

101
C



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EXPLORACION SINTETICA PARA LA OBTENCION
DE UN PRECURSOR DE ACRIDINA UNIDA A
OLIGONUCLEOTIDOS

T R A B A J O

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS
(QUIMICA ORGANICA)
PRESENTA LA
LIC. CIENCIAS QUIMICAS
CLAUDIA ARACELI CONTRERAS CELEDON



MEXICO, D. F.

1996



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO SEGUN EL TEMA :

PRESIDENTE :	Dr. Federico García Jimenez
PRIMER VOCAL :	Dr. Eugene Bratoeff Titeff
SEGUNDO VOCAL :	Dr. Luis Angel Maldonado Grael
TERCER VOCAL :	Dr. Gustavo García de la Mora
SECRETARIO :	Dr. Raymundo Cruz Almanza
PRIMER SUPLENTE :	Dr. Francisco Yuste López
SEGUNDO SUPLENTE :	M en C. José Manuel Méndez Stivalet

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA :

**INSTITUTO DE QUIMICA, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

ASESOR :

Dr. Roberto Martínez



ASESOR TECNICO :

Dr. Marco Augusto Brito Arias



SUSTENTANTE :

L. C. Q. Claudia Araceli Contreras Celedón



Este trabajo se realizó en el laboratorio 1-2 del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Roberto Martínez y del Dr. Marco Augusto Brito Arias.

DEDICATORIA

A mis padres :

***Sra. Alicia Celedón de Contreras
Sr. Mateo Contreras García***

porque gracias a su apoyo, comprensión y cariño he podido realizar una de mis metas más anheladas.

A mis hermanos

***Karina Yuvicel
Marcela Adriana
Pilar Alicia
Mateo Alberto***

por ser parte muy importante en mi vida

AGRADECIMIENTOS

A *Dios* por estar siempre conmigo

Al *Instituto de Química de la UNAM* por las facilidades otorgadas en el desarrollo del presente trabajo

Al *Dr. Roberto Martínez* por su gran ayuda en la realización de este trabajo

Al *Dr. Marco Augusto Brito Arias* por su asesoría, sus consejos y su paciencia

Al *M. en C. Paul Gaytán Colín* del Departamento de Síntesis del Instituto de Biotecnología de la UNAM por su contribución al desarrollo del presente trabajo

Al *M. en C. Edgardo Hernández Chavero* por su amistad, confianza y apoyo recibido durante todo este tiempo

A mis maestros *M en C. Leticia Barajas Bermudez, M. en C. Patricia Vega Sánchez* y *M en C. Jacinto Guadalupe Rodríguez Gómez* por su amplio apoyo durante la realización de este proyecto

A mis compañeros y amigos del laboratorio 1-2 del Instituto de Química de la UNAM por los momentos que compartimos

A todas aquellas personas que colaboraron en la realización de este proyecto

INDICE

	PAG
RESUMEN	2
GLOSARIO	4
ANTECEDENTES	5
OBJETIVO	15
DISCUSION	16
RESULTADOS	24
CONCLUSIONES	34
PARTE EXPERIMENTAL	35
BIBLIOGRAFIA	47
ANEXO	49

RESUMEN

Durante los últimos años gracias a la incorporación de rutas sintéticas más viables, los oligonucleótidos sintéticos han cobrado gran auge en diversas áreas relacionadas a la medicina y a la biología molecular. Continuamente se vienen reportando nuevas metodologías para la preparación de oligonucleótidos en cantidades que permiten su manipulación con fines sintéticos y de ensayos biológicos.

Además del escalamiento en la obtención de oligonucleótidos, estas técnicas han permitido la obtención de oligonucleótidos modificados en cualquiera de sus partes, es decir en la base nitrogenada, en la furanosa ó en el grupo fosfato. Otra consecuencia de la química de los nucleótidos es la preparación de oligonucleótidos unidos a una gran variedad de moléculas entre las que se pueden mencionar los derivados de esteroides y de anillos aromáticos.

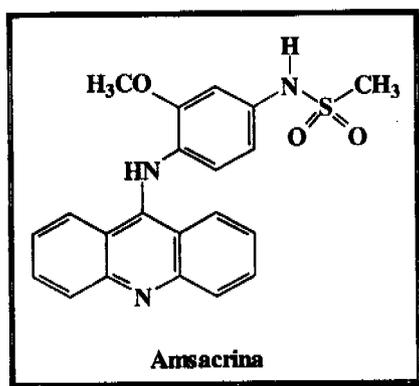
El interés que despierta acoplar moléculas a cadenas sencillas de oligonucleótidos se debe a los efectos que causan los derivados de esteroides en el mejoramiento de la permeabilidad a través de las membranas y por tanto de su distribución a sitios intercaladores. Para el caso de acoplar anillos aromáticos a oligonucleótidos se ha observado que existe un sensible incremento de las interacciones a la doble hélice de ADN lo cual es debido al poder intercalante de los derivados de anillos bencénicos. Dentro de éstos, los derivados de acridina han demostrado poseer una marcada capacidad como agentes intercalantes de ADN y en consecuencia se han propuesto como agentes antitumorales potenciales.

Un inconveniente que presenta la quimioterapia en contra del cáncer es la ausencia de moléculas ó compuestos que actuen en regiones específicas de genomas neoplásicos sin afectar células normales. Como alternativa a este inconveniente se propone el uso de moléculas unidas a oligonucleótidos que tengan secuencias específicas en la región de ADN en la cual se pretende ejercer la acción antitumoral. Los antibióticos naturales tales como la *adriamicina* y drogas

sintéticas como la *amsacrina* interactúan con el ADN y son ampliamente utilizadas en el tratamiento clínico de una gran variedad de enfermedades neoplásicas.

Por otra parte se ha observado que los oligonucleótidos unidos a moléculas además de proporcionar especificidad de secuencia también actúan como acarreadores biológicos. Se ha encontrado que los oligonucleótidos sustituidos pueden interactuar tanto sobre secuencias de ARN formando dobles hélices (*oligos antisense*) como en secuencias de ADN para formar triples hélices a través de interacciones por puentes de hidrógeno tipo Hoogsteen¹.

Los compuestos que actúan a nivel de material genético lo hacen como agentes intercalantes (*acridina*) ó de rompimiento de hélice (*dinamicina*²); también se han descrito un gran número de estudios físicos sobre las interacciones del ADN con cationes aromáticos planos (*proflavina*, *netropsina*³). Debido a su relativa simplicidad, las interacciones de moléculas pequeñas con ácidos nucleicos proporcionan gran información sobre las transiciones conformacionales inducidas por el ligando⁴.



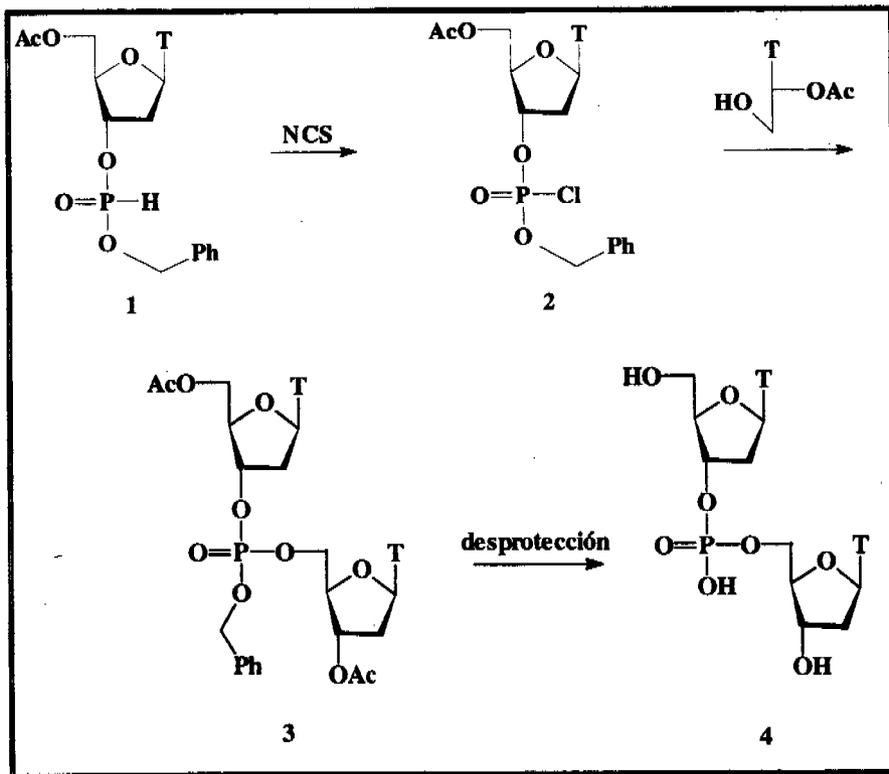
GLOSARIO

T	timidina
NCS	N-clorosuccinimida
AcO	acetato
Tr	tritulo
DCC	diciclohexilcarbodiimida
MSCl	cloruro de mesitilensulfonilo
TPSCl	cloruro de 2,4,6,-triiisopropilbencensulfonilo
MMTr	<i>p</i> -anisildifenilmetilo
Py	piridina
DMTrCl	cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo
<i>t</i> -BuOOH	hidroperóxido de <i>tert</i> -butilo
PPA	ácido polifosfórico
TMS	tetrametilsilano
CDCl ₃	cloroformo deuterado
s	señal simple
d	señal doble
t	señal triple
m	señal múltiple ó compleja
eq	equivalentes

ANTECEDENTES

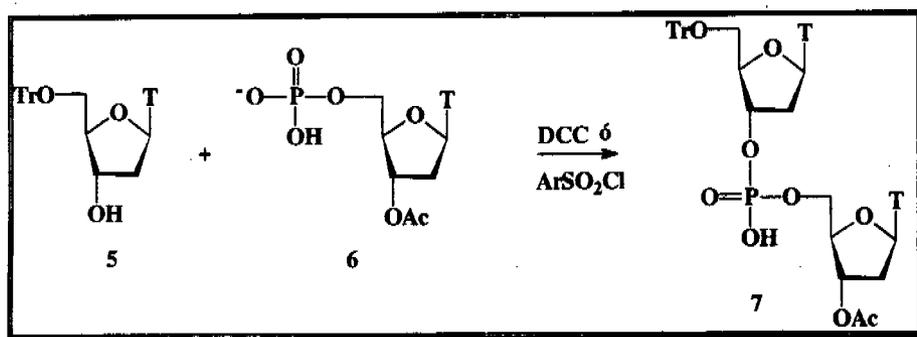
Históricamente, el descubrimiento de la estructura helicoidal del ADN hecho por Watson y Crick⁵ dió la fuerza necesaria para hacer cambios en las síntesis de oligonucleótidos con secuencias definidas. Michelson y Todd⁶ reportaron en 1955 la primera síntesis química de un dinucleótido que contenía un enlace internucleótido (3'-5') idéntico al del ADN natural.

Los primeros estudios se basaron en la activación del 3'-O-(5'-O-acetildesoxitimidinilo)-H-fosfonato de bencilo **1** con N-clorosuccinimida formando el correspondiente clorofosfato **2** seguido de la adición de 3'-O-acetiltimidina. El dinucleósido fosfatotriester **3** resultante se convirtió después de remover los grupos protectores en el ácido timidílico natural **4** (*Esquema 1*).



ESQUEMA 1

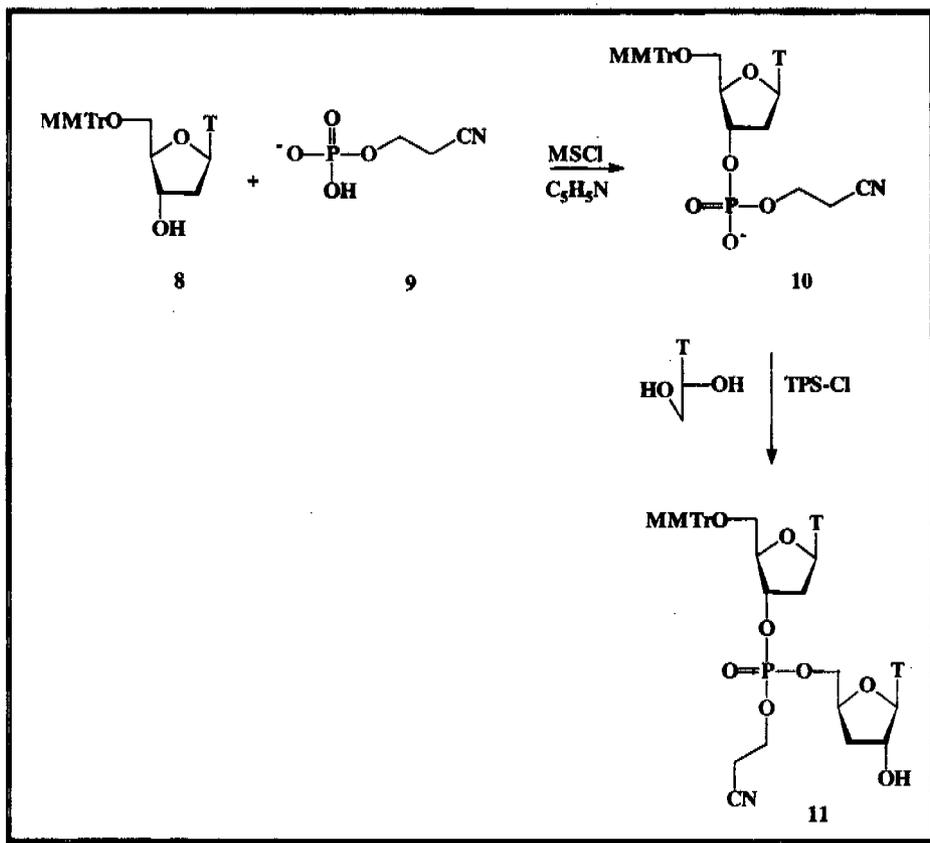
A finales de los 50's Khorana llevó a cabo la preparación de secuencias definidas de desoxirribopolinucleótidos las cuales ayudarían a describir el código genético^{7,8}. La metodología química utilizada para la síntesis de estos oligómeros involucra la condensación de un nucleósido que tiene el grupo OH-3' libre y el grupo OH-5' protegido por el grupo tritilo **5** (sensible a medios ácidos), con un 5'-fosfato nucleósido que contiene el grupo OH-3' bloqueado por un grupo acetilo **6** (sensible a medios básicos). El acoplamiento ocurre en presencia de un agente condensante tal como DCC, MS-Cl, TPS-Cl para formar el fosfato dinucleósido **7** (*Esquema 2*).



ESQUEMA 2

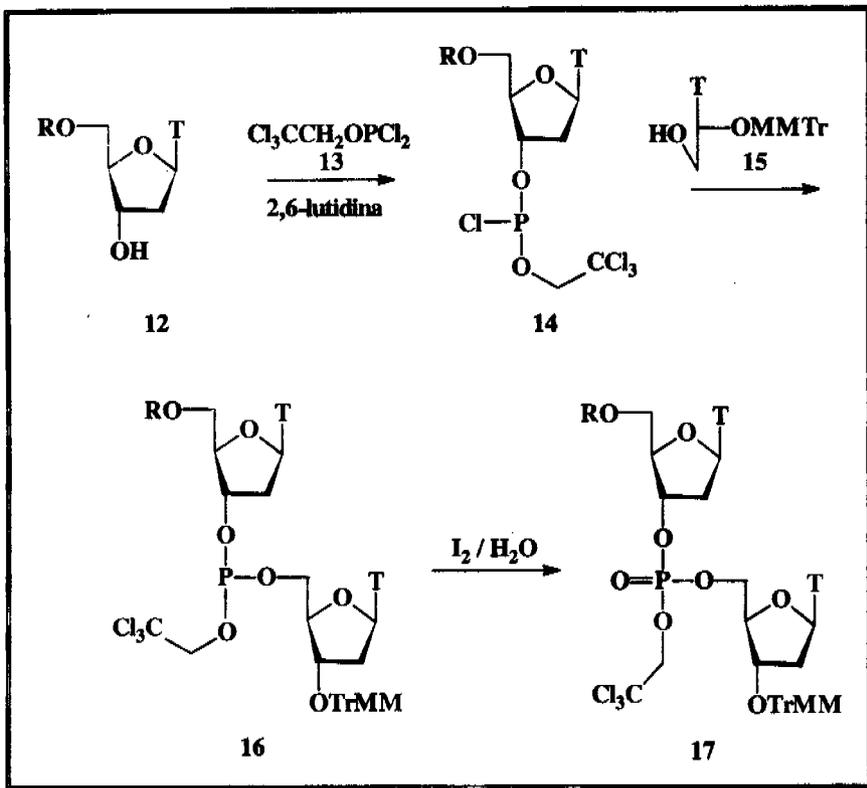
La extensión de la cadena nucleotídica se lleva a cabo al remover el grupo acetilo de la posición 3' en **7** y por condensación subsecuente con otra molécula de **6** se obtiene un nuevo 5'-fosfato nucleósido protegido⁹.

Letsinger y Ogilvie^{10,11} demostraron que la condensación de un desoxirribonucleósido 5'-O-protegido **8** con un monoéster fosfato **9** en presencia de MS-Cl genera el correspondiente fosfodiéster nucleósido intermediario **10**. La adición de un desoxirribonucleósido que tiene el grupo OH-5' libre en presencia de TPS-Cl como agente condensante genera el fosfato triéster dinucleósido **11** el cual se separa fácilmente de la materia prima iónica por medio de una cromatografía en gel de sílice (*Esquema 3*).



ESQUEMA 3

A mediados de los 70's Letsinger^{12,13} revolucionó la síntesis química de oligonucleótidos a través de la metodología del "fosfitotriester". Esencialmente, el método consiste en llevar a cabo la reacción de la desoxitimidina 5'-O protegida 12 con el diclorofosforidito de 2,2,2-tricloroetilo 13 para generar en 5 minutos a -78°C un intermediario desoxirribonucleósido 3'-O-fosforocloridito 14. La adición de la desoxitimidina 3'-O-protegida 15 resulta en la rápida formación del dinucleósido fosfitotriester 16 el cual se oxida al correspondiente fosfato triester 17 por una solución acuosa de I₂ (Esquema 4).



ESQUEMA 4

Los clorofosfitos desoxirribonucleósidos son intermediarios altamente reactivos, inestables y muy sensibles a la humedad así como también son difíciles de manejar bajo condiciones normales. Teniendo en cuenta estos problemas, Beaucage y Caruthers¹⁴ desarrollaron los fosforamiditos desoxirribonucleósidos como una nueva clase de intermediarios para la síntesis de oligonucleótidos.

En años recientes se han estudiado las propiedades de drogas enlazadas al ADN como agentes antitumorales potenciales¹⁵. Algunos antecedentes que se tienen sobre esta área reportan la síntesis de uracilos acridinil sustituidos vía la reacción

de enamina entre el 6-aminouracilo y la 9-cloroacridina; estos compuestos poseen actividad antitumoral así como antibacterial y antifúngica.

Las drogas se enlazan al ADN en varias formas, pero se dividen en 2 clases principales : intercalantes y no intercalantes. En el primer caso los compuestos están enlazados reversiblemente con el ADN y en el segundo caso los compuestos sólo interactúan con el ADN, no hay enlace covalente. El ADN tiene la capacidad reversible de incluir moléculas aromáticas planas las cuales se insertan entre los pares de bases de la doble hélice¹⁶.

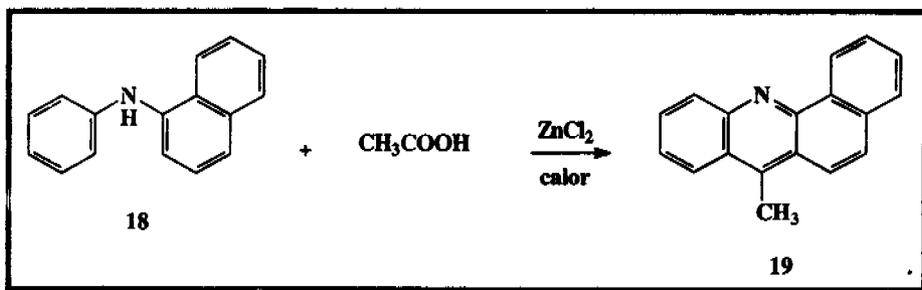
Sin embargo, una serie de análogos de la *amsacrina* empleados como intercaladores presentan una excelente actividad anticancerígena. Esto ha creado un gran interés por encontrar nuevos tipos de agentes intercalantes que posean actividad antitumoral y así poder entender en forma detallada el modo de enlace con la estructura del ADN.

El anaranjado de acridina y el tetra N-metil derivado de la *proflavina* han sido utilizados desde hace tiempo como indicadores histológicos que demuestran la presencia de ácidos nucleicos. Estos compuestos se intercalan en la doble cadena helical del ADN *in vitro*, ocasionando un cambio pronunciado en sus propiedades físicas; la viscosidad de la solución aumenta, la velocidad de sedimentación disminuye, etc. Estos efectos demuestran que las moléculas de acridina se han intercalado entre los pares de bases causando una distorsión local y parcial de la doble hélice originando un incremento en la longitud de la molécula de ADN.

La intercalación ha sido demostrada con un gran número de compuestos que tienen un sistema policíclico aromático y grupos que son capaces de formar puentes de hidrógeno. Algunos de estos compuestos son : la 9-aminoacridina y el *trypanocida ethidium* que son compuestos con actividad antibacterial, la *mepacrina* y la *cloroquina* que tiene actividad contra la malaria, además de un gran número de antibióticos incluyendo las *actinomicinas*, *echinomicinas* y *bleomicinas*.

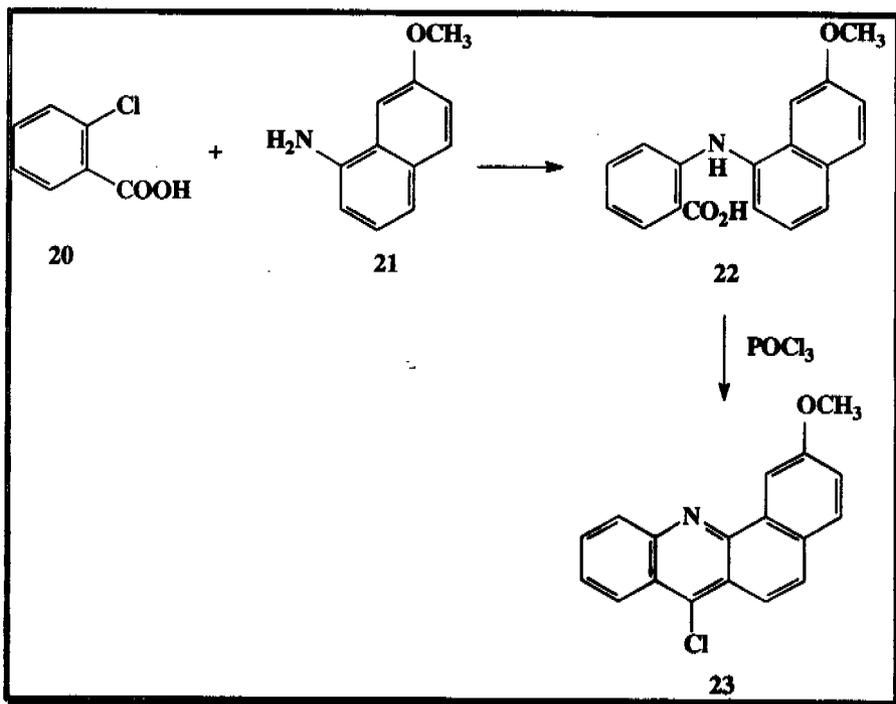
Estos derivados de la acridina fueron sintetizados por los siguientes métodos¹⁷: reacción de Bernthsen, ciclación de 2-carboxifenilnaftilaminas, la reacción de Ullmann-Fetvadjian y la reacción de Pfitzinger.

En la reacción de Bernthsen^{18,19}, la N-fenil-1-naftilamina **18** se calienta en presencia de un ácido orgánico para obtener la benz[a]acridina **19**; en algunos casos se utiliza el anhídrido del ácido y un catalizador que puede ser ZnCl₂, AlCl₃ ó PPA (*Esquema 5*).



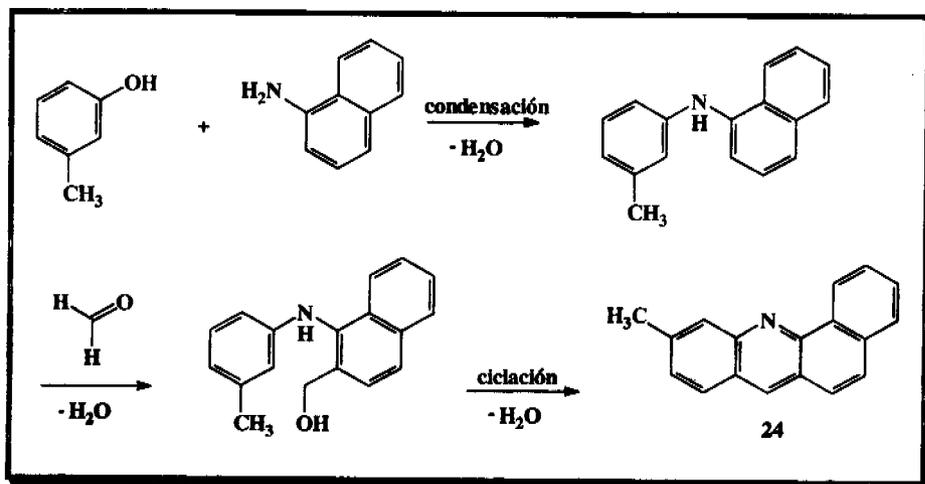
ESQUEMA 5

Los productos de ciclación de 2-carboxifenilnaftilaminas con POCl₃ son las 7-clorobenzen[c]acridinas. Por ejemplo en la condensación de Ullmann del ácido 2-clorobenzoico **20** con la 7-metoxi-1-naftilamina **21** se forma el ácido (7-metoxi-1-naftil)antranílico **22**, el cual se convierte en la 7-cloro-2-metoxibenz[c]acridina **23** por tratamiento con POCl₃²⁰ (*Esquema 6*).



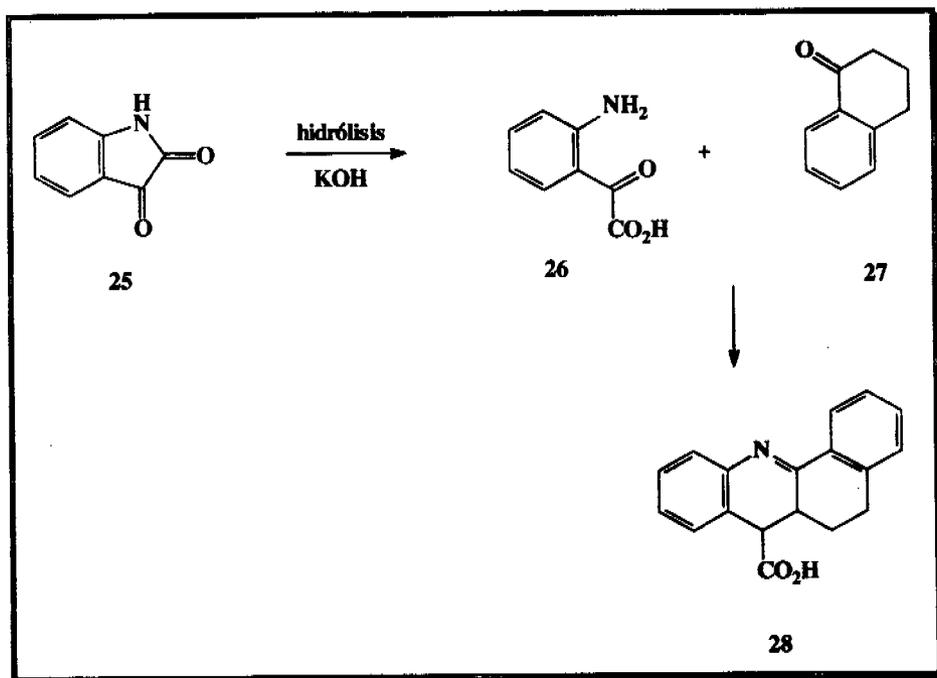
ESQUEMA 6

La reacción de Ullmann-Fetvadjian²¹ (condensación de paraformaldehído con una mezcla caliente de un naftol y una arilamina primaria), es también un método conveniente para la síntesis de benz[c]acridinas. En este método, aminas aromáticas como la anilina y la 1-naftilamina reaccionan primero con los naftoles (fenoles) y el producto de reacción se cicla en presencia del aldehído (paraformaldehído). Así por ejemplo la 1-naftilamina, el *m*-cresol y el formaldehído reaccionan para dar la 10-metilbenz[c]acridina **24** (Esquema 7).



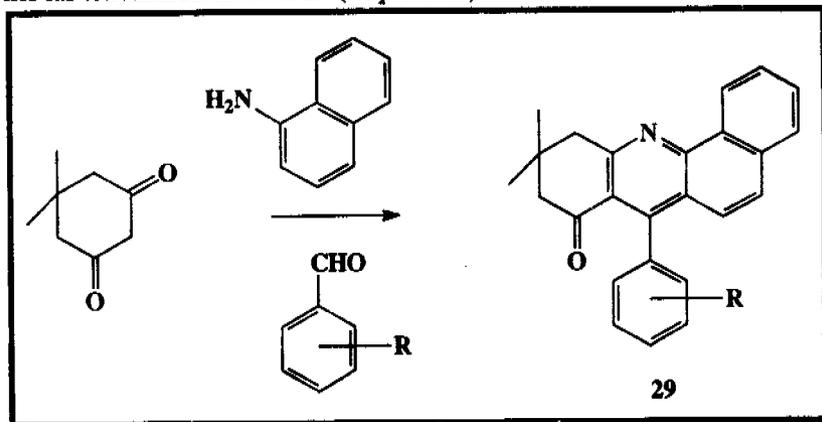
ESQUEMA 7

En la reacción de Pfitzinger,²² la isatina **25** en medio básico (KOH) se convierte en el ácido isatónico **26**, el cual se condensa con la α -tetralona **27** (así como con otras cetonas cíclicas) para formar la 7-carboxi-5,6-dihidrobenc[*c*]acridina **28** (Esquema 8).



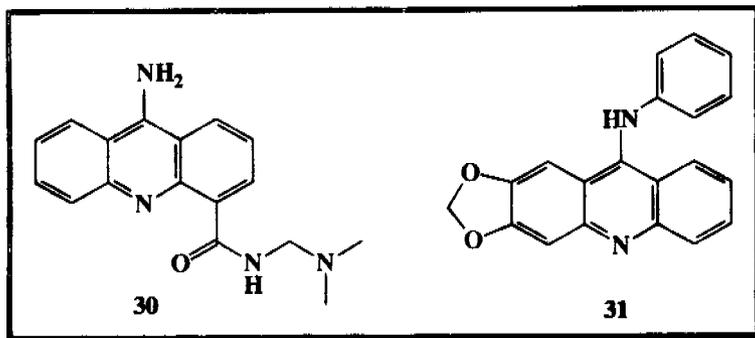
ESQUEMA 8

Otro de los métodos disponibles²³ para generar este tipo de sistema consiste en la condensación de dimedona, α -naftilamina y aldehídos aromáticos lo que permite obtener las tetrahydroacridonas **29** (Esquema 9).



ESQUEMA 9

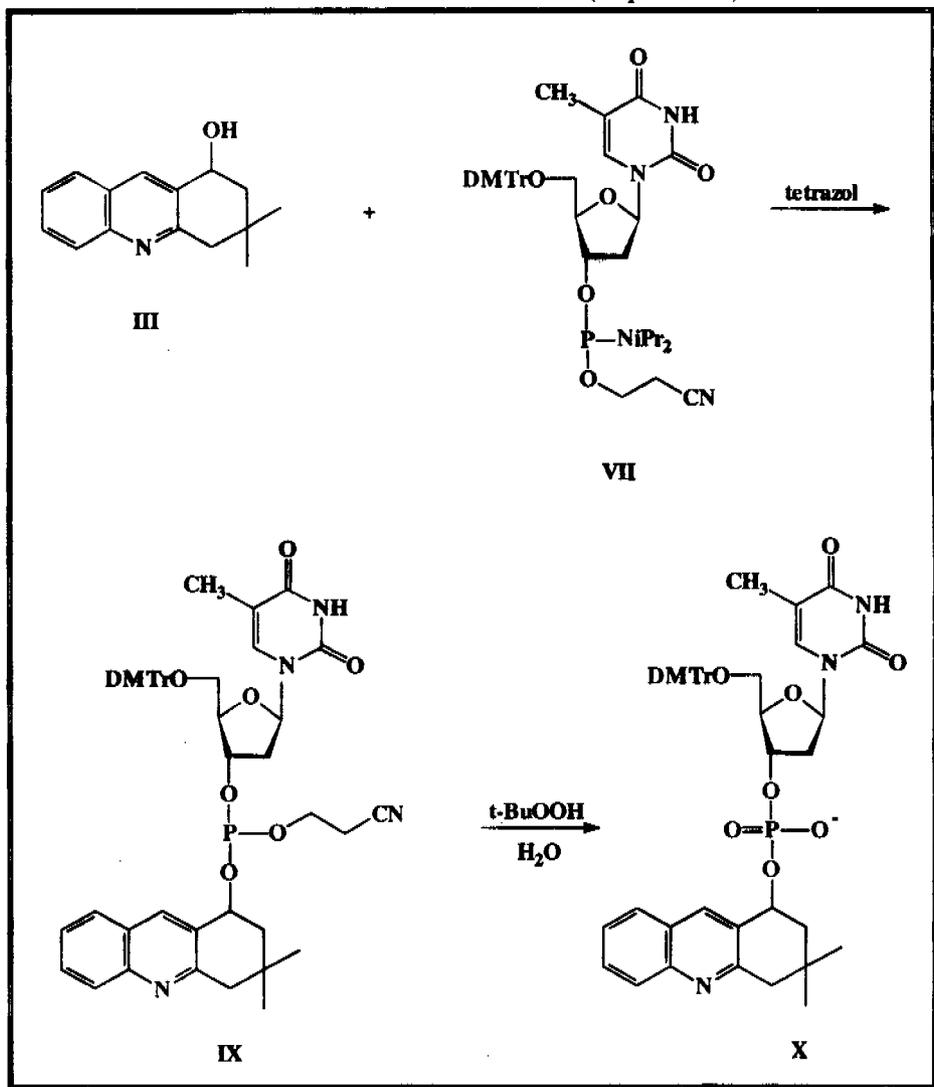
Las acridinas tienen una amplia gama de propiedades farmacológicas. Por ejemplo, se ha encontrado que **30** tiene aplicación en el tratamiento de la leucemia y **31** es utilizado como agente antitumoral²⁴ (Esquema 10)



ESQUEMA 10

OBJETIVO

Obtener el tetrahidroacridinol **III** vía una nueva ruta sintética y diseñar una ruta general de síntesis para la obtención del producto de condensación entre **III** y la timidina **VII** vía el método del fosforamidito triéster (*Esquema 11*).



ESQUEMA 11

DISCUSION

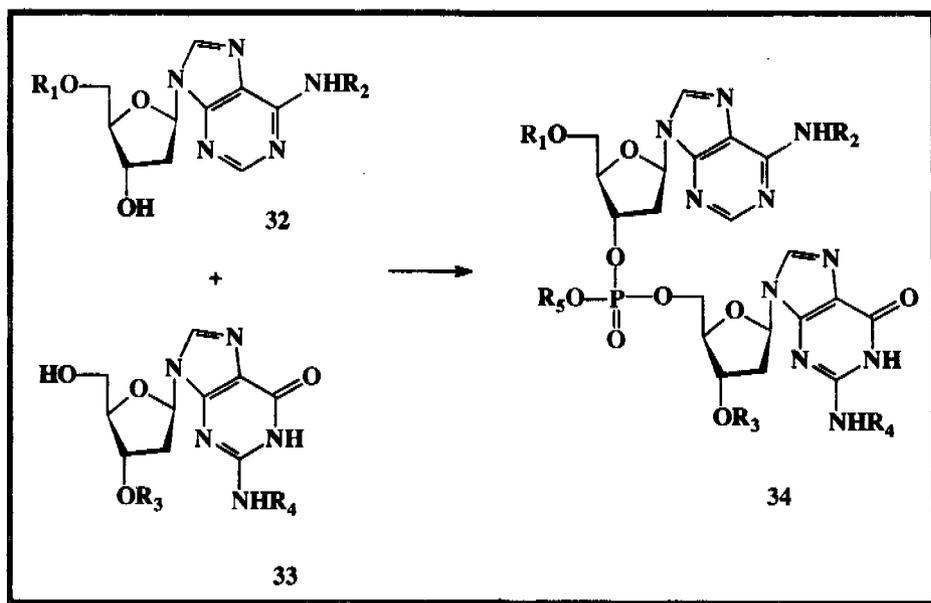
Un oligonucleóido es una cadena que contiene un número de unidades de nucleósidos unidos por medio de un enlace fosfodiéster. En general, los fosfodiesteres se forman entre un grupo hidroxilo 3' de un nucleósido y el grupo hidroxilo 5' de otro: es de esta forma que se encuentran en los ácidos nucleicos.

Los ácidos nucleicos son altamente sensibles a un gran número de reacciones químicas y solamente en las condiciones adecuadas se puede llevar a cabo la formación de una cadena de oligonucleótidos. Las bases heterocíclicas son sensibles a la alquilación, oxidación y reducción. El enlace fosfodiéster es vulnerable a la hidrólisis. En el caso del ADN, la hidrólisis ácida se lleva a cabo más rápidamente que la básica, debido a la sensibilidad del enlace glicosídico C' - N, especialmente en el caso de nucleótidos de purina (depurinación). Tales consideraciones limitan el rango de reacciones químicas en la síntesis de oligodesoxirribonucleótidos a:

- 1.- Hidrólisis en medio ligeramente alcalino
- 2.- Hidrólisis en medio muy ligeramente ácido
- 3.- Reacciones de desplazamiento ligeramente nucleofílico
- 4.- Reacciones de eliminación catalizadas por base
- 5.- Sólo algunas reacciones de oxidación

El paso clave para la síntesis de oligodesoxirribonucleótidos es la formación específica y secuencial de las uniones 3'-5'-fosfodiéster. Los principales centros nucleofílicos en un 2'-desoxirribonucleósido son el grupo 5'-OH, el grupo 3'-OH y en el caso de la adenina, citosina y guanina el grupo amino exocíclico. Para formar específicamente un enlace 3'-5' entre dos unidades de 2'-desoxirribonucleósidos los centros nucleofílicos no involucrados en el enlace deben estar químicamente protegidos. La primera unidad -(5') debe tener grupos protectores en el grupo hidroxilo 5' y en la base heterocíclica, mientras que en la segunda unidad -(3') debe estar protegida en el grupo hidroxilo 3' y en la base heterocíclica. Por ejemplo en la

unión de una unidad de 5'dA **32** y 3'-dG **33** (*Esquema 12*), donde R_1 y R_2 son grupos protectores para la 5'-dA y R_3 y R_4 son grupos protectores para la 3'-dG.



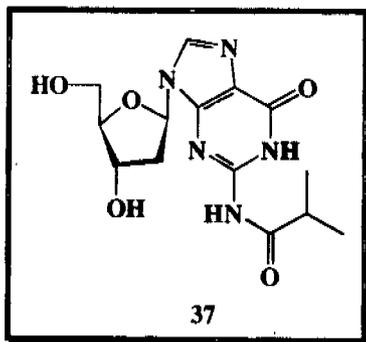
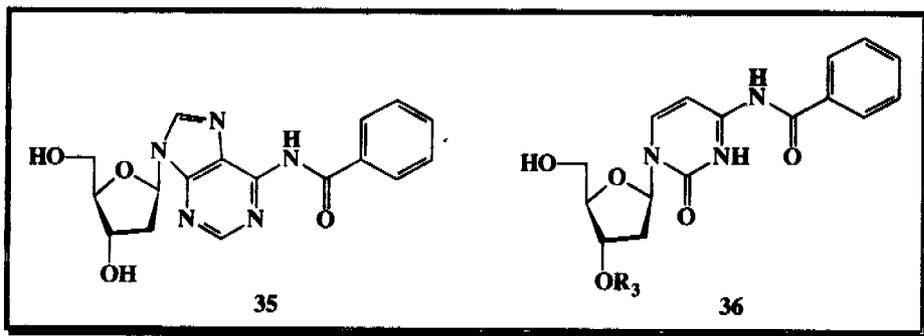
ESQUEMA 12

Una de las dos unidades se fosforila ó fosfitila en el único grupo hidroxilo libre y entonces se une a la otra unidad de nucleósido en una reacción de acoplamiento. El monofosfato dinucleósido resultante está totalmente protegido. Comúnmente los fosfatos tienen un grupo protector R_5 que se introduce durante la fosforilación ó la fosfitilación, de manera que el fosfato internucleósido es un triéster **34**. Para extender la cadena, uno de los dos grupos protectores terminales R_1 ó R_3 se remueve selectivamente para generar un grupo hidroxilo libre en el cual se dá el acoplamiento con otra unidad.

La forma más conveniente para llevar a cabo la reacción de acoplamiento es utilizar el fosfato desoxinucleósido como unidad básica y llevar secuencialmente los acoplamientos. Debido a que el grupo hidroxilo 5' es más nucleofílico que el hidroxilo 3' los grupos fosfatos se forman en la posición 3'. Para llevar a cabo esta

reacción selectiva se requiere proteger los grupos amino heterocíclicos y el grupo hidroxilo 5'.

Se sabe que los grupos acilo son estables por largos períodos de tiempo a condiciones ligeramente ácidas ó básicas, así como a las condiciones de cromatografía, pero que son removidos por tratamiento con amoniaco acuoso al final de la síntesis. El grupo benzoilo se utiliza para proteger la base adenina **35** y la base citosina **36**, así como el *isobutirilo* para la base guanina **37** (*Esquema 13*).



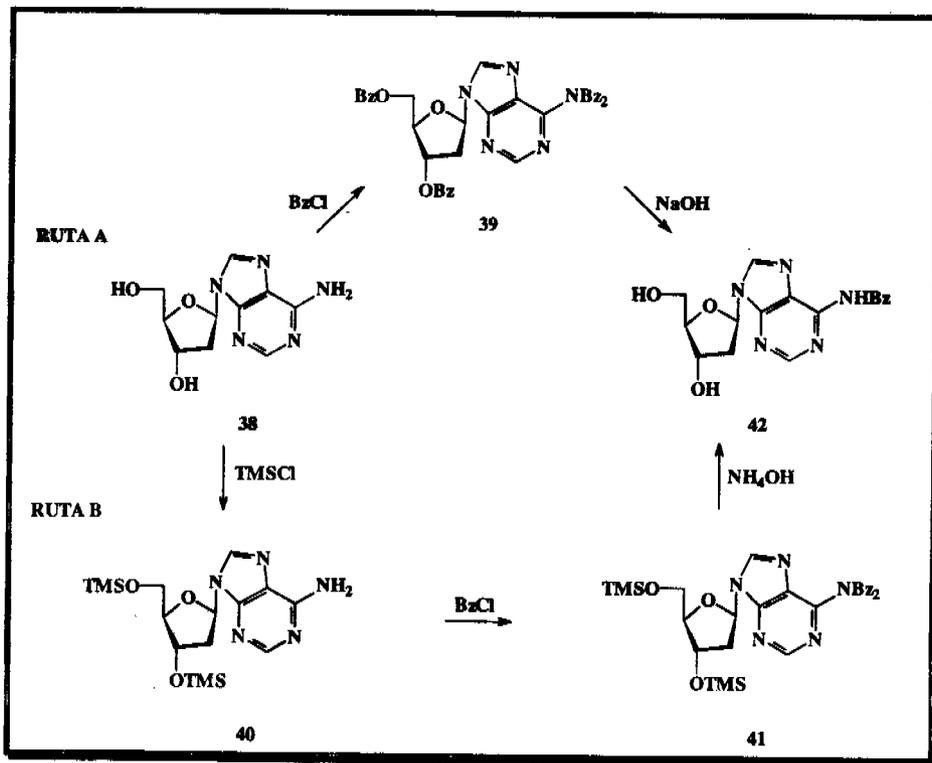
ESQUEMA 13

Los grupos protectores se introducen por acilación de la unidad de 2-desoxirribonucleósidos. En el caso de citosil derivado, se lleva a cabo la acilación selectiva de los grupos amino, pero los grupos oxhidrilo del adenil y guanil

derivados son también nucleofílicos, por lo que es necesario emplear otros procedimientos de acilación; por ejemplo :

1.-*per-acilación* : se utiliza un gran exceso de agente acilante que reacciona con los grupos hidroxilo y el amino, después se desprotege selectivamente a los grupos hidroxilos. Esta selectividad se debe a la gran estabilidad de amidas comparada con la de los ésteres a pH básicos (*Esquema 14, ruta A*)

2.-*protección transiente* : los grupos hidroxilo del azúcar son sililados con TMSCl. Posteriormente se lleva a cabo la benzoilación formando el derivado dibenzoilado, el cual se desprotege con amoníaco acuoso (*Esquema 14, ruta B*).



ESQUEMA 14

Asimismo, el mejor grupo protector para el grupo 5'-OH es el 4,4'-dimetoxitritilo. Este se introduce por reacción del DMTrCl en presencia de catalizadores ligeramente básicos tales como la piridina ó la 4-dimetilaminopiridina. Por

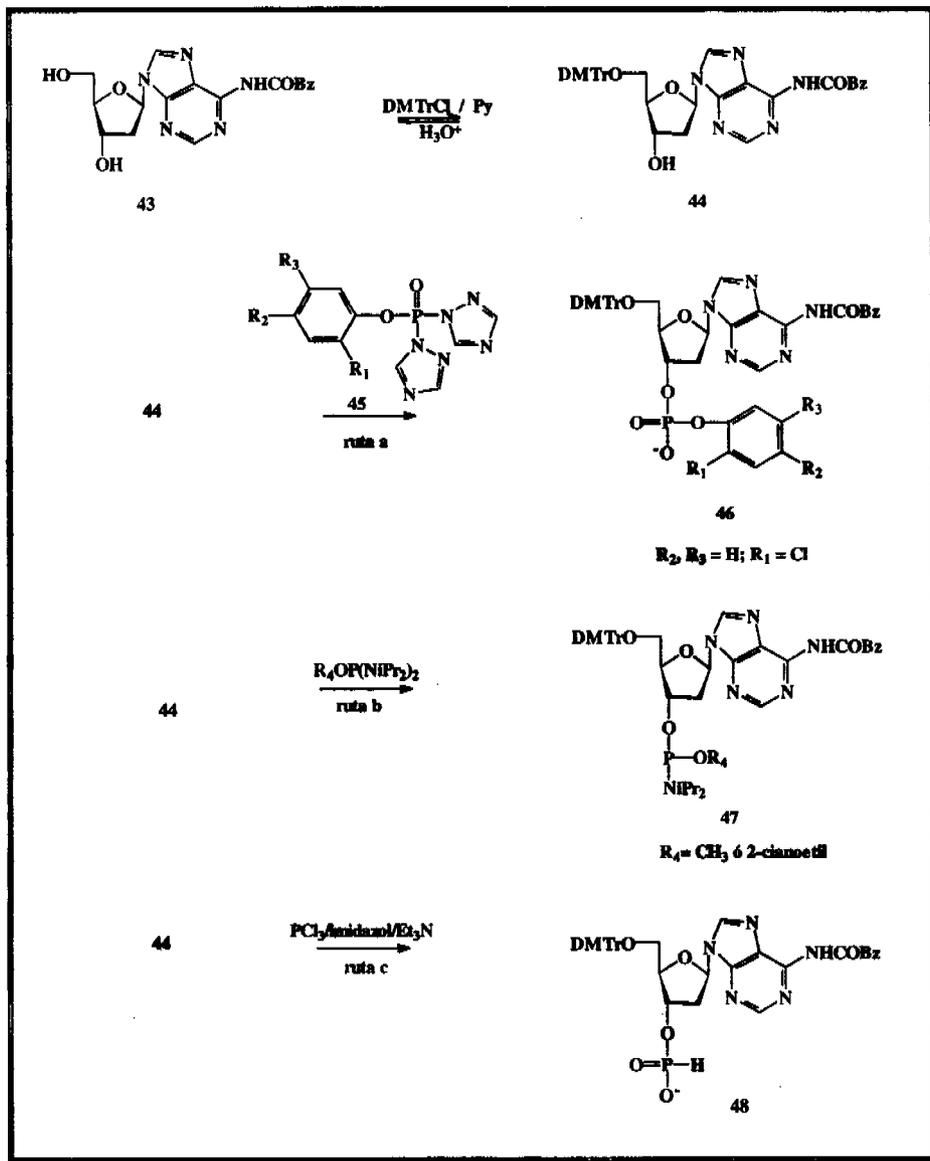
ejemplo, en el *Esquema 15* se muestra la protección en 5' de la 6-N-benzoil-2-desoxiadenosina. La reacción es regioselectiva para el grupo hidroxilo 5' en comparación con el grupo hidroxilo 3' debido a que el grupo protector es muy voluminoso. El grupo DMTr es removido por tratamiento con ácidos como el dicloro ó tricloroacético en un disolvente no acuoso. Durante la desprotección aparece el color naranja brillante del catión dimetoxitritilo y esto puede utilizarse como una medida de la cantidad de desoxinucleósido desprotegido.

Durante el desarrollo de estas síntesis los 5'-O-dimetoxitritil-(N-acilados)-2'-desoxinucleósidos son fosforilados ó fosfitilados en el grupo hidroxilo 3' (*Esquema 15*). En estos casos los productos de síntesis se unen a la cadena de oligonucleótidos formando un fosfatotriester donde el fosfato internucleósido tiene un grupo protector.

En la química del P (V) los mejores grupos protectores para los fosfatotriesteres son los arilo (usualmente derivados mono ó diclorofenilo). Esto se debe a que un arilfosfodiester es un desoxinucleósido mucho más reactivo que un alquilfosfodiester en las reacciones de acoplamiento. Por ejemplo, la 5'-O-dimetoxitritil-6-N-benzoil-2'-desoxiadenosina **44** dá el correspondiente 3'-O-2-clorofenilfosfodiester **46** cuando reacciona con el 2-clorofenilfosforo-bistriazol **45** (*Esquema 15 ruta a*).

En la química de P (III) los fosfitotriesteres arílicos y alquílicos son especies altamente reactivas; de aquí que el grupo metilo ó el 2-cianoetilo sean grupos protectores puesto que pueden ser removidos conveniente y selectivamente al final de la síntesis (*Esquema 15 ruta b*).

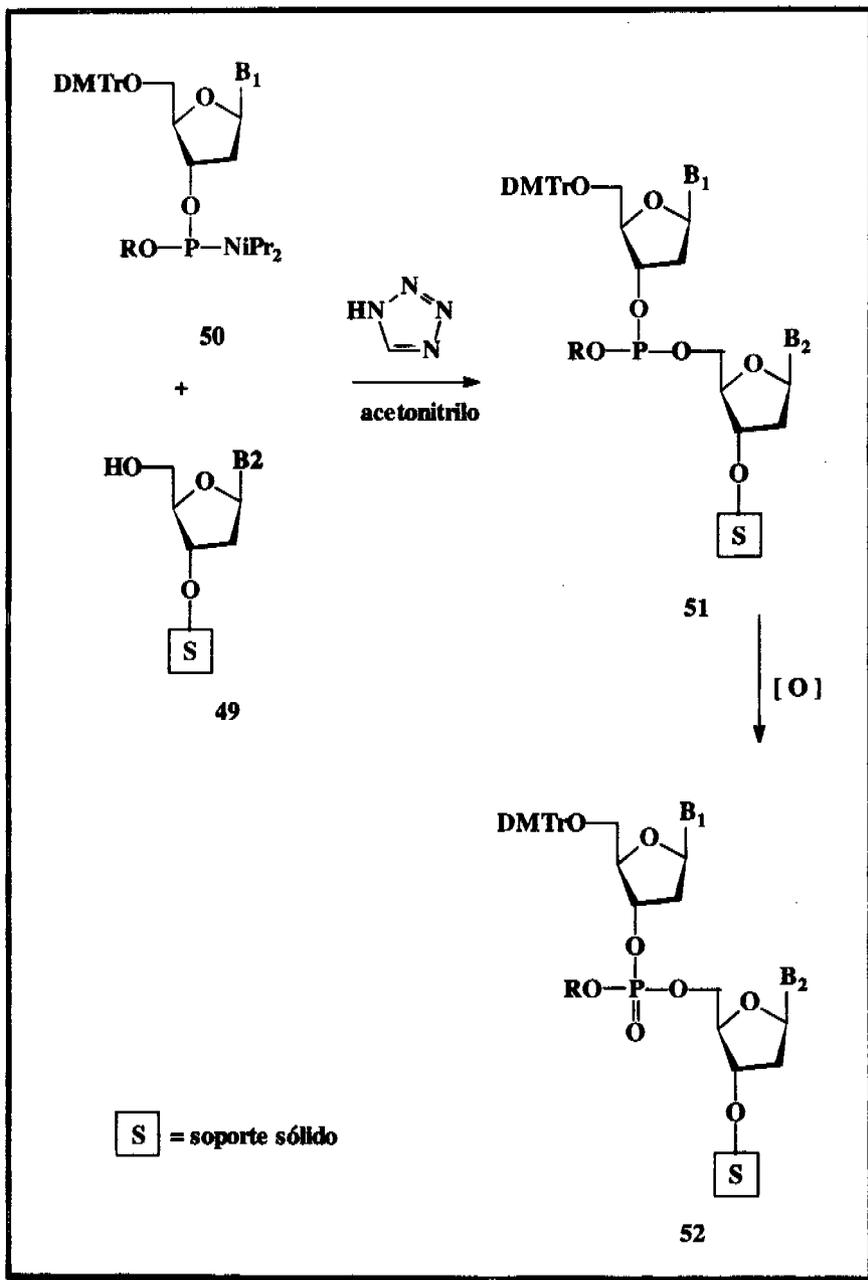
En contraste, la química de los H-fosfonatos no requieren de grupos protectores puesto que los enlaces H-fosfonatos son relativamente inertes bajo las condiciones de acoplamiento. Un desoxiribonucleósido 3'-H-fosfonato se prepara simplemente por la reacción del derivado dexosinucleósido con PCl_3 , triazol ó imidazol como activador y bajo catálisis básica usando N-metilmorfolina ó trietilamina, seguido de un tratamiento acuoso (*Esquema 15 ruta c*).



ESQUEMA 15

El desarrollo de formas eficientes para hacer el enlace internucleótido ha sido por muchos años el tema central de la síntesis de oligonucleótidos. Este problema se solucionó efectivamente por el método del fosfatotriester (fosforamidito) llevado a cabo por Caruthers a principios de 1980 lo que propició la transformación de la síntesis de oligonucleótidos por procedimientos manuales ó semimanuales en un proceso comercial utilizando una máquina. La ventaja de estos métodos es la alta eficiencia de la reacción de acoplamiento entre un grupo hidroxilo 5' del desoxinucleósido protegido con un soporte sólido **49** y el alquil 5'-DMTr-(N-acilado)-desoxinucleósido 3'-O-(N,N-diisopropilamino)fosfito **50**, donde el grupo alquilo puede ser metilo ó 2-cianoetilo (*Esquema 16*).

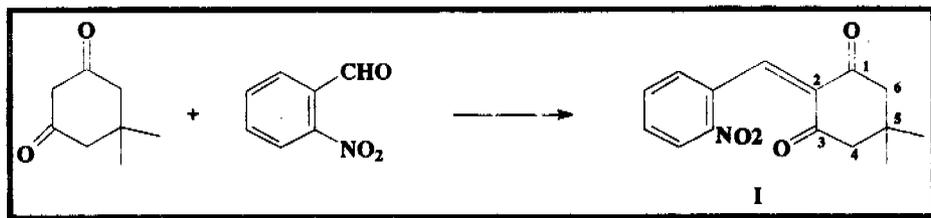
Al contrario de los otros métodos, un fosforamidito es considerablemente menos reactivo y requiere protonación en el nitrógeno para hacer que actúe como un agente fosfitilante. El tetrazol es lo suficientemente ácido como para llevar a cabo la reacción sin que se tenga la pérdida del grupo DMTr. El producto de acoplamiento es un fosfito dinucleósido, el cual puede oxidarse con yodo antes de seguir con la extensión de la cadena.



ESQUEMA 16

RESULTADOS

La condensación de la 5,5-dimetil-1,3-ciclohexanodiona con el 2-nitrobenzaldehído en presencia de KOH acuoso, generó la 2-(2'-nitrofenilmétalen)-5,5-dimetil-1,3-ciclohexanodiona I como un sólido amarillo con un punto de fusión de 178-180°C y en un rendimiento del 45%.



Su espectro de IR (disolución) presenta dos bandas en 1527 y 1373 cm^{-1} debido al grupo nitro.

En el espectro de RMN- ^1H (*espectro 1*) en 8.84 ppm aparece una señal simple que corresponde al protón vinílico, en 8.10 a 7.52 ppm aparecen 4 señales (1 protón cada una) para los 4 protones del anillo aromático, en 3.22 y 2.66 ppm aparecen dos señales dobles (2 protones cada una) que corresponden a los hidrógenos de los carbonos 4 y 6, en 1.25 y en 1.15 ppm aparecen dos señales dobles que integran para 3 protones cada una y que corresponden a los hidrógenos de los dos metilos enlazados al C-5.

El espectro de masas confirma la formación del producto esperado ya que muestra un ión molecular a m/z 273 (46) y los fragmentos a m/z 227 (20) y 83 (100).

El siguiente paso consistió en obtener la 3,3-dimetil-1-oxo-1,2,3,4-tetrahidroacridina II para lo cual se ensayaron diversas condiciones de reacción tal como se muestra en la *Tabla 1*.

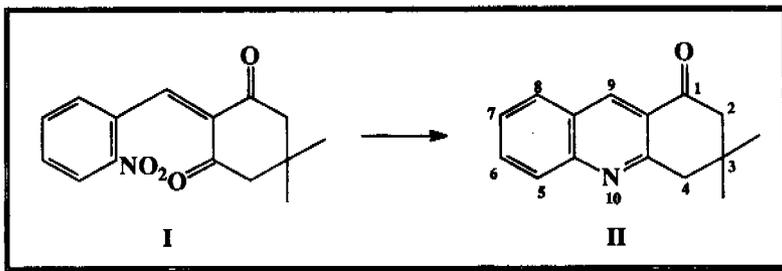


TABLA 1

EXPERIMENTO	CONDICIONES	TIEMPO	RENDIMIENTO
1	Zn, AcOH, EtOH, t.a.	4 hr	26 %
2	SnCl ₂ , EtOH, t.a.	3 hr	---
3	Fe, AcOH, EtOH reflujo	17 hr	44 %
4	Zn, HCl, EtOH, t.a.	6 hr	17 %
5	Na ₂ S ₂ O ₄ , EtOH : H ₂ O reflujo	6 hr	---

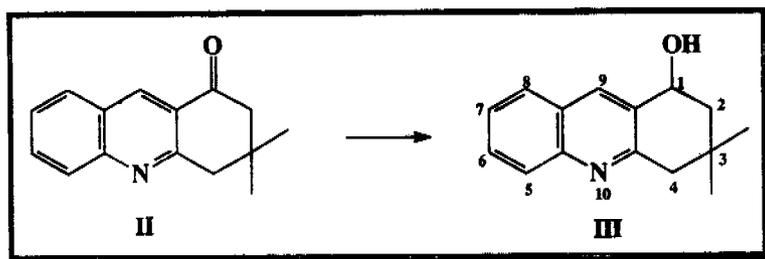
Las mejores condiciones fueron cuando se hizo reaccionar a la ciclohexanodiona **I** con hierro en polvo y ácido acético en etanol a reflujo, obteniendo **II** como un sólido de punto de fusión de 110-112°C.

El compuesto **II** se caracterizó mediante sus datos espectroscópicos de IR (disolución) que muestra una banda en 1689 cm⁻¹ que corresponde a la cetona conjugada y en 2961 y 1593 cm⁻¹, bandas que corresponden al C=N.

Su espectro de RMN- H^1 (*espectro 2*) presenta en 8.85 ppm una señal simple (1 protón) del C-9, en el intervalo de 8.03 ppm a 7.56 ppm aparecen cuatro señales múltiples (1 protón cada una) y que corresponden a los 4 hidrógenos aromáticos (H-5, H-6, H-7 y H-8), en 3.20 ppm y 2.66 ppm aparecen dos señales simples que integran para 2 protones cada una y que corresponde a los hidrógenos de los carbonos 2 y 4, y una señal simple en 1.15 ppm que integra para 6 protones que corresponde a los 6 hidrógenos de los dos metilos unidos al C-3.

El espectro de masas confirma la estructura obtenida por su ión molecular a m/z 225 (85) y su pico base a m/z 169.

A continuación se llevó a cabo la reducción de la tetrahydroacridina **II** al compuesto **III**. Utilizando 5 equivalentes de $NaBH_4$ en THF seco, a temperatura ambiente por 21 horas, no se observó producto de reacción. Sin embargo cuando se cambiaron las condiciones de reacción usando 25 equivalentes de $NaBH_4$ en MeOH seco, a temperatura ambiente durante 16 horas se obtuvo **III** como un sólido amarillo con punto de fusión de 93-95°C y un rendimiento del 87%.



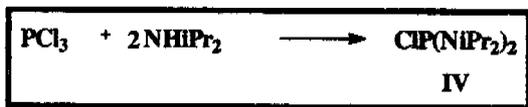
Su espectro de IR (disolución) muestra una banda en 3593 cm^{-1} que corresponde al grupo OH y en 2959 cm^{-1} aparece una señal que corresponde al grupo C=N.

Su espectro de RMN- H^1 (*espectro 3*) muestra una señal simple con un desplazamiento de 8.37 ppm que integra para 1 protón correspondiente al hidrógeno de C-9, en el intervalo de 8.02 a 7.42 ppm aparecen cuatro señales que integran cada una para 1 protón y que se asignan a los 4 hidrógenos aromáticos (H-5 a H-8), en 5.01 ppm aparece una señal doble de doble ($J = 6.24, 11\text{ Hz}$) que integra para 1 protón y que corresponde al hidrógeno del C-1, en 2.90 ppm aparece una señal simple que integra para 2 protones y que se asignan a los hidrógenos del C-4, en 2.57 ppm aparece una señal ancha que integra para 1 protón y que se

intercambia con agua deuterada, por lo que se asigna al H del grupo OH, en 2.10 ppm aparece un doble de doble ($J = 6.2, 12.8$ Hz) que integra para 1 protón y se asigna al hidrógeno del C-2 y en 1.65 ppm aparece un doble de doble ($J = 10.3, 12.82$ Hz) que integra para 1 protón que corresponde al hidrógeno del C-2, en 1.00 y en 1.12 ppm aparecen dos señales simples que integran cada una para 3 protones que corresponden a los CH_3 del C-3.

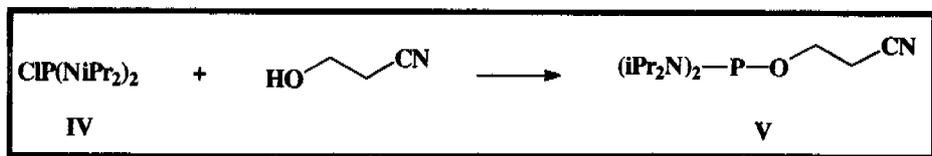
Su espectro de masas presenta un ión molecular a m/z 227 que es el pico base.

La siguiente etapa de la ruta sintética fué la de preparar el agente fosfítante (fosforamidito) V para lo cual se encontraron varios métodos descritos^{23,24}.



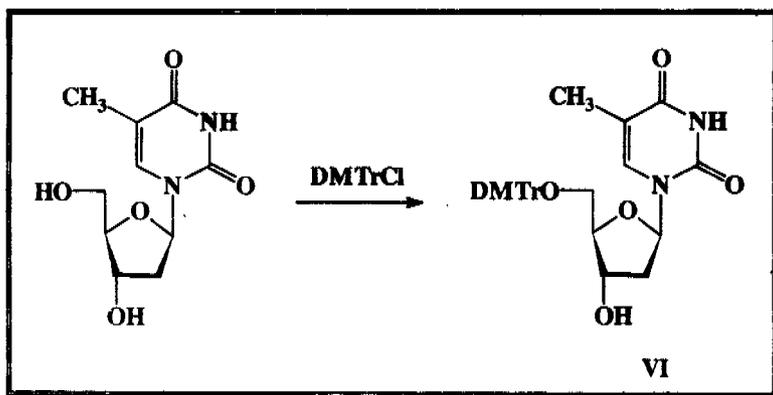
Se utilizó el método de Hamamoto²³ que consiste en hacer reaccionar el PCl_3 con la NHPr_2 para obtener la clorofosfina IV como un líquido incoloro después de destilar a presión reducida sobre fluoruro de cesio. Su espectro de RMN- ^1H (*espectro 4*) muestra una señal múltiple en 3.92 ppm que integra para 4-H correspondientes a los CH vecinos a los metilos y señal doble en 1.28 ppm ($J = 4.4$ Hz) que integra para 24-H correspondientes a los metilos del diisopropilo. En el espectro de RMN- ^{31}P (*espectro 5*) se observa una señal simple en 5.04 ppm que corrobora su estructura.

Sabiendo que la clorofosfina IV es una especie muy reactiva se hizo de inmediato la reacción con el β - hidroxipropionitrilo para formar el fosforamidito V.



Su estructura se comprobó por su espectro de RMN- H^1 (*espectro 6*) en el cual se observa una señal múltiple en 3.90 ppm que integra para 4 protones perteneciente a los 4-CH; en 3.65 ppm aparece una señal triple que integra para 2 protones del CH_2 unido al oxígeno, en 2.69 ppm aparece una señal triple ($J = 4$ Hz) que integra para 2 protones del CH_2-CN y una señal doble en 1.20 ppm ($J = 4.9$ Hz) que integra para 24 protones de los 8 CH_3 .

Continuando con la ruta sintética se trató la timidina con el DMTrCl en piridina y después de 4 horas de reacción a temperatura ambiente se obtuvo una goma amarilla que se recrystalizó de benceno caliente : hexano; se obtuvo VI como un sólido amarillo con punto de fusión de 120-122°C en un 80% de rendimiento.



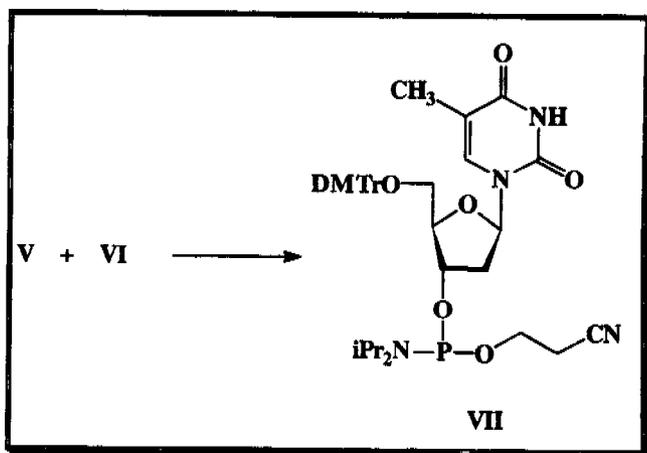
Su espectro de IR (disolución) muestra una banda en 3395 cm^{-1} que corresponde al grupo OH, en 3019 cm^{-1} aparece una banda de amina y en 1686 cm^{-1} aparece una banda que pertenece a los grupos $C=O$ de la timidina.

En su espectro de RMN- H^1 (*espectro 7*) aparece 8.75 ppm una señal simple que integra para 1-H que corresponde al grupo NH, en 7.66 ppm aparece una señal simple que integra para 1-H que corresponde al H-vinílico, entre 7.45 y 7.25 ppm aparecen las señales correspondientes a los 13 protones aromáticos, en 6.42 ppm aparece una señal triple que integra para 1-H y que corresponde al H del C-1', en 4.57 ppm aparece una señal múltiple que integra para 1-H y corresponde al H del C-3', en 4.06 ppm aparece una señal múltiple que integra para 1-H y corresponde al H del C-4', en 3.78 ppm aparece una señal simple que integra para 6-H de los

grupos OCH_3 , en 3.44 ppm aparece una señal múltiple que integra para 2-H y que corresponde a los 2-H del C-5', en 2.37 ppm aparece una señal múltiple que integra para 2-H y que corresponde a los 2-H del C-2', en 1.48 ppm aparece una señal simple que integra para 3-H del CH_3 y finalmente en 1.75 ppm aparece una señal que se intercambia con D_2O y que integra para 1H corresponde al grupo OH en 3'.

Su estructura se corroboró por su espectro de masas el cual presenta su ión molecular a m/z 544 (8) y el pico base a m/z 303.

Teniendo ya el compuesto VI se siguió el método propuesto por Hamamoto para llevar a cabo la fosfitilación con V.

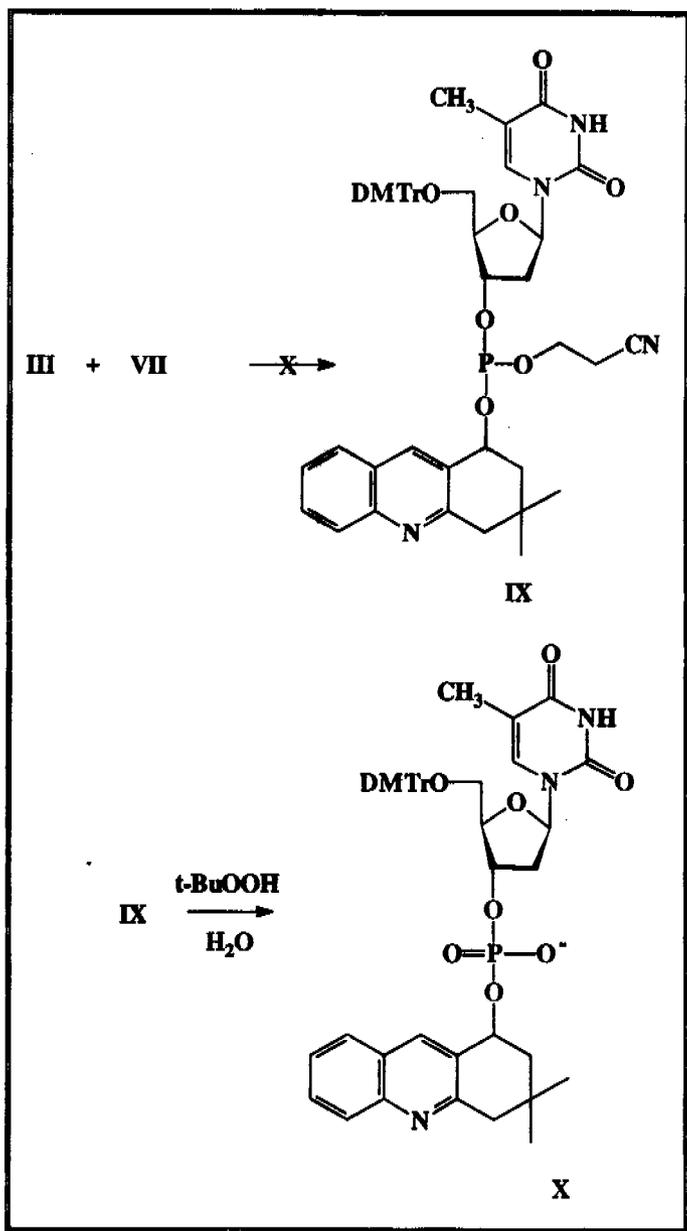


Se utilizó 1.5 eq. del agente fosfitilante y 1 eq. de tetrazol como activador y se dejó reaccionar por 3 horas a temperatura ambiente obteniendo VII como un sólido blanco.

Su estructura se dedujo por su espectro de RMN- ^1H (*espectro 8*) el cual muestra las señales correspondientes al compuesto VI (excepto la señal del OH en 3') pero además las señales del grupo fosforamidito introducido en 3'-O, como una señal triple que aparece en 3.60 ppm que integra para 2-H que corresponden al CH_2 vecino al oxígeno, en 3.35 ppm una señal múltiple que integra para 2-H, en 2.58 ppm aparece una señal triple que corresponde al CH_2 vecino al CN y además una señal doble que aparece en 1.29 ppm que integra para 12-H. En este espectro

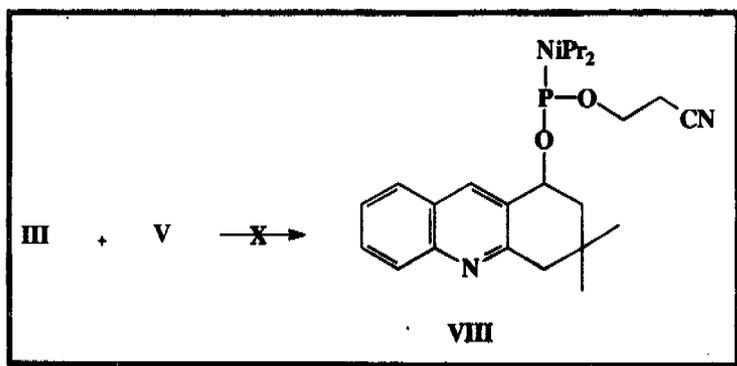
también se observan las señales correspondientes a su diastereoisómero debido a que en 7.64 ppm aparece una señal simple que integra para un protón y que corresponde a un hidrógeno vinílico, en 2.63 ppm aparece una señal triple que integra para 2 protones y que corresponde a los 2 hidrógenos del CH₂-CN.

Para el acoplamiento entre los compuestos **III** y **VII** y teniendo en cuenta que la reacción de fosfitilación es muy sensible a las condiciones de trabajo, éstas se llevaron a cabo bajo una atmósfera completamente inerte. Sin embargo, aún cuando se trabajó bajo las condiciones descritas no se obtuvo el producto esperado.

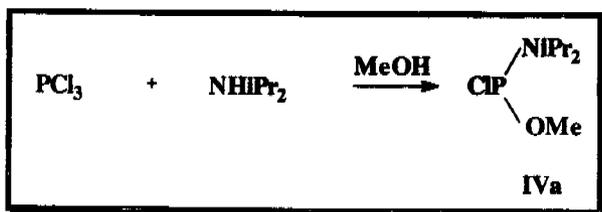


Puesto que en estas reacciones se observaba por cromatografía en capa delgada el consumo del tetrahydroacridinol de partida, se pensó que probablemente sí estaba ocurriendo la reacción deseada, pero el compuesto inicial de acoplamiento (**IX**) era inestable y por ello no se podía aislar. Por lo tanto se repitió el experimento de acoplamiento entre **VII** y **III** con tetrazol como catalizador en acetonitrilo como disolvente a temperatura ambiente y una vez que se había consumido **III** en su totalidad (1 hora), se intentó la oxidación del supuesto producto de acoplamiento así formado (**IX**) con *t*-BuOOH acuoso con la finalidad de obtener **X**. Sin embargo, se obtuvo una mezcla de 4 compuestos la cual resultó ser muy inestable por lo que no se pudo aislar el producto final **X**, ni identificar los subproductos de esta reacción.

Por lo tanto se decidió hacer otras pruebas de acoplamiento pero ahora invirtiendo el orden de activación en los compuestos por acoplar. Con este fin el tetrahydroacridinol **III** se fosfitiló con **V** en presencia de tetrazol con objeto de obtener **VIII**. Sin embargo, **VIII** no se formó.



Una vez que no se pudo obtener **VIII**, se preparó un nuevo agente fosfitilante, siguiendo la metodología de Hamamoto, pero en esta ocasión no se llevó a cabo la sustitución de dos de los cloros del tricloruro de fósforo por la diisopropilamina, sino sólo uno de ellos además de introducir el grupo OMe en lugar del $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ para obtener la clorofosfina **IVa** :



Teniendo ya este reactivo se intentó la fosfitilación del tetrahydroacridinol **III** y de la timidina protegida **VI** utilizando los métodos descritos anteriormente, sin obtener resultados satisfactorios. Teniendo en cuenta estos resultados se decidió formar la sal del tetrahydroacridinol **III** y adicionarla a la timidina protegida y fosfitilada **VII** en acetonitrilo. La sal de sodio en MeOH se dejó reaccionar bajo atmósfera inerte por 4 horas; al cabo de este tiempo se observó la formación de un compuesto poco polar el cual se purificó por cromatografía en columna pero que no se identificó como el producto deseado.

CONCLUSIONES

Como se ha mencionado anteriormente, la síntesis de fosfoésteres se lleva a cabo por reacciones de fosforilación (ó fosfitilación) en el cual un 3'-nucleótido se convierte en una especie fosforilante activa por medio de un agente condensante. Uno de los principales problemas es que los agentes condensantes no solamente activan al nucleótido, sino que también reaccionan con la base del nucleósido ó con el producto, disminuyendo así su rendimiento.

Así, existen diferentes métodos en los que se requiere de la activación del fosfato por un reactivo que facilite la ionización y que genere un buen grupo saliente y de ellos el método del fosfito triéster es el más útil debido a que se puede obtener una desprotección altamente selectiva generando así el monoéster ó el diéster deseado.

Las aproximaciones sintéticas que se siguieron en este trabajo se apoyaron en los procedimientos reportados de la química de P (III) y del fosforamidito; aún así no se obtuvieron los resultados que se esperaban según los datos reportados.

Sin embargo, conociendo la relación que existe entre la química del P (III) y del P (V) se pueden proponer otras rutas sintéticas que nos conduzcan al producto final X.

PARTE EXPERIMENTAL

METODOS GENERALES

Las constantes físicas de los compuestos sintetizados se determinaron en el Departamento Analítico del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fischer-Johns, los cuales se reportan en grados centígrados y no están corregidos.

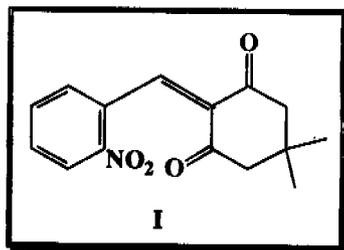
Los espectros de infrarrojo (IR) se hicieron en un espectrofotómetro Nicolet FT-SX y/6 Perkin Elmer 283-B de doble haz usando poliestireno para la calibración del aparato; los espectros se determinaron como soluciones en cloroformo. Las absorciones están reportadas en cm^{-1} .

Los espectros de resonancia magnética protónica de 200 MHz se determinaron en un espectrómetro Varian Gemini 200. El desplazamiento está expresado en ppm utilizando el parámetro δ ; la referencia interna fué TMS y el disolvente utilizado fué CDCl_3 . En el caso de los espectros de resonancia magnética nuclear de P^{31} , estos se determinaron en un espectrómetro Varian Unity de 300 MHz.

Los espectros de masas (EM) de baja resolución por impacto electrónico a 70 eV se determinaron en un espectrómetro de masas JEOL JSM-SX 102 A de doble haz.

El curso de las reacciones se siguió por cromatografía en capa delgada usando ALUMGRAM SIL G/UV₂₅₄ de MACHEREY-NAGEL DUREN. Como revelador se usó luz ultravioleta y en algunos casos solución de H₂SO₄ al 20%.

La separación y purificación de los compuestos se llevó a cabo mediante placas preparativas de vidrio de 20 x 20 cm, tipo DC-Fertigplatten SIL G-200 UV₂₅₄ de MACHEREY-NAGEL. Para cromatografía en columna se empleó gel de sílice 60 F-254 de Merck con tamaño de partícula de 0.040 a 0.063 mm (230-400 mallas).



2-(2'-nitrofenilmetilen)-5,5-dimetil-1,3-ciclohexanodiona I

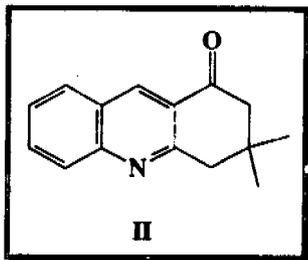
En un matraz redondo de dos bocas provisto de refrigerante, embudo de adición y agitación magnética se disolvió dimedona (2.5g, 2.23×10^{-2} mol, 1eq.) y 2-nitrobenzaldehído (5 g, 4.46×10^{-2} mol, 2 eq.) en 70 ml de etanol al 95%. A esta solución se le agregó, gota a gota, por medio del embudo de adición 10 ml de una solución acuosa 0.25M de KOH. La mezcla de reacción se dejó en reflujo por 8 horas; se eliminó el etanol y la fase acuosa se neutralizó con H_2SO_4 al 10%. Se extrajo con AcOEt (3 x 25ml), el extracto orgánico se lavó con 20 ml de agua, se separó, se secó sobre Na_2SO_4 anhidro; se filtró y se concentró a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice eluyendo con hexano : AcOEt 80:20 obteniendo un sólido amarillo en un rendimiento del 45% y con un punto de fusión de 178-180°C.

IR ($CHCl_3$), cm^{-1} :

2962, 2930, 2872, 1595, 1527, 1373, 1361, 1250, 1166.

RMN- H^1 ($CDCl_3$) : *ver espectro 1*

em ; m/z (abundancia relativa %) : 273 (46, M^+), 227 (20), 83 (100).



3,3-dimetil,1-oxo-1,2,3,4-tetrahidroacridina II

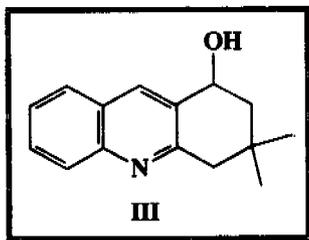
En un matraz redondo de 100 ml se disolvieron 0.4g, de I (1.46×10^{-3} mol) en 30 ml de etanol y 5 ml de CH_2Cl_2 , se agregó fierro en polvo 0.96g (0.17 mol) y 4 ml de ácido acético. La mezcla se mantuvo en agitación a temperatura ambiente por 20 horas después de lo cual se vertió sobre agua, se neutralizó con solución saturada de NaHCO_3 y se extrajo con CH_2Cl_2 (2 x 30 ml). El extracto orgánico se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se evaporó a sequedad. El residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice eluyendo con hexano : AcOEt (80:20), Se obtuvieron 0.145g (44 %) de un sólido amarillo con punto de fusión de 110-112°C.

IR(CHCl_3), cm^{-1} :

2961, 2872, 1689, 1619, 1593, 1568, 1494, 1465, 1269.

RMN- ^1H (CDCl_3): *ver espectro 2*

em ; m/z (abundancia relativa %) 225 (85, M^+), 169 (100).



1-hidroxi-3,3- dimetil-1,2,3,4-tetrahidroacridina III

En un matraz redondo perfectamente seco, equipado con agitador magnético y bajo atmósfera de nitrógeno, se disolvieron 0.1g de **III** (4.4×10^{-4} mol) en 30 ml de metanol seco y se enfrió a 0°C. Se adicionaron 0.42g de NaBH₄ (25 eq.) y la mezcla de reacción se dejó en agitación, por una hora, a 0°C y después se calentó lentamente hasta llegar a temperatura ambiente. Posteriormente se mantuvo en agitación por 16 horas. A la mezcla de reacción se le eliminó el disolvente con vacío y al residuo se le agregó agua y se extrajo con CH₂Cl₂ (2 x 25 ml); la fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó a sequedad. El sólido amarillo resultante se purificó por cromatografía en columna utilizando como eluyente hexano : AcOEt (70 : 30). Se obtuvo 0.087g (87%) de un sólido amarillo con punto de fusión de 93-95°C.

IR (CHCl₃), cm⁻¹:

3612, 3593, 2959, 2932, 2872, 1623, 1601, 1491, 1417, 1263.

RMN-H¹ (CDCl₃) : *ver espectro 3*

em ; m/z (abundancia relativa %) : 227 (100, M⁺), 226 (97).

$\text{ClP}(\text{NiPr}_2)_2$

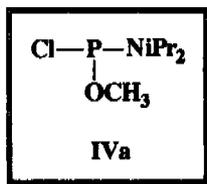
IV

bis-(diisopropilamino)-clorofosfina IV

A un matraz de 3 bocas de 2 litros, completamente seco y provisto de agitación mecánica, embudo de adición y bajo atmósfera inerte, se le agregaron 300 ml de éter etílico seco. Se enfrió a -40°C y se adicionaron 20 ml de PCl_3 (0.225 mol) al matraz de reacción. Posteriormente se adicionó lentamente por el embudo de adición, una solución de 118 ml (0.9 mol) de NH_2Pr_2 en 20 ml de éter etílico seco manteniendo la temperatura a -40°C . Después de retirar el baño de enfriamiento la reacción se mantuvo en agitación por 2 horas. La mezcla de reacción se filtró bajo atmósfera inerte, se eliminó el éter con vacío y el residuo se destiló sobre CaH_2 entre 30°C - 33°C a una presión de 0.1 mm de Hg, obteniendo un líquido incoloro.

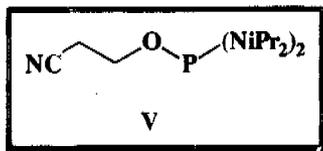
RMN- ^1H (CDCl_3) : ver espectro 4

RMN- ^{31}P (CDCl_3) : ver espectro 5



diisopropilamino-metoxi-clorofosfina IVa

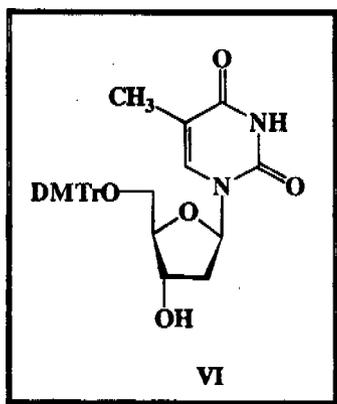
A un matraz de 3 bocas de 2 litros, completamente seco y provisto de agitación mecánica, embudo de adición y bajo atmósfera inerte, se le agregaron 300 ml de éter etílico seco. Se enfrió a -40°C y se adicionaron 20 ml de PCl_3 (0.225 mol) al matraz de reacción. Posteriormente se adicionó lentamente por el embudo de adición, una solución de 59 ml (0.45 mol) de NH_iPr_2 en 20 ml de éter etílico seco manteniendo la temperatura a -40°C . Después de retirar el baño de enfriamiento la reacción se mantuvo en agitación por 1 hora y se adicionaron 18 ml de CH_3OH seco y se dejó reaccionar por 1 hora. La mezcla de reacción fué filtrada bajo atmósfera inerte, se eliminó el éter con vacío y el residuo se destiló sobre CsF entre 30°C - 33°C a una presión de 0.1 mm de Hg, obteniendo un líquido incoloro. Este compuesto es muy inestable y se usó inmediatamente en la siguiente reacción.



bis-(diisopropilamino)-β-cianoetoxifosfina V

En un matraz bola completamente seco, bajo atmósfera inerte y con agitación magnética, se disolvieron 6.8g de IV (2.56×10^{-2} mol) en 30 ml de éter etílico seco. El matraz se enfrió a 0°C y se adicionaron 1.3 ml de β-hidroxipropionitrilo (1eq.) y 3.6 ml de Et₃N (1eq.). El matraz de reacción se llevó a temperatura ambiente y se mantuvo con agitación bajo atmósfera inerte por 17 horas. Posteriormente se filtró bajo atmósfera inerte para eliminar la sal formada y el filtrado se evaporó al vacío.

RMN-H¹ (CDCl₃) : *ver espectro 6*



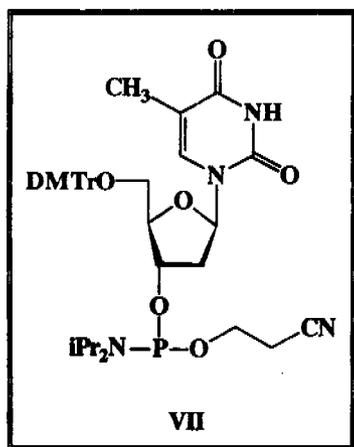
5'-O-dimetroxiritilimidina VI

En un matraz redondo, completamente seco, provisto de agitación magnética y atmósfera de argón se disolvieron 0.5g de timidina (2.06×10^{-3} mol) y 0.7g de cloruro de dimetroxiritilo DMTrCl (1eq.) en 10 ml de piridina seca. Se mantuvo con agitación por 4 horas, después se adicionó 1 ml de metanol seco y la mezcla de reacción se concentró hasta obtener una goma. Se agregó entonces 70 ml de CH_2Cl_2 y 40 ml de agua; la fase orgánica se lavó con agua (2 x 15 ml), se secó sobre Na_2SO_4 anhidro; se filtró y se evaporó a sequedad. El sólido obtenido se recrystalizó de benceno caliente y hexano obteniendo 0.90g (80% de rendimiento) de un polvo ligeramente amarillo con punto de fusión de 120-122°C.

IR (CHCl_3) : cm^{-1}
 3395, 3019, 2934, 2839, 1686, 1608, 1509, 1215, 764.

RMN- H^1 (CDCl_3) : *ver espectro 7*

em , m/z (abundancia relativa %) : 544 (8, M^+), 303 (100).



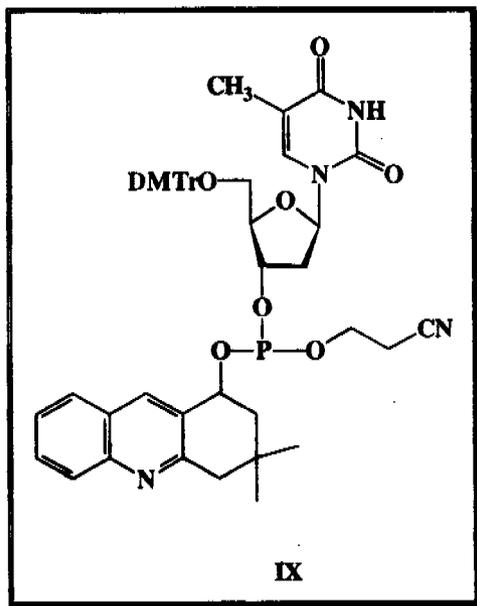
N,N-Diisopropilaminofosfito de 2-cianoetil-3'-O-(5'-O-dimetoxitritil)-timidinilo
VII

En un matraz redondo, completamente seco, provisto de agitación magnética y bajo atmósfera inerte, se disolvieron 0.25g de bis(diisopropilamino)- β -cianoetoxifosfina V (1.5 eq.) y 0.30g del compuesto VI (1eq.) en 5 ml de CH_2Cl_2 seco. Después se adicionaron 0.040g de tetrazol (1 eq.), y se mantuvo en agitación bajo atmósfera inerte por 3 horas. La mezcla de reacción se diluyó con CH_2Cl_2 ; se lavó con solución saturada de NaHCO_3 (2 x 25 ml) y con agua (20 ml). La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se evaporó a sequedad. El residuo orgánico se purificó por cromatografía en columna utilizando como eluyente $\text{AcOEt} : \text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{Et}_3\text{N}$ (45 : 45 : 10), obteniéndose un sólido blanco.

IR (CHCl_3), cm^{-1} :

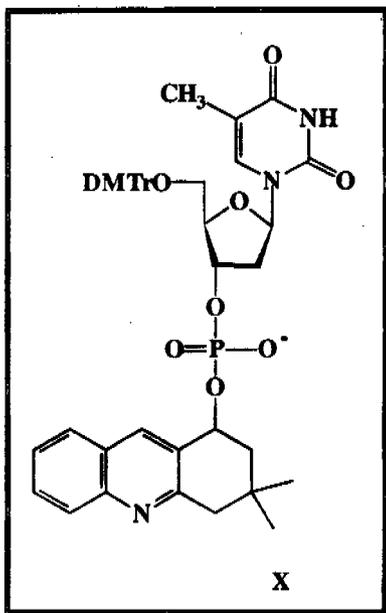
3446, 2979, 2932, 2907, 1607, 1517, 1252, 1186, 1033, 962.

RMN- ^1H (CDCl_3) : *ver espectro 8*



Fosfito de 2-cianoetil, 1-O-(3,3-dimetil-1,2,3,4-tetrahidro)acridinil, 3'-O-(5'-O-dimetoxitritil)timidinilo IX

En un matraz redondo completamente seco, se coevaporaron 0.147g de tetrazol (2.1 mmol) y 0.14g del tetrahidroacridinol **III** (0.6 mmol) con piridina anhidra (2 x 3 ml) primero y con acetonitrilo seco (2 x 3 ml) después. La mezcla se puso bajo atmósfera inerte y se agregaron 6 ml de acetonitrilo seco, 0.5g (0.7 mmol) de fosforamidito **VIII** y se dejó en agitación por 1 hora a temperatura ambiente. El producto de esta reacción no se aisló sino que se utilizó como tal en la siguiente reacción.



Fosfato ácido de 1-O-(3,3-dimetil-1,2,3,4-tetrahidro)acridinil,3'-O-(5'-O-dimetoxirritil)timidinilo X

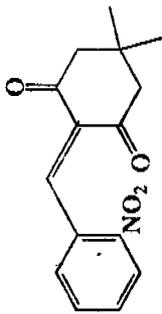
Al matraz que supuestamente contiene IX se le agregaron 0.5 ml de agua y 2.5 ml de *t*-BuOOH al 90%. La mezcla se dejó en agitación por 1 hora y después se le agregaron 60 ml de CH₂Cl₂; se lavó con solución saturada de NaHCO₃ (2 x 25ml) y con solución saturada de NaCl (1 x 25ml). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó a sequedad. El residuo se intentó purificar por cromatografía en columna eluyendo con hexano : AcOEt (50 : 50). La mezcla de reacción mostraba 4 productos, los cuales no se pudieron aislar ya que se observó descomposición.

BIBLIOGRAFIA

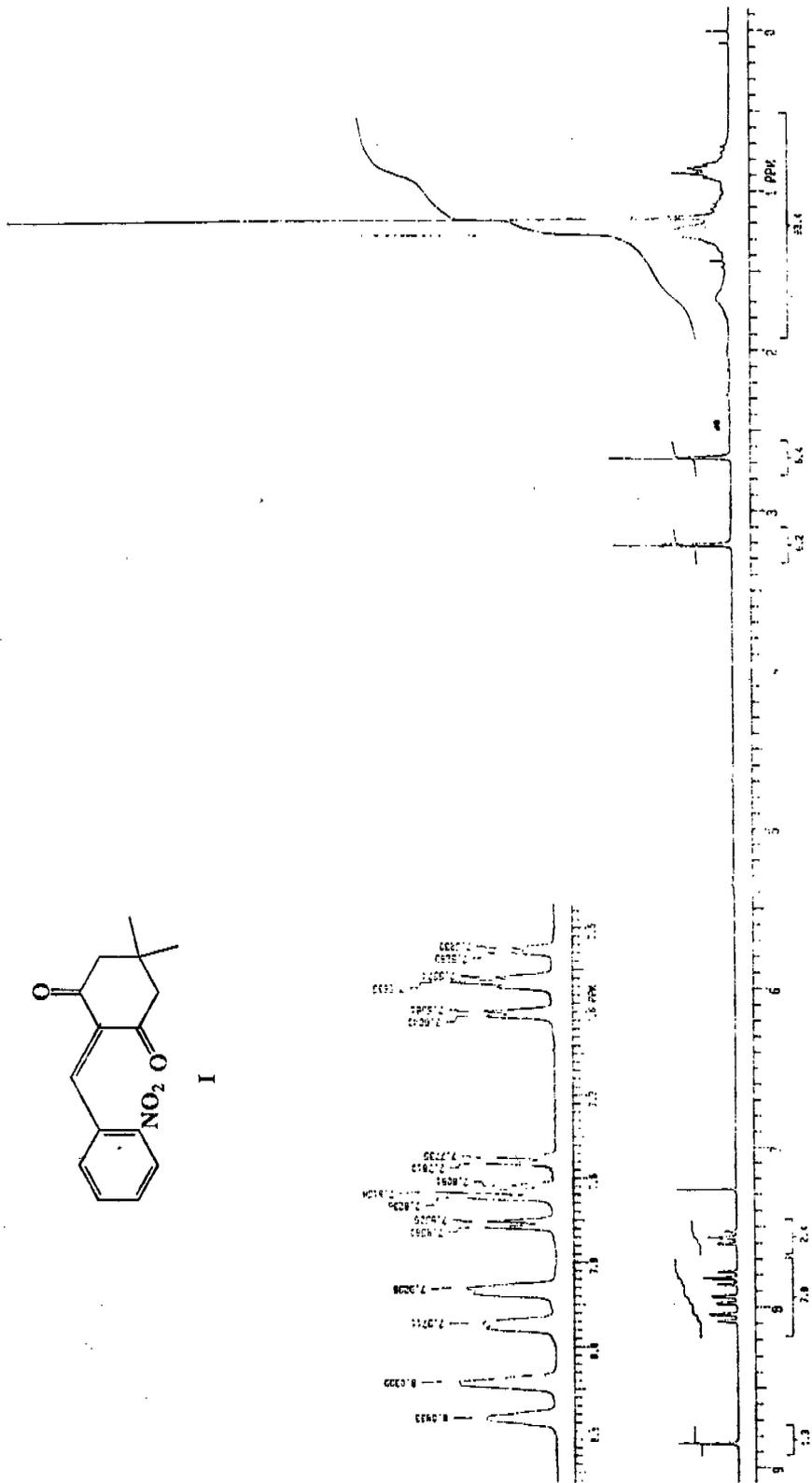
- 1.- Portugal, J. ; *Trends in Biochemical Sciences* **1989**, 4, 127-130
- 2.- Snyder, L. ; Shen, W. ; Bornmann, W. G. y Danishefsky, S. J. ; *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 7033-7037
- 3.- Thuong, N. T. y Asseline, U. ; *Oligonucleotides and Analogues* (Ed.: Eckstein, F.), IRL Press, Oxford **1991**, Capítulo 12.
- 4.- Nguyen, T. y H el ene, C. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, 32, 666-690
- 5.- Watson, J. D. y Crick, F. C. H. *Nature* **1953**, 171, 737-738
- 6.- Michelson, A. N. y Todd, A. R. *J. Chem. Soc.* **1955**, 2632-2638
- 7.- Khorana, H. G. *Pure Appl. Chem.* **1968**, 17, 349-381
- 8.- Khorana, H.G. *Biochem. J.* **1968**, 109, 709-725
- 9.- Agarwal, K. L. ; Yamazaki, A.; Cashion, P. J. y Khorana, H. G. *Angew. Chem. Int. Edit.* **1972**, 11, 451-459
- 10.- Letsinger, R. L. y Ogilvie, K. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, 89, 4801-4803
- 11.- Letsinger, R. L. y Ogilvie, K. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, 91, 3350-3355
- 12.- Letsinger, R. L.; Finnan, J. L.; Heavner, G. A. y Lunsford, W. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, 97, 3278-3279
- 13.- Letsinger, R. L. y Lunsford, W. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, 98, 3655-3661
- 14.- Beaucage, S. L. y Caruthers, M. H. *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22, 1859-1862
- 15.- Letsinger, R. L. y Schott, M. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 7394

- 16.- Blackburn, G. M. y Gait, M. J. *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*, IRL Press, Oxford, **1990**
- 17.- Motohashi, N.; Emrani, J.; Meyer, R. y Kawase, M. *Org. Prep. Proc. Int.* **1993**, 25, 261-292
- 18.- Elderfield, R. C. *Heterocyclic Compounds* Vol. 4, John Wiley, New York, NY, **1952**
- 19.- Bui-Hoi, N. P.; Royer, R. y Hubert-Habart, M. *J. Chem. Soc.* **1948**, 123
- 20.- Bachman, G. B. y Picha, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1946**, 68, 1599
- 21.- Ullmann, F. y Fetvadjan, A.; *Chem Ber.* **1903**, 36, 1027
- 22.- Rosowsky, A.; Chaykovsky, M.; Yeager, S. A.; Amand R. A.; Lin, M. y Modest, E. J. *J. Heterocycl. Chem.* **1971**, 8, 809
- 23.- Cortés, E.; Martínez, R.; Avila, J. G. y Toscano, A. *J. Heterocycl. Chem.* **1988**, 25, 895
- 24.- Kimura, M.; Okabayashi, I. y Kato, A. *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, 37, 697
- 25.- Hamamoto, S. y Takaku, H. *Chem. Lett.* **1986**, 1401-1404
- 26.- Bannwarth, W. y Trzeciak, A. *Helv. Chim. Acta* **1987**, 70, 175-186
- 27.- Schaller, H.; Weimann, G.; Lerch, B.; y Khorana, H. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 3821-3827.

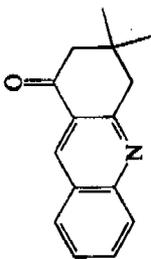
ANEXO



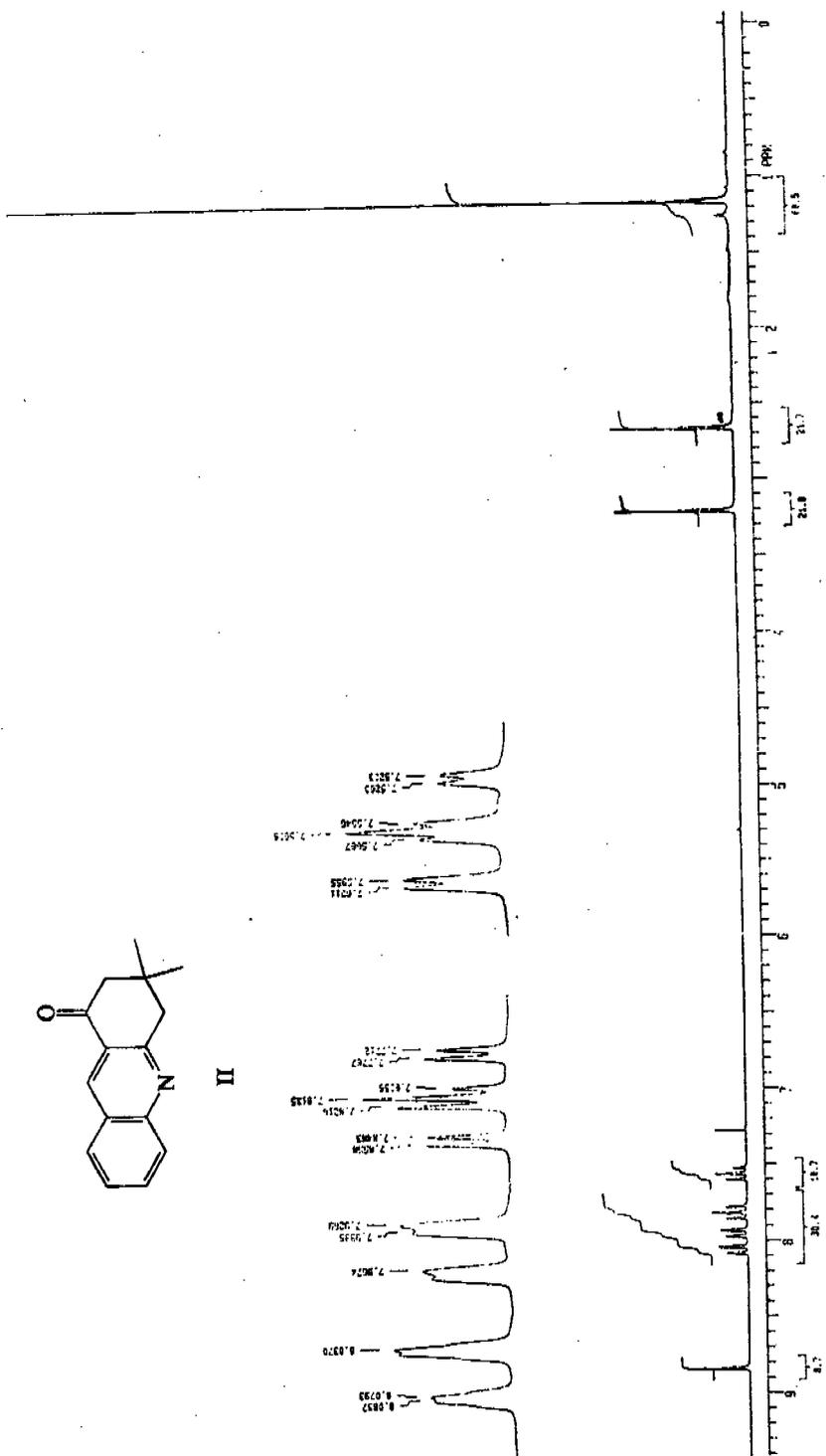
I



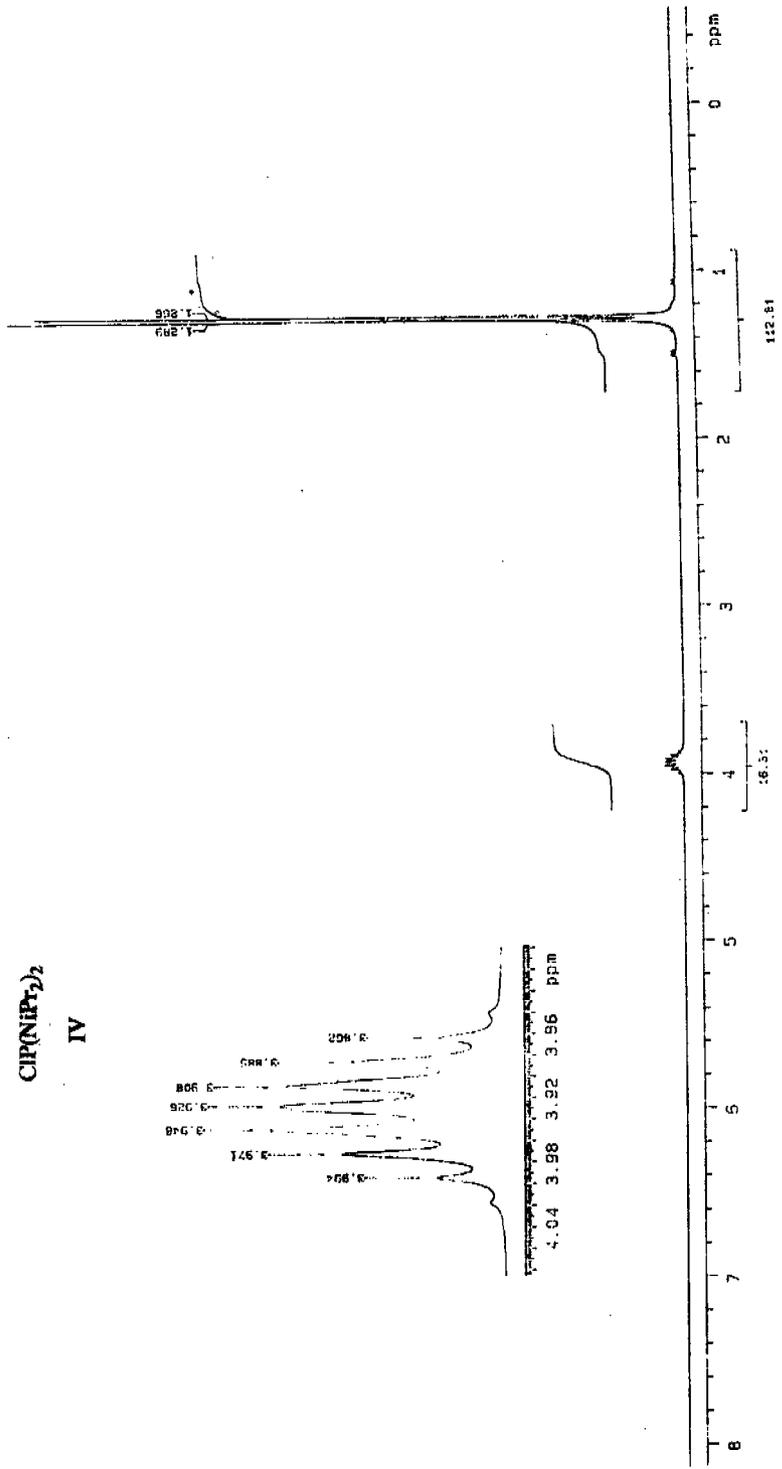
ESPECTRO I



II



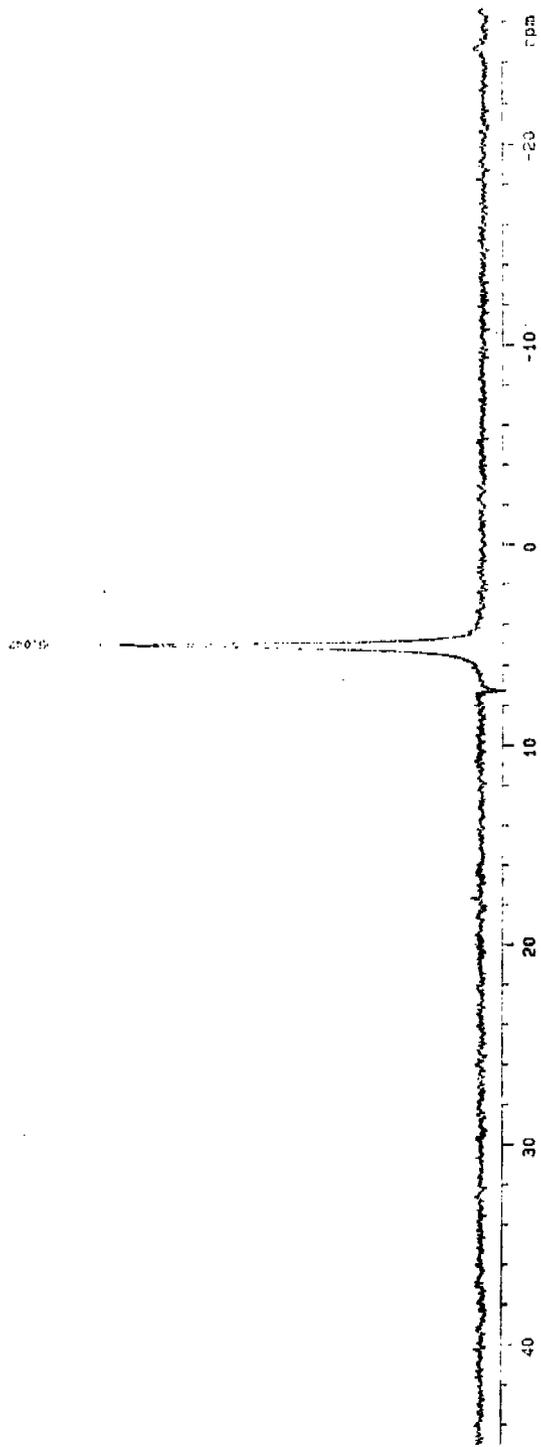
CIP(NiP₂)₂
IV



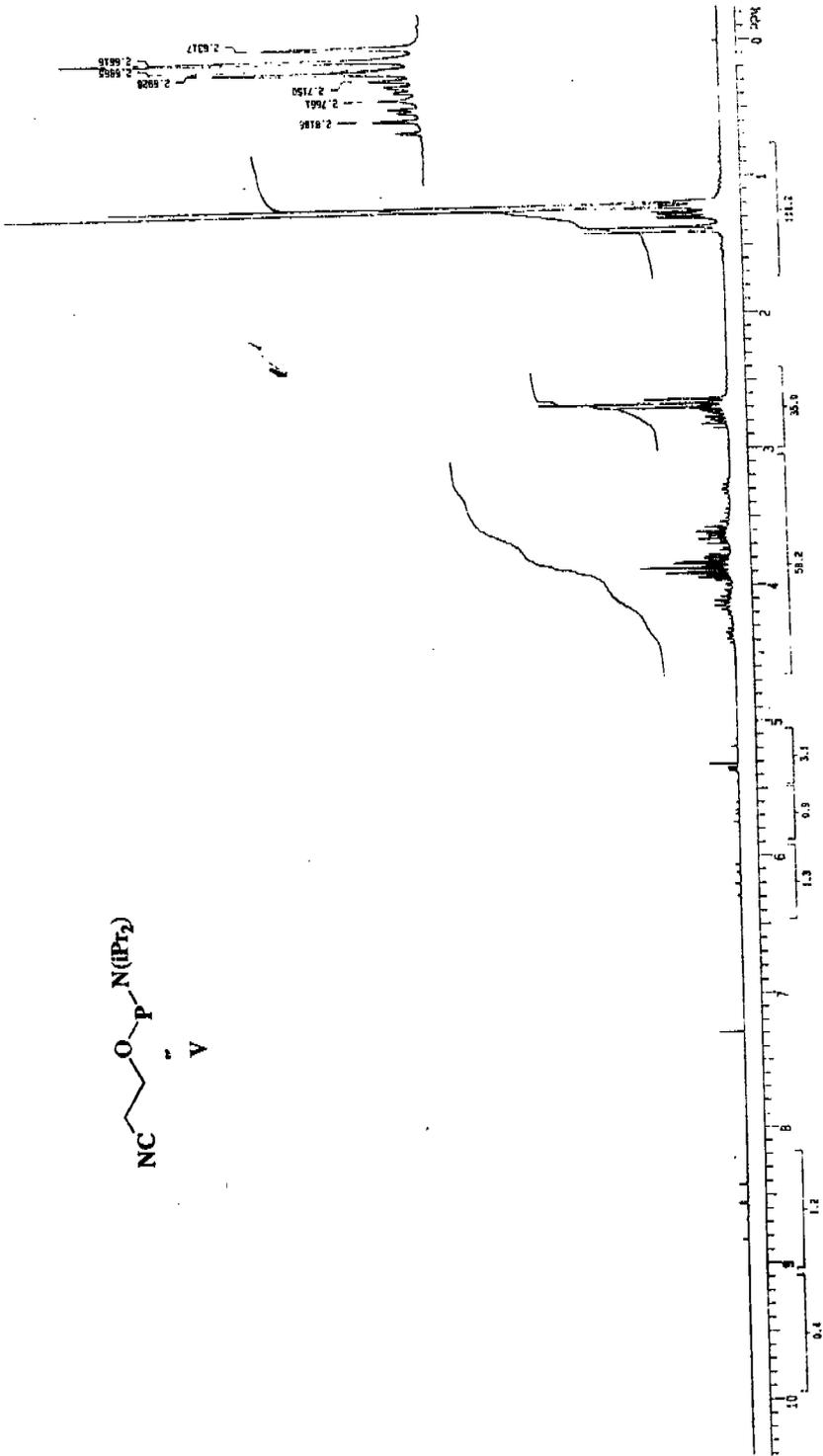
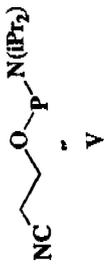
ESPECTRO 4

$\text{ClP}(\text{N}(\text{P}_2)_2)_2$

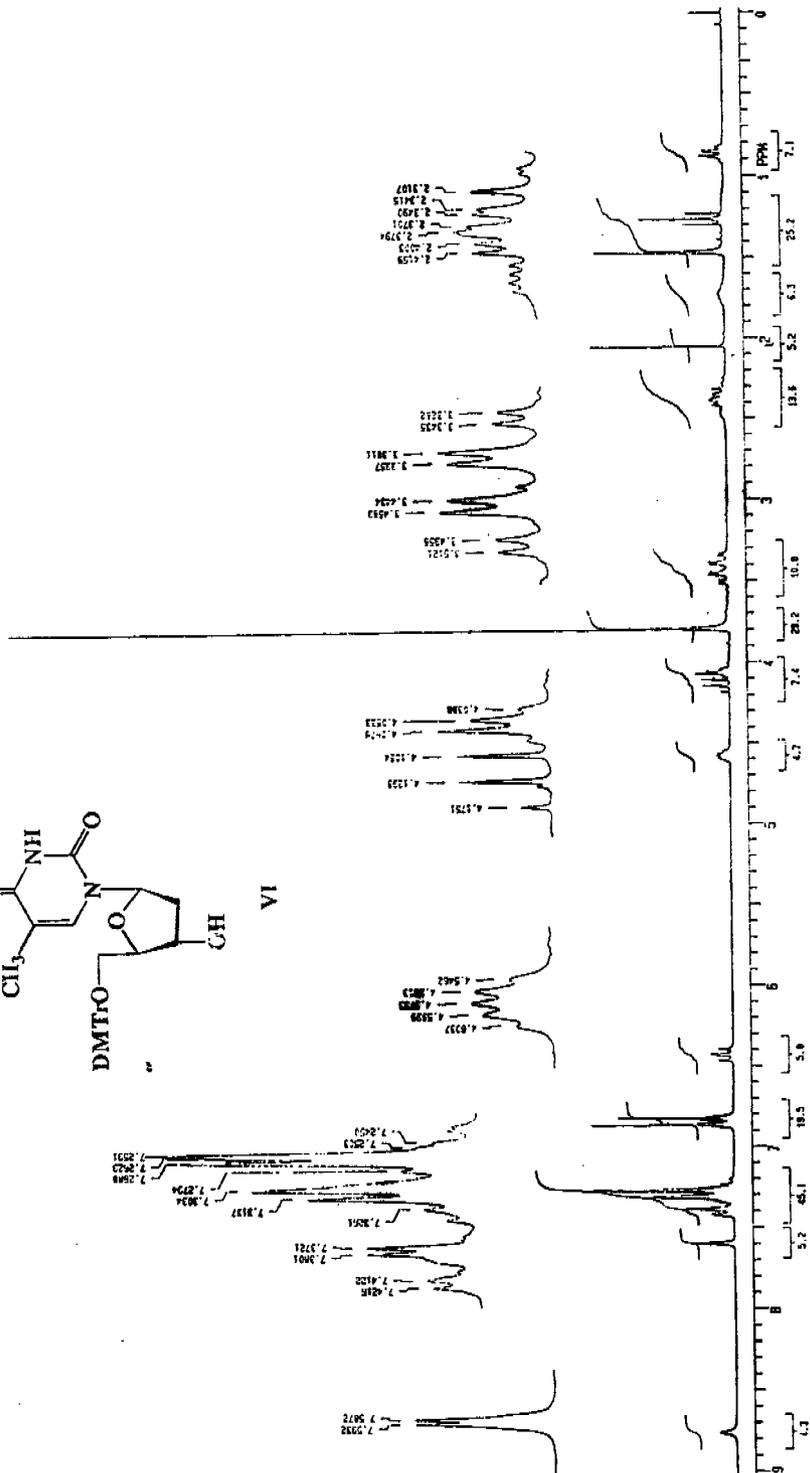
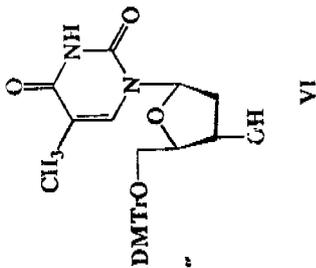
IV



ESPECTRO 5



ESPECTRO 6



ESPECTRO 7

