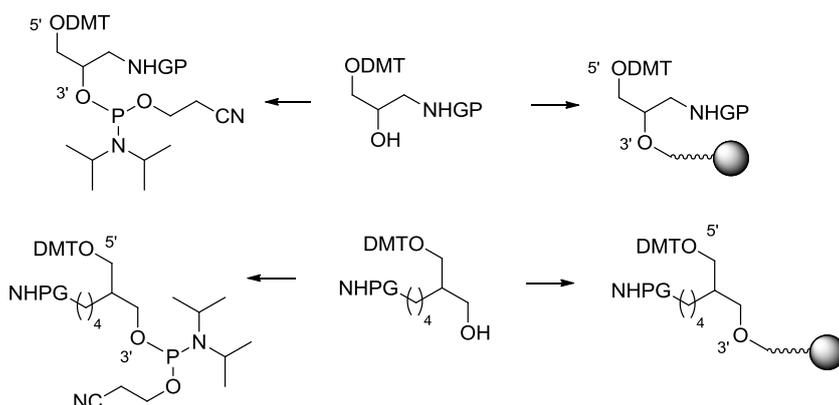
²¹⁰ B. S. Sproat, B. Beijer, P. Rider. *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 6181-6196.

²¹¹ P. S. Nelson, R. Sherman-Gold, R. Leon. *Nucleic Acids Res.* **1989**, *17*, 7179-7186.

²¹² P. S. Nelson, M. Kent, S. Muthini. *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 6253-6259.

Antecedentes -----

estos derivados no son enantioméricamente puros podrían producir mezclas de diastereoisómeros.



Esquema 67. Notas: DMT, dimetoxitritilo; GP, grupo protector.

Otra estrategia a la que se ha recurrido para incorporar funciones amino en los oligonucleótidos consiste en modificar la posición C-5 de las bases pirimidínicas (Figura 35).²¹³ Se sabe que los sustituyentes en esta posición proporcionan una interferencia mínima con la polimerización enzimática y no alteran significativamente la estructura del ADN.²¹⁴ El principal inconveniente, sin embargo, se debe a que la unión covalente de un ligando a una base heterocíclica interna en una posición que está involucrada en el apareamiento de bases puede perturbar la formación del dúplex.

Asimismo, otra estrategia ampliamente empleada en la introducción de una funcionalidad amina implica la modificación de la posición 2' de

²¹³ a) H. Sawai, A. Nakamura, S. Sekiguchi, K. Yumoto, M. Endoh, H. Ozaki. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 1997-1998. b) V. E. Kuznetsova, M. A. Spitsyn, V. E. Shershov, T. O. Guseinov, E. E. Fesenko, S. A. Lapa, A. Y. Ikonnikova, M. A. Avdonina, T. V. Nasedkina, A. S. Zasedatelev et al. *Mendeleev Commun.* **2016**, 26, 95-98.

²¹⁴ J. K. Tesler, K. A. Cruickshank, L. E. Morrison, T. L. Netzel. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 6966-6976.

la ribosa.²¹⁵ La alteración sintética de esta posición es sencilla y, en la forma A del ADN, se localiza en el surco menor de la doble hélice orientada hacia la disolución.

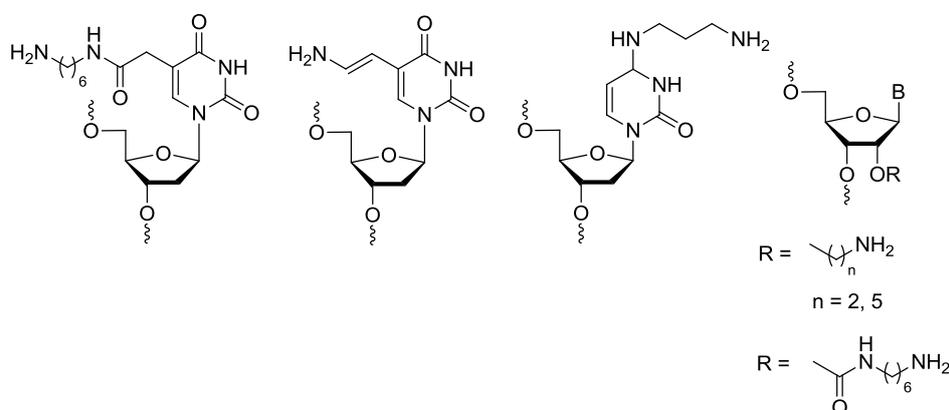


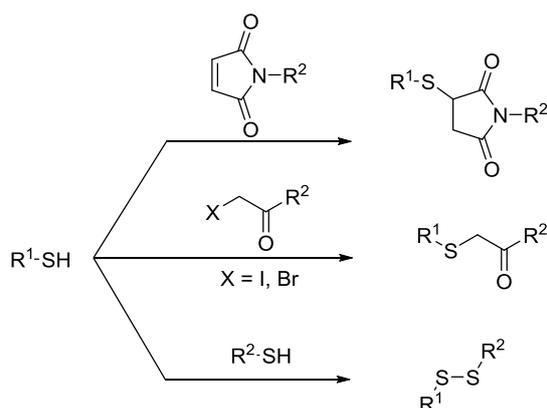
Figura 35

3.2. Grupo tiol

Los oligonucleótidos que presentan un grupo tiol en su estructura son frecuentemente utilizados en la formación de conjugados, ya que este grupo reacciona selectivamente con una amplia variedad de sustratos, como los derivados de maleimida y haloacetamida para formar tioéteres estables. También tienen una gran importancia los enlaces disulfuro debido a su inestabilidad en el citosol, que permite la liberación selectiva de los oligonucleótidos de sus ligandos conjugados en el medio intracelular (Esquema 68).

²¹⁵ a) M. Manoharan, C. J. Guinasso, P. D. Cook. *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 7171-7174; b) I. Dubey, G. Pratviel, B. Meunier. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1.* **2000**, 3088-3095; c) S. Jin, C. V. Miduturu, D. C. McKinney, S. K. Silverman. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 4284-4299.

Antecedentes -----



Esquema 68. R¹ oligonucleótido, R² ligando, o viceversa.

Se han estudiado distintas estrategias para la preparación de oligonucleótidos modificados con un grupo tiol. De la misma forma que con el grupo amino, se han descrito tanto derivados acíclicos como derivados nucleosídicos. La incorporación de 4-tiouridina²¹⁶ constituye la primera estrategia descrita.

Como derivados no nucleosídicos se ha recurrido a mercaptoalcoholes,²¹⁷ que permiten introducir grupos tiol en el extremo 5', o a derivados de treoninol,²¹⁸ que permiten la introducción del grupo tiol en cualquier posición de la cadena (Figura 36).

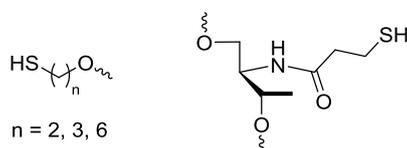


Figura 36

²¹⁶ I. Schwartz, J. Ofengand. *J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1974**, 71, 3951-3955.

²¹⁷ B. A. Connolly, P. Rider. *Nucleic Acids Res.* **1985**, 13, 4485-4502.

²¹⁸ S. Pérez-Rentero, S. Grijalvo, R. Ferreira, R. Eritja. *Molecules* **2012**, 17, 10026-10045.

En analogía con el grupo amino, las modificaciones de los derivados nucleosídicos que permiten la introducción de la función tiol se han establecido tanto en la posición 2' del anillo de ribosa^{215c,219} como en las bases nucleotídicas.²²⁰ De la misma manera, los 5'-mercapto didesoxinucleósidos²²¹ han sido utilizados para la incorporación del grupo reactivo en el extremo 5' del oligonucleótido (Figura 37).

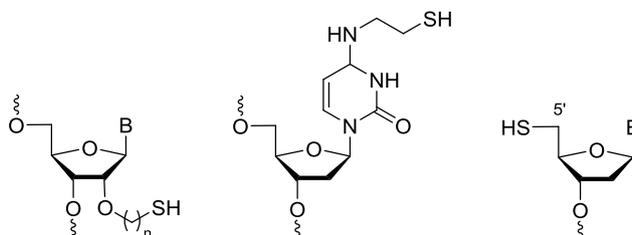


Figura 37

3.3. Química click

La química click (*click chemistry*) es un concepto introducido por Sharpless²²² en 2001 que engloba un grupo de reacciones que son rápidas, estereoespecíficas, con altos rendimientos, que generan subproductos benignos fáciles de eliminar y que son versátiles para unir diversas estructuras sin una protección previa. La aplicación de la química click en la formación de bioconjugados fue demostrada por Meldal y col.²²³ al preparar peptidotriazoles en fase sólida. Estos estudios pusieron el inicio en la introducción de distintas funciones y grupos en

²¹⁹ C. W. Gundlach, T. R. Ryder, G. D. Glick. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 4039-4042.

²²⁰ a) J. T. Goodwin, G. D. Glick. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 5549-5552; b) S. E. Osborne, R. J. Cain, G. D. Glick. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1171-1182; c) D. Gottschling, H. Seliger, G. Tarrasón, J. Piulats, R. Eritja. *Bioconjugate Chem.* **1998**, *9*, 831-837.

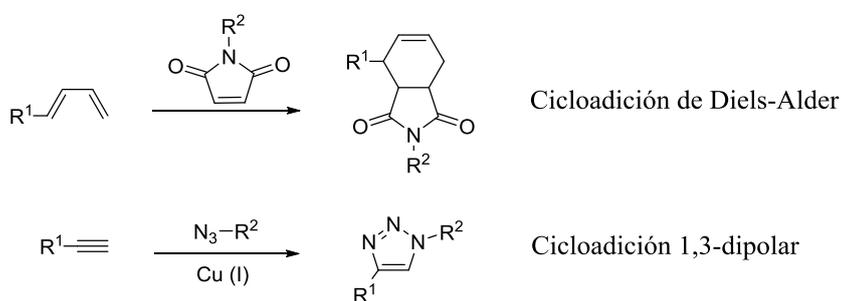
²²¹ B. S. Sproat, B. Beijer, P. Rider, P. Neuner. *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 4837-4848.

²²² H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004-2021.

²²³ C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064.

Antecedentes -----

biomoléculas. Las reacciones de cicloadición²²⁴ han sido ampliamente estudiadas en la formación de oligonucleótidos conjugados (Esquema 69); entre otros motivos, porque involucran grupos funcionales poco comunes en las biomoléculas que permiten reacciones quimioselectivas.



Esquema 69

4. Ligandos conjugados con oligonucleótidos

La variedad de ligandos que se han conjugado con oligonucleótidos es muy amplia, aunque en esta sección únicamente se hará referencia a los ácidos grasos y a las moléculas fluorescentes.

4.1. Ácidos grasos

Uno de los mayores desafíos en el desarrollo de medicamentos es el transporte de los mismos hacia las dianas objetivo. Por esta razón, son necesarias tecnologías de distribución donde se aprovechen las interacciones de los fármacos con proteínas plasmáticas que faciliten su transporte desde el lugar de administración.

²²⁴ K. Krell, D. Harijan, D. Ganz, L. Doll, H. A. Wagenknecht. *Bioconjugate Chem.* **2020**, *31*, 990-1011.

La conjugación de oligonucleótidos con ácidos grasos utiliza las propiedades naturales de transporte de la albúmina sérica humana,²²⁵ la proteína plasmática más abundante en la sangre que transporta ligandos endógenos, como los ácidos grasos, y que tiene una vida media circulatoria sanguínea larga. Se ha explotado la existencia de múltiples sitios de unión a ligandos en el diseño de fármacos que se unen a la albúmina, como el análogo de insulina detemir,²²⁶ modificado con un ácido graso de 14 carbonos, o la liraglutida,²²⁷ un fármaco aprobado para el tratamiento de la diabetes tipo 2 que presenta ácido palmítico.

En los últimos años, se han realizado diversos estudios para establecer las condiciones óptimas en la conjugación de oligonucleótidos a ácidos grasos. Las investigaciones de Howard y col.²²⁸ han evidenciado que el número, la posición y el tipo de ácido graso influyen en la afinidad de unión del oligonucleótido conjugado a la albúmina. De forma que demuestran que la conjugación de dos ácidos mejora su unión por la albúmina en comparación con un único ácido conjugado. Por otro lado, Biscans *et al.*²²⁹ han estudiado *in vivo* cómo afecta la valencia de los ácidos conjugados al siARN en sus propiedades fisicoquímicas, las cuales influyen directamente en la distribución, eliminación y silenciamiento. Estas investigaciones concluyen que los conjugados con ácidos grasos trivalentes permanecen predominantemente en el sitio de inyección, mientras que los siARN unidos a ácidos monovalentes se liberan rápidamente en la circulación y se acumulan principalmente en el riñón.

²²⁵ F. Kratz. *J. Controlled Release* **2008**, *132*, 171-183.

²²⁶ P. Home, P. Kurtzhals. *Expert Opin. Pharmacother.* **2006**, *7*, 325-343.

²²⁷ A. Plum, L.B. Jensen, J.B. Kristensen. *J. Pharm. Sci.* **2013**, *102*, 2882-2888.

²²⁸ M. L. Hvam, Y. Cai, F. Dagnæs-Hansen, J. S. Nielsen, J. Wengel, J. Kjems, K. A. Howard. *Mol. Ther.* **2017**, *25*, 1710-1717.

²²⁹ A. Biscans, A. Coles, D. Echeverria, A. Khvorova. *J. Control Release* **2019**, *302*, 116-125.

Antecedentes -----

Los estudios recientes de Seth y col.²³⁰ establecen que la afinidad de unión de los oligonucleótidos a las proteínas plasmáticas es mayor con ácidos grasos de 16 o 18 átomos de carbono, no influyendo el número de insaturaciones, y que tanto el ácido oleico como el palmítico aumentan la acción del oligonucleótido en los músculos esquelético y cardíaco.

En la actualidad, existe un oligonucleótido conjugado con ácido palmítico, GRN163L, que se encuentra en fase II de ensayos clínicos para la mielofibrosis.²³¹ Estudios *in vitro* han demostrado que la actividad de la telomerasa, desregulada en muchos tipos de cánceres, es inhibida en mayor medida tras la conjugación con ácido palmítico.

4.2. Moléculas fluorescentes

Las moléculas de ARN son responsables de una amplia gama de funciones en las células vivas y su nivel de expresión está involucrado en el correcto funcionamiento de las células. Por ello, se han desarrollado numerosos métodos para medir esta expresión y/o las diferencias en los niveles de expresión génica entre poblaciones celulares. Es en este punto donde los oligonucleótidos conjugados con fluoróforos tienen especial relevancia al ser poderosos instrumentos de detección y análisis que permiten rastrear partículas de ARN y nucleótidos en células vivas. El principio básico en el que se basa esta herramienta es en la emisión de radiación detectable y cuantificable cuando el conjugado se hibrida a una secuencia de ARN diana.

²³⁰ a) T. P. Prakash, A. E. Mullick, R. G. Lee, J. Yu, S. T. Yeh, A. Low, A. E. Chappell, M. E. Ostergaard, S. Murray, H. J. Gaus, et al. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, 6029-6044; b) A. E. Chappell, H. J. Gaus, A. Berdeja, R. Gupta, M. Jo, T.P. Prakash, M. Ostergaard, E. E. Swayze, P. P. Seth. *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48*, 4382-4395.

²³¹ B. S. Herbert, G. C. Gellert, A. Hochreiter, K. Pongracz, W. E. Wright, D. Zielinska, A. C. Chin, C. B. Harley, J. W. Shay, S. M. Gryaznov. *Oncogene* **2005**, *24*, 5262-5268.

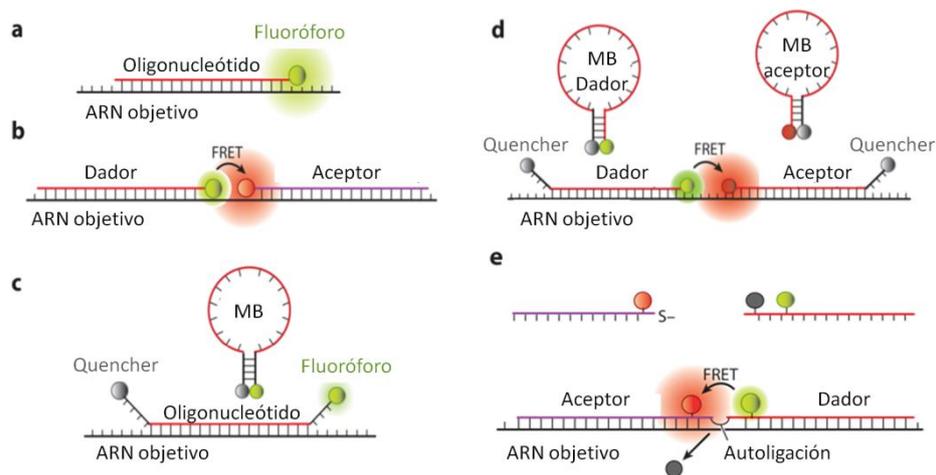


Figura 38

Son considerables las técnicas²³² a las que se ha recurrido para la detección de moléculas de ARN *in vivo* (Figura 38), entre ellas se incluyen la hibridación fluorescente *in situ* (FISH)²³³ y las balizas moleculares (*Molecular Beacons*, MBs).²³⁴ La técnica FISH implica la detección de genes específicos en células mediante la hibridación con una secuencia complementaria que tiene adherida una molécula fluorescente. La utilización de oligonucleótidos marcados con diferentes colorantes fluorescentes que emitan a diferentes longitudes de onda, permite la detección de varios genes en el mismo experimento. Las MBs son moléculas no fluorescentes en su forma libre pero que exhiben una fuerte fluorescencia cuando se unen a secuencias objetivo. Son oligonucleótidos que presentan un fluoróforo en un extremo y un desactivante en el otro y que, cuando están en forma libre, poseen una estructura terciaria en forma de horquilla que mantiene estas dos

²³² G. Bao, W. J. Rhee, A. Tsourkas. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2009**, *11*, 25 - 47.

²³³ a) H. A. John, M. L. Birnstiel, K. W. Jones. *Nature* **1969**, *223*, 582-587; b) D. Huber, L. Voith von Voithenberg, G. V. Kaigala. *Micro Nano Eng.* **2018**, *1*, 15-24.

²³⁴ a) S. Tyagi, F.R. Kramer. *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 303-308; b) K. Wang, Z. Tang, C. J. Yang, Y. Kim, X. Fang, W. Li, Y. Wu, C. D. Medley, Z. Cao, J. Li, P. Colon, H. Lin, W. Tan. *Angew. Chem. Int.* **2009**, *48*, 856-870.

Antecedentes ----

funciones próximas evitando la emisión de fluorescencia. La unión del oligonucleótido con la secuencia diana induce cambios conformacionales que permiten la apertura de la horquilla y la emisión de la fluorescencia.

Algunos de los fluoróforos más utilizados en FISH son los derivados de fluoresceína [isotiocianato de fluoresceína (FITC) o éster de 5(6)-carboxifluoresceína-*N*-hidroxisucimida (FluoX), con fluorescencia verde], los derivados de rodamina (isotiocianato de tetrametilrodamina, rojo Texas, con fluorescencia roja) o acetato de aminometilcumarina (AMCA), con fluorescencia azul.²³⁵

Además de su utilización como herramientas de diagnóstico clínico, otras aplicaciones habituales de los oligonucleótidos fluorescentes son su utilidad como cebadores en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para obtener un producto de ADN amplificado detectable y cuantificable; o su utilización en micro-arrays de ADN, donde el uso de fluoróforos con diferentes longitudes de onda posibilita la monitorización e identificación de ácidos nucleicos con una mayor sensibilidad de detección.

²³⁵ J. G. J. Bauman, J. Wiegant, P. Borst, P. van Duijn. *Exp. Cell. Res.* **1980**, 128, 485-490.

Objetivos

Debido a su potencial biológico en el tratamiento y diagnóstico de enfermedades, la preparación de oligonucleótidos conjugados es un área muy estudiada en la química de los ácidos nucleicos. En este capítulo se plantea el desarrollo de una metodología sencilla que permita la introducción de ligandos en cualquier posición de la cadena, de tal manera que posibilite la inserción de distintos ligandos en un mismo oligómero y cuyo punto de partida tenga un origen común.

Como se ha puesto de manifiesto en los antecedentes, algunas estrategias de conjugación se basan en la incorporación de grupos reactivos en los oligonucleótidos durante su síntesis, y una posterior incorporación del ligando. Con esta base, se plantea, partiendo de un precursor comercial común, la preparación de derivados de desoxirribosa enantioméricamente puros que presenten posiciones reactivas en su constitución (derivados de aminometil o mercaptometil) y que, en virtud de su estructura de dioles cíclicos, puedan ser incorporados durante la síntesis de los oligonucleótidos de forma sencilla y automática. Debido a su reactividad, tanto el grupo amino como el grupo tiol se han utilizado en las estrategias de conjugación. Sin embargo, para el caso del grupo amino, son necesarios distintos derivados dependiendo de si se introduce en el extremo 5', en el 3' o en una posición interna. Por ello, es interesante el desarrollo de un método versátil que facilite la introducción de las modificaciones en cualquier punto de la cadena sin alterar la estructura del esqueleto azúcar-fosfato.

Objetivos -----

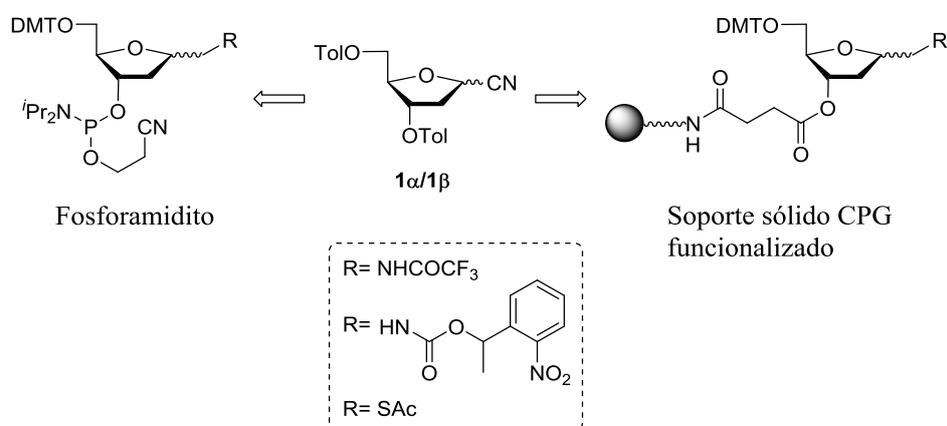
Asimismo, se estudiarán grupos protectores ortogonales que permitan la incorporación de distintos ligandos de interés en un mismo oligómero y otorguen a los oligonucleótidos varias funcionalidades, mejorando su potencial farmacológico y solventando las principales limitaciones que la terapia génica presenta.

De manera que, teniendo en cuenta la utilidad clínica de los oligonucleótidos conjugados, este estudio se plantea con un objetivo múltiple: la síntesis de derivados de 2'-desoxirribosa con grupos reactivos en su estructura, la introducción de estos monómeros en las cadenas durante su síntesis, el estudio de distintos grupos protectores ortogonales para el grupo amino y la funcionalización de los oligonucleótidos con lípidos y fluoróforos.

Resultados y discusión

1. Síntesis de los derivados 2-desoxi-D-ribofuranosa 1-funcionalizados

El primer paso para cumplir con los objetivos planteados es la preparación de tres azúcares, dos derivados de aminometil y uno de mercaptometil, en sus dos formas anoméricas α y β , y con la estructura química adecuada para poder ser incorporados en los oligonucleótidos por el método del fosforamidito en fase sólida. Para el derivado de aminometil se estudian dos grupos protectores, uno lábil en medio básico (trifluoroacetil) y otro fotolábil [1-(2-nitrofenil)etoxicarbonil, NPEC], y para el derivado de mercaptometil se estudia el grupo acetil, el cual se desprotege en condiciones básicas.



Esquema 70. Estructuras necesarias para la introducción de los monómeros en el oligonucleótido por el método del fosforamidito en fase sólida.

Resultados y discusión -----

La síntesis por el método del fosforamidito en fase sólida requiere de estructuras de fosforamidito para colocar los monómeros en el extremo 5' o en una posición interna y de la preparación de soportes sólidos funcionalizados para incorporarlos al extremo 3' (Esquema 70).

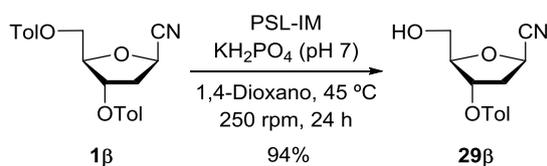
Para la síntesis de estos monómeros se recurre a los dos diastereoisómeros α y β del cianoazúcar **1**, ya que es un derivado comercial accesible a gran escala, presenta las dos isomerías requeridas para este estudio y ofrece una gran versatilidad que lo adecua para ser utilizado como único sustrato de partida en la obtención de los seis derivados objetivo.

1.1. Síntesis de los fosforamiditos 2-desoxi-D-ribofuranosa 1-funcionalizados

1.1.1. Fosforamiditos derivados de N-(trifluoroacetil)aminometil

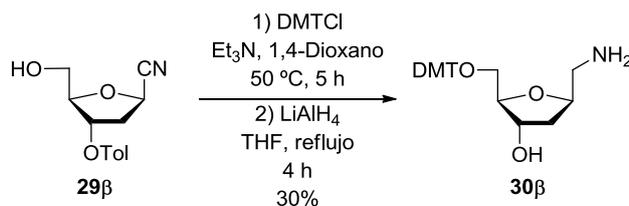
Aprovechando la estructura química del producto de partida y los estudios previos²³⁶ del grupo de investigación se realiza una hidrólisis enzimática regioselectiva para la desprotección del grupo toluilo primario en el correspondiente diéster. Para ello, el β -cianoazúcar **1 β** se trata con la lipasa de *Pseudomonas cepacia* inmovilizada sobre diatomeas, PSL-IM (2:1 p/p con respecto a **1 β**), en una disolución tampón fosfato 0.15 M (pH 7) y 18% de 1,4-dioxano a 45 °C durante 24 h, obteniéndose el producto hidrolizado **29 β** con un 94% de rendimiento (Esquema 71).

²³⁶ 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; d) A. Carnero, Y.S. Sanghvi, V. Gotor, S. Fernández, M. Ferrero. *Adv. Synth. Catal.* **2017**, *359*, 130-137.

**Esquema 71**

A continuación, se procede a la protección del alcohol primario con el grupo dimetoxitritilo (DMT). Con este fin, se consideran las condiciones estándar²³⁷ que utilizan DMTCI en piridina como disolvente a temperatura ambiente, pero no se observa evolución de la reacción por lo que el ataque nucleofílico no se produce. Se obtienen los mismos resultados aumentando la temperatura (50 °C) o añadiendo Et₃N al medio de reacción.

Por este motivo, se decide utilizar 1,4-dioxano como disolvente y hacer reaccionar el compuesto **29β** con DMTCI en presencia de Et₃N (Esquema 72). La mezcla se calienta a 50 °C y tras 5 h se observa la desaparición total del sustrato de partida. El crudo de la reacción es lo suficientemente puro para llevar a cabo la siguiente etapa, no siendo necesaria una purificación posterior mediante cromatografía en columna. El tratamiento del crudo con LiAlH₄ a reflujo de THF durante 4 h da lugar al aminoalcohol **30β** con un 30% de rendimiento. El resultado de las dos etapas consecutivas es la protección del hidroxilo primario con dimetoxitritilo, la desprotección del hidroxilo secundario y la reducción del grupo ciano a una amina primaria.

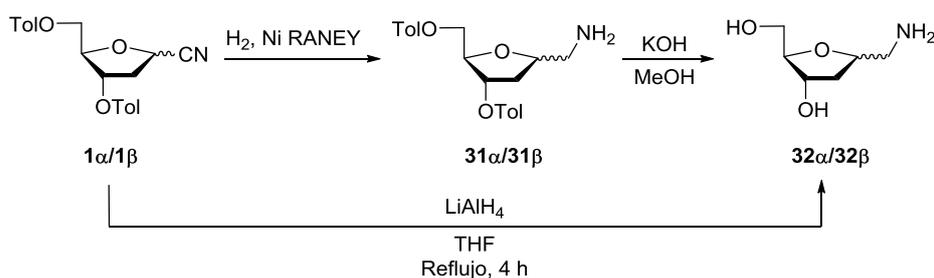
**Esquema 72**

²³⁷ P. T. Gilham, H. G. Khorana. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 6212-6222.

Resultados y discusión -----

Puesto que la segunda etapa de esta estrategia sintética presenta un rendimiento moderado-bajo, se decide buscar otra metodología que proporcione mejores resultados. Para ello, se tiene en cuenta la labilidad del grupo DMT en condiciones ligeramente ácidas y las precauciones a considerar a partir de su incorporación en la molécula, por lo que cuanto más tarde se proteja el hidroxilo primario más sencilla será la realización de las etapas posteriores.

En primer lugar, se propone transformar el grupo ciano, de los compuestos **1 α /1 β** , en amina a través de una hidrogenación con Ni RANEY[®], seguida de una desprotección de los toluilos en las condiciones básicas utilizadas en el Capítulo 1 (KOH, MeOH y temperatura ambiente) para el mismo fin (Esquema 73). Sin embargo, se observa que en la hidrogenación, independientemente del tiempo de reacción, se obtiene como subproducto el derivado **32** resultante de la desprotección de ambos grupos hidroxilo. Por esta razón, se lleva a cabo la reacción de **1 α /1 β** con LiAlH₄ a reflujo de THF,²³⁸ aislando en una única etapa sintética los aminodiolos **32 α /32 β** .

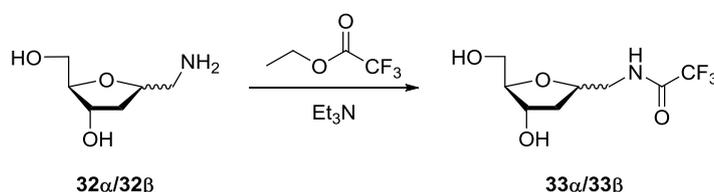


Esquema 73

Posteriormente, se realiza la protección del grupo amino mediante el tratamiento con trifluoroacetato de etilo en presencia de Et₃N (Esquema

²³⁸ A. Carnero, Y. S. Sanghvi, V. Gotor, S. Fernández, M. Ferrero. *Adv. Synth. Catal.* **2017**, 359, 130-137.

74). Teniendo en cuenta la bibliografía consultada,²³⁹ se lleva a cabo una optimización de las condiciones de reacción con el compuesto **32β** variando el disolvente, la concentración, la temperatura y el tiempo de reacción, y atendiendo a la desaparición del producto de partida mediante TLC (Tabla 8).



Esquema 74

Tabla 8. Trifluoroacetilación de **32β**.^a

Disolvente	Concentración (M)	Temperatura (°C)	Tiempo (h)
MeOH	0.1	t.a.	30
	0.05	40	72
	0.05	60 (Reflujo)	24
DMF	0.1	40	24
	0.1	40	72
	0.1	80	24

^a3.3 equivalentes de trifluoroacetato de etilo y 5.5 equivalentes de Et₃N.

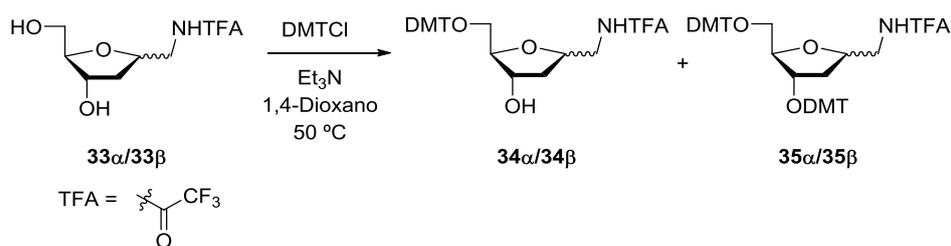
El aminodiol **32β** es parcialmente soluble en MeOH y la variación de concentración, de temperatura o tiempos más largos no conducen a una conversión completa. Cuando se utiliza DMF como disolvente la solubilidad de **32β** es total y, además, su elevado punto de ebullición permite una mayor temperatura, obteniéndose una conversión total con una concentración 0.1 M, 80 °C y 24 h de reacción.

²³⁹ a) J. C. Bressi, C. L. M. J. Verlinde, A. M. Aronov, M. L. Shaw, S. S. Shin, L. N. Nguyen, S. Suresh, F. S. Buckner, W. C. Van Voorhis, I. D. Kuntz et al. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 2080-2093; b) Z. S. Li, Z. C. Liang, R. P. Qiao, L. H. Zhang, Q. Du, Z. J. Yang, L. R. Zhang, P. Z. Zhang. *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 1017-1024; c) V. P. K. Kondapi, S. N. Hosseini, O. M. Soueidan, N. Jabari, F. G. West. *Eur. J. Org. Chem.* **2016**, 1367-1379.

Resultados y discusión -----

Con el fin de evitar la tediosa purificación mediante cromatografía de columna del compuesto **32 α /32 β** (10% NH₃/MeOH), debida a su alta polaridad en el gel de sílice, se realizan las etapas de reducción y protección de manera consecutiva sin la previa purificación del aminodiol, obteniéndose los derivados **33 α /33 β** con rendimientos de 70% y 80%, respectivamente.

En la siguiente etapa, se protege el alcohol primario con DMTCl empleando las condiciones utilizadas para preparar **30**. Es decir, con 1,4-dioxano como disolvente, en presencia de Et₃N y a 50 °C (Esquema 75). Sin embargo, se obtienen resultados no reproducibles, donde se observan mezclas de compuestos mono (**34**) y diprotegidos (**35**). Por ello, se optimiza esta etapa de reacción disminuyendo la temperatura y los equivalentes de DMTCl, obteniéndose los mejores resultados a 30 °C y con 1.5 equivalentes de DMTCl (Tabla 9). En estas condiciones, se aíslan los compuestos **34 α /34 β** con rendimientos de 65% y 70%, respectivamente.



Esquema 75

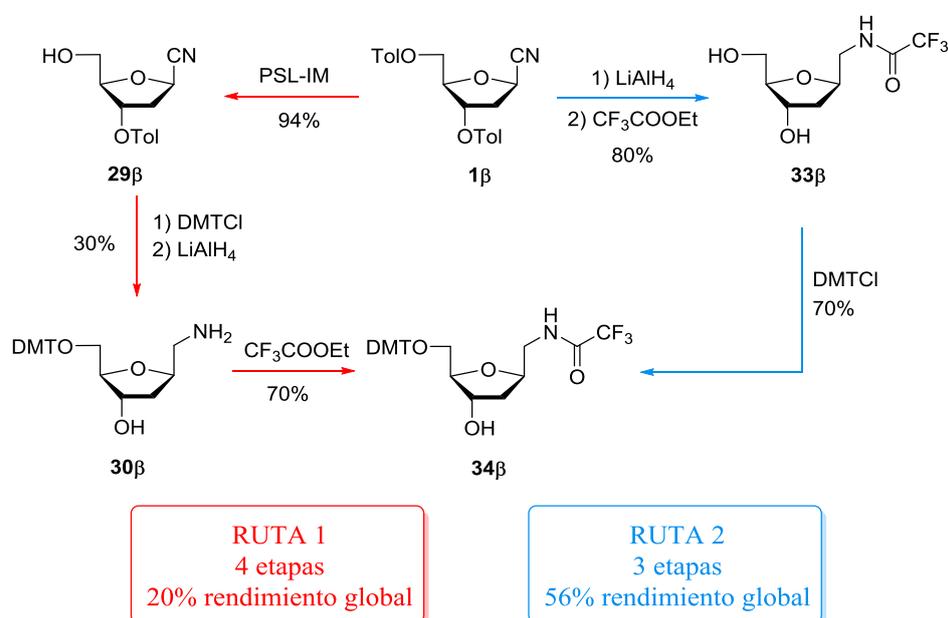
Tabla 9. Dimetoxitritilación de **33**.

T (°C)	DMTCl (equiv)	Compuestos ^a		
		33	34	35
50	2.5	-	x	x
	1.5	x	x	x
30	1.5	-	x	-
20	1.5	x	x	-

^aSeguimiento de la reacción mediante TLC. x Producto observado.

- Producto no observado.

Comparando las dos estrategias sintéticas (Esquema 76), en ambas se obtiene el compuesto **34β**, aunque la segunda presenta mejor rendimiento global (56% frente a 20%) y una etapa menos de reacción, por lo que es el método elegido para preparar los fosforamiditos **36α/36β**.

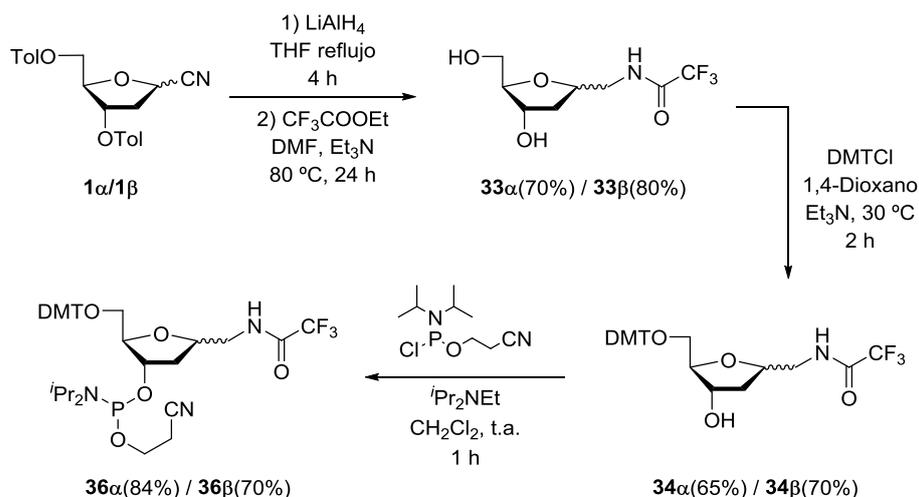


Esquema 76. Comparación de las dos rutas para la síntesis del derivado **34β**.

Para la formación del 3'-*O*-fosforamidito a partir de **34α/34β** se utiliza como agente fosforilante 2-cianoetil-*N,N*-diisopropilaminoclorofosforamidito, el cual reacciona directamente con el hidroxilo sin necesidad de ningún activante. Se requiere la presencia de una base no nucleofílica, como diisopropiletilamina, para neutralizar el HCl que se desprende en la reacción y evitar reacciones secundarias como la pérdida del grupo DMT. La reacción se lleva a cabo en CH₂Cl₂ como disolvente, y los correspondientes fosforamiditos **36α/36β** se obtienen con rendimientos de 84% y 70%, respectivamente. Para ambos anómeros ha sido posible el aislamiento y la caracterización de los dos

Resultados y discusión -----

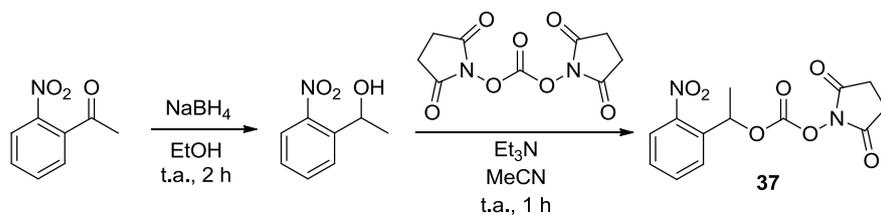
diastereoisómeros resultantes de la introducción de fósforo en la molécula (**36 α -A**, **36 α -B**, **36 β -A**, **36 β -B**).



Esquema 77. Síntesis de los derivados fosforamidito de aminometilo protegidos con trifluoroacetilo.

1.1.2. Fosforamiditos con grupo protector fotolábil para el grupo amino

Se selecciona el grupo fotolábil 1-(2-nitrofenil)etoxicarbonil (NPEC) para proteger el grupo amino. Para ello, se trata el aminodiol **32 α /32 β** con carbonato de 1-(2-nitrofenil)etil-*N*-succinimidilo (**37**), el cual ha sido sintetizado a partir de 2-nitroacetofenona según las condiciones descritas por Kawada *et al.* (Esquema 78).²⁴⁰

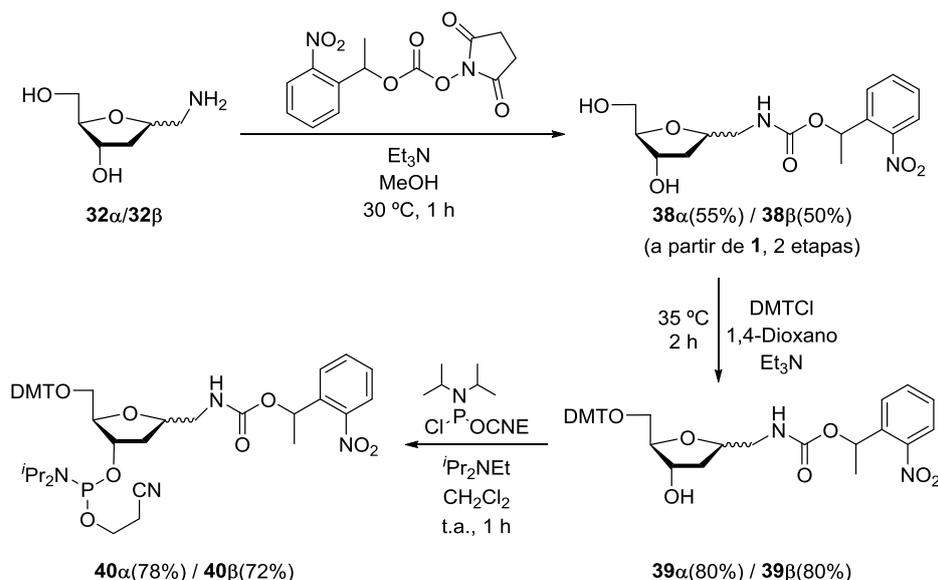


Esquema 78

²⁴⁰ Y. Kawada, T. Kodama, K. Miyashita, T. Imanichi, S. Obika. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 5102-5108.

La reacción se realiza en presencia de Et₃N y en MeOH como disolvente, obteniéndose los carbamatos **38α/38β** con 55% y 50% de rendimiento, respectivamente (Esquema 79). Ambos rendimientos se calculan a partir del sustrato de partida **1α/1β**, ya que **32α/32β** no se purifican mediante cromatografía de columna.

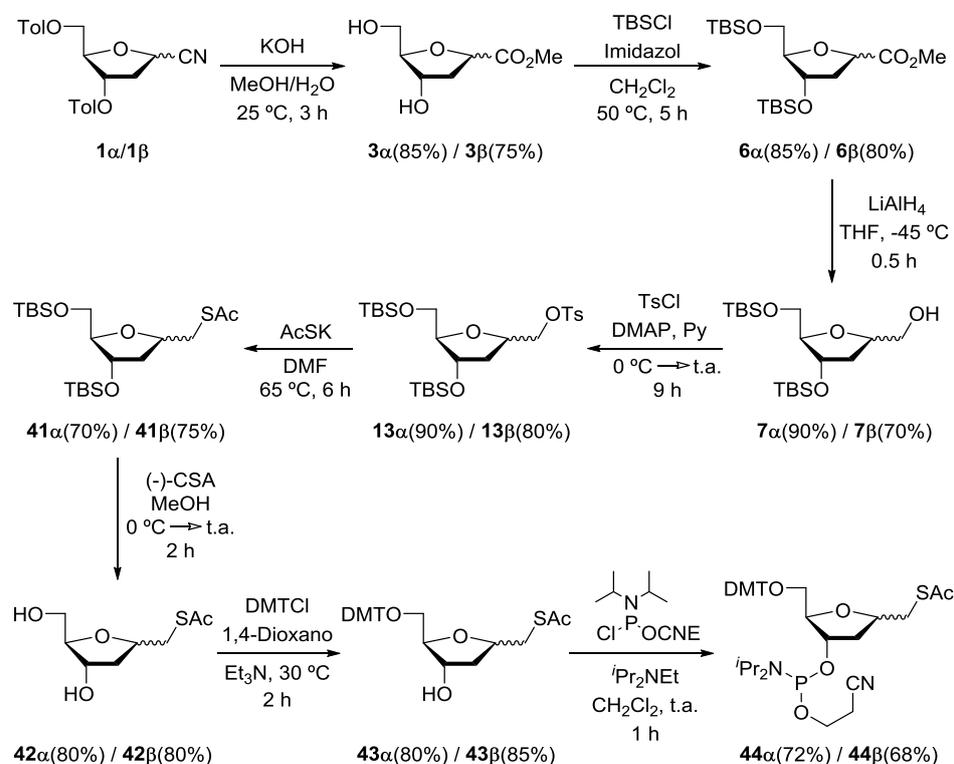
A continuación, se realiza la protección del hidroxilo primario con el grupo dimetoxitritilo en las mismas condiciones que en la síntesis del compuesto **34** (1.5 equivalentes de DMTCl, Et₃N y 1,4-dioxano) pero aumentando la temperatura a 35 °C, ya que se comprueba que a 30 °C la reacción no alcanza conversión completa. Los correspondientes derivados con el 5'-OH protegido **39α/39β** se obtienen ambos con 80% de rendimiento. El posterior tratamiento con 2-cianoetil-*N,N*-diisopropilaminoclorofosforamidito proporciona los fosforamiditos **40α/40β** con 78% y 72% de rendimiento, respectivamente. Se han podido aislar y caracterizar distintos diastereoisómeros (**40α-A**, **40α-B**, **40β-A**, **40β-B**).



Esquema 79. Síntesis de los derivados fosforamidito de aminometilo protegido con un grupo fotolábil.

1.1.3. Fosforamiditos derivados de acetiltiometil

Para la síntesis de los fosforamiditos con el grupo mercaptometilo en posición 1, se sigue una ruta sintética en la que se utilizan algunas etapas desarrolladas previamente en la obtención de α -homonucleósidos (Esquema 80).



Esquema 80. Síntesis de los derivados fosforamidito de mercaptometilo.

Así, los cianoderivados **1 α /1 β** se tratan con KOH en una mezcla MeOH/H₂O, produciéndose la hidrólisis del nitrilo y la esterificación *in situ* del ácido, además de la eliminación de los grupos protectores toluilo, dando lugar a los ésteres **3 α /3 β** con rendimientos del 85% y 75%, respectivamente. Posteriormente, los grupos hidroxilo son protegidos como éteres de *tert*-butildimetilsililo (TBS), aislándose los derivados **6 α /6 β** (85% y 80% de rendimiento, respectivamente). La reducción de

los éteres **6** con LiAlH_4 en THF a $-45\text{ }^\circ\text{C}$ proporciona los alcoholes **7 α** (90% de rendimiento) y **7 β** (70% de rendimiento), que se transforman en los tosilatos **13 α /13 β** por tratamiento con cloruro de *p*-toluensulfonilo y DMAP catalítico en piridina, con rendimientos de 90% y 80%, respectivamente.

El desplazamiento del grupo tosilato con tioacetato de potasio se lleva a cabo según las condiciones de Nakano *et al.*,²⁴¹ originándose los tioésteres **41 α** (70% de rendimiento) y **41 β** (75% de rendimiento).

La desprotección de los éteres de silicio se realiza, en primer lugar, con TBAF; no obstante, este tratamiento proporciona mezclas de compuestos que no se consiguen separar ni identificar. Como alternativa se propone la utilización de un ácido fuerte, donde los éteres de silicio son lábiles. Para ello, se considera HCl concentrado, pero la utilización de este ácido acuoso ocasiona tanto la desprotección de los hidroxilos como la hidrólisis del tioéster, proporcionando mezclas de compuestos. Para solucionar el problema de hidrólisis se hace uso del ácido canforsulfónico [(-)CSA], un ácido relativamente fuerte y soluble en disolventes orgánicos que puede ser añadido directamente al medio de reacción sin la necesidad de su disolución previa en agua. De esta manera, la reacción de **41 α /41 β** con (-)-CSA en MeOH conduce a los dioles **42 α /42 β** con un 80% de rendimiento para ambos anómeros.

Por último, la preparación de los fosforamiditos correspondientes se realiza siguiendo la misma secuencia de reacciones que en los aminoderivados. Una primera protección del hidroxilo primario con DMTCl a $30\text{ }^\circ\text{C}$ que proporciona los compuestos **43 α** (80%) y **43 β** (85%), seguida de la fosfitilación del hidroxilo secundario para obtener los fosforamiditos **44 α /44 β** con rendimientos de 72% y 68%,

²⁴¹ H. Nakano, J. Yokoyama, R. Fujita, H. Hongo. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 7761-7764.

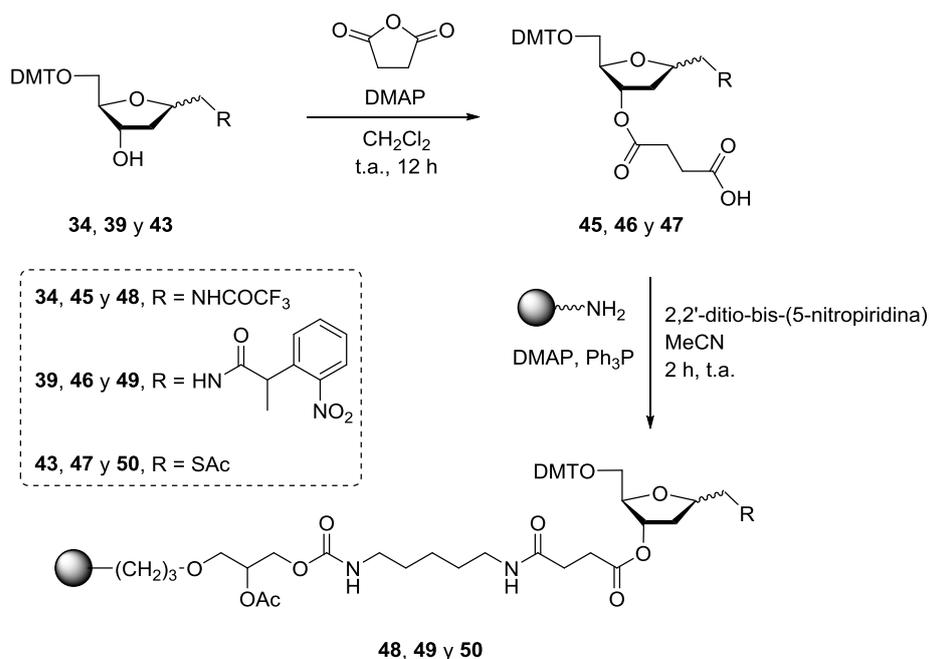
respectivamente. Para el anómero β ha sido posible el aislamiento y la caracterización de los dos diastereoisómeros resultantes de la introducción de fósforo en la molécula (**44 β -A**, **44 β -B**).

1.2. Síntesis de los soportes sólidos con derivados 2-desoxi-D-ribofuranosa 1-funcionalizados

Como se ha indicado anteriormente, para comenzar una secuencia sintética con el primer monómero modificado se debe anclar este a una resina, la cual consiste en pequeñas esferas de vidrio de poro controlado (*Controlled-Pored Glass*, CPG) funcionalizadas con un espaciador aminoalquílico (*Long Chain AlkylAmine*, LCAA), cuyo objetivo es alejar las posiciones reactivas de la superficie del soporte.

Este proceso transcurre en dos etapas (Esquema 81) y parte de los derivados cuyo hidroxilo primario está protegido con el grupo DMT (**34 α /34 β** , **39 α /39 β** y **43 α /43 β**). En primer lugar, se hace reaccionar el hidroxilo 3' de cada uno de los derivados con anhídrido succínico en presencia de DMAP y en CH_2Cl_2 como disolvente para formar los hemisuccinatos correspondientes **45 α /45 β** , **46 α /46 β** y **47 α /47 β** .

La segunda etapa consiste en la incorporación de los hemisuccinatos **45**, **46** y **47** al soporte sólido (LCAA-CPG) por reacción con los grupos amino. Así, sobre una disolución de **45**, **46** o **47** y DMAP en MeCN, se añade otra disolución de 2,2'-ditio-bis-(5-nitropiridina) en MeCN/ CH_2Cl_2 (1:3, v:v) y, a continuación, se adiciona Ph_3P . Esta mezcla se añade sobre el polímero LCAA-CPG, previamente acondicionado sobre un disco de polipropileno.



Esquema 81. Síntesis de los soportes sólidos con derivados 2-desoxi-D-ribofuranosa 1-funcionalizados.

2. Síntesis, purificación y caracterización de los oligonucleótidos con monómeros 1-funcionalizados

Tanto los fosforamiditos como los soportes sólidos funcionalizados han sido utilizados para la preparación de oligonucleótidos que contienen los monómeros modificados tanto en el extremo 3' como en el 5'. Esto demuestra la versatilidad de los seis derivados para ser incorporados en cualquier posición de la cadena. Todas las secuencias se muestran en la Tabla 10 y se han sintetizado en un sintetizador automático según los protocolos estándar²⁴² detallados en la parte experimental de este

²⁴² M. H. Caruthers, A. D. Barone, S. L. Beaucage, D. R. Dodds, E. F. Fisher, L. J. McBride, M. Matteucci, Z. Stabinsky, J. Y. Tang. *Methods Enzymol.* **1987**, 154, 287-313.

Resultados y discusión -----

capítulo, basándose dicha síntesis en fase sólida en el ciclo de cinco etapas indicado en los antecedentes (Esquema 63).

Tabla 10. Secuencias de oligonucleótidos y su caracterización por MALDI-TOF.^a

Código	Secuencias (5' → 3')	MM (calc)	MM (encont)
RS34α	CATTGTCCA-34α	2880.5	2880.3
RS39α	CATTGTCCA-39α	2880.5/3072.5 ^b	2880.5/3073.5 ^b
RS39β	CATTGTCCA-39β	2880.5/3072.5 ^b	2880.5/3073.5 ^b
RS43α	CATTGTCCA-43α	2897.5/5792.1 ^c	2897.2
Gapmer34α	cguuTCCTTTGTTcugga-34α	5865	5853.8
Gapmer34β	cguuTCCTTTGTTcugga-34β	5865	5854.5
Gapmer39α	cguuTCCTTTGTTcugga-39α	5866/6061 ^b	5864.6
Gapmer39β	cguuTCCTTTGTTcugga-39β	5866/6061 ^b	5855/6057
Gapmer43α	cguuTCCTTTGTTcugga-43α	5884	5880.8
Gapmer43β	cguuTCCTTTGTTcugga-43β	5883	5880.5
34αGapmer	34α-cguuTCCTTTGTTcugga	5865	5864.5
34βGapmer	34β-cguuTCCTTTGTTcugga	5865	5866.8
39αGapmer	39α-cguuTCCTTTGTTcugga	5866	5865/6042
39βGapmer	39β-cguuTCCTTTGTTcugga	5866	5849/6057
43αGapmer	43α-cguuTCCTTTGTTcugga	5883	5878
43βGapmer	43β-cguuTCCTTTGTTcugga	5883	5880.8
39βGapmer34α	39βcguuTCCTTTGTTcugga34α	6075/6268	6074.0/6267.6

^aSecuencias de los oligonucleótidos sintetizados con los derivados de 2-desoxi-D-ribofuranosa. T, A, G y C son 2'-desoxinucleótidos; a, c, g y u son 2'-OMe-nucleótidos.

^bMasa molecular esperada con un grupo protector fotolábil. ^cMasa molecular esperada de un dímero con un puente disulfuro.

Se han preparado dos tipos de secuencias: en primer lugar, las secuencias modelo RS, que consisten en cadenas cortas formadas por las cuatro bases naturales con los derivados sintéticos en el extremo 3', sintetizadas para estudiar su estabilidad durante todo el ciclo sintético y para optimizar las condiciones de desprotección. Y, por otro lado, las

secuencias tipo “gapmer”, que consisten en cadenas complementarias del gen de la luciferasa *Renilla* modificadas en sus extremos con 2’-*O*-metil-ARN con el objetivo de aumentar su estabilidad frente a las nucleasas y poder realizar experimentos antisentido de inhibición génica. En estas cadenas los monómeros sintéticos se han introducido tanto en el extremo 3’ como en el 5’.

Además, se ha llevado a cabo la síntesis de otros oligonucleótidos, también de la secuencia complementaria del gen de la luciferasa *Renilla*, que combinan dos o tres monómeros sintéticos, tanto de configuración α como β , y que han sido preparados de forma eficiente, demostrando la posibilidad de incorporar varios monómeros en una misma secuencia con excelentes rendimientos (Tabla 11).

Tabla 11. Secuencias de oligonucleótidos con dos o tres monómeros modificados.^a

Código	Secuencias (5’ → 3’)
39βGapmer34β	39β-cguuTCCTTTGTTcugga-34β
39βGapmer43β	39β-cguuTCCTTTGTTcugga-43β
34αGapmer39α	34α-cguuTCCTTTGTTcugga-39α
43α39αGapmer34α	43α39α-cguuTCCTTTGTTcugga-34α
43β39βGapmer34β	43β39β-cguuTCCTTTGTTcugga-34β
34α39βGapmer43β	34α39β-cguuTCCTTTGTTcugga-43β
43α34αGapmer39α	43α34α-cguuTCCTTTGTTcugga-39α

^aSecuencias de los oligonucleótidos sintetizados con los derivados de 2-desoxi-D-ribofuranosa. T, G y C son 2’-desoxinucleótidos; a, c, g y u son 2’-OMe-nucleótidos.

3. Eliminación de los grupos protectores de los oligonucleótidos

Una vez que se han sintetizado las secuencias deseadas, los oligonucleótidos se encuentran anclados al soporte sólido y presentan los

Resultados y discusión -----

grupos protectores de las bases nitrogenadas, del fósforo y del monómero sintético correspondiente según la funcionalidad introducida en la cadena. Para obtener los oligonucleótidos libres es necesaria una etapa de desprotección cuyas condiciones se han optimizado con los oligonucleótidos modelo RS.

Así, los dos oligonucleótidos que contienen el derivado de 1-aminometil-1,2-didesoxi-D-ribofuranosa **34 α** (grupo protector trifluoroacetato) o **39 β** (grupo protector fotolábil) se tratan con una disolución de amoníaco a 55 °C durante 12 h. Los crudos resultantes han sido analizados por HPLC y caracterizados por MALDI-TOF (Figura 39). Como cabe esperar, **RS34 α** presenta un único pico cuya masa corresponde al producto deseado desprotegido. En el caso del oligonucleótido **RS39 β** el cromatograma muestra dos picos que son analizados por espectrometría de masas. El compuesto con mayor tiempo de retención corresponde al producto protegido con el grupo fotolábil, y el producto con el menor tiempo de retención es el oligómero **RS34 α** desprotegido. Este resultado evidencia la sensibilidad del grupo fotolábil a la luz y permite establecer las precauciones necesarias a considerar, como trabajar en ausencia de luz durante la etapa de desanclaje con el fin de evitar su desprotección.

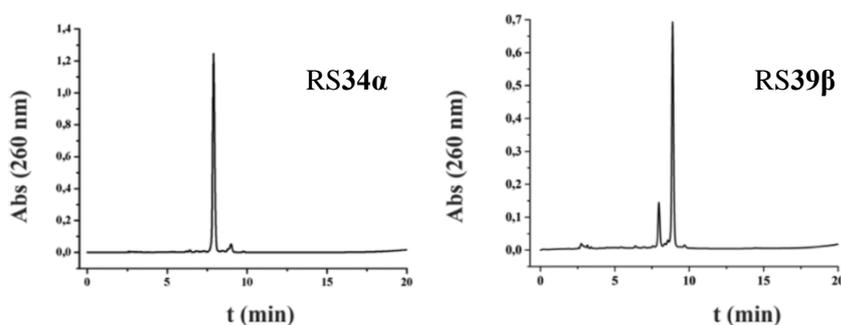
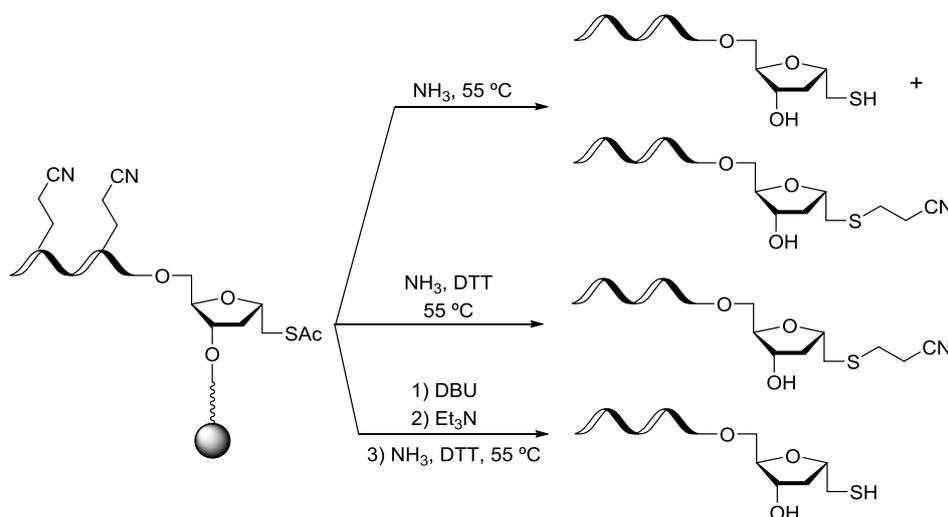


Figura 39. Cromatogramas de HPLC de las secuencias modelo RS modificadas en 3' con los derivados **34 α** y **39 β** . Columna utilizada: ACE 3 μ m HILA-3-1546-A.

En el caso del derivado 1-acetiltiometil RS43 α se han valorado simultáneamente dos métodos de desprotección (Esquema 82). Por un lado, el tratamiento habitual con una disolución de amoníaco a 55 °C durante 12 h, cuyo resultado es la obtención de una mezcla de dos oligonucleótidos: el compuesto deseado desprotegido y otro donde el grupo tiol ha reaccionado con el grupo cianoetilo una vez se ha desprotegido el fosfato internucleotídico. Por otro lado, se ha probado el tratamiento a 55 °C con NH₃ y ditioneitol (DTT), un agente reductor que evita la formación de enlaces disulfuro, pero solo se obtiene el oligonucleótido resultante de la reacción secundaria con el cianoetilo.



Esquema 82. Condiciones de desprotección para el oligonucleótido modelo RS43 α .

A la vista de estos resultados, se diseña un método de desprotección en tres etapas que evite la formación de subproductos. En primer lugar, el oligonucleótido se trata con una disolución al 1% de DBU en MeCN, esta base es capaz de romper la unión con el cianoetilo en el grupo fosfato sin afectar al resto de grupos protectores. Posteriormente, se realizan varios lavados con MeCN, cuyo objetivo es eliminar el grupo cianoetilo para evitar que reaccione con el grupo tiol libre en la siguiente etapa y se

Resultados y discusión -----

origene el derivado cianoetiltoeter como subproducto. Seguidamente, se añade una disolución al 1% de Et₃N en MeCN para intercambiar el catión. Finalmente, se trata con una disolución de amoniaco que contiene DTT (0.1 M) a 55 °C durante 12 h. El cromatograma de HPLC tras este último tratamiento (Figura 40) presenta un único pico cuya masa corresponde al producto deseado.

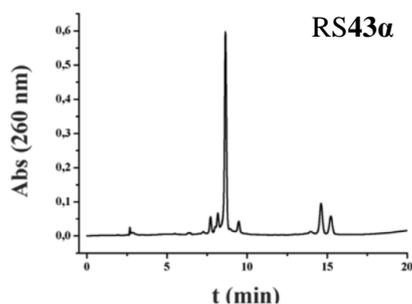


Figura 40. Cromatograma de HPLC de la secuencia modelo **RS43 α** modificada en el extremo 3'. Columna utilizada: ACE 3 μ m HILA-3-1546-A.

Las condiciones óptimas de desprotección encontradas para cada derivado se han utilizado para la desprotección de todas las demás secuencias de los gapmer. La masa de los compuestos resultantes se muestra en la Tabla 10. Todas las secuencias de gapmer se han obtenido con buenos rendimientos que oscilan entre el 42% y el 96%. Los cromatogramas de HPLC de las secuencias gapmer con modificación aminometil en el extremo 3' o 5' se muestran en la Figura 41. Las dos formas isoméricas (α y β) se pueden distinguir perfectamente en los perfiles de HPLC por sus diferentes tiempos de retención. Estos resultados confirman la pureza enantiomérica de estos dos nuevos enlazadores de amina α y β .

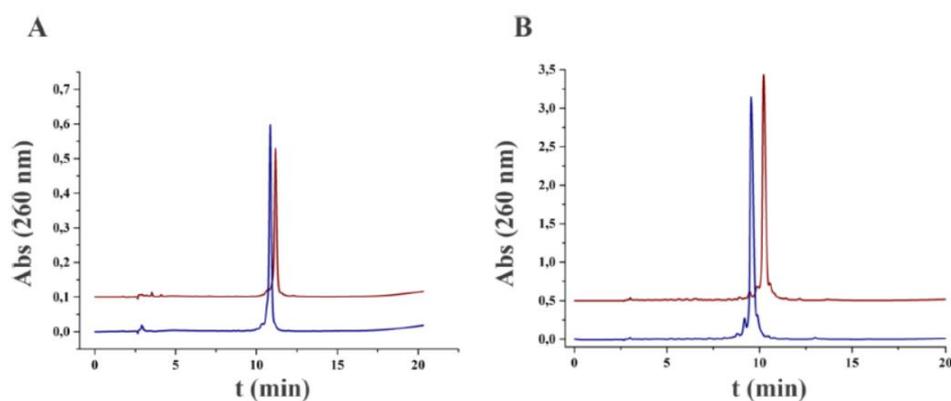


Figura 41. Perfiles de HPLC de los oligonucleótidos gapmer modificados con el grupo amino. (A) Gapmer modificado en 5' y (B) gapmer modificado en 3'. Color azul correspondiente a la forma isomérica α y color rojo a la β . Columna utilizada: ACE 3 μ m HILA-3-1546-A.

3.1. Eliminación del grupo protector fotolábil

Se ha estudiado la eficiencia de la eliminación del grupo fotolábil NPEC de los gapmer que contienen los derivados **39 α** y **39 β** en el extremo 3'. Este estudio se ha realizado tanto con el oligonucleótido separado de la resina como anclado a ella con el objetivo de comparar ambos sistemas. Para ello, las secuencias gapmer modificadas se han sometido a irradiaciones a 340 nm durante diferentes periodos de tiempo.

La primera prueba ha consistido en una fotólisis del gapmer**39 α** anclado a la resina sin ningún tratamiento previo; sin embargo, no se observa la eliminación del grupo protector. Por ello, se decide suspender el oligómero en una disolución MeCN/H₂O (1:1) y realizar la fotólisis a distintos tiempos (30, 60 y 120 min), lográndose la desprotección total del grupo NPEC tras 120 min (Tabla 12). Se obtiene un resultado similar con el gapmer**39 β** .

Aunque el método anterior ha sido efectivo, se explora la fotólisis (15, 30, 45 y 60 min) sobre los oligonucleótidos previamente tratados con

Resultados y discusión -----

NH₃ a 55 °C, para liberarlos de la resina, y en disolución, consiguiéndose también la eliminación del grupo fotolábil. Como se muestra en la Tabla 12, la desprotección del grupo fotolábil sobre el oligonucleótido liberado de la resina precisa tiempos más cortos de exposición. No obstante, es más sencillo el aislamiento del oligómero unido a la resina, no observándose diferencias entre los derivados **39α** y **39β**. Estos resultados confirman que la presencia del soporte sólido no interfiere en la obtención del oligonucleótido con el grupo amino libre, permitiendo reacciones de acoplamiento adicionales en fase sólida.

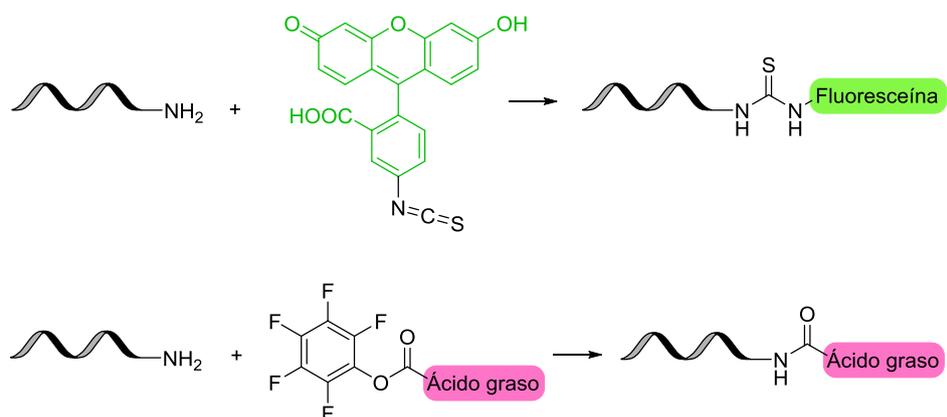
Tabla 12. Estudio cinético de la eliminación de NPEC de los gapmers de **39α** y **39β**

Fotólisis	Sobre soporte sólido CPG ^a			En disolución ^b			
t reacción (min)	30	60	120	15	30	45	60
Gapmer 39α (%)	78	91	100	60	89	100	100
Gapmer 39β (%)	71	92	100	80	93	99	100

^aReacción de desprotección realizada sobre 2 mg de oligonucleótido anclado a la resina en suspensión. ^bReacción de desprotección realizada sobre 2 mg de oligonucleótido liberado de la resina.

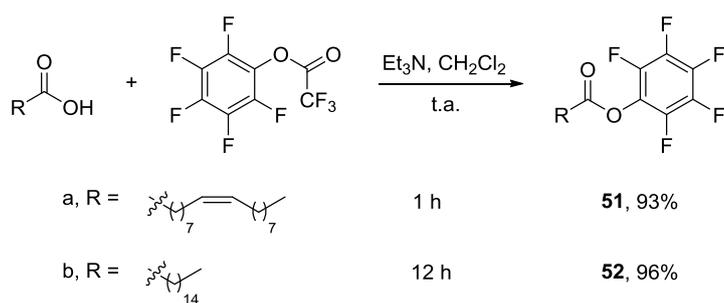
4. Preparación de oligonucleótidos conjugados

La conjugación de los oligonucleótidos con moléculas fluorescentes y de transporte es importante para el desarrollo de nuevas herramientas terapéuticas y de diagnóstico. Por ello, en esta sección se ha llevado a cabo la introducción de una molécula fluorescente y de dos ácidos grasos en los oligonucleótidos modificados con el grupo amino tanto en el extremo 3' como en el 5' (Esquema 83). Como molécula fluorescente se ha conjugado fluoresceína a través de la reacción con el correspondiente isotiocianato (FITC). Como moléculas de transporte se ha recurrido a dos ácidos grasos, palmítico y oleico, que han sido acoplados mediante la reacción con los correspondientes ésteres activados de pentafluorofenilo.



Esquema 83

Los ésteres de pentafluorofenilo de los ácidos oleico (**51**) y palmítico (**52**) se han preparado según las condiciones descritas por Prakash *et al.*^{230a} (Esquema 84), haciendo reaccionar el ácido graso correspondiente con trifluoroacetato de pentafluorofenilo en presencia de Et₃N y en CH₂Cl₂ como disolvente, lográndose excelentes rendimientos, 93% para **51** y 96% para **52**.



Esquema 84

Las primeras reacciones de conjugación se han llevado a cabo con las secuencias desancladas del soporte RS**34α** y gapmer**34α** que contienen el derivado modificado con el grupo amino en el extremo 3'. Por la accesibilidad comercial del derivado de fluoresceína se ha utilizado este reactivo como punto de partida. Así, el gapmer**34α**, en una disolución

Resultados y discusión -----

tampón de NaHCO₃, se hace reaccionar con FITC en DMF, obteniéndose un compuesto cuyo tiempo de retención en HPLC es mayor que el del oligonucleótido con el grupo amino libre y cuya masa corresponde con la del conjugado deseado (entrada 1, Tabla 13).

Tabla 13. Oligonucleótidos conjugados.

Entrada	Oligonucleótido-conjugado	Rendimiento (%)	MM (calc)	MM (encont)
1	Gapmer 34α -FICT	50	6256.1	6258
2	RS 34α -Oleico ^a	5	3146	3145.6
3	RS 34α -Oleico ^b	76	3146	3145.6
4	RS 34α -Palmítico ^b	64	3121	3123.6
5	RS 39α -Palmítico ^c	61	3121	3124.0
6	RS 39α -Palmítico ^d	19	3121	3124.0
7	RS 39α -Palmítico ^e	8	3121	3124.0
8	Palmítico- 39α gapmer ^c	72	6108	6107.5
9	Palmítico- 39α gapmer ^d	66	6108	6107.5
10	Palmítico- 39α gapmer ^e	46	6108	6107.5
11	FITC- 39α gapmer 34α	6	6463	6465.2
12	FITC- 39α gapmer 34α -Oleico	20	6728	6742.7

^aNaHCO₃/MeCN (1:1, v:v). ^bNaHCO₃/DMF/MeCN (1:4:2, v:v:v). ^cFotólisis y conjugación en disolución. ^dFotólisis sobre soporte sólido y conjugación en disolución. ^eFotólisis y conjugación sobre soporte sólido.

Teniendo en cuenta que el rendimiento del conjugado gapmer**34α**-FITC es solo de un 50%, se decide estudiar la influencia de la solubilidad en la preparación de los oligonucleótidos funcionalizados con ácidos grasos. Para ello, se realiza la reacción de acoplamiento entre la secuencia modelo RS**34α** y el oleato de pentafluorofenilo mediante dos protocolos: en el primer caso,²⁴³ el oligonucleótido se disuelve en una mezcla NaHCO₃/MeCN (1:1, v:v), y en el segundo, a la mezcla anterior se le añade DMF como cosolvente [NaHCO₃/DMF/MeCN (1:4:2,

²⁴³ N. Tort, J. P. Salvador, A. Aviñó, R. Eritja, J. Comelles, E. Martínez, J. Samitier, M. P. Marco. *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23*, 2183-2191.

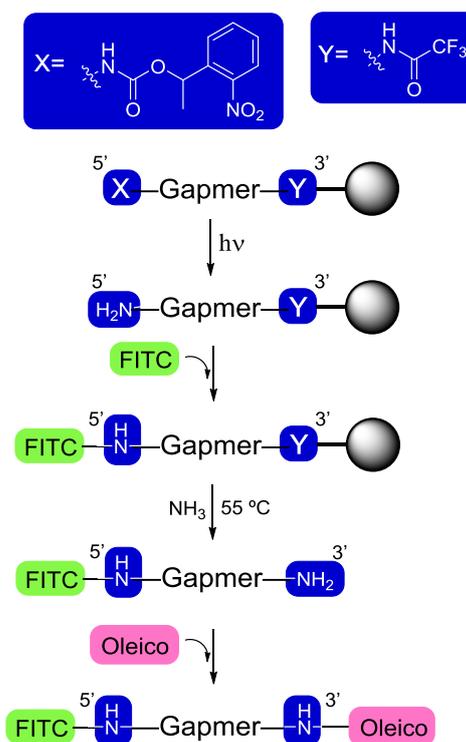
v:v:v)]. Según se observa en las entradas 2 y 3 de la Tabla 13, la adición de un cosolvente mejora considerablemente el rendimiento de la reacción de acoplamiento (5% frente a 76%), ya que aumenta la cantidad relativa de fase orgánica en la reacción. Con estas condiciones optimizadas, la secuencia **RS34 α** se ha hecho reaccionar con palmitato de pentafluorofenilo, dando lugar al compuesto deseado con un 64% de rendimiento (entrada 4, Tabla 13).

A continuación, se ha estudiado la conjugación de los oligonucleótidos **RS39 α** y **39 α gapmer**, modificados con el derivado amino protegido con el grupo fotolábil en el extremo 3' y 5', respectivamente, para valorar la influencia de su posición en la secuencia. Asimismo, se ha evaluado tanto la fotólisis como la conjugación con palmitato de pentafluorofenilo en disolución o sobre el soporte sólido, con el objetivo de comparar la eficiencia de la reacción entre las distintas estrategias. En primer lugar, se realiza tanto la desprotección del grupo amino como la consiguiente reacción de conjugación sobre **RS39 α** y **39 α gapmer** en disolución, obteniéndose 61% y 72% de rendimiento, respectivamente (entradas 5 y 8, Tabla 13). La siguiente alternativa explorada ha sido una primera fotólisis sobre el soporte sólido, seguida del desanclaje del oligonucleótido y la reacción de conjugación en disolución, de manera que se obtiene **RS39 α -Palmítico** con un 19% de rendimiento y **Palmítico-39 α gapmer** con un 66% de rendimiento (entradas 6 y 9, Tabla 13). Como última estrategia analizada, sobre los oligonucleótidos **RS39 α** y **39 α gapmer** anclados al soporte sólido se ha realizado, primero la fotólisis, después la reacción de acoplamiento con palmitato de pentafluorofenilo y, por último, la desconexión de la resina. Los rendimientos obtenidos han sido 8% para la secuencia modelo **RS39 α** y 46% para el **39 α gapmer** (entradas 7 y 10, Tabla 13). A la vista de estos resultados es evidente que la conjugación entre el ácido palmítico y las secuencias **39 α gapmer**, donde el monómero

Resultados y discusión -----

modificado se encuentra en el extremo 5', es más eficiente que con las secuencias cortas **RS39 α** , donde el monómero modificado se encuentra en el extremo 3' (entradas 5-7 frente 8-10, Tabla 13). El producto deseado **RS39 α -Palmítico** solo se obtiene con buen rendimiento (61%) cuando tanto la fotólisis como la conjugación tienen lugar en disolución. Una de las razones de estos bajos rendimientos podría ser el impedimento estérico derivado de la proximidad entre el monómero modificado en el extremo 3' y el soporte sólido. Otra de las conclusiones de estos resultados es la menor eficiencia de la conjugación sobre el soporte sólido en comparación con el acoplamiento en disolución. A pesar de ello, la fase sólida sigue siendo un método útil para las reacciones de conjugación debido a sus tiempos de reacción más cortos, a la eliminación sencilla del exceso de reactivos y a que permite reacciones de conjugación ortogonales con múltiples elementos.

Por último, se ha evaluado la posibilidad de preparar un oligonucleótido conjugado con dos ligandos diferentes, uno fluorescente y otro lipídico (Esquema 85). De forma que el **39 α gapmer34 α** unido al soporte sólido y modificado en cada extremo con el mismo derivado de nucleósido pero con distinto grupo protector, se somete a una primera irradiación para desproteger selectivamente el grupo amino del extremo 5'. Posteriormente, el oligonucleótido resultante se incuba con FITC sobre el soporte sólido, seguido del tratamiento con las condiciones de desprotección del grupo trifluoroacetilamino, que también liberan la cadena del soporte. El resultado es el gapmer funcionalizado con la molécula fluorescente en la posición 5' y el grupo amino libre en 3', **FITC-39 α gapmer34 α** , que se conjuga con el oleato de pentafluorofenilo en disolución. El producto final obtenido ha sido purificado por HPLC y caracterizado por espectrometría de masas.



Esquema 85. Síntesis del oligómero FITC-39αgapmer34α-Oleico funcionalizado con un fluoróforo y un lípido.

Estos resultados suponen un importante avance en la obtención de oligonucleótidos funcionalizados con aplicaciones diagnósticas y terapéuticas.

Conclusiones

En este capítulo se describe la síntesis y aplicabilidad de oligonucleótidos funcionalizados con lípidos y moléculas fluorescentes a partir de oligonucleótidos que contienen, en distintos puntos de su estructura, nuevos monómeros conectores reactivos (enlazadores). Estos puntos reactivos de la molécula consisten en derivados de azúcar con grupos aminometil y mercaptometil.

A partir de un mismo cianoazúcar comercial (también utilizado en el Capítulo 1) se han preparado tres azúcares reactivos en sus dos formas anoméricas (α y β). Estos intermedios se han anclado a los soportes sólidos apropiados y se han sintetizado los fosforamiditos correspondientes, en ambos casos con excelentes rendimientos, obteniéndose un amplio abanico de oligonucleótidos que contienen grupos amino y/o tiol en distintas posiciones de la cadena.

El azúcar derivado de mercaptometil se ha protegido con un grupo S-acetilo, mientras que para el derivado de aminometil se han estudiado dos grupos protectores ortogonales que pueden eliminarse de forma independiente con distintas condiciones, lo que permite la conjugación de dos ligandos diferentes en un mismo oligonucleótido.

Aunque la introducción de funcionalidades amino y tiol en los oligonucleótidos es una estrategia recurrente en la síntesis de conjugados, las ventajas que presentan los monómeros sintetizados en este capítulo frente a los reportados en la bibliografía son: su pureza enantiomérica,

Conclusiones -----

que evita posibles mezclas de diastereoisómeros; su preparación a partir de un precursor versátil y accesible; su total compatibilidad con las propiedades estructurales de los ácidos nucleicos; su estructura ribosídica, que los hace compatibles con la síntesis automática de oligonucleótidos y permite su incorporación en cualquier posición de la secuencia; o su pequeño tamaño, similar al de un nucleósido, que los podría hacer adecuados para la introducción de sondas fluorescentes.

La funcionalización con lípidos y moléculas fluorescentes de los oligonucleótidos que contienen los nuevos derivados descritos, demuestra la utilidad de estos enlazadores.

Los nuevos oligómeros sintetizados en este capítulo suponen un avance en el ensamblaje de oligonucleótidos para proporcionar conjugados funcionales que podrían contribuir a la superación de los principales obstáculos de la terapia génica como son la internalización celular, la absorción en el tejido o la resistencia a las nucleasas.

Parte Experimental

1. Condiciones de trabajo, disolventes y reactivos

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

- El MeOH se ha secado sobre hidruro cálcico.
- El 1,4-dioxano se ha secado sobre hilos de sodio con benzofenona como indicador.
- La Et₃N se ha secado con NaOH.
- La lipasa de *Pseudomonas cepacia* inmovilizada sobre diatomitas (PSL-IM, 943 U/g) ha sido adquirida a Amano Enzyme.
- Tanto los 2'-desoxi y 2'-O-metil-ribonucleosido fosforamiditos como los soportes y LCAA-CPG han sido adquiridos en Applied Biosystems y Link Technologies Ltd.
- Se ha utilizado agua ultrapura (Millipore) en todos los experimentos.

La desalación de los oligonucleótidos ha sido realizada por cromatografía de exclusión molecular utilizando columnas Sephadex G-25 (NAP-5 o NAP-10), adquiridas a GE Healthcare.

2. Técnicas instrumentales

Las técnicas utilizadas en la realización de este capítulo han sido detalladas en los capítulos anteriores. Las nuevas técnicas se detallan a continuación.

Parte Experimental -----

Los oligonucleótidos se han preparado en un sintetizador de ADN (Applied Biosystems 3400 DNA Synthesizer) usando soportes de poliestireno LV200[®].

El análisis y la purificación de los oligonucleótidos sintetizados se ha realizado mediante RP-HPLC (cromatógrafo Waters) a 254 nm. El seguimiento de las reacciones de conjugación también se ha realizado mediante RP-HPLC a 254 nm y a 480 nm. Se han utilizado distintas columnas con un relleno de gel de sílice y dos eluyentes: A [85.5% H₂O, 5% MeCN, 9.5% acetato de trietilamonio (TEAA)] y B (27% H₂O, 70% MeCN y 3% TEAA).

Se han empleado dos métodos en función de que el oligonucleótido posea el DMT o no, estos métodos se describen a continuación:

- Método DMT-OFF: Columna analítica ACE 3 μ m HILA-3-1546-A (4.6 x 150 mm); inyección automática; flujo 0.7 ml/min.
- Método DMT-ON: Columna semipreparativa (Xbridge OST C₁₈ 2.5 μ m (10 x 50 mm); inyección manual; flujo 2 ml/min.

Método DMT-OFF			Método DMT-ON		
t (min)	A	B	t (min)	A	B
0	100	0	0	100	0
20	50	50	20	30	70
22	0	100	22	0	100
24	0	100	25	0	100
26	100	0	27	100	0

La cuantificación de la concentración de oligonucleótido sintetizado ha sido realizada mediante un espectrofotómetro Jasco V650.

Los análisis de masas se han realizado en un espectrómetro MALDI Voyager DE RP time-of-flight (TOF) (Applied Biosystems) y las matrices para dichos experimentos se han preparado con 2',4',6'-trihidroxiacetofenona monohidrato y citrato de amonio dibásico.

3. Síntesis de fosforamiditos y otros derivados

En este capítulo se ha trabajado tanto con el anómero α como con el β , realizando las transformaciones de cada uno de ellos por separado. Los procedimientos que se presentan a continuación, si no se indica lo contrario, se han utilizado para los dos anómeros y se describen de forma general, incluyéndose las diferencias en cada caso, si las hubiera.

3.1. Síntesis de 3, 6, 7 y 13

La síntesis de **3 α** , **6 α** , **7 α** y **13 α** se ha descrito en el Capítulo 1. Un procedimiento análogo se ha seguido para la obtención de la serie β (**3 β** , **6 β** , **7 β** y **13 β**) y los rendimientos se indican en el Esquema 80.

3.2. Síntesis del cianoazúcar 29 β

Sobre una disolución de **1 β** (2 g, 5.3 mmol) en 1,4-dioxano (9 ml) se añade una disolución tampón 0.15 M KH_2PO_4 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 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 **29 β** como un sólido blanco con un 94% de rendimiento.

3.3. Síntesis de 30 β

A una disolución de **29 β** (50 mg, 0.19 mmol) en 1,4-dioxano anhidro (2.4 ml) se añade Et_3N anhidra (265 μl , 1.9 mmol) y DMTCl (160 mg, 0.48 mmol). La reacción se agita a 50 °C durante 5 h. A continuación, se añade una disolución acuosa saturada de NaHCO_3 y se extrae con CH_2Cl_2 . Se juntan las fases orgánicas, se secan con Na_2SO_4 y se evaporan a presión reducida. El residuo resultante se disuelve en THF

Parte Experimental -----

anhidro (1 ml), se añade LiAlH₄ (52 mg, 1.36 mmol) y se calienta a reflujo durante 4 h. Se destruye el exceso de LiAlH₄ por adición de THF y MeOH en frío, se filtra sobre Celite[®] y se evaporan los disolventes a presión reducida. El crudo resultante se purifica en columna cromatográfica utilizando como eluyente 20% MeOH/CH₂Cl₂, obteniéndose el compuesto **30β** con un 30% de rendimiento.

3.4. Síntesis de los aminodiolos **32α** y **32β**

Se añade LiAlH₄ (8 equiv) a una disolución de **1α** o **1β** en THF anhidro (0.15 M) y la reacción se agita a reflujo durante 4 h. El exceso de LiAlH₄ se destruye en frío por adición de THF y MeOH, y la mezcla se filtra sobre Celite[®]. Los disolventes se evaporan y el residuo se purifica en columna cromatográfica utilizando como eluyente un gradiente 0-10% NH₃/MeOH, obteniéndose los compuestos **32α** y **32β** (ambos contienen trazas de sílica gel).

3.5. Síntesis de los derivados trifluoroacetilados **33α** y **33β**

Sobre una disolución de **32α** o **32β** en DMF anhidra (0.1 M), se añaden Et₃N anhidra (5.5 equiv) y trifluoroacetato de etilo (3.3 equiv). La mezcla se calienta a 80 °C y se mantiene en agitación durante 24 h. A continuación, se evaporan los disolventes a presión reducida y el residuo se purifica por cromatografía en columna utilizando como eluyente un gradiente 5-20% 2-propanol/CH₂Cl₂, aislándose **33α** (70% de rendimiento) y **33β** (80% de rendimiento). Los datos de rendimiento aislado corresponden a las dos etapas.

3.6. Síntesis de **34α** y **34β**

Sobre una disolución 0.08 M de **33α** o **33β** en 1,4-dioxano anhidro, se añaden Et₃N anhidra (10 equiv) y cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (1.5

equiv). La mezcla se agita a 30 °C durante 2 h. A continuación, se añade una disolución acuosa saturada de NaHCO₃ y se extrae con CH₂Cl₂. La fase orgánica se seca con Na₂SO₄, se filtra y se eliminan los disolventes a presión reducida. El residuo se purifica por cromatografía en columna utilizando como eluyente 40% AcOEt/Hexano. La columna se empaqueta previamente con sílica gel neutralizada con una disolución de 10% Et₃N en AcOEt:Hexano (4:6, v:v). Los rendimientos aislados para **34α** y **34β** fueron 65% y 70%, respectivamente.

3.7. Síntesis de los derivados fosforamidito **36α** y **36β**

Los compuestos **34α** o **34β** se co-evaporan dos veces con MeCN anhidro bajo presión reducida y se secan durante una noche en un liofilizador. Después, sobre una disolución de estos compuestos en CH₂Cl₂ anhidro (0.06 M) se añade ^tPr₂NEt anhidra (3 equiv). La disolución resultante se enfría en un baño de hielo y se añade gota a gota 2-cianoetil-*N,N*-diisopropilaminoclorofosforamidito (1.5 equiv). Tras 15 min, la reacción se deja agitando a temperatura ambiente durante 1 h. A continuación, se añade una disolución acuosa de NaCl y se extrae con CH₂Cl₂. Las fases orgánicas se secan, se filtran y se evaporan hasta sequedad, y el crudo se purifica por columna cromatográfica (40% AcOEt/Hexano), obteniéndose **36α** (84% de rendimiento) y **36β** (70% de rendimiento). La columna se empaqueta previamente con sílica gel neutralizada con una disolución de 10% Et₃N en AcOEt:Hexano (4:6, v:v).

3.8. Síntesis de carbonato de 1-(2-nitrofenil)etil-*N*-succinimida (**37**)

Este compuesto se sintetiza según las condiciones descritas por Kawada *et al.*²⁴⁰ Sobre una disolución de 2-nitroacetofenona (1 g, 6.1 mmol) en etanol (30 ml) se añade NaBH₄ (340 mg, 9.1 mmol) a 0 °C y la

Parte Experimental -----

mezcla se mantiene en agitación a temperatura ambiente durante 2 h. A continuación, se añade agua y se extrae con AcOEt. Las fases orgánicas se combinan, se secan con Na₂SO₄ y se evaporan a presión reducida. El crudo resultante tiene suficiente grado de pureza para ser utilizado directamente en la siguiente etapa. Así, se disuelve en MeCN anhidro (30 ml) y se añade Et₃N anhidra (1.3 ml, 9.1 mmol) y carbonato de disuccinimida (1.7 g, 6.7 mmol). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 1 h. Posteriormente, se añade agua y se extrae con CH₂Cl₂, las fases orgánicas se combinan, se secan (Na₂SO₄) y se evaporan a presión reducida. El producto **37** se obtiene con un 85% de rendimiento.

3.9. Síntesis de los derivados **38α** y **38β**

Sobre una disolución de **32α** o **32β** en MeOH anhidro (0.1 M) se añade Et₃N anhidra (1.5 equiv) y carbonato de 1-(2-nitrofenil)etil-*N*-succinimida (**37**, 1 equiv). La reacción se mantiene en agitación a 30 °C durante 1 h. A continuación, se evapora el disolvente a presión reducida, se añade una disolución acuosa saturada de NaCl y se extrae con AcOEt. Las fases orgánicas se secan con Na₂SO₄, se filtran y se evaporan a presión reducida. El crudo se purifica por cromatografía en columna (5% MeOH/CH₂Cl₂), aislándose **38α** (55% de rendimiento desde **1α**) y **38β** (50% de rendimiento desde **1β**).

3.10. Síntesis de **39α** y **39β**

Se sigue el mismo procedimiento que para la síntesis de **34α/34β**, utilizando como sustrato de partida **38α/38β** y 35 °C como temperatura de reacción, obteniéndose **39α** o **39β** con un 80% de rendimiento en ambos casos.

3.11. Síntesis de los derivados de fosforamidito **40 α** y **40 β**

Se sigue el mismo procedimiento que para la síntesis de **36 α /36 β** , utilizando como sustrato de partida **39 α /39 β** , obteniéndose **40 α** (78% de rendimiento) y **40 β** (72% de rendimiento).

3.12. Síntesis de los derivados de tioacetilo **41 α** y **41 β**

Sobre una disolución de tioacetato de potasio (1.7 equiv) en DMF anhidra (0.5 M) se añade, gota a gota, una disolución 0.3 M de **13 α** o **13 β** en DMF anhidra. La reacción se mantiene en agitación a 65 °C durante 6 h. La mezcla se disuelve en agua y se extrae con Et₂O, las fases orgánicas se combinan, se secan con Na₂SO₄, se filtran y se evaporan a presión reducida. El residuo se purifica por cromatografía en columna (gradiente de eluyentes 5-15% AcOEt/Hexano), obteniéndose **41 α** (70% de rendimiento) y **41 β** (75% de rendimiento).

3.13. Desprotección de los éteres de silicio. Síntesis de los derivados **42 α** y **42 β**

Sobre una disolución 0.07 M de **41 α** o **41 β** en MeOH anhidro a 0 °C se añade lentamente (-)-CSA (2 equiv). La mezcla se agita durante 5 min a esta temperatura y después se deja a temperatura ambiente durante 2 h. A continuación, se añade NaHCO₃ sólido y se mantiene en agitación durante 5 min. Se evapora el disolvente a presión reducida y el residuo se purifica por columna cromatográfica (10% MeOH/CH₂Cl₂), aislándose **42 α** y **42 β** con un 80% de rendimiento para ambos anómeros.

3.14. Síntesis de **43 α** y **43 β**

Se sigue el mismo procedimiento que para la síntesis de **34 α /34 β** , utilizando como sustrato de partida **42 α /42 β** , obteniéndose **43 α** (80% de rendimiento) y **43 β** (85% de rendimiento).

3.15. Síntesis de los derivados de fosforamidito 44 α y 44 β

Se sigue el mismo procedimiento que para la síntesis de 36 α /36 β , utilizando como sustrato de partida 43 α /43 β , obteniéndose 44 α (72% de rendimiento) y 44 β (68% de rendimiento).

3.16. Preparación de los derivados de 3-*O*-succinato-2-desoxi-D-ribofuranosa (45 α , 45 β , 46 α , 46 β , 47 α y 47 β)

Los monómeros 5-*O*-DMT (34 α , 34 β , 39 α , 39 β , 43 α y 43 β) se co-evaporan dos veces con CH₂Cl₂ anhidro y se disuelven en CH₂Cl₂ anhidro (0.02 M). Después, se añade 1.5 equiv de anhídrido succínico y 1.5 equiv de DMAP. La reacción se mantiene en agitación a temperatura ambiente durante 12 h. Tras la adición de CH₂Cl₂, la mezcla se lava con una disolución 0.1 M de NaH₂PO₄ (pH 5). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄, se filtra y se evapora a presión reducida, obteniéndose los derivados 3-*O*-succinato-2-desoxi-D-ribofuranosa correspondientes (45 α , 45 β , 46 α , 46 β , 47 α y 47 β). Los succinatos obtenidos se utilizan en la siguiente etapa sin la necesidad de una purificación adicional.

3.17. Incorporación de los 3-*O*-succinatos a un soporte sólido LCAA-CPG. Síntesis de 48 α , 48 β , 49 α , 49 β , 50 α y 50 β

El derivado de succinato se incorpora a un soporte de vidrio de poro controlado con cadenas largas de alquilamino (*Long-chain alkylamine-controlled pore glass*, LCAA-CPG).

Se colocan 0.5 equiv de H₂N-LCAA-CPG (150 mg, 70 μ mol de amino por g) en un vial provisto de un disco de polipropileno, se lava dos veces con 5 ml de MeCN y se seca a vacío.

Por otra parte, sobre una disolución de los derivados 5-*O*-DMT-3-*O*-succinato (45 α , 45 β , 46 α , 46 β , 47 α y 47 β) obtenidos en la etapa anterior

y 1 equiv de DMAP en acetonitrilo anhidro (0.1 M), se añade 1 equiv de 2,2'-ditio-bis(5-nitropiridina) (DTNP) disuelto en una mezcla 0.3 M de MeCN:CH₂Cl₂ (1:3, v:v). A continuación, sobre esta disolución se añade 1 equiv de Ph₃P en MeCN anhidro (80 µl). Esta disolución final se añade sobre el vial que contiene el LCAA-CPG. Tras 2 h de reacción a temperatura ambiente, la resina se lava con CH₂Cl₂ y MeCN. Por último, la resina se trata con una mezcla 1:1 de Ac₂O/Py/THF y 1-metilimidazol/THF durante 5 min para bloquear los grupos amino libres. El soporte sólido se lava con CH₂Cl₂ y MeCN y se seca. El grado de funcionalización se determina mediante la cuantificación del DMT, obteniéndose valores de 20-25 µmol/g.

3.18. Síntesis de oleato de pentafluorofenilo (51)

Sobre una disolución 1 M de ácido oleico (283 mg, 1 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro, se añade Et₃N anhidra (2.25 ml, 16 mmol) y trifluoroacetato de pentafluorofenilo (0.67 ml, 4 mmol). La reacción se mantiene en agitación a temperatura ambiente durante 1 h. A continuación, la mezcla se diluye en CH₂Cl₂ (6 ml) y se lava con una disolución acuosa saturada de NaHCO₃ (5 ml) y, posteriormente, con una disolución 1 M de NaH₂PO₄ (5 ml). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄, se filtra, se eliminan los disolventes a presión reducida y el residuo se purifica por cromatografía en columna (50% CH₂Cl₂/Hexano). El producto **51** se obtiene con un 93% de rendimiento.

3.19. Síntesis de palmitato de pentafluorofenilo (52)

Se sigue el mismo procedimiento que el descrito para la síntesis del oleato de pentafluorofenilo, aunque en este caso, debido a la baja solubilidad, la reacción tiene lugar a una concentración 0.1 M de ácido palmítico (256 mg, 1 mmol) en CH₂Cl₂ y agitándose a temperatura ambiente durante 12 h. Las etapas de aislamiento y purificación del

producto son similares que en el compuesto **51**. El éster **52** deseado se obtiene con un 96% de rendimiento.

4. Síntesis, purificación y caracterización de oligonucleótidos

4.1. Síntesis de oligonucleótidos

Las secuencias de oligonucleótidos sintetizadas en este capítulo se resumen en las Tablas 10 y 11 del apartado de resultados y discusión. Se ha preparado un gran abanico de oligonucleótidos que se pueden dividir en dos grupos: las secuencias cortas (RS) modelo, sintetizadas para estudios de estabilidad, y las secuencias basadas en el gen de la luciferasa *Renilla* (gapmer).

Los oligonucleótidos se han preparado en un sintetizador de ADN, en distintas series, a escalas de 0.5 μmol o 1 μmol . De forma que se han seguido los protocolos estándar para el método del fosforamidito en fase sólida, partiendo de 35 mg de resina y una concentración 0.1 M de los fosforamiditos.

Los derivados de 2-desoxi-D-ribofuranosa 1-funcionalizados se han insertado específicamente en los extremos 3' y 5' de las secuencias deseadas. Los soportes en fase sólida de cada uno de estos derivados se han utilizado para introducir dichas modificaciones en el extremo 3' de las secuencias y los correspondientes fosforamidito derivados han sido empleados para introducir las modificaciones en la posición 5' de los oligonucleótidos. El método de trabajo ha sido DMT-ON, es decir, el grupo DMT del último residuo incorporado en la cadena no se ha eliminado en el último ciclo de síntesis.

4.2. Desprotección y purificación de oligonucleótidos

Tras la unión secuencial de los monómeros y en función del derivado introducido en la secuencia, los oligonucleótidos anclados a los soportes se han sometido a distintos tratamientos. El objetivo es el análisis y la purificación de cada oligonucleótido desprotegido y liberado del soporte sólido. Este proceso consta de una serie de etapas consecutivas que, de forma general, son (Figura 42): primero, la separación del soporte y la desprotección de los grupos protectores; segundo, la eliminación de las pequeñas moléculas resultantes de la desprotección mediante una columna de exclusión por tamaños; tercero, la purificación de las secuencias por HPLC, de forma que se separen las secuencias truncadas de las correctas; cuarto, eliminación del grupo 5'-O-DMT, con la consiguiente columna de exclusión por tamaños; y finalmente, el análisis por HPLC y masas.

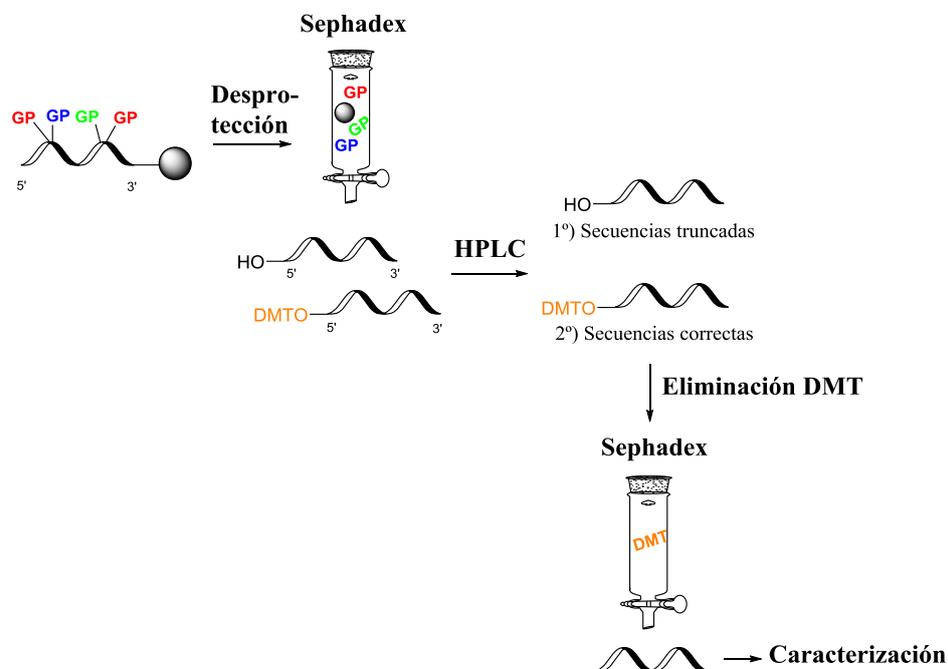


Figura 42. Procedimiento general para la desprotección y purificación de oligonucleótidos.

Parte Experimental -----

Los grupos protectores 5'-*O*-DMT de las secuencias gapmer modificadas en 3' con cada uno de los seis derivados **34 α** , **34 β** , **39 α** , **39 β** , **43 α** y **43 β** se eliminan en condiciones ácidas mediante el tratamiento de los soportes con una disolución al 3% de ácido tricloroacético en CH₂Cl₂.

Los soportes sólidos de las secuencias que presentan los derivados nucleosídicos **43 α** y **43 β** , tanto en la posición 3' como en la 5', se tratan primero con una disolución de 1% DBU en MeCN para romper las uniones con el grupo cianoetilo. A continuación, se realizan varios lavados con MeCN, para arrastrar los residuos generados y, por último, se trata con una disolución al 1% de Et₃N en MeCN durante 1 min para intercambiar el catión. La liberación de la secuencia de la resina se lleva a cabo mediante tratamiento con una disolución acuosa al 32% de NH₃ y 0.1 M de ditioneitol (DTT) a 55 °C durante 12 h.

Todos los soportes de las secuencias que contienen **34 α** , **34 β** , **39 α** y **39 β** en los extremos 3' y/o 5' se tratan con una disolución acuosa al 32% de NH₃ a 55 °C durante 12 h para liberar las cadenas del soporte sólido. Después, se eliminan los grupos protectores 5'-*O*-DMT de las secuencias RS **34 α** , **39 β** y **43 α** por una adición directa de la disolución de amoníaco sobre cartuchos OPC (*Oligonucleotide Purification Cartridge*).

Una vez realizado el procedimiento adecuado en cada caso, se lleva a cabo una primera purificación de las secuencias en disolución liberadas del soporte, donde se eliminan pequeñas moléculas orgánicas, resultantes de la desprotección de los grupos protectores, utilizando columnas de exclusión por tamaños (Sephadex G-25) y agua como eluyente.

La siguiente purificación de los oligonucleótidos se realiza mediante HPLC con el objetivo de separar las secuencias correctas de las truncadas. Los gapmers con el monómero modificado en el extremo 5' se purifican con el método DMT-ON descrito en el apartado General. Las

fracciones obtenidas se recogen y se concentran. Los productos resultantes se destritan mediante el tratamiento con 1 ml de una disolución acuosa al 50% de ácido acético durante 30 min a temperatura ambiente, seguido por una extracción con Et₂O. La fase acuosa, donde se encuentran los oligonucleótidos desprotegidos, se purifica en columnas de Sephadex G-25.

Todos los oligonucleótidos libres y purificados se analizan por HPLC con el método DMT-OFF descrito en el apartado General. Tanto la longitud como la homogenicidad de cada una de las secuencias sintetizadas se verifica mediante MALDI-TOF y las masas calculadas y encontradas se recogen en la Tabla 10.

4.3. Eliminación del grupo protector fotolábil en los oligonucleótidos que contienen derivados 39 α y 39 β

La eliminación del grupo protector fotolábil [1-(2-nitrofenil)etoxicarbonil] de los oligonucleótidos se ha realizado por irradiación directa tanto del oligonucleótido sobre el soporte sólido como de la secuencia en disolución liberada de la resina.

Los oligonucleótidos desligados del soporte sólido (2 mg de oligonucleótido) han sido irradiados con una lámpara UV-vis a 340 nm durante diferentes periodos de tiempo (15, 30, 45, 60 y 120 min) en una disolución (100 μ l) de H₂O/MeCN (1:1, v:v). Asimismo, los oligonucleótidos que todavía están soportados sobre la resina (2 mg de resina) se han suspendido en la misma disolución y se han irradiado con una lámpara UV-vis durante 0.5, 1, 2 o 6 h. Tras la exposición, estos últimos, se han desprotegido y purificado como se describe en el apartado anterior.

5. Conjugación de oligonucleótidos

5.1. Oligonucleótido conjugado con fluoresceína. Síntesis en disolución

Se ha llevado a cabo la reacción de conjugación a través del grupo amino del gapmer**34 α** con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Sobre una disolución del gapmer**34 α** (52 nmol) en una disolución acuosa 0.1 M de NaHCO₃ (pH 9), se añaden 10 equiv de FITC (0.2 mg, 520 nmol) disueltos en 250 μ l de DMF. La mezcla de reacción se mantiene a temperatura ambiente durante 8 h. A continuación, se añaden 10 equiv adicionales de FITC y la mezcla se deja reaccionando durante 12 h. Se evaporan los disolventes y el residuo se resuspende en 1 ml de agua. La disolución se desala utilizando una columna de Sephadex G-25 y se analiza el resultado mediante HPLC, obteniéndose el conjugado gapmer-**34 α** -FITC con un 50% de rendimiento.

5.2. Oligonucleótidos conjugados con ácido oleico o palmítico. Síntesis en disolución

Los oligonucleótidos que contienen derivados **34 α** o **39 α** se disuelven en 350 μ l de una disolución acuosa de NaHCO₃ (pH 9)/DMF/MeCN (1:4:2, v:v:v). A continuación, se añaden 20 μ l de Et₃N y 10 equiv de oleato o palmitato de pentafluorofenilo. La mezcla de reacción se mantiene en agitación a temperatura ambiente durante 12 h. Tras ello, la solución se concentra a sequedad, el residuo se redisuelve en agua y la disolución se desala en una columna de Sephadex G-25. Los productos se purifican por HPLC y los rendimientos de cada conjugación se recogen en la Tabla 13.

5.3. Conjugación en soporte sólido

Sobre los oligonucleótidos unidos al soporte sólido que contienen **39 α** en el extremo 5' o en el 3' de la cadena, se añaden 200 μ l de DMF, 20 μ l de Et₃N y 10 equiv de palmitato de pentafluorofenilo. La mezcla de reacción se mantiene en agitación a temperatura ambiente durante 2 h. A continuación, se lava la resina con MeCN para eliminar el exceso de reactivos y se seca. Posteriormente, se realiza el tratamiento con una disolución al 32% de NH₃ a 55 °C para eliminar los grupos protectores y desanclar el oligómero del soporte sólido. Los oligonucleótidos funcionalizados resultantes se someten al tratamiento habitual de desalación mediante una columna de Sephadex G-25 y purificación por HPLC. Los rendimientos de los productos obtenidos se muestran en la Tabla 13.

5.4. Oligonucleótido doblemente conjugado con fluoresceína y ácido oleico

El **39 α gapmer34 α** anclado al soporte se fotoliza durante 6 h y, después, se lava con MeCN y DMF. A continuación, se hace reaccionar con isotiocianato de fluoresceína a través del grupo amino libre: sobre una suspensión de 0.5 μ mol del **39 α gapmer34 α** y 20 equiv de Et₃N (2 μ l, 10 μ mol), se añaden 20 equiv de FITC (4 mg, 10 μ mol) disueltos en 250 μ l de DMF. La mezcla se mantiene en agitación a temperatura ambiente durante 2 h, y tras ello, se lava con MeCN y se seca. A continuación, el soporte sólido se trata con NH₃ acuoso (32%) a 55 °C durante 12 h; con este tratamiento se consigue la separación del soporte y la eliminación de los grupos protectores. La disolución se purifica mediante una columna de exclusión por tamaños (Sephadex G-25) y se lleva a sequedad. Posteriormente, 24 nmol del oligonucleótido FITC-**39 α gapmer34 α** se disuelven en 70 μ l de una disolución tampón de NaHCO₃ (pH 9)/DMF/MeCN (1:4:2, v:v:v). Seguidamente, se añaden 1 μ l de Et₃N y 20 equiv

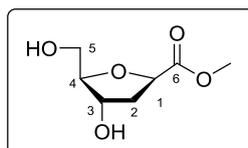
Parte Experimental -----

de oleato de pentafluorofenilo, y la reacción se mantiene agitando a temperatura ambiente durante 12 h. Se evaporan los disolventes hasta sequedad y el residuo se resuspende en agua para su desalado a través de una columna de Sephadex G-25. El oligonucleótido doblemente funcionalizado FITC-**39** α gapmer**34** α -oleico se purifica por HPLC, aislándose con un 20% de rendimiento.

6. Datos experimentales

A continuación se recogen los datos experimentales que han permitido la caracterización de los compuestos que no habían sido previamente descritos. La numeración empleada en la asignación de los espectros de resonancia magnética nuclear está indicada en la figura que acompaña a cada compuesto.

1,2-Didesoxi-1 β -(metoxicarbonil)-D-ribofuranosa (3 β)



Aceite amarillento

R_f: 0.36 (10% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₇H₁₂O₅

Masa Molecular: 176.17 g/mol

IR (NaCl): ν 3387, 2954, 1738 cm⁻¹.

¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 2.19 (m, 2H, H₂), 3.57 (d, 2H, H₅, *J* = 5.1 Hz), 3.75 (s, 3H, *Me*), 3.91 (dt, 1H, H₄, *J* = 5.0, 2.8 Hz), 4.26 (dt, 1H, H₃, *J* = 5.7, 2.9 Hz), 4.64 (dd, 1H, H₁, *J* = 8.5, 7.4 Hz) ppm.

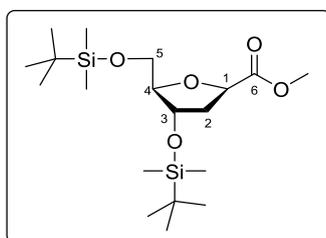
¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ 39.7 (C₂), 52.7 (O-CH₃), 63.5 (C₅), 73.2 (C₃), 77.4 (C₁), 89.5 (C₄), 175.3 (C=O) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₇H₁₂NaO₅ [M+Na]⁺: 199.0577. Encontrada: 199.0580

Parte Experimental -----

**3,5-Bis-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)-1,2-didesoxi-1 β -(metoxicarbonil)-*D*-
ribofuranosa (6 β)**



Líquido viscoso

R_f: 0.59 (20% AcOEt/Hexano)

Fórmula molecular: C₁₉H₄₀O₅Si₂

Masa Molecular: 404.69 g/mol

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

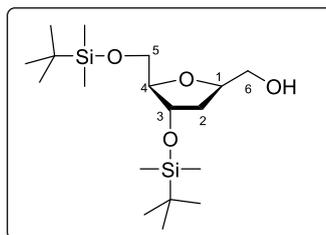
¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 0.08 (s, 3H, Si-*Me*), 0.09 (s, 3H, Si-*Me*), 0.108 (s, 3H, Si-*Me*), 0.113 (s, 3H, Si-*Me*), 0.91 (s, 9H, Si-*t*Bu), 0.92 (s, 9H, Si-*t*Bu), 2.12 (m, 2H, H₂), 3.51 (dd, 1H, H₅, *J* = 10.9, 6.5 Hz), 3.68 (dd, 1H, H₅, *J* = 10.8, 4.2 Hz), 3.73 (s, 3H, O-*Me*), 3.89 (ddd, 1H, H₄, *J* = 6.3, 4.3, 1.8 Hz), 4.42 (m, 1H, H₃), 4.61 (dd, 1H, H₁, *J* = 8.8, 7.4 Hz) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ -5.32 (Si-CH₃), -5.29 (Si-CH₃), -4.53 (Si-CH₃), -4.50 (Si-CH₃), 18.7 (SiCMe₃), 19.2 (SiCMe₃), 26.3 (3 CH₃-*t*Bu), 26.4 (3 CH₃-*t*Bu), 39.8 (C₂), 52.5 (O-CH₃), 64.6 (C₅), 75.0 (C₃), 77.7 (C₁), 90.0 (C₄), 174.3 (C=O) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₁₉H₄₀NaO₅Si₂ [M+Na]⁺: 427.2306. Encontrada: 427.2308

3,5-Bis-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)-1,2-didesoxi-1 β -(hidroximetil)-*D*-ribofuranosa (7 β)



Líquido viscoso

R_f: 0.37 (20% AcOEt/Hexano)

Fórmula molecular: C₁₈H₄₀O₄Si₂

Masa Molecular: 376.25 g/mol

IR (NaCl): ν 3450, 2960, 2925, 1472, 1256 cm⁻¹.

¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 0.08 (s, 6H, Si-*Me*), 0.10 (s, 6H, Si-*Me*), 0.91 (s, 9H, Si-*tBu*), 0.92 (s, 9H, Si-*tBu*), 1.84 (m, 2H, H₂), 3.50 (m, 2H, H₆), 3.60 (dd, 1H, H₅, $J = 11.6, 4.0$ Hz), 3.65 (dd, 1H, H₅, $J = 10.8, 4.2$ Hz), 3.79 (ddd, 1H, H₄, $J = 6.3, 4.2, 2.5$ Hz), 4.21 (m, 1H, H₁), 4.36 (dt, 1H, H₃, $J = 5.1, 2.6$ Hz) ppm.

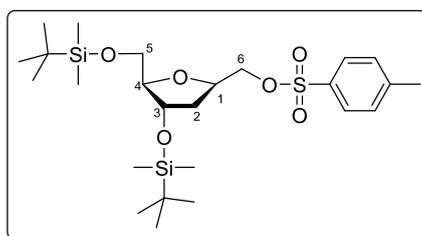
¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ -5.3 (Si-CH₃), -5.2 (Si-CH₃), -4.5 (Si-CH₃), -4.4 (Si-CH₃), 18.9 (SiCMe₃), 19.2 (SiCMe₃), 26.3 (3 CH₃-*tBu*), 26.5 (3 CH₃-*tBu*), 38.0 (C₂), 64.9 (C₅), 65.4 (C₆), 75.1 (C₃), 80.6 (C₁), 89.0 (C₄) ppm.

EMAR (ESI⁺, m/z):

- Calculada para C₁₈H₄₀NaO₄Si₂ [M+Na]⁺: 399.2357. Encontrada: 399.2361

Parte Experimental -----

**3,5-Bis-O-(*tert*-butildimetilsilil)-1,2-didesoxi-1 β -[(tosiloxi)metil]-D-
ribofuranosa (13 β)**



Líquido viscoso

R_f: 0.64 (20% AcOEt/Hexano)

Fórmula molecular: C₂₅H₄₆O₆SSi₂

Masa Molecular: 530.87 g/mol

IR (NaCl): ν 2954, 2930, 2896, 2857, 1471, 1366, 1255 cm⁻¹.

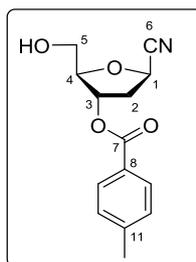
¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 0.02 (s, 3H, Si-*Me*), 0.04 (s, 3H, Si-*Me*), 0.07 (s, 6H, Si-*Me*), 0.88 (s, 9H, Si-*tBu*), 0.89 (s, 9H, Si-*tBu*), 1.80 (m, 2H, H₂), 2.46 (s, 3H, Ts-*Me*), 3.41 (dd, 1H, H₅, *J* = 10.9, 5.9 Hz), 3.53 (dd, 1H, H₅, *J* = 10.9, 4.1 Hz), 3.75 (ddd, 1H, H₄, *J* = 6.2, 4.1, 2.3 Hz), 3.95 (dd, 1H, H₆, *J* = 10.5, 5.6 Hz), 4.10 (dd, 1H, H₆, *J* = 10.5, 3.4 Hz), 4.29 (m, 2H, H₁ + H₃), 7.44 (d, 2H, H_{arom}, *J* = 8.5 Hz), 7.79 (d, 2H, H_{arom}, *J* = 8.4 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 (SiCMe₃), 19.2 (SiCMe₃), 21.6 (CH₃-Ts), 26.3 (3 CH₃-*tBu*), 26.5 (3 *tBu*-CH₃), 37.7 (C₂), 64.6 (C₅), 72.8 (C₆), 74.8 (C₃), 77.1 (C₁), 89.2 (C₄), 129.1 (2CH_{arom}), 131.1 (2CH_{arom}), 134.4 (C_{arom}), 146.5 (C_{arom}) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₂₅H₄₇O₆SSi₂ [M+H]⁺: 531.2626. Encontrada: 531.2633

1β-Ciano-1,2-didesoxi-3-*O*-toluoil-D-ribofuranosa (29β)



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): ν 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* = 3.6 Hz), 7.25 (d, 2H, H_{arom}, *J* = 7.8 Hz), 7.88 (d, 2H, H_{arom}, *J* = 8.2 Hz) ppm.

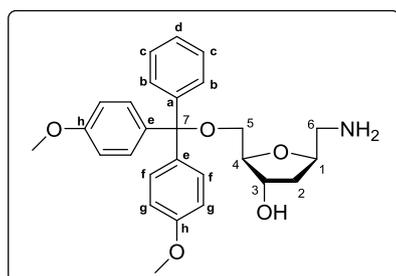
¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): δ 21.8 (CH₃), 38.3 (C₂), 62.6 (C₅), 66.0 (C₁), 75.7 (C₃), 86.8 (C₄), 118.3 (CN), 126.5 (C₈), 129.4 (2CH_{arom}), 129.8 (2CH_{arom}), 144.6 (C₁₁), 166.1 (C=O) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₂₇H₃₁NNaO₅ [M+Na]⁺: 284.0893. Encontrada: 284.0887

Parte Experimental -----

**1 β -Aminometil-1,2-didesoxi-5-*O*-(4,4'-dimetoxitritil)-*D*-ribofuranosa
(30 β)**



Aceite amarillento

R_f: 0.34 (20% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₂₇H₃₁NO₅

Masa molecular: 449.54 g/mol

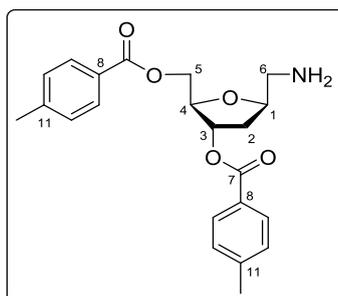
IR (NaCl): ν 3365, 2930, 1607, 1508 cm⁻¹.

¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 1.86 (m, 2H, H₂), 2.68 (dd, 1H, H₆, $J = 13.1, 6.9$ Hz), 2.82 (dd, 1H, H₆, $J = 13.1, 3.9$ Hz), 3.12 (d, 2H, H₅, $J = 4.8$ Hz), 3.76 (s, 6H, *Me*-DMT), 3.94 (dt, 1H, H₄, $J = 4.8, 2.8$ Hz), 4.22 (m, 2H, H₁ + H₃), 6.84 (d, 4H, H_g, $J = 8.9$ Hz), 7.24 (m, 3H, H_c + H_d), 7.32 (d, 4H, H_f, $J = 8.9$ Hz), 7.45 (d, 2H, H_b, $J = 7.2$ Hz) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ 39.0 (C₂), 46.5 (C₆), 55.7 (2 O-CH₃), 65.8 (C₅), 74.6 (C₃), 79.5 (C₁), 87.5 (C₁₀), 87.6 (C₄), 114.1 (4C_g), 127.8 (C_d), 128.7 (2C_c), 129.3 (2C_b), 131.3 (4C_f), 137.3 (2C_e), 146.4 (C_a), 160.1 (2C_h) ppm.

EMAR (ESI⁺, m/z):

- Calculada para C₂₇H₃₁NNaO₅ [M+Na]⁺: 472.2094. Encontrada: 472.2087

1 β -Aminometil-1,2-didesoxi-3,5-di-*O*-toluoil-D-ribofuranosa (31 β)

Aceite amarillento

R_f: 0.20 (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, H₂), 2.38 (s, 3H, *Me*-Tol), 2.40 (s, 3H, *Me*-Tol), 2.84 (dd, 1H, H₆, $J = 12.9, 6.0$ Hz), 3.06 (superpuesto, 1H, H₆), 3.14 (s, 2H, NH₂), 4.38 (m, 2H, H₄ + H₁), 4.51 (m, 2H, H₅), 5.48 (m, 1H, H₃), 7.22 (2d, 4H, H_{arom}), 7.91 (2d, 4H, H_{arom}) ppm.

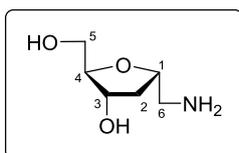
¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): δ 21.8 (2CH₃), 35.5 (C₂), 45.0 (C₆), 64.7 (C₅), 76.9 (C₃), 79.5 (C₁), 82.8 (C₄), 127.0 (C₈), 127.1 (C₈), 129.27 (2CH_{arom}), 129.30 (2CH_{arom}), 129.8 (4CH_{arom}), 144.0 (C₁₁), 144.2 (C₁₁), 166.2 (C=O), 166.6 (C=O) ppm.

EMAR (ESI⁺, m/z):

- Calculada para C₂₂H₂₆NO₅ [M+H]⁺: 384.1805. Encontrada: 384.1808

Parte Experimental -----

1 α -Aminometil-1,2-didesoxi-D-ribofuranosa (32 α)



Aceite amarillento

R_f: 0.20 (1% NH₃/MeOH)

Fórmula molecular: C₆H₁₃NO₃

Masa molecular: 147,17 g/mol

IR (NaCl): ν 3415, 2955, 1598 cm⁻¹.

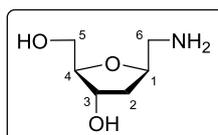
¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 1.76 (ddd, 1H, H₂, $J = 13.5, 4.8, 3.9$ Hz), 2.41 (m, 1H, H₂), 3.13 (m, 2H, H₆), 3.52 (dd, 1H, H₅, $J = 11.7, 5.6$ Hz), 3.59 (dd, 1H, H₅, $J = 11.7, 4.3$ Hz), 3.97 (dt, 1H, H₄, $J = 5.5, 4.1$ Hz), 4.26 (dt, 1H, H₃, $J = 6.6, 3.6$ Hz), 4.40 (m, 1H, H₁) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ 38.6 (C₂), 44.8 (C₆), 63.4 (C₅), 73.3 (C₃), 76.1 (C₁), 88.1 (C₄) ppm.

EMAR (ESI⁺, m/z):

- Calculada para C₆H₁₄NO₃ [M+H]⁺: 148.0968. Encontrada: 148.0977

1 β -Aminometil-1,2-didesoxi-D-ribofuranosa (32 β)



Aceite amarillento

R_f: 0.25 (1% NH₃/MeOH)

Fórmula molecular: C₆H₁₃NO₃

Masa molecular: 147.17 g/mol

IR (NaCl): ν 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.

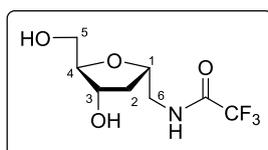
¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ 38.9 (C₂), 45.9 (C₆), 63.8 (C₅), 73.9 (C₃), 79.1 (C₁), 88.8 (C₄) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

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

Parte Experimental -----

**1,2-Didesoxi-1 α -[N-(trifluoroacetil)aminometil]-D-ribofuranosa
(33 α)**



Aceite transparente

R_f: 0.58 (20% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₈H₁₂F₃NO₄

Masa molecular: 243.18 g/mol

IR (NaCl): 3404, 3302, 2940, 1713, 1216, 1191, 1160 cm⁻¹.

¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 1.69 (ddd, 1H, H₂, J = 13.2, 5.8, 4.6 Hz), 2.34 (ddd, 1H, H₂, J = 13.1, 7.7, 6.6 Hz), 3.45 (d, 2H, H₆, J = 5.4 Hz), 3.52 (dd, 1H, H₅, J = 11.7, 4.9 Hz), 3.57 (dd, 1H, H₅, J = 11.7, 4.2 Hz), 3.87 (dt, 1H, H₄, J = 5.3, 4.0 Hz), 4.25 (m, 2H, H₁ + H₃) ppm.

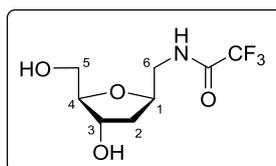
¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ 38.7 (C₂), 45.3 (C₆), 63.3 (C₅), 73.2 (C₃), 77.5 (C₁), 87.6 (C₄), 117.6 (q, CF₃, J = 286.7 Hz), 159.2 (q, C=O, J = 36.8 Hz) ppm.

EMAR (ESI⁺, m/z):

- Calculada para C₈H₁₃F₃NO₄ [M+H]⁺: 244.0791. Encontrada: 244.0786

- Calculada para C₈H₁₂F₃NNaO₄ [M+Na]⁺: 266.0611. Encontrada: 266.0603

- Calculada para C₈H₁₂F₃KNO₄ [M+K]⁺: 282.0350. Encontrada: 282.0342

1,2-Didesoxi-1β-[N-(trifluoroacetil)aminometil]-D-ribofuranosa (33β)

Aceite transparente

R_f: 0.57 (20% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₈H₁₂F₃NO₄

Masa molecular: 243.18 g/mol

IR (NaCl): ν 3395, 3315, 2945, 1712, 1192, 1162 cm⁻¹.

¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 1.87 (m, 2H, H₂), 3.44 (t, 2H, H₆, *J* = 5.0 Hz), 3.52 (dd, 1H, H₅, *J* = 11.7, 4.9 Hz), 3.60 (dd, 1H, H₅, *J* = 11.7, 4.2 Hz), 3.80 (dt, 1H, H₄, *J* = 4.5, 3.1 Hz), 4.22 (dt, 1H, H₃, *J* = 5.9, 2.9 Hz), 4.29 (m, 1H, H₁) ppm.

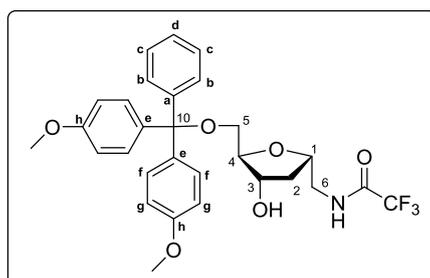
¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ 38.9 (C₂), 44.6 (C₆), 63.6 (C₅), 73.7 (C₃), 77.8 (C₁), 88.7 (C₄), 117.6 (q, CF₃, *J* = 286.6 Hz), 159.3 (q, C=O, *J* = 37.0 Hz) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₈H₁₃F₃NO₄ [M+H]⁺: 244.0791. Encontrada: 244.0780
- Calculada para C₈H₁₂F₃NNaO₄ [M+Na]⁺: 266.0611. Encontrada: 266.0599
- Calculada para C₈H₁₂F₃KNO₄ [M+K]⁺: 282.0350. Encontrada: 282.0337

Parte Experimental -----

1,2-Didesoxi-5-O-(4,4'-dimetoxitritil)-1 α -[N-(trifluoroacetil)aminometil]-D-ribofuranosa (34 α)



Aceite amarillo intenso

R_f: 0.22 (40% AcOEt/Hexano)

Fórmula molecular: C₂₉H₃₀F₃NO₆

Masa molecular: 545.56 g/mol

IR (NaCl): ν 3414, 3282, 2934, 1715, 1509, 1252, 1202, 1177 cm⁻¹.

¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 1.68 (ddd, 1H, H₂, *J* = 13.2, 5.8, 4.2 Hz), 2.35 (ddd, 1H, H₂, *J* = 13.1, 7.7, 6.4 Hz), 3.07 (dd, 1H, H₅, *J* = 9.9, 5.1 Hz), 3.14 (dd, 1H, H₅, *J* = 10.0, 4.3 Hz), 3.47 (m, 2H, H₆), 3.77 (s, 6H, *Me*-DMT), 4.03 (q, 1H, H₄, *J* = 4.1 Hz), 4.26 (dt, 1H, H₃, *J* = 6.5, 3.8 Hz), 4.34 (m, 1H, H₁), 6.85 (d, 4H, H_g, *J* = 8.9 Hz), 7.24 (m, 3H, H_c + H_d), 7.31 (d, 4H, H_f, *J* = 8.9 Hz), 7.43 (d, 2H, H_b, *J* = 7.1 Hz) ppm.

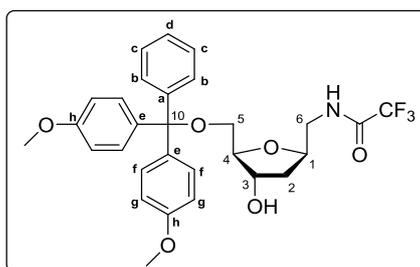
¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ 38.7 (C₂), 45.4 (C₆), 55.7 (2 O-CH₃), 65.5 (C₅), 74.0 (C₃), 77.8 (C₁), 86.9 (C₄), 87.5 (C₁₀), 114.1 (4C_g), 117.6 (q, CF₃, *J* = 286.7 Hz), 127.7 (C_d), 128.7 (2C_c), 129.3 (2C_b), 131.3 (4C_f), 137.2 (C_e), 137.3 (C_e), 146.4 (C_a), 159.2 (q, C=O, *J* = 37.0 Hz), 160.1 (2C_h) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₂₉H₃₀F₃NNaO₆ [M+Na]⁺: 568.1917. Encontrada: 568.1893

- Calculada para C₂₉H₃₀F₃KNO₆ [M+K]⁺: 584.1657. Encontrada: 584.1632

1,2-Didesoxi-5-O-(4,4'-dimetoxitritil)-1 β -[N-(trifluoroacetil)aminometil]-D-ribofuranosa (34 β)



Aceite amarillento

R_f: 0.13 (40% AcOEt/Hexano)

Fórmula molecular: C₂₉H₃₀F₃NO₆

Masa molecular: 545.56 g/mol

IR (NaCl): ν 3424, 3331, 2934, 1721, 1510, 1251, 1216, 1177 cm⁻¹.

¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 1.75 (ddd, 1H, H₂, J = 13.1, 10.0, 5.8 Hz), 1.90 (ddd, 1H, H₂, J = 13.0, 5.5, 1.9 Hz), 3.10 (m, 2H, H₅), 3.39 (dd, 1H, H₆, J = 13.7, 6.3 Hz), 3.49 (dd, 1H, H₆, J = 13.7, 4.6 Hz), 3.76 (s, 6H, *Me*-DMT), 3.94 (dt, 1H, H₄, J = 5.0, 2.3 Hz), 4.23 (m, 1H, H₃), 4.29 (m, 1H, H₁), 6.84 (d, 4H, H_g, J = 8.9 Hz), 7.21 (m, 3H, H_c + H_d), 7.31 (d, 4H, H_f, J = 8.9 Hz), 7.44 (m, 2H, H_b) ppm.

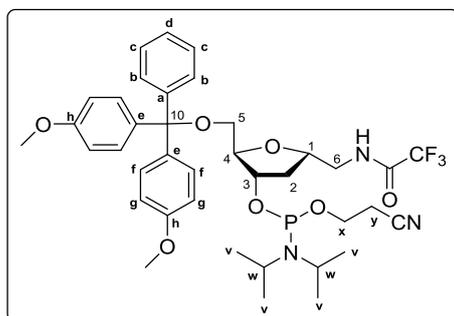
¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ 39.2 (C₂), 44.6 (C₆), 55.7 (2 O-CH₃), 65.6 (C₅), 74.4 (C₃), 77.9 (C₁), 87.4 (C₁₀), 87.7 (C₄), 114.1 (4C_g), 117.5 (q, CF₃, J = 286.8 Hz), 127.8 (C_d), 128.7 (2C_c), 129.3 (2C_b), 131.3 (4C_f), 137.2 (C_e), 137.3 (C_e), 146.4 (C_a), 159.2 (q, C=O, J = 36.8 Hz), 160.1 (2C_h) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₂₉H₃₀F₃NNaO₆ [M+Na]⁺: 568.1917. Encontrada: 568.1884
- Calculada para C₂₉H₃₀F₃KNO₆ [M+K]⁺: 584.1657. Encontrada: 584.1623

Parte Experimental -----

1,2-Didesoxi-5-O-(4,4'-dimetoxitritil)-1 α -[N-(trifluoroacetil)aminometil]-D-ribofuranosil-3-O-(2-cianoetil)-N,N-diisopropilamino)fosforamidito (36 α)



Fórmula molecular: C₃₈H₄₇F₃N₃O₇P

Masa molecular: 745,76 g/mol

ISÓMERO 36 α -A

Aceite transparente

R_f: 0.63 (40% AcOEt/Hexano)

IR (NaCl): ν 3318, 2966, 2254, 1723, 1509, 1251, 1213, 1033 cm⁻¹.

¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 1.15 (d, 6H, H_v, *J* = 6.9 Hz), 1.18 (d, 6H, H_v, *J* = 6.9 Hz), 1.79 (dt, 1H, H₂, *J* = 13.1, 5.0 Hz), 2.40 (dt, 1H, H₂, *J* = 13.6, 7.0 Hz), 2.52 (t, 2H, H_y, *J* = 6.0 Hz), 3.10 (dd, 1H, H₅, *J* = 10.1, 4.6 Hz), 3.25 (dd, 1H, H₅, *J* = 10.1, 4.0 Hz), 3.43 (dd, 1H, H₆, *J* = 13.7, 4.1 Hz), 3.63 (m, 5H, H₆ + H_w + H_x), 3.78 (s, 6H, *Me*-DMT), 4.15 (q, 1H, H₄, *J* = 4.0 Hz), 4.34 (m, 1H, H₁), 4.48 (m, 1H, H₃), 6.85 (d, 4H, H_g, *J* = 8.9 Hz), 7.24 (m, 3H, H_c + H_d), 7.30 (d, 4H, H_f, *J* = 8.9 Hz), 7.45 (d, 2H, H_b, *J* = 7.0 Hz) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ 20.9 (d, C_y, *J* = 7.3 Hz), 25.0 (d, 4C_v, *J* = 7.4 Hz), 38.2 (d, C₂, *J* = 4.0 Hz), 44.4 (d, 2C_w, *J* = 12.3 Hz), 45.2 (C₆), 55.7 (2 O-CH₃), 59.7 (d, C_x, *J* = 18.6 Hz), 65.1 (C₅), 76.1 (d, C₃, *J* = 16.2 Hz), 78.4 (C₁), 86.0 (d, C₄, *J* = 4.4 Hz), 87.5 (C₁₀), 114.1 (4C_g), 117.5 (q, CF₃, *J* = 286.8 Hz), 119.3 (CN), 127.8 (C_d), 128.8 (2C_c),

129.3 (2C_b), 131.3 (4C_f), 137.2 (C_e), 137.3 (C_e), 146.4 (C_a), 159.2 (q, C=O, $J = 37.6$ Hz), 160.1 (2C_h) ppm.

³¹P-RMN (121.5 MHz, MeOH- *d*₄): δ 148.05 ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₃₈H₄₇F₃KNaO₇P [M+K]⁺: 784.2735.
Encontrada: 784.2702

ISÓMERO 36 α -B

Aceite transparente

R_f: 0.53 (40% AcOEt/Hexano)

IR (NaCl): ν 3424, 3324, 2967, 2254, 1725, 1509, 1251, 1215, 1178, 1034 cm⁻¹.

¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 1.07 (d, 6H, H_v, $J = 6.8$ Hz), 1.17 (d, 6H, H_v, $J = 6.8$ Hz), 1.89 (dt, 1H, H₂, $J = 13.2, 4.9$ Hz), 2.40 (dt, 1H, H₂, $J = 13.7, 7.0$ Hz), 2.68 (t, 2H, H_y, $J = 5.8$ Hz), 3.08 (dd, 1H, H₅, $J = 10.0, 4.8$ Hz), 3.19 (dd, 1H, H₅, $J = 10.0, 4.5$ Hz), 3.54 (m, 4H, H₆ + H_w), 3.77 (s, 6H, *Me*-DMT), 3.78 (m, 2H, H_x), 4.12 (q, 1H, H₄, $J = 4.0$ Hz), 4.33 (m, 1H, H₁), 4.46 (m, 1H, H₃), 6.85 (d, 4H, H_g, $J = 8.9$ Hz), 7.23 (m, 3H, H_c + H_d), 7.30 (d, 4H, H_f, $J = 8.9$ Hz), 7.43 (d, 2H, H_b, $J = 7.0$ Hz) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ 20.9 (d, C_y, $J = 6.8$ Hz), 23.56 (d, 2C_v, $J = 7.1$ Hz), 23.61 (d, 2C_v, $J = 7.1$ Hz), 38.3 (d, C₂, $J = 2.8$ Hz), 44.4 (d, 2C_w, $J = 12.4$ Hz), 45.3 (C₆), 55.7 (2 O-CH₃), 59.7 (d, C_x, $J = 19.0$ Hz), 65.2 (C₅), 76.6 (d, C₃, $J = 16.8$ Hz), 78.4 (C₁), 85.9 (d, C₄, $J = 5.9$ Hz), 87.5 (C₁₀), 114.1 (4C_g), 117.5 (q, CF₃, $J = 286.8$ Hz), 119.5 (CN), 127.8 (C_d), 128.8 (2C_c), 129.3 (2C_b), 131.3 (4C_f), 137.1 (C_e), 137.2 (C_e), 146.4 (C_a), 159.2 (q, C=O, $J = 37.6$ Hz), 160.1 (2C_h) ppm.

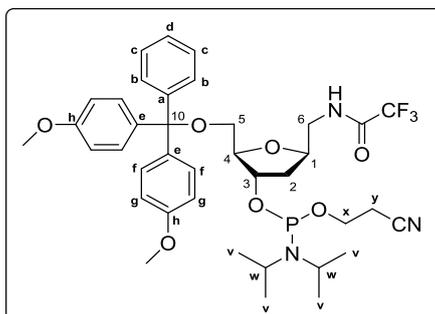
³¹P-RMN (121.5 MHz, MeOH- *d*₄): δ 148.10 ppm.

Parte Experimental -----

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₃₈H₄₈F₃N₃O₇P [M+H]⁺: 746.3176. Encontrada: 746.3151
- Calculada para C₃₈H₄₇F₃N₃NaO₇P [M+Na]⁺: 768.2996. Encontrada: 768.2965
- Calculada para C₃₈H₄₇F₃KN₃O₇P [M+K]⁺: 784.2735. Encontrada: 784.2709

1,2-Didesoxi-5-O-(4,4'-dimetoxitritil)-1 β -[N-(trifluoroacetil)aminometil]-D-ribofuranosil-3-O-(2-cianoetil)-N,N-diisopropilamino)fosforamidito (36 β)



Fórmula molecular: C₃₈H₄₇F₃N₃O₇P

Masa molecular: 745,76 g/mol

ISÓMERO 36 β -A

Aceite transparente

R_f: 0.34 (30% AcOEt/Hexano)

IR (NaCl): ν 3425, 3324, 2968, 2254, 1726, 1509, 1251, 1215, 1178, 1034 cm⁻¹.

¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 1.16 (d, 6H, H_v, *J* = 6.8 Hz), 1.19 (d, 6H, H_v, *J* = 6.8 Hz), 1.83 (m, 1H, H₂), 2.01 (m, 1H, H₂), 2.54 (t, 2H, H_y, *J* = 6.0 Hz), 3.15 (m, 2H, H₅), 3.47 (m, 2H, H₆), 3.65 (m, 4H, H_x + H_w), 3.78 (s, 6H, *Me*-DMT), 4.06 (m, 1H, H₄), 4.27 (m, 1H, H₁), 4.43 (m, 1H, H₃), 6.86 (d, 4H, H_g, *J* = 8.9 Hz), 7.22 (m, 3H, H_c + H_d), 7.32 (d, 4H, H_f, *J* = 7.5 Hz), 7.45 (d, 2H, H_b, *J* = 7.3 Hz) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ 20.9 (d, C_y, *J* = 6.8 Hz), 24.95 (d, 2C_v, *J* = 7.5 Hz), 25.0 (d, 2C_v, *J* = 7.5 Hz), 38.5 (d, C₂, *J* = 4.6 Hz), 44.4 (d, 2C_w, *J* = 12.0 Hz), 44.5 (C₆), 55.7 (2 O-CH₃), 59.7 (d, C_x, *J* = 18.6 Hz), 65.1 (C₅), 76.5 (d, C₃, *J* = 16.4 Hz), 78.2 (C₁), 87.1 (d, C₄, *J* = 4.0 Hz), 87.5 (C₁₀), 114.1 (4C_g), 117.5 (q, CF₃, *J* = 286.8 Hz), 119.3 (CN),

Parte Experimental -----

127.8 (C_d), 128.7 (2C_c), 129.3 (2C_b), 131.3 (4C_f), 137.2 (C_e), 137.3 (C_e), 146.4 (C_a), 159.2 (q, C=O, $J = 36.8$ Hz), 160.1 (2C_h) ppm.

³¹P-RMN (121.5 MHz, MeOH- *d*₄): δ 148.1 ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₃₈H₄₇F₃N₃NaO₇P [M+Na]⁺: 768.2996.
Encontrada: 768.2968

ISÓMERO 36 β -B

Aceite transparente

R_f: 0.28 (30% AcOEt/Hexano)

IR (NaCl): ν 3424, 3322, 2967, 2254, 1726, 1510, 1251, 1215, 1179, 1034 cm⁻¹.

¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 1.09 (d, 6H, H_v, $J = 6.8$ Hz), 1.18 (d, 6H, H_v, $J = 6.8$ Hz), 1.80 (m, 1H, H₂), 2.12 (dd, 1H, H₂, $J = 12.9, 4.7$ Hz), 2.68 (t, 2H, H_y, $J = 6.0$ Hz), 3.12 (d, 2H, H₅, $J = 4.9$ Hz), 3.46 (m, 2H, H₆), 3.59 (m, 2H, H_w), 3.77 (m, 8H, *Me*-DMT + H_x), 4.02 (m, 1H, H₄), 4.28 (dq, 1H, H₁, $J = 10.0, 5.5$ Hz), 4.42 (m, 1H, H₃), 6.85 (d, 4H, H_g, $J = 8.9$ Hz), 7.23 (m, 3H, H_c + H_d), 7.31 (d, 4H, H_f, $J = 8.9$ Hz), 7.43 (d, 2H, H_b, $J = 7.2$ Hz) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ 20.9 (d, C_y, $J = 7.1$ Hz), 24.97 (d, 2C_v, $J = 7.0$ Hz), 25.0 (d, 2C_v, $J = 7.0$ Hz), 38.5 (d, C₂, $J = 3.6$ Hz), 44.4 (d, 2C_w, $J = 12.7$ Hz), 44.5 (C₆), 55.7 (2 O-CH₃), 59.8 (d, C_x, $J = 18.9$ Hz), 65.2 (C₅), 76.8 (d, C₃, $J = 17.0$ Hz), 78.1 (C₁), 86.9 (d, C₄, $J = 5.6$ Hz), 87.5 (C₁₀), 114.1 (4C_g), 117.5 (q, CF₃, $J = 286.8$ Hz), 119.5 (CN), 127.8 (C_d), 128.8 (2C_c), 129.3 (2C_b), 131.3 (4C_f), 137.1 (C_e), 137.2 (C_e), 146.4 (C_a), 159.2 (q, C=O, $J = 37.6$ Hz), 160.1 (2C_h) ppm.

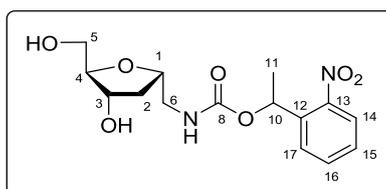
³¹P-RMN (121.5 MHz, MeOH- *d*₄): δ 147.7 ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₃₈H₄₈F₃N₃O₇P [M+H]⁺: 746.3176. Encontrada: 746.3156

- Calculada para C₃₈H₄₇F₃N₃NaO₇P [M+Na]⁺: 768.2996.
Encontrada: 768.2972

**1,2-Didesoxi-1 α -[(1-(2-nitrofenil)etoxi)carbonilaminometil]-D-
ribofuranosa (38 α)**



Aceite amarillo

R_f: 0.29 (10% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₁₅H₂₀N₂O₇

Masa Molecular: 340.33 g/mol

IR (NaCl): ν 3360, 2939, 1694, 1538, 1259 cm⁻¹.

¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 1.60 (d, 3H, H₁₁, *J* = 6.8 Hz), 1.64 (m, 1H, H₂), 2.24 (m, 1H, H₂), 3.19 (m, 2H, H₆), 3.50 (dd, 1H, H₅, *J* = 11.7, 5.6 Hz), 3.59 (dd, 1H, H₅, *J* = 11.7, 3.9 Hz), 3.79 (m, 1H, H₄), 4.09 (m, 1H, H₁), 4.19 (m, 1H, H₃), 6.14 (q, 1H, H₁₀, *J* = 6.8 Hz), 7.48 (m, 1H, H_{arom}), 7.72 (m, 2H, H_{arom}), 7.94 (d, 1H, H_{arom}, *J* = 7.7 Hz) ppm.

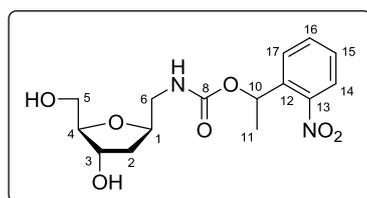
¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ 22.5 (C₁₁), 38.6 (C₂), 46.10 (C₆), 46.14 (C₆), 63.3 (C₅), 69.6 (C₁₀), 73.2 (C₃), 78.2 (C₁), 78.3 (C₁), 87.0 (C₄), 125.2 (CH_{arom}), 128.3 (CH_{arom}), 129.5 (CH_{arom}), 134.8 (CH_{arom}), 134.9 (CH_{arom}), 139.9 (C₁₂), 149.1 (C₁₃), 157.9 (C=O), 158.0 (C=O) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₁₅H₂₁N₂O₇ [M+H]⁺: 341.1343. Encontrada: 341.1332
- Calculada para C₁₅H₂₀N₂NaO₇ [M+Na]⁺: 363.1163. Encontrada: 363.1153
- Calculada para C₁₅H₂₀KN₂O₇ [M+K]⁺: 379.0902. Encontrada: 379.0891

Parte Experimental -----

**1,2-Didesoxi-1 β -[(1-(2-nitrofenil)etoxi)carbonilaminometil]-D-
ribofuranosa (38 β)**



Aceite marrón claro

R_f: 0.26 (10% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₁₅H₂₀N₂O₇

Masa Molecular: 340.33 g/mol

IR (NaCl): ν 3355, 2937, 1703, 1525, 1261 cm⁻¹.

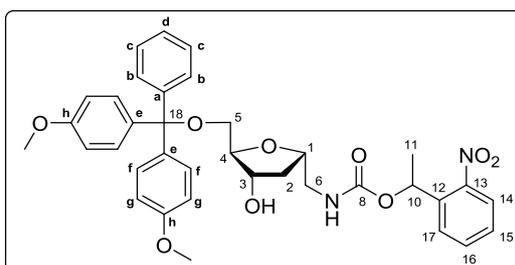
¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 1.61 (d, 3H, H₁₁, *J* = 6.6 Hz), 1.63-1.84 (varios m, 2H, H₂), 3.19 (m, 2H, H₆), 3.53 (m, 2H, H₅), 3.75 (m, 1H, H₄), 4.16 (m, 2H, H₁ + H₃), 6.13 (q, 1H, H₁₀, *J* = 6.5 Hz), 7.50 (m, 1H, H_{arom}), 7.72 (m, 2H, H_{arom}), 7.95 (d, 1H, H_{arom}, *J* = 7.6 Hz) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ 22.37 (C₁₁), 22.44 (C₁₁), 38.4 (C₂), 38.6 (C₂), 45.2 (C₆), 45.5 (C₆), 63.6 (C₅), 63.7 (C₅), 69.6 (C₁₀), 73.6 (C₃), 78.7 (C₁), 78.8 (C₁), 88.5 (C₄), 88.6 (C₄), 125.3 (CH_{arom}), 128.2 (CH_{arom}), 129.6 (CH_{arom}), 134.8 (CH_{arom}), 139.8 (C₁₂), 149.2 (C₁₃), 158.2 (C=O) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₁₅H₂₁N₂O₇ [M+H]⁺: 341.1343. Encontrada: 341.1339
- Calculada para C₁₅H₂₀N₂NaO₇ [M+Na]⁺: 363.1163. Encontrada: 363.1157
- Calculada para C₁₅H₂₀KN₂O₇ [M+K]⁺: 379.0902. Encontrada: 379.0896

1,2-Didesoxi-5-O-(4,4'-dimetoxitritil)-1 α -[1-(2-nitrofenil)etoxi]carbonilaminometil]-D-ribofuranosa (39 α)



Aceite amarillento

R_f: 0.19 (50% AcOEt/Hexano)

Fórmula molecular: C₃₆H₃₈N₂O₉

Masa Molecular: 642.69 g/mol

IR (NaCl): ν 3422, 2932, 1719, 1525, 1508, 1252 cm⁻¹.

¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): 1.58 (d, 3H, H₁₁, *J* = 6.5 Hz), 1.59 (m, 1H, H₂), 2.23 (m, 1H, H₂), 3.10 (m, 2H, H₅), 3.23 (m, 2H, H₆), 3.74 y 3.75 (2s, 6H, *Me*-DMT), 6.15 (q, 1H, H₄, *J* = 6.4 Hz), 4.14 (m, 1H, H₁), 4.22 (m, 1H, H₃), 6.15 (q, 1H, H₁₀, *J* = 6.4 Hz), 6.82 (m, 4H, H_{arom}), 7.14-7.36 (varios m, 8H, H_{arom}), 7.44 (m, 2H, H_{arom}), 7.67 (m, 2H, H_{arom}), 7.91 (m, 1H, H_{arom}) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ 22.5 (C₁₁), 38.7 (C₂), 38.8 (C₂), 46.3 (C₆), 55.7 (2 O-CH₃), 65.4 (C₅), 65.5 (C₅), 69.6 (C₁₀), 74.1 (C₃), 74.2 (C₃), 78.7 (C₁), 78.9 (C₁), 86.4 (C₄), 87.4 (C₁₈), 114.0 (4C_g), 125.2 (CH_{arom}), 127.7 (C_d), 128.15 (CH_{arom}), 128.24 (CH_{arom}), 128.7 (2C_c), 129.4 (2C_b), 129.4 (CH_{arom}), 131.3 (4C_f), 134.9 (CH_{arom}), 137.3 (2C_e), 139.9 (C₁₂), 146.5 (C_a), 149.0 (C₁₃), 158.0 (C=O), 160.0 (2C_h) ppm.

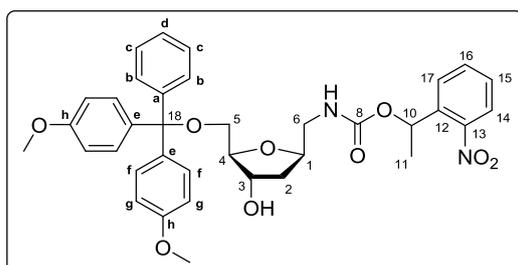
EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₃₆H₃₈N₂NaO₉ [M+Na]⁺: 665.2470. Encontrada: 665.2462

- Calculada para C₃₆H₃₈KN₂O₉ [M+K]⁺: 681.2209. Encontrada: 681.2201

Parte Experimental -----

1,2-Didesoxi-5-O-(4,4'-dimetoxitritil)-1 β -[1-(2-nitrofenil)etoxi]carbonilaminometil]-D-ribofuranosa (39 β)



Aceite amarillento

R_f: 0.16 (50% AcOEt/Hexano)

Fórmula molecular: C₃₆H₃₈N₂O₉

Masa Molecular: 642.69 g/mol

IR (NaCl): ν 3424, 2931, 1722, 1525, 1510, 1252 cm⁻¹.

¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): 1.52 y 1.53 (2d, 3H, H₁₁, *J* = 6.4 Hz), 1.65-1.85 (varios m, 2H, H₂), 3.12 (m, 2H, H₅), 3.23 (m, 2H, H₆), 3.77 y 3.78 (2s, 6H, *Me*-DMT), 3.91 (m, 1H, H₄), 4.19 (m, 2H, H₁ + H₃), 6.13 (m, 1H, H₁₀), 6.86 (m, 4H, H_{arom}), 7.17-7.65 (varios m, 12H, H_{arom}), 7.93 (m, 1H, H_{arom}) ppm.

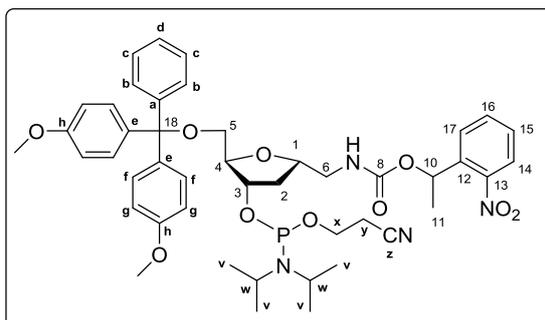
¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ 22.4 (C₁₁), 22.5 (C₁₁), 38.6 (C₂), 38.9 (C₂), 45.3 (C₆), 45.5 (C₆), 55.7 (2 O-CH₃), 65.65 (C₅), 65.71 (C₅), 69.6 (C₁₀), 74.4 (C₃), 74.5 (C₃), 78.6 (C₁), 78.7 (C₁), 87.4 (C₁₈), 87.6 (C₄), 114.1 (4C_g), 125.2 (CH_{arom}), 127.8 (C_d), 128.2 (CH_{arom}), 128.8 (2C_c), 129.4 (2C_b), 129.5 (CH_{arom}), 131.3 (4C_f), 134.8 (CH_{arom}), 137.3 (C_e), 137.4 (C_e), 139.8 (C₁₂), 146.5 (C_a), 149.0 (C₁₃), 157.9 (C=O), 160.1 (2C_h) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₃₆H₃₈N₂NaO₉ [M+Na]⁺: 665.2470. Encontrada: 665.2454

- Calculada para C₃₆H₃₈KN₂O₉ [M+K]⁺: 681.2209. Encontrada: 681.2192

1,2-Didesoxi-5-O-(4,4'-dimetoxitritil)-1 α -[(1-(2-nitrofenil)etoxi)carbonilaminometil]-D-ribofuranosil-3-O-(2-cianoetil-N,N-diisopropilamino)fosforamidito (40 α)



Fórmula molecular: C₄₅H₅₅N₄O₁₀P

Masa Molecular: 842.91 g/mol

ISÓMERO 40 α -A

Aceite transparente

R_f: 0.34 (40% AcOEt/Hexano)

IR (NaCl): ν 3355, 2967, 2253, 1723, 1526, 1510, 1179, 1033 cm⁻¹.

¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 1.10-1.18 (varios d, 12H, H_v, *J* = 6.8 Hz), 1.60 (d, 3H, H₁₁, *J* = 6.5 Hz), 1.72 (m, 1H, H₂), 2.29 (m, 1H, H₂), 2.50 (t, 2H, H_y, *J* = 6.0 Hz), 3.08 (m, 1H, H₅), 3.24 (m, 3H, H₅ + H₆), 3.60 (m, 4H, H_x + H_w), 3.77 y 3.78 (2s, 6H, *Me*-DMT), 4.09 (m, 1H, H₄), 4.19 (m, 1H, H₁), 4.44 (m, 1H, H₃), 6.15 (m, 1H, H₁₀), 6.85 (m, 4H, H_{arom}), 7.17-7.49 (varios m, 10H, H_{arom}), 7.70 (m, 2H, H_{arom}), 7.93 (m, 1H, H_{arom}) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ 20.8 (d, C_y, *J* = 6.6 Hz), 22.5 (C₁₁), 25.00 (d, 4C_v, *J* = 7.3 Hz), 38.0 (d, C₂, *J* = 4.0 Hz), 38.1 (d, C₂, *J* = 4.0 Hz), 44.3 (d, C_w, *J* = 12.2 Hz), 46.0 (C₆), 46.2 (C₆), 55.7 (2 O-CH₃), 59.7 (d, C_x, *J* = 18.3 Hz), 65.1 (C₅), 69.6 (C₁₀), 75.9 (d, C₃, *J* = 15.6 Hz), 76.0 (d, C₃, *J* = 16.4 Hz), 79.0 (C₁), 79.3 (C₁), 85.7 (C₄), 87.5 (C₁₈), 114.1 (4C_g), 119.3 (CN), 125.2 (CH_{arom}), 127.8 (C_d), 128.2 (CH_{arom}), 128.3

Parte Experimental -----

(CH_{arom}), 128.8 (2C_c), 129.4 (2C_b), 129.5 (CH_{arom}), 131.4 (4C_f), 134.9 (CH_{arom}), 137.2 (C_e), 137.3 (C_e), 137.4 (C_e), 140.0 (C₁₂), 146.5 (C_a), 149.1 (C₁₃), 158.0 (C=O), 160.1 (2C_h) ppm.

³¹P-RMN (121.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ 148.0 ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₄₅H₅₆N₄O₁₀P [M+H]⁺: 843.3729. Encontrada: 843.3726

- Calculada para C₄₅H₅₅N₄NaO₁₀P [M+Na]⁺: 865.3548. Encontrada: 865.3545

- Calculada para C₄₅H₅₅KN₄O₁₀P [M+K]⁺: 881.3287. Encontrada: 881.3300

ISÓMERO 40α-B

Aceite transparente

R_f: 0.30 (40% AcOEt/Hexano)

IR (NaCl): ν 3360, 2967, 2253, 1723, 1526, 1510, 1179, 1033 cm⁻¹.

¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 1.04 (d, 6H, H_v, *J* = 6.8 Hz), 1.15 (d, 6H, H_v, *J* = 6.8 Hz), 1.60 (d, 3H, H₁₁, *J* = 6.6 Hz), 1.82 (m, 1H, H₂), 2.31 (m, 1H, H₂), 2.65 (t, 2H, H_y, *J* = 5.9 Hz), 3.06 (m, 1H, H₅), 3.16 (m, 1H, H₅), 3.24 (m, 2H, H₆), 3.55 (m, 2H, H_w), 3.72 (m, 2H, H_x), 3.77 (s, 6H, *Me*-DMT), 4.07 (m, 1H, H₄), 4.17 (m, 1H, H₁), 4.42 (m, 1H, H₃), 6.14 (m, 1H, H₁₀), 6.83 (m, 4H, H_{arom}), 7.16-7.49 (m, 10H, H_{arom}), 7.70 (m, 2H, H_{arom}), 7.93 (m, 1H, H_{arom}) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ 20.9 (d, C_y, *J* = 6.7 Hz), 22.50 (C₁₁), 22.54 (C₁₁), 24.9 (d, 2C_v, *J* = 7.7 Hz), 25.0 (d, 2C_v, *J* = 7.3 Hz), 38.2 (C₂), 44.3 (d, C_w, *J* = 12.6 Hz), 46.2 (C₆), 54.8 (2 O-CH₃), 59.7 (d, C_x, *J* = 19.0 Hz), 65.2 (C₅), 65.3 (C₅), 69.6 (C₁₀), 76.5 (d, C₃, *J* = 16.2 Hz), 76.6 (d, C₃, *J* = 17.7 Hz), 79.1 (C₁), 79.3 (C₁), 85.7 (d, C₄, *J* = 5.7 Hz), 87.5 (C₁₈), 114.1 (4C_g), 119.5 (CN), 125.2 (CH_{arom}), 127.8 (C_d), 128.2 (CH_{arom}), 128.3 (CH_{arom}), 128.8 (2C_c), 129.3 (2C_b), 129.5 (CH_{arom}), 131.3 (4C_f), 134.8 (CH_{arom}), 137.2 (2C_e), 139.9 (C₁₂), 146.4 (C_a), 149.1 (C₁₃), 157.9 (C=O), 160.1 (2C_h) ppm.

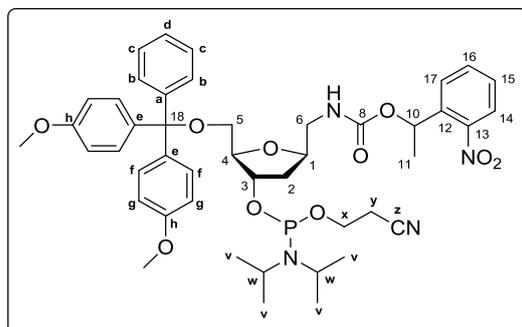
³¹P-RMN (121.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ 148.0 y 148.1 ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₄₅H₅₆N₄O₁₀P [M+H]⁺: 843.3729. Encontrada: 843.3725
- Calculada para C₄₅H₅₅N₄NaO₁₀P [M+Na]⁺: 865.3548. Encontrada: 865.3550
- Calculada para C₄₅H₅₅KN₄O₁₀P [M+K]⁺: 881.3287. Encontrada: 881.3310

Parte Experimental -----

1,2-Didesoxi-5-*O*-(4,4'-dimetoxitritil)-1 β -[(1-(2-nitrofenil)etoxi)carbonilaminometil]-*D*-ribofuranosil-3-*O*-(2-cianoetil-*N,N*-diisopropilamino)fosforamidito (40 β)



Fórmula molecular: C₄₅H₅₅N₄O₁₀P

Masa Molecular: 842.91 g/mol

ISÓMERO 40 β -A

Aceite transparente

R_f: 0.41 (40% AcOEt/Hexano)

IR (NaCl): ν 3356, 2932, 2253, 1725, 1526, 1510, 1179, 1033 cm⁻¹.

¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 1.13 (d, 6H, H_v, *J* = 6.8 Hz), 1.18 (d, 6H, H_v, *J* = 6.8 Hz), 1.49 y 1.52 (2d, 3H, H₁₁, 6.5 Hz), 1.66-1.96 (varios m, 2H, H₂), 2.52 (t, 2H, H_y, *J* = 6.0 Hz), 3.07-3.29 (varios m, 4H, H₅ + H₆), 3.48-3.71 (m, 4H, H_x + H_w), 3.77 y 3.78 (2s, 6H, *Me*-DMT), 4.03 (m, 1H, H₄), 4.16 (m, 1H, H₁), 4.40 (m, 1H, H₃), 6.11 (m, 1H, H₁₀), 6.85 (m, 4H, H_{arom}), 7.11-7.64 (varios m, 12H, H_{arom}), 7.91 (m, 1H, H_{arom}) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ 20.9 (d, C_y, *J* = 6.8 Hz), 22.4 (C₁₁), 22.5 (C₁₁), 24.96 (d, 2C_v, *J* = 7.2 Hz), 24.99 (d, 2C_v, *J* = 7.3 Hz), 37.8 (C₂), 38.2 (C₂), 44.4 (d, C_w, *J* = 11.9 Hz), 45.0 (C₆), 55.7 (2 O-CH₃), 59.7 (d, C_x, *J* = 19.2 Hz), 65.2 (C₅), 69.6 (C₁₀), 77.6 (C₃, pico de cruce HSQC), 78.9 (C₁), 79.0 (C₁), 87.0 (C₄), 87.5 (C₁₈), 114.1 (4C_g), 119.3 (CN), 125.2 (CH_{arom}), 127.8 (C_d), 128.2 (CH_{arom}), 128.8 (2C_c), 129.4

(2C_b), 129.5 (CH_{arom}), 131.4 (4C_f), 134.8 (CH_{arom}), 137.2 (C_e), 137.3 (C_e), 139.6 (C₁₂), 146.4 (C_a), 149.1 (C₁₃), 158.0 (C=O), 160.1 (2C_h) ppm.

³¹P-RMN (121.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ 148.0 ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₄₅H₅₆N₄O₁₀P [M+H]⁺: 843.3729. Encontrada: 843.3723

- Calculada para C₄₅H₅₅N₄NaO₁₀P [M+Na]⁺: 865.3548. Encontrada: 865.3541

ISÓMERO 40β-B

Aceite transparente

R_f: 0.34 (40% AcOEt/Hexano)

IR (NaCl): ν 3363, 2933, 2253, 1729, 1509, 1250, 1179, 1034 cm⁻¹.

¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 1.08 (d, 6H, H_v, *J* = 6.8 Hz), 1.19 (d, 6H, H_v, *J* = 6.8 Hz), 1.50 y 1.53 (2d, 3H, H₁₁, *J* = 6.4 Hz), 1.70-1.95 (varios m, 2H, H₂), 2.68 (t, 2H, H_y, *J* = 5.9 Hz), 3.08-3.41 (varios m, 4H, H₅ + H₆), 3.60 (m, 2H, H_w), 3.78 y 3.79 (2s, 6H, *Me*-DMT), 3.78 (m, 2H, H_x), 4.01 (m, 1H, H₄), 4.18 (m, 1H, H₁), 4.41 (m, 1H, H₃), 6.12 (m, 1H, H₁₀), 6.85 (m, 4H, H_{arom}), 7.18-7.63 (varios m, 12H, H_{arom}), 7.93 (m, 1H, H_{arom}) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ 20.9 (d, C_y, *J* = 6.6 Hz), 22.4 (C₁₁), 22.5 (C₁₁), 24.9 (d, 2C_v, *J* = 7.7 Hz), 25.0 (d, 2C_v, *J* = 7.3 Hz), 38.0 (C₂), 38.2 (C₂), 44.4 (d, C_w, *J* = 12.6 Hz), 45.0 (C₆), 45.3 (C₆), 55.7 (2 O-CH₃), 59.7 (d, C_x, *J* = 19.1 Hz), 65.2 (C₅), 65.3 (C₅), 69.6 (C₁₀), 77.0 (C₃, pico de cruce HSQC), 78.86 (C₁), 78.94 (C₁), 86.8 (d, C₄, *J* = 5.5 Hz), 87.5 (C₁₈), 114.1 (4C_g), 119.5 (CN), 125.2 (CH_{arom}), 127.8 (C_d), 128.18 (CH_{arom}), 128.23 (CH_{arom}), 128.8 (2C_c), 129.4 (2C_b), 129.5 (CH_{arom}), 131.3 (4C_f), 134.8 (CH_{arom}), 137.17 (C_e), 137.21 (C_e), 137.3 (C_e), 139.8 (C₁₂), 146.4 (C_a), 149.0 (C₁₃), 157.9 (C=O), 160.1 (2C_h) ppm.

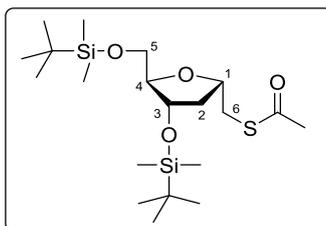
³¹P-RMN (121.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ 147.6 ppm.

Parte Experimental -----

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₄₅H₅₆N₄O₁₀P [M+H]⁺: 843.3729. Encontrada: 843.3732
- Calculada para C₄₅H₅₅N₄NaO₁₀P [M+Na]⁺: 865.3548. Encontrada: 865.3541

1 α -(Acetiltiometil)-3,5-bis-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)-1,2-didesoxi-D-ribofuranosa (41 α)



Aceite amarillo

R_f: 0.63 (20% AcOEt/Hexano)

Fórmula molecular: C₂₀H₄₂O₄SSi₂

Masa Molecular: 434.78 g/mol

IR (NaCl): ν 2954, 1697, 1257, 1109, 626 cm⁻¹.

¹H-RMN (300.13 MHz, CDCl₃): δ 0.03 (s, 3H, Si-*Me*), 0.04 (s, 3H, Si-*Me*), 0.06 (s, 6H, Si-*Me*), 0.87 (s, 18H, Si-*t*Bu), 1.72 (dt, 1H, H₂, $J = 13.0$, 4.2 Hz), 2.21 (ddd, 1H, H₂, $J = 13.2$, 7.3, 6.0 Hz), 2.33 (s, 3H, CO-*Me*), 3.12 (dd, 1H, H₆, $J = 13.6$, 5.6 Hz), 3.19 (dd, 1H, H₆, $J = 13.5$, 7.4 Hz), 3.48 (dd, 1H, H₅, $J = 10.8$, 5.6 Hz), 3.60 (dd, 1H, H₅, $J = 10.9$, 3.8 Hz), 3.89 (m, 1H, H₄), 4.15 (m, 1H, H₁), 4.34 (dt, 1H, H₃, $J = 6.3$, 3.4 Hz) ppm.

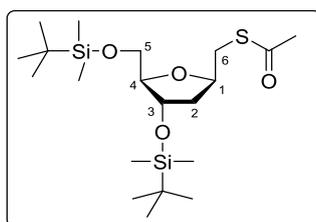
¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): δ -5.3 (Si-CH₃), -5.2 (Si-CH₃), -4.7 (Si-CH₃), -4.6 (Si-CH₃), 18.1 (SiCMe₃), 18.5 (SiCMe₃), 25.9 (^tBu-CH₃), 26.1 (^tBu-CH₃), 30.7 (CO-CH₃), 34.9 (C₆), 39.9 (C₂), 63.6 (C₅), 73.7 (C₃), 78.0 (C₁), 87.2 (C₄), 195.7 (C=O) ppm.

EMAR (ESI⁺, m/z):

- Calculada para C₂₀H₄₃O₄SSi₂ [M+H]⁺: 435.2415. Encontrada: 435.2413
- Calculada para C₂₀H₄₂NaO₄SSi₂ [M+Na]⁺: 457.2235. Encontrada: 457.2241
- Calculada para C₂₀H₄₂KO₄SSi₂ [M+K]⁺: 473.1974. Encontrada: 473.1971

Parte Experimental -----

1 β -(Acetiltiometil)-3,5-bis-O-(*tert*-butildimetilsilil)-1,2-didesoxi-D-ribofuranosa (41 β)



Aceite amarillo

R_f: 0.75 (20% AcOEt/Hexano)

Fórmula molecular: C₂₀H₄₂O₄SSi₂

Masa Molecular: 434.78 g/mol

IR (NaCl): ν 2955, 1961, 1255, 1108, 626 cm⁻¹.

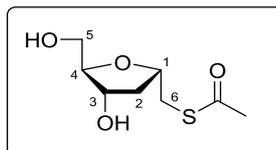
¹H-RMN (300.13 MHz, CDCl₃): δ 0.05 (s, 12H, Si-*Me*), 0.87 (s, 9H, Si-*t*Bu), 0.89 (s, 9H, Si-*t*Bu), 1.67 (ddd, 1H, H₂, $J = 12.6, 9.6, 5.6$ Hz), 1.85 (ddd, 1H, H₂, $J = 12.6, 5.5, 2.2$ Hz), 2.34 (s, 3H, CO-*Me*), 2.98 (dd, 1H, H₆, $J = 13.6, 6.5$ Hz), 3.18 (dd, 1H, H₆, $J = 13.6, 4.8$ Hz), 3.45 (dd, 1H, H₅, $J = 10.7, 6.1$ Hz), 3.61 (dd, 1H, H₅, $J = 10.8, 4.0$ Hz), 3.79 (m, 1H, H₄), 4.28 (m, 2H, H₁ + H₃) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): δ -5.3 (Si-CH₃), -5.2 (Si-CH₃), -4.60 (Si-CH₃), -4.55 (Si-CH₃), 18.1 (SiCMe₃), 18.5 (SiCMe₃), 25.9 (*t*Bu-CH₃), 26.1 (*t*Bu-CH₃), 30.7 (CO-CH₃), 33.8 (C₆), 40.1 (C₂), 63.7 (C₅), 74.1 (C₃), 77.1 (C₁), 88.0 (C₄), 195.6 (C=O) ppm.

EMAR (ESI⁺, m/z):

- Calculada para C₂₀H₄₃O₄SSi₂ [M+H]⁺: 435.2415. Encontrada: 435.2416
- Calculada para C₂₀H₄₂NaO₄SSi₂ [M+Na]⁺: 457.2235. Encontrada: 457.2235
- Calculada para C₂₀H₄₂KO₄SSi₂ [M+K]⁺: 473.1974. Encontrada: 473.1974

1 α -(Acetiltiometil)-1,2-didesoxi-D-ribofuranosa (42 α)



Aceite transparente

R_f: 0.47 (10% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₈H₁₄O₄S

Masa Molecular: 206.26 g/mol

IR (NaCl): ν 3374, 2931, 1692, 629 cm⁻¹.

¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 1.71 (ddd, 1H, H₂, *J* = 12.7, 6.7, 5.7 Hz), 2.30 (m, 1H, H₂), 2.33 (s, 3H, CO-*Me*), 3.10 (dd, 1H, H₆, *J* = 13.6, 5.9 Hz), 3.20 (dd, 1H, H₆, *J* = 13.6, 6.4 Hz), 3.51 (dd, 1H, H₅, *J* = 11.8, 5.1 Hz), 3.59 (dd, 1H, H₅, *J* = 11.8, 3.9 Hz) 3.82 (q, 1H, H₄, *J* = 4.0 Hz), 4.16 (m, 1H, H₁), 4.21 (m, 1H, H₃) ppm.

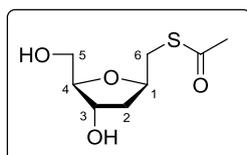
¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ 30.4 (CO-CH₃), 35.2 (C₆), 40.4 (C₂), 63.3 (C₅), 73.3 (C₃), 78.4 (C₁), 87.4 (C₄), 197.0 (C=O) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₈H₁₅O₄S [M+H]⁺: 207.0686. Encontrada: 207.0688
- Calculada para C₈H₁₄NaO₄S [M+Na]⁺: 229.0505. Encontrada: 229.0506
- Calculada para C₈H₁₄KO₄S [M+K]⁺: 245.0244. Encontrada: 245.0245

Parte Experimental -----

1 β -(Acetiltiometil)-1,2-didesoxi-D-ribofuranosa (42 β)



Aceite transparente

R_f: 0.47 (10% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₈H₁₄O₄S

Masa Molecular: 206.26 g/mol

IR (NaCl): ν 3390, 2930, 1691, 630 cm⁻¹.

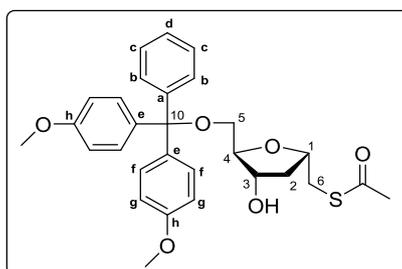
¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 1.76 (ddd, 1H, H₂, J = 13.1, 9.6, 6.1 Hz), 1.92 (ddd, 1H, H₂, J = 13.0, 5.6, 2.2 Hz), 2.33 (s, 3H, CO-*Me*), 3.10 (d, 2H, H₆, J = 5.7 Hz), 3.52 (d, 2H, H₅, J = 5.0 Hz), 3.77 (m, 1H, H₄), 4.21 (m, 2H, H₁ + H₃) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ 30.4 (CO-CH₃), 34.2 (C₆), 40.7 (C₂), 63.9 (C₅), 74.0 (C₃), 78.6 (C₁), 89.0 (C₄), 196.9 (C=O) ppm.

EMAR (ESI⁺, m/z):

- Calculada para C₈H₁₅O₄S [M+H]⁺: 207.0686. Encontrada: 207.0684
- Calculada para C₈H₁₄NaO₄S [M+Na]⁺: 229.0505. Encontrada: 229.0502
- Calculada para C₈H₁₄KO₄S [M+K]⁺: 245.0244. Encontrada: 245.0240

**1 α -(Acetiltiometil)-1,2-didesoxi-5-O-(4,4'-dimetoxitritil)-D-
ribofuranosa (43 α)**



Aceite transparente

R_f: 0.32 (40% AcOEt/Hexano)

Fórmula molecular: C₂₉H₃₂O₆S

Masa Molecular: 508.63 g/mol

IR (NaCl): ν 3413, 2929, 1692, 1508, 625 cm⁻¹.

¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 1.69 (ddd, 1H, H₂, J = 12.6, 6.9, 5.4 Hz), 2.33 (m, 1H, H₂), 2.34 (s, 3H, CO-Me), 3.12 (m, 4H, H₅ + H₆), 3.76 (s, 6H, Me-DMT), 3.98 (dt, 1H, H₄, J = 5.1, 3.9 Hz), 4.23 (m, 2H, H₁ + H₃), 6.84 (d, 4H, H_g, J = 8.9 Hz), 7.24 (m, 3H, H_c + H_d), 7.31 (d, 4H, H_f, J = 8.9 Hz), 7.44 (d, 2H, H_b, J = 7.0 Hz) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ 30.5 (CO-CH₃), 35.2 (C₆), 40.7 (C₂), 55.7 (2 O-CH₃), 65.5 (C₅), 74.2 (C₃), 78.8 (C₁), 86.6 (C₄), 87.4 (C₁₀), 114.0 (4C_g), 127.7 (C_d), 128.7 (2C_c), 129.3 (2C_b), 131.3 (4C_f), 137.3 (C_e), 137.4 (C_e), 146.5 (C_a), 160.0 (2C_h), 196.9 (C=O) ppm.

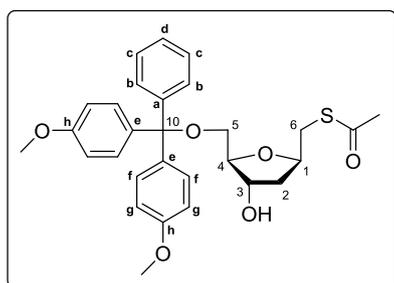
EMAR (ESI⁺, m/z):

- Calculada para C₂₉H₃₂NaO₆S [M+Na]⁺: 531.1812. Encontrada: 531.1782

- Calculada para C₂₉H₃₂KO₆S [M+K]⁺: 547.1551. Encontrada: 547.1520

Parte Experimental -----

**1 β -(Acetiltiometil)-1,2-didesoxi-5-O-(4,4'-dimetoxitritil)-D-
ribofuranosa (43 β)**



Aceite transparente

R_f: 0.29 (40% AcOEt/Hexano)

Fórmula molecular: C₂₉H₃₂O₆S

Masa Molecular: 508.63 g/mol

IR (NaCl): ν 3402, 2929, 1693, 1508, 627 cm⁻¹.

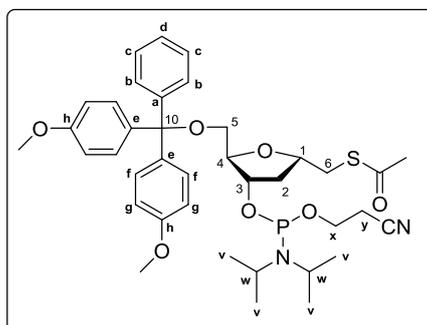
¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 1.78 (ddd, 1H, H₂, *J* = 13.0, 9.6, 5.8 Hz), 1.90 (ddd, 1H, H₂, *J* = 13.1, 5.7, 2.2 Hz), 2.29 (s, 3H, CO-Me), 3.12 (m, 4H, H₅+ H₆), 3.76 (s, 6H, Me-DMT), 3.90 (m, 1H, H₄), 4.22 (m, 1H, H₃), 4.29 (dq, 1H, H₁, *J* = 11.0, 5.6 Hz), 6.84 (d, 4H, H_g, *J* = 8.9 Hz), 7.22 (m, 3H, H_c + H_d), 7.33 (d, 4H, H_f, *J* = 8.9 Hz), 7.46 (d, 2H, H_b, *J* = 7.0 Hz) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ 30.5 (CO-CH₃), 34.3 (C₆), 40.4 (C₂), 55.7 (2 O-CH₃), 65.6 (C₅), 74.5 (C₃), 78.5 (C₁), 87.4 (C₁₀), 87.8 (C₄), 114.0 (4C_g), 127.2 (C_d), 128.7 (2C_c), 129.4 (2C_b), 131.3 (4C_f), 137.3 (C_e), 137.4 (C_e), 146.5 (C_a), 160.1 (2C_h), 196.7 (C=O) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₂₉H₃₂NaO₆S [M+Na]⁺: 531.1812. Encontrada: 531.1808
- Calculada para C₂₉H₃₂KO₆S [M+K]⁺: 547.1551. Encontrada: 547.1547

1 α -(Acetiltiometil)-1,2-didesoxi-5-O-(4,4'-dimetoxitritil)-D-ribofuranosil-3-O-(2-cianoetil-N,N-diisopropilamino)fosforamidito (44 α)



Fórmula molecular: C₃₈H₄₉N₂O₇PS

Masa Molecular: 708.85 g/mol

ISÓMERO 44 α -A

Aceite amarillento

R_f: 0.48 (40% AcOEt/Hexano)

IR (NaCl): ν 2965, 2226, 1961, 1509, 1179, 1034, 590 cm⁻¹.

¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 1.15 (d, 6H, H_v, *J* = 6.9 Hz), 1.18 (d, 6H, H_v, *J* = 6.9 Hz), 1.84 (m, 1H, H₂), 2.34 (s, 3H, CO-*Me*), 2.37 (m, 1H, H₂), 2.51 (t, 2H, H_y, *J* = 6.0 Hz), 3.04-3.26 (varios m, 4H, H₅ + H₆), 3.62 (m, 4H, H_w + H_x), 3.78 (s, 6H, *Me*-DMT), 4.12 (m, 1H, H₄), 4.27 (m, 1H, H₁), 4.47 (m, 1H, H₃), 6.86 (d, 4H, H_g, *J* = 8.9 Hz), 7.25 (m, 3H, H_c + H_d), 7.31 (d, 4H, H_f, *J* = 8.9 Hz), 7.44 (d, 2H, H_b, *J* = 7.0 Hz) ppm.

³¹P-RMN (121.5 MHz, MeOH- *d*₄): δ 148.13 ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₃₈H₅₀N₂O₇PS [M+H]⁺: 709.3071. Encontrada: 709.3063

Parte Experimental -----

- Calculada para $C_{38}H_{49}N_2NaO_7PS$ $[M+Na]^+$: 731.2890.
Encontrada: 731.2884

MEZCLA DE ISÓMEROS 44 α -A Y 44 α -B

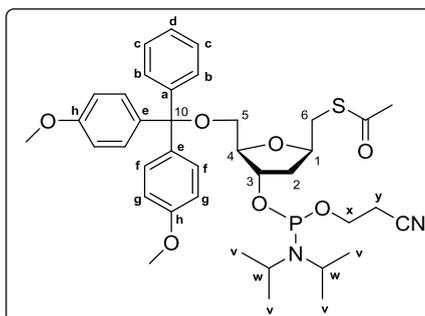
Aceite amarillento

R_f: 0.48, 0.44 (40% AcOEt/Hexano)

IR (NaCl): ν 2967, 2231, 1970, 1509, 1178, 1033, 587 cm^{-1} .

³¹P-RMN (121.5 MHz, MeOH- d_4): δ 148.0, 148.1 ppm.

**1 β -(Acetiltiometil)-1,2-didesoxi-5-*O*-(4,4'-dimetoxitritil)-*D*-
ribofuranosil-3-*O*-(2-cianoetil-*N,N*-diisopropilamino)fosforamidito
(44 β)**



Fórmula molecular: C₃₈H₄₉N₂O₇PS

Masa Molecular: 708.85 g/mol

ISÓMERO 44 β -A

Aceite amarillento

R_f: 0.65 (40% AcOEt/Hexano)

IR (NaCl): ν 2967, 2254, 1722, 1509, 1178, 1033, 583 cm⁻¹.

¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 1.15 (d, 6H, H_v, *J* = 6.8 Hz), 1.18 (d, 6H, H_v, *J* = 6.8 Hz), 1.87 (m, 1H, H₂), 2.01 (m, 1H, H₂), 2.30 (s, 3H, CO-*Me*), 2.52 (t, 2H, H_y, *J* = 5.9 Hz), 3.16 (m, 4H, H₅ + H₆), 3.62 (m, H_w + H_x), 3.78 (s, 6H, *Me*-DMT), 4.02 (m, 1H, H₄), 4.30 (m, 1H, H₁), 4.45 (m, 1H, H₃), 6.86 (d, 4H, H_g, *J* = 8.9 Hz), 7.26 (m, 3H, H_c + H_d), 7.33 (d, 4H, H_f, *J* = 8.9 Hz), 7.46 (d, 2H, H_b, *J* = 7.0 Hz) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ 20.9 (d, C_y, *J* = 7.2 Hz), 24.9 (d, C_v, *J* = 7.4 Hz), 25.0 (d, C_v, *J* = 7.4 Hz), 30.5 (CO-CH₃), 34.1 (C₆), 39.7 (d, C₂, *J* = 4.3 Hz), 44.4 (d, 2C_w, *J* = 12.6 Hz), 55.7 (2 O-CH₃), 59.7 (d, C_x, *J* = 18.4 Hz), 64.9 (C₅), 76.3 (d, C₃, *J* = 16.8 Hz), 78.7 (C₁), 87.1 (d, C₄, *J* = 4.6 Hz), 87.4 (C₁₀), 114.1 (4C_g), 119.3 (CN), 127.8 (C_d), 128.8 (2C_c), 129.4 (2C_b), 131.4 (4C_f), 137.3 (C_e), 137.4 (C_e), 146.5 (C_a), 160.1 (2C_h), 196.7 (C=O) ppm.

Parte Experimental -----

³¹P-RMN (121.5 MHz, MeOH-*d*₄): 148.0 ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₃₈H₅₀N₂O₇PS [M+H]⁺: 709.307. Encontrada: 709.3079
- Calculada para C₃₈H₄₉N₂NaO₇PS [M+Na]⁺: 731.2890. Encontrada: 731.2899
- Calculada para C₃₈H₄₉N₂KO₇PS [M+K]⁺: 747.2630. Encontrada: 747.2642

ISÓMERO 44β-B

Aceite amarillento

R_f: 0.58 (40% AcOEt/Hexano)

IR (NaCl): ν 2966, 2253, 1963, 1509, 1178, 1035, 588 cm⁻¹.

¹H-RMN (300.13 MHz, MeOH-*d*₄): δ 1.08 (d, 6H, H_v, *J* = 6.8 Hz), 1.18 (d, 6H, H_v, *J* = 6.8 Hz), 1.87 (m, 1H, H₂, *J* = 13.1, 9.3, 5.9 Hz), 2.12 (m, 1H, H₂, *J* = 12.0, 5.2, 2.0 Hz), 2.31 (s, 3H, CO-*Me*), 2.69 (t, 2H, H_y, *J* = 5.9 Hz), 3.16 (m, 4H, H₅ + H₆), 3.59 (m, 2H, H_w), 3.79 (s, 6H, *Me*-DMT), 3.80 (m, 2H, H_x), 4.00 (m, 1H, H₄), 4.31 (m, 1H, H₁), 4.44 (m, 1H, H₃), 6.87 (d, 4H, H_g, *J* = 8.9 Hz), 7.26 (m, 3H, H_c + H_d), 7.34 (d, 4H, H_f, *J* = 8.9 Hz), 7.47 (d, 2H, H_b, *J* = 7.0 Hz) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOH-*d*₄): δ 20.9 (d, C_y, *J* = 6.9 Hz), 24.97 (d, C_v, *J* = 7.2 Hz), 25.01 (d, C_v, *J* = 7.0 Hz), 30.5 (CO-CH₃), 34.1 (C₆), 39.7 (d, C₂, *J* = 3.1 Hz), 44.4 (d, 2C_w, *J* = 12.4 Hz), 55.7 (2 O-CH₃), 59.8 (d, C_x, *J* = 19.1 Hz), 65.1 (C₅), 76.7 (d, C₃, *J* = 16.5 Hz), 78.6 (C₁), 86.9 (d, C₄, *J* = 5.4 Hz), 87.4 (C₁₀), 114.1 (4C_g), 119.4 (CN), 127.8 (C_d), 128.7 (2C_c), 129.4 (2C_b), 131.4 (4C_f), 137.2 (C_e), 137.3 (C_e), 146.5 (C_a), 160.1 (2C_h), 196.8 (C=O) ppm.

³¹P-RMN (121.5 MHz, MeOH-*d*₄): 147.7 ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

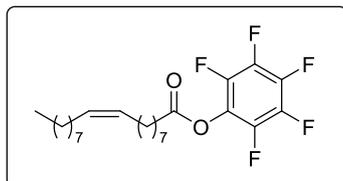
- Calculada para C₃₈H₅₀N₂O₇PS [M+H]⁺: 709.3071. Encontrada: 709.3085

----- *Capítulo 3*

- Calculada para $C_{38}H_{49}N_2NaO_7PS$ $[M+Na]^+$: 731.2890.
Encontrada: 731.2905
- Calculada para $C_{38}H_{49}N_2KO_7PS$ $[M+K]^+$: 747.2630. Encontrada:
747.2661

Parte Experimental -----

Oleato de pentafluorofenilo (51)



Aceite amarillento

Fórmula molecular: $C_{24}H_{33}F_5O_2$

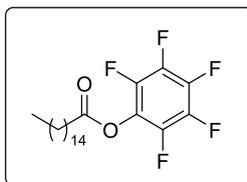
Masa Molecular: 448.51 g/mol

1H -RMN (400.13 MHz, $CDCl_3$): δ 0.86 (t, 3H, Me, $J = 7.0$ Hz), 1.21-1.44 (m, 20H, $(CH_2)_n$), 1.82-1.70 (m, 2H, CH_2CH_2CO), 2.01 (m, 4H, $CH_2CH=CHCH_2$), 2.64 (t, 2H, CH_2CO , $J = 7.4$ Hz), 5.34 (m, 2H, $CH=CH$) ppm.

^{13}C -RMN (100.6 MHz, $CDCl_3$): δ 14.0 (CH_3), 22.6 (CH_2), 24.7 (CH_2), 27.1(CH_2), 27.2 (CH_2), 28.8 (CH_2), 28.9 (CH_2), 29.0 (CH_2), 29.3 (CH_2), 29.5 (CH_2), 29.6 (CH_2), 29.7 (CH_2), 31.9 ($COCH_2$), 33.3 ($CH_2CH=CH$), 129.6 ($CH=CH$), 130.0 ($CH=CH$), 136.5 (C_{arom}), 138.0 (C_{arom}), 139.0 (C_{arom}), 139.8 (C_{arom}), 140.6 (C_{arom}), 142.4 ($C_{arom}O$), 169.5 ($C=O$) ppm.

^{19}F -RMN (376.5 MHz, $CDCl_3$): δ -162.5-162.7 (m, 2F), -158.4 (t, 1F, $J = 21.6$ Hz), -152.8-153.1 (m, 2F) ppm.

Palmitato de pentafluorofenilo (52)



Sólido blanco

P_f: 43-44 °C

Fórmula molecular: C₂₂H₃₁F₅O₂

Masa Molecular: 422.47 g/mol

¹H-RMN (400.13 MHz, CDCl₃): δ 0.86 (t, 3H, Me, *J* = 6.8 Hz), 1.24 (s, 24H, (CH₂)_n), 1.75 (m, 2H, CH₂CH₂CO), 2.64 (t, 2H, CH₂CO, *J* = 7.4 Hz) ppm.

¹³C-RMN (100.6 MHz, CDCl₃): δ 14.1 (CH₃), 22.6 (CH₂), 24.7 (CH₂), 28.8 (CH₂), 29.1 (CH₂), 29.3 (CH₂), 29.4 (CH₂), 29.5 (CH₂), 29.6 (CH₂), 29.7 (CH₂), 31.9 (CH₂), 33.3 (COCH₂), 137.5-142.3 (6C_{arom}), 169.6 (C=O) ppm.

¹⁹F-RMN (376.5 MHz, CDCl₃): δ -162.5-162.7 (m, 2F), -158.3 (t, 1F, *J* = 21.6 Hz), -152.8-152.9 (m, 2F) ppm.

CAPÍTULO 4

**Síntesis y caracterización de L-nucleósidos
2'-sustituidos**

Antecedentes

1. L-Nucleósidos

Los análogos de nucleósido constituyen una familia importante de moléculas con potencial actividad antiviral y antitumoral. Un amplio grupo de estas estructuras miméticas es el formado por los L-nucleósidos, imágenes especulares no superponibles de los D-nucleósidos, en las que todos los estereocentros tienen una configuración invertida, es decir, son enantiómeros de los nucleósidos naturales.

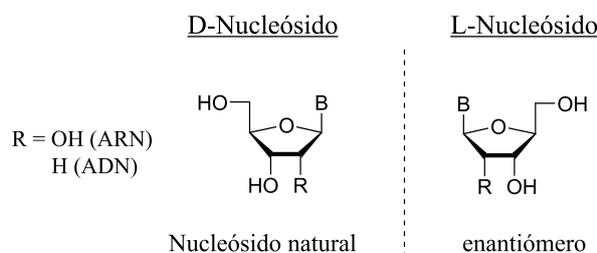


Figura 43. D y L-nucleósidos.

Durante un largo período de tiempo, se asumió que solo los análogos nucleosídicos con una configuración D, como los naturales, podrían exhibir actividad biológica debido a la estereoespecificidad que se suponía poseían las enzimas en los sistemas vivos. Sin embargo, a principios de los años 90, esta suposición fue reevaluada²⁴⁴ y los derivados de L-nucleósidos emergieron como una nueva clase de agentes terapéuticos.

²⁴⁴ F. Focher, S. Spadari, G. Maga. *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* **2003**, 3, 41-53.

Antecedentes -----

Aunque la síntesis del primer L-nucleósido se remonta a 1964,²⁴⁵ se prestó poca atención a este grupo de derivados hasta 1992 con el descubrimiento de la lamivudina (3TC, Figura 44),²⁴⁶ utilizada para el tratamiento del VIH tipo 1 y 2, y del VHB. Desde entonces, el descubrimiento de que varios virus podían aceptar L-nucleósidos como sustratos para su propia replicación, provocando el final de la síntesis de ADN, ha promovido la preparación y evaluación de un gran número de L-nucleósidos. Entre las características de este tipo de compuestos destacan: su actividad biológica comparable, incluso mayor en algunos casos, a los enantiómeros D; perfiles toxicológicos más favorables, y una mayor estabilidad metabólica.²⁴⁷

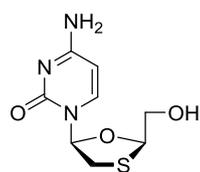
Numerosos L-nucleósidos han mostrado gran actividad como agentes antivirales. Al igual que la lamivudina, su análogo 5-fluoro, la emtricitabina (β -L-2',3'-didesoxi-3'-tia-5-fluorocitidina, FTC, Figura 44) es un fármaco aprobado para el tratamiento de infecciones por VIH. De la misma manera, los análogos de β -timidina, telbivudina y clevudina, son dos fármacos antivirales aprobados contra el VHB. El maribavir, otro L-nucleósido, ha exhibido actividad contra el citomegalovirus y, en la fase III de ensayos clínicos, ha mostrado una mayor eficacia que la terapia antiviral convencional en pacientes receptores de trasplantes con infección por citomegalovirus, por lo que actualmente se encuentra en trámites para su aprobación por la FDA.²⁴⁸

²⁴⁵ a) J. Smejkal, F. Sorm. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1964**, 29, 2809-2813; b) E. M. Acton, K. J. Ryan, L. Goodman. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 86, 5352-5354.

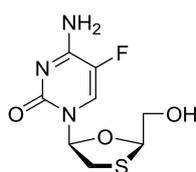
²⁴⁶ a) R. F. Schinazi, C. K. Chu, A. Peck, A. McMillan, S. Mathis, D. Cannon, L. S. Jeong, J. W. Beach, W. B. Choi, S. Yeola, et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1992**, 36, 672-676; b) J. M. Cameron, P. Collins, M. Daniel, R. Storer. *Drugs Fut.* **1993**, 18, 319-323.

²⁴⁷ C. Mathe, G. Gosselin. *Antivir. Res.* **2006**, 71, 276-281.

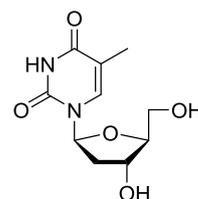
²⁴⁸ [takeda.com/Newsroom/ News Releases](https://www.fda.gov/newsroom/news-releases). 21/07/2021.



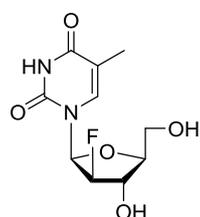
Lamivudina, 3TC
(VIH y VHB)



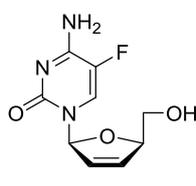
Emtricitabina, FTC
(VIH)



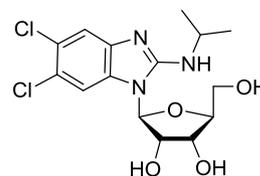
Telbivudina, LdT
(VHB)



Clevudina, L-FMAU
(VHB)



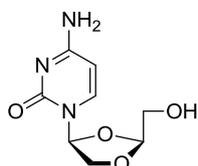
Elvicitabina, L-d4FC
(VHB)



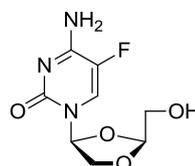
Maribavir
(Citomegalovirus)

Figura 44. Algunos L-nucleósidos antivirales comercializados (3TC, FTC, LdT y L-FMAU) o en fase de estudio.

Además, los derivados de L-nucleósidos son prometedores agentes anticancerígenos. La troxacitabina (Figura 45) constituye el primer compuesto con isomería L que ha mostrado actividad contra tumores sólidos y leucemia. Otro ejemplo es su análogo 5-fluoro, la 5-fluorotroxacitabina, que ha exhibido actividad *in vitro* contra la leucemia mieloide aguda.²⁴⁹



Troxacitabina, TRX



5-Fluorotroxacitabina, 5FTRX

Figura 45. L-nucleósidos antitumorales.

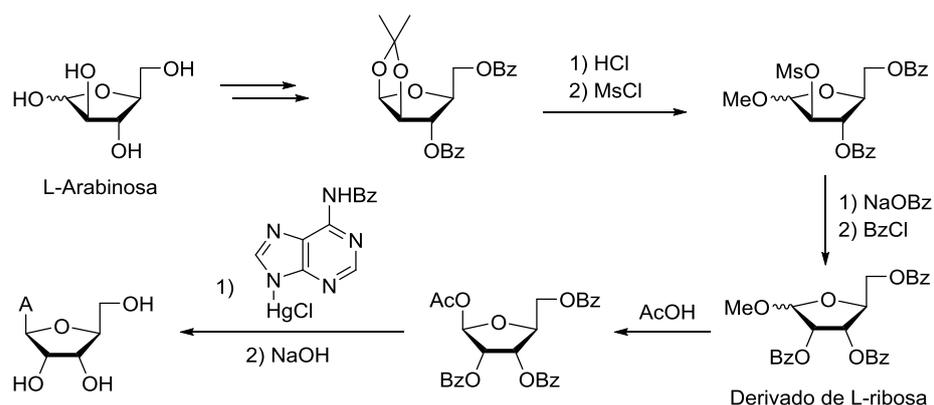
²⁴⁹ A. Bankar, T. P. Siriwardena, B. Rzoska, C. Rydergard, H. Kylefjord, V. Rrakli, A. Eneroth, P. Pinho, S. Norin, J. Bylund. *Haematologica* **2021**, *106*, 754-579.

Antecedentes -----

Estos derivados se pueden sintetizar por métodos químicos tradicionales (glicosilaciones de Hilbert-Johnson o de Vorbrüggen, o síntesis *de novo*) a partir de L-ribosa o L-desoxirribosa, cuya preparación es posible a partir de otros azúcares disponibles en la naturaleza como L-arabinosa, L-xilosa, D-glucosa, D-ribosa, etc.²⁵⁰ A continuación, se presentan algunos de los métodos recogidos en la bibliografía clasificados en función del azúcar de partida.

1.1. Síntesis a partir de L-arabinosa

La mayoría de las síntesis descritas para análogos L comienzan con L-arabinosa, el L-azúcar más fácilmente disponible y componente natural de la hemicelulosa y la pectina. En los primeros métodos recogidos en la bibliografía,²⁴⁵ este azúcar se transforma en un derivado de L-ribosa, que tras una glicosilación con una sal de mercurio(II) permite acceder al análogo nucleosídico correspondiente (Esquema 86).

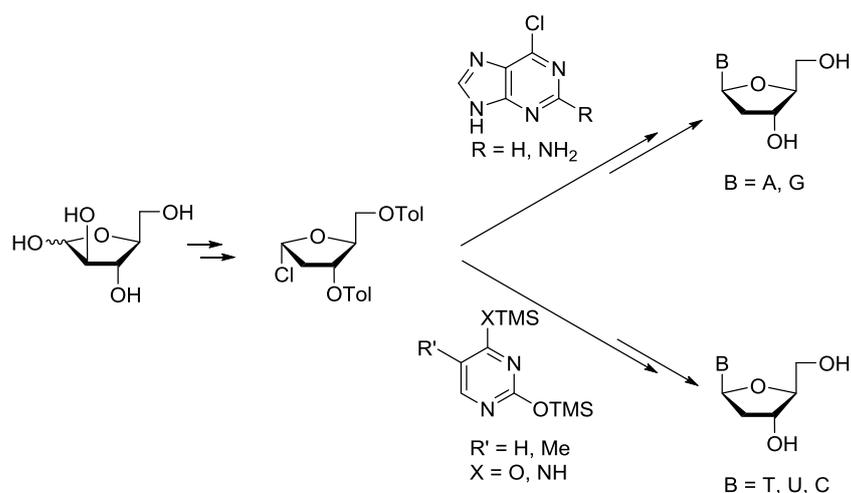


Esquema 86. Síntesis de L-adenosina.

Asimismo, a partir de una reacción de Hilbert-Johnson entre la α -cloro-3,5-di-*O*-toluoil-L-desoxirribosa y una base heterocíclica adecuada

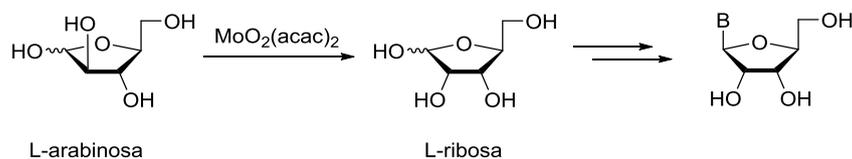
²⁵⁰ D. Perrone, M. L. Capobianco. *L-Nucleosides*. In: *Chemical Synthesis of Nucleoside Analogues*, P. Merino. Ed.; Wiley: Hoboken, 2013.

(Esquema 87) se ha desarrollado una síntesis estereoselectiva²⁵¹ para la preparación de distintos 2'-desoxi-L-nucleósidos.



Esquema 87

A partir de la L-arabinosa también se han sintetizado L-ribonucleósidos con las cuatro bases naturales mediante la epimerización del C-2 utilizando acetilacetato de molibdeno (Esquema 88).²⁵² La reacción del azúcar de partida con el complejo de molibdeno origina una mezcla de L-arabinosa/L-ribosa, de la que se puede aislar la L-ribosa que, una vez benzoylada y acetilada, se acopla con las bases adecuadamente protegidas para dar predominantemente el β-L-nucleósido.



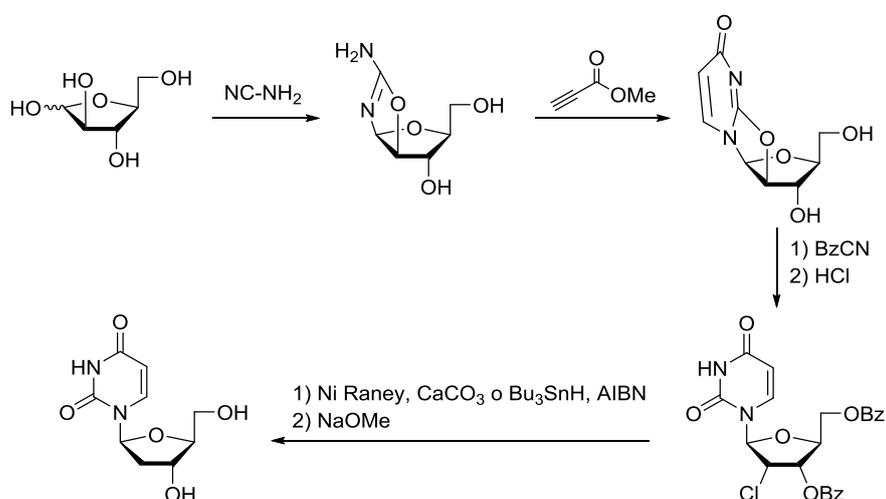
Esquema 88

²⁵¹ S. Fujimori, N. Iwanami, Y. Hashimoto, K. Shudo. *Nucleosides Nucleotides* **1992**, *11*, 341-349.

²⁵² Y. Abe, T. Takizawa, T. Kunieda. *Chem. Pharm. Bull.* **1980**, *28*, 1324-1326.

Antecedentes -----

Además de reacciones de condensación, también se han desarrollado estrategias *de novo* basadas en la construcción del anillo de uracilo directamente sobre el azúcar a partir de la L-arabinosa (método de Holy).²⁵³ El tratamiento de este azúcar con cianamida proporciona la correspondiente 2-amino-1,2-oxazolina, que tras la reacción con propiolato de metilo da lugar a la anhidrouridina (Esquema 89). Para favorecer una hidrólisis más limpia del enlace anhidro, los grupos hidroxilo se protegen como benzoatos, y la apertura se lleva a cabo con HCl. Posteriormente, el derivado de cloro resultante se reduce con Bu_3SnH y el nucleósido protegido se hidroliza para dar la L-desoxiuridina.



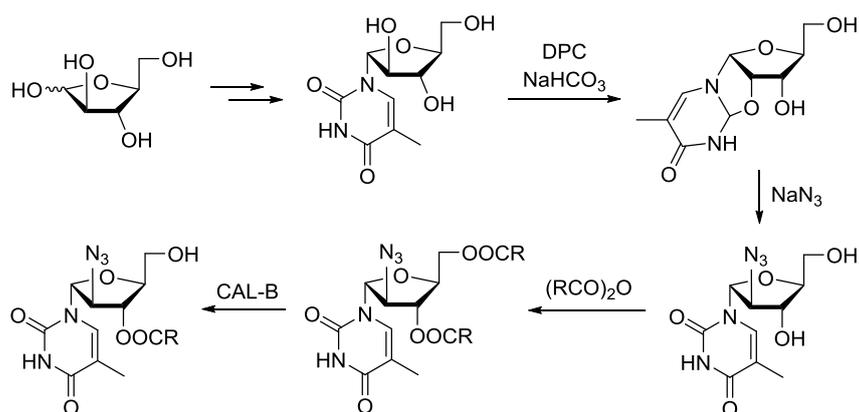
Esquema 89

Por otra parte, se ha utilizado la catálisis enzimática para acceder a derivados de L-nucleósidos protegidos regioselectivamente (Esquema 90).²⁵⁴ La L- α -arabinofuranosiltimidina se transforma en el derivado anhidro, que por tratamiento con NaN_3 da lugar al 2'-azidonucleósido. Posteriormente, se lleva a cabo la hidrólisis del correspondiente diéster

²⁵³ A. Holy. *Coll. Czech. Chem. Commun.* **1972**, *37*, 4072-4087.

²⁵⁴ D. Sharma, A. Khandelwal, R. K. Sharma, S. Bhatia, L. C. Reddy, C. E. Olsen, J. Wengel, V. S. Parmar, A. K. Prasad. *Indian J. Chem.* **2009**, *48B*, 1712-1720.

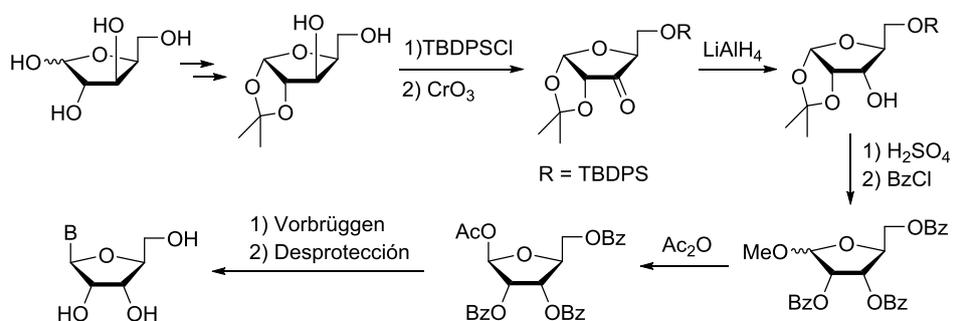
catalizada por la lipasa de *Candida antarctica* B (CAL-B), obteniéndose el derivado con el hidroxilo primario libre.



Esquema 90

1.2. Síntesis a partir de L-xilosa

Al igual que la L-arabinosa, otro epímero de la L-ribosa, la L-xilosa, ha sido empleado ampliamente para preparar L-nucleósidos, aunque el principal inconveniente es su elevado precio. Un ejemplo es el que se muestra en el Esquema 91,²⁵⁵ donde, mediante un procedimiento de oxidoreducción, la L-xilosa se transforma en un derivado de L-ribosa, que tras su acetólisis y glicosilación origina los L-nucleósidos.



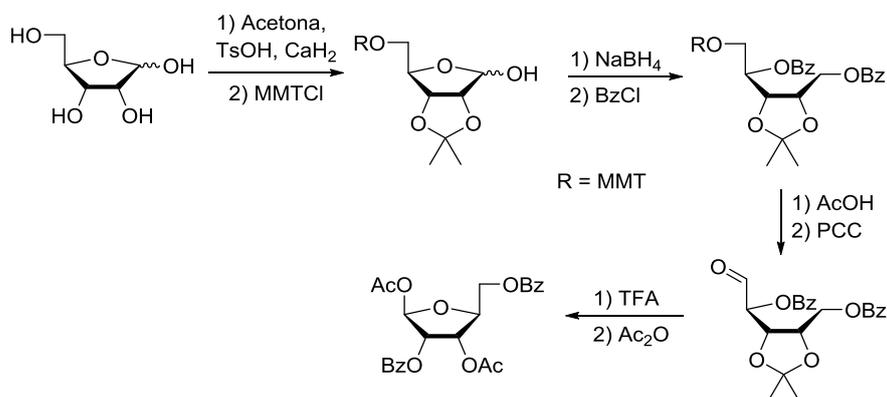
Esquema 91

²⁵⁵ E. Moyroud, P. Strazewski. *Tetrahedron* **1999**, 55, 1277-1284.

1.3. Síntesis a partir de D-ribosa y D-glucosa

También se han obtenido derivados de L-ribosa a partir de azúcares naturales con configuración D como la glucosa o la ribosa. A continuación, se muestra un ejemplo de cada uno de ellos.

A partir de la D-ribosa²⁵⁶ se puede obtener un derivado de L-ribosa que permite la obtención de L-nucleósidos (Esquema 92). En primer lugar, se bloquean el hidroxilo primario y el 3,4-diol de la D-ribosa, después se reduce el hemiacetal y se protegen los hidroxilos como benzoílos. A continuación, se genera el correspondiente aldehído en la posición 5', que, tras la desprotección del 3,4-diol con ácido trifluoroacético, forma un enlace hemiacetal con uno de los grupos hidroxilo liberados. Finalmente, la protección con anhídrido acético da lugar al derivado de L-ribosa.



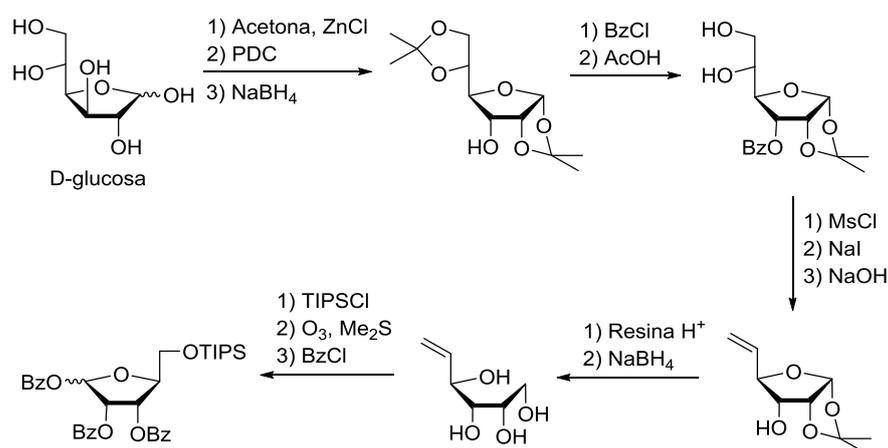
Esquema 92. Obtención de un derivado de L-ribosa a partir de D-ribosa.

Como en el caso anterior, un azúcar de bajo precio, la D-glucosa,²⁵⁷ se puede transformar en un derivado de la L-ribosa (Esquema 93). Para ello, se sintetiza el derivado de alofuranosa diacetálico, que después de la

²⁵⁶ G. G. Sivets, T. V. Klennitskaya, E. V. Zhernosek, I. A. Mikhailopulo. *Synthesis* **2002**, 253-259.

²⁵⁷ S. Pitsch. *Helv. Chim. Acta* **1997**, 80, 2286-2314.

benzoilación y la desprotección selectiva del acetal primario da lugar al correspondiente diol. Este compuesto se transforma en el di-*O*-mesilato, que por tratamiento con NaI proporciona el correspondiente alqueno. La hidrólisis ácida del acetal, seguida de la reducción del hemiacetal resultante, da lugar a hexenitol, cuyo OH primario se protege selectivamente. Finalmente, la ozonólisis reductiva de ese intermedio y su benzoilación, conduce a una mezcla α/β de derivados de L-ribosa.



Esquema 93. Obtención de un derivado de L-ribosa a partir de D-glucosa.

2. L-Oligonucleótidos

Con motivo de su quiralidad, el ADN y el ARN nativos tienen enantiomeros: L-ADN y L-ARN (Figura 46). Los L-oligonucleótidos (L-ONs) tienen unas propiedades físicas idénticas a los D-ONs, en términos de solubilidad, cinética de hibridación y estabilidad térmica del dúplex, pero son completamente ortogonales al entorno estereoespecífico de la biología nativa. Por ello, los L-ONs son resistentes a la degradación por

complejos heteroquirales D-L son menos estables, lo que condiciona la utilización de L-ONs como terapias antisentido.²⁵⁹

2.1. Spiegelmers

La aplicación más exitosa de los L-oligonucleótidos es en el desarrollo de aptámeros formados completamente por enantiómeros L y denominados spiegelmers. Como ya se ha comentado en esta memoria, los aptámeros son polímeros de ácidos nucleicos que son capaces de reconocer, con alta especificidad y afinidad, distintos ligandos, y que se sintetizan mediante un método denominado SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment*). Al igual que cualquier L-ON, presentan las ventajas de poseer un esqueleto bioinerte de L-ribosa, ausencia de toxicidad e inmunogenia, además de mantener una alta especificidad con dianas nativas como péptidos, proteínas y moléculas pequeñas.

De forma muy resumida, el método SELEX²⁶⁰ (Figura 47) comienza con la síntesis de una gran librería de oligonucleótidos formada por secuencias de longitud fija con regiones aleatorias y regiones invariables de unión de cebadores. A continuación, estas secuencias se exponen al ligando diana y las que no se unen se eliminan, generalmente mediante cromatografía de afinidad. Después, las cadenas unidas se eluyen y se amplifican por PCR para un ciclo posterior. Tras el número de ciclos adecuado (normalmente 12) se lleva a cabo una secuenciación y caracterización de los aptámeros.

²⁵⁹ a) H. Urata, K. Shinohara, E. Ogura, Y. Ueda, M. Akagi. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 8174-8175; b) Y. Hashimoto, N. Iwanami, S. Fujimori, K. Shudo. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 9883-9887.

²⁶⁰ C. Tuerk, L. Gold. *Science*. **1990**, *249*, 505-510.

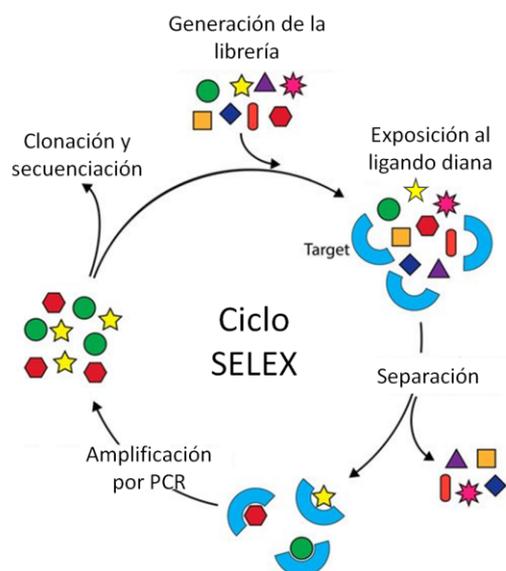


Figura 47. Método SELEX.

Teniendo en cuenta el funcionamiento del ciclo SELEX y la necesidad de enzimas que reconozcan a los oligonucleótidos, el diseño de los L-aptámeros se lleva a cabo como una selección *in vitro* de "imagen especular" (Figura 48); es decir, se estudia la imagen especular de la diana natural de interés y se selecciona el D-aptámero adecuado para ella. Por otra parte, se sintetiza el L-aptámero y se utiliza para unirse a la diana natural. Según las reglas de simetría quiral,²⁶¹ el spiegelmer debe unirse al objetivo nativo con la misma afinidad con la que el D-aptámero se une a la imagen especular.

²⁶¹ a) L. Pasteur, Recherches sur la dissymetrie moleculaire des produits organiques naturels: Leçons professées a la Societe chimique de Paris le 20 janvier et le 3 fevrier 1860, Impr. de C. Lahure, Paris, 1860; b) E. Fischer. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1894**, 27, 2985-2993.

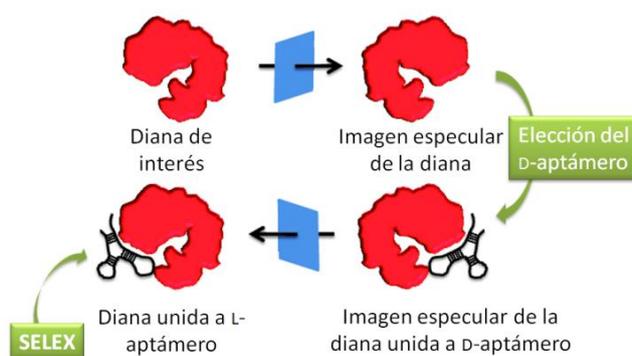


Figura 48

En la actualidad se están llevando a cabo ensayos clínicos con varias terapias de spiegelmer, y varias moléculas han completado ensayos clínicos de fase I o II.²⁶² Además, también se han utilizado en el desarrollo de bioensayos para la detección de analitos clínicamente relevantes dentro de mezclas biológicas complejas, ampliando así la utilidad de estas herramientas al diagnóstico.²⁶³

2.2. Otras aplicaciones

Las balizas moleculares (*Molecular Beacons*, MBs), descritas en el capítulo anterior, constituyen uno de los biosensores más comunes. Se han estudiado MBs formadas completamente por L-nucleótidos²⁶⁴ que han permitido detectar cambios de temperatura a tiempo real a través de la fluorescencia emitida al desnaturalizarse y perder su estructura tridimensional. También se han preparado MBs químeras formadas por

²⁶² A. Vater, S. Klussmann. *Drug Discov. Today* **2015**, 20, 147-155.

²⁶³ L. Yi, X. Wang, L. Bethge, S. Klussmann, M. G. Roper. *Analyst* **2016**, 141,1939-1946.

²⁶⁴ G. Ke, C. Wang, Y. Ge, N. Zheng, Z. Zhu, C. J. Yang. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 18908-18911.

Antecedentes ----

D- y L-ON,²⁶⁵ de manera que se combina la mayor bioestabilidad del L-ON, mientras se mantiene la capacidad de hibridación del D-ON.

Por otro lado, dada la importancia que han demostrado las nanoestructuras de ADN tanto en investigación como en medicina, los L-ADN también se están empezando a estudiar en este campo.²⁶⁶ Aunque la resistencia a la degradación por nucleasas y la menor interacción inespecífica es evidente, la imposibilidad de preparar L-ADN mediante polimerización enzimática restringe el tamaño de los bloques de construcción que se pueden obtener, limitando su utilización.

3. Oligonucleótidos 2'-modificados

La introducción de sustituyentes alquilo en los grupos hidroxilo de las posiciones 2' de los oligorribonucleótidos es una estrategia ampliamente empleada para la preparación de análogos de ARN. Esta alteración tiene como objetivo proteger la posición vulnerable y aumentar la estabilidad biológica frente a las endo y exonucleasas, enzimas que hidrolizan los enlaces fosfodiéster en regiones internas o externas, respectivamente.²⁶⁷

Estructuralmente, las modificaciones en C-2' restringen la estructura del anillo ribosídico dando lugar a dos conformaciones (Figura 49): C2'-*endo*, estructura energéticamente favorable en la forma B del ADN, y C3'-*endo*, frecuente en la forma A del ADN y en el ARN. Por ello, los nucleótidos modificados en C-2' pueden emplearse para desarrollar estructuras miméticas tanto de ADN como de ARN. La adopción de una conformación restringida confiere características únicas a estas

²⁶⁵ Y. Kim, C. J. Yang, W. Tan. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 7279-7287.

²⁶⁶ a) H. Lin, Y. Ke, Z. Li, J. H. Wang, Y. Liu, H. Yan. *Nano Lett.* **2009**, *9*, 433-436; b) C. R. Simmons, F. Zhang, T. MacCulloch, N. Fahmi, N. Stephanopoulos, Y. Liu, N. C. Seeman, H. Yan. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 11254-11260.

²⁶⁷ a) T. P. Prakash, B. Bhat. *Curr. Top. Med. Chem.* **2007**, *7*, 641-649; b) G. Zhao, J. Li, Z. Tong, B. Zhao, R. Mu, Y. Guan. *PLOS ONE* **2013**, *8*, e79415.

moléculas, como una mayor resistencia frente a las nucleasas, mejor afinidad de unión, menor toxicidad o una capacidad mejorada para identificar pares de bases no coincidentes.

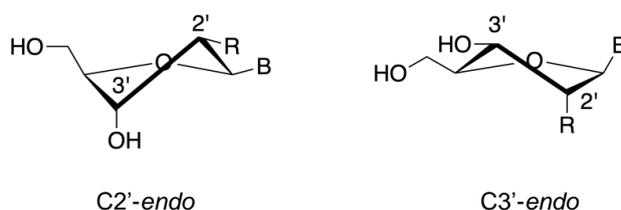


Figura 49

Aunque se han estudiado diversos sustituyentes para esta posición, los más utilizados son 2'-*O*-Me y 2'-*O*-metoxietil (2'-*O*-MOE). Se ha demostrado que la alta resistencia a las nucleasas que presentan algunos análogos depende de la carga y la hidratación, pero no del volumen del sustituyente. Sin embargo, el volumen del sustituyente sí puede influir en la velocidad de acoplamiento de los monómeros durante la síntesis del oligonucleótido.²⁶⁸

Un alto porcentaje de los oligonucleótidos comercializados (Introducción, Tabla 2) están formados por monómeros que presentan modificaciones en la posición 2'. Ejemplo de ello son los fármacos Macugen, Onpattro, Givlaari y el ARNi en fase III Inclisiran, que contienen 2'-*O*-metil-ARN, o los fármacos Kynamro, Spinraza, Tegsedí y Waylivra con 2'-*O*-MOE en su estructura.²⁶⁹

²⁶⁸ B. S. Sproat, A. I. Lamond, B. Beijer, P. Neuner, U. Ryder. *Nucleic Acids Res.* **1989**, *17*, 3373-3386.

²⁶⁹ R. Eritja. *Nucleic acids chemistry. Modifications and Conjugates for Biomedicine and Nanotechnology*; R. Eritja. Ed.; De Gruyter: Berlin/Boston, 2021.

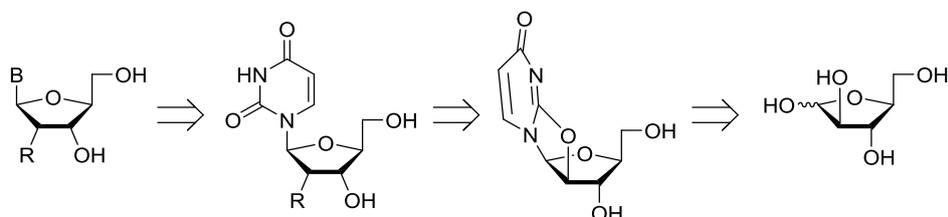
Objetivos

La importancia farmacológica de los L-nucleósidos es evidente, siendo principalmente interesantes como antivirales. De la misma manera, queda patente el enorme potencial de los L-oligonucleótidos, especialmente como aptámeros, aunque también en otros campos que se encuentran en sus primeros estadios.

Por estas razones, en el presente capítulo se plantea la preparación de L-nucleósidos, a partir de un azúcar fácilmente accesible y económico, que presenten distintos sustituyentes en la posición 2' y derivados de diferentes bases nitrogenadas. El estudio se centrará en la búsqueda de un procedimiento sintético a partir de L-arabinosa que permita obtener un abanico de análogos para su utilización posterior en estudios como antivirales y antitumorales. Asimismo, también se plantea el uso de estos derivados para la síntesis de L-oligonucleótidos con el objetivo de sintetizar oligonucleótidos de segunda generación con isomería L y estudiar la influencia que tiene la combinación de sustituyentes *O*-alquilo e isomería L en este tipo de estructuras.

Resultados y discusión

La síntesis de los derivados nucleosídicos de este capítulo se lleva a cabo a través de una estrategia que se basa en la apertura de un anhidronucleósido sintetizado a partir de la L-arabinosa, un azúcar disponible en la naturaleza (Esquema 94). El punto central de esta ruta sintética es la $O^{2,2'}$ -anhidro-L-uridina, ya que debido a su susceptibilidad a la sustitución S_N2 con una amplia variedad de nucleófilos permite acceder a los derivados de uridina sustituidos en la posición 2', cuya posterior transformación de la base dará lugar a otros análogos.



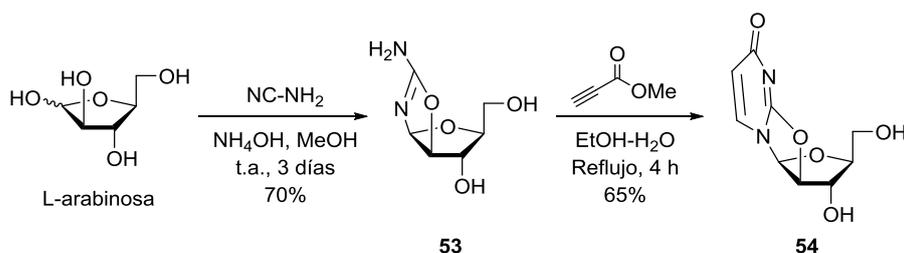
Esquema 94. Retrosíntesis de L-nucleósidos.

El procedimiento sintético propuesto para cada 2'-derivado constará de tres etapas fundamentales: la preparación de anhidrouridina a partir de L-arabinosa; una apertura del anillo con los agentes nucleofílicos, que proporcionarán la L-uridina con diferentes sustituyentes en la posición 2', y una última etapa en la que el anillo de uracilo se transformará en otras bases pirimidínicas.

1. Síntesis de $O^{2,2'}$ -anhidro-L-uridina

El sustrato de partida para la síntesis de los L-nucleósidos es la L-arabinosa (Esquema 95), un azúcar disponible de forma natural, epímero de la L-ribosa objetivo, con la isomería adecuada para obtener los compuestos de interés y que se ha utilizado con anterioridad en la preparación de derivados nucleosídicos.

La formación de la $O^{2,2'}$ -anhidro-L-uridina se lleva a cabo según las condiciones de Holy,²⁵³ en un proceso que consta de dos etapas. En primer lugar, la condensación entre L-arabinosa y cianamida en medio básico (MeOH-NH₄OH) durante 3 días a temperatura ambiente origina la aminooxazolina **53** con un 70% de rendimiento. A continuación, el tratamiento del compuesto **53** con propiolato de metilo en una mezcla EtOH-H₂O a reflujo durante 4 h permite obtener el anhidro-L-nucleósido **54** con un 65% de rendimiento.



Esquema 95

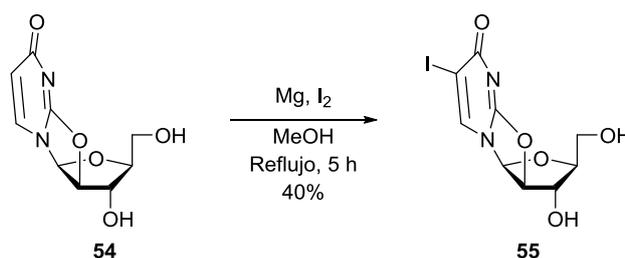
2. Apertura del anhidronucleósido mediante $\text{S}_{\text{N}}2$

2.1. Síntesis de 2'-O-metil-L-uridina

La apertura de un anhidronucleósido para dar derivados 2'-O-Me modificados ha sido descrita por distintos grupos. De las condiciones recogidas en la bibliografía, se elige el procedimiento realizado por

Szlenkier *et al.*²⁷⁰ para D-nucleósidos, debido a la disponibilidad de reactivos y al buen rendimiento de la transformación.

Para ello, sobre una suspensión de magnesio y yodo en metanol, se añade el compuesto **54** y se mantiene en agitación a reflujo durante 5 h (Esquema 96). Sin embargo, en lugar de obtener el compuesto deseado, se aísla el derivado **55**, resultante de la iodación de la anhidrouridina **54**, con un 40% de rendimiento. La formación de este producto puede deberse a que el compuesto **54** se añadiera antes de que se hubiera generado el $\text{Mg}(\text{OMe})_2$ en el medio de reacción.

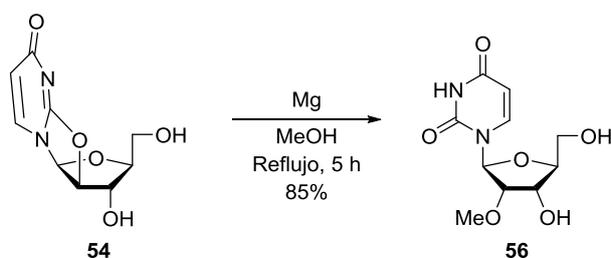


Esquema 96

Para evitar posibles reacciones secundarias se decide suprimir el yodo como catalizador (Esquema 97).²⁷¹ Con el fin de asegurar que el $\text{Mg}(\text{OMe})_2$ se haya generado *in situ*, se añade magnesio sobre metanol y se mantiene en agitación vigorosa a 30 °C, durante 40-45 min, hasta que se deja de percibir la liberación de H_2 . A continuación, se adiciona la anhidrouridina **54** y se agita a reflujo durante 5 h. En estas condiciones, se obtiene la 2'-O-metil-L-uridina (**56**) con un 85% de rendimiento.

²⁷⁰ M. Szlenkier, K. Kamel, J. Boryski. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2006**, 35, 410-425.

²⁷¹ S. K. Roy, J. Tang. *Org. Process Res. Dev.* **2000**, 4, 170-171.

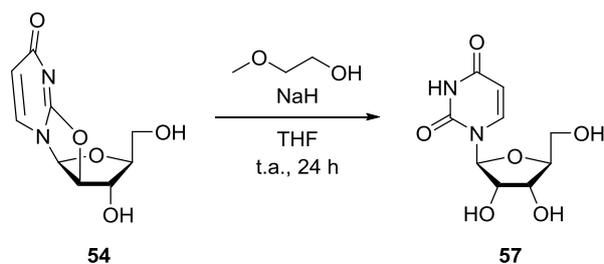


Esquema 97

2.2. Síntesis de 2'-*O*-metoxietil-L-uridina

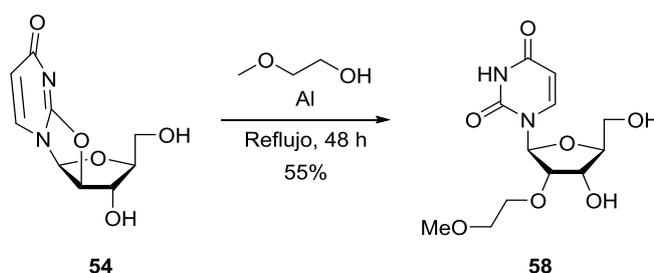
Para obtener la 2'-*O*-MOE-L-uridina se decide utilizar las condiciones descritas en el apartado anterior para formar el derivado de magnesio correspondiente, que lleve a cabo la sustitución nucleofílica. Para ello, se añade magnesio en 2-metoxietanol y se mantiene con agitación vigorosa a 30 °C. A pesar de percibirse liberación de H₂, la reacción redox es muy lenta y el magnesio no termina de consumirse, por lo que se decide buscar otra alternativa.

Se plantea la utilización de una base fuerte que favorezca la extracción del protón del 2-metoxietanol y facilite el ataque nucleofílico. Así, sobre una mezcla de 2-metoxietanol y NaH en THF se añade la anhidrouridina **54** (Esquema 98). Aunque tras 24 h no se observa sustrato de partida, el único producto que se aísla es la L-uridina (**57**).



Esquema 98

En vista de este resultado, se rechaza el uso de una base fuerte y se opta por la opción del organometálico (Esquema 99). En lugar del derivado de magnesio se decide formar el compuesto organometálico de aluminio, según el protocolo descrito por Legorburu *et al.*²⁷² Para ello, se añade aluminio sobre 2-metoxietanol y se calienta a reflujo durante 2 h. A continuación, se adiciona la anhidrouridina **54** y se mantiene agitando a reflujo durante 48 h, aislándose la 2'-OMOE-L-uridina (**58**) con un 55% de rendimiento.



Esquema 99

3. Transformación de la base nitrogenada. Síntesis de derivados de citidina

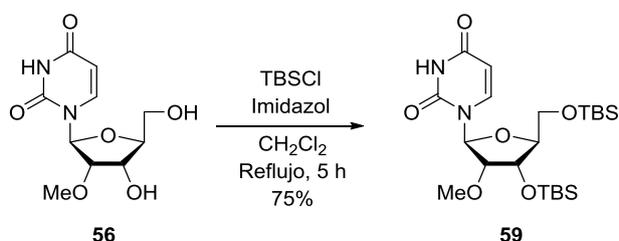
La transformación de la base uracilo en citosina es un procedimiento ampliamente empleado para la preparación de análogos de citidina. El objetivo de esta sección es modificar la posición 4 de la base heterocíclica de los compuestos **56** y **58**. Para ello, se sigue el protocolo descrito por Lavandera *et al.*,²⁷³ en el que un derivado de uridina se transforma en un derivado de 4-(1,2,4-triazol) que da acceso al compuesto con citosina.

²⁷² U. Legorburu, C. B. Reese, Q. Song. *Tetrahedron* **1999**, 55, 5635-5640.

²⁷³ I. Lavandera, S. Fernández, M. Ferrero, V. Gotor. *Tetrahedron* **2003**, 59, 5449-5456.

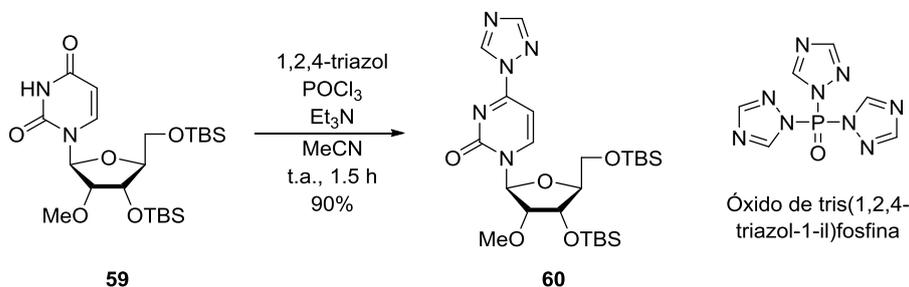
Resultados y discusión -----

La primera etapa de este protocolo es la protección de los grupos hidroxilo (Esquema 100). Se decide realizar la protección con cloruro de *tert*-butildimetilsililo al ser un agente habitual para este fin en los capítulos anteriores. Siguiendo el mismo procedimiento, el compuesto **56** se trata con TBSCl en presencia de imidazol y diclorometano como disolvente y, tras 5 h de reacción a reflujo, se obtiene el compuesto **59** con un 75% de rendimiento.



Esquema 100

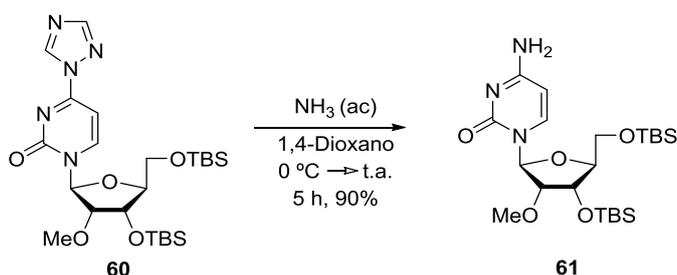
A continuación, se prepara *in situ* el óxido de tris(1,2,4-triazol-1-il)fosfina mediante el tratamiento de cloruro de fosforilo con 1,2,4-triazol y trietilamina. La adición de este óxido sobre una disolución de **59** en acetonitrilo da lugar al compuesto **60** con un 90% de rendimiento tras 90 min a temperatura ambiente (Esquema 101).



Esquema 101

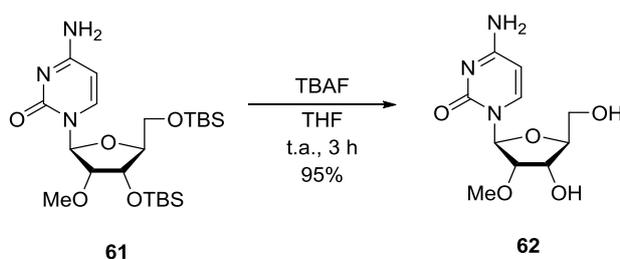
La siguiente etapa es el tratamiento de **60** con una disolución acuosa de amoníaco al 32% utilizando 1,4-dioxano como disolvente (Esquema

102), que conduce al derivado de citosina protegido **61** (90% de rendimiento).



Esquema 102

Para la obtención de 2'-*O*-metil-L-citidina (**62**) es necesaria la desprotección de los éteres de silicio, que se realiza con fluoruro de tetrabutilamonio (TBAF) en THF a temperatura ambiente, aislándose este análogo con un 95% de rendimiento (Esquema 103).

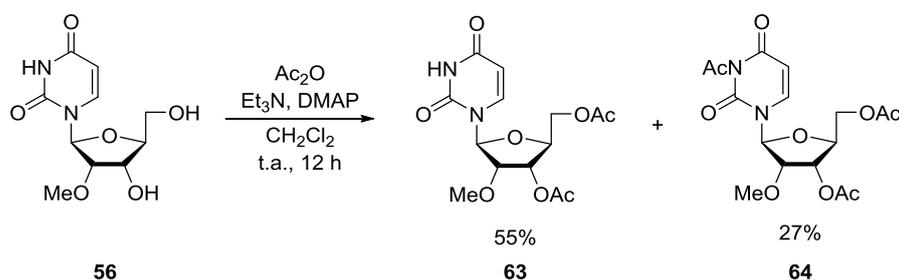


Esquema 103

Considerando el factor económico y la toxicidad tanto del TBSCl como del TBAF, se decide sustituir el grupo protector de los hidroxilos por uno que haga el proceso más sostenible. De esta forma, se hace reaccionar el compuesto **56** con anhídrido acético (Ac_2O) en presencia de Et_3N y DMAP, y utilizando diclorometano como disolvente (Esquema 104). Tras 12 h de reacción a temperatura ambiente, se obtiene el derivado diacetilado objetivo **63** con un rendimiento moderado del 55%

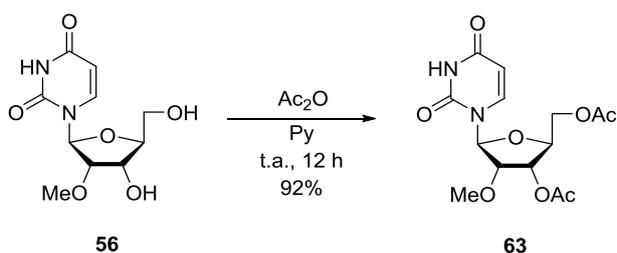
Resultados y discusión -----

debido a que se forma como subproducto el compuesto triacetilado **64** resultante de la *N*-acetilación de la base, que se aísla con un 27% de rendimiento.



Esquema 104

Para evitar la formación de **64** se emplean otras condiciones en ausencia de DMAP.²⁷⁴ Así, el compuesto **56** se hace reaccionar con Ac_2O en piridina durante 12 h a temperatura ambiente, lo que origina únicamente el derivado diacetilado **63** con un 92% de rendimiento (Esquema 105).

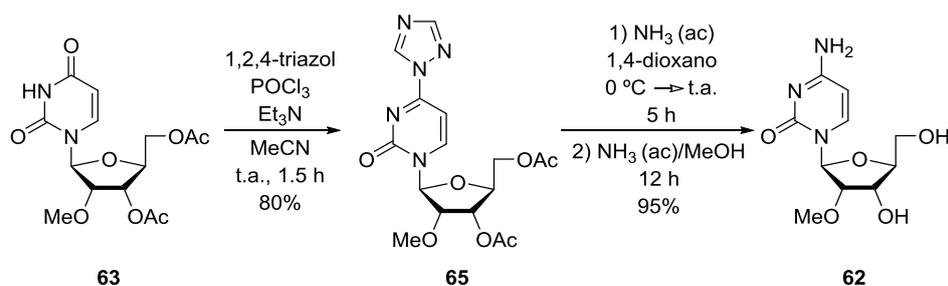


Esquema 105

Para la transformación de uracilo en citosina se lleva a cabo una secuencia de reacciones similares a las indicadas en los Esquemas 101 y 102. La conversión de **63** en el derivado de 1,2,4-triazol y tratamiento

²⁷⁴ J. Shi, J. Du, T. Ma, K. W. Pankiewicz, S. E. Patterson, P. M. Tharnish, T. R. McBrayer, L. J. Stuyver, M. J. Otto, C. K. Chu, et al. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 1641-1652.

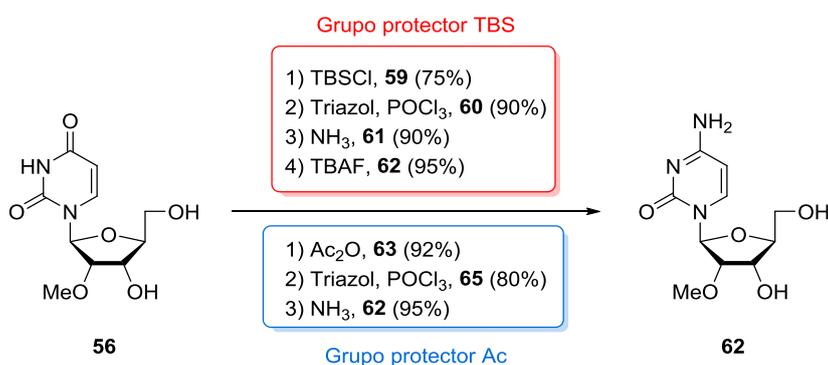
posterior con una disolución de NH_3 acuoso en 1,4-dioxano conduce al derivado de citidina correspondiente (Esquema 106). Seguidamente, se adiciona *in situ* una disolución de NH_3 (ac)/MeOH (1:1, v:v), y tras 12 h se obtiene el derivado de L-citidina **62** desprotegido con un 95% de rendimiento. El grupo acetato es lábil en las condiciones básicas necesarias para construir el anillo de citosina, por lo que no es necesaria una etapa de desprotección adicional de los grupos hidroxilo como ocurría con los éteres de silicio.



Esquema 106

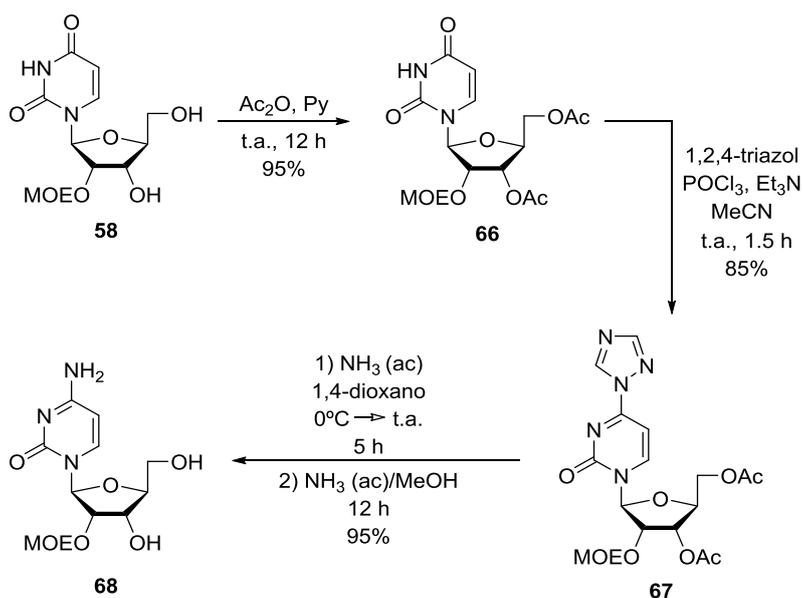
Para el propósito de este capítulo resulta más conveniente la protección de los grupos hidroxilo del azúcar como acetatos, tanto por el aspecto económico de los reactivos utilizados, como por su menor toxicidad, siendo ambos elementos clave en el desarrollo de procesos sostenibles. Por otra parte, al requerir una etapa menos de reacción proporciona un mejor rendimiento global del proceso (70% con Ac frente a 58% con TBS). Sin embargo, es interesante la protección con el grupo TBS, ya que permite la transformación de la base heterocíclica en unas determinadas condiciones de reacción mientras se mantienen protegidos los grupos hidroxilo, lo que podría ser interesante para otros objetivos sintéticos (Esquema 107).

Resultados y discusión -----



Esquema 107. Comparación de los rendimientos de cada etapa de la síntesis de **62** con los dos grupos protectores, TBS (rojo) y acetato (azul).

Teniendo en cuenta las ventajas que otorga la protección de los hidroxilos como ésteres de acetilo, se elige este grupo protector para llevar a cabo la transformación del compuesto 2'-*O*-MOE-L-uridina (**58**) en el derivado de citosina **68**. Para ello, se utiliza la misma secuencia sintética que en el nucleósido 2'-*O*-Me **56**. Los rendimientos de cada una de las etapas se recogen en el Esquema 108.



Esquema 108

4. Síntesis de L-nucleósidos modificados en la posición 5 de la base nitrogenada

Los derivados pirimidínicos sustituidos en la posición 5 tienen un gran interés debido a su actividad biológica y han atraído una atención considerable en el campo de la medicina, existiendo un gran número de nucleósidos 5-sustituidos con aplicaciones terapéuticas.²⁷⁵

4.1. Derivados de L-5-iodouridina

Además del valor biológico intrínseco de los derivados de 5-iodouracilo, su acoplamiento con alquenos o alquinos terminales²⁷⁶ permite la preparación de otros compuestos con potencial farmacológico.

La iodación electrofílica es la reacción más adecuada para la introducción selectiva de átomos de yodo en compuestos orgánicos. Uno de los agentes más empleados para este fin es el yodo molecular (I₂), el cual presenta una electrofilia débil, por lo que necesita una activación, que puede conseguirse con un agente oxidante o con un ácido de Lewis, o de Brønsted, que polarice el enlace.

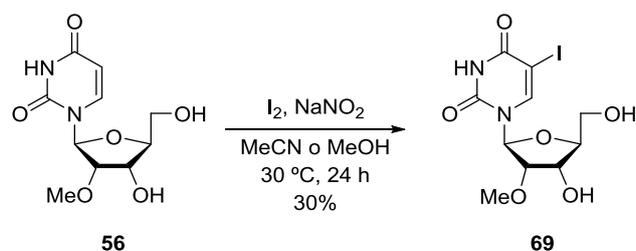
Se decide llevar a cabo la iodación una vez que se ha realizado la apertura de la anhidouridina y se dispone de los correspondientes L-nucleósidos 2'-sustituidos (Esquema 109). De esta forma, el compuesto **56** se trata con yodo molecular y NaNO₂²⁷⁷ utilizando MeCN o MeOH como disolventes. A pesar de obtenerse el compuesto **69** deseado, el rendimiento de la transformación es bajo (30%), por lo que se busca una combinación de reactivos alternativa.

²⁷⁵ T. S. Lin, M. S. Chen, C. McLaren, Y-S Gao, I. Ghazzouli, W. H. Prusoff. *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 440-444.

²⁷⁶ a) M. J. Robins, P. J. Barr. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 1854-1862; b) A.V. Ardhapuere, Y. S. Sanghvi, A. R. Kapdi, J. García, G. Sanchez, P. Lozano, J. L. Serrano. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 24558-24563.

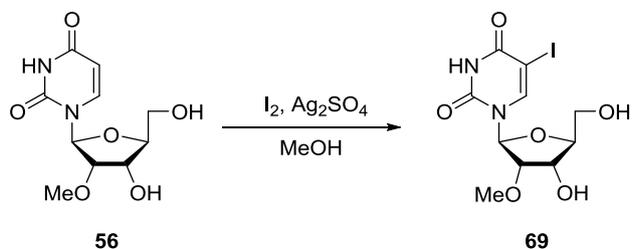
²⁷⁷ L. M. Patil, D. E. Ponde, S. D. Samant. *Heterocycl. Lett.* **2014**, *4*, 559-564.

Resultados y discusión -----



Esquema 109

Se considera la utilización de un reactivo de plata como agente activante del I_2 , según el protocolo descrito por Sy.^{164a} De manera que se hace reaccionar el compuesto **56** con una disolución de I_2 y Ag_2SO_4 en metanol a temperatura ambiente (Esquema 110). Sin embargo, tras 48 h no se observa evolución de la reacción, recuperándose el sustrato de partida (entrada 1, Tabla 14). Por ello, se llevan a cabo varios experimentos modificando la relación de equivalentes de los reactivos y la temperatura, y atendiendo a la desaparición del sustrato de partida mediante TLC. Las condiciones estudiadas no permiten una conversión completa y siempre se observa sustrato de partida, aunque cuando la reacción se lleva a cabo con 3 equiv de I_2 y 3 equiv de Ag_2SO_4 a reflujo de MeOH, la conversión de la reacción es alta y el compuesto **69** se aísla con un 60% de rendimiento, independientemente del tiempo de reacción (entradas 4 y 5, Tabla 14).



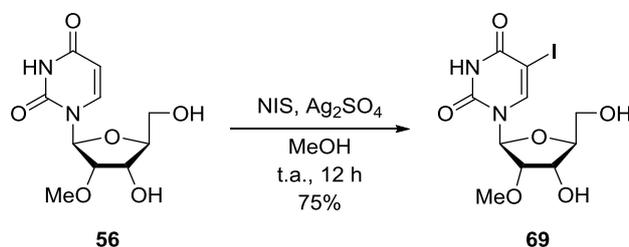
Esquema 110

Tabla 14. Reacción de iodación de **56** con I₂/Ag₂SO₄.

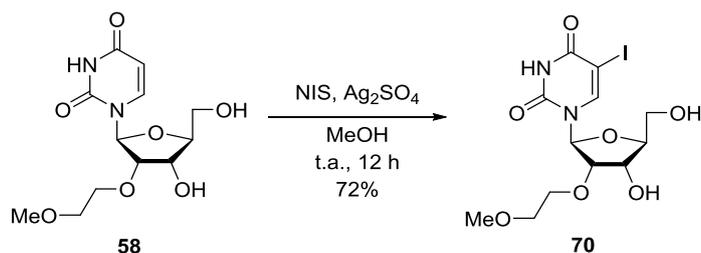
Entrada	I ₂ ^a	Ag ₂ SO ₄ ^a	T	t (h)	Rendimiento 69 (%) ^b
1	1	1	t.a.	48	-
2	1	1	reflujo	48	35
3	2.5	2.5	reflujo	48	48
4	3	3	reflujo	24	60
5	3	3	reflujo	48	60

^aEquiv de los reactivos respecto a **56**. ^bRendimiento calculado tras la cromatografía de columna.

En la búsqueda de un protocolo mejor, se sustituye el I₂ por un agente electrófilo donador de átomos de yodo, la *N*-iodosuccinimida (NIS). El tratamiento de **56** con NIS en presencia de Ag₂SO₄ y en metanol como disolvente, da lugar al compuesto **69** con un 75% de rendimiento tras 12 h de reacción a temperatura ambiente (Esquema 111).

**Esquema 111**

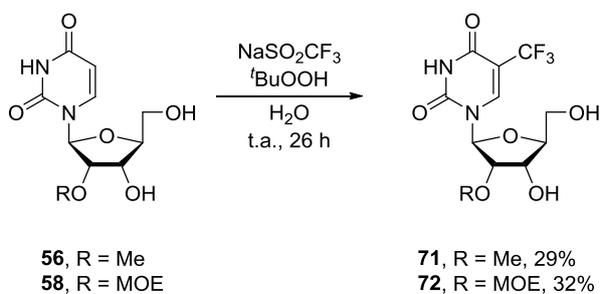
Teniendo en cuenta que la combinación NIS-Ag₂SO₄ ha proporcionado los mejores resultados, se utiliza este protocolo para realizar la iodación del derivado 2'-*O*-MOE **58**, aislándose el compuesto de 5-iodouridina **70** con un rendimiento del 72% (Esquema 112).

**Esquema 112**

4.2. Derivados de L-5-trifluorometiluridina

Teniendo presente la actividad terapéutica de algunos análogos nucleosídicos como la 5-trifluorotimidina, un fármaco antiviral y anticancerígeno que posee un grupo trifluorometilo en la posición 5 de la base, se decide transformar los derivados **56** y **58** en los correspondientes compuestos 5-trifluorometilados. Para ello, se aplica el protocolo descrito por Ji *et al.*^{164b} que permite introducir el grupo trifluorometilo en heterociclos a través de un mecanismo radicalario.

Así pues, la adición de *tert*-butilhidroperóxido sobre una mezcla del compuesto **56** y NaSO₂CF₃ en agua, origina el derivado **71** con un 29% de rendimiento tras 26 h de reacción a temperatura ambiente (Esquema 113). La aplicación de la misma metodología, pero partiendo de **58**, permite obtener el compuesto **72** con un 32% de rendimiento.

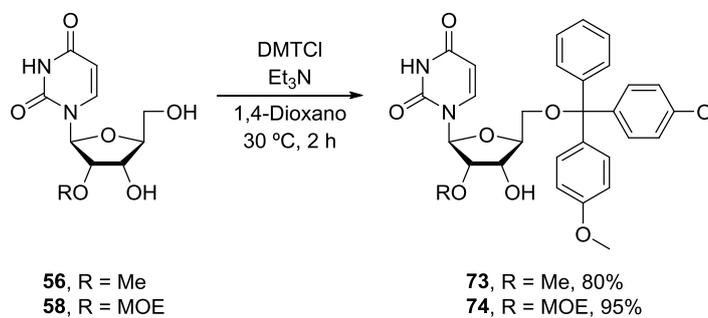


Esquema 113

5. Síntesis de 5'-O-dimetoxitritil-L-nucleósidos 2'-modificados

Paralelamente, se ha llevado a cabo la protección del grupo hidroxilo de la posición 5' de los compuestos **56** y **58** con el grupo DMT, protección necesaria en la síntesis de oligonucleótidos por el método del fosforamidito en fase sólida. Para ello, los compuestos **56** y **58** se hacen

reaccionar con DMTCl en presencia de Et₃N y utilizando 1,4-dioxano como disolvente. La mezcla se mantiene en agitación a 30 °C durante 2 h, obteniéndose los compuestos **73** y **74** con un 80% y 95% de rendimiento, respectivamente.



Esquema 114

Conclusiones

En este capítulo se ha descrito la síntesis de L-nucleósidos, compuestos interesantes desde el punto de vista biológico que en las últimas décadas han surgido como importantes agentes antivirales y antitumorales.

Se ha llevado a cabo la síntesis de L-nucleósidos sustituidos en 2' con grupos OMe y OMOE derivados de uridina, citidina, 5-iodouridina y 5-trifluorometiluridina a través de una ruta sintética que involucra la formación de $O^{2,2'}$ -anhidro-L-uridina y su posterior apertura nucleofílica con distintos agentes. Para la preparación de $O^{2,2'}$ -anhidro-L-uridina se utiliza como sustrato de partida la L-arabinosa, un azúcar disponible en la naturaleza, componente de la pectina y la hemicelulosa.

La transformación de la base uracilo en citosina se ha realizado utilizando dos grupos protectores para los hidroxilos del azúcar, un éter de silicio (TBS) y un éster (Ac). El acetato ha resultado el grupo más adecuado al necesitar una etapa menos de reacción y precisar de reactivos más económicos y menos tóxicos para las etapas de protección/desprotección, lo que permite enmarcar el protocolo dentro de la química sostenible. Sin embargo, el grupo TBS permite una desprotección selectiva de la función amino que podría ser interesante para otros objetivos.

De forma adicional, debido a las valiosas propiedades de los L-oligonucleótidos, se ha llevado a cabo la síntesis de los monómeros 5'-*O*-DMT de los derivados 2'-*O*-alquil-L-uridina, precursores clave para la síntesis de oligonucleótidos por el método del fosforamidito en fase sólida.

Parte experimental

1. Condiciones de trabajo, disolventes y reactivos

Los reactivos y métodos generales han sido detallados en la parte experimental de los capítulos anteriores.

2. Técnicas instrumentales

Las técnicas utilizadas en la realización de este capítulo han sido detalladas en los capítulos anteriores a excepción de los espectros de infrarrojo (IR), que se han adquirido en un espectrómetro Jasco FT/IR-4700 por análisis directo de la muestra.

3. Procedimientos experimentales

3.1. Síntesis del derivado de aminooxazolina 53

Sobre una suspensión de L-arabinosa (1 g, 6.7 mmol) y cianamida (677 mg, 16.1 mmol) en metanol (17 ml) se añade NH_4OH 6 M (2.8 ml). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 3 días. A continuación, se disminuye la temperatura a $-10\text{ }^\circ\text{C}$ y se mantiene en agitación durante 12 h. Se evapora la mitad del volumen de disolvente a presión reducida y el sólido se filtra y se lava con MeOH y Et_2O . El producto **53** se obtiene con un 70% de rendimiento.

3.2. Síntesis de $O^{2,2'}$ -anhidro-L-uridina (**54**)

Sobre una disolución del compuesto **53** (1.6 g, 9.2 mmol) en 23 ml de una mezcla EtOH/H₂O (1:1, v:v) se añade propiolato de metilo (1.6 ml, 18.4 mmol) y se agita a reflujo durante 4 h. A continuación, se evapora la mitad del volumen de disolvente a presión reducida y el sólido se filtra y se lava con EtOH y H₂O. El compuesto **54** se obtiene con un 65% de rendimiento.

3.3. Síntesis de 2'-*O*-metil-L-uridina (**56**)

Una suspensión de magnesio (430 mg, 17.6 mmol) en MeOH anhidro (13 ml) se agita vigorosamente a 30 °C durante 45 min. A continuación, se añade la anhidouridina **54** (200 mg, 0.88 mmol) y se mantiene a reflujo durante 5 h. La mezcla se enfría, primero a temperatura ambiente y después a 0 °C, y se añade ácido acético glacial hasta pH neutro. Posteriormente, se evaporan los disolventes hasta obtener una espuma que se redissuelve en EtOH y se calienta a reflujo durante 2 h. Tras una filtración sobre Celite[®], el crudo se purifica mediante columna cromatográfica (5% MeOH/CH₂Cl₂), aislándose el compuesto **56** con un 85% de rendimiento.

3.4. Síntesis de 2'-*O*-metoxietil-L-uridina (**58**)

Una suspensión de aluminio (36 mg, 1.3 mmol) en 2-metoxietanol (1 ml) se agita a reflujo durante 2 h. A continuación, la mezcla se enfría a temperatura ambiente, se añade el compuesto **54** (50 mg, 0.22 mmol) y se calienta a reflujo durante 48 h. Posteriormente, la mezcla se enfría a temperatura ambiente y se tritura y co-evapora con metanol (3 veces). El crudo resultante se purifica por cromatografía en columna utilizando como eluyente 5% MeOH/CH₂Cl₂, obteniéndose el compuesto **58** con un 55% de rendimiento.

3.5. Protección con TBSCl. Síntesis del compuesto **59**

Sobre una disolución del compuesto **56** (60 mg, 0.23 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (0.8 ml) se añade imidazol (78 mg, 1.2 mmol) y TBSCl (173 mg, 1.2 mmol). La reacción se agita a reflujo durante 5 h. A continuación, se añade agua/hielo y se extrae con CH₂Cl₂. La fase orgánica se seca con Na₂SO₄, se filtra y se evapora a presión reducida. El crudo resultante se purifica por cromatografía en columna (20% AcOEt/Hexano), aislándose el compuesto **59** con un rendimiento del 75%.

3.6. Síntesis del derivado de 4-triazolpirimidina **60**

Sobre una suspensión de 1,2,4-triazol (193 mg, 2.79 mmol) en MeCN anhidro (2.3 ml) se añade POCl₃ (33 µl, 0.35 mmol). A continuación, se añade a 0 °C Et₃N anhidra (429 µl, 3.08 mmol) y una disolución del compuesto **59** (68 mg, 0.14 mmol) en MeCN anhidro (0.5 ml). La reacción se agita a temperatura ambiente durante 1.5 h. Posteriormente, se añaden 120 µl de Et₃N y 30 µl de agua, y se agita durante 10 min. Se evaporan los disolventes, el residuo se disuelve en CH₂Cl₂ y se lava con NaHCO₃. La fase orgánica se seca con Na₂SO₄, se filtra y se evapora a presión reducida. El crudo resultante se purifica por columna cromatográfica (40% AcOEt/Hexano), aislándose el compuesto **60** con un 90% de rendimiento.

3.7. Síntesis del derivado de L-citidina **61**

Sobre una disolución del compuesto **60** (26 mg, 0.05 mmol) en 1,4-dioxano (1 ml) a 0 °C se añaden 285 µl de NH₃ acuoso (32%). La reacción se mantiene en agitación a temperatura ambiente durante 5 h. Tras evaporar los disolventes a presión reducida, el crudo se purifica por cromatografía en columna utilizando como eluyente 5% MeOH/CH₂Cl₂, dando lugar al compuesto **61** con un rendimiento del 90%.

3.8. Síntesis de 2'-*O*-metil-L-citidina (**62**)

Método A: a partir de 61

Sobre una disolución de **61** (275 mg, 0.62 mmol) en 6.2 ml de THF anhidro a 0 °C se añade TBAF (3.72 mmol, 1.0 M en THF). Tras 5 min, se retira el baño de hielo y la reacción se agita a temperatura ambiente durante 3 h. A continuación, se eliminan los disolventes y el crudo se purifica por cromatografía en columna (10% MeOH/CH₂Cl₂), obteniéndose el compuesto **62** con un 95% de rendimiento.

Método B: a partir de 65

Sobre una disolución del derivado **65** (54 mg, 0.13 mmol) en 1,4-dioxano (2.5 ml) a 0 °C se añaden 0.74 ml de una disolución acuosa al 32% de amoníaco. La reacción se agita a temperatura ambiente durante 5 h. A continuación, se añade un volumen igual al de 1,4-dioxano de una disolución de NH₃ (ac)/MeOH (1:1, v:v) y se agita durante 12 h. Posteriormente, se evaporan los disolventes y el crudo se purifica por cromatografía en columna utilizando como eluyente 20% MeOH/CH₂Cl₂, obteniéndose el derivado de L-citidina **62** con un 95% de rendimiento.

3.9. Protección con Ac₂O. Síntesis de **63**

Sobre una disolución de **56** (100 mg, 0.39 mmol) en piridina anhidra a 0 °C (1.3 ml) se añade Ac₂O (0.26 ml, 2.73 mmol) y se agita a temperatura ambiente durante 12 h. A continuación, se añade CH₂Cl₂ y se lava con una disolución saturada de NaHCO₃. La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄, se filtra y se evapora a presión reducida. El crudo resultante se purifica por columna cromatográfica utilizando como eluyente un gradiente 90% AcOEt/Hexano-AcOEt. El compuesto **63** se obtiene con un 92% de rendimiento.

3.10. Síntesis del derivado de 4-triazolpirimidina 65

Se sigue el mismo procedimiento que para la síntesis de **60**, utilizando como sustrato de partida **63**. Tras la purificación por cromatografía en columna (10% Hexano/AcOEt), se obtiene el compuesto **65** con un rendimiento de 80%.

3.11. Protección con Ac₂O. Síntesis de 66

Se sigue el mismo procedimiento que para la síntesis de **63**, utilizando como sustrato de partida **58**. Tras la purificación mediante columna cromatográfica utilizando como eluyente un gradiente 90% AcOEt/Hexano-AcOEt, se aísla el compuesto **66** con un 95% de rendimiento.

3.12. Síntesis del derivado de 4-triazolpirimidina 67

Se sigue el mismo procedimiento que para la síntesis de **60**, utilizando como sustrato de partida **66**. Tras la purificación por cromatografía en columna con AcOEt como eluyente, se obtiene el derivado **67** con un 85% de rendimiento.

3.13. Síntesis de 2'-OMOE-L-citidina (68)

Se sigue el mismo procedimiento que para la síntesis de **62** (Método B) utilizando como sustrato de partida **67**. Tras la purificación en columna cromatográfica utilizando como eluyente 20% MeOH/CH₂Cl₂, se obtiene el compuesto **68** con un 95% de rendimiento.

3.14. Síntesis de los derivados con 5-iodouracilo 69 y 70

Sobre una disolución 0.1 M de **56** o **58** en MeOH anhidro se añade 1 equiv de Ag₂SO₄ y 1.5 equiv de *N*-iodosuccinimida. La mezcla se mantiene en agitación a temperatura ambiente durante 12 h. A

Parte Experimental -----

continuación, se filtra sobre Celite[®] y se lava con metanol. Tras eliminar disolventes, el crudo se purifica mediante columna cromatográfica (5% MeOH/CH₂Cl₂), obteniéndose los derivados de L-5-iodouridina **69** (75% de rendimiento) o **70** (72% de rendimiento).

3.15. Síntesis de los derivados con 5-trifluorometiluracilo **71** y **72**

Sobre una disolución acuosa 2.5 M de **56** o **58** y 3 equiv de NaSO₂CF₃, se añaden lentamente, a 0 °C, 5 equiv de *tert*-butilhidroperóxido. La mezcla se mantiene con agitación vigorosa a temperatura ambiente. Tras 24 h, se realiza una segunda adición de NaSO₂CF₃ (3 equiv) y de *tert*-butilhidroperóxido (5 equiv). La reacción se sigue por cromatografía en capa fina (10% MeOH/CH₂Cl₂) hasta la completa desaparición del producto de partida (tiempo total 26 h). La mezcla se disuelve en AcOEt y se lava con NaHCO₃, la fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄, se filtra y se evapora a presión reducida. El crudo se purifica por columna cromatográfica utilizando como eluyente 3% MeOH/CH₂Cl₂. Los derivados **71** y **72** se aíslan con 29% y 32% de rendimiento, respectivamente.

3.16. Protección del hidroxilo primario con DMT. Síntesis de **73** y **74**

Sobre una disolución 0.08 M de **56** o **58** en 1,4-dioxano anhidro, se añaden Et₃N anhidra (10 equiv) y cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (1.5 equiv). La mezcla se agita a 30 °C durante 2 h. A continuación, se añade una disolución acuosa saturada de NaHCO₃ y se extrae con CH₂Cl₂. La fase orgánica se seca con Na₂SO₄, se filtra y se eliminan los disolventes a presión reducida. El residuo se purifica por cromatografía en columna empleando como eluyente 2% MeOH/CH₂Cl₂. La columna se empaqueta previamente con sílica gel neutralizada con una disolución de 10% Et₃N

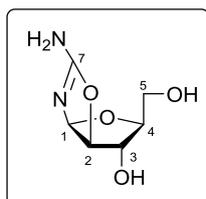
en MeOH:CH₂Cl₂ (2:98, v:v). Los compuestos **73** y **74** se aíslan con 80% y 95% de rendimiento, respectivamente.

4. Datos experimentales

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

Parte Experimental -----

2-Amino-β-L-arabinofurano[1',2':4,5]oxazolina (53)



Sólido blanco

P_f: 179-181 °C

R_f: 0.40 (1% NH₃/MeOH)

Fórmula molecular: C₆H₁₀N₂O₄

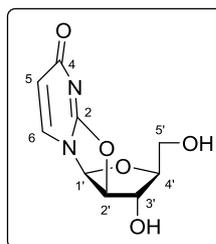
Masa molecular: 174.15 g/mol

¹H-RMN (300.13 MHz, D₂O): δ 3.49 (dd, 1H, H₅, *J* = 12.1, 6.9 Hz), 3.57 (dd, 1H, H₅, *J* = 12.1, 5.4 Hz), 3.98 (m, 1H, H₄), 4.29 (dd, 1H, H₃, *J* = 3.1, 1.0 Hz), 4.89 (dd, 1H, H₂, *J* = 5.5, 1.0 Hz), 5.87 (d, 1H, H₁, *J* = 5.5 Hz) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, D₂O): δ 61.2 (C₅), 75.2 (C₃), 84.3 (C₄), 88.7 (C₂), 98.6 (C₁), 164.8 (C₇) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₆H₁₁N₂O₄ [M+H]⁺: 175.0713. Encontrada: 175.0718
- Calculada para C₆H₁₀N₂NaO₄ [M+Na]⁺: 197.0533. Encontrada: 197.0530
- Calculada para C₆H₁₀KN₂O₄ [M+K]⁺: 213.0272. Encontrada: 213.0268

***O*^{2,2'}-Anhidro-L-uridina (54)**

Sólido blanco

P_f: 237-239 °C

R_f: 0.53 (40% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₉H₁₀N₂O₅

Masa molecular: 226.19 g/mol

IR: ν 3249, 2192, 1775, 1619 cm⁻¹.

¹H-RMN (300.13 MHz, D₂O): δ 3.56 (m, 2H, H_{5'}), 4.40 (m, 1H, H_{4'}), 4.67 (m, 1H, H_{3'}), 5.47 (d, 1H, H_{2'}, *J* = 5.9 Hz), 6.19 (d, 1H, H₅, *J* = 7.4 Hz), 6.54 (d, 1H, H_{1'}, *J* = 5.9 Hz), 7.92 (d, 1H, H₆, *J* = 7.4 Hz) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, D₂O): δ 60.9 (C_{5'}), 75.5 (C_{3'}), 89.6 (C_{2'}), 89.8 (C_{4'}), 91.0 (C_{1'}), 108.7 (C₅), 138.4 (C₆), 161.2 (C₂), 175.7 (C₄) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

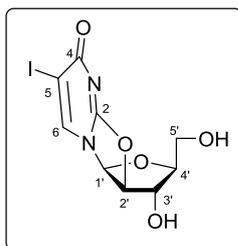
- Calculada para C₉H₁₁N₂O₅ [M+H]⁺: 227.0662. Encontrada: 227.0658

- Calculada para C₉H₁₀N₂NaO₅ [M+Na]⁺: 249.0482. Encontrada: 249.0477

- Calculada para C₉H₁₀KN₂O₅ [M+K]⁺: 265.0221. Encontrada: 265.0216

Parte Experimental -----

***O*^{2,2'}-Anhidro-L-5-iodouridina (55)**



Sólido blanco

R_f: 0.36 (20% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₉H₉IN₂O₅

Masa molecular: 352.08 g/mol

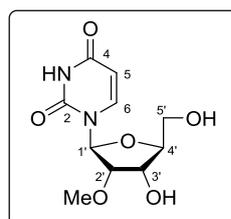
¹H-RMN (300.13 MHz, MeOD-*d*₄): δ 3.53 (m, 2H, H_{5'}), 4.28 (dt, 1H, H_{4'}, *J* = 3.9, 2.0 Hz), 4.56 (m, 1H, H_{3'}), 5.39 (d, 1H, H_{2'}, *J* = 5.9 Hz), 6.52 (d, 1H, H_{1'}, *J* = 5.9 Hz), 8.41 (s, 1H, H₆) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOD-*d*₄): δ 62.4 (C_{5'}), 76.9 (C_{3'}), 80.9 (C₅), 91.6 (C_{4'}), 91.8 (C_{2'}), 92.4 (C_{1'}), 143.7 (C₆), 162.4 (C₂), 171.3 (C₄) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₉H₁₀IN₂O₅ [M+H]⁺: 352.9629. Encontrada: 352.9636
- Calculada para C₉H₉IN₂NaO₅ [M+Na]⁺: 374.9448. Encontrada: 374.9456
- Calculada para C₉H₉IKN₂O₅ [M+K]⁺: 390.9188. Encontrada: 390.9196

2'-O-Metil-L-uridina (56)



Sólido blanco

P_f: 156-158 °C

R_f: 0.77 (30% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₁₀H₁₄N₂O₆

Masa molecular: 258.23 g/mol

IR: ν 3232, 3005, 2990, 1649 cm⁻¹.

¹H-RMN (300.13 MHz, D₂O): δ 3.50 (s, 3H, O-Me), 3.79 (dd, 1H, H_{5'}, J = 12.9, 4.3 Hz), 3.91 (dd, 1H, H_{5'}, J = 12.8, 2.8 Hz), 4.04 (dd, 1H, H_{2'}, J = 5.2, 4.0 Hz), 4.09 (ddd, 1H, H_{4'}, J = 6.3, 4.2, 3.0 Hz), 4.32 (t, 1H, H_{3'}, J = 5.7 Hz), 5.88 (d, 1H, H_{5'}, J = 8.1 Hz), 5.96 (d, 1H, H_{1'}, J = 3.9 Hz), 7.89 (d, 1H, H_{6'}, J = 8.1 Hz) ppm.

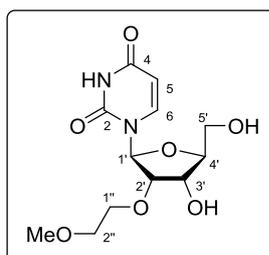
¹³C-RMN (75.5 MHz, D₂O): δ 58.2 (CH₃), 60.4 (C_{5'}), 68.1 (C_{3'}), 82.6 (C_{2'}), 84.2 (C_{4'}), 87.6 (C_{1'}), 102.2 (C₅), 141.7 (C₆), 151.4 (C₂), 166.1 (C₄) ppm.

EMAR (ESI⁺, m/z):

- Calculada para C₁₀H₁₅N₂O₆ [M+H]⁺: 259.0925. Encontrada: 259.0928
- Calculada para C₁₀H₁₄N₂NaO₆ [M+Na]⁺: 281.0744. Encontrada: 281.0747
- Calculada para C₁₀H₁₄KN₂O₆ [M+K]⁺: 297.0483. Encontrada: 297.0486

Parte Experimental -----

2'-O-(2-Metoxietil)-L-uridina (58)



Sólido blanco

P_f: 116-118 °C

R_f: 0.77 (30% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₁₂H₁₈N₂O₇

Masa molecular: 302,28 g/mol

IR: ν 3235, 3005, 2990, 1647 cm⁻¹.

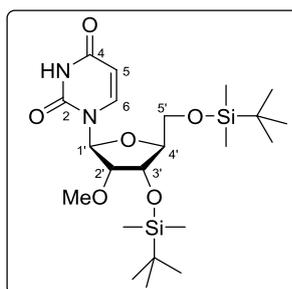
¹H-RMN (300.13 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3.22 (s, 3H, O-*Me*), 3.44 (t, 2H, H_{2''}, *J* = 4.8 Hz), 3.62 (m, 4H, H_{5'} + H_{1''}), 3.85 (q, 1H, H_{4'}, *J* = 3.1 Hz), 3.94 (t, 1H, H_{2'}, *J* = 5.0 Hz), 4.09 (q, 1H, H_{3'}, *J* = 5.0 Hz), 5.06 (d, 1H, OH_{3'}, *J* = 5.7 Hz), 5.16 (t, 1H, OH_{5'}, *J* = 5.0 Hz), 5.65 (d, 1H, H₅, *J* = 8.1 Hz), 5.84 (d, 1H, H_{1'}, *J* = 5.1 Hz), 7.92 (d, 1H, H₆, *J* = 8.1 Hz), 11.35 (sa, 1H, NH) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ 58.1 (CH₃), 60.6 (C_{5'}), 68.4 (C_{3'}), 69.0 (C_{1''}), 71.2 (C_{2''}), 81.4 (C_{2'}), 85.1 (C_{4'}), 86.2 (C_{1'}), 101.8 (C₅), 140.5 (C₆), 150.6 (C₂), 163.2 (C₄) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₁₂H₁₉N₂O₇ [M+H]⁺: 303.1187. Encontrada: 303.1190
- Calculada para C₁₂H₁₈N₂NaO₇ [M+Na]⁺: 325.1006. Encontrada: 325.0997
- Calculada para C₁₂H₁₈KN₂O₇ [M+K]⁺: 341.0746. Encontrada: 341.0736

3',5'-Bis-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)-2'-*O*-metil-L-uridina (59)



Sólido blanco

P_f: 65-66 °C

R_f: 0.29 (20% AcOEt/Hexano)

Fórmula molecular: C₂₂H₄₂N₂O₆Si₂

Masa molecular: 486.75 g/mol

¹H-RMN (300.13 MHz, CDCl₃): δ 0.06 (s, 3H, Si-*Me*), 0.08 (s, 3H, Si-*Me*), 0.09 (s, 3H, Si-*Me*), 0.10 (s, 3H, Si-*Me*), 0.88 (s, 9H, Si-*t*Bu), 0.91 (s, 9H, Si-*t*Bu), 3.54 (s, 3H, O-*Me*), 3.58 (dd, 1H, H_{2'}, *J* = 4.8, 1.4 Hz), 3.75 (dd, 1H, H_{5'}, *J* = 10.6, 1.0 Hz), 4.03 (m, 2H, H_{4'} + H_{5'}), 4.21 (dd, 1H, H_{3'}, *J* = 7.4, 4.9 Hz), 5.67 (d, 1H, H_{5'}, *J* = 8.1 Hz), 5.92 (d, 1H, H_{1'}, *J* = 1.4 Hz), 8.05 (d, 1H, H₆, *J* = 8.1 Hz), 9.99 (sa, 1H, NH) ppm.

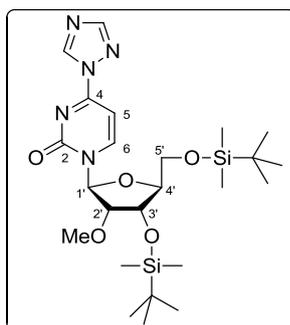
¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): δ -5.5 (Si-CH₃), -5.4 (Si-CH₃), -4.8 (Si-CH₃), -4.5 (Si-CH₃), 18.2 (SiCMe₃), 18.5 (SiCMe₃), 25.8 (CH₃-*t*Bu), 26.0 (CH₃-*t*Bu), 58.3 (O-CH₃), 60.8 (C_{5'}), 68.5 (C_{3'}), 83.8 (C_{4'}), 84.4 (C_{2'}), 87.6 (C_{1'}), 102.0 (C₅), 140.2 (C₆), 150.4 (C₂), 164.0 (C₄) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₂₂H₄₃N₂O₆Si₂ [M+H]⁺: 487.2654. Encontrada: 487.2653
- Calculada para C₂₂H₄₂N₂NaO₆Si₂ [M+Na]⁺: 509.2474. Encontrada: 509.2472
- Calculada para C₂₂H₄₂KN₂O₆Si₂ [M+K]⁺: 525.2213. Encontrada: 525.2211

Parte Experimental -----

3',5'-Bis-O-(*tert*-butildimetilsilil)-2'-O-metil-4-(1,2,4-triazol-1-il)-L-citidina (60)



Sólido higroscópico

R_f: 0.31 (40% AcOEt/Hexano)

Fórmula y masa moleculares: C₂₄H₄₃N₅O₅Si₂ y 537.82 g/mol

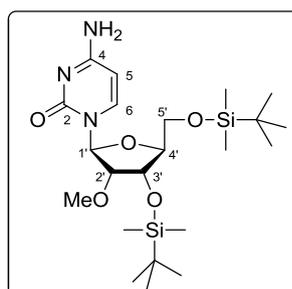
¹H-RMN (300.13 MHz, CDCl₃): δ 0.03 (s, 3H, Si-Me), 0.06 (s, 3H, Si-Me), 0.14 (s, 3H, Si-Me), 0.16 (s, 3H, Si-Me), 0.87 (s, 9H, Si-^tBu), 0.97 (s, 9H, Si-^tBu), 3.68 (m, 1H, H_{2'}), 3.69 (s, 3H, O-Me), 3.81 (d, 1H, H_{5'}, *J* = 11.1 Hz), 4.17 (m, 3H, H_{3'} + H_{4'} + H_{5'}), 5.98 (s, 1H, H_{1'}), 6.96 (d, 1H, H_{5'}, *J* = 7.2 Hz), 8.12 (s, 1H, H_{triazol}), 8.86 (d, 1H, H₆, *J* = 7.2 Hz), 9.25 (s, 1H, H_{triazol}) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): δ -5.3 (Si-CH₃), -5.2 (Si-CH₃), -4.8 (Si-CH₃), -4.4 (Si-CH₃), 18.2 (SiCMe₃), 18.7 (SiCMe₃), 25.8 (CH₃-^tBu), 26.2 (CH₃-^tBu), 58.6 (O-CH₃), 60.2 (C_{5'}), 67.6 (C_{3'}), 83.6 (C_{4'}), 84.0 (C_{2'}), 89.4 (C_{1'}), 94.3 (C₅), 143.4 (C_{triazol}), 147.3 (C₆), 154.1 (C_{triazol}), 154.4 (C₂), 159.4 (C₄) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₂₄H₄₄N₅O₅Si₂ [M+H]⁺: 538.2875. Encontrada: 538.2872
- Calculada para C₂₄H₄₃N₅NaO₅Si₂ [M+Na]⁺: 560.2695. Encontrada: 560.2691
- Calculada para C₂₄H₄₃KN₅O₅Si₂ [M+K]⁺: 576.2434. Encontrada: 576.2432

3',5'-Bis-*O*-(*tert*-butildimetilsilil)-2'-*O*-metil-L-citidina (61)



Sólido blanco

P_f: 104-105 °C

R_f: 0.57 (10% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula y masa moleculares: C₂₂H₄₃N₃O₅Si₂ y 485.76 g/mol

IR: ν 3335, 3005, 2990, 1639 cm⁻¹.

¹H-RMN (300.13 MHz, CDCl₃): δ 0.05 (s, 3H, Si-Me), 0.07 (s, 3H, Si-Me), 0.10 (s, 3H, Si-Me), 0.11 (s, 3H, Si-Me), 0.88 (s, 9H, Si-^{*t*}Bu), 0.93 (s, 9H, Si-^{*t*}Bu), 3.60 (m, 1H, H_{2'}), 3.62 (s, 3H, O-Me), 3.77 (d, 1H, H_{5'}, *J* = 10.6 Hz), 4.05 (m, 2H, H_{4'} + H_{5'}), 4.18 (dd, 1H, H_{3'}, *J* = 8.5, 4.7 Hz), 5.65 (d, 1H, H_{5'}, *J* = 7.4 Hz), 5.94 (s, 1H, H_{1'}), 8.15 (s, 2H, NH₂), 8.17 (d, 1H, H₆, *J* = 2.1 Hz) ppm.

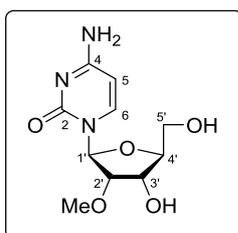
¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): δ -5.4 (Si-CH₃), -5.3 (Si-CH₃), -4.8 (Si-CH₃), -4.4 (Si-CH₃), 18.2 (SiCMe₃), 18.6 (SiCMe₃), 25.8 (CH₃-^{*t*}Bu), 26.1 (CH₃-^{*t*}Bu), 58.3 (O-CH₃), 60.5 (C_{5'}), 68.1 (C_{3'}), 83.1 (C_{4'}), 84.3 (C_{2'}), 88.3 (C_{1'}), 94.2 (C₅), 141.5 (C₆), 156.0 (C₂), 166.0 (C₄) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₂₂H₄₄N₃O₅Si₂ [M+H]⁺: 486.2814. Encontrada: 486.2810
- Calculada para C₂₂H₄₃N₃NaO₅Si₂ [M+Na]⁺: 508.2633. Encontrada: 508.2629
- Calculada para C₂₂H₄₃KN₃O₅Si₂ [M+K]⁺: 524.2373. Encontrada: 524.2368

Parte Experimental -----

2'-O-Metil-L-citidina (62)



Sólido blanco

P_f: 252-253 °C

R_f: 0.48 (30% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₁₀H₁₅N₃O₅

Masa molecular: 257.24 g/mol

IR: ν 3322, 3179, 3005, 2990, 2360, 1639 cm⁻¹.

¹H-RMN (300.13 MHz, D₂O): δ 3.51 (s, 3H, O-Me), 3.79 (dd, 1H, H_{5'}, $J = 12.9, 4.3$ Hz), 3.92 (dd, 1H, H_{5'}, $J = 12.9, 2.8$ Hz), 3.98 (dd, 1H, H_{2'}, $J = 5.2, 3.5$ Hz), 4.07 (m, 1H, H_{4'}), 4.27 (dd, 1H, H_{3'}, $J = 6.4, 5.5$ Hz), 5.94 (d, 1H, H_{1'}, $J = 3.4$ Hz), 6.03 (d, 1H, H₅, $J = 7.6$ Hz), 7.86 (d, 1H, H₆, $J = 7.6$ Hz) ppm.

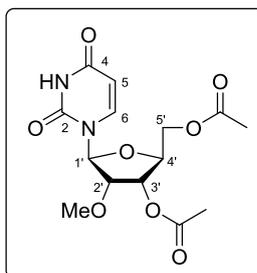
¹³C-RMN (75.5 MHz, D₂O): δ 58.2 (CH₃), 60.4 (C_{5'}), 68.1 (C_{3'}), 82.9 (C_{2'}), 83.8 (C_{4'}), 88.4 (C_{1'}), 96.1 (C₅), 141.6 (C₆), 156.9 (C₂), 165.9 (C₄) ppm.

EMAR (ESI⁺, m/z):

- Calculada para C₁₀H₁₆N₃O₅ [M+H]⁺: 258.1084. Encontrada: 258.1092

- Calculada para C₁₀H₁₅N₃NaO₅ [M+Na]⁺: 280.0904. Encontrada: 280.0910

3',5'-di-*O*-Acetil-2'-*O*-metil-L-uridina (63)



Sólido blanco

P_f: 60-61 °C

R_f: 0.31 (80% AcOEt/Hexano)

Fórmula molecular: C₁₄H₁₈N₂O₈

Masa molecular: 342.30 g/mol

IR: ν 3328, 3196, 3005, 2990, 1641, 1608 cm⁻¹.

¹H-RMN (300.13 MHz, CDCl₃): δ 2.12 (s, 3H, OCO-*Me*), 2.14 (s, 3H, OCO-*Me*), 3.47 (s, 3H, O-*Me*), 4.04 (dd, 1H, H_{2'}, $J = 5.3, 3.4$ Hz), 4.36 (m, 3H, H_{4'} + H_{5'}), 4.98 (t, 1H, H_{3'}, $J = 5.8$ Hz), 5.76 (d, 1H, H₅, $J = 8.2$ Hz), 5.91 (d, 1H, H_{1'}, $J = 3.3$ Hz), 7.53 (d, 1H, H₆, $J = 8.1$ Hz), 9.52 (sa, 1H, NH) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): δ 20.8 (OCO-CH₃), 20.9 (OCO-CH₃), 59.2 (O-CH₃), 62.6 (C_{5'}), 70.0 (C_{3'}), 79.3 (C_{4'}), 81.7 (C_{2'}), 88.7 (C_{1'}), 102.8 (C₅), 139.3 (C₆), 150.2 (C₂), 163.2 (C₄), 170.3 (2 OC=O) ppm.

EMAR (ESI⁺, m/z):

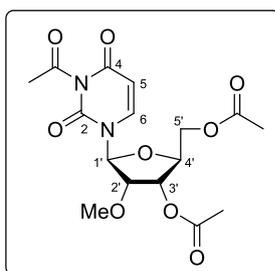
- Calculada para C₁₄H₁₉N₂O₈ [M+H]⁺: 343.1136. Encontrada: 343.1142

- Calculada para C₁₄H₁₈N₂NaO₈ [M+Na]⁺: 365.0955. Encontrada: 365.0963

- Calculada para C₁₄H₁₈KN₂O₈ [M+K]⁺: 381.0695. Encontrada: 381.0703

Parte Experimental -----

***N*-Acetil-3',5'-di-*O*-acetil-2'-*O*-metil-L-uridina (64)**



Sólido blanco

P_f: 120-121.5 °C

R_f: 0.48 (80% AcOEt/Hexano)

Fórmula molecular: C₁₆H₂₀N₂O₉

Masa molecular: 384.34 g/mol

IR: ν 3005, 2990, 1737, 1654 cm⁻¹.

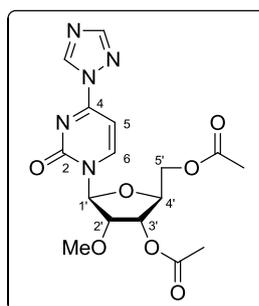
¹H-RMN (300.13 MHz, CDCl₃): δ 2.09 (s, 3H, OCO-*Me*), 2.12 (s, 3H, OCO-*Me*), 2.55 (s, 3H, NCO-*Me*), 3.45 (s, 3H, O-*Me*), 4.05 (dd, 1H, H_{2'}, *J* = 5.1, 3.0 Hz), 4.34 (m, 3H, H_{4'} + H_{5'}), 4.94 (dd, 1H, H_{3'}, *J* = 6.3, 5.2 Hz), 5.75 (d, 1H, H_{5'}, *J* = 8.2 Hz), 5.83 (d, 1H, H_{1'}, *J* = 2.9 Hz), 7.54 (d, 1H, H_{6'}, *J* = 8.2 Hz) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): δ 20.7 (OCO-CH₃), 20.8 (OCO-CH₃), 27.7 (NCO-CH₃), 59.1 (O-CH₃), 62.3 (C_{5'}), 69.8 (C_{3'}), 79.3 (C_{4'}), 81.5 (C_{2'}), 89.0 (C_{1'}), 102.6 (C₅), 138.9 (C₆), 148.5 (C₂), 161.2 (C₄), 170.1 (2 OC=O), 172.7 (NC=O) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₁₆H₂₁N₂O₉ [M+H]⁺: 385.1242. Encontrada: 385.1249
- Calculada para C₁₆H₂₀N₂NaO₉ [M+Na]⁺: 407.1061. Encontrada: 407.1069
- Calculada para C₁₆H₂₀KN₂O₉ [M+K]⁺: 423.0800. Encontrada: 423.0809

3',5'-di-*O*-Acetil-2'-*O*-metil-4-(1,2,4-triazol-1-il)-L-citidina (65)



Sólido blanco

P_f: 160-161 °C

R_f: 0.23 (80% AcOEt/Hexano)

Fórmula molecular: C₁₆H₁₉N₅O₇

Masa molecular: 393.35 g/mol

¹H-RMN (300.13 MHz, CDCl₃): δ 2.14 (s, 3H, OCO-*Me*), 2.16 (s, 3H, OCO-*Me*), 3.64 (s, 3H, O-*Me*), 4.17 (dd, 1H, H_{2'}, *J* = 5.0, 1.5 Hz), 4.44 (t, 2H, H_{5'}, *J* = 3.1 Hz), 4.54 (dt, 1H, H_{4'}, *J* = 9.1, 2.7 Hz), 4.79 (dd, 1H, H_{3'}, *J* = 9.1, 5.0 Hz), 6.01 (d, 1H, H_{1'}, *J* = 1.4 Hz), 7.08 (d, 1H, H₅, *J* = 7.3 Hz), 8.13 (s, 1H, H_{triazol}), 8.41 (d, 1H, H₆, *J* = 7.3 Hz), 9.26 (s, 1H, H_{triazol}) ppm.

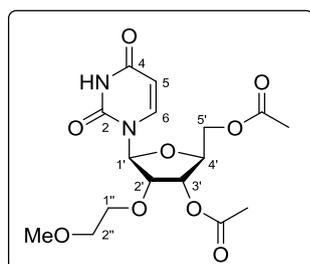
¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): δ 20.7 (OCO-CH₃), 21.0 (OCO-CH₃), 59.3 (O-CH₃), 61.7 (C_{5'}), 69.1 (C_{3'}), 79.1 (C_{4'}), 81.8 (C_{2'}), 90.5 (C_{1'}), 94.7 (C₅), 143.5 (C_{triazol}), 145.8 (C₆), 154.1 (C₂), 154.3 (C_{triazol}), 159.6 (C₄), 170.1 (OC=O), 170.2 (OC=O) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₁₆H₂₀N₅O₇ [M+H]⁺: 394.1357. Encontrada: 394.1353
- Calculada para C₁₆H₁₉N₅NaO₇ [M+Na]⁺: 416.1177. Encontrada: 416.1172
- Calculada para C₁₆H₁₉KN₅O₇ [M+K]⁺: 432.0916. Encontrada: 432.0912

Parte Experimental -----

3',5'-di-O-Acetil-2'-O-(2-metoxietil)-L-uridina (66)



Aceite transparente

R_f: 0.45 (AcOEt)

Fórmula molecular: C₁₆H₂₂N₂O₉

Masa molecular: 386.35 g/mol

IR: ν 3328, 3197, 3005, 2990, 1642, 1608 cm⁻¹.

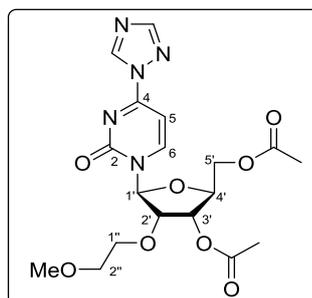
¹H-RMN (300.13 MHz, CDCl₃): δ 2.12 (s, 3H, OCO-Me), 2.14 (s, 3H, OCO-Me), 3.30 (s, 3H, O-Me), 3.47 (m, 2H, H_{2''}), 3.68 (m, 1H, H_{1''}), 3.82 (m, 1H, H_{1''}), 4.30 (dd, 1H, H_{2'}, *J* = 5.5, 3.9 Hz), 4.34 (d, 2H, H_{5'}, *J* = 3.4 Hz), 4.40 (dt, 1H, H_{4'}, *J* = 6.3, 3.3 Hz), 4.98 (t, 1H, H_{3'}, *J* = 5.9 Hz), 5.74 (d, 1H, H_{5'}, *J* = 8.1 Hz), 5.89 (d, 1H, H_{1'}, *J* = 3.8 Hz), 7.50 (d, 1H, H₆, *J* = 8.2 Hz), 9.35 (sa, 1H, NH) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): δ 20.7 (OCO-CH₃), 20.9 (OCO-CH₃), 59.1 (O-CH₃), 62.8 (C_{5'}), 70.3 (C_{3'}), 70.7 (C_{1''}), 72.2 (C_{2''}), 79.4 (C_{4'}), 80.4 (C_{2'}), 89.3 (C_{1'}), 102.6 (C₅), 139.7 (C₆), 150.2 (C₂), 163.2 (C₄), 170.28 (OC=O), 170.34 (OC=O) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₁₆H₂₃N₂O₉ [M+H]⁺: 387.1398. Encontrada: 387.1406
- Calculada para C₁₆H₂₂N₂NaO₉ [M+Na]⁺: 409.1218. Encontrada: 409.1226
- Calculada para C₁₆H₂₂KN₂O₉ [M+K]⁺: 425.0957. Encontrada: 425.0966

**3',5'-di-*O*-Acetil-2'-*O*-(2-metoxietil)-4-(1,2,4-triazol-1-il)-L-citidina
(67)**



Sólido blanco

P_f: 131-133 °C

R_f: 0.29 (AcOEt)

Fórmula y masa moleculares: C₁₈H₂₅N₅O₈ y 439.42 g/mol

¹H-RMN (300.13 MHz, CDCl₃): δ 2.12 (s, 3H, OCO-*Me*), 2.14 (s, 3H, OCO-*Me*), 3.33 (s, 3H, O-*Me*), 3.52 (t, 2H, H_{2''}, *J* = 4.4 Hz), 3.85 (dt, 1H, H_{1''}, *J* = 11.7, 4.2 Hz), 4.08 (dt, 1H, H_{1''}, *J* = 11.6, 4.6 Hz), 4.36 (dd, 1H, H_{2'}, *J* = 5.0, 1.5 Hz), 4.43 (m, 2H, H_{5'}), 4.60 (dt, 1H, H_{4'}, *J* = 9.0, 2.6 Hz), 4.76 (dd, 1H, H_{3'}, *J* = 8.9, 5.1 Hz), 5.98 (d, 1H, H_{1'}, *J* = 1.4 Hz), 7.07 (d, 1H, H₅, *J* = 7.3 Hz), 8.13 (s, 1H, H_{triazol}), 8.39 (d, 1H, H₆, *J* = 7.3 Hz), 9.26 (s, 1H, H_{triazol}) ppm..

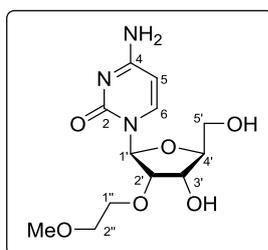
¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): δ 20.6 (OCO-CH₃), 21.0 (OCO-CH₃), 59.0 (O-CH₃), 61.8 (C_{5'}), 69.3 (C_{3'}), 70.6 (C_{1''}), 71.6 (C_{2''}), 79.3 (C_{4'}), 80.4 (C_{2'}), 91.4 (C_{1'}), 94.7 (C₅), 143.5 (C_{triazol}), 145.9 (C₆), 154.19 (C₂), 154.23 (C_{triazol}), 159.6 (C₄), 170.1 (OC=O), 170.3 (OC=O) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₁₈H₂₄N₅O₈ [M+H]⁺: 438.1619. Encontrada: 438.1614
- Calculada para C₁₈H₂₃N₅NaO₈ [M+Na]⁺: 460.1439. Encontrada: 460.1435
- Calculada para C₁₈H₂₃KN₅O₈ [M+K]⁺: 476.1178. Encontrada: 476.1173

Parte Experimental -----

2'-O-(2-Metoxietil)-L-citidina (68)



Sólido blanco

P_f: 153-155 °C

R_f: 0.35 (20% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₁₂H₁₉N₃O₆

Masa molecular: 301.30 g/mol

IR: ν 3321, 3178, 3005, 2990, 2358, 1639 cm⁻¹.

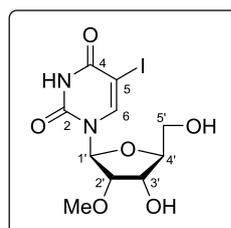
¹H-RMN (300.13 MHz, D₂O): δ 3.32 (s, 3H, O-Me), 3.60 (t, 2H, H_{2''}, $J = 4.4$), 3.73-3.91 (varios m, 4H, H_{5'} + H_{1''}), 4.08 (m, 2H, H_{2'} + H_{4'}), 4.23 (dd, 1H, H_{3'}, $J = 6.3, 5.4$ Hz), 5.91 (d, 1H, H_{1'}, $J = 3.6$ Hz), 6.00 (d, 1H, H₅, $J = 7.6$ Hz), 7.82 (d, 1H, H₆, $J = 7.6$ Hz) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, D₂O): δ 58.0 (O-CH₃), 60.4 (C_{5'}), 68.3 (C_{3'}), 69.5 (C_{1''}), 71.2 (C_{2''}), 81.7 (C_{2'}), 83.7 (C_{4'}), 88.7 (C_{1'}), 96.1 (C₅), 141.6 (C₆), 157.2 (C₂), 166.0 (C₄) ppm.

EMAR (ESI⁺, m/z):

- Calculada para C₁₂H₂₀N₃O₆ [M+H]⁺: 302.1347. Encontrada: 302.1342

2'-O-Metil-L-5-iodouridina (69)



Sólido amarillo pálido

P_f: 241-243 °C

R_f: 0.31 (10% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₁₀H₁₃IN₂O₆

Masa molecular: 384.12 g/mol

IR: ν 3459, 3380, 3005, 2990, 1653 cm⁻¹.

¹H-RMN (300.13 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3.37 (s, 3H, O-Me), 3.57 (m, 1H, H_{5'}), 3.70 (m, 1H, H_{5'}), 3.78 (t, 1H, H_{2'}, *J* = 4.5 Hz), 3.85 (m, 1H, H_{4'}), 4.11 (q, 1H, H_{3'}, *J* = 5.2 Hz), 5.19 (d, 1H, OH_{3'}, *J* = 6.0 Hz), 5.35 (sa, 1H, OH_{5'}), 5.78 (d, 1H, H_{1'}, *J* = 3.8 Hz), 8.53 (s, 1H, H₆) ppm.

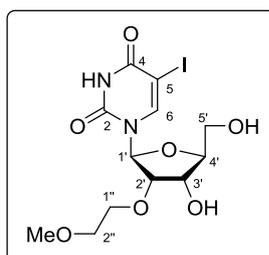
¹³C-RMN (75.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ 57.7 (CH₃), 59.7 (C_{5'}), 67.9 (C_{3'}), 69.5 (C₅), 83.2 (C_{2'}), 84.9 (C_{4'}), 86.6 (C_{1'}), 145.0 (C₆), 150.3 (C₂), 160.7 (C₄) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₁₀H₁₄IN₂O₆ [M+H]⁺: 384.9891. Encontrada: 384.9898
- Calculada para C₁₀H₁₃IN₂NaO₆ [M+Na]⁺: 406.9711. Encontrada: 406.9720
- Calculada para C₁₀H₁₃IKN₂O₆ [M+K]⁺: 422.9450. Encontrada: 422.9461

Parte Experimental -----

2'-O-(2-Metoxietil)-L-5-iodouridina (70)



Sólido blanco

P_f: 62-63 °C

R_f: 0.47 (10% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₁₂H₁₇IN₂O₇

Masa molecular: 428.18 g/mol

IR: ν 3458, 3376, 3005, 2990, 1649 cm⁻¹.

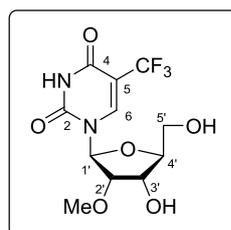
¹H-RMN (300.13 MHz, D₂O): δ 3.33 (s, 3H, O-Me), 3.61 (t, 2H, H_{2''}, $J = 4.4$ Hz), 3.80 (m, 3H, H_{5'} + H_{1''}), 3.93 (dd, 1H, H_{5'}, $J = 13.0, 2.7$ Hz), 4.09 (m, 2H, H_{2'} + H_{4'}), 4.27 (dd, 1H, H_{3'}, $J = 6.8, 5.2$ Hz), 5.88 (d, 1H, H_{1'}, $J = 3.1$ Hz), 8.46 (s, 1H, H₆) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, D₂O): δ 58.1 (CH₃), 59.6 (C_{5'}), 67.6 (C₅), 67.8 (C_{3'}), 69.5 (C_{1''}), 71.2 (C_{2''}), 81.8 (C_{2'}), 83.9 (C_{4'}), 87.9 (C_{1'}), 146.1 (C₆), 151.1 (C₂), 163.0 (C₄) ppm.

EMAR (ESI⁺, m/z):

- Calculada para C₁₂H₁₈IN₂O₇ [M+H]⁺: 429.0153. Encontrada: 429.0142
- Calculada para C₁₂H₁₇IN₂NaO₇ [M+Na]⁺: 450.9973. Encontrada: 450.9961
- Calculada para C₁₂H₁₇IKN₂O₇ [M+K]⁺: 466.9712. Encontrada: 466.9699

2'-O-Metil-L-5-trifluorometiluridina (71)



Aceite transparente

R_f: 0.3 (10% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₁₁H₁₃F₃N₂O₆

Masa molecular: 326.23 g/mol

¹H-RMN (300.13 MHz, MeOD-*d*₄): δ 3.58 (s, 3H, O-*Me*), 3.77 (dd, 1H, H_{5'}, *J* = 12.1, 1.6 Hz), 3.86 (dd, 1H, H_{2'}, *J* = 4.9, 2.0 Hz), 3.98 (m, 2H, H_{4'} + H_{5'}), 4.26 (dd, 1H, H_{3'}, *J* = 7.4, 5.0 Hz), 5.92 (d, 1H, H_{1'}, *J* = 1.9 Hz), 9.00 (d, 1H, H₆, *J* = 1.0 Hz) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOD-*d*₄): δ 58.9 (CH₃), 60.3 (C_{5'}), 68.9 (C_{3'}), 85.4 (C_{2'}), 85.7 (C_{4'}), 89.3 (C_{1'}), 105.2 (q, C₅, *J* = 33.0 Hz), 124.0 (q, CF₃, *J* = 269.1 Hz), 143.7 (q, C₆, *J* = 5.8 Hz), 151.3 (C₂), 161.3 (C₄) ppm.

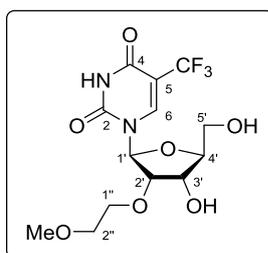
¹⁹F-RMN (282 MHz, MeOD-*d*₄): -64.4 ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₁₁H₁₄F₃N₂O₆ [M+H]⁺: 327.0798. Encontrada: 327.0800
- Calculada para C₁₁H₁₃F₃N₂NaO₆ [M+Na]⁺: 349.0618. Encontrada: 349.0626
- Calculada para C₁₁H₁₃F₃KN₂O₆ [M+K]⁺: 365.0357. Encontrada: 365.0358

Parte Experimental -----

2'-O-(2-Metoxietil)-L-5-trifluorometiluridina (72)



Aceite transparente

R_f: 0.35 (10% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula molecular: C₁₃H₁₇F₃N₂O₇

Masa molecular: 370.28 g/mol

¹H-RMN (300.13 MHz, MeOD-*d*₄): δ 3.38 (s, 3H, O-*Me*), 3.60 (t, 2H, H_{2''}, *J* = 4.5 Hz), 3.77 (dd, 1H, H_{5'}, *J* = 12.2, 1.8 Hz), 3.83 (m, 1H, H_{1''}), 3.93 (m, 1H, H_{5'}), 3.96 (m, 1H, H_{1''}), 4.04 (m, 2H, H_{2'} + H_{4'}), 4.24 (dd, 1H, H_{3'}, *J* = 7.0, 5.0 Hz), 5.93 (d, 1H, H_{1'}, *J* = 2.4 Hz), 8.97 (d, 1H, H₆, *J* = 1.0 Hz) ppm.

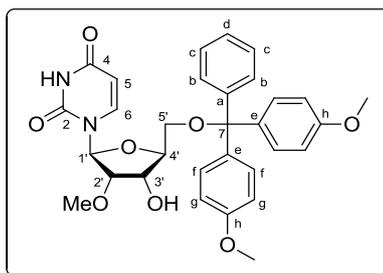
¹³C-RMN (75.5 MHz, MeOD-*d*₄): δ 59.2 (CH₃), 60.6 (C_{5'}), 69.4 (C_{3'}), 70.9 (C_{1''}), 73.0 (C_{2''}), 84.2 (C_{2'}), 86.0 (C_{4'}), 89.7 (C_{1'}), 105.3 (q, C₅, *J* = 32.7 Hz), 124.0 (q, CF₃, *J* = 268.7 Hz), 143.8 (q, C₆, *J* = 5.7 Hz), 151.4 (C₂), 161.3 (C₄) ppm.

¹⁹F-RMN (282 MHz, MeOD-*d*₄): -64.4 ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₁₃H₁₈F₃N₂O₇ [M+H]⁺: 371.1061. Encontrada: 371.1063
- Calculada para C₁₃H₁₇F₃N₂NaO₇ [M+Na]⁺: 393.0880. Encontrada: 393.0883
- Calculada para C₁₃H₁₇F₃KN₂O₇ [M+K]⁺: 409.0619. Encontrada: 409.0623

5'-O-(4,4'-Dimetoxitritil)-2'-O-metil-L-uridina (73)



Sólido blanco

P_f: descompone a partir de 97 °C

R_f: 0.44 (5% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula y masa moleculares: C₃₁H₃₂N₂O₈ y 560.59 g/mol

IR: ν 3326, 3010, 2990, 1643, 1520 cm⁻¹.

¹H-RMN (300.13 MHz, CDCl₃): δ 3.54 (m, 2H, H_{5'}), 3.64 (s, 3H, O-Me), 3.73 (m, 1H, H_{2'}), 3.76 (s, 6H, Me-DMT), 3.99 (d, 1H, H_{4'}, *J* = 7.9 Hz), 4.47 (dd, 1H, H_{3'}, *J* = 7.7, 5.5 Hz), 5.27 (d, 1H, H₅, *J* = 8.2 Hz), 5.96 (s, 1H, H_{1'}), 6.84 (d, 4H, H_g, *J* = 8.8 Hz), 7.28 (m, 7H, H_c + H_d + H_f), 7.38 (d, 2H, H_b, *J* = 7.5 Hz), 8.03 (d, 1H, H₆, *J* = 8.1 Hz) ppm.

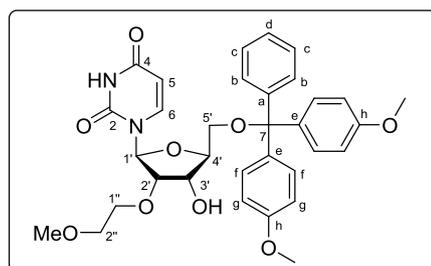
¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): δ 55.4 (2 O-CH₃, DMT), 58.9 (O-CH₃), 61.3 (C_{5'}), 68.5 (C_{3'}), 83.4 (C_{4'}), 84.2 (C_{2'}), 87.15 (C_{1'}), 87.24 (C₇), 102.3 (C₅), 113.4 (4C_g), 127.3, 128.2, 128.3, 130.25, 130.34 (2C_b + 2C_c + C_d + 4C_f), 135.2 (C_e), 135.4 (C_e), 140.2 (C₆), 144.5 (C_a), 150.2 (C₂), 158.8 (C_h), 158.9 (C_h), 163.3 (C₄) ppm.

EMAR (ESI⁺, *m/z*):

- Calculada para C₃₁H₃₃N₂O₈ [M+H]⁺: 561.2231. Encontrada: 561.2210
- Calculada para C₃₁H₃₂N₂NaO₈ [M+Na]⁺: 583.2051. Encontrada: 583.2028
- Calculada para C₃₁H₃₂KN₂O₈ [M+K]⁺: 599.1790. Encontrada: 599.1765

Parte Experimental -----

5'-O-(4,4'-Dimetoxitritil)-2'-O-(2-metoxietil)-L-uridina (74)



Sólido blanco

P_f: descompone a partir de 30 °C

R_f: 0.67 (10% MeOH/CH₂Cl₂)

Fórmula y masa moleculares: C₃₃H₃₆N₂O₉ y 604.65 g/mol

IR: ν 3330, 3010, 2990, 1647, 1521 cm⁻¹.

¹H-RMN (300.13 MHz, CDCl₃): δ 3.38 (s, 3H, O-Me), 3.52 (m, 2H, H_{5'}), 3.59 (m, 2H, H_{2''}), 3.78 (m, 1H, H_{1''}), 3.80 (s, 6H, Me-DMT), 4.01 (dd, 1H, H_{2'}, J = 5.0, 2.5 Hz), 4.09 (m, 2H, H_{1''} + H_{4'}), 4.44 (t, 1H, H_{3'}, J = 5.7 Hz), 5.28 (d, 1H, H₅, J = 8.2 Hz), 5.95 (d, 1H, H_{1'}, J = 2.4 Hz), 6.84 (m, 4H, H_g), 7.17 (m, 2H, H_c), 7.28 (m, 5H, H_d + H_f), 7.38 (m, 2H, H_b), 7.97 (d, 1H, H₆, J = 8.2 Hz) ppm.

¹³C-RMN (75.5 MHz, CDCl₃): δ 55.4 (2 O-CH₃, DMT), 59.0 (O-CH₃, MOE), 61.7 (C_{5'}), 68.9 (C_{3'}), 70.4 (C_{1''}), 71.8 (C_{2''}), 83.3 (C_{2'}), 83.5 (C_{4'}), 87.1 (C₇), 87.9 (C_{1'}), 102.2 (C₅), 113.2, 113.4 (4C_g), 127.2, 127.9, 128.1, 128.3, 129.3, 130.2, 130.3 (2C_b + 2C_c + C_d + 4C_f), 135.2 (C_e), 135.5 (C_e), 140.2 (C₆), 144.5 (C_a), 150.4 (C₂), 158.77 (C_h), 158.80 (C_h), 163.6 (C₄) ppm.

EMAR (ESI⁺, m/z):

- Calculada para C₃₃H₃₇N₂O₉ [M+H]⁺: 605.2494. Encontrada: 605.2489
- Calculada para C₃₃H₃₆N₂NaO₉ [M+Na]⁺: 627.2313. Encontrada: 627.2310
- Calculada para C₃₃H₃₆KN₂O₉ [M+K]⁺: 643.2052. Encontrada: 643.2049