



UNIVERSIDAD DE BELGRANO

Las tesis de Belgrano

**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Carrera de Licenciatura en Ciencias Químicas**

**Síntesis de 2'-C-Metilnucleosidos con potencial
aplicación en biosensores**

Nº 102

Rodrigo Pontiggia

Tutor: Luis E. Iglesias

Departamento de Investigación

Abril 2004

Agradecimientos

Al Dr. Javier Montserrat, por haberme guiado durante estos primeros pasos en la investigación pero sobre todo por su gran cariño y por ser un gran maestro a quien respeto y admiro.

Al Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI) y sus autoridades por haberme brindado las facilidades necesarias para la realización de este trabajo.

A la Dra. Mariana Gallo, por ayudarme a asignar los innumerables espectros, por su buen humor y ser una gran amiga.

Al Dr. Adolfo Iribarren por brindarme la oportunidad de formar parte de su equipo y por poseer una gran calidad humana.

Al Dr. Luis Iglesias por haber despertado mi interés por la Química Orgánica.

Al Dr. Marcelo Vernengo, a la Dra. Cecilia Di Rissio y a mis profesores.

A mi abuela Leonor por seguir de cerca mis pasos y acompañarme siempre.

A mis hermanos: Osvaldo y Juan Pablo por estar cuando los necesito.

A Marisa, Laura Lourdes y todas las tardes que compartimos frente a la mesada.

A Paula Iribarren por haberme propuesto para trabajar en el INGENI

A todos mis amigos de la facultad, con quienes pasamos momentos inolvidables

A mis amigos de siempre a quienes siempre les voy a estar agradecido por estar ahí cuando los necesito: Ambi, Cuca, Gaston, Gorto, Janka, Jean Paul, Jota, La Larva, Maida, Manolo, Maria, Mariano, Marto, Naju, Narancho, Edy, Silver, Ori, Pancho, Santiago, Tomas, Tute, Tweety.

A IL Duomo y la gente de "El Puente"

Resumen

El análisis de alimentos se caracteriza por su gran complejidad, esto se debe a la gran variedad de analitos, que van desde macrocomponentes hasta trazas y que se encuentran por lo general en matrices complejas. El equipamiento utilizado rutinariamente en laboratorios como Cromatografos, equipos de absorción atómica, espectrómetros de masa etc. tienen un alto costo y requieren tiempos de análisis prolongados.

Una alternativa al uso de estos costosos equipos son los biosensores. Estos son sensores capaces de reconocer y cuantificar analitos en matrices complejas a través de moléculas específicas inmovilizadas sobre un soporte sólido. El desarrollo de estos sensores comenzó con la utilización de anticuerpos y enzimas, pero los avances en la química de los ácidos nucleicos permitieron reemplazar estas moléculas por oligonucleótidos.

En la actualidad el uso de biosensores con ácidos nucleicos se encuentra limitado por su inestabilidad en los fluidos biológicos, producto de la acción de las nucleasas (enzimas capaces de cortar secuencias de ADN o ARN). Una alternativa a este problema es la incorporación de modificaciones en los nucleótidos que le confieran al oligonucleótido una mayor resistencia.

Las modificaciones en el carbono 2', especialmente la incorporación de un grupo metilo en esta posición confiere una mayor estabilidad a los oligonucleótidos.

El trabajo presenta tres rutas diferentes para la realización de esta modificación, dos de las cuales nunca habían sido llevadas a cabo.

Indice

Introducción	Pág. 1
1.2- Introducción al concepto de Biosensor	Pág. 14
1.3- Principio de funcionamiento de un biosensor	Pág. 15
1.3.1-Sensores electroquímicos	Pág. 16
1.3.a Sensores potenciométricos	Pág. 16
1.3.1.bSensores amperométricos	Pág. 16
1.3.1 c-Sensores conductimétricos y de capacitancia	Pág. 17
1.3.2 Sensores ópticos	Pág. 17
1.3.3-Sensores gravimétricos	Pág. 18
1.4. Utilización de biosensores en el análisis de alimentos	Pág. 18
1.4.2 Biosensores Vs Inmunoensayos	Pág. 20
1.5 Utilización de ácidos nucleicos como ligandos para la fabricación de biosensores	Pág. 22
1.5.1 Reemplazo de anticuerpos por aptameros	Pág. 21
1.5.2.1 Selección de aptameros	Pág. 22
1.5.2.2 Reemplazo de enzimas por Ribozimas	Pág. 24
1.5.2.3 Selección de ribozimas alostericas	Pág. 24
1.6 Limitaciones de los oligonucleótidos naturales para su utilización en fluidos biológicos y la utilización de nucleósidos modificados	Pág. 27
1.7 <i>Antecedentes de las rutas sintéticas para la fabricación de 2'-C-metilnucleósidos</i>	Pág. 30
1.8 Estrategias para la fabricación de Biosensores.	Pág. 31
Parte Experimental	
2.1- Materiales.	Pág. 34
2.2 Métodos generales y equipamiento	Pág. 35
2.3- Síntesis de los nucleósidos	Pág. 36
Discusión y Resultados	
3.1 Síntesis de 2'-C-metiluridina	Pág. 52
3.2 Síntesis de 2'-C-metiladenosina	Pág. 58
4- Conclusión	Pág. 65

Abreviaturas y símbolos

AcOEt	acetato de etilo
ACN	acetonitrilo
AcOH	ácido acético
ADN	ácido desoxirribonucleico
DCA	ácido dicloroacético
<i>TsOH</i>	<i>ácido p-toluensulfónico</i>
ARN	ácido ribonucleico
TCA	ácido tricloroacético
aq.	acuoso
Ac ₂ O	anhídrido acético
anh.	anhidro/a
Bz	bencilo
CDCl ₃	cloroformo deuterado
c.c.d.	cromatografía en placa delgada
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
DMSO	dimetilsulfóxido
<i>DMSO-d₆</i>	<i>dimetilsulfóxido perdeuterado</i>
Et ₂ O	dietil éter
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMF	dimetilformamida
dd	doble doblete
d	doblete
dt	dobletriplete
NOE	Efecto Nuclear Overhauser
eq	equivalente/s
EtOH	etanol
EP	éter de petróleo
Ph	fenilo
TBAF	fluoruro de tetrabutilamonio
<i>UMe</i>	<i>2'-C-metiluridina</i>
MeOH	metanol
m	multiplete
n. d.	no determinado
<i>MNO</i>	<i>óxido de N-metilmorfolina</i>
ppm	partes por millón
Py	piridina
PM	peso molecular
RF	relación de frente
RMN	resonancia magnética nuclear
s	singulete
sa	singulete ancho
ss	solución saturada
THF	tetrahidrofurano
TIPDS	1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano
Ts	tosilo
TEA	triethylamina
t	triplete

Objetivo

El objetivo de este trabajo es establecer rutas sintéticas adecuadas para la preparación de 2'-C-metilnucleosidos en las cantidades necesarias para realizar la síntesis de los 2'-C-metilnucleótidos trifosfato y los posteriores estudios de técnicas de selección molecular para el desarrollo de biosensores.

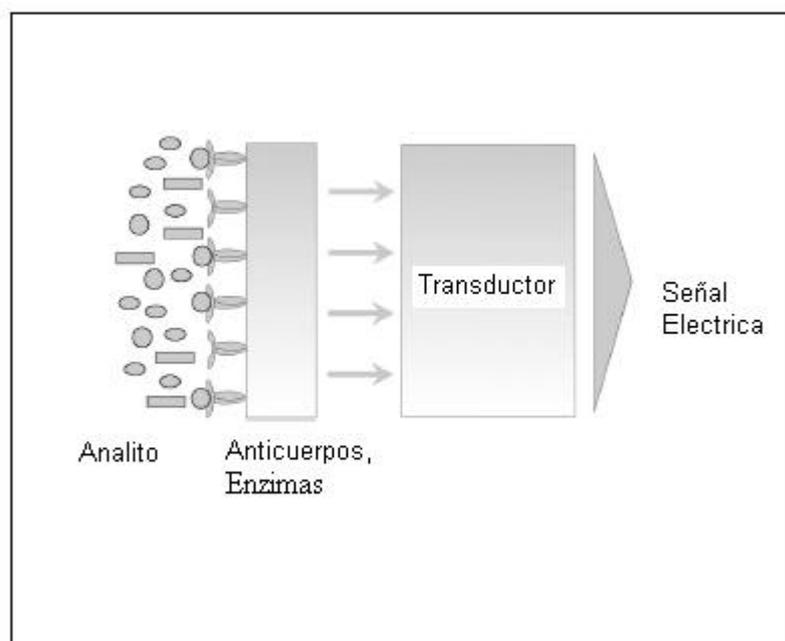
Introducción

La industria de alimentos se caracteriza por la inmensa cantidad de sustancias químicas utilizadas, algunas de ellas forman parte de los alimentos naturalmente, mientras que otras son agregadas con fines específicos como mejorar las propiedades organolépticas o aumentar la vida útil. La identificación de estas sustancias puede requerirse por diversos motivos determinar adulteraciones, falsificaciones, toxicidad, estado higiénico etc. El avance en los estudios de toxicidad y las crecientes exigencias de las legislaciones en materia de inocuidad de los alimentos ha obligado tanto a los productores como a los fiscalizadores a controlar la composición de los productos alimenticios, desde sus macrocomponentes como lípidos, proteínas, hidratos de carbono agua hasta sustancias trazas como metales pesados y toxinas entre otros.

El análisis de alimentos requiere en muchos casos de tiempos prolongados de análisis, y de instrumental sofisticado y costoso, Cromatógrafos Líquidos y Gaseosos, equipos de absorción atómica etc. Recientemente ha cobrado gran impulso la utilización de metodologías alternativas como es el caso de los Biosensores. Estos son dispositivos que tienen la capacidad de cuantificar analitos en matrices complejas en solo minutos, existiendo incluso la posibilidad de acoplarlos en líneas de producción para un monitoreo continuo.

1.2- Utilización de biosensores

Los biosensores son sensores que cuentan con enzimas o ligandos inmovilizados sobre un soporte sólido. Estas moléculas catalizan una reacción química o se unen con el analito, produciendo una señal que es utilizada para detectar y cuantificar el analito. La ventaja fundamental de este método de ensayo reside en su gran especificidad, resultado de un reconocimiento molecular prácticamente único entre ligando y analito. Este principio es similar al utilizado en los inmunoensayos, pero en contraste con estos últimos, los biosensores permiten la cuantificación del complejo molécula-ligando en forma automática y en tiempos más cortos. Estas cualidades permiten su utilización en el análisis continuo de trazas, estudios ambientales y facilitan el control de calidad en industrias como la farmacéutica y la alimenticia. Existen un gran número de publicaciones en este campo y se prevé que en un futuro no muy lejano los biosensores cumplan la función de "inmunoensayos de trabajo continuo".



Si bien en los últimos años ha habido grandes avances en el campo de los biosensores, aún quedan varios problemas por resolver, relacionados en su mayoría con la inmovilización, orientación y propiedades específicas de las moléculas utilizadas sobre la superficie de los transductores.

La figura 1 muestra el esquema básico de un biosensor, en el cual un ligando se une con su contraparte inmovilizada en la superficie del sensor. Este evento de unión es reconocido por el transductor que produce una señal eléctrica y que más tarde es analizada por un procesador para cuantificar al analito.

1.3-Principio de funcionamiento de un biosensor

En términos generales existen dos tipos de biosensores, los biocatalíticos y los de bio-afinidad. Los sensores biocatalíticos utilizan en su gran mayoría enzimas que catalizan una reacción bioquímica, esta produce la señal que luego es procesada para la cuantificación del analito. Los de bio-afinidad, están diseñados para monitorear la unión entre el analito y su ligando.

Existen cuatro tipos de aparatos de detección capaces de transformar el evento de unión del analito o la reacción química en una señal cuantificable: electroquímicos (potenciométricos, amperométricos o conductimétricos/capacitancia), ópticos, microgravimétricos y termométricos. Cada uno de ellos puede funcionar en forma directa (sin marcar) o indirecta (a través de marcas). Las marcas son sustancias utilizadas para generar una señal y que se acoplan en algún componente del sensor, un claro ejemplo de esto es el sensor óptico que registra la desaparición de la señal generada por un ligando marcado con fluoresceína por competencia con el analito natural en la muestra a analizar¹. La diferencia de fluorescencia es la señal que utilizada para la determinación de la concentración del analito. Por su parte los sensores de funcionamiento directo miden cambios electroquímicos, ópticos o de otras propiedades físicas en el momento de la formación del complejo con el ligando.-

Aunque los biosensores que utilizan marcadores son altamente sensibles, la concepción de un sensor directo es interesante por su simplicidad y representa una alternativa a los inmunoensayos, además de ofrecer la posibilidad de desarrollar sistemas de monitoreo continuo.

Si bien el funcionamiento de estos sensores escapa a los alcances de este trabajo, resulta interesante introducir algunos conceptos básicos para comprender cómo funcionan estos dispositivos, por lo que a continuación se describe brevemente el funcionamiento de los mismos.

1.3.1-Sensores electroquímicos

1.3.1a-Sensores Potenciométricos

El fundamento teórico de estos sensores es la ecuación de Nernst. De acuerdo con esta ecuación los cambios de potencial son logaritmicamente proporcionales a la actividad específica de las especies iónicas participantes del equilibrio. Estos tipos de electrodos son capaces de medir cambios de potencial superficiales a corrientes cercanas a cero y han sido diseñados a partir de las siguientes estrategias:

- Potencial transmembrana: El electrodo detecta la diferencia de potencial generada de un lado y del otro de una membrana selectiva. El antígeno o anticuerpo inmovilizado sobre la membrana se une con el correspondiente compuesto de la solución y cambia el potencial a un lado y el otro de la membrana.
- Potencial del electrodo: Este dispositivo es similar al descrito anteriormente, pero en este caso es en la superficie del electrodo donde se forma el complejo antígeno-anticuerpo, produciéndose un cambio de potencial relacionado con la concentración del analito en solución.

Los sensores potenciométricos son pequeños y de fácil operación además pueden ser automatizados. Sin embargo sufren problemas de sensibilidad y se ven muy afectados por uniones no específicas, por lo que la relación señal-ruido causa problemas analíticos difíciles de resolver.

1.3.1.b-Sensores Amperométricos

Estos sensores están diseñados para medir la corriente generada por una reacción electroquímica a un voltaje constante. Existen pocas aplicaciones prácticas ya que son pocas las enzimas capaces de intervenir en reacciones redox, por lo que se necesitan marcadores electroquímicamente activos. Los electrodos de oxígeno y de H₂O₂ son los más utilizados. Un sistema novedoso consiste en la utilización de un polímero con propiedades de óxido-reducción [PVP-Os(bipiridil)₂Cl]; el cual es co-inmovilizado con anticuerpos específicos². Si bien estos sensores presentan la desventaja de tener un funcionamiento indirecto, cuentan con una excelente sensibilidad. Esto se debe a la relación lineal con la concentración del analito, comparado con la relación logarítmica utilizada en los sistemas potenciométricos.

1. Lopez et al. Electrochemical immunosensor for the detection of Atrazine. *J Mol Recognit* **1998** 11: 178 81

2. Lopez et al. Electrochemical immunosensor for the detection of Atrazine. *J Mol Recognit* **1998** 11: 178 81

1.3.1c-Sensores conductimétricos y de capacitancia

Estos dispositivos miden las alteraciones en la conductividad de una solución a voltaje constante causadas por reacciones bioquímicas que específicamente consumen o producen iones. Estos cambios se miden utilizando electrodos de un metal noble en los cuales se inmovilizan los elementos bioactivos; la formación del complejo receptor–ligando causa una disminución en la conductividad entre electrodos.

La desventaja que presentan estos sensores es que la alta fuerza iónica de las matrices biológicas dificultan la detección de los cambios de conductividad pequeños causados por la reacción bioquímica. Para solucionar este problema se han creado sensores conductimétricos acoplados a canales iónicos³. El funcionamiento de este sistema se basa en el hecho de que la conductancia de un grupo de canales iónicos, alineados en una membrana bilipídica, va a ser afectada por el evento de unión del anticuerpo con el antígeno. Este tipo de sensor es menos afectado por las uniones no específicas.

1.3.2 Sensores ópticos

Los sensores ópticos son los más utilizados, y existen en el mercado un gran número de este tipo de transductores. Estos dispositivos presentan la ventaja de ser no destructivos y de generar la señal en cortos periodos de tiempo.

Las propiedades físicas utilizadas para cuantificar el analito son varias: cambios en la absorción, fluorescencia, luminiscencia e índice de refracción sobre la superficie del sensor entre otras.

Existen sensores ópticos tanto para sistemas de detección directa como indirectos. Los marcadores más comunes son fluorescentes, pero también existen bio y quimiolumiscentes.⁴

Al igual que en los casos anteriores, los sistemas de detección directos tienen la desventaja de presentar problemas causados por la unión no específica, produciendo señales falsas. Sin embargo estos problemas pueden ser resueltos introduciendo una región de referencia en el chip, como en el caso descrito por Scheinder *et al*⁵ quienes desarrollaron un sensor para medir interferón en suero humano con gran sensibilidad.

1.3.3-Sensores Gravimétricos

Si bien el aumento en la masa del sensor producto de la unión del analito con el ligando inmovilizado es casi despreciable, existen dispositivos capaces de detectar estos cambios por medio de sensores acústicos. El principio de funcionamiento está basado en la propagación de ondas en el sensor, la fase y velocidad de la onda acústica están influenciados por la adsorción del analito a la superficie del biosensor.

1.4.1-Utilización de biosensores en el análisis de alimentos

Estos dispositivos le deben su amplitud de aplicación al hecho de que en teoría se podría utilizar cualquier par analito-ligando imaginable, y que además sería posible utilizar enzimas que catalicen reacciones que generen alguna variación cuantificable por alguno de los métodos descritos anteriormente. Si bien existen diversos aspectos que deben ser mejorados como la interferencia causada por la unión inespecífica de ligandos y la regeneración de los sensores, los resultados publicados hasta este momento son prometedores.

Existen diversas aplicaciones que van más allá de la química clínica que fue el área donde esta tecnología comenzó a desarrollarse. Hoy es posible encontrar ejemplos en áreas como bacteriología, virología, monitoreo de alimentos y procesos higiénicos, detección de pesticidas y herbicidas entre otros. En la figura 2 se describen algunos de los sensores recientemente desarrollados de interés en el campo de los alimentos.

Uno de los ejemplos más interesantes en este campo es el sensor fabricado por T. Chiyo *et al.* quienes aplicaron esta novedosa tecnología al control de calidad en la producción de Sake⁶. Este sensor no solo permite determinar la calidad del Sake rápidamente sino que además permite proveer las condiciones del sake al final de fermentación que es de varias semanas a partir de bases de datos existentes.

3. Cornell BA *et al.* A biosensor that uses ion-channel switches, *Nature* **1997**;387:5803

4. Luppá P *et al.* Immunosensors-principles an applications to clinical chemistry. *Clin. Chim Acta* **2001** 314 26.

5. Schneider BH *et al.* Highly sensitive optical chip immunoassay in human serum. *Biosens Bioelectron* **2000**;15:13 22

6. T. Chiyo, K. Matsui, Y. Murakami, K. Yokoyama, E. Tamiya, Yeast-immobilized SPV device for koji quality control in sake brewing process, *Biosens Bioelectron*. **2001** 10021 16.

Autor	Aplicación	Método de detección
7	Pesticida	Óptico
8	Atrazina	Óptico
9	Progesterona en leche	Inmuncromatográfico
10	Organofosfatos	Potenciometrico-enzimatico
11	Fumonisinias	Bidifractivo
12	Susnaticias tóxicas	Electroquímico-enzima
13	Pesticidas organofosforados	Amperométrico
14	Contaminantes en agua	Afinidad
15	Herbecidas	Óptico

Figura 2-Aplicación de biosensores en industria de los alimentos

Una de las dificultades que presenta el análisis de alimentos es que en muchos casos es necesario determinar componentes a nivel de trazas, como en el caso de metales pesados, micotoxinas, residuos de antibióticos etc. Este hecho plantea un nuevo interrogante: ¿son los biosensores lo suficientemente sensibles para su utilización en la cuantificación de trazas?

Existen numerosas publicaciones que describen sistemas con límites de detección por debajo de los logrados por metodologías convencionales, como cromatografía líquida de alta presión, cromatografía gaseosa etc. El sistema amperométrico descrito por Skládal et al.¹⁶, es capaz de medir concentraciones de ácido 2,4-diclorofenoxiacético en el orden de 0.1 microgramos por litro.

El sistema desarrollado por Rippeth, et al. que consiste en un sistema de inyección líquida con un electrodo con Acetilcolinesterasa inmovilizada¹⁷, no solo es capaz de detectar pesticidas organofosforados en una concentración de 4×10^{-11} moles por litro sino que puede realizar mediciones en agua de río a campo abierto, evitando de esta forma las modificaciones que puede sufrir la muestra hasta que es llevada a un laboratorio. Este sensor además probó ser estable durante más de 80 días en condiciones óptimas de almacenamiento.

Otro de los requerimientos de los análisis de alimentos es que estos se lleven a cabo en el menor tiempo posible, en este sentido un ejemplo del corto tiempo de análisis requerido por los biosensores el sistema descartable con detección amperométrica para la cuantificación de pesticidas¹⁸ desarrollado por A.J. Baumner et al. que a pesar necesitar mejoras para poder realizar pruebas de campo (desviación estándar máxima de 39% en muestras reales), se lograron niveles de detección de atrazina y terbutilazina por debajo de 1 microgramo por litro, con un tiempo de ensayo de tan solo ocho minutos una vez realizada la curva de calibración.

7. Bier F. et al. Real-time analysis of competitive binding using graing coupler immunosensor for pesticide detetction. *Biosens Bioelectron* **1994**:9:125 30

8. Brecha A et al. Direct optical immunosensor for atrazine detection. *Anal Chim Acta* **1995**:311:289 99

9. Laitinen MP et al. Affinity immunosensor for milk progesterone: Identification of critical parameters. *Biosens Bioelectron* **1996**:11(12):1270 14

10. Mulchandani P et al. Biosensor for direct determination of organophosphate nerve agents. Potentiometric enzyme electrodo. *Biosens Bioelectron* **1999**:14:77 85

11. Mollet W. et al. Inmunoassay of fumonisins by surface plasmon resonance biosensor. *Anal Biochem* **1998**:258:161 7

12. O'Daly et al. Electrochemical enzyme immuno-assay for detection of toxic substances. *Enzyme Microb Technol* **1992**:14:299 302

13. Rippeth JJ et al. Flow-injection detector incorporating a screen-printed disposable amperometric biosensor for monitoring organophosphate pesticides. *Analyst* **1997**:122:1425 9

14. Weller MG et al, Highly parallel affinity sensor for the detection of environmental contaminants in water. *Anal Chim Acta* **1999**:393:29 41

15. Yokohama K et al , Highly sensitive quartz crystal immunosensor for multisample detection of herbicides. *Anal Chim Acta* **1995**:304:139 45

16. Skladal et al Characterization of monoclonal antibodies to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid using a piezoelectric quartz crystal microbalance in solution. *J Immunol Methods*. **1994**:17 :117

17. Rippeth JJ. et al . Flow injection detector incorporating a screen-printed disposable amperometric biosensor for monitoring organophosphate pesticides. *Analyst* **1997** 122;1425.

18. Baumner A. et al. Development of a new immunosensor for pesticide detection: a disposable system with liposome-enhancement and amperometric detection. *Biosens Bioelectron* **1998**; 519 13

1.4.2 Biosensores Vs Inmunoensayos

Actualmente se utilizan rutinariamente técnicas como inmunoensayos unido a una enzima (ELISA) o radio inmuno ensayo (RIA) para la detección numerosos analitos en los alimentos como es la caso de las hormonas. El principio de funcionamiento de estos métodos es similar al de los biosensores, por lo que resulta evidente que es interesante comparar ambas metodologías tal como lo hicieron Guido et al.¹⁹, quienes compararon un inmunoensayo convencional con una sensor óptico capaz de detectar, IGF-1 (polipéptido utilizado para aumentar la producción de leche, que se presume carcinogénico) en muestras de leche. Estos autores concluyeron que ambos métodos eran igualmente efectivos para la detección de IGF-1, pero la capacidad de realizar ensayos en tiempo realmente cortos y el hecho de que no se necesita un segundo reactivo para la detección de complejo inmune, dan al biosensor una amplia ventaja sobre el ELISA convencional.

1.5 Utilización de Ácidos nucleicos como ligandos para la fabricación de biosensores

Como fue explicado anteriormente, existen dos tipos de biosensores, los que generan una señal catalizando una reacción química y los que detectan cambios en alguna propiedad física del electrodo por la unión del analito a la molécula inmovilizada. En general los biosensores utilizan en el primer caso enzimas y el segundo anticuerpos, ya que su sencilla producción lo permite. Pero el campo de los biosensores se ha extendido al uso de ácidos nucleicos en reemplazo de las enzimas y de los anticuerpos²⁰.

Los ácidos nucleicos presentan ciertas ventajas para su utilización en biosensores, una de ellas es su relativa simplicidad y repetitividad en la composición de ADN (ácido desoxiribonucleico) y ARN (ácido ribonucleico), que si bien presentan el problema de ser degradados rápidamente existen alternativas para solucionar esta desventaja que serán explicadas más adelante.

1.5.1 Reemplazo de anticuerpos por aptámeros

Los biosensores de bioafinidad consisten en la unión de analito con el ligando, sin importar la naturaleza del ligando. Esto hace posible el reemplazo de los anticuerpos hasta ahora utilizados, por oligonucleótidos con afinidad por una molécula en particular también llamados aptámeros.

Si bien es sabido que existen secuencias de ácidos nucleicos capaces de reconocer otras moléculas, se han desarrollado técnicas como SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) que permiten hallar secuencias de ácidos nucleicos con distinta afinidad por una molécula blanco en particular.

Existe ya un antecedente que demuestra que es posible utilizar ácidos nucleicos en reemplazo de anticuerpos. M. Lee et al.²¹, desarrollaron un biosensor, que por medio de la unión con un aptámero de ADN, es capaz de determinar la concentración de trombina en plasma humano. El sistema de funcionamiento de este sensor se basa en un ensayo de competencia entre la trombina natural y trombina marcada con fluoresceína (F-trombina). Los aptámeros de ADN se unieron covalentemente al soporte sólido de silica gel a través de un puente de polietilenimina, para aumentar la accesibilidad de la trombina. El soporte sólido unido al aptámero y a la F-trombina se colocó en los extremos de fibras ópticas. La competencia entre la trombina natural y la F-trombina produjo la disminución de la fluorescencia al final de la fibra óptica. Esta fue la señal utilizada para determinar la concentración de trombina en plasma. Este dispositivo logró un límite de detección de 1 nM con una desviación porcentual del 3% con un tiempo de ensayo de 7 a 8 minutos, y un tiempo de regeneración del sistema de 5 a 6 minutos. El sensor demostró ser estable aún después de 8 horas de ensayos.

Si bien el dispositivo desarrollado por Lee puede ser mejorado sustancialmente, es un antecedente importante que demuestra que la utilización de aptámeros en lugar de anticuerpos para la detección de analitos es posible; logrando resultados reproducibles en tiempos mucho menores que cualquier otro tipo de método utilizado hasta el momento.

El hecho de que existan a la fecha pocos biosensores que funcionen con ácidos nucleicos, se debe a su escasa estabilidad en fluidos biológicos producto de la actividad de nucleasas. Los oligonucleótidos modificados con resistencia a nucleasas podrían permitir el desarrollo de los sensores de ADN y ARN.

1.5.2.1 Selección de aptámeros

Los ácidos nucleicos cuentan con la complejidad estructural (producto de la interacción entre bases y otras) necesaria para unirse específicamente a otras moléculas. El problema reside en encontrar estas secuencias y aislarlas. Resulta de interés hacer una breve descripción de la técnica de selección molecular *in vitro*.

19. Guidi A, et al, Comparison of a conventional immunoassay (ELISA) with a surface plasmon resonance-based biosensor for IGF-1 detection in cows' milk, *Biosens. Bioelectron*, **2001** 971 16

20. Lippa P et al. Immunosensors-principles an applications to clinical chemistry. *Clin. Chim Acta* **2001** 314 26.

21. Lee M, et al., A fiber-optic microarray biosensor using aptamers as receptors. *Anal. Biochem*, **2000** 142 282

Esta técnica se basa en la probabilidad de que en un pool azaroso de oligonucleótidos existan moléculas con funciones específicas. Por ejemplo: La probabilidad de encontrar el core catalítico de la ribozima Cabeza de Martillo (13 nucleótidos) en un pool de secuencias al azar de ARN es de 1 en 67 millones por lo que en un pool de 10^{15} moléculas, aproximadamente habrán 15 millones contendrán el core catalítico de la ribozima cabeza de martillo

La metodología de SELEX se basa en la selección de secuencias específicas de ARN de un conjunto inicial mediante la utilización de columnas rellenas con resinas unidas covalentemente a la molécula blanco, que más tarde será el analito.

La figura 3 esquematiza los pasos involucrados durante las técnicas de selección *in vitro*. El primer paso consiste en incubar el conjunto azaroso de ácidos nucleicos con el soporte sólido unido covalentemente a un ligando específico. Luego se prepara una columna y se eluyen las moléculas sin afinidad por la molécula blanco.

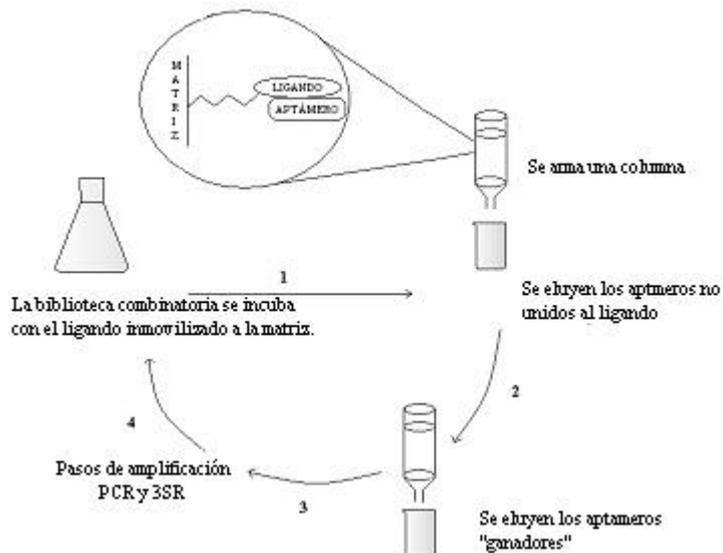


Figura 3. Esquema de selección *in vitro* de ligandos

Los oligonucleótidos con unidos a la matriz son eluidos mas tarde ajustando las condiciones del solvente.

Una vez aislado el o los oligonucleótidos alta afinidad se procede a la amplificación, para lo cual se utilizan técnicas de replicación como PCR y 3SR (Replicación autosostenida de secuencia). Este ciclo se repite hasta obtener los oligonucleótidos con más alta afinidad. Hasta el momento SELEX ha sido utilizado casi exclusivamente para el descubrimiento de nuevas drogas, pero es una herramienta muy poderosa para hallar ligandos para un gran número de moléculas como se puede apreciar en el siguiente cuadro.

BLANCO	TIPO DE BIBLIOTECA	Nº DE CICLOS DE SELEX	LONGITUD DE LA ZONA AL SUR	Kd
T4 ADN polimerasa	ARN	4	8	5
Factor rho de <i>E. coli</i>	ARN	11	32	5
Transcriptasa reversa HIV-	ARN	9	32	5
Cyanocobalamina	ARN	8	72	88
Teofilina	ARN	8	40	110
ATP	ARN	8	120	700
D-triptofano	ARN	7	120	18000

Figura 4-Ejemplos SELEX llevados a cabo.²²

22. Gold L., et al. Diversity of oligonucleotide funtions, *Annu. Rev. Biochem.* **1995** 64:763

1.5.2.2 Reemplazo de enzimas por Ribozimas

La utilización de biosensores de afinidad no es la única posibilidad que presentan los ácidos nucleicos. Como fue explicado anteriormente existen otros tipos de biosensores que generan señales a partir de una reacción bioquímica catalizada por una enzima. En los últimos años se demostró que la utilización de ribozimas (análogos de las enzimas proteicas compuestas de ARN) para la detección de sustancias era posible.

La utilización de ribozimas en lugar de proteínas presenta varias ventajas. Al igual que en el caso de los aptámeros, las ribozimas pueden ser sintetizadas químicamente, y existen procesos de selección análogos a SELEX para la detección ribozimas con propiedades específicas

Dentro de este grupo de moléculas existe un tipo especial de ribozimas capaces de ser activadas o desactivadas por otras moléculas, estas son la denominadas ribozimas "alostéricas", esta activación o disminución en la actividad puede ser utilizada como señal para cuantificar al efector. El problema nuevamente reside en encontrar ribozimas que se activen en presencia del analito lo cual puede ser solucionado utilizando técnicas de evolución molecular.

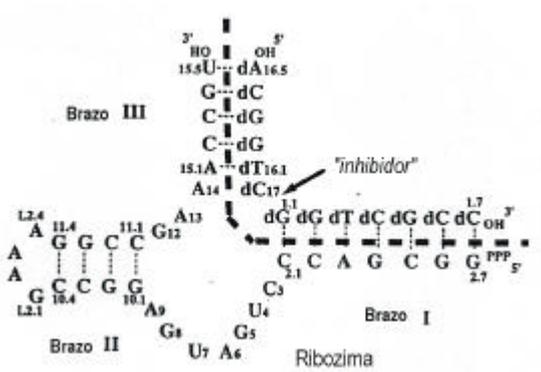


Figura 1-Estructura de la Ribozima Cabeza de Martillo

Las estructuras de las ribozimas permiten el agregado de secuencias de nucleótidos en sitios específicos sin perder actividad²³. Los procesos de selección de ribozimas, utilizan esta propiedad para agregar secuencias que modifican la actividad de la ribozima en presencia de alguna sustancia, inhibiéndola o aumentando su actividad.

La ribozima cabeza de martillo (figura 6), es la secuencia más corta de ARN con actividad catalítica conocida hasta el momento y ha sido estudiada exhaustivamente. Esta ribozima cataliza el clivaje de ARN y puede además autoclivarse si se encuentra en la conformación adecuada.

Breaker R²⁴. desarrolló una serie de ribozimas Cabeza de Martillo que solo presentaban actividad en presencia de: CMPc; AMPc; teofilina; Flavín mononucleótido (FMN) o teofilina + FMN. La figura 6 muestra la estructura de la enzima Cabeza de Martillo modificada con una zona al azar utilizada para llevar a cabo el proceso de selección molecular.

El primer paso que realizó fue la generación de un conjunto de ribozimas acopladas a secuencias azarosas (Nx). Luego separó las ribozimas que presentaban actividad sin estar en presencia de un efector, en este caso Breaker aprovechó la actividad de autoclivaje de la ribozima Cabeza de Martillo, separando las ribozimas clivadas (activas) de las no clivadas (no activas) por electroforesis con geles de poliacrilamida. (PAGE) (figura 7 paso 1). Las secuencias sin actividad fueron recortadas del gel e incubadas en presencia de un efector (Breaker utilizó los efectores mencionados anteriormente), luego aisló las secuencias con actividad en presencia del analito por PAGE las amplificó por PCR-TR (Polinucleotide Chain Reaction con transcriptasa reversa) y las purificó con PAGE (figura 7 paso 2).

El ciclo fue repetido hasta que se obtuvieron las ribozimas que solo presentan actividad en presencia de un efector.

Así se lograron aislar ribozimas que se activan en presencia de pequeñas moléculas orgánicas, pero también se han encontrado ribozimas alostéricas que responden a oligonucleótidos²⁵⁻²⁶, proteínas²⁷ e io-

23. Soukup G., Emilsson G, Breaker R. Altering Molecular recognition of RNA aptamers by allosteric Selection. *J. Mol. Biol.* **2000** 298 623.

24. Breaker R. Engineered allosteric ribozymes as biosensor components. *Curr. Op. Biotech.* **2002** 31- 13

25. Robertson M, et al In vitro selection of an allosteric ribozyme that transduces analytes to amplicons, *Nat Biotechnol* **1999**, 17 62

26. Komatsu Y, et al Construction of new ribozymes requiring short regulator oligonucleotides as cofactor. *J Mol Biol* **2000** 299;1231.

27. Robertson M. et al In vitro selection of nucleoprotein enzymes. *Nat Biotechnol* **2001** 19: 650.

nes metálicos²⁸. Según demuestran estos ejemplos es posible utilizar sistemas combinados de ribozimas alostéricas para la detección y cuantificación de analitos en matrices complejas.

A pesar de la escasa complejidad en la composición y estructura de las ribozimas (comprado con las enzimas proteicas), es posible desarrollar ribozimas alostéricas con capacidad para discriminar entre analitos análogos. Soukup et al²⁹. desarrollaron ribozimas activadas por teofilina pero no por análogos de la misma.

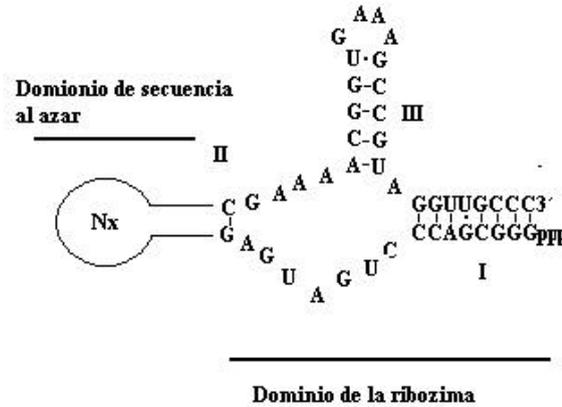


Figura 6 –Estructura genérica de una ribozima “Cabeza de Martillo” alostérica.

Estos trabajos evidencian que es posible utilizar estas secuencias de ARN en lugar de las enzimas proteicas logrando discriminar entre anitos estructuralmente similares, y a la vez es posible analizar una gran variedad de sustancias que van desde metales hasta proteínas , resultando pues en potenciales aplicaciones en el campo del análisis de alimentos.

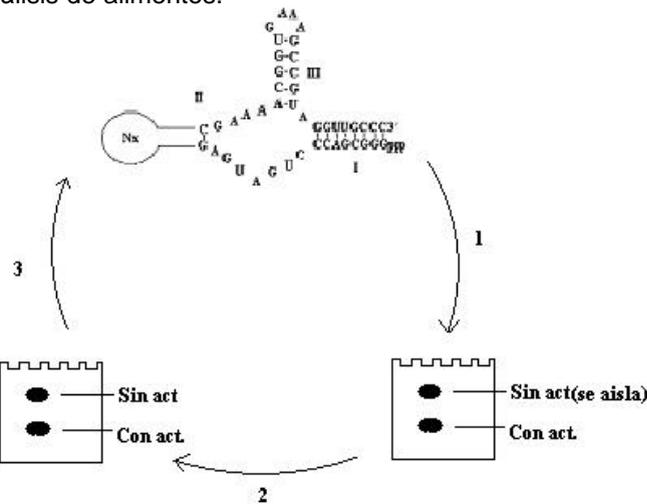


Figura 7- Ciclo de selección y amplificación ribozimas alostéricas.

1.6 Limitaciones de los oligonucleótidos naturales para su utilización en fluidos biológicos y la utilización de nucleósidos modificados.

Si bien los ácidos nucleicos tienen un gran potencial para su utilización en biosensores en reemplazo de anticuerpos y enzimas, presentan un gran inconveniente, su utilización en fluidos biológicos es muy limitada debido a la inestabilidad de los oligonucleótidos. La presencia de nucleasas, enzimas capaces cortar secuencias de ADN y/o ARN, limita el tiempo de vida medio de los oligonucleótidos considerablemente, haciendo necesario la utilización de nucleósidos modificados, que le confieran a los aptámeros y ribozimas una mayor estabilidad.

El desarrollo de oligonucleótidos modificados con resistencia a nucleasas comenzó como una herramienta en el campo de la terapia génica. En las últimas décadas se han desarrollado nucleósidos con modificaciones sobre el azúcar, sobre el esqueleto fosfato internucleotídico y sobre la nucleobase .El alcance de las

28. Seetharman S, Zivarts M, Sudarsan N, Breaker R. Immobilized RNA switches for the analysis of complex chemical and biological mixtures. *Nat Biotechnol* **2001** 19 336.

29. Soukup G., et al. Altering Molecular recognition of RNA aptamers by allosteric Selection. *J. Mol. Biol.* **2000** 298 623.

modificaciones en la nucleobase tienen un alcance limitado debido a que los requerimientos de la formación de pares de bases son importantes en la formación de las estructuras terciarias de los oligonucleótidos.

El fosfato internucleotídico, suele ser el blanco de nucleasas, por lo que se han sintetizado diversos nucleósidos con modificaciones en ese sitio. Entre estos compuestos modificados se encuentran los fosforotiatos, que si bien presentan la ventaja de ser fácilmente sintetizados, dificultantan la formación de las estructuras terciarias de los oligonucleótidos, por lo que el desarrollo de modificaciones en otros sitios de los nucleósidos es de gran interés.

La incorporación de modificaciones en el azúcar ha sido bien estudiada, y han demostrado mayor utilidad las que involucran la posición 2'. Se han sintetizado diversos nucleósidos con modificaciones en esta posición (ver Figura 8). Las diferencias de tamaño y electronegatividad de los distintos sustituyentes confieren a los nucleósidos diferentes propiedades. Los 2'-desoxi-2'-fluoroligolnucleótidos tienen la mayor afinidad por ARN, pero no tienen resistencia a nucleasas suficiente para su utilización.

Los 2'-O-alquilo-ribonucleótidos también estabilizan la unión con ARN, pero su estabilidad a nucleasas, al igual que en el ejemplo anterior, no es suficiente para utilización. El hecho de que ninguna modificación por si sola; ni en el azúcar, ni en el fosfato internucleotídico, pueden brindar a los oligonucleótidos la características necesarias para su utilización en fluidos biológicos.

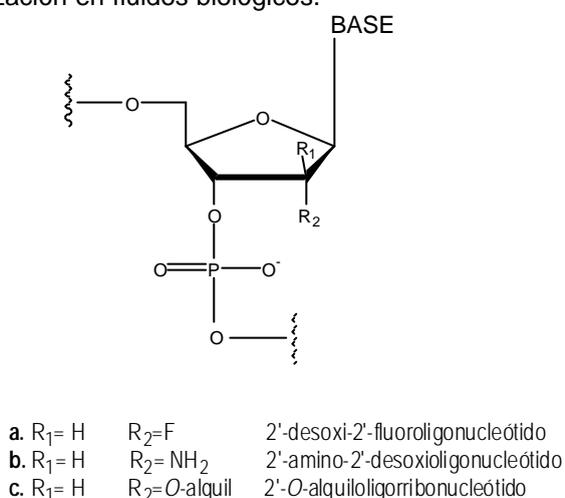


Figura 8. Modificaciones en el azúcar

Existe, además de las modificaciones descritas anteriormente, otro tipo de modificación capaz de brindar resistencia a nucleasas. Esta la incorporación de un grupo metilo en el carbono 2', la importancia estos 2-C-metilnucleósidos es que el metilo en esa posición no afecta la conformación del azúcar (en el caso del ARN) , pero resulta un obstáculo para la endonucleasas.

Los estudios computacionales y de Resonancia Magnética Nuclear realizados sobre la 2'-C-metiluridina demostraron que la conformación del azúcar modificada es equivalente a la del ribonucleósido natural³⁰ y esta esquematizada en la figura 9. Ambas estructuras posicionan el oxhidrilo 2' en una orientación equivalente, siendo además equivalente la posición de la base. El nucleósido con esta modificación es capaz de reproducir las interacciones observadas en las estructuras del ARN natural.

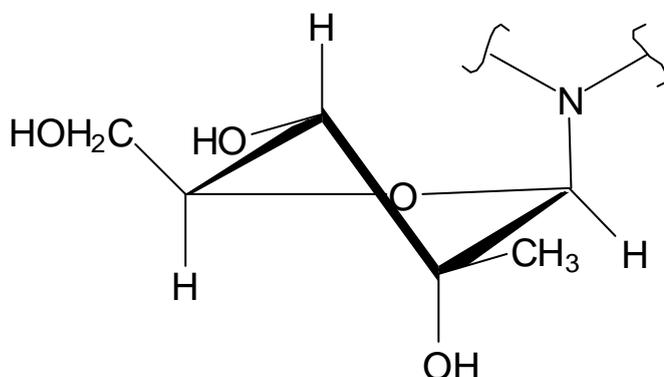


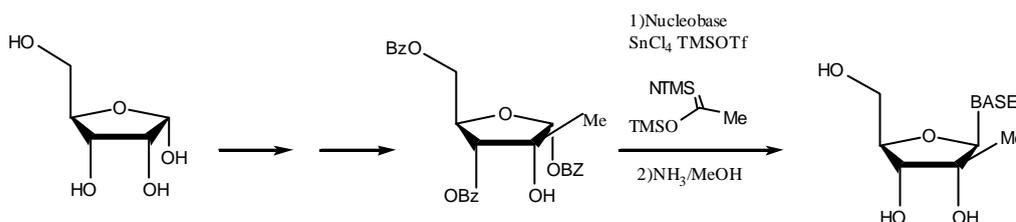
Figura 9- Configuración del azúcar en un 2'-C-metilnucleósido

La introducción de la 2'-C-metiluridina en la ribozima Cabeza de Martillo, la misma utilizada por Garret et al y Breaker, produjo un aumento en el tiempo de vida medio en distintos medios (Gallo M., resultados no publicados). Se introdujo la modificación en diferentes posiciones de la ribozima (Ume4, Ume7, Ume 47) y se estudió su estabilidad en distintos fluidos: Lisado de células, Suero fetal bovino, cultivo de células 293T. Aunque hubo diferencias dependiendo de la posición del nucleósido modificado en la ribozima en todos los casos se observó un aumento en la resistencia a nucleasas mucho mayor que la pérdida de actividad de la ribozima.

Los estudios realizados por M. Gallo et al. demuestran que la utilización de nucleósidos metilados en C-2', confieren a los oligonucleótidos en los que son insertados una estabilidad más que importante frente a la acción de las RNasas, siendo una potencial herramienta para la aplicación de aptámeros y ribozimas en la fabricación de biosensores, resolviendo el problema de la estabilidad de los mismos en matrices biológicas.

1.7 Antecedentes de las rutas sintéticas para la síntesis de 2'-C-metilnucleósidos

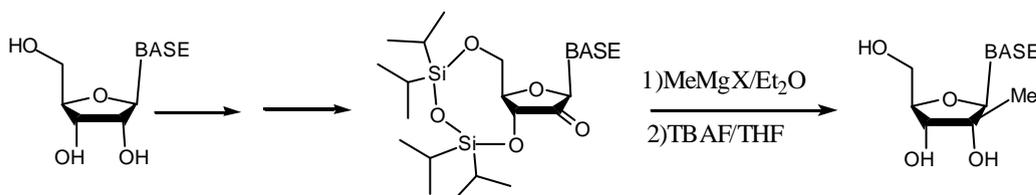
Las estrategias planteadas en la bibliografía para la síntesis de los 2'-C-metilnucleósidos, padecen serios problemas. En primer lugar no se han conseguido rutas sintéticas con altos rendimientos. Además se suscitan dificultades debido a que muchas rutas no son estereoselectivas produciendo grandes cantidades de arabinonucleósidos³¹. Muchos de estos caminos de síntesis se basan en la unión de una base con el azúcar 2-C-ribose y en general poseen rendimientos entre moderados a bajos³². La obtención de este tipo de nucleósido modificado a través de la glicosilación tiene como ventaja que permite la incorporación de una gran variedad de bases, pero como contrapartida son poco estereoselectivas y de muy bajo rendimiento.



Esquema 1. Síntesis de 2'-C-metilnucleósidos a través de Glicosilación Química

Otra estrategia publicada es la adición de compuestos organometálicos sobre la posición 2'. Matsuda et al³³ utilizaron CH_3MgI sobre el 2'-cetonucleósido obteniendo una mezcla de nucleósidos con el azúcar en la conformación ribo y arabino. Si bien esta adición no es estereoespecífica puede ser utilizada obteniendo buenos rendimientos globales como se discutirá más adelante.

La fabricación de biosensores con aptámeros y ribozimas resistentes a nucleasas hace necesaria la síntesis de cantidades importantes de nucleósidos modificados. Debido a la escasez de rutas estereoselectivas y con alto rendimiento de 2'-C-metilnucleósidos, resulta de gran interés científico explorar nuevas rutas de síntesis.



Esquema 2 Síntesis de 2-C-metilnucleósidos por adición de reactivo de Grignard

31. Wolfe M et al. A concise synthesis of 2-C-methylribonucleosides, *Tetrahedron Letters* **1996**, 7611-36

32. Jenkins S. et al, *J. Org. Chem* **1968**, 33, 2490

33. Matsuda et al. Radical deoxygenation of tert-alcohols in 2'-branched-chsin sugar pyrimidine nucleosides: synthesis and antileukemic activity of 2'-deoxy-2'-s-methylcytidine, *Chem Pharm. Bull.* **1987**:35-9

1.8 Estrategias para la fabricación de Biosensores

La confección de biosensores basados en ácidos nucleicos modificados puede realizarse siguiendo dos estrategias (ver figura 10). La primera posibilidad se basa en la identificación de aptámeros de ácidos nucleicos modificados, a través de la confección de bibliotecas combinatorias de ácidos nucleicos modificados y los posteriores pasos de selección y amplificación explicados anteriormente. Sin embargo para llegar a esta instancia es necesario cumplimentar ciertos requisitos. Las técnicas de selección molecular incluyen pasos de amplificación como PCR, por lo que es necesario la obtención de los 2'-C-metilnucleótidos a partir de los nucleósidos. Las enzimas utilizadas en las reacciones de transcripción como la T7 RNA polimerasa podrían no aceptar como sustrato a los 2'-metilnucleótidos, haciendo imposible la utilización de técnicas como SELEX.

Hasta el momento no se han realizado pruebas de transcripción 2'-C-metilnucleótidos modificados. El hecho de que la conformación del azúcar y la posición de la base en nuestros compuestos sea la misma que en el ARN natural, hacen pensar que en principio no debería haber mayores problemas para superar los pasos de amplificación teniendo en cuenta que se han realizado pruebas de transcripción con nucleótidos con varias modificaciones, obteniéndose resultados satisfactorios.³⁴⁻³⁵

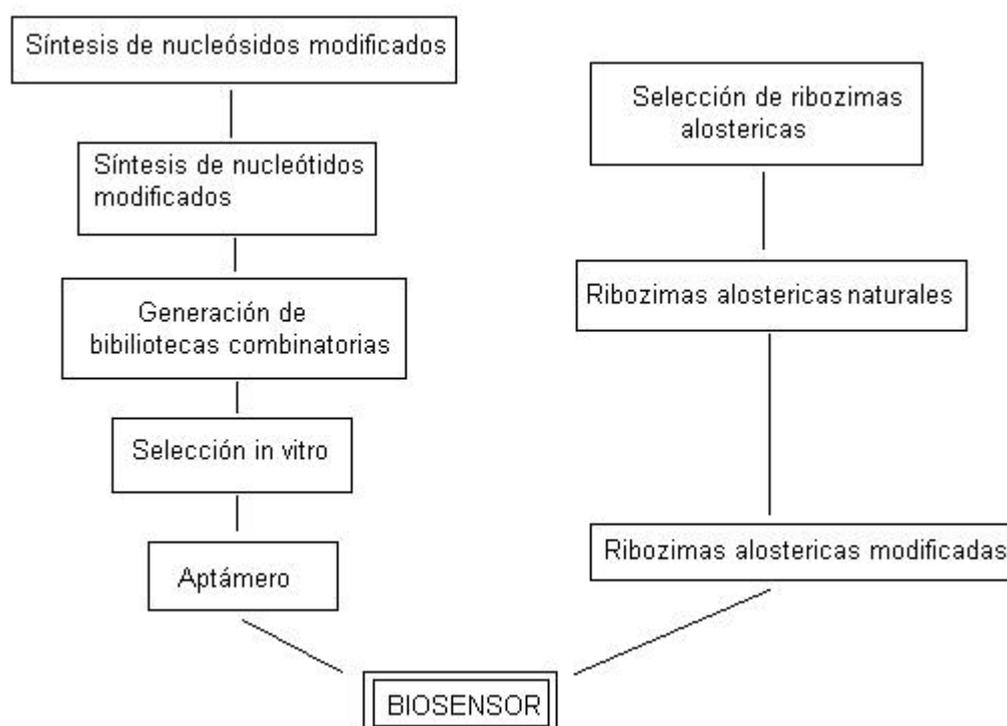


Figura 10- Estrategias para la fabricación de biosensores

No obstante otras estrategias de diseño de biosensores. Por ejemplo es posible introducir modificaciones en etapas posteriores a las de selección sobre ribozimas alostéricas, incorporando modificaciones en sitios específicos. Esta aproximación evita los pasos de amplificación con nucleótidos modificados.

34. Goullain et al, Enhancing the catalytic repertoire of nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* **2001**:29 9

35. Vaish N. et al, Expanding the structural and functional diversity of RNA; analog uridine triphosphates as candidates for in vitro selection of nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* **2000**:28 17

Parte experimental

2.1- Materiales y Métodos

2.1.1- Reactivos.

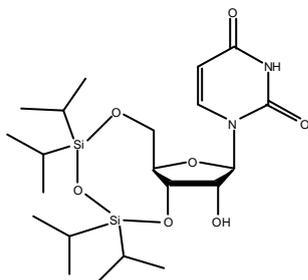
NOMBRE	PROVEEDOR
Acetato de etilo	J. T. Baker
Ácido clorhídrico (c)	Merck
Ácido <i>p</i> -toluensulfónico monohidrato	ICN Biomedicals
Ácido sulfúrico (c)	Merck
Adenosina	Pharma Waldhof
Agua deuterada	Aldrich
Amoníaco (c)	Merck
Anhídrido acético	J. T. Baker
Anhídrido 4- <i>tert</i> -butilfenoxiacético / THF	Proligo
Bicarbonato de sodio	Mallinckrodt
Bisulfito de sodio	J.T.Baker
Borohidruro de sodio	Aldrich
Bromuro de metiltrifenilfosfonio	Aldrich
<i>tert</i> -Butanol	J. T. Baker
<i>n</i> -Butil litio 1,6 M en hexano	Acros Organics
Carbonato de sodio	Mallinckrodt
Cloroformo	Merck
Cloroformo deuterado	Aldrich
Cloruro de amonio	Merck
Cloruro de benzoilo	Panreac
Cloruro de oxalilo	Aldrich
Cloruro de <i>t</i> -butildimetilsililo	Aldrich
Cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo	ICN Biomedicals
Cloruro de sodio	Merck
Cloruro de <i>p</i> -toluensulfonilo	Aldrich
Cloruro de trimetilsililo	ICN
Diclorometano	J. T. Baker
Dimetilformamida	J. T. Baker
Dimetilsulfóxido	J. T. Baker
Dimetilsulfóxido deuterado	Aldrich
Éter de petróleo (35-60 °C)	J. T. Baker
Éter etílico	Merck
Fluoruro de tetrabutilamonio 1 M en THF	Aldrich
Hidróxido de sodio	Merck
Iodo	Merck
Metanol	J. T. Baker
<i>N</i> -Metilmorfolina óxido monohidrato	Merck
Nitrógeno	AGA
Pentóxido de fósforo	Merck
Piridina	J. T. Baker
Sulfato de sodio anhidro	J. T. Baker
Tetrahidrofurano	J. T. Baker
<i>N,N',N',N'</i> -Tetrametilendiamina	GIBCO BRL
1,1,3,3-Tetraisopropil-1,3-diclorodisiloxano	Gelest
Tetróxido de Osmio	Aldrich
Tolueno	J. T. Baker
Trietilamina	Pharma Waldhof
Trióxido de cromo	Anedra
Uridina	Pharma Waldhof

2.2- Métodos generales y equipamiento.

- Las purificaciones se realizaron empleando técnicas cromatográficas, utilizando sílica gel, con partícula de poro 20-45 μm ó 6-35 μm y sílica gel 60, grano 230-400. El análisis y seguimiento de las reacciones fueron llevados a cabo por cromatografía en capa delgada (c.c.d.) usando placas de aluminio de sílica gel 60F₂₅₄. Los componentes fueron localizados por observación de las placas bajo lámpara UV a 254 nm o reveladas con iodo
- Las evaporaciones fueron llevadas a cabo usando un evaporador rotatorio Büchi equipado con una trampa refrigerante de -100 °C FTS Systems y una bomba de alto vacío.
- El THF fue reflujo sobre sodio metálico usando benzofenona como indicador de anhidrez y luego destilado a presión atmosférica. La DMF fue secada por calentamiento a 100° C con hidruro de calcio y luego destilada a presión reducida. La TEA, la Py y el dioxano fueron secados por calentamiento, bajo reflujo, con hidruro de calcio y destilados a presión atmosférica. El CH₂Cl₂ fue de grado HPLC.
- Todos los reactivos sensibles a la humedad fueron transferidos vía jeringa bajo presión positiva de nitrógeno o atmósfera de argón, las reacciones sensibles a la humedad fueron llevadas a cabo bajo presión positiva de argón.
- Las estructuras fueron determinadas usando resonancia magnética nuclear de ¹H y ¹³C en un equipo Bruker de 500 MHz. Los espectros fueron registrados en CDCl₃ o DMSO-*d*₆ usando tetrametilsilano (0.00 ppm, ¹H-RMN) y CDCl₃ (76.95 ppm, ¹³C-RMN) como estándares internos. Los desplazamientos químicos (d, ppm) citados como multipletes están referidos al centro aproximado de la señal.

2.3- Síntesis de los nucleósidos .

3',5'-O-(1,1,3,3-Tetraisopropildisiloxan-1,3-diil)uridina (**2**)



M_r :486

Rf: 0.40 en EP /

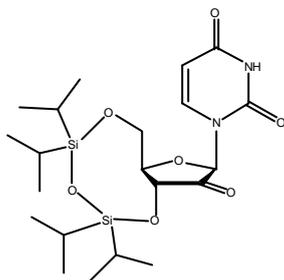
AcOEt, 1 : 2

Rendimiento: 90 - 95 %

Uridina (4.880 g, 20 mmol) se evaporó dos veces a presión reducida en Py anh. y posteriormente se disolvió en Py anh. (50 ml). A esta solución enfriada en hielo se le agregó gota a gota una solución de 1,3-dicloro-1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano (70 ml, 22.3 mmol, 1.15 eq) en CH₂Cl₂ seco (5 ml). Al finalizar esta adición, se llevó la mezcla a temperatura ambiente. La reacción se siguió por c.c.d., completándose luego de 2-3 h. Se detuvo la reacción con MeOH (3 ml) y se evaporó el solvente al vacío. Se disolvió el residuo en AcOEt (0.15 l) y se lavó la solución con NaHCO₃ 1 M (2 x 0.10 l). Se secó la fase orgánica sobre Na₂SO₄ anh., se filtró y se evaporó en vacío.

Espectro de ¹³C RMN (CDCl₃): (d, ppm) 12.4, 12.8, 12.9, 13.3 (CHs isopropilos); 16.2, 16.3, 16.8, 17.5, 17.9 (CH₃s isopropilos); 60.3 (C-5'); 68.9 (C-3'); 73.2 (C-2'); 80.9 (C-4'); 90.5 (C-1'); 100.9 (C-5); 139.7 (C-6); 150.1 (C-2); 162.9 (C-4).

Espectro de ¹H RMN (CDCl₃): (d, ppm) 0.85-1.25 (m, 16H, CH(CH₃)₂); 3.72 (sa, 1H, OH); 4.00 (dd, 1H, J_{5',5''}= 12.9 Hz, J_{5',4'}= 2.2 Hz, H-5''); 4.05-4.40 (m, 4H, H-2', H-3', H-4' y H-5'); 5.70 (d, 1H, J_{5,6}= 8.1 Hz, H-5); 5.74 (s, 1H, H-1'); 7.75 (d, 1H, J_{5,6}= 8.1 Hz, H-6); 9.83 (sa, 1H, NH).

2'-Oxo -3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxan-1,3-diil)uridina (**3a**).

M: 484

Rf: 0.47 en EP / AcOEt, 1 : 2

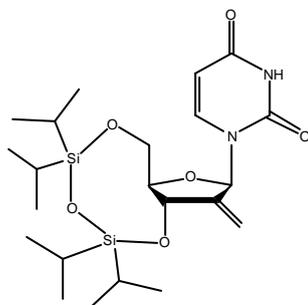
Rendimiento: 80 %

A- Oxidación con trióxido de cromo: 6 ml de anhídrido acético y 10 ml de Py se agregaron a una suspensión de 6 g de CrO_3 en 200 ml de CH_2Cl_2 y la mezcla se agitó a temperatura ambiente aproximadamente 15 min. El compuesto **2** (9.20 g, 19 mmol) disuelto en 60 ml de CH_2Cl_2 seco se agregó a la suspensión del trióxido de cromo previamente enfriada en hielo. Se dejó 1 h agitando a temperatura ambiente. Cuando la reacción se completó, se volcó la mezcla de reacción sobre 1.8 l de AcOEt frío y se filtró con microfibras de vidrio poro 4. El filtrado se concentró (temperatura menor a 25° C). El compuesto **3** se purificó en una columna de sílica gel (AcOEt / EP, 1 : 3).

B- Oxidación de Swern: Se agregó gota a gota una solución de cloruro de oxalilo (0,14 ml, 1.6 eq) en CH_2Cl_2 destilado anh. (0,55 ml) a -78°C a una solución de 0,13 ml (2.5 eq) de DMSO en 0,96 ml de CH_2Cl_2 . Se dejó agitando cinco minutos y entonces se agregó gota a gota una solución del compuesto (**15**) (500 mg, 1 mmol) en 2,8 ml de CH_2Cl_2 . Se dejó agitando 15 minutos a -78 °C. Se cortó la reacción con 0,7 ml de TEA y se agitó cinco minutos a la misma temperatura antes de llevar a temperatura ambiente. Posteriormente, se extrajo con ss de NaHCO_3 y se lavó con agua. Se secó con Na_2SO_4 y se obtuvo el nucleósido oxidado con 80 % de rendimiento.

Espectro de ^{13}C RMN (CDCl_3): (d, ppm) 12.6, 12.8, 13.0, 13.1 (CHs isopropilos); 16.2, 16.3, 16.6, 16.9, 17.1 (CH_3 s isopropilos); 62.03 (C-5'); 71.33 (C-3'); 80.45 (C-4'); 84.38 (C-1'); 102.40 (C-5); 144.85 (C-6); 149.99 (C-2); 163.03 (C-4); 205.43 (C-2').

Espectro de ^1H RMN (CDCl_3): (d, ppm) 0.85-1.25 (m, 16H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 3.96 (m, 1H, H-4'); 4.14 (m, 2H, H-5' y H-5''); 5.00 (s, 1H, H-1'); 5.03 (d, 1H, $J_{3,4} = 3.8$ Hz, H-3'); 6.75 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.0$ Hz, H-5); 7.16 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.1$ Hz, H-6); 8.92 (sa, 1H, NH).

2'-Deoxi-2'metilen-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxan-1,3-diil)uridina (**4**).

M: 482

Rf: 0.75 en EP / AcOEt, 1 : 2

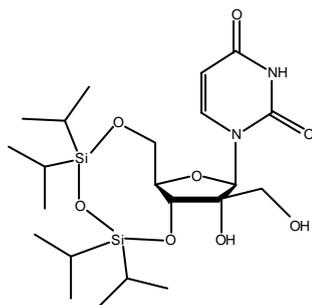
Rendimiento: 69 %

A una suspensión de 8.33 g (1.6 eq) de bromuro de metiltrifenilfosfonio en 240 ml de THF anh. en atmósfera de argón, se le agregaron 17 ml de *n*-butil litio 1,6 M en hexano (1.9 eq). Se dejó una hora a temperatura ambiente bajo agitación, se obtuvo una solución anaranjada. Entonces, fue agregada gota a gota a la mezcla una solución de 6.94 g de 2'-cetouridina protegida con el puente disiloxano (14 mmol) disueltos en 100 ml de THF. Se dejó reaccionar 2 h a temperatura ambiente. Luego se agregaron 120 ml de NH₄Cl 1 M y se extrajo con AcOEt (2 x 160 ml). Las fases orgánicas se juntaron, se lavaron con agua, se secaron con Na₂SO₄ anh. y se evaporó el solvente. El producto se obtuvo puro luego de una columna cromatográfica (AcOEt / EP, 3 : 7).

Espectro de ¹³C RMN (CDCl₃): (d, ppm) 12.3, 12.6, 12.8, 13.4 (CHs isopropilos); 16.6, 16.8, 17.1, 17.2, 17.3 (CH₃s isopropilos); 60.3 (C-5'); 70.1 (C-3'); 82.1 (C-4'); 88.5 (C-1'); 102.1 (C-5); 111.4 (C-6') 139.5 (C-6); 146.5 (C-2'); 150.0 (C-2); 164.2 (C-4).

Espectro de ¹H RMN (CDCl₃): (d, ppm) 0.86-1.26 (m, 16H, CH(CH₃)₂); 3.69 (ddd, 1H, J_{4,5} = 2.6 Hz, J_{4,5'} = 2.7 Hz, J_{4,3} = 8.7 Hz, H-4'); 4.05 (dd, 1H, J_{5,5'} = 13.1 Hz, J_{5,4} = 2.7 Hz, H-5''); 4.14 (dd, 1H, J_{5,5'} = 13.1 Hz, J_{5,4} = 2.6 Hz, H-5'); 4.83 (dd, 1H, J_{3,4''} = 8.7 Hz, J_{3,6'} = 1.5 Hz, H-3'); 5.46 (dd, 1H, J_{6,1'} = 1.9 Hz, J_{6,6''} = 2.8 Hz, H-6''); 5.53 (dd, 1H, J_{6,3} = 1.5 Hz, J_{6,6''} = 2.8 Hz, H-6'); 5.70 (d, 1H, J_{5,6} = 8.1 Hz, H-5); 6.52 (d, 1H, J_{6,1'} = 1.9 Hz, H-1'); 7.43 (d, 1H, J_{5,6} = 8.1 Hz, H-6); 9.23 (sa, 1H, NH).

(2'*R*)-2'-C-(Hidroximetil)- 3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxan-1,3-diil)uridina (**5a**).



M_r: 516

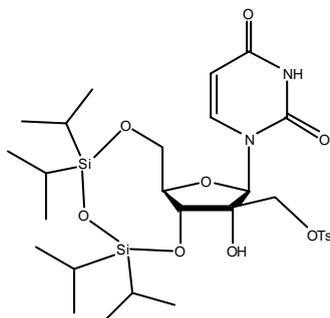
Rf: 0.34 en EP / AcOEt, 1 : 2

Rendimiento. 97 %

El compuesto **4** (4.83 g, 100.3 mmol) se disolvió en una mezcla de THF (25 ml), *tert*-butanol (25 ml) y agua (7.5 ml). Óxido de *N*-Metilmorfolina (1.5 g; 13 mmol, 1.2 eq) y OsO₄ (1 ml de una solución 2.5 % m/v, en *tert*-butanol; 0.1 mmol, 0.01 eq) se agregaron a 0° C y agitando. La reacción se dejó 5 días a 4° C. Luego se detuvo la reacción con una solución 1 M de NaHSO₃ y la mezcla de reacción se extrajo con AcOEt (2 x 50 ml). La fase orgánica se lavó con agua, se secó con Na₂SO₄ anh. y se evaporó el solvente a presión reducida. Se obtuvo cuantitativamente el producto **5** (5 g) como una mezcla diastereomérica en proporción 95: 5, según se determinó por RMN, la cual se usó sin posterior purificación para la próxima reacción.

Espectro ¹³C RMN del isómero mayoritario (CDCl₃): (d, ppm) 12.1, 12.7, 12.8, 13.3 (CHs isopropilos); 16.8, 16.9, 17.0, 17.1, 17.3 (CH₃s isopropilos); 59.8 (C-5'); 61.4 (-CH₂OH); 67.8 (C-3'); 80.1 (C-2'); 81.0 (C-4'); 90.3 (C-1'); 101.5 (C-5); 141.2 (C-6); 151.3 (C-2); 164.4 (C-4).

Espectro de ¹H RMN del isómero mayoritario (CDCl₃): (d, ppm) 0.80-1.20 (m, 16H, CH(CH₃)₂); 3.45 (d, 1H, J_{6,6''} = 10.1 Hz, H-6''); 3.65 (sa, 2H, OH-2', OH-6'); 3.90 (d, 1H, J_{6,6''} = 10.1 Hz, H-6'); 3.95-4.40 (m, 4H, H-3', H-4', H-5' y H-5''); 5.60 (d, 1H, J_{5,6} = 7.8 Hz, H-5); 6.00 (s, 1H, H-1'); 7.81 (d, 1H, J_{5,6} = 7.8 Hz, H-6); 10.35 (sa, 1H, NH).

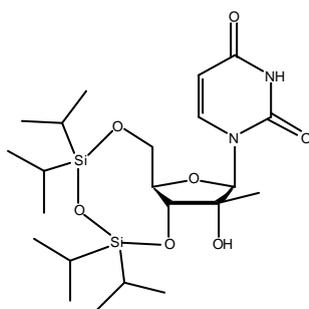
(2'R)-2'-C-(4-Metilfenilsulfoniloximetil)-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxan-1,3-diil)uridina (**6**).

M_r : 670
Rf: 0.80 en EP / AcOEt, 1 : 2
Rendimiento: 60 %

A una solución del compuesto **5** (5 g, 10 mmol) en Py seca (13 ml), se le agregó cloruro de *p*-toluensulfonilo (3.8 g, 20 mmol, 2.0 eq) y se agitó la mezcla durante la noche a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregó una segunda porción de cloruro de *p*-toluensulfonilo (5.6 g, 30 mmol, 3 eq) y se continuó la agitación por 3 h más hasta que, por c.c.d. se observó la desaparición del material de partida. El solvente fue evaporado a vacío, el residuo disuelto en AcOEt, lavado con agua, secado con Na₂SO₄ anh. y filtrado para obtener el crudo de la mezcla de reacción, el cual fue posteriormente purificado por columna de sílica gel (EP ? AcOEt / EP, 1 : 2). Se obtuvo **6** como un sólido amorfo.

Espectro de ¹³C RMN (CDCl₃): (d, ppm) 12.6, 12.7, 12.9, 13.6 (CHs isopropilos); 16.7, 16.8, 16.9, 17.0, 17.2, 17.3 (CH₃s isopropilos); 21.6 (CH₃ tosilo); 60.9 (C-5'); 66.5 (CH₂O tosilo); 68.1 (C-3'); 79.3 (C-2'); 81.8 (C-4'); 89.5 (C-1'); 102.4 (C-5); 127.9 (C-2 tosilo); 129.7 (C-3 tosilo); 131.6 (C-4 tosilo); 144.8 (C-6); 145.2 (C-1 tosilo); 151.8 (C-2); 163.1 (C-4).

Espectro de ¹H RMN (CDCl₃): (d, ppm) 0.80-1.20 (m, 16 H, CH(CH₃)₂); 2.35 (s, 3H, CH₃ tosilo); 3.42 (s, 1H, OH); 3.82 (d, 1H, J_{6,6'} = 10.8 Hz, H-6'); 3.90-4.50 (m, 5H, H-3', H-4', H-5', H-5'' y H-6''); 5.62 (d, 1H, J_{5,6} = 8.0 Hz, H-5); 5.98 (s, 1H, H-1'); 7.20 (d, 2H, J_{ortho} = 7.4 Hz, fenilo); 7.60 (d, 1H, J_{5,6} = 8.0 Hz, H-6); 7.70 (d, 2H, J_{ortho} = 7.4 Hz, fenilo); 10.35 (s, 1H, NH).

2'-C-Metil-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxan-1,3-diil)-2'-C-metiluridina (**7**).

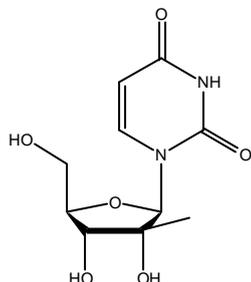
M_r : 500
Rf: 0.70 en EP / AcOEt, 4 : 6
Rendimiento: 90 %

El compuesto **6** (4 g, 60 mmol) se disolvió en 60 ml de DMF anh., entonces se agregó NaBH₄ (1.2 g, 31 mmol, 5.0 eq) y la mezcla se agitó 2 h a temperatura ambiente. Cuando por c.c.d. se observó que el material de partida había desaparecido, se detuvo la reacción agregando cuidadosamente gota a gota NH₄Cl (ss) sobre la mezcla enfriada sobre hielo. La mezcla resultante se extrajo con AcOEt (2 x 80 ml), las capas orgánicas se lavaron con NaCl (ss) (5 x 0.14 l), se secaron con Na₂SO₄ anh. y se evaporaron para obtener el crudo. El producto fue purificado por cromatografía flash, eluyéndose con EP ? AcOEt / EP, 1 : 2. El compuesto **7** puro resultó ser una espuma luego eliminar los solventes a vacío.

Espectro de ¹³C RMN (CDCl₃): (d, ppm) 12.5, 12.8, 13.4, 13.6 (CHs isopropilos); 16.8, 16.9, 17.0, 17.2, 17.3 (CH₃s isopropilos); 20.4 (CH₃); 59.8 (C-5'); 72.7 (C-3'); 78.9 (C-2'); 81.6 (C-4'); 90.4 (C-1'); 102.3 (C-5); 139.6 (C-6); 150.5 (C-2); 163.4 (C-4).

Espectro de ^1H RMN (CDCl_3): (d, ppm) 0.80-1.20 (m, 16H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 1.22 (s, 3H, CH_3); 2.53 (s, 1H, OH-2'); 3.90-4.15 (m, 3H, H-4', 5' y 5''); 4.21 (d, 1H, $J_{3',4'} = 8.1$ Hz, H-3'); 5.70 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.1$ Hz, H-5); 6.00 (s, 1H, H-1'); 7.73 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.1$ Hz, H-6); 8.40 (sa, 1H, NH).

2'-C-Metiluridina (**8**).



M_r : 258

Rf: 0.40 en CH_2Cl_2 / MeOH, 9 : 1

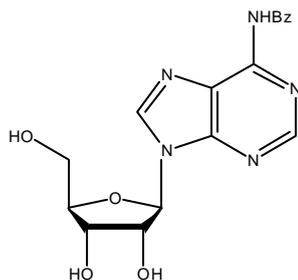
Rendimiento: 95%

Una solución del compuesto **7** (2.8 g, 5.6 mmol) en 900 ml de THF anh. fue tratada con una solución de TBAF 1 M en THF (12 ml, 12 mmol, 2.2 eq) a temperatura ambiente. Después de 5 min, la reacción fue detenida mediante el agregado de 0.1 ml de Py / MeOH / agua, 3 : 3 : 1 (v/v/v) y la solución fue agregada a una suspensión de una resina Dowex 50Wx4-200 (5 g) en la forma piridonio en 3.4 ml de la misma suspensión de Py / MeOH / agua. La mezcla fue agitada suavemente por 10 min y la resina filtrada y lavada con MeOH (3 x 6 ml). El filtrado combinado con los lavados fueron evaporados hasta sequedad al vacío para obtener el producto final.

Espectro de ^{13}C RMN (DMSO-d_6): (d, ppm) 19.3 (CH_3); 59.9 (C-5'); 72.7 (C-3'); 79.4 (C-2'); 82.1 (C-4'); 92.0 (C-1'); 102.6 (C-5); 141.8 (C-6); 151.0 (C-2); 166.4 (C-4).

Espectro de ^1H RMN (DMSO-d_6): (d, ppm) 1.00 (s, 3H, CH_3); 3.79 (dd, 1H, $J_{5',5''} = 11.8$ Hz, $J_{5',4'} = 2$ Hz, H-5''); 3.84 (d, 1H, $J_{3',4'} = 9.5$ Hz, H-3'); 3.97 (m, 1H, H-4'); 3.98 (m, 1H, H-5'); 5.05 (sa, 2H, OH-3' y OH-2'); 5.19 (sa, 1H, OH-5'); 5.84 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.2$ Hz, H-5); 5.95 (s, 1H, H-1'); 7.86 (d, 1H, $J_{5,6} = 8.2$ Hz, H-6).

N⁶-Benzoiladenosina (**10**):



M_r : 371

Rf: 0.5 en MeOH / CH_2Cl_2 , 7 : 93

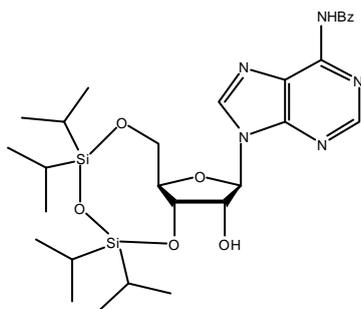
Rendimiento: 90%

Se suspendieron 200 mg (0.75 mmol) de adenosina en 8 ml de Py anh. bajo atmósfera de nitrógeno. Se enfrió a 0° C, se agregaron gota a gota 0.67 ml de clorotrimetilsilano y se dejó agitando en frío por 30 min. Entonces, se agregaron 0.67 ml de cloruro de benzoilo y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 3 h. Al cabo de este tiempo se enfrió y se agregaron 1.62 ml de agua fría. Se esperó 15 min y se agregaron 1.6 ml de NH_3 concentrado. La mezcla resultante se agitó por 30 min más y se evaporó. El aceite que se obtuvo se extrajo con 18 ml de Et_2O y agua. La fase acuosa se concentró hasta que precipitó el producto como un sólido blanco amorfo que se filtró y secó sobre P_2O_5 con vacío.

Espectro de ^{13}C RMN (CDCl_3): (d, ppm) 61.3 (C-5'); 70.3 (C-3'); 73.7 (C-2'); 85.7 (C-4'); 87.6 (C-1'); 125.8 (C-5); 128.4 (C-3 Bz); 129.2 (C-2 Bz); 132.4 (C-4 Bz); 133.4 (C-1 Bz); 146.1 (C-8); 150.4 (C-4); 151.2 (C-2); 152.2 (C-6); 165.7 (CO).

Espectro de ^1H RMN (CDCl_3): (d, ppm) 3.59 (dd, 1H, $J_{5',5''}= 11.9$ Hz, $J_{5',4'}= 4.0$ Hz, H-5''); 3.69 (dd, 1H, $J_{5',5''}= 11.9$ Hz, $J_{5',4'}= 4.0$ Hz, H-5'); 3.99 (m, 1H, H-4'); 4.25 (dd, 1H, $J_{3,2'}= 4.3$ Hz, $J_{3,4'}= 4.3$ Hz, H-3'); 4.65 (dd, 1H, $J_{3,2'}= 4.3$ Hz, $J_{1,2'}= 5.8$ Hz, H-2'); 5.15, 5.26, 5.57 (s, 3H, OH-2', -3' y -5'); 6.04 (d, 1H, $J_{1,2'}= 5.8$ Hz, H-1'); 7.55 (dd, 2H, $J_{2,3}= 7.3$ Hz, $J_{4,3}= 7.3$ Hz, Hs-3 Bz); 7.64 (t, 1H, $J_{4,3}= 7.3$ Hz, H-4 Bz); 8.05 (d, 2H, $J_{2,3}= 7.3$ Hz, Hs-2 Bz); 8.72 (s, 1H, H-2); 8.75 (s, 1H, H-8); 11.18 (sa, 1H, NH).

*N*⁶-Benzoil-3',5'-O-(tetraisopropildisiloxan-1,3-dil)adenosina (**11**).



M_r : 614

Rf: 0.8 en MeOH / CH_2Cl_2 , 7 : 93

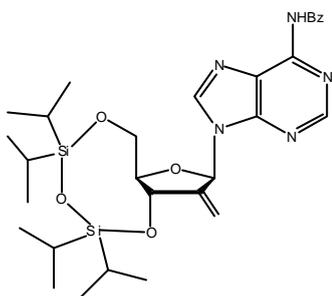
Rendimiento: 75 % desde adenosina

1,1 g (3.0 mmol) de adenosina benzoilada se evaporaron en vacío de Py seca y entonces se disolvieron en 8.1 ml de este mismo solvente, se enfrió en baño de hielo y se agregaron gota a gota 1.6 ml de 1,3-dicloro-1,1,3,3 tetraisopropildisiloxano (1.2 equivalentes). Al finalizar esta adición se llevó a temperatura ambiente y se dejó con agitación. La reacción se siguió por c.c.d. hasta mostrar que se había completado luego de 2 - 3 h. Se detuvo la reacción con MeOH (2 ml) y se evaporó el solvente en vacío. Se disolvió el residuo en AcOEt (15 ml) y se lavó la solución con NaHCO_3 acuoso 1 M (2 x 10 ml). La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anh., se filtró y se evaporó en vacío. El producto (sólido amorfo) se purificó por columna (CH_2Cl_2 : MeOH 100:0- 97:3).

Espectro de ^{13}C RMN (CDCl_3): (d, ppm) 12.6, 12.8, 13.1, 13.3 (CHs isopropilos); 16.9, 17.0, 17.1, 17.3, 17.4 (CH₃s isopropilos), 61.7 (C-5'); 70.8 (C-3'); 71.5 (C-2'); 82.3 (C-4'); 89.9 (C-1'); 123.6 (C-5); 127.9 (C-3 Bz); 128.8 (C-2 Bz); 132.7 (C-4 Bz); 133.7 (C-1 Bz); 141.9 (C-8); 149.7 (C-4); 151.0 (C-2); 152.7 (C-6); 164.6 (CO).

Espectro de ^1H RMN (CDCl_3): (d, ppm) 1.00-1.15 (m, 16H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 3.36 (s, 1H, OH); 4.06 (dd, 1H, $J_{5',5''}= 13.8$ Hz, $J_{5',4'}= 4.6$ Hz, H-5''); 4.14 (m, 2H, H-4' y H-5'); 4.64 (d, 1H, $J_{3,2'}= 5.1$ Hz, H-2'); 5.11 (dd, 1H, $J_{3,4'}= 7.4$ Hz, $J_{3,2'}= 5.1$ Hz, H-3'); 6.04 (s, 1H, H-1'); 7.51 (dd, 2H, $J_{2,3}= 7.4$ Hz, $J_{4,3}= 7.8$ Hz Hs-3 Bz); 7.60 (t, 1H, $J_{4,3}= 7.4$ Hz, H-4 Bz); 8.03 (d, 2H, $J_{2,3}= 7.8$ Hz, H-2 Bz); 8.16 (s, 1H, Hs-2); 8.75 (s, 1H, H-8); 9.22 (sa, 1H, NH).

N⁶-Benzoil-2'-deoxi-2'-metilen-3',5'-O-(tetraisopropildisiloxan-1,3-diil)adenosina_(13):

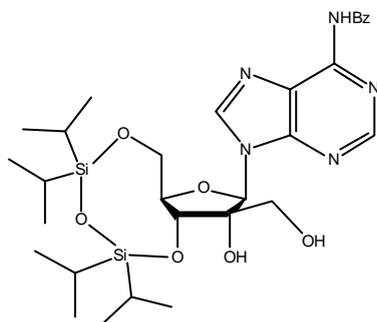
 M_r : 610Rf: 0.6, MeOH / CH₂Cl₂, 97 : 3

Rendimiento: 11 %

- a) 4,8 ml de anhídrido acético y 7,6 ml de Py se agregaron a una suspensión de 4,792 g de trióxido de cromo en 352 ml de CH₂Cl₂ y la mezcla se agitó a temperatura ambiente aproximadamente durante 15 min. Se agregaron, entonces, 9,582g (17 mmol) del nucleósido protegido **11** disueltos en 50 ml de CH₂Cl₂ seco a la suspensión del CrO₃ previamente enfriada en hielo. Se dejó 1 h con agitación a temperatura ambiente. Cuando la reacción se completó, según se observó por c.c.d., se volcó la mezcla de reacción sobre 400 ml de AcOEt frío y se filtró con microfibras de vidrio poro 4 y se percoló con sílica gel..
- b) A una suspensión de 16,45 g de bromuro de metil trifenilfosfonio en 130 ml de THF anh. bajo atmósfera de argón, se le agregaron 43,8 ml de butil litio 1,6 M en hexano. Se dejó una hora a temperatura ambiente bajo agitación, se obtuvo una solución anaranjada. Entonces, se agregaron gota a gota aprox. 9,582 g (15.33 mmol) de **(1)** oxidado con CrO₃ (a) Se dejó reaccionar 2 h a temperatura ambiente. Cuando la reacción finalizó se agregaron 2.4 ml de NH₄Cl 1 M y se extrajo con AcOEt (2 x 150 ml). Las fases orgánicas se juntaron, se lavaron con agua, se secaron con Na₂SO₄ anh. y se evaporó el solvente. El producto se obtiene puro luego de una columna cromatográfica (CH₂Cl₂ / MeOH ,100:0 - 3 :97).

Espectro de ¹³C RMN (CDCl₃): (d, ppm) 12.7, 12.8, 12.9 (CHs isopropilos); 16.7, 16.8, 16.9, 17.0, 17.1, 17.2, 12.3 (CH₃s isopropilos), 61.3 (C-5'); 71.3 (C-3'); 77.7 (C-4'); 83.5 (C-1'); 112.1 (C-2'); 123.2 (C-5); 127.9 (C-3 Bz); 128.7 (C-2 Bz); 130.8 (C-4 Bz); 131.8 (C-1 Bz); 142.6 (C-8); 147.2 (C-4); 150.0 (C-2); 153.1 (C-6); 164.6 (CO).

Espectro de ¹H RMN (CDCl₃): (d, ppm) 0.85-1.20 (m, 16H, CH(CH₃)₂); 3.90-4.40 (m, 4H, H-3', H-4', H-5' y H-5'"); 5.45 (m, 2H, CH₂); 6.80 (d, 1H, J_{1,2}= 2 Hz, H-1'); 7.60-7.70 (m, 3H, Hs-3 y H-4 Bz); 7.88 (d, 2H, J_{2,3}= 7.8 Hz, Hs-2 Bz); 8.20 (s, 1H, H-2); 8.81 (s, 1H, H-8); 8.44 (sa, 1H, NH).

*N*⁶-Benzoil-3',5'-O-(tetraisopropildisiloxan-1,3-diil)2' hidroximetil adenosina (**14**).*M*:644

Rf:0,37 Hexano/AcOEt/MeOH, 10 : 5 : 1,4

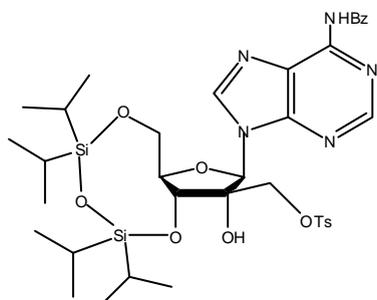
Rendimiento: 66,6%

1,2772 g de **13** (2,03 mmol) se disolvieron en 5,06 ml. de THF; 5,06 ml de alcohol ter-butílico y 1,469 ml de agua. Se enfrió con baño de hielo y se agregaron 1,588g de Oxido de n-metilmorfolina y 1,505 ml de una solución 2,5% de OsO₄ en *t*-butanol (0,148 mmol). Se dejó a 4^o C durante 24 horas.

Se separó la mezcla en una columna de silica gel (CHCl₃: MeOH, 100: 3) R_f:0,2

Espectro de ¹³C RMN (CDCl₃): (d, ppm) 12.2, 12.43, 12.6, 12.7(CHs isopropilos); 16.4, 16.5, 16.5, 16.7, 16.8, 16.9 (CH₃s isopropilos), 61.4 (C-5'); 67.9 (C-6'); 68.8 (C-3'); 77.1(C2'); 81.6(C-4'); 90.0 (C-1'); ; 127.7 (C-5); 128.25 (C-3 fenoxi); 128.3 (C-2 fenoxi); 132.0 (C-4 fenoxi); 132.0 (C-1 fenoxi); 142.7 (C-8); 139.5 (C-4); 150.8 (C-2); 151.7 (C-6); 165.9 (C=O).

Espectro de ¹H RMN (CDCl₃): (d, ppm) 0.85-1.20 (m, 16H, CH(CH₃)₂); 3.90-4.40 (m, 4H, H-3', H-4', H-5' y H-5''); 5.45 (m, 2H, CH₂); 6.80 (d, 1H, J_{1,2}= 2 Hz, H-1'); 7.60-7.70 (m, 3H, Hs-3 y H-4 Bz); 7.88 (d, 2H, J_{2,3}= 7.8 Hz, Hs-2 Bz); 8.20 (s, 1H, H-2); 8.81 (s, 1H, H-8); 8.44 (sa, 1H, NH

*N*⁶-Benzoil-3',5'-O-(tetraisopropildisiloxan-1,3-diil)2'-C-tosil adenosina (**15**)*M*:799

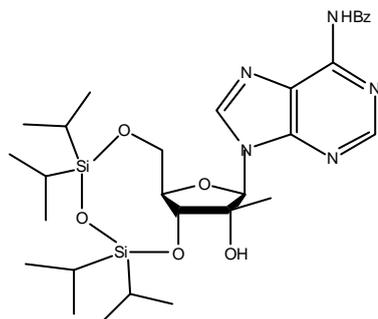
Rf: 0.23 (n-hexano: AcOEt , 1:1)

Rendimiento: 19,19%

Se disolvió el nucléosido (**14**) en 14,6 ml de Py seca, se agregó el cloruro de para-toluen-sulfonilo y se dejó a 40^oC 24 horas. Luego se purificó el producto mediante una columna de silica gel (n-hexano: AcOEt 1:1) obteniendo un sólido amorfo.

Espectro de ¹³C RMN (CDCl₃): (d, ppm) 12.4, 12.8, 13.5 (CHs isopropilos); 16.8, 16.9, 17.0, 17.1, 17.2 (CH₃s isopropilos); 21.6 (CH₃ tosilo); 60.7 (C-5'); 66.9 (CH₂O tosilo); 69.4 (C-3'); 79.2 (C-2'); 81.6 (C-4'); 89.4 (C-1'); 122.4 (C-5); 127.4 (C-3 benzoilo); 128.1 (C-2 tosilo); 128.7 (C-2 benzoilo); 130.1 (C-3 tosilo); 132.0 (C-4 tosilo); 132.8 (C-4 benzoilo); 133.1 (C-1 benzoilo); 142.1 (C-8); 145.3 (C-1 tosilo); 149.0 (C-6); 150.9 (C-4); 151.3 (C-2); 164.7 (C=O).

spectro de ¹H RMN (CDCl₃): (d, ppm) 0.80-1.20 (m, 16 H, CH(CH₃)₂); 2.41 (s, 3H, CH₃ tosilo); 3.76 (s, 1H, OH); 3.89 (d, 1H, J_{6,6'}= 10 Hz, H-6'); 3.97(d, 1H, J_{6',6''}= 10 Hz, H-6''); 4.05 (m, 1H, H-5'); 4.14 (m, 1H, H-4'); 4.28 (m, 1H, H- 5'');4.98 (d, 1H, H-3, J_{3,4}=8 Hz); 6.16 (s, 1H, H-1'); 7,16 (d, 2H, J_O= 8 Hz, tosilo); 7.55 – 7.7 (m, 5H, 2Hs tosilo Hs-3, H-4 benzoilo), 8.08 (m, 2H, Hs-2 benzoilo) 8.20 (s, 1H, H-2); 8.61 (s, 1H, H-8); 9.36 (sa, 1H, NH).

*N*⁶-Benzoil-3',5'-O-(tetraisopropildisiloxan-1,3-diil)2'-metil-adenosina (**16**). M_r :610

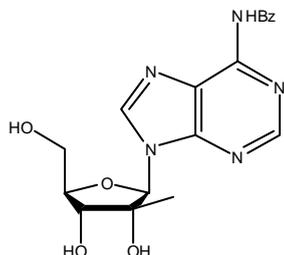
Rf: 0.27 (n-hexano; AcOEt, 1,5:1)

Rendimiento: 23%

Se disolvieron 0,165 g de (**15**) en 2,041 ml de DMF anhidra, Luego se agregaron 0,39 g de NaBH₄ (1,039 mmol). Se dejó reaccionar 2 horas y se agregó cloruro de amonio gota a gota y en baño de hielo. Se extrajo 2 veces con 2 ml de AcOEt, se lavó la fase orgánica 5 veces con 3 ml de NaCl (ss). Se secó la fase orgánica con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se rotaevaporó el solvente. Luego se llevó a cabo una columna en silicagel (n-hexano: AcOEt 1,5:1) obteniendo un sólido amorfo.

Espectro de ¹³C RMN (CDCl₃): (d, ppm) 12.6, 12.8, 12.9, 13.5 (CHs isopropilos); 16.9, 17.0, 17.2, 17.3, 17.4 (CH₃s isopropilos); 20.9 (CH₃); 61.2 (C-5'); 74.4 (C-3'); 79.5 (C-2'); 82.1 (C-4'); 90.9 (C-1'); 123.3 (C-5); 127.8 (C-3 benzoilo); 128.8 (C-2 benzoilo); 132.7 (C-4 benzoilo) 133.7 (C-1 benzoilo); 141.4 (C-8); 149.7 (C-4); 152.5 (C-6); 152.7 (C-2); 164.8 (C=O).

Espectro de ¹H RMN (CDCl₃): (d, ppm) 0.80-1.10 (m, 28H, CH(CH₃)₂); 1.20 (s, 3H, CH₃); 3.15 (s, 1H, OH-2'); 4.10 (m, 1H, H 5'); 4.18 (m, 1H, H 4'); 4.30 (m, 1H, H 5'); 4.61 (d, 1H, J_{3',4'} = 8 Hz, H-3'); 6.17 (s, 1H, H-1'); 7.52 (m, 3H, Hs3-, H-4 benzoilo); 8.03 (m, 2H, H-2 benzoilo) 8.28 (s, 1H, H-2), 8.80 (s, 1H, H-8); 9.18 (sa, 1H, NH).

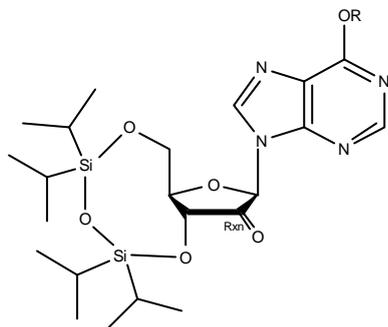
*N*⁶-Benzoil- 2'-metil-adenosina (**17**). M_r :365Rf: 0,4 (CH₂Cl₂;MeOH, 100:3)

Rendimiento: 80%

Se disolvieron 21mg de (**16**) (0,0344mmol) en 0,5 ml de THF anhidro, y se agregaron 0,0754 ml de fluoruro de tetrabutilamonio 1M (0,0751mmol) después de 5 min. se agregaron 0,36 ml de una solución MeOH; H₂O; Py (3:3:1) y 0,18 g de resina Dowex Py⁺. Se agitó 10 min y se filtró con MeOH, luego se evaporó a vacío el solvente obteniendo un sólido amorfo.

Espectro de ¹³C RMN (CDCl₃): (d, ppm) 23.0 (CH₃); 59.1 (C-5'); 71.4 (C-3'); 78.5 (C-4') 82.6 (C-2'); 91.3 (C-1'); 123.6 (C-5); 127.5 (C-3 benzoilo); 128.0 (C-2 benzoilo); 132.2 (C-4 benzoilo) 133.5 (C-1 benzoilo); 141.9 (C-8); 149.8 (C-4); 151.5 (C-6); 152.7 (C-2); 164.8 (C=O).

Espectro de ¹H RMN (CDCl₃): (d, ppm); 1.05 (s, 3H, CH₃); 3.2.0 (s, 2H, OHs); 3.35 (s, 1H, OH); 3.9 (m, 1H, H 5'); 4.05 – 4.20 (m, 3H, H-3',H-4',H-5'); 6.26 (s, 1H, H-1'); 7.52 – 7.70 (m, 3H, Hs3-, H-4 del benzoilo); 8.08 (m, 2H, H-2 benzoilo); 8.75 (s, 1H, H-2), 8.83 (s, 1H, H-8); 9.18 (sa, 1H, NH).

2'-desoxi-6-O-(2,6-diclorofenil)-2'-oxo-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxan-1,3-diil) inosina (**20**):

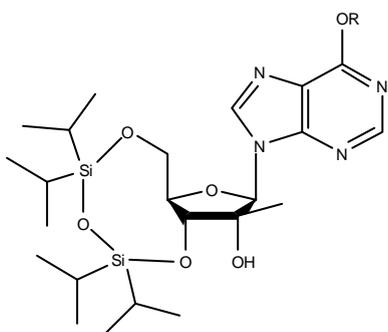
M:653,7
*R*_f: 0,3 (N-hex: AcoEt)
 Rendimiento:98%
 R= [2,6-diclorofenilo]

Se agregaron 1,08 ml de anhídrido acético y 0,904 ml de Py a una suspensión de 1,1376 g de CrO₃ (11,49 mmoles) en 53,4 ml de CH₂Cl₂ seco. Luego de 15 minutos se agregaron los 2 g de nucleosido (**19**) (3,05 mmoles) disueltos en 11,2 ml de CH₂Cl₂ seco.

2 horas más tarde se echó la mezcla sobre 50 ml de AcOEt frío. A continuación se le agregó 0,5 gramos de silica gel y se percoló sobre un lecho de celite, se enjuagó con AcOEt y se evaporó en vacío, obteniendo un sólido amorfo.

Espectro de ¹³C RMN (CDCl₃): (d, ppm) 12.1, 12.5, 12.6, 13.0 (CHs isopropilos); 16.4, 16.5, 16.6, 16.9, 17.0, 17.1 (CH₃s isopropilos), 61.4 (C-5'); 72.9 (C-3'); 78.7 (C-4'); 80.2 (C-1'); 120.0 (C-5); 127.2 (C-4 fenoxi); 128.5 (C-3 fenoxi) 128.7 (C-2 fenoxi); 143.9 (C-8); 152.9 (C-2);153.2 (C-4); 158.3 (C-6); 204.8 (C=O).

Espectro de ¹H RMN (CDCl₃): (d, ppm) 0.85-1.20 (m, 28.H, CH(CH₃)₂); 3.05-3.25 (m, 3H, H-4', H-5' y H-5'');5.40 (sa, 1H, H-3'); 5.90 (s, 1H, H-1');7.10-7.30(m, 2H, H3 H5 fenoxi); 7.40 (m, 2H, H-2, H-4 tosilo); 8.2 (s, 1H, H-8)

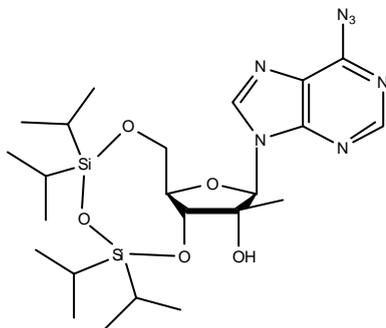
6-O-(2,6-diclorofenil)-2'-C-metil-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxan-1,3-diil) inosina (**21**):

M:667
*R*_f:0,61 (N-hexano :AcoEt 4:1)
 Rendimiento: 50%
 R= 2,6-diclorofenilo

Se disolvió el nucleósido (**20**) (1 g, 1,53 mmoles) en 31,2 ml de Et₂O, luego se agregaron 1,983 ml de reactivo de Grindard (MeMgI, 1,148 mmoles) manteniendo la temperatura a -50°C. Luego de 1,5 horas se agregó 7,95 ml de NH₄Cl 1 M. Se llevó a pH 2 con HCl 5 % y se extrajo dos veces con 5 ml de Et₂O. Se lavó la fase orgánica tres veces con 5 ml de H₂O y se secó la misma con Na₂SO₄ anhidro. Se filtró y se evaporó en vacío el solvente. Se purificó en columna de silica gel utilizando un gradiente de N-hexano;AcOEt 10:2 - 10:3 obteniendo un sólido amorfo.

Espectro de ¹³C RMN (CDCl₃): (d, ppm) 12.4, 12.9, 13.1, 13.4 (CHs isopropilos); 16.8, 16.9, 17.0, 17.2, 17.3, 17.4 (CH₃s isopropilos), 20.3 (CH₃) 62.3 (C-5'); 76.7 (C-3');79.2 (C-2'); 82.6 (C-4'); 88.7 (C-1'); 120.0 (C-5); 127.2 (C-4 fenoxi); 128.5 (C-3 fenoxi) 128.7 (C-2 fenoxi); 143.9 (C-8); 152.9 (C-2);153.2 (C-4); 158.3 (C-6).

Espectro de ¹H RMN (CDCl₃): (d, ppm) 0.85-1.18 (m, 28.H, CH(CH₃)₂);1.56 (s,3H, CH₃) 3.40(sa,1H, OH); 4.07 (m, 1H, H-4') 4.11 (m, 2H, H-5', H5''); 4.48 (d, 1H, H-3', J_{3,4}=7Hz); 5,80 (s, 1H, H-1');7.10-7.30(m, 2H, H3 H4 fenoxi); 8.14 (s, 2H, H-8, H-2)

6 azido -2'-C-metil-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxan-1,3-diil) inosina (**22**):

M:547

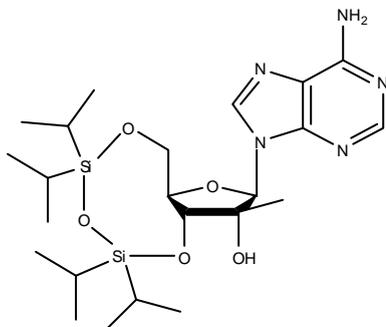
Rf:0,63 (CH₂Cl₂:MeOH;100:3)

Rendimiento:30%

En un balón con atmósfera de N₂ se agregaron 0,5733 g de (**21**) (0,86 mmoles). Luego se agregaron 12,81 ml de dimetilformamida y 0,138 g de NaN₃ (2,1226 mmoles). Se dejó reaccionar 5 horas a 60°C. Luego evaporó en vacío el solvente y se purificó mediante una columna de silica gel (CH₂Cl₂:MeOH;100:3), obteniendo el producto como un sólido amorfo.

Espectro de ¹³C RMN (CDCl₃): (d, ppm) 12.4, 12.9, 13.1, 13.4 (CHs isopropilos); 16.8, 16.9, 17.0, 17.2, 17.3, 17.4 (CH₃s isopropilos), 20.3 (CH₃) 62.3 (C-5'); 76.7 (C-3');79.2 (C-2'); 82.6 (C-4'); 88.7 (C-1'); 120.3 (C-5); 143.5 (C-8); 152.8 (C-4);153.2 (C-2); 155.7 (C-6).

Espectro de ¹H RMN (CDCl₃): (d, ppm) 0.85-1.20 (m, 28.H, CH(CH₃)₂);1.59 (s,3H, CH₃) 3.45 (sa,1H, OH); 3.80 (m, 1H, H-4') 4.05 (m, 2H, H-5, H5'); 5.40 (sa, 1H, H-3'); 4.48 (d, 1H, H-3', J_{3,4}= 7Hz); 5,93 (s, 1H, H-1'); 8.17 (s, 2H, H-8, H-2)

2'-C-metil-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxan-1,3-diil) adenosina (**23**):

Mr:521

Rf:0,27 (CH₂Cl₂:MeOH 100:5)

Rendimiento:55%

0,1155 g ,(0.211 mmol) de (**21**) se disolvieron en 1,79 ml de AcOEt. Luego se agregó el Pd/C (0,2 g). Se dejó reaccionar en agitación durante 2 horas con una presión de H₂ de 30 a 40 psi. Luego se filtró en un lecho de celite el cual se lavó con AcOEt y se rotaevaporó el solvente.

Se purificó el producto por medio de una columna de silicagel utilizando un gradiente de CH₂Cl₂:MeOH 100:5 a 100:7 obteniendo un sólido amorfo.

Espectro de ¹³C RMN (CDCl₃): (d, ppm) 12.53, 12.91, 13.07, 13.44 (CHs isopropilos); 16.9, 17.04, 17.31, 17.43 (CH₃s isopropilos), 20.2 (CH₃) 62.4 (C-5'); 76.7 (C-3'); 78.96 (C-2'); 81.94 (C-4'); 89.11 (C-1'); 120.2 (C-5); 143.5 (C-8); 148.8 (C-4);151.2 (C-2); 159.7 (C-6)

Espectro de ¹H RMN (CDCl₃): (d, ppm) 0.88-1.26 (m, 28.H, CH(CH₃)₂);1.46 (s,3H, CH₃) 3.75 (m, 1H, H-4') 4.05 (m, 2H, H-5, H5'); 4.50 (d, 1H, H-3', J_{3,4}= 7Hz); 5.01 (sa, 2H, NH₂) 5,69 (s, 1H, H-1');6.13 (sa, 1H, OH); 7.27 (s,1H, H-2); 7.79 (s,1H, H-8)

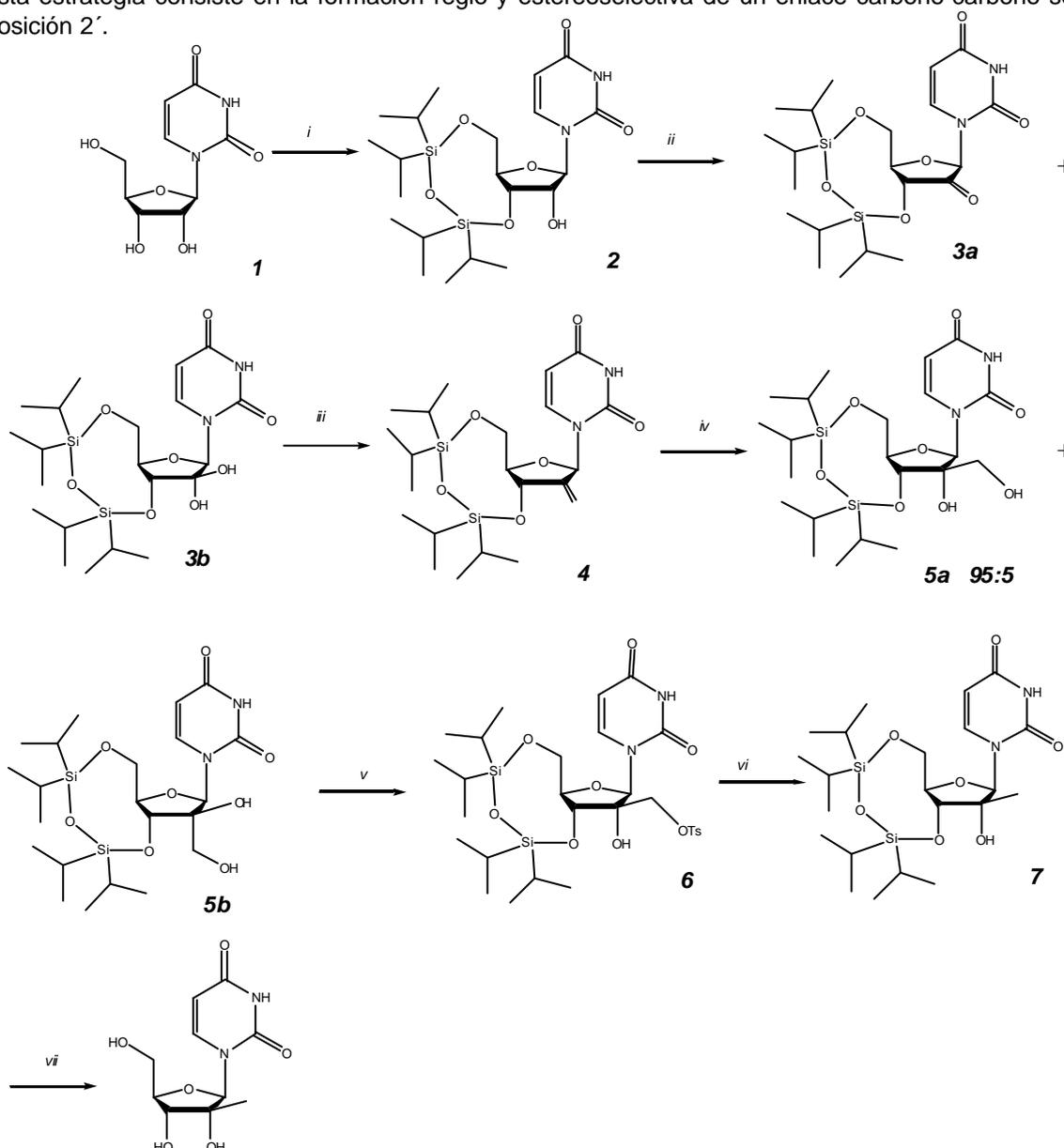
Resultados y Discusión

3. Síntesis de los 2'-C-Metilnucleosidos

3.1 Síntesis de 2'-C-Metiluridina

En primer lugar se decidió llevar adelante la preparación de la 2'-C-metiluridina. Esta pirimidina previamente sintetizada en nuestro laboratorio³⁶ tiene la ventaja de ser químicamente más estable que los nucleósidos purínicos, consecuencia de la mayor estabilidad del enlace glicosídico de los primeros.³⁷ Otra ventaja adicional de la utilización de la uridina esta dada por la ausencia de la necesidad de un esquema de protección en la base, lo cual simplifica la preparación de este tipo de compuestos.

El esquema 1 muestra la ruta que se siguió para la síntesis de la 2'-C-metiluridina. La idea central de esta estrategia consiste en la formación regio y estereoselectiva de un enlace carbono-carbono sobre la posición 2'.



Esquema 3. Preparación de la 2'-C-metiluridina.

i: a- TIPDSCl_2 , Py; b- MeOH; ii: a- CrO_3 , Py, Ac_2O , CH_2Cl_2 ; b- AcOEt; iii: a- $\text{Ph}_3\text{P}=\text{CH}_2$, THF; b- Et_2O , NH_4Cl ; iv: a- OsO_4 , MNO, $t\text{-BuOH}$, THF; b- NaHSO_3 1 M, AcOEt; v: TsCl, Py; vi: a- NaBH_4 , DMF; b- NH_4Cl ; vii: TBAF, THF.

36. Gallo M. et al, *Tetrahedron* **2001**, 57, 5707

37. Shabarova Z., Bogdanov A. *Adv. Org. Chem. of Nuc. Ac.* Ed VCH, Alemania **1994**.

El primer paso de la ruta sintética consistió en la protección regioselectiva de los oxhidrilos de las posiciones 3' y 5' dejando libre el oxhidrilo 2' utilizando 1,3-dicloro-1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano (reactivo de Markiewicz)³⁸. La regioselectividad de esta reacción es consecuencia del ataque inicial del oxhidrilo de la posición 5' sobre uno de los silicios del reactivo de Markiewicz a través de una reacción de sustitución nucleofílica. A continuación el oxhidrilo de la posición 3' cicla intramolecularmente generando el compuesto (**2**) del Esquema 1. El oxhidrilo de la posición 2' no puede ciclar como consecuencia de su lejanía respecto del sitio de reacción. El anillo resultante es muy estable tanto en medio ácido como en medio básico, y su remoción es muy sencilla. Esta reacción se llevó a cabo en piridina anhidra para eliminar del medio el HCl formado como subproducto de la reacción. El rendimiento de la misma fue del 90%.

Una vez protegidos los oxhidrilos de las posiciones 3' y 5' se pudo realizar la oxidación del oxhidrilo 2' utilizando trióxido de cromo/ piridina/ anhídrido acético. La reacción se completó con un rendimiento del 80%. Al completarse la reacción se pudo detectar por ccd. la presencia de un compuesto minoritario con Rf menor al del 2'-cetonucleósido. Al caracterizar la mezcla de reacción por ¹³C-RMN se determinó que este producto minoritario era el producto de adición del agua al grupo carbonilo (**3b**, Esquema 1). Este compuesto se caracterizó por tener un conjunto de señales con desplazamientos químicos muy parecidos, excepto para el C-2' que en el compuesto **3a** aparece con el desplazamiento característico de las cetonas (d » 200-210ppm) mientras que en el caso del compuesto **3b** este mismo carbono aparece con un desplazamiento en ¹³C característico de los hidratos (d » 95-105 ppm) como puede observarse en la figura 1. La formación de este producto puede interpretarse como una liberación parcial de la tensión anular del anillo ribosídico provocada por el cambio de hibridización sp² a sp³ del C-2' en la estructura **3b**.

La purificación de esta mezcla presentó problemas referidos a la eliminación del cromo, esta dificultad podría deberse a la coordinación de este elemento con la base, lo que se condice con el ensanchamiento de los picos encontrado en el los espectros de ¹H del crudo.

La mezcla de reacción **3a+3b** purificada se sometió a la reacción de Wittig utilizando bromuro de metil-trifenilfosfonio y butilitio como base en THF como solvente, obteniéndose el compuesto (**4**) con un rendimiento del 80%. El curso de la reacción se siguió por ccd y se observó la desaparición de las manchas correspondientes a los compuestos **3a** y **3b**. Esto puede ser explicado en virtud del desplazamiento del equilibrio entre estas estructuras como consecuencia de la desaparición del agua del medio de reacción por reacción con una cantidad molar equivalente del iluro utilizado.

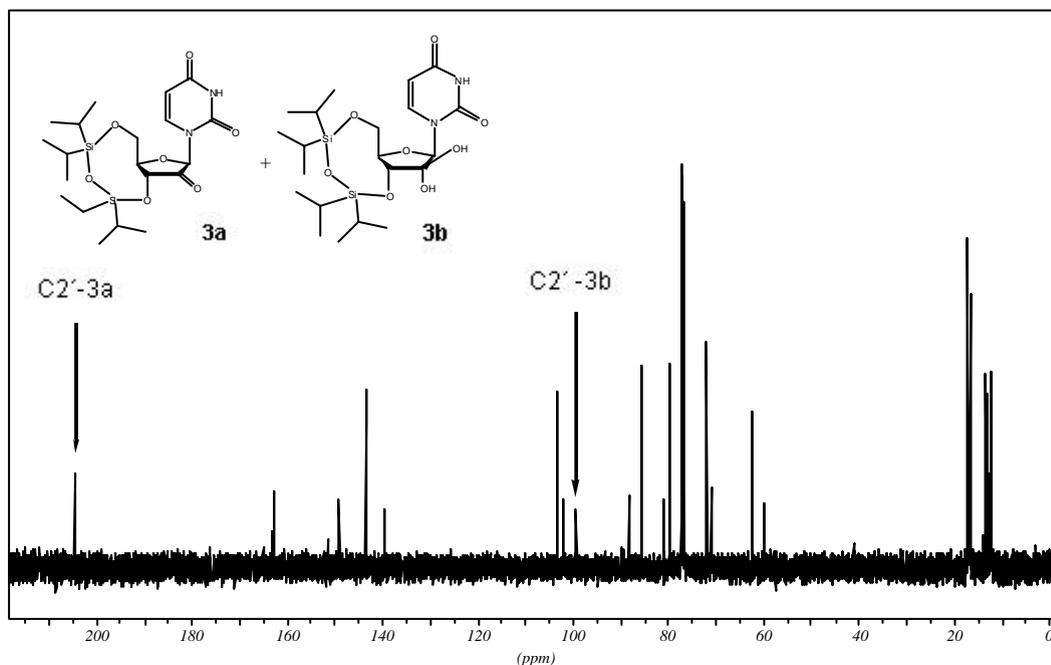


Figura 7-Espectro 1- 2'-Oxo -3',5' -O -(1, 1 ,3 ,3 -tetraisopropildisiloxan-1,3-diil)uridina (**3a**)y su hidrato (**3b**) en CDCl₃

La caracterización de este compuesto (**4**) se llevó a cabo por RMN, destacándose la desaparición en ^{13}C -RMN de la señal del carbonilo y la aparición de una señal adicional de carbono correspondiente a un metileno como pudo observarse a partir del ^{13}C -RMN representado en la Figura 2 y confirmado a través de un experimento DEPT (datos no mostrados).

El paso siguiente consistió en la dihidroxilación estereoselectiva del doble enlace carbono-carbono. Con este objetivo se llevó a cabo la reacción con óxido de *N*-metilmorfolina en cantidades estequiométricas³⁹ y cantidades catalíticas de OsO_4 .

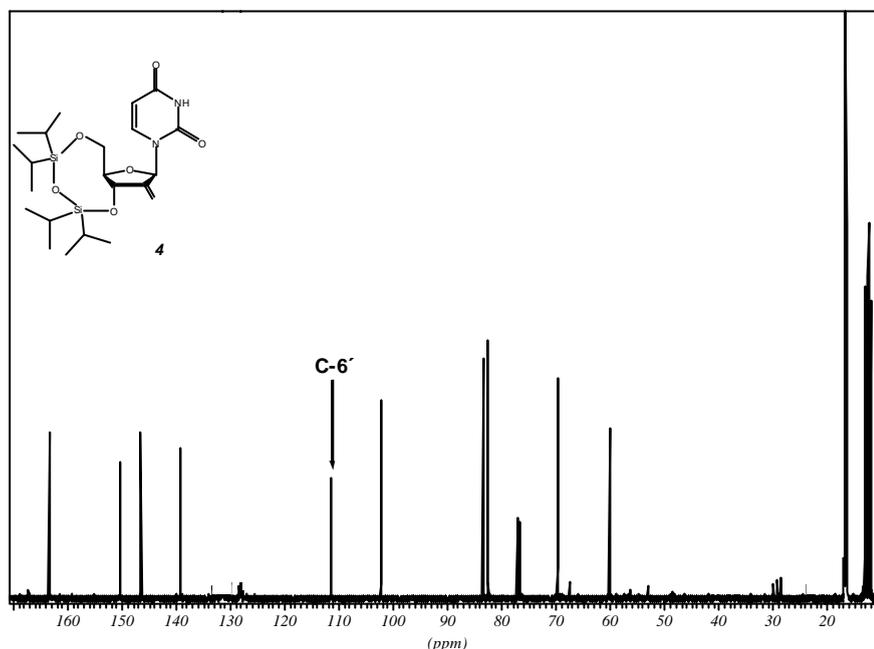


Figura 8 ^{13}C -RMN de 2'-Deoxi-2'metilen-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxan-1,3-diil)uridina (**4**) en CDCl_3 .

Dadas las diferencias en impedimento estérico de las dos caras del doble enlace, las previsiones originales sobre la estereoselectividad de la reacción indicaban que el ataque debía ocurrir desde la cara menos impedida, la cara μ , lo que condicionaría la configuración *R* del carbono 2'.

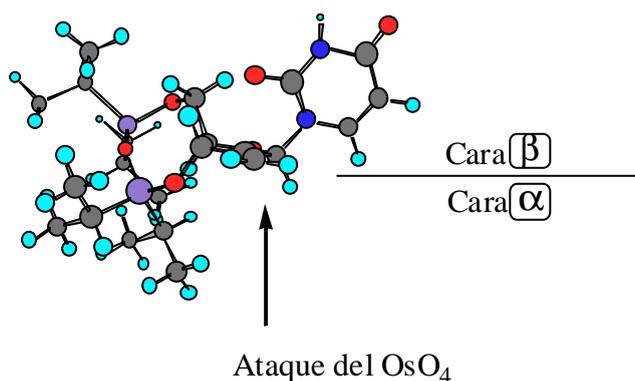


Figura 9- Ataque del OsO_4 por la cara α .

Esto fue confirmando al llevar a cabo la reacción en la que se obtuvo ambos diastereoisómero (**5**, Esquema 1) en una relación 95:5 según las señales de ^1H . Las señales más relevantes del ^{13}C -RMN de los productos indican la desaparición del metileno del doble enlace ($d=146$ ppm) y la aparición de una señal característica de carbono unido a oxígeno ($d \gg 55$ ppm) que tiene la fase característica de los carbonos unidos a dos hidrógenos en el experimento DEPT (Figura 4).

39. Van Rheine V. et al, *Tetrahedron Lett*, **1973** 1976

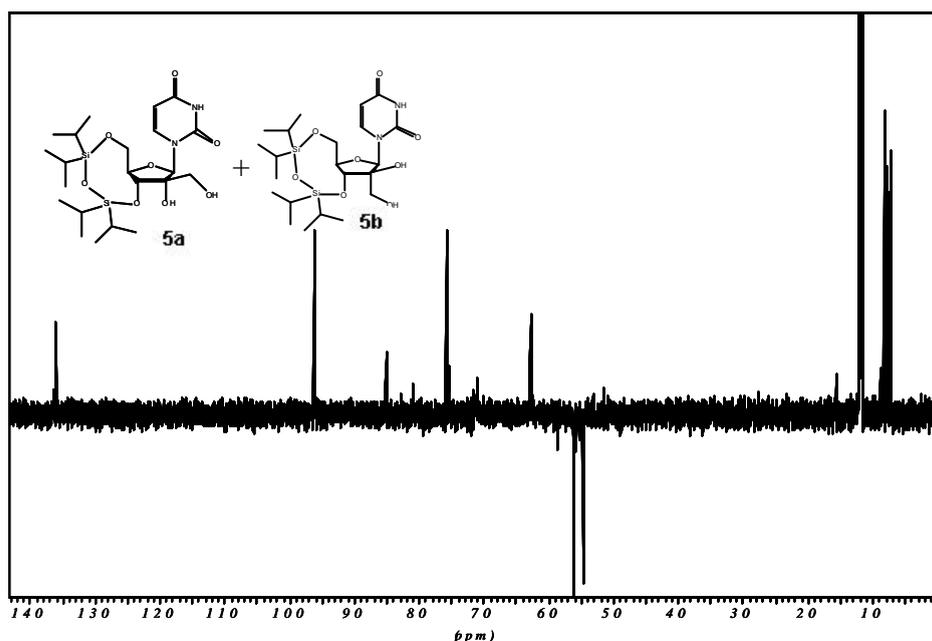


Figura 10 Experimento DEPT de (2'R)-2'-C-(Hidroximetil)-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxan-1,3-diil)uridina (**5**) en CDCl_3

El producto más abundante (**5a**) fue purificado; en este punto la configuración absoluta del carbono 2' fue asignada tentativamente como *R* (Figura 4) y la confirmación de esta asignación se llevó a cabo sobre el producto (**8**) mediante la determinación de las constantes de acoplamiento C-H dada la imposibilidad de medir los acoplamientos H-H por la ausencia de hidrógeno en el C-2⁴⁰.

Para continuar con la ruta sintética preestablecida era necesario obtener el tosilato (**6**) a partir del compuesto (**5a**) utilizando cloruro de *p*-toluensulfonilo. Para obtener este producto la reacción debía ocurrir regioselectivamente con el oxhidrilo primario en presencia del oxhidrilo terciario del C2'; esta regioselectividad fue posible gracias al impedimento estérico que este último que permitió completar reacción con un rendimiento del 60%.

El tosilato luego se redujo con NaBH_4 obteniéndose (**7**) con un rendimiento del 90%. Una vez concluida esta instancia se desprotegió el nucleósido tratándolo con fluoruro de tetrabutilamonio en THF, obteniendo así la 2'-C-metiluridina (**8**).

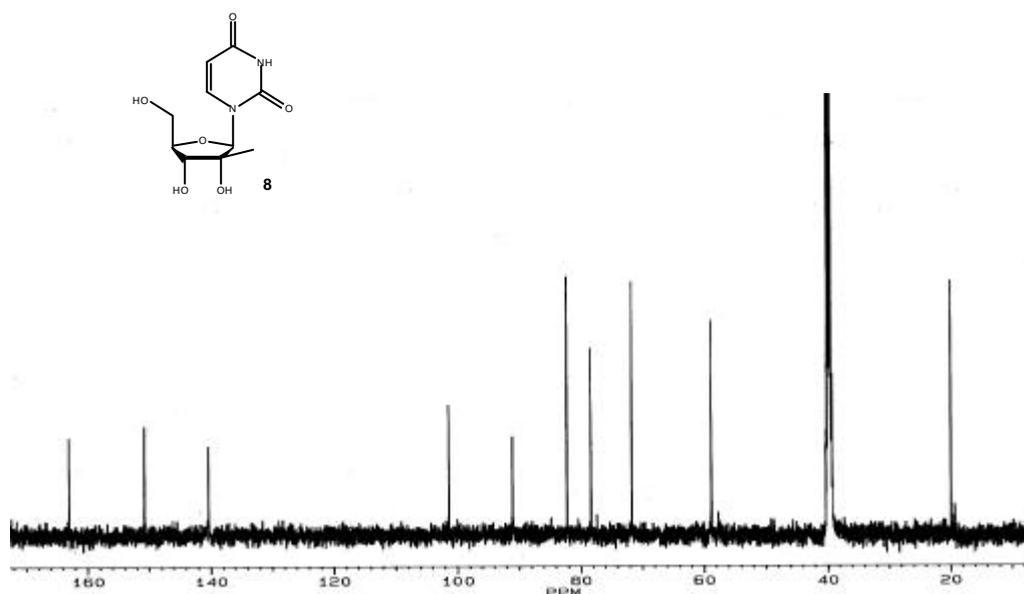


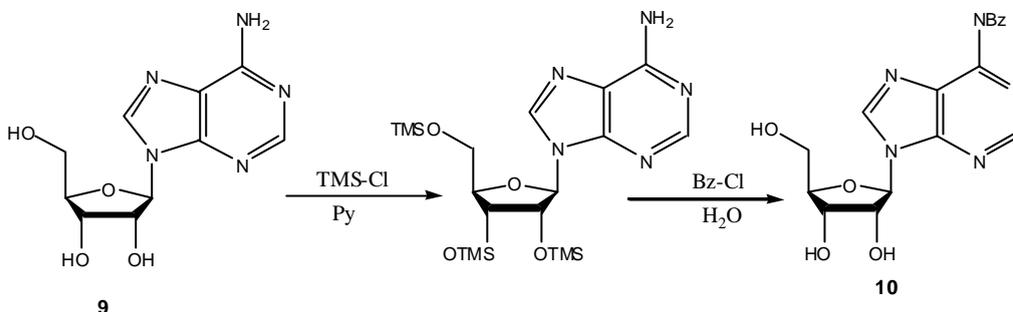
Figura 11 ^{13}C -RMN de 2'-C-metiluridina (**8**) en CDCl_3

40. Gallo M. et al , *Tetrahedron* **2001**, 57, 5707

3.2-Síntesis de la 2'-C-metiladenosina

Una vez concluida la síntesis de la 2'-C-uridina se decidió utilizar una ruta análoga para la preparación de la 2'-C-metiladenosina, la cual nunca había sido preparada por esta vía.

Con el fin de utilizar adenosina como reactivo de partida, fue necesario proteger el grupo amino exocíclico de la purina, para ello se utilizó la estrategia de "protección transitoria" descrita en el esquema 2.



Esquema 4- Protección transiente de la adenosina

En esta reacción los oxhidrilos de las posiciones 2', 3' y 5' fueron protegidos transitoriamente con el grupo trimetilsililo (TMS), una vez realizada la protección se procedió a benzoilar el grupo amino exocíclico y en el mismo medio de reacción se eliminaron los trimetilsililos por agregado de agua.

Una vez preparada la adenosina benzoilada se comenzó la síntesis de la 2-c-metiladenosina, según se indica en el Esquema 3

Se realizó la protección del los OH 3' y 5' con el reactivo de Markiewicz de la misma manera que fue realizado con la uridina, aislándose el producto (11) con un 90 % de rendimiento.

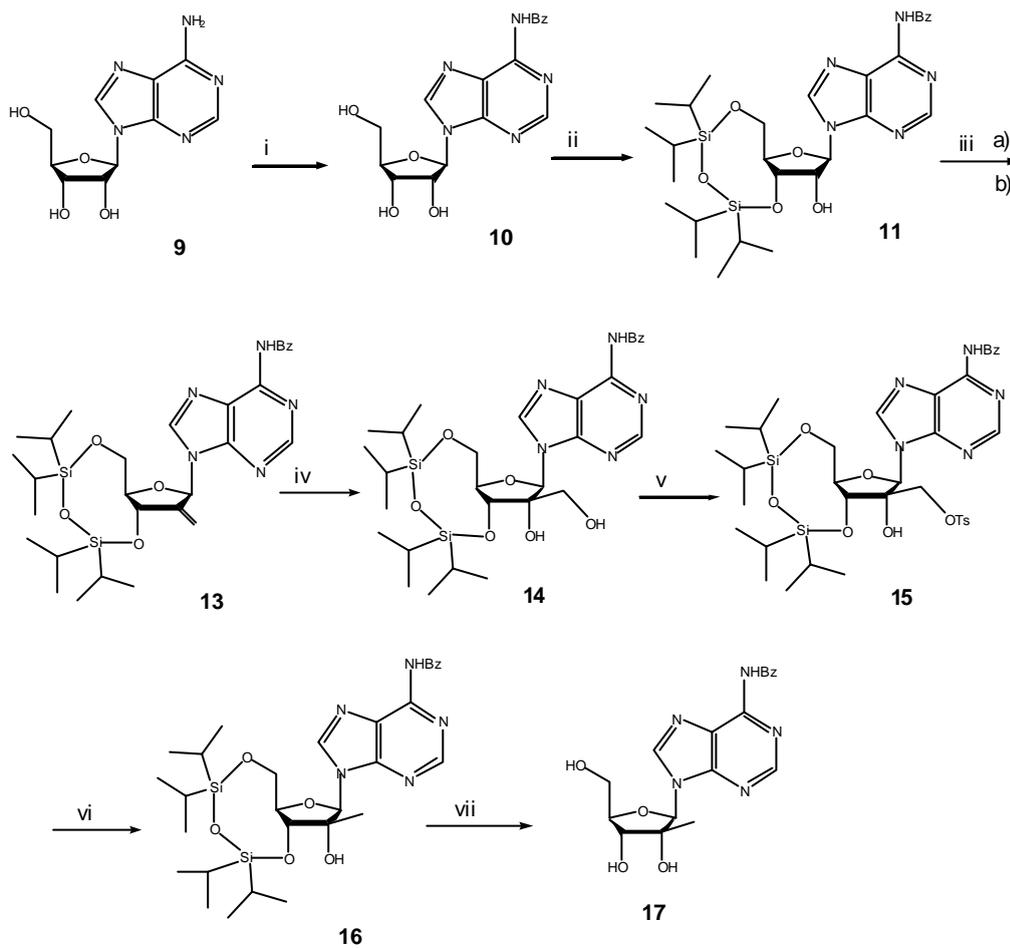
El paso posterior consistió en la oxidación del oxhidrilo del C-2'. A tales fines se utilizó en primera instancia trióxido de cromo/ piridina / anhídrido acético. Esta reacción resultó tener un rendimiento menor al 10%, presentándose además los problemas ya descritos para la eliminación del cromo. Este bajo rendimiento, comparado con el encontrado para la misma reacción con la uridina protegida con el puente disiloxano podría ser atribuido a la menor estabilidad del enlace glicosídico de las purinas sumado a efectos provocados por la coordinación del cromo sobre la base.

Con la intención de aumentar el rendimiento de este paso se recurrió a otras técnicas que obviarán la utilización de Cr, por lo que se decidió intentar realizar la modificación llevando a cabo la reacción de Swern⁴¹. Este método es generalmente utilizado para la oxidación de oxhidrilos en azúcares y utiliza dime-tilsulfóxido como oxidante y cloruro de oxalilo como activante electrofílico. En un primer momento se supuso que la ausencia de cromo en la reacción podría facilitar la posterior purificación y verse traducida en un mayor rendimiento, sin embargo el rendimiento de esta reacción no fue superior al de la oxidación con trióxido de cromo.

También se utilizó anhídrido acético⁴² en lugar de cloruro de oxalilo, pero se obtuvo nuevamente una mezcla compleja (figura 6).

41. Swern D. et al, *J Org Chem*, **1978** 43: 2480

42. Albright et al, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 89 2416

**Esquema 5** Preparación de la 2'-C-metiladenosina

i: TMCS, BzCl ii: a- TIPDSCl₂, Py; b- MeOH; iii: A) a- CrO₃, Py, Ac₂O, CH₂Cl₂; b- AcOEt; B) a- Ph₃P=CH₂, THF, b- Et₂O, NH₄Cl; iv: a- OsO₄, MNO, *t*-BuOH, THF, b- NaHSO₃ 1M, AcOEt, v: TsCl, Py; vi a- NaBH₄, DMF; b NH₄Cl; vii TBAF, THF

En posteriores intentos por mejorar este paso de reacción se observó que el rendimiento de la reacción con trióxido de cromo parecía disminuir al aumentar el tiempo que el nucleósido permanecía en contacto con el medio de reacción.

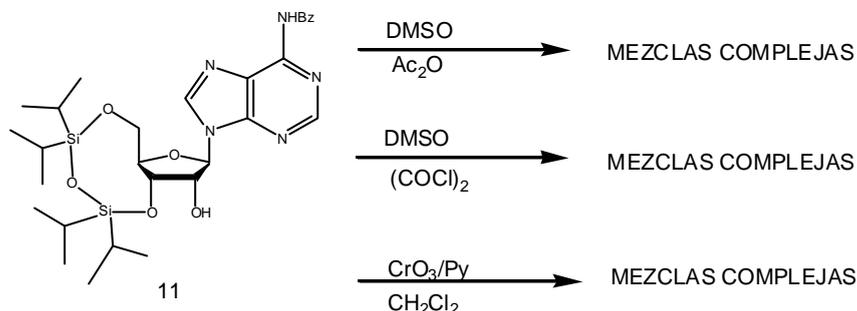


Figura 12 Intentos de oxidación de oxhidrilo 2' del compuesto (**11**)

Esta evidencia llevó a pensar que se debía reducir este tiempo, por lo que se decidió no trabajar el crudo de reacción y hacer reaccionar con el reactivo de Wittig inmediatamente después de una rápida percolación en silica gel. La introducción de esta modificación en la ruta sintética prevista significó un aumento sustancial en el rendimiento siendo posible la obtención del compuesto (**13**) con un rendimiento del 11% luego de ambas reacciones.

En la figura 7 se muestra el espectro de ¹³C-RMN y se indica la aparición del doble enlace carbono-carbono que tiene una fase negativa en el experimento DEPT con pulso a 135° a (δ=111,5 ppm)

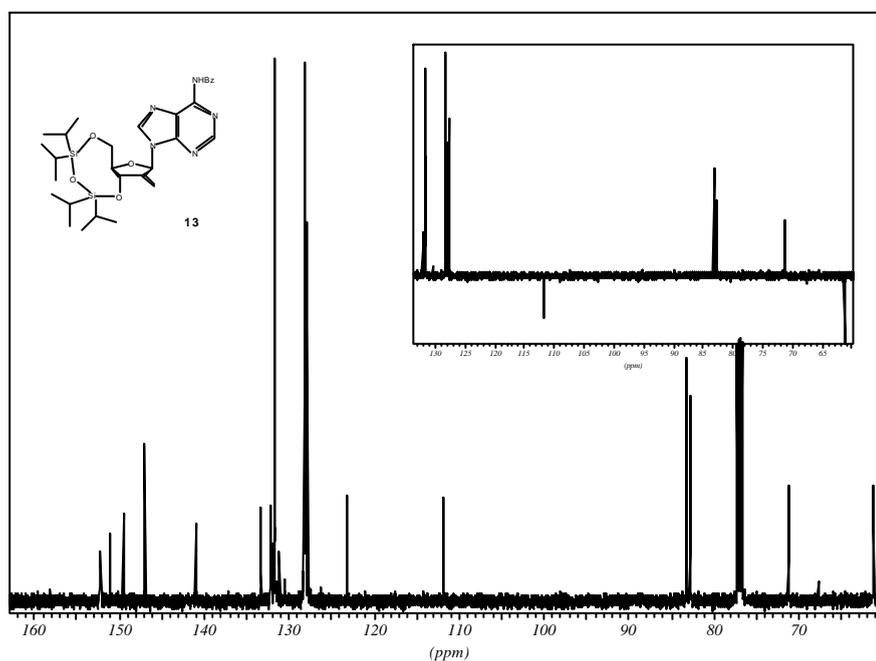


Figura 13. ¹³C-RMN de N⁶-Benzoil-2'-deoxi-2'-metilen-3',5'-O-(tetraisopropildisiloxan-1,3-dii)adenosina (**13**) en CDCl₃, DEPT (en recuadro).

El alqueno fue posteriormente oxidado con óxido de *N*-metilmorfolina y tetraóxido de osmio como catalizador, para formar el compuesto (**14**). La reacción demostró ser muy limpia y altamente estereoselectiva encontrando una relación de diastereoisómeros >99:1 según señales del ¹H-RMN y con un rendimiento del 66%.

El tratamiento del compuesto (**14**) con cloruro de *p*-toluensulfonilo condujo regioselectivamente a la formación del tosilato sobre el alcohol primario. Sin embargo la reacción mostró no ser tan limpia como en el caso de 2'-C-metiluridina obteniendo el producto deseado con un rendimiento del 19%

El paso siguiente fue completado mediante la adición de borohidruro de sodio disuelto en *N,N*-dimetilformamida anhidra, obteniendo el compuesto (**16**) con un rendimiento del 25%.

La desprotección del nucleósido se realizó por agregado de fluoruro de tetrabutilaminio con un rendimiento de alrededor del 100%, obteniendo una masa final de 10 mg de *N*-benzoil-2'-C-metiladenosina (**17**) en forma cuantitativa.

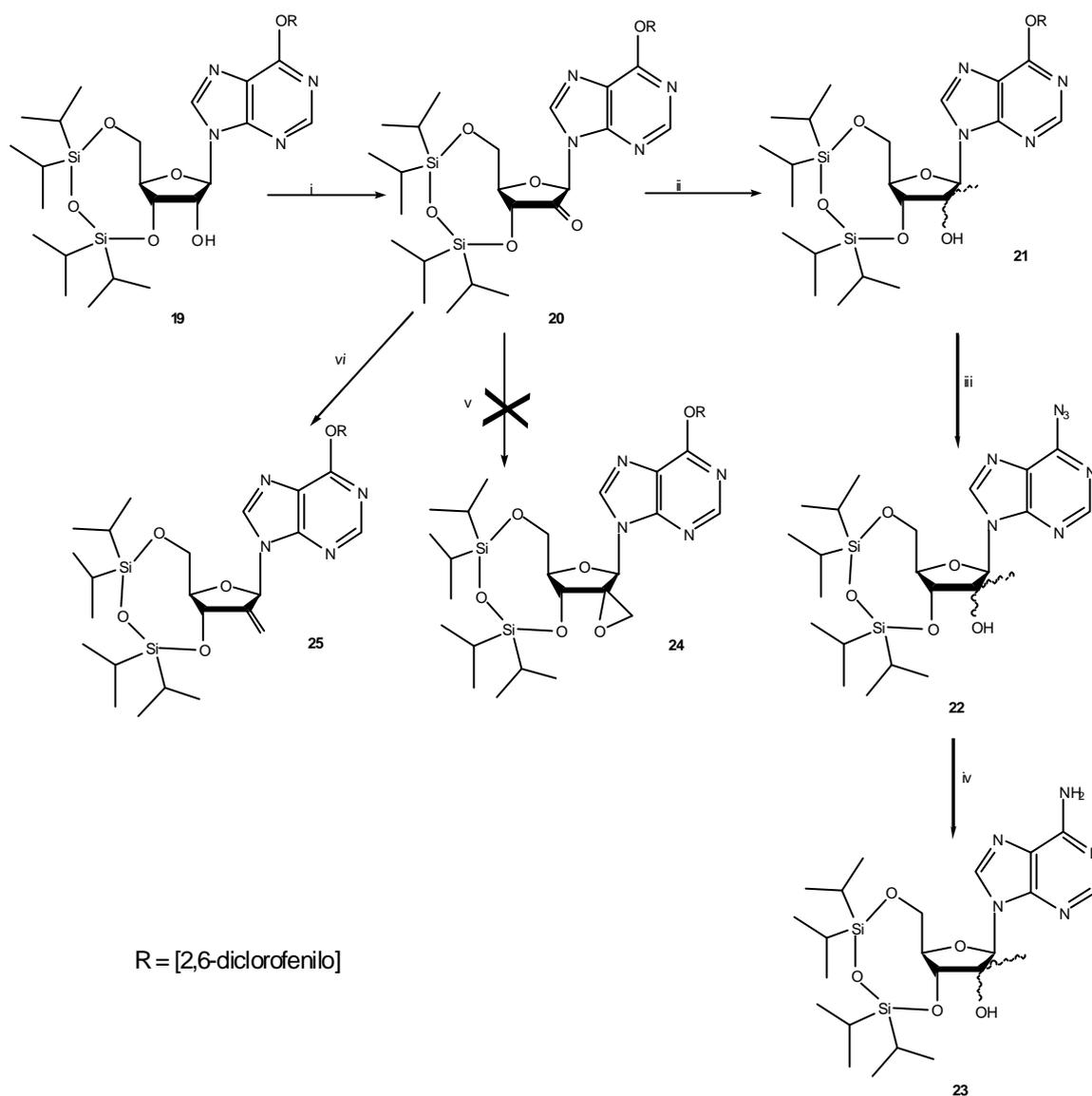
Debido a los bajos rendimientos en la síntesis de la 2'-C-metiladenosina siguiendo la estrategia utilizada para la 2'-C-metiluridina se buscó una ruta alternativa. Se decidió entonces utilizar la 6-O-(2,6 diclorofenil) inosina como producto de partida. Este análogo de inosina tiene la ventaja de permitir trabajar sobre el azúcar y posteriormente modificar la base para obtenerla adenosina o la inosina modificadas (ver Esquema 4)

Para comenzar con las reacciones en el carbono 2' se protegió con el reactivo de Markievicz; una vez purificado el producto fue oxidado con CrO₃. En esta oportunidad la oxidación tuvo un rendimiento del 90%. Este altísimo rendimiento con respecto a las oxidaciones de la adenosina podría ser atribuidas a la presencia de un oxígeno exocíclico en la base en lugar de un nitrógeno perteneciente a un grupo amida. Este reemplazo de una amida por un éter podría evitar la coordinación con cromo y la subsiguiente alteración de las propiedades electrónicas de la base, que serían causa de la inestabilización del enlace glicosídico.

Una vez aislado el compuesto (**20**) se intentó continuar con una ruta similar a la utilizada anteriormente, por lo que el paso siguiente debía ser la formación de un doble enlace carbono-carbono utilizando el reactivo de Wittig. Sin embargo el rendimiento de esta reacción fue extremadamente bajo, echo que creó la necesidad de utilizar rutas alternativas.

La primera ruta alternativa planteada consistió en la formación de un epóxido sobre el carbono 2', que por analogía a reacciones similares podría ser preparado estereoselectivamente mediante el ataque del ácido *m*-cloroperbenzóico por la cara *a* del azúcar menos impedida estericamente. Una vez formado el epóxido este podría ser abierto regioselectivamente, orientando un carbono en forma ecuatorial por encima del plano del anillo ribosídico y un oxhidrilo axial por debajo, llegando de esta forma al 2'-C-metilnucleósido en un solo paso. Sin embargo no se encontraron condiciones de reacción para que esto ocurriera.

La siguiente alternativa llevada adelante fue la esquematizada en el Esquema 4, y que utiliza la adición de un compuesto organometálico sobre el carbonilo del compuesto (**20**) para formar una nueva unión carbono-carbono. Para tener éxito el reactivo organometálico utilizado (MeMgI) debía atacar el C=O de 2' por la cara *b* y evitar de esta forma la producción excesiva del 2'-C-metilrabinonucleósido.



Esquema 6. Preparación de la 2'-C-metiladenosina por adición de un organometálico

i: CrO_3 , Py; xvii: MeMgI , Et_2O ; ii: NaN_3 , DMF; iii: H_2 , Pd/C; xx: m-CPBA; iv: a- $\text{Ph}_3\text{P}=\text{CH}_2$, THF, b- Et_2O , NH_4Cl

Al ser esta cara la más impedida fue necesario ajustar las condiciones de la reacción haciendo posible la obtención de ambos productos en una relación 1 a 1, pudiéndose observar por RMN la aparición de una señal correspondiente al carbono primario de la posición 2' ($\delta=20.3$ ppm).

Tras la purificación por columna se aisló uno de los diastereoisómeros (21) cuya configuración absoluta sobre el C2' hasta el momento no fue asignada, ya que para realizar esto es necesario determinar los acoplamientos por RMN y es conveniente hacerlos midiendo los acoplamientos C-H sobre el nucleósido totalmente desprotegido.

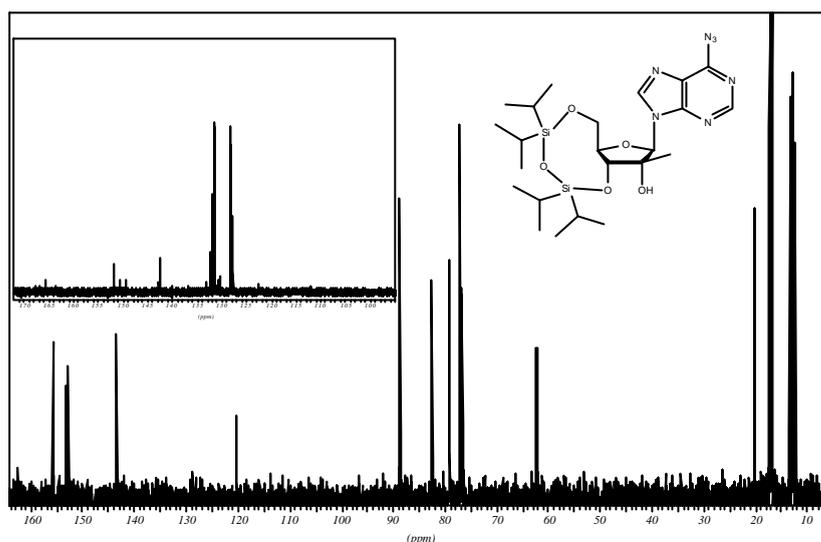


Figura 14. ^{13}C -RMN de 6 azido -2'-C-metil-3',5'-O-(1,1,3,3-tetraisopropilidiloxan-1,3-diil) inosina (**22**) en CDCl_3 , en recuadro zona aromática de (**21**).

La eliminación del grupo 2,6-diclorofenoxi para ello se realizó mediante una reacción con azida sódica en DMF que dio como el compuesto (**22**). Esto fue comprobado observando la desaparición de las señales en la zona aromática del ^{13}C -RMN producto de la eliminación del grupo 2,6-diclorofenoxi (ver figura 7).

Este compuesto *N*-sustituido pudo ser reducido con H_2 a una presión de 30-40 psi y utilizando paladio sobre carbono como catalizador, dando como producto la 2'-C-metiladenosina protegida con el puente disiloxano, el producto de esta reacción se pudo observar gracias a la aparición de un singulete ancho en ^1H -RMN perteneciente a las señales de los hidrógenos del grupo amino exocíclico ($\delta=5.01$ ppm).

Conclusión

Se sintetizó 2'-C-metiluridina siguiendo una ruta previamente desarrollada por el grupo de investigación, confirmando su gran estereoselectividad y alto rendimiento.

Se intentó utilizar sintetizar la 2'-C-metiladenosina utilizando una ruta análoga a la utilizada para la síntesis del primer compuesto, pero se encontró que esta no es adecuada debido a los rendimientos, especialmente el paso de oxidación posterior no tuvo el rendimiento suficiente para poder continuar por la ruta preestablecida.

Se diseñó una nueva ruta para la síntesis de la 2'-C-metiladenosina mediante la adición de un organometálico, consiguiendo obtener los diastereoisómeros en una proporción de 1 a 1, y rendimientos considerablemente mejores que los obtenidos por otras rutas, permitiendo preparar el nucleósido modificado en cantidades suficientes para continuar con la síntesis de los 2'-C-nucleótidos trifosfato.

Se diseñó una nueva ruta para preparar la 2'-C-metiladenosina, partiendo de un derivado de la inosina. Si bien este compuesto pudo superar el paso de oxidación exitosamente, la reacción de Wittig no pudo ser completada con buen rendimiento.

Se diseñó una nueva ruta para la síntesis de la 2'-C-metiladenosina mediante la adición de un compuesto organometálico, consiguiendo obtener los diastereoisómeros en una proporción de 1 a 1, y rendimientos considerablemente mejores que los obtenidos por otras rutas, permitiendo preparar el nucleósido modificado en cantidades suficientes para continuar con la síntesis de los 2'-C-nucleótidos trifosfato.

