

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE QUÍMICA
DEPARTAMENT DE QUÍMICA ORGÀNICA

Tesi doctoral presentada per En/Na

Cristina AUSÍN MORENO

amb el títol

**"Àcids nucleics químicament modificats amb
potencial terapèutic:
oligonucleòtids cíclics i àcids nucleics peptídics
amb abraçadores de guanina"**

per a l'obtenció del títol de Doctor/a en

QUÍMICA

Barcelona, 22 d'octubre de 2003.

ÍNDEX I ABREVIATURES

Abreviatures	5
INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS	7
1. Oligonucleòtids com a agents terapèutics	9
2. Teràpia antisentit	10
2.1. Introducció històrica	10
2.2. Mecanismes d'acció dels oligonucleòtids antisentit	11
2.2.1. Inhibició de la traducció per bloqueig estèric	11
2.2.2. Mecanisme de la RNasa H	11
2.3. Oligonucleòtids en fases clíniques d'estudi	12
2.4. Propietats dels oligonucleòtids antisentit	13
3. Modificacions químiques dels oligonucleòtids	15
3.1. Modificacions dels enllaços internucleosídics	16
3.1.1. Derivats de fòsfor	16
3.1.2. Anàlegs amb enllaços desfosfointernucleosídics	18
3.2. Modificacions en els sucres	19
3.2.1. Modificacions en 2'	19
3.2.2. LNAs	19
3.2.3. Biciclo-DNAs	20
3.2.4. Hexoses	21
3.3. Oligòmers en els que se substitueix completament l'esquelet de fosfat-ribosa	23
3.3.1. Àcids nucleics peptídics	23
3.3.2. Morfolino-oligonucleòtids	23
3.3.3. "Plastic"-DNAs	24
3.4. Modificacions en les nucleobases	24
3.4.1. Modificacions en pirimidines	24
3.4.2. Modificacions en purines	25
3.5. Conjugats en 5' i 3'	26
3.6. Generacions d'oligonucleòtids antisentit	27
3.6.1. Primera generació	27
3.6.2. Segona generació	27
4. Objectius	28
5. Bibliografia	28
CAPÍTOL 1. Oligonucleòtids cíclics	33
1. Introducció	35
1.1. Objectius	35
1.2. Dihidrofolat reductasa	36
1.3. Liposomes	38
1.3.1. Liposomes catiónics	39
1.3.2. Mecanisme	40
2. Oligonucleòtids cíclics	41
2.1. Descripció dels mètode de síntesi	41
2.2. Síntesi dels oligonucleòtids cíclics	43
2.2.1. Síntesi de la nucleotidil-resina	43
2.2.2. Elongació de la cadena oligonucleotídica	45
2.2.3. Ciclació, desancoratge i desprotecció	46
2.2.4. Anàlisi i purificació	49

2.2.5. Caracterització	50
2.2.6. Valoració de les síntesis	51
2.3. Síntesi de l'oligonucleòtid lineal fosforotioat (12PS)	52
2.3.1. Síntesi de l'oligonucleòtid	52
2.3.2. Anàlisi, purificació i caracterització	53
3. Assaig de l'activitat citotòxica dels oligonucleòtids cíclics	53
4. Oligonucleòtids cíclics fosforotioat	58
4.1. Propietats dels oligonucleòtids fosforotioat	58
4.2. Mètodes de síntesi	60
4.3. Síntesi de dímers cíclics fosforotioat	61
4.3.1. Estratègia convencional de síntesi	62
4.3.2. Assaig d'una nova estratègia per a la síntesi d'oligonucleòtids cíclics completament fosforotioat	67
4.4. Discussió dels resultats	69
5. Bibliografia	69
CAPÍTOL 2. Abraçadores de guanina	75
1. Introducció i objectius	77
1.1. Anàlegs de citosina	78
1.2. Objectius	81
2. Disseny de la síntesi de les abraçadors de guanina	82
3. Síntesi dels monòmers de PNA	84
3.1. Intent de tenir una via comú per als dos monòmers	84
3.2. Obtenció dels monòmers de PNA de les abraçadores de guanina	86
3.2.1. Incorporació del 2-aminoresorcinol al 5-bromouracil	86
3.2.2. Ciclacions i reaccions de Mitsunobu	89
3.2.3. Incorporació de les nucleobases a l'esquelet d'aminoetilglicina	93
3.3. Valoració de la síntesi dels monòmers de PNA	97
4. Bibliografia	100
CAPÍTOL 3. Síntesi de PNAs incorporant abraçadores de guanina i estudi de l'estabilitat dels dúplexs PNA-DNA	103
1. Introducció	105
1.1. Origen del PNA	106
1.2. Característiques del PNA	107
1.2.1. Estabilitat química	107
1.2.2. Modes d'unió a DNA	107
2. Síntesi de PNA	109
2.1. Descripció del mètode de síntesi	109
2.1.1. Desprotecció	111
2.1.2. Acoblaments	112
2.1.3. Cicle de síntesi	113
2.1.4. Desancoratge i desprotecció final	114
2.2. Disseny i elecció de les seqüències	114
2.3. Síntesi de PNA a temperatura ambient	116

2.3.1. Síntesi dels oligòmers de PNA que contenen les nucleobases naturals	116
2.3.2. Incorporació de les abraçadores de guanina en els decàmers de PNA	118
2.4. Síntesi de PNA assistida per microones	120
2.4.1. Introducció a la utilització de microones en química orgànica	120
2.4.2. Fonament teòric i aspectes pràctics	121
2.4.3. Estudi de l'acoblament de monòmers de PNA en un microones convencional	124
2.4.4. Síntesi de PNA en un microones de cavitat monomodal	127
3. Estudi de l'estabilitat dels dúplexs PNA-DNA	132
3.1. Introducció	132
3.2. Estabilitat dels dúplexs formats pels PNAs que contenen nucleobases naturals i DNA	133
3.3. Influència d'un "mismatch" en l'estabilitat del dúplex	136
3.4. Estabilitat dels dúplexs formats pels PNAs que contenen abraçadores de guanina i DNA	139
3.5. Discussió dels resultats i nous experiments	142
4. Bibliografia	147
Conclusions	151
PART EXPERIMENTAL	157
Annex	213

A: Adenina	HOBt: 1-hidroxibenzotriazole
Ac ₂ O: anhídrid acètic	HPA: àcid 3-hidroxipicolínic
ACN: acetonitril	HPLC: cromatografia líquida d'elevada resolució
AcOEt: acetat d'etil	iBu: isobutiril
AcOH: àcid acètic	Me: metil
AEG: aminoetilglicina	MeOH: alcohol metílic
anh: anhidre	Mmt: monometòxitrilit
ATT: 6-aza-2-tiotimina	MSNT: 1-mesitilensulfonil-3-nitro-1,2,4-triazole
Bhoc: benzhidriloxicarbonil	NADP: nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat
Boc: <i>tert</i> -butoxicarbonil	NMI: 1-metilimidazole
^t BuOOH: hidroperòxid de <i>tert</i> -butil	NMP: N-metilpirrolidona
Bz: benzoil	OD ₂₆₀ : densitat òptica a 260 nm
C: citosina	OPC: cartutx de purificació d'oligo-nucleòtids
CA: citrat amònic	PAGE: electroforesi en gel de poliacrilamida
CCF: cromatografia de capa fina	PAL: àcid 5-(4-(9-fluorenilmetiloxi-carbonil) aminoetil-3,5-dimetoxifenoxi)-valèric
CHO: ovari de hamster xinès	PEG-PS: polietilenglicol-poliestirè
CNE: 2-cianoetil	Pf: punt de fusió
DBU: 1,8-diazabicyclo[5.4.0]-undec-7-è	Pip: piperidina
DCC: <i>N,N</i> -diciclohexilcarbodiimida	PNA: àcid nucleic peptídic
DCM: diclorometà	Pyr: piridina
DEAD: dietilazodiarboxilat	Rdt: rendiment
DHB: àcid 2,5-dihidroxibenzoic	RMN: espectroscopia de resonància magnètica nuclear
DHFR: dihidrofolat reductasa	RNA: àcid ribonuclèic
DIEA: <i>N,N</i> -diisopropiletilamina	Stains all: bromur de 1-etil-2-{(E)-3-[1-etilnafto[1,2-d][1,3]tiazol-2(1H)-iliden]-2-metil-1-propenil}nafto[1,2-d][1,3]tiazol-1-í
DIPAD: diisopropilazidicarboxilat	T: timina
DIPCDI: <i>N,N</i> -diisopropilcarbodiimida	TBE: tampó Tris borat EDTA
DMF: <i>N,N</i> -dimetilformamida	TCA: àcid tricloroacètic
DMI: 1,3-dimetilimidazolidinona	TE: tampó tris-HCl; EDTA
DMSO: dimetilsulfòxid	TEA: trietilamina
DMT: 4,4'-dimetoxitrilit	TEAAc: acetat de trimetilamoni
DNA: àcid desoribonuclèic	TEAB: bicarbonat de trietilamoni
DOPE: 1,2-Dioleoil-sn-Glicero-3-fosfo-etanolamina	TEMED: <i>N,N,N',N'</i> -tetrametiletiledi- amina
DOTAP: metilsulfat de <i>N</i> -[1-(2,3-Dioleoil-oxi)propil]- <i>N,N,N</i> -trimetilamoni	TFA: àcid trifluoroacètic
DOTMA: clorur de (N-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]- <i>N,N,N</i> -trimetilamoni)	TFMSA: àcid trifluorometansulfònic
dUMP: desoxiuridilat	THAP: 2,4,6-trihidroxiacetofenona
EDC: hidroclorur de 1-(3-dimetilamino-propil)-3-etilcarbodiimida	THF: tetrahidrofurà
EDTA: àcid etilendiaminotetraacètic	T _M : temperatura de fusió
EM-ES: espectrometria de masses per electrospray	TMBS: trimetilbensensulfònic
EM-FAB: espectrometria de masses per bombardeig d'àtoms ràpids	TMG: 1,1,3,3-tetrametilguanidina
EM-IC: espectrometria de masses per ionització química	TMP: timidilat
EM-IE: espectrometria de masses per impacte electrònic	UV-VIS: ultraviolat-visible
EM-MALDI-TOF: espectrometria de masses de desorció iònica provocada per làser, assistida per matriu i anàlisi per temps de vol	XAL: àcid 5-(9-aminoxanten-2-oxi)- valèric
EtOH: alcohol etílic	Z: benziloxicarbonil
Fmoc: 9-fluorenilmetoxicarbonil	
G: guanina	
HATU: hexafluorofosfat 9-(7-azabenzotriazo-1-il)-1,1,3,3-tetraetiluroni	

INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS

1. OLIGONUCLEÒTIDS COM A AGENTS TERAPÈUTICS

Durant els darrers anys, els àcids nucleics han rebut molta atenció degut a la seva possible aplicació com a agents terapèutics. Poden ser utilitzats com a inhibidors per a estudiar la funció i la modulació de l'expressió de diversos gens. També han estat emprats com a nucleases artificials.

La capacitat dels oligonucleòtids per a establir interaccions específiques amb altres cadenes d'àcids nucleics es deu a l'habilitat de les nucleobases per a formar enllaços d'hidrogen de manera específica. Aprofitant aquesta capacitat de reconeixement, apareixen diverses estratègies en funció de la diana a la que són dirigides (Figura 1).

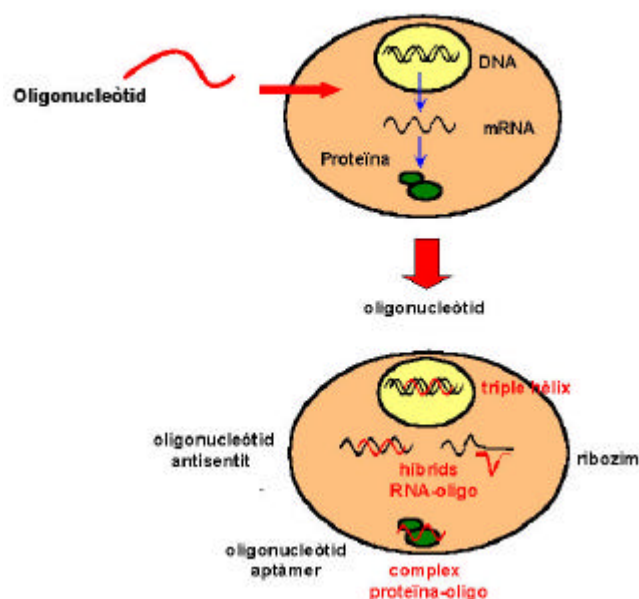


Figura 1. Aplicacions terapèutiques dels oligonucleòtids

En la **teràpia antigen**¹ un oligonucleòtid s'uneix al DNA dels cromosomes i, formant una triple hèlix, bloqueja la transcripció de la informació genètica a mRNA. Quan la diana a la que es dirigeixen els oligonucleòtids són molècules de mRNA, aleshores l'estratègia s'anomena **antisentit**. La formació del complex oligonucleòtid-mRNA inhibeix la traducció a proteïnes de la informació continguda en el mRNA. Els **ribozims**² són cadenes oligonucleotídiques que s'uneixen a l'RNA, de manera específica, i el degraden fent que la transferència d'informació genètica quedi interrompuda. Els oligonucleòtids també es poden unir a proteïnes, de manera específica, modificant la seva activitat, són els anomenats **aptàmers**³ i aquesta estratègia rep el nom de teràpia sentit.

En els darrers anys s'ha desenvolupat una tècnica anomenada **interferència per RNA** (RNAi) per a estudiar la funció de les proteïnes⁴ a partir de la degradació específica de l'RNA missatger. El mecanisme encara no està clar^{5,6}, però se sap que calen dúplexs d'RNA de 21 a 23 parells de bases, anomenats petits RNAs d'interferència. Es postula que a la cèl·lula es forma un complex proteïna-RNA que degrada el corresponent RNA missatger, de manera ràpida i específica i s'elimina així l'expressió del gen. El mecanisme sembla ser diferent a l'antisentit i els seus efectes són més específics. Aquest fenomen va ser descobert al 1995⁷ en el nematode *Caenorhaditis elegans*, que és un organisme model per a experiments biològics, quan els investigadors van intentar emprar RNA antisentit per a inactivar l'expressió d'un gen. S'infectava *C. elegans* amb l'RNA complementari a l'RNA missatger diana per tal de capturar el missatger i evitar la traducció de la proteïna codificada per la seqüència. Van observar que si la infecció tenia lloc alhora amb l'RNA antisentit i el complementari (sentit) la supressió de gen era molt més efectiva.

2. TERÀPIA ANTISENTIT

2.1. Introducció històrica

Al 1977 Paterson⁸ va ser el primer en publicar que l'expressió gènica podia ser modificada amb àcids nucleics exògens, mitjançant la utilització de DNA monocadena per a inhibir la traducció de la informació d'un mRNA complementari. Aquest fenomen va rebre el nom de HART (hybrid arrested translation). Els resultats obtinguts en aquestes primeres experiències van mostrar que els oligonucleòtids antisentit podien inhibir l'expressió gènica de manera específica. Això s'ha estudiat tant en recerca bàsica com amb vistes d'un possible ús terapèutic i per a protegir collites en agricultura.

L'any següent, Zamecnik i Stephenson^{9,10} van ser els primers en proposar la utilització d'oligonucleòtids sintètics antisentit amb finalitats terapèutiques. Van utilitzar un oligonucleòtid complementari al DNA del sarcoma de Rous per a inhibir el creixement d'aquest virus en la cèl·lula. La inhibició específica es basa en el reconeixement específic de tipus Watson-Crick entre els parells de bases de l'oligonucleòtid antisentit i l'àcid nucleic viral.

Al 1983, Simons i Kleckner¹¹ van detectar, en procarïotes, un RNA que era complementari al lloc d'unió del mRNA al ribosoma, incloent el codó d'inici de la traducció, i que suprimia la seva expressió de manera específica.

Fins al 1985 no va haver gaire progrés en aquest camp, principalment per tres raons. En primer lloc es dubtava que els oligonucleòtids poguessin entrar en cèl·lules

eucariotes. Segon, la síntesi d'un oligonucleòtid amb la seqüència correcta i amb prou longitud com per a hibridar-se amb prou afinitat a 37°C era difícil. I finalment, hi havia molt poca informació sobre les seqüències del genoma humà.

2.2. Mecanismes d'acció dels oligonucleòtids antisentit

La regulació de l'expressió gènica mitjançant mecanismes de tipus antisentit es pot trobar també a la natura, tant en procariotes com en eucariotes¹². En organismes procariotes es coneix l'existència de fragments d'uns 100 nucleòtids, que suposen un 3-5% del genoma, que són complementaris a seqüències de l'RNA missatger i poden actuar en llocs de transcripció i post-transcripció, en fets com el processat d'RNA, la seva estabilitat, degradació o traducció. Se sap que en organismes eucariotes els RNAs antisentit participen en el processat dels cromosomes.

Els oligonucleòtids antisentit són cadenes curtes de DNA que són complementàries a una diana de mRNA. Aquests oligonucleòtids s'hibriden complementàriament a l'RNA seguint les regles de Watson-Crick i inhibeixen la traducció del mRNA diana, per un mecanisme que pot ser actiu i/o passiu^{13,14,15}. Un mecanisme passiu es dona quan hi ha una hibridació entre el mRNA i una seqüència oligonucleotídica exògena que comporta la formació d'un dúplex que no permet que el complex ribosomal llegeixi la informació continguda en la diana d'RNA. En el mecanisme actiu, aquesta mateixa hibridació permet la unió i actuació de la RNasa H, que és una proteïna que degrada l'RNA i deixa l'oligonucleòtid de DNA intacte, de manera que es pot hibridar a una nova molècula de mRNA i continuar amb la seva activitat antisentit. Una característica molt necessària dels oligonucleòtids antisentit és una elevada afinitat d'unió cap a l'RNA, especialment en el cas del bloqueig estèric.

2.2.1. Inhibició de la traducció per bloqueig estèric

La inhibició de la traducció de la informació continguda en l'RNA missatger es pot donar per unió de l'oligonucleòtid antisentit al punt del mRNA on comença la traducció. La formació d'aquest dúplex pot evitar, per impediment estèric, la unió dels factors d'iniciació units al ribosomes¹⁶. Si ja ha començat l'acció del ribosoma sobre el mRNA, aleshores la presència d'un oligonucleòtid hibridat a l'RNA pot evitar la translocació dels ribosomes al llarg de l'RNA¹⁷. No queda molt clar si els ribosomes poden arribar a arrancar els oligonucleòtids de l'RNA mitjançant l'ajuda d'enzims com les helicases¹⁸, i se suposa que això depèn de l'oligonucleòtid hibridat en cada cas¹⁹. Aquest mecanisme d'inhibició de la traducció per bloqueig estèric va ser el que va rebre el nom de HART⁸.

2.2.2. Mecanisme de la RNasa H

La importància del paper de la RNasa H en l'activitat dels oligonucleòtids antisentit va ser destacada per primer cop pels grups de Häupte¹⁷ i Minshull²⁰. La RNasa H és un enzim endogen que hidrolitza de manera catalítica la cadena d'RNA en un dúplex RNA/DNA²¹. Es troba tant en cèl·lules de plantes com d'animals i retrovirus. Tot i que les seves funcions fisiològiques no estan completament clares se sap que, com que participa en la replicació i reparació del DNA, es troba en totes les cèl·lules que s'estan dividint.

Algunes modificacions químiques dels oligonucleòtids com els fosforotioats activen l'acció de la RNasa H de manera molt eficient mentre que d'altres l'eviten. Només oligonucleòtids amb càrrega permeten la formació de substrats susceptibles de ser

atacats per la RNasa H. Malgrat això, la RNasa H no requereix una homologia molt extensa entre el mRNA i l'oligonucleòtid antisentit. De fet, s'ha descrit que la RNasa H reconeix com a substrats dúplexs amb una extensió de sis parells de bases²². Això pot ser un avantatge, però pot implicar riscos de certa falta d'especificitat.

Si l'oligonucleòtid antisentit és massa llarg o massa curt es perd un element d'especificitat. Actualment, es considera que la longitud òptima per a un oligonucleòtid antisentit es troba entre 16 i 20 nucleòtids.

2.3. Oligonucleòtids en fases clíniques d'estudi

Els agents antisentit han estat utilitzats en un elevat nombre de sistemes patològics com són càncers, situacions de resistència a combinacions de fàrmacs, malalties virals... Normalment les dianes són l'extrem 5' del mRNA i la regió que inclou el codó iniciador de la traducció, tot i que estudis recents indiquen que aquestes regions no són necessàriament òptimes²³.

El primer oligonucleòtid aprovat com a fàrmac² va ser anomenat Vitravene (fomivirsen sòdic) i és un fàrmac antiviral que va ser desenvolupat per ISIS Pharmaceuticals i introduït al mercat per CIBAVision. Va ser aprovat per les autoritats europea i dels Estats Units al juliol de 1999 i a l'agost del 1998, respectivament. El Vitravene s'utilitza per a tractar una infecció inflamatòria viral de l'ull (retinitis) que és causada pel citomegalovirus (CMV). El CMV normalment afecta a pacients amb problemes del sistema immunitari com són els pacients amb la SIDA. Pot afectar a un o a tots dos ulls i és habitual que els pacients pateixin una important discapacitat visual o ceguesa com a resultat d'infeccions no tractades. El Vitravene és un oligonucleòtid fosforotioat (veure 3.1.1), 21-mer, amb seqüència complementària a mRNA del CMV.

A la següent taula^{24,25,26,27} es recullen productes de diferents companyies farmacèutiques, amb mecanisme d'actuació de tipus antisentit, indicant també la seva diana i la fase de desenvolupament clínic en la que es troben.

Companyia	Producte	Diana	Indicació	Fase de desenvolupament
ISIS Pharmaceuticals	Vitravene (Fomivirsen)	CMVIE2	Retinitis induïda per citomegalovirus	Aprovat
	Affinitak (ISIS3521)	Proteïna quinasa C a	Càncer ovari, pròstata, pit, colon, pulmó	III
	Alicaforsen (ISIS2302)	ICAM-1	Malaltia de Crohn	III
			Colitis ulcerosa	II
	ISIS14803	Antiviral	Hepatitis C	II
	ISIS2503	H-RAS	Càncer de pàncreas i altres	II
	ISIS104838	TNF-a	Artritis reumatoide	II
Psoriasis			II	
OGX-011 (ISIS112989)	Cluster	Càncer de pròstata i altres	I	

GENTA	Genasense™	Bcl-2	Leucèmia limfocítica aguda, melanoma maligne, mieloma múltiple	III
			Leucèmia mieloide aguda, càncer de pròstata	II
Hybridon	GEM231	Proteïna quinasa A	Càncer sòlid	II
	GEM132	CMVUL32	Retinitis induïda per citomegalovirus	I
MethylGene	MG98	DNA metiltransferasa	Càncer sòlid	II
AVI Biophar	Resten-NG	c-myc	Càncer, restenosis	II i III
Lorus Therapeutics	GTI2040	Ribonucleòtid reductasa	Càncer	I
	GTI2501	Ribonucleòtid reductasa	Càncer	I
INEX	INX3280	Myc	Restenosis	II
Coley Pharmaceuticals	Diversos productes	---	Càncer, asma, al·lèrgies, malalties infeccioses	I i II
Enzo Biochem	HGTV43	HIV-1	HIV	II
EpiGenesis	EPI2010	Adenosina A1R	Malalties respiratòries	II
Hybridon	GEM92	HIV-1	HIV	I
Ori Genix	ORI 1001	Papillomavirus humà (HPV)	Fàrmacs antivirals	I

Taula 1. Productes de diferents companyies farmacèutiques en diverses fases clíniques de desenvolupament

Es pot trobar una base de dades força actualitzada de la fase de desenvolupament en la que es troben els fàrmacs per al tractament de diversos tipus de càncers:

http://www.cancerconsultants.com/what_data.php?x=0

2.4. Propietats dels oligonucleòtids antisentit

Hi ha una sèrie de requisits que han de complir els oligonucleòtids que es vulguin utilitzar com a agents antisentit^{13,28}.

1. Els oligonucleòtids han de poder ser sintetitzats fàcilment en quantitats grans. La química dels fosforamidits i la utilització de sintetitzadors automàtics ha facilitat molt la síntesi d'oligonucleòtids. A més s'estan desenvolupant mètodes optimitzats per a sintetitzar oligonucleòtids a gran escala.
2. El complex format entre l'oligonucleòtid i la seva seqüència diana complementària ha de ser estable en condicions fisiològiques.
3. La interacció entre l'oligonucleòtid i la diana ha de ser específica.

4. L'oligonucleòtid ha de tenir una vida mitjana en condicions *in vivo* prou llarga com per a ser capaç de desenvolupar la seva acció dins de la cèl·lula, és a dir, ha de ser resistent a les nucleases.
5. L'oligonucleòtid ha de ser capaç de travessar membranes cel·lulars per tal d'arribar al seu punt d'actuació i ha de poder ser retingut dins de la cèl·lula.
6. L'agent antisentit no hauria d'interaccionar de manera no específica amb altres macromolècules.

Els oligonucleòtids amb aplicacions terapèutiques han de ser estables a degradació enzimàtica. Els oligonucleòtids naturals són degradats molt ràpidament per part de les nucleases extra- i intracel·lulars de manera que no són aptes per a ser utilitzats com a fàrmacs. En el cas dels oligodesoxinucleòtids aquesta degradació té lloc principalment per acció d'exonucleases, essent les que actuen per l'extrem 3' les més efectives. Aquest fet va portar a introduir modificacions químiques en l'esquelet dels oligonucleòtids.

La baixa capacitat dels oligonucleòtids de travessar les membranes cel·lulars és una de les principals dificultats de la teràpia antisentit. Depèn del tipus de cèl·lula sobre el que es vulgui actuar però, en general, tots els oligonucleòtids, independentment de les modificacions químiques que presentin, tenen problemes per a ser introduïts en les cèl·lules en elevades concentracions. Per això ha calgut desenvolupar estratègies per a introduir oligonucleòtids en cèl·lules, com són la utilització de liposomes catiónics i la microinjecció.

Un cop superats els dos problemes, com són la resistència a nucleases i la introducció dels oligonucleòtids en les cèl·lules, cal actuar sobre la capacitat dels oligonucleòtids per a unir-se amb gran afinitat i de forma completament específica amb les seves dianes.

Per tal de dissenyar convenientment les modificacions químiques necessàries cal considerar els factors que afecten l'estabilitat termodinàmica dels dúplexs. Els factors estabilitzants són la formació d'enllaços d'hidrogen i les interaccions d'apilament p-p, de manera que modificacions que provoquin un augment del nombre d'acceptors o donadors d'enllaç d'hidrogen o aquelles que augmentin l'àrea de tipus p de les nucleobases poden ser emprades per a millorar l'afinitat.

La repulsió electrostàtica entre esquelets polianiónics és el principal factor desestabilitzant en la formació de dúplexs. Per tal de millorar l'afinitat es pot substituir l'esquelet per un sense càrrega o amb càrrega positiva.

Hi ha una sèrie de consideracions²⁹ que s'han de tenir presents a l'hora de dissenyar un oligonucleòtid antisentit:

- a. Encara que comencen a aparèixer aproximacions semiempíriques, és necessari escollir la seqüència oligonucleotídica d'entre un ventall de possibilitats.
- b. S'ha de demostrar la supressió o inhibició de l'expressió d'una diana molecular rellevant (normalment una proteïna)
- c. No és recomanable utilitzar oligonucleòtids antisentit amb tots els enllaços internucleosídics de tipus fosfodiester, ja que aquestes molècules, a més de ser sensibles a les nucleases, donen com a productes de degradació nucleòtids monofosfat que poden ser tòxics³⁰

- d. Cal maximitzar l'especificitat de seqüència i minimitzar la no-especificitat de seqüència
- e. No utilitzar oligonucleòtids antisentit amb quatre residus de guanina consecutius

3. MODIFICACIONS QUÍMIQUES DELS OLIGONUCLEÒTIDS

L'estructura dels oligonucleòtids permet introduir modificacions químiques en diverses posicions²² (Figura 2). Per una banda actuant sobre els enllaços internucleosídics o sobre els sucres que formen part de l'esquelet dels àcids nucleics es poden incorporar un elevat nombre de variacions³¹. També les bases nitrogenades són susceptibles a modificacions químiques. A més, els oligonucleòtids es poden unir covalentment a una gran varietat de molècules. En el context de la teràpia antisentit aquesta conjugació s'ha utilitzat per a millorar tant el transport com les propietats d'hibridació dels oligonucleòtids. Normalment els conjugats s'introdueixen per l'extrem 5' mitjançant reactius fosforilants o per l'extrem 3' a través de connectors.

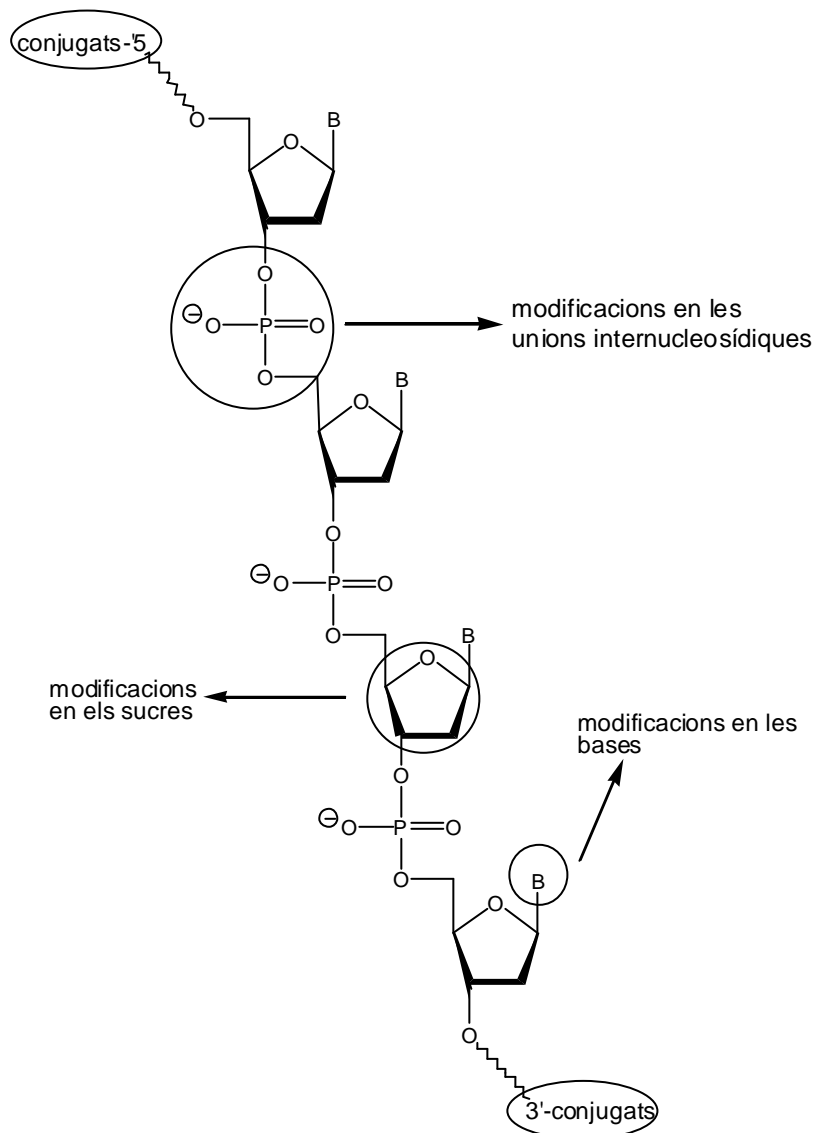


Figura 2. Representació de les diverses posicions en les que es poden introduir modificacions químiques en l'estructura dels oligonucleòtids.

Un factor a considerar quan es dissenyen els nous oligonucleòtids és que han de poder ser sintetitzats de manera econòmica, ràpida i en quantitats prou elevades com per a realitzar assaigs biològics. És important que la química que es desenvolupi pugui ser utilitzada en fase sòlida i millor si és compatible amb els mètodes sintètics generalment utilitzats per a obtenir oligonucleòtids.

El fet d'introduir-hi modificacions químiques pot afectar a les propietats dels nucleòsids. Pot tenir influència sobre la seva capacitat de formar enllaços d'hidrogen, les interaccions per apilament i de van der Waals i tenir altres efectes com poden ser electrostàtics o estèrics. Els efectes provocats per aquestes modificacions no són predictibles de manera general i depenen del tipus de modificació, el lloc de l'oligonucleòtid en el que s'introdueixen i l'entorn en el que es troben.

3.1. Modificacions en els enllaços internucleosídics

3.1.1. Derivats de fòsfor (Figura 3)

De totes les modificacions de l'esquelet, les que impliquen la substitució dels grup fosfodiester per una unió neutra són les més abundants. Inicialment es va creure que els oligonucleòtids resultants, en ser més lipofílics, s'haurien d'introduir millor en les cèl·lules i a més, en disminuir la repulsió electrostàtica entre cadenes, haurien de tenir una major afinitat pels àcids nucleics complementaris.

Una de les primeres modificacions introduïdes en els oligonucleòtids per a rendir esquelets neutres van ser els **metilfosfonats**^{32,33}, en els quals un dels àtoms d'oxigen no enllaçants a nucleòsid del grup fosfodiester se substitueix per un grup metil. L'àtom de fòsfor passa a tenir quiralitat. Aquests oligonucleòtids són molt resistents a l'acció de les nucleases, però són poc solubles en aigua i els homooligòmers que presenten aquesta modificació no activen la RNasa H i tenen menys afinitat per als àcids nucleics complementaris que no pas els oligonucleòtids naturals.

En la investigació dels efectes que es produeixen en els oligonucleòtids en introduir modificacions en l'esquelet, altres experiències es van centrar en la substitució dels àtoms d'oxigen del grup fosfodiester per àtoms de sofre obtenint-se els anomenats oligonucleòtids **fosforotioats**³⁴ i **fosforoditioats**³¹, en funció del nombre d'àtoms d'oxigen substituïts.

Els oligonucleòtids fosforotioats se sintetitzen fàcilment en sintetitzadors comercials de DNA, són resistents a l'acció de les nucleases (encara que menys que altres oligonucleòtids modificats) i poden activar la RNasa H un cop hibridats a l'RNA diana. El principal problema que presenten és que tenen tendència a provocar efectes no específics per unió amb proteïnes intra- i extracel·lulars i a més activen la degradació per part de la RNasa H de molècules d'RNA que no són dianes però a les que són parcialment complementaris.

En aplicacions terapèutiques, degut a ser els primers exemples en ser estudiats, els fosforotioats es prenen com a referència per a la resta d'oligonucleòtids amb esquelet modificat.

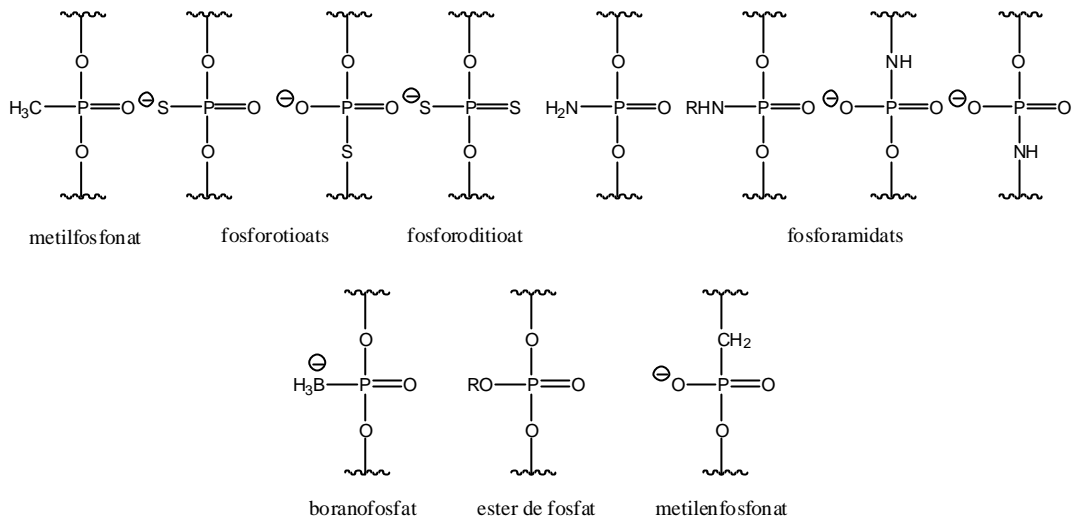


Figura 3. Anàlegs amb el grup fosfat internucleosídic modificat

En el grup dels oligonucleòtids **fosforamidats**³⁵ es troben diversos exemples. Per una banda n'hi ha amb càrrega negativa i aquirals en els que un dels oxígens enllaçants de grup fosfodiester se substitueix per un grup amino, N3'→P5' o P3'→N5'. Per altra banda hi ha fosforamidats neutres, en els que l'àtom de fòsfor té quiralitat i en els que els oxígens substituïts per grups amino són els no-enllaçants. De tots ells, els que tenen les millors propietats biofísiques i són potencialment els més útils per a aplicacions terapèutiques, són els N3'→P5' fosforamidats. Aquests formen dúplexs estables amb DNA i RNA complementaris i són estables a les nucleases. Aquesta estabilitat és deguda a la presència dels grup amino en 3' que en ser donador d'electrons rendeix uns fosforamidats menys susceptibles d'atac nucleòfil. El problema que presenten aquests productes és que no són capaços d'activar la RNasa H quan s'uneixen a RNA complementari, probablement degut a que l'enzim no és capaç de reconèixer els dúplexs formats amb aquests oligòmers modificats. Malgrat aquest problema, els oligonucleòtids que contenen unions N3'→P5' fosforamidats presenten una elevada activitat antisentit en cultius cel·lulars i *in vivo* que s'assumeix que és simplement pel mecanisme de bloqueig estèric de l'RNA.

El DNA amb **boranofosfats**^{36,37} s'obté per substitució d'un dels àtoms d'oxigen no enllaçants del grup fosfodiester per un grup borà (BH₃). El diester boranofosfat és isoelectrònic amb els fosfodiesters, isostèric amb el grup metilfosfonat i quiral. Els oligonucleòtids resultants són molt solubles en aigua però més lipofílics que el DNA natural. Els dúplexs que formen amb oligonucleòtids naturals complementaris són lleugerament menys estables que els no modificats. El DNA amb boranofosfats és molt més estable a les nucleases que el fosfodiester i que el fosforotioat i pot activar la RNasa H per a que hidrolitzi l'RNA.

Els **esters de fosfat**²² són derivats dels oligonucleòtids en els que s'incorporen grups alquil units als oxígens no enllaçants dels fosfats. Són neutres i es poden utilitzar per a obtenir conjugats d'oligonucleòtids.

En el cas dels **metilen fosfonats**³⁸ hi ha una substitució de l'oxigen 3' del grup fosfodiester per un grup metilè. Els oligodesoxinucleòtids que contenen enllaços de tipus metilenfosfonat en determinades posicions s'hibriden a l'RNA diana amb més afinitat que els oligòmers naturals.

3.1.2. Anàlegs amb enllaços desfosfointernucleosídics

Tot i que el nombre d'anàlegs d'oligonucleòtids amb enllaços desfosfointernucleosídics sintetitzats és força elevat (Figura 4), en general les seves propietats no els fan gaire interessants en el camp de la teràpia antisentit.

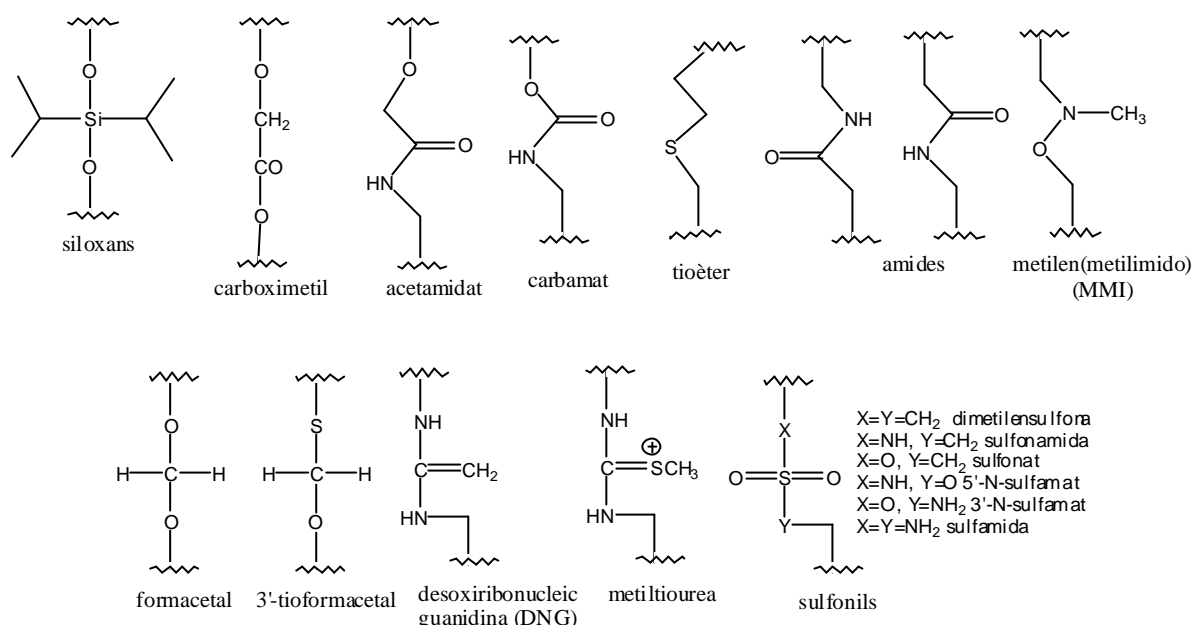


Figura 4. Anàlegs desfosfointernucleosídics

A la següent taula es recullen les propietats més destacades d'aquests anàlegs:

Modificació	Hibridació ^a	Resistència a les nucleases ^b	Altres	Referència
Siloxans	---	---	Síntesi d'hexàmers	22
Carboximetils	---	---	Síntesi de trímers	39,40,41
Acetamidats	No	---	Poca solubilitat en aigua	42
Carbamats	No	---	Desestabilitzants	43
Tioèters	---	---	Oligòmers neutres i no hidrolitzables	22
Amides	OK	---	Igual de estables que els naturals	44
Metilen(metilimido)	OK	OK	Millors propietats farmacològiques que els naturals	45,46
Formacetals	OK	OK	Bona permeabilitat a membranes	47
DNG	OK	OK	Bona permeabilitat i menor repulsió electrostàtica	48
Metiltiurea	OK	OK	Lleugerament pitjor que DNG	49
Sulfonils	variable	---	El millor per hibridació és el 5'-N-sulfamat	50

^a hibridació a seqüències d'àcids nucleics complementàries, comparada amb la de molècules de DNA equivalents, OK: hibridació igual o més forta; No: no hi ha hibridació. ^b resistència a l'acció de les nucleases comparada amb la de les molècules de DNA equivalents, OK: major resistència; ---: dada no descrita.

De tots aquests mítics, els més interessants són els que contenen l'enllaç internucleosídic de tipus metilen(metilimido) (MMI), que és aquiral i neutre i un cop incorporat en oligonucleòtids, aquests són estables en condicions fisiològiques. Els oligonucleòtids que contenen aquesta modificació s'hibriden a RNA complementari amb gran afinitat i especificitat i són resistents a l'acció d'endo- i exonucleases. Estudis biològics realitzats mostren que els oligonucleòtids amb enllaços de tipus MMI presenten millors propietats farmacològiques que els oligòmers naturals.

3.2. Modificacions en els sucres

3.2.1. Modificacions en 2'⁵¹

D'entre les possibles modificacions en 2', s'han sintetitzat 2'-O-alkil, 2'-O-alkil amb enllaços glicol èter (MOE), 2'-O-aminoalkil i 2'-F-ANA (Figura 5) per a determinar les seves propietats farmacocinètiques, farmacodinàmiques i farmacològiques. En el cas dels 2'-O-alkil, a mesura que augmenta la longitud de la cadena alquíllica, l'afinitat d'unió disminueix i la resistència a les nucleases augmenta. La introducció d'un àtom de fluor en 2' provoca un augment de l'afinitat d'unió, però no proporciona cap resistència a l'acció de les nucleases. La modificació 2'-O-MOE augmenta la força d'unió i la resistència a les nucleases proporcionada també és més gran que la dels oligonucleòtids naturals. Per últim, 2'-O-AP (2'-O-aminopropil) és la modificació en 2' que proporciona la major resistència a l'acció de les nucleases però l'augment de T_M en aquest cas és modest.

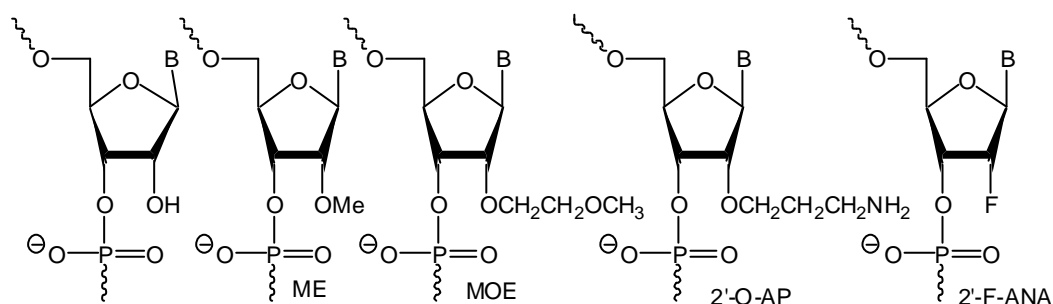


Figura 5. Modificacions en 2'

3.2.2. LNAs⁵²

Els àcids nucleics "locked" (LNAs) són ribonucleòtids que contenen un pont metilènic que uneix l'oxigen en 2' de la ribosa amb el carboni en 4' (Figura 6). S'ha observat que la incorporació de LNA en oligòmers millora l'afinitat per les seqüències complementàries i augmenta la temperatura de fusió. Oligonucleòtids mixtes de LNA i DNA així com quimeres LNA-DNA-LNA indueixen l'acció de la RNasa H. Aquests fets fan dels LNAs una família de molècules interessants per a ser utilitzades en aplicacions antisentit. Un primer grup de derivats són els anàlegs en els que l'oxigen que fa de pont és substituït per sofre o nitrogen. El canvi de l'oxigen per amino o metilamino conserva l'elevada afinitat pels corresponents oligòmers de DNA. L'extensió del pont entre 2' i 4' amb un metilè porta al [3.2.1]-LNA que presenta afinitats intermitges entre les del DNA o RNA i el LNA. Canviant la configuració dels centres 1', 2', 3' i 4' s'obtenen diversos diastereoisòmers⁵³. Tres d'ells, el β -D-ribo-, l' α -L-ribo- i el β -D-xilo-LNA presenten una

elevada afinitat, dependent de la seqüència, per les seves respectives dianes complementàries d'RNA, mentre que l' α -L-xilo-LNA és incapaç d'hibridar-se a l'RNA⁵⁴.

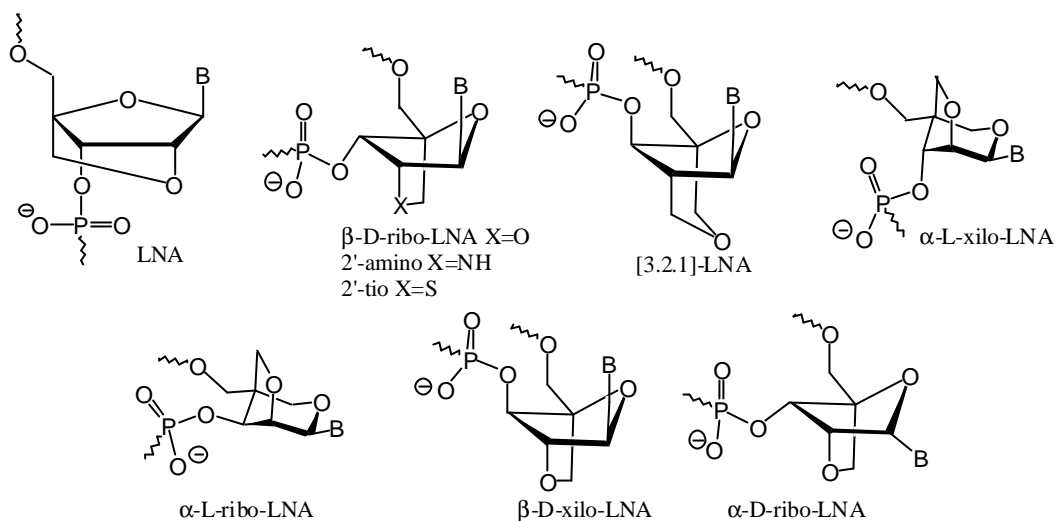


Figura 6. LNAs

3.2.3. Biciclo-DNAs^{26,55}

El sistema furanòsic dels nucleòsids naturals proporciona les característiques geomètriques adients per a que els oligonucleòtids adoptin una estructura en forma d'hèlix. L'enllaç C4'-C5' té una mínima restricció conformacional. Els biciclo-DNAs (Figura 7) han estat dissenyats amb l'objectiu de restringir la llibertat d'aquest enllaç de manera que contribueixi més a la preorganització de la cadena oligonucleotídica per a formar dúplexs amb forma helicoidal. Estudis de modelització molecular dels nucleòsids van suggerir que la incorporació d'un anell carbocíclic per a generar un esquelet de tipus bicíclic [3.3.0] disposaria l'anell de furanosa en la conformació que adopta en el B-DNA.

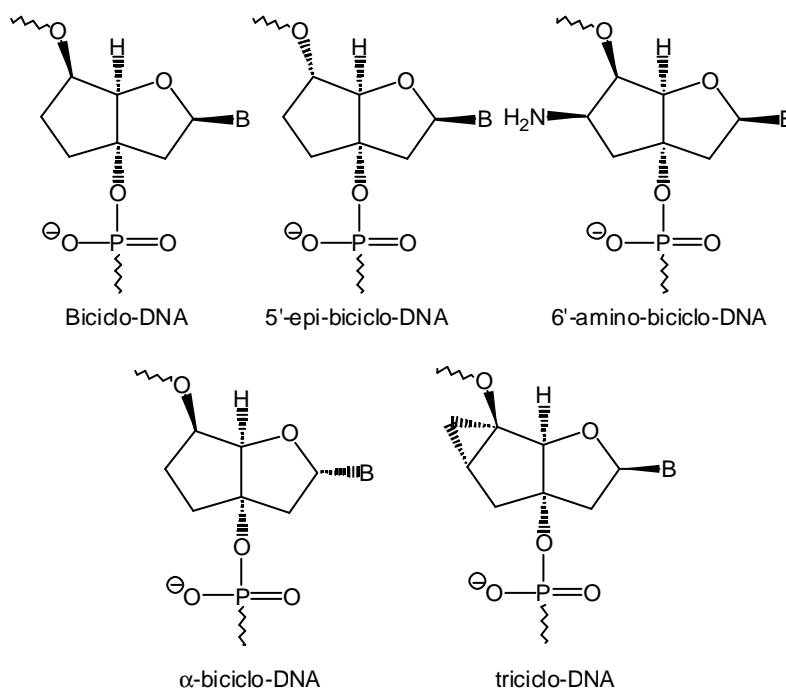


Figura 7. Biciclo-DNAs

Estudis realitzats amb diverses seqüències oligonucleotídiques que contenen biciclo-DNAs van mostrar que formaven dúplexs de tipus Watson-Crick amb DNAs i RNAs complementaris. L'estabilitat tèrmica d'aquests heterodúplexs és del mateix ordre que la corresponent als dúplexs naturals. Pel que fa a la resistència a l'acció de les nucleases s'observa una considerable estabilització.

A la següent taula es descriuen les propietats, d'hibridació i de resistència a l'acció de les nucleases del oligòmers que contenen aquestes modificacions, comparades amb les dels oligonucleòtids naturals.

Modificació	Hibridació	Resistència a nucleases
5'-epi-biciclo-DNA	Menor	---
6'-amino-biciclo-DNA	Igual	---
a-biciclo-DNA	Igual	Més estable
triciclo-DNA	Major	Completa resistència

El triciclo-DNA⁵⁶ és el candidat més interessant per a ser estudiat en aplicacions de teràpia antisentit ja que provoca un augment de l'estabilitat tèrmica dels oligòmers en els que es troba, a més proporciona una completa resistència a les nucleases i no inhibeix l'acció de la RNasa H quan forma dúplexs amb RNA.

3.2.4. Hexoses

Dins d'aquest grup es troben els anàlegs d'oligonucleòtids en els que el sucre, que habitualment es troba en forma de ribosa, ha estat substituït per una hexosa, amb la base nitrogenada unida a 2' en la família dels hexitol-NAs i a 1' en la resta de derivats.

Modificació	Hibridació ^a	Altres	Referència
Hexitol-NAs (Figura 8)			
HNA	Ok ?	Forma homodúplexs i dúplexs amb DNA i RNA	13
ANA	Ok ?	Resistent a nucleases	57
MNA	Ok ?	Menys estables que ANA	57
CNA	Ok ?	Menys estables que ANA	
CeNA	Ok ?	Resistent a nucleases i activa la RNasa H	58,59
2'→4' pentapiranosil-NAs (Figura 9)			
pRNA	Ok ?	Forma dúplexs antiparal·lels estables	26
β-D-xilopiranosil-NA	Ok ?	Menys estable que l'arabino	26
a-L-lixopiranosil-NA	Ok ?	Menys estable que l'arabino	26
a-L-arabinopiranosil-NA	Ok ?	Presenta les majors T _M del grup	26
Treofuranosil i 3'→4' pentapiranosil-NAs (Figura 10)			
TNA	Ok =	Especificitat d'unió comparable a RNA	60
a-L-lixopiranosil-NA	Ok ?	Aparellament molt dependent de la seqüència	61
β-D-ribopiranosil -NA	Ok ?	Aparellament molt dependent de la seqüència	61
4'→6' hexapiranosil-NAs (Figura 11)			
Homo-DNA β-D 4'-6'	Ok ?	Unions molt més fortes que en els naturals	62
Altropiranosil-NA β-D-4'-6'	No	Gran impediment estèric dels hidroxils	26
Glucopiranosil-NA β-D 4'-6'	No	Gran impediment estèric dels hidroxils	26
Alopiranosil-NA β-D 4'-6'	No	Gran impediment estèric dels hidroxils	26

^ahibridació a seqüències d'àcids nucleics complementàries, comparada amb la de molècules de DNA equivalents, OK: es dona hibridació (? : T_M major, ? : T_M menor), No: no hi ha hibridació.

D'entre tots aquests anàlegs destaquen els àcids nucleics ciclohexenils (CeNAs), aquests reconeixen l'RNA complementari de manera eficient, a més tenen una estabilitat a l'acció de les nucleases superior al DNA i són capaços d'activar la RNasa H.

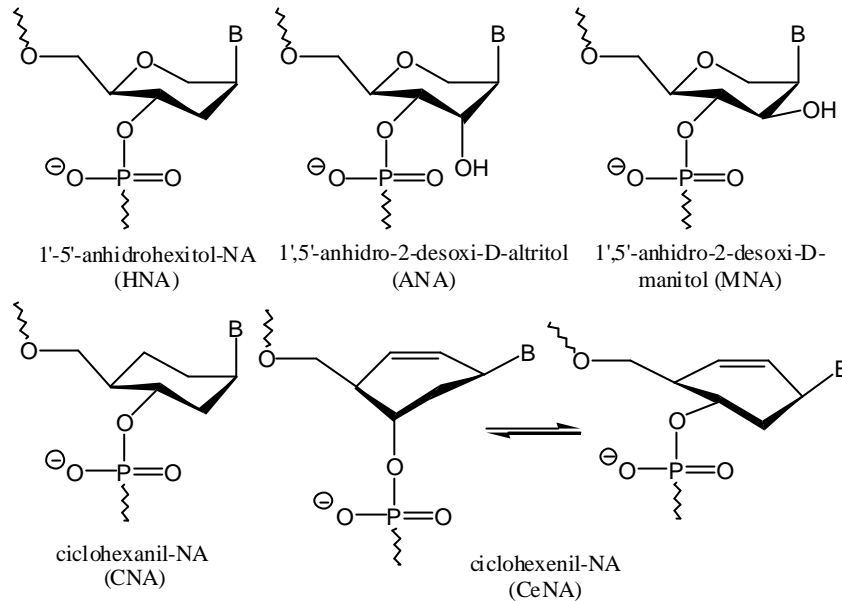


Figura 8. Hexitol-Nas

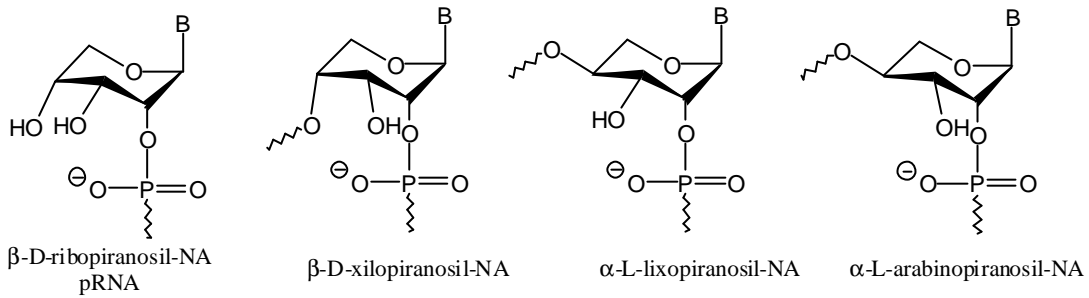


Figura 9. 2'→4' pentapiranosil-NAs

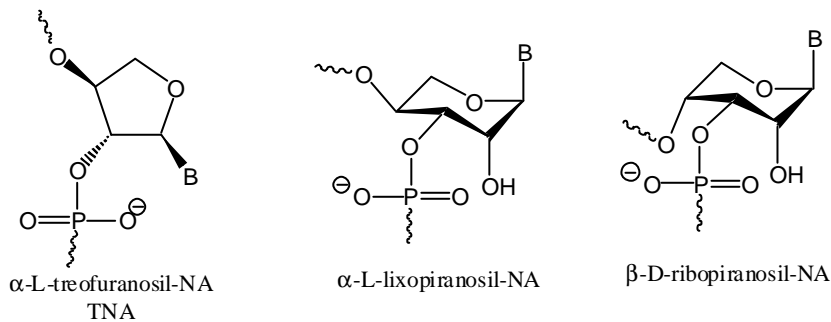


Figura 10. treofuranosil-NA i 3'→4' pentapiranosil-Nas

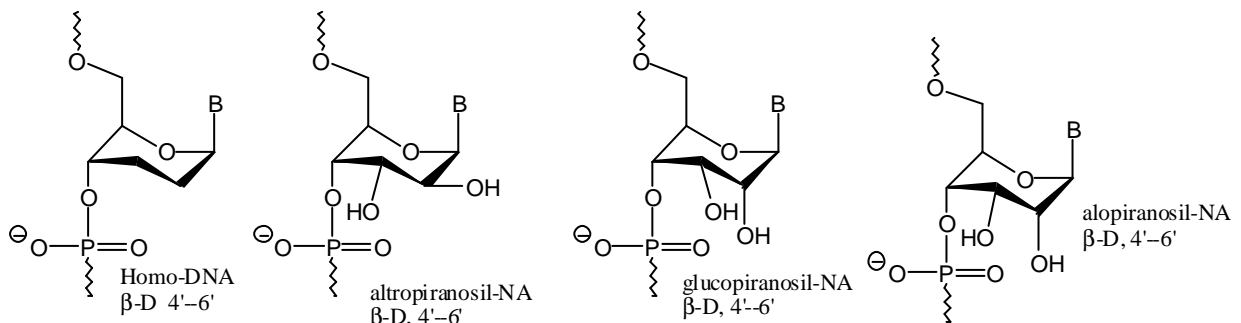


Figura 11. 4'→6' hexapiranosil-NAs

3.3. Oligòmers en els que se substitueix completament l'esquelet de fosfat-ribosa

Els oligonucleòtids en els que l'esquelet de ribosa-fosfat ha estat substituït per altres funcionalitats, normalment àcids nucleics peptídics (PNAs) i morfolino-oligonucleòtids, presenten avantatges respecte a les modificacions descrites anteriorment.

3.3.1. Àcids nucleics peptídics^{25,31}

Els PNAs són oligòmers peptídics formats per unitats de N-(2-aminoetil)glicina amb les bases nitrogenades unides a través d'una cadena lateral mitjançant un enllaç de tipus amida (Figura 12). Els dos grups amida en cada monòmer proporcionen rigidesa a l'esquelet. Els oligòmers de PNA són poc solubles en aigua i sovint se'ls uneix una unitat de lisina per a solucionar aquest problema. El PNA forma dúplexs amb RNA i DNA que són més estables que els corresponents dúplexs naturals. A més, els dúplexs que contenen PNA tenen la mateixa o fins i tot menys tolerància pels "mismatches" (aparellaments no canònics) que els dúplexs naturals. La recerca per a desenvolupar agents antisentit que continguin PNAs ja ha tingut força èxit i hi ha diversos grups que han descrit inhibicions efectives de la traducció de diverses dianes d'RNA en cultius cel·lulars. També s'han realitzat estudis *in vitro* amb PNA com a agents antigen amb resultats positius.

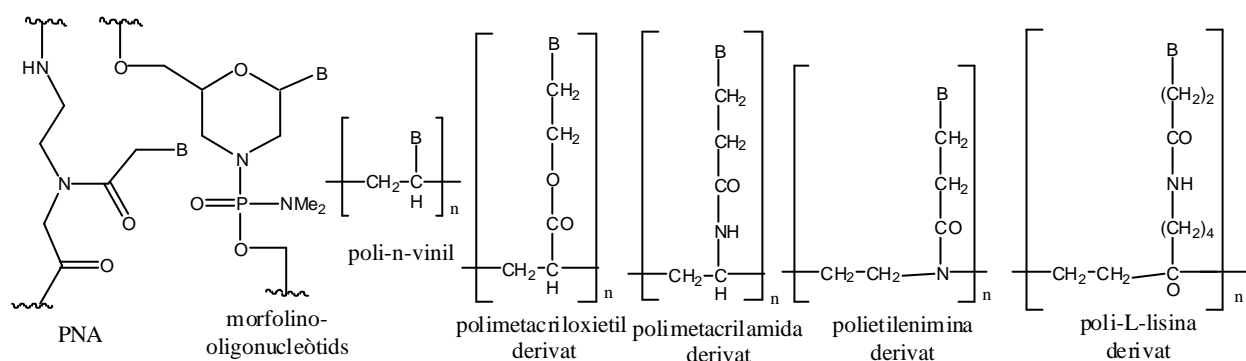


Figura 12. Anàlegs en els quals l'esquelet de fosfat-ribosa ha estat completament substituït per altres estructures

3.3.2. Morfolino-oligonucleòtids^{31,63}

Els morfolino-oligonucleòtids tenen els nucleòsids units per enllaços de tipus fosforamidat (Figura 12). Els homo-morfolino-oligòmers presenten una elevada solubilitat en aigua i són extremadament estables a la degradació en fluids biològics. Tot i que presenten centres quirals, els morfolino-oligos formen heterodúplexs amb RNA que són més estables que els corresponents dúplexs DNA-RNA. S'ha demostrat que els anàlegs morfolino són més efectius com a agents en teràpia antisentit que els oligòmers fosforotioats amb la mateixa seqüència, tot i que no activen la RNasa H un cop units a l'RNA diana. Això s'explica per que els morfolino-oligos no s'uneixen de manera inespecífica a proteïnes i presenten una major especificitat seqüencial

3.3.3. "Plàstic"-DNAs

Els "plàstic"-DNAs són el resultat de substituir l'esquelet de fosfat ribosa dels oligonucleòtids per polímers sintètics. Hi ha un elevat nombre d'anàlegs sintetitzats (Figura 12). De tots ells, només els derivats de poli(n-vinil)⁶⁴ han estat estudiats per a conèixer la seva activitat biològica.

3.4. Modificacions en les nucleobases^{65,66}

Els punts més atractius per a introduir modificacions en les nucleobases són aquelles posicions del solc major que estan exposades als dissolvents, és a dir, les posicions 4 i 5 en les pirimidines i les posicions 6 i 7 en les purines. Les substitucions en aquests punts s'espera que no interfereixin amb l'aparellament de les bases i que tampoc suposin un impediment estèric que afecti a la geometria de la doble hèlix. Les modificacions que poden ser positives per a l'estabilitat del dúplex són les que augmenten el nombre d'enllaços d'hidrogen que es poden formar entre les nucleobases o les que augmenten les interaccions d'apilament (les que suposen una extensió del sistema π de les nucleobases).

3.4.1. Modificacions en pirimidines (Figura 13)

A l'hora d'introduir modificacions en les pirimidines destaca la posició 5, ja que no participa en els aparellaments entre les bases. Així les modificacions en C-5 han estat molt estudiades i, per tant la química necessària per a introduir-les està molt desenvolupada. Existeix un gran nombre d'exemples de pirimidines modificades en 5, però la manera més habitual d'estabilitzar dúplexs d'oligonucleòtids és mitjançant la substitució de l'àtom d'hidrogen per un grup metil, és a dir, timina per uracil i 5-metilcitosina per citosina. La posició C-5 de l'uracil s'utilitza habitualment per a incorporar grups marcadors com són grups fluorescents, biotina, agents complexants, intercaladors, etc.

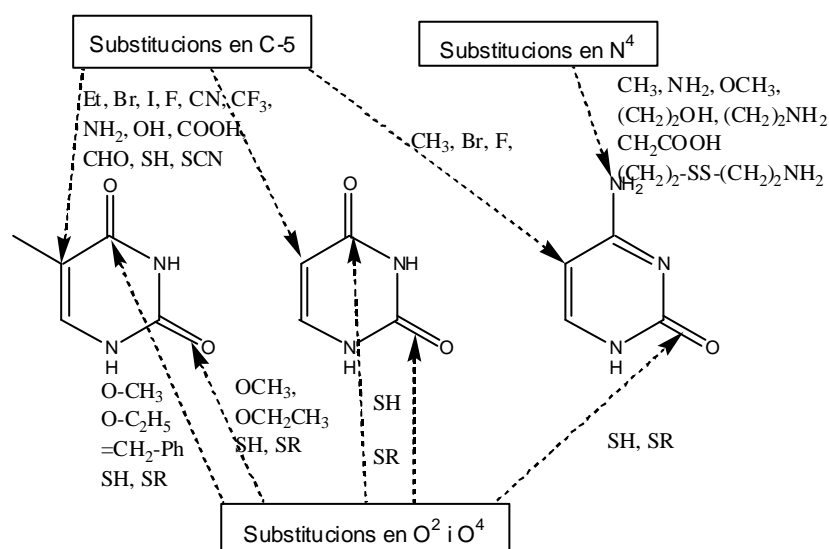


Figura 13. Posicions en les que es donen habitualment les modificacions en les pirimidines i alguns dels grups funcionals introduïts en cadascuna d'elles.

Altres posicions de les pirimidines susceptibles a ser modificades són O-2, N-4 i O-4. En molècules de tRNA es poden trobar 2-tio- i 4-tiopirimidines. Pel que fa al grup amino situat en C-4 de la citosina, un dels dos hidrògens participa en l'aparellament de Watson-Crick amb el carbonil en 6 de la guanina. L'altre H queda situat en el solc major i és un punt susceptible per a la introducció de modificacions en l'estructura de la citosina.

Un altre mètode d'estabilitzar els dúplexs d'oligonucleòtids consisteix en situar un grup funcional carregat positivament tant en el solc major com en el menor, on pugui interaccionar amb els fosfats, de manera que es redueixi la repulsió electrostàtica entre les cadenes. La magnitud de l'estabilització depèn de la posició del catió i de si la formació de la sal es dona dins de la mateixa cadena o amb la cadena complementària.

Els heterocicles bicíclics i tricíclics també poden estabilitzar les estructures dels dúplexs d'àcids nucleics a través de l'augment de les interaccions d'apilament que es donen en estendre el sistema aromàtic π de les pirimidines a partir del l'enllaç 4-5.

3.4.2. Modificacions en purines (Figura 14)

De tots els derivats de les purines, el nucleòsid més conegut és la desoxiinosina (Y en la figura 14), que ha estat anomenat nucleòsid universal ja que pot hibridar-se amb els quatre nucleòsids naturals. L'ordre d'estabilitat d'aquests parells és: YC>YA>YT>YG, tot i que en el cas de YT i YG, l'estabilitat depèn de la posició en la que es troben i del seu entorn. La xantosina (X en la figura 14) és una altre exemple habitual de modificacions del residu de guanina. A pH fisiològic l'ordre d'estabilitat dels parells formats amb les nucleobases naturals és: XT>XG>XA>XC. Altres exemples de modificacions en C-2 i C-6 de nucleòsids amb purines són: desoxiisoguanosina (1 en la figura 14), 2-azahipoxantosina (2 en la figura 14), 2-fluorhipoxantosina (3 en la figura 14), 2'-desoxiisoguanosina (4 en la figura 14), 2-amino-2'-desoxiadenosina (5 en la figura 14).

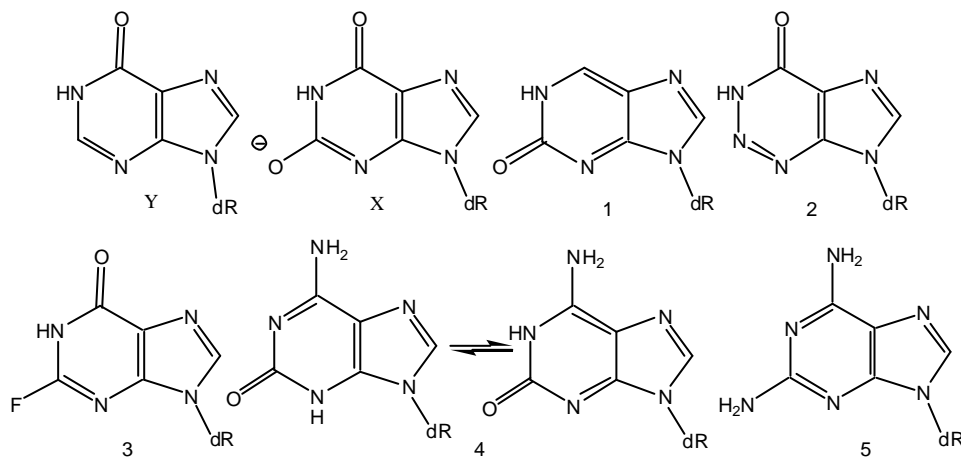


Figura 14. Exemples de modificacions en C-2 i C-6 de les purines

Les introduccions de grups electronegatius com amino, hidroxil, metoxi en el grup amino exocíclic tant de la citosina com de l'adenina provoquen un augment de la proporció de tautòmer imino. Els parells N⁶-metoxi-adenina:citosina i N⁶-metoxi-adenina:timina tenen la mateixa estabilitat, fet que suggereix l'existència d'un equilibri tautomèric imino-amino, i la citosina forma parells estables amb el tautòmer imino (Figura 15).

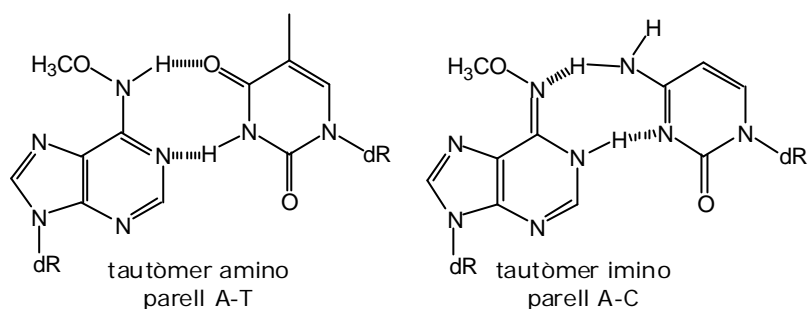


Figura 15. Parells de bases formats pels dos tautòmers de la N⁶-metoxi-adenina.

Les diferents substitucions assajades en C-8 (Figura 16) condueixen a nucleobases que s'hibriden a la base complementària rendint dúplexs de menor estabilitat que els naturals. En general, les funcionalitats oxigenades canvien el potencial electrostàtic de la molècula donant-li un caràcter més negatiu.

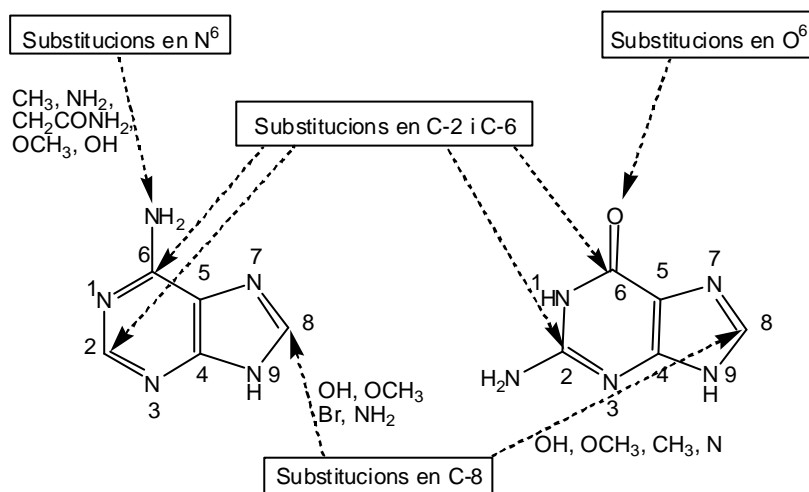


Figura 16. Posicions en les que habitualment es donen les substitucions en les purines i alguns dels grups funcionals introduïts en cadascuna d'elles.

Hi ha un altre grup important de derivats de les purines, amb un elevat nombre d'exemples, que són els deaza anàlegs. S'han preparat tant 7- com 3-deazapurines i els seus efectes sobre l'estabilitat dels dúplexs en els que participen són diversos.

3.5. Conjugats en 5' i en 3'²²

La conjugació en l'extrem 5' dels oligonucleòtids és particularment atractiva per que es pot aconseguir emprant els mètodes habituals de síntesi en fase sòlida sempre i quan el grup a unir pugui ser derivatitzat en forma de fosforamidit, H-fosfonat o fosfat (segons quina estratègia de síntesi se segueixi en l'obtenció dels oligonucleòtids) i sigui compatible amb les etapes de desprotecció i de desancoratge. A la bibliografia es poden trobar diversos exemples de conjugats en 5': agents intercalants, "cross-linkers", endonucleases artificials, conjugats a pèptids i transportadors lipofílics.

També hi ha exemples de conjugats en l'extrem 3' dels oligonucleòtids, en forma d'agents intercalants, conjugats amb enzims i amb pèptids.

3.6. Generacions d'oligonucleòtids antisentit

3.6.1. Primera generació

Els primers oligonucleòtids utilitzats com a agents antisentit van ser els fosforotioats. Això es deu a una sèrie de característiques que els feien molt atractius com són la seva facilitat de síntesi, una resistència a l'acció de les nucleases prou elevada com per a ser administrats per via parenteral, la capacitat d'activar la RNasa H quan es troben hibridats a l'RNA i una certa capacitat d'unió a proteïnes com per a poder ser absorbits i distribuïts en els teixits.

Però no totes les característiques dels oligonucleòtids fosforotioats són tan atractives. Entre els seus desavantatges es pot trobar una pèrdua d'afinitat per a l'RNA diana (al voltant de 0.8°C per cada unió nucleotídica), o la inhibició de la RNasa H quan l'oligonucleòtid es troba en una concentració elevada. També s'uneixen de manera no-específica a proteïnes, podent provocar efectes no desitjats i, des del punt de vista d'administració, cal destacar que es tracta de molècules que no travessen la barrera hemato-encefàlica i a més tenen una pobre biodisponibilitat oral.

3.6.2. Segona generació

Les característiques que es van intentar millorar amb la segona generació són la resistència a les nucleases, l'absorció cel·lular així com la modulació de la seva unió a proteïnes. D'entre les diferents posicions d'un nucleòsid sobre les que es pot introduir alguna modificació química, la posició 2' del carbohidrat és una de les més estudiades. D'entre les possibles modificacions en aquesta posició cal destacar els derivats 2'-O-alquils, 2'-O-alquils amb enllaços glicol-èter, 2'-F-ANA i 2'-O-aminoalquils (Figura 5).

Tot i que les modificacions en 2' milloren la capacitat d'unió i la resistència a les nucleases, no activen l'acció de la RNasa H. Això pot ser degut a que els dúplexs formats tenen més caràcter RNA-RNA que l'estructura RNA-DNA necessària per a provocar l'acció de la RNasa H.

Com que no activen la RNasa H, aquesta segona generació ha d'influir sobre altres processos associats amb l'RNA, com ara "l'splicing".

S'han descrit híbrids d'RNA i àcids arabinonucleics (ANA) (Figura 8) i àcids 2'-desoxi-2'-fluoro-D-arabinonucleics (2'-F-ANA) (Figura 5) que sí que activen la RNasa H. Els híbrids amb ANA presenten valors menors de T_M comparats amb els híbrids de control DNA/RNA, però els 2'-F-ANA tenen valors de T_M més elevats que els corresponents híbrids amb ANA, fosforotioats i DNA. L'explicació donada per a que aquests oligonucleòtids siguin substrats de la RNasa H és que aquests híbrids tenen una estructura similar a la del substrat natural DNA/RNA i, a més, el substituent a 2' (OH o F) es troba en el solc major de l'hèlix, en un lloc on no hauria d'interferir amb la unió i l'acció de la RNasa H. A més a més, aquests oligonucleòtids presenten major resistència a l'acció de les nucleases que no pas els oligonucleòtids fosfodiester, encara que menor que els fosforotioats.

La companyia farmacèutica ISIS Pharmaceuticals ha desenvolupat oligonucleòtids antisentit que s'agrupen en aquestes dues categories. Els fàrmacs anomenats de primera generació són oligonucleòtids fosforotioat, com és el cas de l'únic fàrmac aprovat

actualment que utilitza un mecanisme antisentit en el seu funcionament. Aquests compostos de la primera generació s'estan desenvolupant per al tractament de malalties inflamatòries, oncologia i hepatitis C. Els productes anomenats de segona generació són sobre tot 2'-O-metoxietiloligonucleòtids i actualment es troben en diverses etapes de desenvolupament per al tractament d'artritis reumatoide, psoriasis, diabetis, esclerosi múltiple i càncer de pròstata.

4. OBJECTIUS

Els objectius que es van plantejar en el present treball es poden dividir en dos grans blocs.

Per una banda es pretén millorar la resistència a l'acció de les nucleases dels oligonucleòtids amb una potencial activitat antisentit. És conegut que, d'aquest tipus d'enzims, les exonucleases són les que presenten una major activitat degradativa i per això es proposa com a primer objectiu (capítol 1) la síntesi d'oligonucleòtids cíclics amb unions fosfodiester, que no presenten extrems susceptibles de ser atacats per les exonucleases i l'avaluació de la seva activitat com a agents antisentit per a inhibir la dihidrofolat reductasa.

A més, per tal d'incorporar als oligonucleòtids cíclics també la resistència a les endonucleases es proposa com a objectiu addicional l'aplicació de la metodologia de síntesi a l'obtenció d'oligòmers cíclics amb enllaços internucleosídics de tipus fosforotioat.

La segona part del treball se centra en el camp de l'afinitat entre cadenes d'àcids nucleics, tant per apilament com mitjançant enllaços d'hidrogen. El tercer objectiu a desenvolupar consisteix en la síntesi d'unes nucleobases anàlogues de la citosina, amb modificacions que permetin augmentar el nombre d'enllaços d'hidrogen a formar amb la guanina (capítol 2).

Finalment, el darrer objectiu consisteix en incorporar aquestes abraçadores de guanina a un esquelet de PNA i estudiar l'efecte que tenen aquestes modificacions de l'esquelet i de la nucleobase en la seva hibridació amb DNA (capítol 3).

5. BIBLIOGRAFIA

¹ Praseuth, D.; Guieysse, A.L.; Hélène, C. **Triple helix formation as the antigene strategy for sequence-specific control of gene expression**, *Biochim. Biophys. Acta*, **1999**, *1489*, 181-206

² Opalinska, J.B.; Gewirtz, A.M. **Nucleic-acid therapeutics: basic principles and recent applications**, *Nature Reviews*, **2002**, *1*, 503-514

³ Cerchia, L.; Hamm, J.; Libri, D.; Tavitian, B.; de Franciscis, V. **Nucleic acid aptamers in cancer medicine**, *FEBS Lett.* **2002**, *528(1-3)*, 12-16

⁴ Tuschl, T. **RNA interference and small interfering RNAs**, *ChemBiochem*, **2001**, *2*, 239-245

⁵ Zamore, P.D. **RNA interference: listening to the sound of silence**, *Nature Structural Biology*, **2001**, *8(9)*, 746-750

⁶ Caplen, N.J. **A new approach to the inhibition of gene expressions**, *Trends Biotechnol.* **2002**, *20(2)*, 49-51

⁷ Schepers, U.; Kolter, T. **RNA interference: a new way to analyze protein function**, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40(13)*, 2437-2439

- ⁸ Paterson, B.M.; Roberts, B.E.; Kuff, E.L. **Structural gene identification and mapping by DNA-mRNA hybrid-arrested cell-free translation**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1977**, 74(10), 4370-4374
- ⁹ Zamecnik, P.C.; Stephenson, M.L. **Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1978**, 75(1), 280-284
- ¹⁰ Stephenson, M.L.; Zamecnik, P.C. **Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1978**, 75(1), 285-288
- ¹¹ Simons, R.W.; Kleckner, N. **Translational control of IS10 transposition**, *Cell*, **1983**, 34, 683-691
- ¹² Stein, C.A. **Antisense that comes naturally**, *Nature Biotechnol.* **2001**, 19, 737-738
- ¹³ Kvaerno, L.; Wengel, J. **Antisense molecules and furanose conformations—is it really that simple?**, *Chem. Commun.*, **2001**, 1419-1424
- ¹⁴ Galderisi, U.; Cascino, A.; Giordano, A. **Antisense oligonucleotides as therapeutic agents**, *J. Cell. Phys.* **1999**, 181, 251-257
- ¹⁵ Gewirtz, A.M.; Sokol, D.L.; Ratajczak, M.Z. **Nucleic acid therapeutics: state of the art and future prospects**, *Blood*, **1998**, 3, 712-736
- ¹⁶ Lawson, T.G.; Ray, B.K.; Dodds, J.T.; Grifo, J.A.; Abramson, R.D.; Merrick, W.C.; Betsch, D.F.; Weith, H.L.; Thach, R.E. **Influence of 5' proximal secondary structure on the translational efficiency of eukaryotic mRNAs and on their interaction with initiation factors**, *J. Biol. Chem.* **1986**, 261(30), 13979-13989
- ¹⁷ Häuptle, M.T.; Frank, R.; Dobberstein, B. **Translation arrest by oligodeoxynucleotides complementary to mRNA coding sequences yields polypeptides of predetermined length**, *Nucleic Acids Res.*, **1986**, 14(3), 1427-48
- ¹⁸ Wellen, C.; Lichtenstein, **What makes an mRNA anti-sensitive?**, *Trends Biochem. Sci.* **1993**, 18, 419-423
- ¹⁹ Liehaber, S.A.; Cash, F.E.; Shakin, S.H. **Translationally associated helix-destabilizing activity in rabbit reticulocyte lysate**, *J. Biol. Chem.* **1984**, 259(24), 15597-15602
- ²⁰ Minshull, J.; Hunt, T. **The use of single-stranded DNA and RNase H to promote quantitative 'hybrid arrest of translation' of mRNA/DNA hybrids in reticulocyte lysate cell-free translations**, *Nucleic Acids Res.* **1986**, 14(16), 6433-51
- ²¹ Zamaratscki, E.; Pradeepkumar, P.I.; Chattopadhyaya, J. **A critical survey of the structure-function of the antisense oligo/RNA heteroduplex as substrate for RNase H**, *J. Biochem. Biophys. Methods*, **2001**, 48, 189-208
- ²² Uhlmann, E.; Peyman, A. **Antisense oligonucleotides: a new therapeutic principle**, *Chem. Rev.* **1990**, 90(4), 543-584
- ²³ Kurreck, J. **Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications**, *Eur. J. Biochem.* **2003**, 270, 1628-1644
- ²⁴ Dove, A. **Antisense and sensibility**, *Nature Biotechnol.* **2002**, 20, 121-124
- ²⁵ Braasch, D.A.; Corey, D.R. **Novel antisense and peptide nucleic acid strategies for controlling gene expression**, *Biochemistry*, **2002**, 41(14), 4503-4510
- ²⁶ Leumann, C.L. **DNA analogues: from supramolecular principles to biological properties**, *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, 10, 841-854
- ²⁷ Tamm, I.; Dörken, B.; Hartmann, G. **Antisense therapy in oncology: new hope for an old idea?**, *The Lancet*, **2001**, 358, 489-497
- ²⁸ Stein, C.A.; Cheng, Y.-C. **Antisense oligonucleotides as therapeutic agents—is the bullet really magical?**, *Science*, **1993**, 261 (5124), 1004-1012
- ²⁹ Stein, C.A. **The experimental use of antisense oligonucleotides: a guide for the perplexed**, *J. Clin. Investigation*, **2001**, 108(5), 641-644
- ³⁰ Vaerman, J.L.; Moureau, P.; Deldime, F.; Lewalle, P.; Lammineur, C.; Morschhauser, F.; Martiat, P. **Antisense Oligodeoxyribonucleotides Suppress Hematologic Cell Growth Through Stepwise Release of Deoxyribonucleotides**, *Blood*, **1997**, 90, 331-339
- ³¹ Micklefield, J. **Backbone modifications of nucleic acids: synthesis, structure and therapeutic applications**, *Curr. Med. Chem.* **2001**, 8, 1157-1179

- ³² Thiviyathan, V.; Vyazovkina, K.V.; Gozansky, E.K.; Bichenchova, E.; Abramova, T. V.; Luxon, B.A.; Lebedev, A.V.; Gorenstein, D.G. **Structure of hybrid backbone methylphosphonate DNA heteroduplexes: effect of R and S stereochemistry**, *Biochemistry*, **2002**, *41*(3), 827-838
- ³³ Hamma, T.; Miller, P.S. **Synthesis of alternating oligo-2'-O-methylribonucleoside methylphosphonates and their interactions with HIV TAR RNA**, *Biochemistry*, **1999**, *38*, 15333-15342
- ³⁴ Levin, A.A. **A review of issues in the pharmacokinetics and toxicology of phosphorothioate antisense oligonucleotides**, *Biochim. Biophys. Acta*, **1999**, *1489*, 69-84
- ³⁵ Gryaznov, S.M. **Oligonucleotide N3'→P5' phosphoramidates as potential therapeutic agents**, *Biochim. Biophys. Acta*, **1999**, *1489*, 131-140
- ³⁶ Sergueeva, Z.A.; Sergueev, D.S.; Ribeiro, A.A.; Summers, J.S.; Shaw, B.R. **Individual isomers of dinucleoside boranophosphates as synthons for incorporation into oligonucleotids: synthesis and configurational assignment**, *Helv. Chim. Acta*, **2000**, *83*, 1377-1391
- ³⁷ Rait, V.; Sergueev, D.; Summers, J.; He, K.; Huang, F.; Krzyzanowska, B.; Shaw, B.R. **Boranophosphate nucleic acids- a versatile DNA backbone**, *Nucleosides & Nucleotides*, **1999**, *18*(6-7), 1379-1380
- ³⁸ Winqvist, A.; Strömberg, R. **Reactions of 3'-C-Halomethyl and 3'-C-sulfonylmethyl uridines with phosphinic acid derivatives - synthesis of building blocks for oligonucleotides containing 3'-C-methylenephosphonate linkages**, *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 1509-1515
- ³⁹ Robins, M.J.; Doboszewski, B.; Timoshchuk, V.A.; Peterson, M.A. **Glucose-derived 3'-(carboxymethyl)-3'-deoxyribonucleosides and 2'.3'-lactones as synthetic precursors for amide-linked oligonucleotide analogues**, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 2939-2945
- ⁴⁰ Halford, M.H.; Jones, A.S. **Synthetic analogs of polynucleotides**, *Nature*, **1968**, *217*, 638
- ⁴¹ Tittensor, J.R. **The preparation of nucleoside carbonates**, *J. Chem. Soc.* **1971**, *C*, 2656-2661
- ⁴² Gait, M.J.; Jones, A.S.; Jones, M.D.; Sheperd, M.J.; Walker, R.T. **Synthetic analogues of polynucleotides. Part 15. The synthesis and properties of poly(5'-amino-3'-O-carboxymethyl-2',5'-dideoxy-erythro-pentonucleosides) containing 3'(O)→5'(C) acetamidate linkages**, *J. Chem. Soc. Perkin Trans I*, **1979**, 1389-1394
- ⁴³ Prhavic, M.; Lesnik, E.A.; Mohan, V.; Manoharan, M. **2'-O-carbamate-containing oligonucleotides: synthesis and properties**, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 8777-8780
- ⁴⁴ De Mesmaeker, A.; Wendeborn, S.; Jouanno, C.; Fritsch, V.; Wolf, R.M. **Amide backbone modifications for antisense oligonucleotides carrying potential intercalating substituents: influence on the thermodynamic stability of the corresponding duplexes with RNA- and DNA- complements**, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*(14), 1869-1874
- ⁴⁵ Morvan, F.; Sanghvi, Y.S.; Perbost, M.; Vasseur, J.J.; Bellon, L. **Oligonucleotide mimics for antisense therapeutics: solution phase and automated solid-support synthesis of MMI linked oligomers**, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 255-256
- ⁴⁶ Yang, X.; Han, X.; Cross, C.; Bare, S.; Sanghvi, S.Y.; Gao, X. **NMR structure of an antisense DNA-RNA hybrid duplex containing a 3'-CH₂N(CH₃)-O-5' or an MMI backbone linker**, *Biochemistry*, **1999**, *38*, 12586-12596
- ⁴⁷ Cross, C.W.; Rice, J.S.; Gao, X. **Solution structure of an RNA-DNA hybrid duplex containing a 3'-thioformacetal linker and an RNA A-tract**, *Biochemistry*, **1997**, *36*, 4096-4107
- ⁴⁸ Linkletter, B.A.; Brice, T.C. **Solid-phase synthesis of positively charged deoxynucleic guanine (DNG) modified oligonucleotides containing neutral urea linkages: effect of charge deletions on binding and fidelity**, *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*(8), 1893-1902
- ⁴⁹ Challa, H.; Bruice, T.C. **Incorporation of positively charged deoxynucleic S-methylthio-urea linkages into oligodeoxyribonucleotides**, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2001**, *11*(18), 2423-2427

- ⁵⁰ Fettes, K.J.; Howard, N.; Huckman, D.T.; Adah, S.; Player, M.R.; Torrence, P.F.; Micklefied, J. **Synthesis and nucleic-acid-binding properties of sulfamide- and 3'-N-sulfamate-modified DNA**, *J. Chem. Soc. Perkins Trans I*, **2002**, 485-495
- ⁵¹ Manoharan, M. **2'-carbohydrate modifications in antisense oligonucleotide therapy: importance of conformation, configuration and conjugation**, *Bioch. Biophys. Acta*, **1999**, 1489, 117-130
- ⁵² Braasch, D.A.; Corey, D.R. **Locked nucleic acid (LNA): fine-tuning the recognition of DNA and RNA**, *Chemistry & Biology*, **2001**, 8, 1-7
- ⁵³ Kurreck, J.; Wyszko, E.; Gillen, C.; Erdmann, V.A. **Design of antisense oligonucleotides stabilized by locked nucleic acids**, *Nucleic Acids Res.* **2002**, 30(9), 1911-1918
- ⁵⁴ Sorensen, M.D.; Kvaernom, L.; Bryld, T.; Hakansson, A.E.; Verbeure, B.; Gaubert, G.; Herdewijn, P.; Wengel, J. **a-L-ribo-configured locked nucleic acid (a-L-LNA): synthesis and properties**, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 124(10), 2164-2176
- ⁵⁵ Beier, M.; Reck, F.; Wagner, T.; Krishnamurthy, R.; Eschenmoser, A. **Chemical etiology of nucleic acid structure: comparing pentopyranosyl-(2'→4') oligonucleotides with RNA**, *Science*, **1999**, 283, 699-703
- ⁵⁶ Renneberg, D.; Boullong, E.; Reber, U.; Schümperli, D.; Leumann, C.J. **Antisense properties of tricyclo-DNA**, *Nucleic Acids Res.* **2002**, 30(13), 2751-2757
- ⁵⁷ Allart, B.; Khan, K.; Rosemeyer, H.; Shepers, G.; Hendrix, C.; Rothenbacher, K.; Seela, F.; Van Aerschot, A.; Herdewijn, P. **D-Altritol nucleic acids (ANA): Hybridisation properties, stability, and initial structural analysis**, *Chem. Eur. J.* **1999**, 5(8), 2424-2431
- ⁵⁸ Verbeure, B.; Lescrier, E.; Wang, J.; Herdewijn, P. **RNase H mediated cleavage of RNA by cyclohexene nucleic acid (CeNA)**, *Nucleic Acids Res.* **2001**, 29(24), 4941-4947
- ⁵⁹ Wang, J.; Verbeure, B.; Luyten, I.; Lescrier, E.; Froeyen, M.; Hendrix, C.; Roesmeyer, H.; Seela, F.; Van Aerschot, A.; Herdewijn, P.; **Cyclohexene nucleic acids (CeNA): Serum stable oligonucleotides that activate RNase H and increase duplex stability with complementary RNA**, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 8595-8602
- ⁶⁰ Schöning, K-U.; Scholz, P.; Guntha, S.; Wu, X.; Krishnamurthy, R.; Eschenmoser, A. **Chemical etiology of nucleic acid structure: the a-threofuranosil-(3'→2') oligonucleotide system**, *Science*, **2000**, 290, 1347-1351
- ⁶¹ Reck, F.; Wippo, H.; Kudick, R.; Bolli, M.; Ceulemans, G.; Krishnamurthy, R.; Eschenmoser, A. **L-a-lyxopyranosil (4'→3') oligonucleotides: a base-pairing system containing a shortened backbone**, *Org. Lett.* **1999**, 1(10), 1531-1534
- ⁶² Groebke, K.; Hunziker, J.; Fraser, W.; Peng, L.; Diederichsen, U.; Zimmermann, K.; Holzner, A.; Leumann, C.; Eschenmoser, A. **Warum Pentose- und nicht Hexose-Nucleinsäure? Teil V. (Purin-Purin)-Basenpaarung in der homo-DNS-Reihe: Guanin, Isoguanin, 2,6-Diaminopurin und Xanthin**, *Helv. Chim. Acta*, **1998**, 81, 375-448
- ⁶³ Summerton, J. **Morpholino antisense oligomers: the case for an RNase H-independent structural type**, *Biochim. Biophys. Acta*, **1999**, 1489, 141-158
- ⁶⁴ Pitha, J. **Physiological activities of synthetic analogs of polynucleotides**, *Adv. Poly. Sci.* **1983**, 50, 1-16
- ⁶⁵ Herdewijn, P. **Heterocyclic modifications of oligonucleotides and antisense technology**, *Antisense Nuclear Acid Drug Development*, **2000**, 10, 297-310
- ⁶⁶ Luyten, I.; Herdewijn, P. **Hybridization properties of base-modified oligonucleotides within the double and triple helix motif**, *Eur. J. Med. Chem.* **1998**, 33, 515-576

CAPÍTOL 1: OLIGONUCLEÒTIDS CÍCLICS

1. INTRODUCCIÓ

1.1 Objectius

La dihidrofolat reductasa (DHFR) és un enzim amb una importància crucial per a la proliferació de les cèl·lules. Participa en la síntesi de purines i, per tant, és necessari per a la replicació del DNA. Això fa que aquest enzim constitueixi una bona diana en teràpia cancerosa incloent la utilització d'oligonucleòtids antisentit.

A la bibliografia¹ es troben descrits experiments per a provar la hipòtesi de que la traducció del mRNA que codifica per a la DHFR humana pot ser inhibida *in vitro* tant per RNA antisentit com per oligodesoxinucleòtids antisentit. A partir d'aquests resultats, al grup del Dr. C. Ciudad del Departament de Bioquímica de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona van decidir utilitzar oligonucleòtids antisentit fosforotioats dirigits contra determinades seqüències de l'RNA que codifica per a DHFR en cèl·lules d'ovari de hamster xinès (CHO)².

El principal problema que presenten els oligonucleòtids lineals fosfodièsters a l'hora de ser utilitzats en teràpia antisentit és que no són estables a l'acció de les nucleases i són degradats un cop introduïts dins de les cèl·lules. Entre les nucleases, les que tenen més activitat són les 3'-exonucleases.

En el nostre grup de treball s'ha posat a punt un mètode de síntesi que permet l'obtenció d'oligonucleòtids cíclics. Els oligonucleòtids fosfodiester cíclics tenen dos avantatges respecte als lineals per a ser utilitzats com a oligonucleòtids antisentit. En primer lloc són resistents a les exonucleases i, en segon lloc, els cicles es poden unir de manera molt més forta a les seves dianes que les estructures lineals, sobretot en el cas dels tríplexs, degut a que l'estructura cíclica limita la seva llibertat conformacional³.

Per altra banda, els oligonucleòtids fosforotioats han tingut una gran importància com a agents antisentit degut a la seva elevada resistència a degradació enzimàtica per nucleases, però s'ha observat que a concentracions elevades generen efectes "no antisentit" que poden ser deguts, com a mínim en part, a l'habilitat de les molècules amb grups tioats per a unir-se a proteïnes cel·lulars i provocar efectes no desitjats en les cèl·lules⁴.

Al mateix temps que s'estaven realitzant els experiments d'aplicació dels oligonucleòtids antisentit a les cèl·lules de CHO va aparèixer a la bibliografia un treball del grup d'en Kool⁵ en el que utilitzaven oligonucleòtids fosfodiester circulars antisentit per a inhibir el creixement de cèl·lules leucèmiques. Es tracta de l'únic precedent descrit en el que s'aprofita la resistència a les exonucleases proporcionada pel caràcter circular dels oligòmers per a utilitzar oligonucleòtids cíclics com a agents antisentit. En els seus estudis van demostrar que hi havia especificitat de seqüència, utilitzant diferents oligonucleòtids com a control. A més, van observar que es donava activitat fins i tot a concentracions baixes d'oligonucleòtid. L'activitat antisentit del seu oligonucleòtid depèn de la concentració en la que es troba, essent més gran l'activitat com més elevada és la concentració d'oligonucleòtid.

Així doncs ens vam plantejar com a primer objectiu l'estudiar la possible utilització d'oligonucleòtids antisentit cíclics contra l'RNA per a la DHFR com a agents antitumorals i comparar la seva activitat respecte a oligonucleòtids lineals fosforotioats amb la mateixa seqüència oligonucleotídica.

Un segon objectiu va consistir en ampliar la resistència dels oligonucleòtids cíclics també a les endonucleases, sintetitzant oligonucleòtids cíclics fosforotioat.

1.2. Dihidrofolat reductasa (DHFR)

La DHFR (E.C. 1.5.1.3) és un enzim important en el metabolisme del folat, on catalitza la reducció del dihidrofolat a tetrahidrofolat, utilitzant NADPH com a cofactor. El tetrahidrofolat és necessari per a la síntesi de timidilat, purines, metionina i altres intermedis metabòlics. La inhibició de la DHFR té com a resultat el bloqueig de la síntesi de DNA i, per tant, la mort cel·lular.



Figura 1.1. DHFR: en vermell s'observa una molècula de folat, en blau un oxigen del grup fosfodiester del NADP⁺, en groc la part nicotinamida del NADP⁺ i en verd la part adenina del NADP⁺

El tetrahidrofolat és un co-factor en diferents reaccions de transferència d'unitats de C₁ en diferents estats d'oxidació. La serina és una gran font de grups metil en una reacció catalitzada per la serina hidroximetil transferasa, que la converteix en glicina i uneix covalentment la unitat C1 al N(5) i/o al N(10) del tetrahidrofolat, rendint N⁵,N¹⁰-metilè-tetrahidrofolat. Aquest, per una banda, participa en la síntesi de novo de purines i, per una altra banda, és substrat de la timidilat sintasa (que catalitza la conversió de desoxiuridilat (dUMP) a timidilat (TMP)) que l'oxida a dihidrofolat (Figura 1.2).

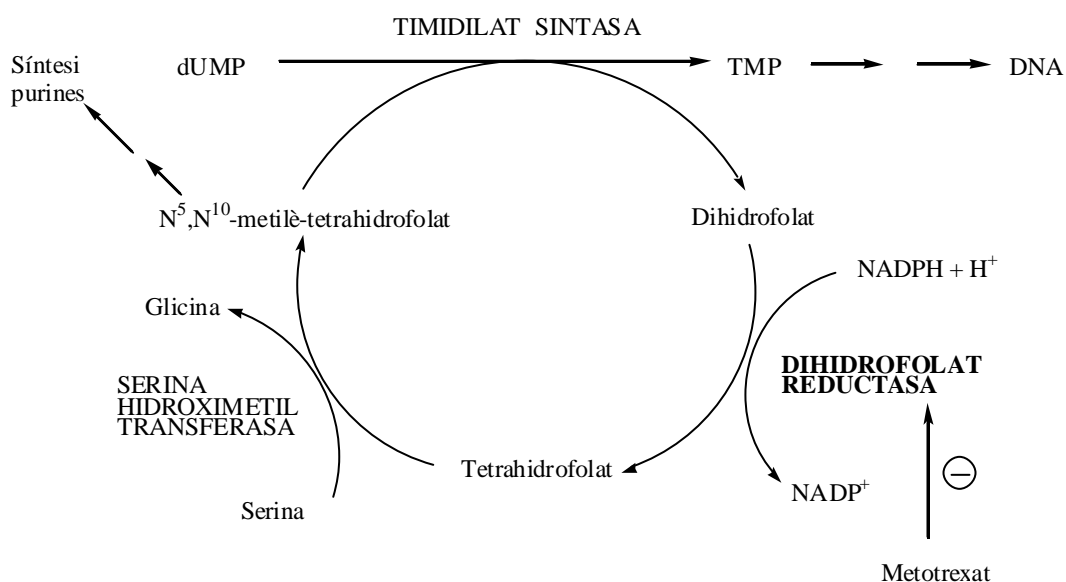


Figura 1.2. Participació de la dihidrofolat reductasa en la síntesi de DNA, a través de la regulació de l'acció de la timidilat sintasa.

El metotrexat (MTX) o ametopteridina, és un anàleg estructural del dihidrofolat i actua com a inhibidor competitiu de la DHFR ($K_i < 10^{-9}$ M). La inhibició de la DHFR té com

a resultat la disminució de les reserves cel·lulars de tetrahidrofolat, ja que aquest és consumit en la reacció catalitzada per a timidilat sintasa. Així, s'inhibeix la síntesi de timidilat, que és un dels precursors del DNA. Les cèl·lules en fase replicativa tenen una necessitat superior d'activitat DHFR que les cèl·lules en estat quiescent⁶. Degut a això, la DHFR és una diana adequada en el tractament de condicions hiperproliferatives com la neoplàsia. Actualment, el MTX s'utilitza en afeccions tumorals com coriocarcinomes, carcinomes de mama i leucèmies limfocítiques agudes^{7,8}. La utilització de MTX presenta el mateix problema que altres tractaments quimioterapèutics, i és que després de diverses administracions s'arriba a desenvolupar resistència a la droga.

1.3. Liposomes

Per tal que els oligonucleòtids antisentit puguin desenvolupar al seva funció és necessari que entrin dins de la cèl·lula. Però la seva naturalesa polianiónica fa que el pas a través de membranes cel·lulars sigui difícil i això limita la seva acció. Per a solucionar aquest problema s'han utilitzat diversos mètodes com a vehicles d'introducció dels oligonucleòtids dins de les cèl·lules.

Tradicionalment els mètodes d'introducció i distribució de DNA en les cèl·lules s'han classificat en sistemes mitjançant vectors virals⁹ i sistemes mitjançant vectors no virals. Els vector virals (com adenovirus o retrovirus) presenten avantatges degut a la seva gran eficiència de transfecció i a l'ampli ventall de cèl·lules que són potencialment transduïbles, però també tenen problemes importants per que poden generar resposta immunitària i existeix la possibilitat de recombinació gènica en insertar-se un gen extern en el genoma de l'hoste^{10,11}. Degut a això, els liposomes poden constituir una alternativa vàlida als vectors virals^{12,13}. A més, amb els immunoliposomes es pot incrementar la selectivitat cap a cèl·lules tumorals específiques.

Hi ha diferents classificacions dels mètodes d'introducció d'oligonucleòtids dins de les cèl·lules mitjançant vectors no virals. Per una banda¹⁴ es poden fer tres grups, que són: mètodes de transferència directes, transferència mitjançant transportadors i mètodes de permeabilització de la membrana plasmàtica. D'entre els mètodes directes hi ha la microinjecció¹⁵. Alguns exemples de transportadors són: proteïnes¹⁶, lípids¹⁷, i dendrímers¹⁸. El tercer mètode de transport utilitza detergents, toxines formadores de porus, radiació làser¹⁹ o polsos elèctrics²⁰ per a permeabilitzar la membrana plasmàtica per formació de porus.

Els primers estudis clínics amb oligonucleòtids utilitzaven injeccions locals per a assolir concentracions terapèutiques en el lloc d'actuació del fàrmac¹⁵. En estudis més recents, els oligonucleòtids s'han administrat mitjançant injeccions subcutànies, però les limitacions pràctiques d'aquesta tècnica han fet que es busquin altres mètodes més convenients per a la introducció i distribució d'oligonucleòtids en les cèl·lules. Entre d'altres tècniques es troba l'ús de formulacions tòpiques, aerosols d'oligonucleòtids. Una possibilitat molt atractiva és la distribució oral, que ja ha estat utilitzada per a oligonucleòtids.

Una de les tècniques més utilitzades en la introducció i distribució d'oligonucleòtids en cèl·lules consisteix en l'ús de liposomes. Els liposomes es poden definir com a vesícules compostes d'una o varies capes de fosfolípids que envolten un

compartiment aquós. Tenen una mida variable que oscil·la entre 0,025 i 20 μm . Van ser descrits per primera vegada per Bangham al 1965²¹ i des d'aleshores s'han utilitzat àmpliament com a agents de transport, tant per a fàrmacs²² com per a àcids nuclèics.

Segons la seva composició els liposomes poden classificar-se com a neutres, amb càrrega (aniònics o catiònics), sensibles al pH, o estabilitzats estèricament. També es poden diferenciar en funció de la seva mida i del nombre de bicapes que presenten.

Dels diferents tipus de liposomes, els lípids catiònics representen un dels transportadors més efectius d'oligonucleòtids *in vitro*.

1.3.1. Liposomes catiònics

Els liposomes catiònics són els més utilitzats per tal de transfectar àcids nuclèics, ja que formen complexos amb el DNA, que està carregat negativament. Van ser desenvolupats per primer cop per Felgner al 1987¹⁷. A més de participar en el transport dels oligonucleòtids, s'ha vist que aquests liposomes catiònics incrementen la vida mitja dels oligonucleòtids en cultius cel·lulars²⁴.

En l'estructura dels lípids catiònics hi ha tres parts ben diferenciades: una part hidrofòbica, un connector i un grup de cap²⁵ (Figura 1.3). La part hidrofòbica està formada per hidrocarburs de cadena senzilla, de doble cadena o derivats del colesterol. La majoria dels liposomes catiònics presenten hidrocarburs de doble cadena (per exemple dioleòiloxi en DOTAP i DOTMA). El connector es troba entre les cues hidrofòbiques i el grup de cap, que sol ser l'esquelet de 3 carbonis de la molècula de glicerol. El grup de cap és on es troben les càrregues positives de la molècula, pot ser monovalent (amoni terciari o quaternari) o multivalent (lipopoliamines).

Fins al moment s'han sintetitzat diversos lípids catiònics amb l'objectiu de trobar un que tingui una elevada activitat de transfecció i baixa toxicitat²⁶. Des de que Felgner va introduir el primer agent liposòmic, no s'ha trobat un millor liposoma com a agent transportador de gens²⁷.

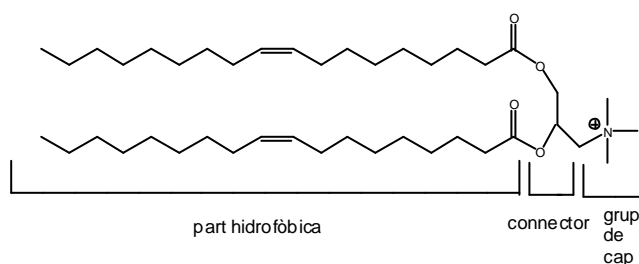


Figura 1.3. Estructura típica d'un lípid catiònic (DOTAP)

Els complexos entre els liposomes catiònics i el DNA s'anomenen lipoplexes. S'han observat diferents tipus d'estructures de lipoplex i la discussió sobre quina és la més efectiva encara no ha arribat a resultats concloents^{28,29}. No ha estat possible predir els resultats d'una lipofecció a partir de dades biofísiques dels liposomes i dels seus respectius lipoplexes, perquè hi ha una gran varietat de paràmetres que influeixen i que no només depenen dels lípids i de la formació del lipoplex sinó també dels plasmidis i de les línies cel·lulars entre d'altres²⁸.

La formulació d'un lípid catiònic normalment necessita d'altres components addicionals (lípid-ajudants) per tal d'augmentar la seva capacitat de transfecció tant *in vitro* com *in vivo*. La presència d'aquests lípids neutres (normalment DOPE o colesterol) fa augmentar substancialment la fluïdesa de la membrana i facilita la penetració del material genètic dins de la cèl·lula²⁹.

1.3.2. Mecanisme

El mecanisme pel qual els lipoplexes entren en les cèl·lules ha estat objecte de molts estudis i encara no es coneix amb seguretat absoluta. La majoria dels resultats obtinguts han estat per "assaig i error".

Les etapes del procés de distribució dels oligonucleòtids mitjançant liposomes catiònics, *in vitro*, inclouen la formació dels complexos oligonucleòtid-lípid catiònic, la seva entrada dins de la cèl·lula, la distribució intracel·lular i l'alliberament citoplasmàtic dels oligonucleòtids (Figura 1.4). El transport dels oligonucleòtids per part de lípids catiònics es basa en la interacció electrostàtica entre les càrregues negatives dels oligonucleòtids i les càrregues positives dels lípids.

Inicialment es pensava que l'entrada dels complexos oligonucleòtid-liposoma dins de la cèl·lula era per fusió amb la membrana cel·lular²³. Actualment el mecanisme més acceptat d'entrada dels lipoplexes en la cèl·lula és per endocitosi més que no pas per fusió amb la membrana plasmàtica³⁰. Malgrat tot, no es pot descartar la possibilitat que alguns complexos puguin desestabilitzar i/o fusionar-se directament amb la membrana plasmàtica, però sembla que aquest procés és menys freqüent que l'entrada per la ruta endocitòtica²³.

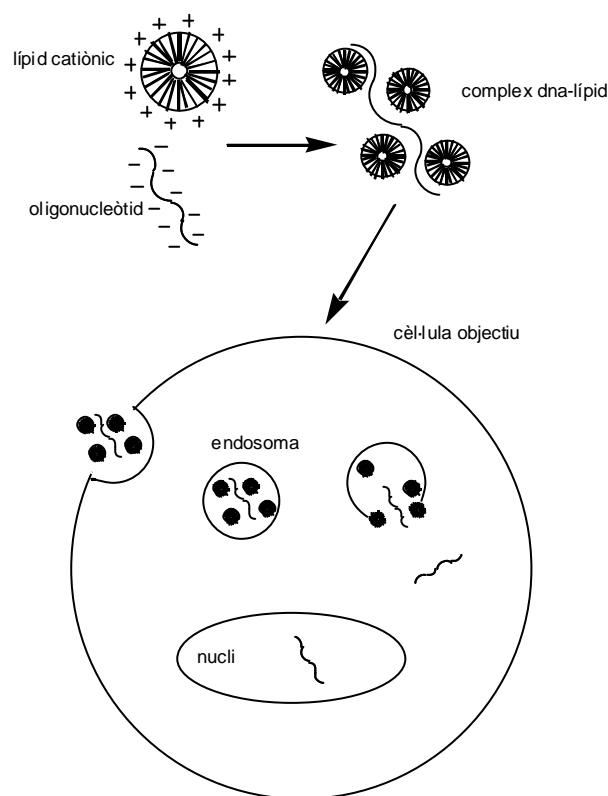


Figura 1.4. Representació dels mecanisme d'introducció i distribució dels oligonucleòtids antisentit dins les cèl·lules per part dels liposomes catiònics

Un cop dins de la cèl·lula els oligonucleòtids s'han de dissociar dels complexos per tal de funcionar²⁷. Es creu que hi ha una desestabilització de la membrana endosomal que resulta en un "flip-flop" de lípids aniònics que difonen lateralment dins el complex i (formant un parell iònic neutre amb el lípid catiònic) desplacen els oligonucleòtids del lípid catiònic de manera que resulten alliberats al citoplasma.

Actualment es realitzen diversos assaigs clínics que utilitzen liposomes com a transportadors d'agents quimioterapèutics com el cisplati³¹. També s'està estudiant la incorporació de taxol en liposomes³². A més, s'han realitzat assaigs clínics amb complexos de DNA i liposomes catiònics com en el cas de melanomes metastàsics³³ i de fibrosi quística³⁴.

2. OLIGONUCLEÒTIDS CÍCLICS

2.1. Descripció del mètode de síntesi

Els primers intents de síntesi d'oligonucleòtids cíclics en solució³⁵ i en fase sòlida³⁶ es van realitzar aplicant el mètode del fosfat triester³⁷ (reaccionen derivats fosfat diester dels nucleòsids amb l'hidroxil 5'-terminal de la cadena en creixement). En aquest mètode les síntesis són lentes i els rendiments no són quantitius. També s'han descrit estratègies de síntesi d'oligonucleòtids cíclics de 2-4 nucleòtids fent ús de la química de H-fosfonat^{38,39}.

Una gran millora va ser la utilització del mètode del fosfit triester⁴⁰ i suports sòlids per a elongar la cadena⁴¹. Aquest mètode fa servir derivats fosforamidit dels nucleòsids que són molt reactius i permeten acoblaments ràpids i quantitius. La primera síntesi utilitzant aquest mètode va ser descrita pel grup de DeNapoli^{42,43} i es basa en ancorar l'oligonucleòtid al polímer a través del grup amino exocíclic de la citosina. Aquest mètode, però, presenta dos inconvenients importants. Per una banda, l'ancoratge al suport polimèric es realitza a través d'una citosina, això implica un requisit seqüencial. A més, totes les cadenes (lineals i cícliques) presenten el mateix tipus d'unió al suport polimèric, de manera que després de desancorar s'obtenen barreges de molts productes, dificultant força l'aïllament del producte cíclic buscat.

Per a sintetitzar oligonucleòtids cíclics més grans s'han desenvolupat estratègies de síntesi en les que l'elongació té lloc en fase sòlida i la ciclació de l'oligonucleòtid protegit és en solució utilitzant un oligonucleòtid de seqüència complementària als dos extrems de la cadena a ciclitzar com a motlle per a aproximar els grups que han de reaccionar. Existeixen diferents estratègies per a dissenyar el motlle. Aquest pot ser intern⁴⁴ o pot ser extern per formació de dúplex⁴⁵ o de triplex^{3,46} (Figura 1.5). La ciclació pot ser per reacció química^{47,48} o enzimàtica⁴⁹.

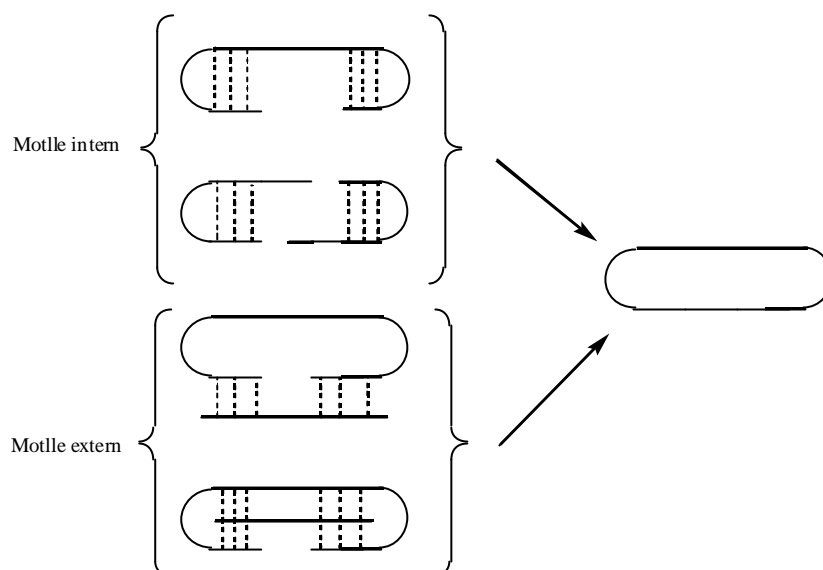


Figura 1.5. Exemples de motlles utilitzats en la ciclació d'oligonucleòtids

Al nostre grup s'ha desenvolupat un altre mètode de síntesi d'oligonucleòtids cíclics en fase sòlida⁵⁰. Presenta una sèrie de característiques que el fan molt atractiu per a sintetitzar oligonucleòtids cíclics de mida petita o mitjana. S'utilitza metodologia de síntesi en fase sòlida i el mètode del fosfit trièster per a elongar la cadena, per això es poden emprar derivats nucleosídics comercials. No té limitacions en el contingut de nucleobases i es pot sintetitzar qualsevol seqüència cíclica.

La ciclació es realitza quan l'oligonucleòtid encara està unit al suport sòlid, això permet tenir condicions semblants a les d'alta dilució que dificulten en gran mesura les reaccions intermoleculares. Una característica fonamental d'aquest mètode de síntesi és el mecanisme de la reacció de desanclatge, ja que és selectiva per a seqüències cícliques i queden ancorats a resina els productes lineals i els possibles productes de reaccions intermoleculares (Figura 1.6).

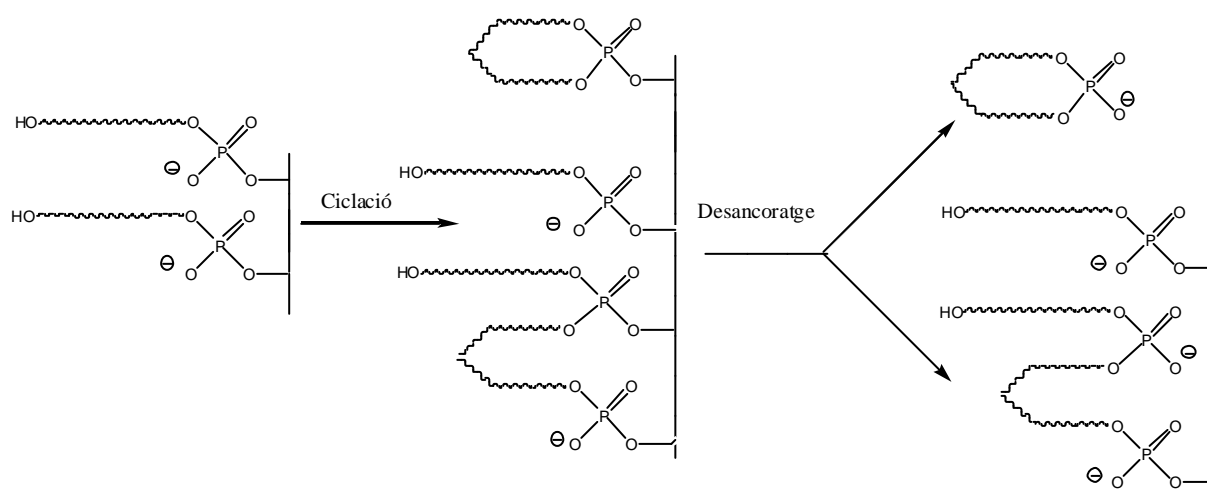


Figura 1.6. Selectivitat de l'etapa de desanclatge de les diferents cadenes d'oligonucleotídiques obtingudes en la ciclació sobre suport sòlid.

2.2. Síntesi dels oligonucleòtids cíclics

La utilització d'oligonucleòtids antisentit sobre la DHFR havia estat estudiada anteriorment² amb oligonucleòtids fosforotioats lineals. Com a alternativa a aquest tipus d'oligonucleòtids es va decidir estudiar l'activitat d'oligonucleòtids cíclics fosfodiester i comparar-la amb els resultats que s'havien obtingut prèviament, per tal d'analitzar la influència del caràcter cíclic en l'activitat antisentit d'aquests oligòmers. De totes les seqüències estudiades els millors resultats s'havien obtingut amb els oligonucleòtids 5'-GTTTCAGCGGTCGAACCAT-3' (ATNL) i 5'-GGACACGGCGACGATGCA-3' (DTNL) que actuen contra la zona d'inici de la traducció de la DHFR. L'ATNL s'hibrida a partir del codó d'inici de la traducció i el DTNL als 18 nucleòtids següents a la zona d'hibridació de l'ATNL. Per això, en primer lloc es van sintetitzar dos oligonucleòtids cíclics fosfodiester amb les mateixes seqüències que ATNL i DTNL anomenats cATNL i cDTNL i es van s'assajar sobre les cèl·lules de CHO. A partir dels resultats obtinguts es va decidir sintetitzar oligonucleòtids més curts per a estudiar l'efecte de la longitud sobre l'activitat. Es va escollir com a seqüència l'oligonucleòtid complementari als primers 12 nucleòtids des del codó d'inici, aquest inclòs. Per això se sintetitzen dos oligonucleòtids 12-mers de seqüència 5'-CGGTCTGAACCAT-3', un d'ells és lineal fosforotioat (12PS) mentre que l'altre és cíclic fosfodiester (c12PO).

2.2.1. Síntesi de la nucleotidil-resina

El mètode de síntesi comença ancorant el nucleòtid 3'-terminal a la resina a través d'un compost bifuncional, l'àcid 3-cloro-4-hidroxifenilacètic, el qual actua simultàniament com a punt d'unió a la resina i com a protector permanent del fosfat de l'extrem 3'-terminal.

La resina utilitzada per a sintetitzar els diferents oligonucleòtids cíclics és un copolímer de polietilenglicol i poliestirè (TentaGel), funcionalitzat amb grups amino amb un grau de substitució inicial al voltant de 240 $\mu\text{mol/g}$ resina. Es va derivatitzar amb l'espaiador àcid 6-aminohexanòic (Figura 1.7), per tal d'augmentar la flexibilitat de la resina i separar l'extrem 3'-terminal de l'oligonucleòtid de la resina, de manera que l'impediment estèric durant les etapes de ciclació i desancoratge sigui menor. Aquesta etapa es va realitzar en presència de quantitats equimolars de diciclohexilcarbodiimida (DCC) i 1-hidroxibenzotriazole (HOBt) durant 5 hores. Es va calcular la funcionalització de la resina a partir del nombre de grups Fmoc ancorats i el resultat va ser de 220 $\mu\text{mol/g}$ resina. A continuació es van acetilar els grups amino que quedaven lliures repetint el tractament amb anhídrid acètic i piridina fins que es va obtenir un resultat negatiu en la prova de ninhidrina (el que indicava l'absència de grups amino lliures). Finalment es van desprotegir els grups amino, eliminant el Fmoc per tractament amb piperidina.

El primer nucleòsid que es va ancorar al suport polimèric es va introduir unit al compost bifuncional àcid 3-cloro-4-hidroxifenilacètic. L'àcid carboxílic d'aquest connector es protegeix en forma d'ester per a evitar possibles reaccions secundàries en la reacció de condensació amb el fosforamidit. El grup escollit, el 2,4,5-triclorofenil, fa de protector durant la reacció de condensació entre el "linker" i el nucleòsid i de bon grup sortint (triclorofenol) durant la reacció d'acoblament a la resina. La puresa del nucleotidil-

“linker” és un punt clau per a l'obtenció de nucleotidil-resines homogènies. Quan la impuresa present en el cru de reacció és la generada per la hidròlisi del fosforamidit (l'hidrogenfosfonat) es pot ancorar el nucleotidil-connector impur a la resina sense necessitat de purificació. Però quan el producte que es vol ancorar és el nucleotidil-connector impurificat amb connector no reaccionat, l'elongació posterior de la cadena nucleotídica pot tenir lloc també a través dels grups hidroxil fenòlics, obtenint-se finalment com a producte secundari un oligonucleòtid amb un defecte en el nombre de nucleòtids que és difícil de separar de l'oligonucleòtid objectiu.

Per tal de preparar aquest nucleotidil-espaiador, en primer lloc es va sintetitzar l'espaiador (l'àcid 3-cloro-4-hidroxifenilacètic) amb el grup àcid protegit com a triclorofenil ester (Figura 1.7). El producte es va obtenir per reacció entre l'àcid i el 2,4,5-triclorofenol en presència de DCC. Després de purificar per cromatografia en gel de sílice i precipitar el producte sobre hexà es va aconseguir obtenir l'espaiador protegit amb un rendiment del 32%. A continuació es va sintetitzar el nucleotidil-connector fent reaccionar el connector amb el fosforamidit de 5'-DMT-timidina (reactiu comercial) en presència de tetrazole, seguit d'una etapa d'oxidació del fosfit format a fosfat triester amb un excés d'hidroperòxid de *tert*-butil ($t\text{BuOOH}$).

En aquesta darrera etapa les condicions anhidres són fonamentals per a evitar la hidròlisi del fosforamidit. Degut a la inestabilitat del producte sintetitzat en contacte amb la sílice, que impossibilita l'aïllament del producte pur per cromatografia, la purificació del producte es va realitzar per precipitació sobre hexà i el rendiment obtingut és del 57%. Es va caracteritzar el sòlid obtingut per ^{31}P -RMN i es van observar els senyals corresponents al nucleotidil-linker (-7,96 ppm) i a impureses d'hidrogen fosfonat (7,27, 7,20 ppm). Les impureses d'hidrogen fosfonat no reaccionen amb els grups amino del suport polimèric de manera que no va ser necessari realitzar una nova purificació.

La següent etapa consisteix en la preparació de la nucleotidil-resina. Es va fer reaccionar la resina amb 4 equivalents de nucleotidil-espaiador en presència de quantitats equimolars de DCC i HOBt durant 18h. Es va determinar la funcionalització de la resina a partir dels grups DMT units a la resina. Es va obtenir una funcionalització al voltant de 100 $\mu\text{mol/g}$ en les diferents síntesis. Es van acetilar els grups amino lliures fins a obtenir resultat negatiu per assaig de ninhidrina. Es va desprotegir el fosfat de l'extrem 3', eliminant el grup cianoetil per tractament amb TEA en piridina i es va caracteritzar la nucleotidil-resina per ^{31}P -RMN (-4,3 ppm).

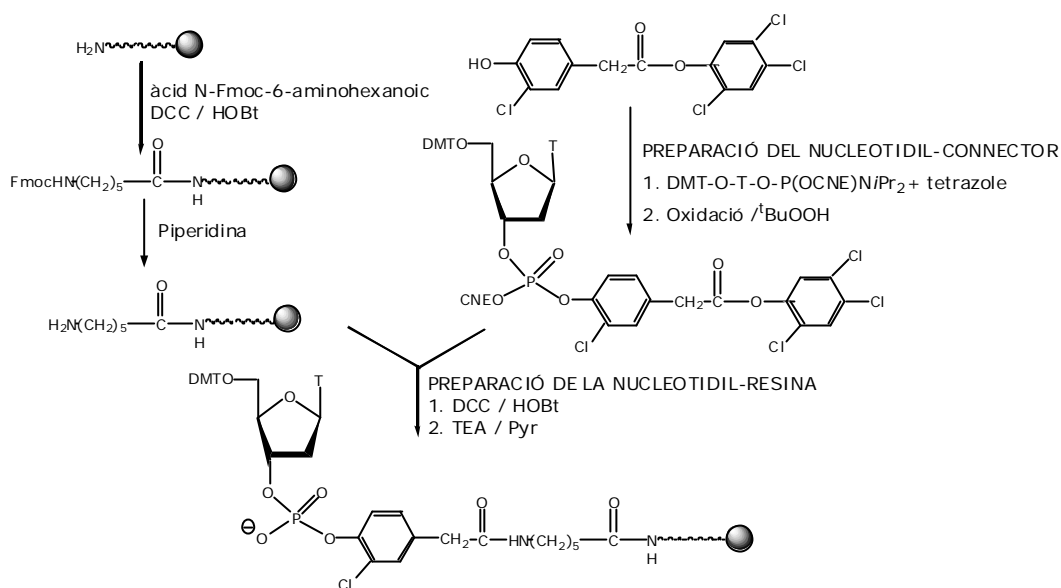


Figura 1.7. Preparació del nucleotidil-connector i ancoratge a la resina

2.2.2. Elongació de la cadena oligonucleotídica

Un cop unit el primer nucleòtid al suport es procedeix a l'elongació seqüencial de la cadena oligonucleotídica de la manera habitual (en un sintetitzador automàtic). Les seqüències lineals sintetitzades van ser 5'-TCAGCGGTCTGAACCATGT-3' per a cATNL i 5'-GCAGGACACGGCGACGAT-3' per a cDTNL. Es van emprar 3'-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidits de 5'-O-dimetoxitritil nucleòsids (T, C^{Bz}, A^{Bz}, G^{iBu}) comercials. El cicle sintètic d'elongació té les següents etapes: en primer lloc s'elimina, amb un tractament amb TCA, el grup protector 4,4-dimetoxitritil del grup hidroxil primari de l'extrem 5'-terminal de la cadena d'oligonucleòtid ancorat a resina. A continuació s'acobra un altre nucleòtid per reacció dels fosforamidit del nucleòsid amb el grup hidroxil lliure de l'extrem 5'-terminal, amb tetrazole com a catalitzador. Després s'acetilen els grups hidroxil que han quedat lliures i finalment s'oxida l'enllaç fosfit triester a fosfat triester.

En primer lloc es van sintetitzar els oligonucleòtids cATNL i cDTNL a escala petita. Els rendiments de les etapes d'acoblament es van determinar per quantificació espectrofotomètrica del catió tritil que s'allibera en cada etapa de desprotecció. A la següent taula es resumeixen els rendiments de la síntesi lineal:

	cATNL- petita	cDTNL- petita
Escala inicial (µmol)	1,9	2,2
Rdt global (%)	84	86,5
Rdt etapa (%)	98,9	99,1
Cadenes lineals completes (µmol)	1,59	1,90

Es va repetir la síntesi a escala més gran i dos cops per a cada oligonucleòtid:

	cATNL-1	cATNL-2	cDTNL-1	cDTNL-2
Escala inicial (μmol)	6,0	6,3	6,1	6,2
Rdt global (%)	83,9	88,8	92,1	86,5
Rdt etapa (%)	98,9	99,3	99,5	99,1
Cadenes lineals completes (μmol)	5,0	5,6	5,6	5,4

En les síntesis de l'oligonucleòtid 12-mer cíclic (c12), els rendiments de la síntesi del precursor lineal van ser:

	c12-1	c12-2
Escala inicial (μmol)	0,51	4,7
Rdt global (%)	86,6	78,3
Rdt etapa (%)	98,7	97,8
Cadenes lineals completes (μmol)	0,44	3,7

Com es pot observar, els rendiments de les etapes d'acoblament dels nucleòtids oscil·len entre el 98 i el 99%, sense grans diferències en les síntesis, de manera que el rendiment global depèn principalment de la longitud de la seqüència a sintetitzar.

2.2.3. Ciclació, desancoratge i desprotecció

Un cop completat el cicle d'elongació, es procedeix a l'etapa clau de la síntesi, que és la ciclació (Figura 1.8). Aquesta es dona per reacció entre el fosfat-dièster 3'-terminal i el grup hidroxil en 5' utilitzant com a reactiu activant el 1-mesitilensulfonil-3-nitro-1,2,4-triazol (MSNT) (25 equivalents) en piridina. La seqüència oligonucleotídica o la longitud de la cadena poden influir molt en la reacció. Com més llarga és la cadena més gran és la probabilitat de formació d'enllaços intercadena. Les condicions de reacció extremadament anhidres són fonamentals i es realitzen tractaments llargs i repetitius. El mecanisme proposat implica la formació d'un anhidrid mixte fosfòric-sulfònic (Figura 1.9). Aquest pot patir un atac nucleòfil per part del grup hidroxil de l'extrem 5' (ruta A) o bé reaccionar amb 3-nitro-1,2,4-triazole present en el medi portant a un fosfat activat que és atacat per l'hidroxil de l'extrem 5' (ruta B). El producte cíclic que es forma queda unit al suport polimèric mitjançant un enllaç fosfat-trièster.

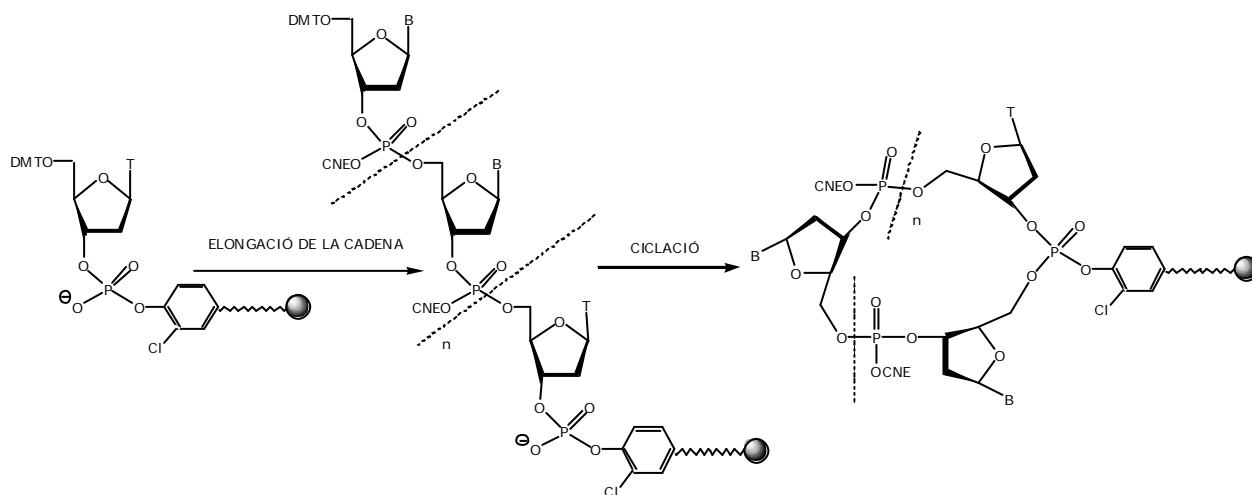


Figura 1.8. Esquema de les etapes d'elongació i ciclació de l'oligonucleòtid ancorat a resina

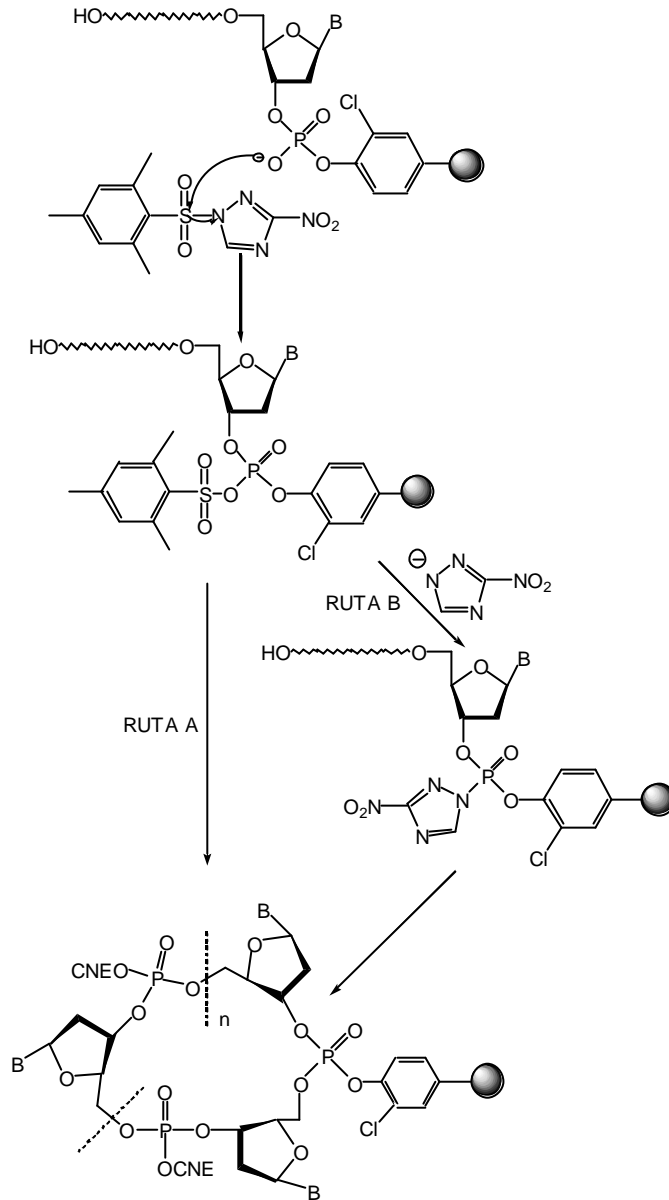


Figura 1.9. Possibles mecanismes de l'etapa de ciclació amb MSNT dels precursor lineals ancorats a resina

Després de la ciclació es desprotegeixen, mitjançant una reacció de β -eliminació, els fosfats de la cadena, que estaven protegits amb el grup CNE, per tractament amb TEA (Figura 1.10).

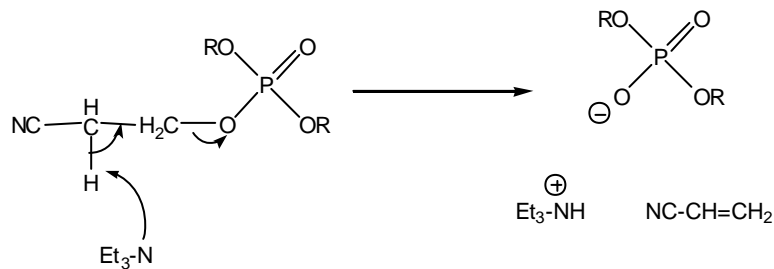


Figura 1.10. Mecanisme de d'eliminació del grup CNE dels fosfats de la cadena nucleotídica

L'oligonucleòtid cíclic s'escindeix de la resina, per tractament amb *syn*-piridin-2-aldoximat de tetrametilguanidini en dioxà/aigua, a través d'un atac nucleòfil sobre el fosfat triester corresponent seguit d'una reacció de β -eliminació (Figura 1.11). Els oligonucleòtids lineals no ciclats no es desancoren de la resina en les condicions en que ho fan els cíclics. Això és degut a que el fosfat triester de l'oligonucleòtid cíclic encorat és molt susceptible a l'atac amb oximat. En canvi, si l'oligonucleòtid no està ciclats, el fet de tenir una càrrega negativa sobre el fosfat diester dificulta l'atac nucleòfil de l'oximat sobre l'àtom de fòsfor i, per tant, el desancoratge de l'oligonucleòtid de la resina. Finalment un tractament amb NH_3 a 55°C durant 12 hores permet desprotegir les bases nitrogenades i s'obté l'oligonucleòtid cíclic totalment desprotegit.

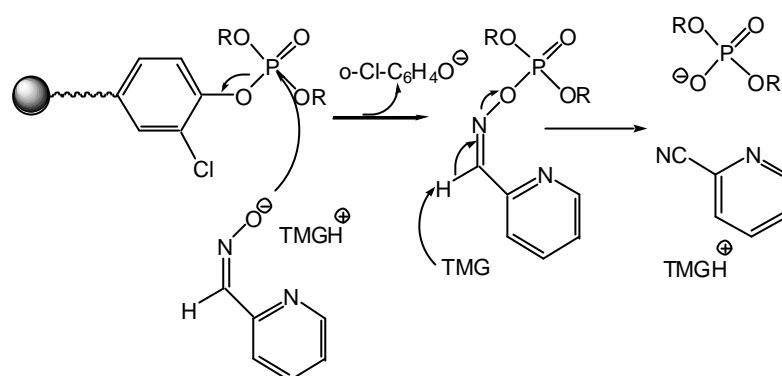


Figura 1.11. Mecanisme de desancoratge de l'oligonucleòtid cíclic del suport sòlid

La purificació dels oligonucleòtids sintetitzats té lloc en diverses etapes. En primer lloc s'eliminen l'oximat i altres impureses de baix pes molecular mitjançant una filtració molecular sobre Sephadex G-10. A continuació, es quantifica l'oligonucleòtid obtingut per mesura de l'absorbància a 260 nm i es calculen els rendiments de ciclació.

Les síntesis, tant a escala petita com a escala gran de cATNL i cDTNL, van donar els següents resultats per a les etapes de ciclació, desancoratge i desprotecció de les bases:

	cATNL- petita	cDTNL- petita	cATNL- 1	cATNL- 2	cDTNL- 1	cDTNL- 2
OD₂₆₀	14,7	22,2	66	62	103	71
μmol	0,085	0,12	0,38	0,36	0,55	0,38
μg	470	666	2112	1979	3088	2129
Rdt (c+d+d) (%)	4,5	6,0	7,6	6,4	9,8	7,0

On c+d+d és ciclació+desprotecció+desancoratge

En les síntesis de l'oligonucleòtid 12-mer (c12PO) els rendiments d'aquestes etapes es resumeixen a la següent taula:

	c12-1	c12-2
OD₂₆₀	19,3	66,1
μmol	0,17	0,57
μg	618	2115
Rdt (c+d+d) (%)	39	15

Els rendiments de les síntesis depenen tant de la seqüència i de la longitud de l'oligòmer a obtenir com de l'escala de treball. En general els rendiments per a cDTNL van ser lleugerament superiors als corresponents a cATNL i no es van observar diferències importants en canviar l'escala de síntesi. Comparant els resultats obtinguts per als 18-mer i per al dodecàmer es veu que la longitud de l'oligonucleòtid influeix en el rendiment, essent menor com més gran és la mida de l'oligòmer.

2.2.4. Anàlisi i purificació

Els oligonucleòtids 18-mer sintetitzats es van analitzar per HPLC en fase reversa (C18). Com es pot veure en els cromatogrames de la figura 1.12 A, aquesta tècnica no permet la purificació d'aquests oligonucleòtids. L'amplitud dels pics en els cromatogrames probablement es deu a la presència de fenòmens d'estructuració interna que fan que sigui difícil identificar els diferents components del cru i per tant aïllar el producte desitjat. Els intents de trobar unes condicions desnaturalitzants en les que poder analitzar per HPLC els crus de síntesi dels 18-mers cíclics tampoc no van donar resultats positius. Una anàlisi per electroforesi en gel de poliàcrilamida va mostrar els resultats de la figura 1.12 B. Es va realitzar una primera purificació mitjançant PAGE preparativa i es va obtenir un rendiment de purificació de només un 4%. Com que interessava millorar aquest rendiment es va plantejar la utilització de l'electroforesi però eliminant la presència de la urea del gel. Introduint aquesta variació en la composició del gel es va aconseguir millorar el rendiment de la purificació fins a un 25%. A més de canviar el rendiment de recuperació dels productes, també varia la seva mobilitat en el gel i és més gran que amb urea.

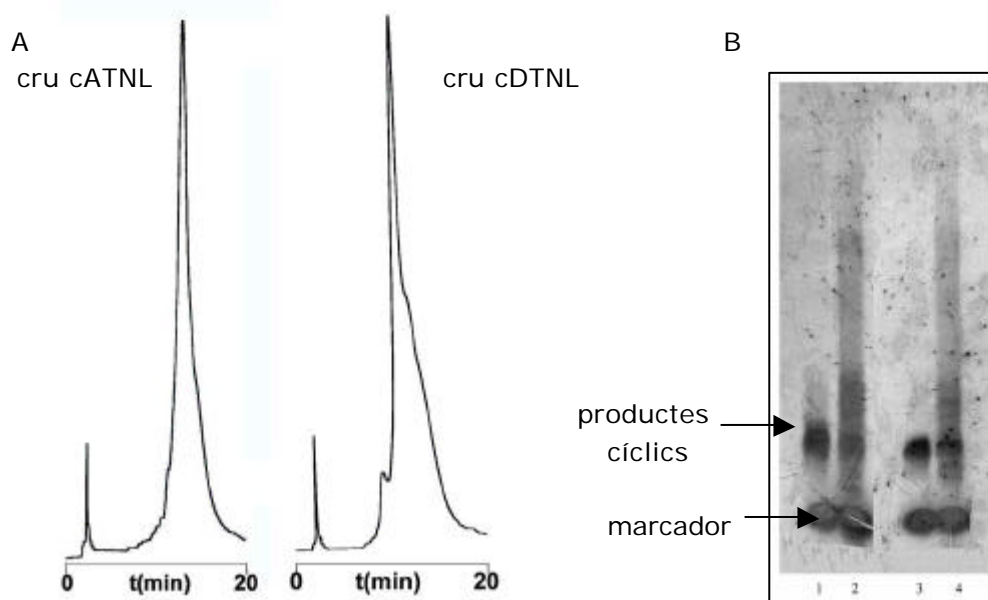


Figura 1.12. A: HPLC analític dels crus de cATNL i cDTNL, gradient: 10→40% en 20 min. B: PAGE analític amb urea. Carril 1: cATNL pur, Carril 2: cru de cATNL, Carril 3: cDTNL pur, Carril 4: cru de cDTNL. En tots els carrils s'observa amb la mobilitat més gran el senyal corresponent al marcador utilitzat com a referència (bromur de fenol, equivalent a un 6-mer lineal).

L'oligonucleòtid 12-mer cíclic (c12PO) sintetitzat es va analitzar per HPLC i, a partir del cromatograma obtingut (Figura 1.13), es va decidir utilitzar aquesta tècnica, a nivell semi-preparatiu, per a purificar el cru. El rendiment de la purificació va ser del 24% i es va obtenir un producte amb una puresa del 97%.

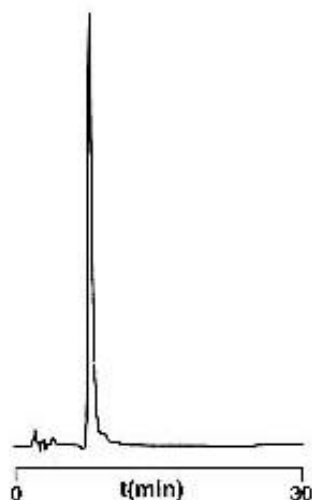


Figura 1.13. HPLC de c12PO purificat, gradient: 5→35% en 30 min

2.2.5. Caracterització

La caracterització d'oligonucleòtids cíclics de mida superior a 16 nucleòtids s'havia intentat en el grup per espectrometria de masses d'electrosprai amb resultats negatius. Com a alternativa a aquesta tècnica es va utilitzar l'espectrometria de masses d'ionització per desorpció amb làser assistida per matriu amb detecció per temps de vol (EM-MALDI-TOF).

Les matrius més utilitzades per a analitzar oligonucleòtids són l'àcid 3-hidroxiacetic (HPA)⁵¹ i la 2,4,6-trihidroxiacetofenona (THAP)⁵².

Per tal de solucionar els problemes derivats de la formació d'adductes catiónics s'han utilitzat diverses tècniques de dessalat⁵³. La primera que es va proposar consistia en la precipitació dels oligonucleòtids amb acetat amònic⁵⁴, però l'efectivitat d'aquesta precipitació es redueix a oligonucleòtids grans i normalment no permet un intercanvi complet dels cations alcalins per amoni. Una altra possibilitat és l'addició a la mostra de resines d'intercanvi iònic que substitueixen els cations alcalins dels oligonucleòtids per ions hidroni o amoni. Aquest mètode és extremadament efectiu per a l'anàlisi d'oligonucleòtids petits. Altres investigadors^{53,55} han proposat l'ús de co-matrius per tal de reduir el problema de les sals. Només aquelles co-matrius que poden co-cristal·litzar amb la barreja analit-matriu són efectives per a millorar la producció d'ions. L'addició de sals amòniques, com el citrat amònic (CA), millora l'estabilitat en fase gas dels ions desorbts pel làser ja que redueix la fragmentació. L'ús de bases orgàniques és un pas endavant i un mètode efectiu per a millorar l'anàlisi d'oligonucleòtids per MALDI. Aquestes bases, usades com a co-matrius, redueixen els adductes catiónics fins a nivells negligibles, fins i tot quan la mostra estava en una solució d'elevada concentració salina. Per a oligonucleòtids grans, aquestes co-matrius també milloren l'estabilitat dels ions en fase gas (ajustant el pH de la solució a valors que afavoreixin la desorpció/ionització pel làser, reduint la protonació de l'analit, ...).

Recentment, ha aparegut a la bibliografia l'ús de sucres com a co-matrius⁵⁶. Aquests sucres augmenten la ionització i/o redueixen la fragmentació dels ions formats. S'ha observat una millora en la resolució observada.

Després de diverses proves amb les matrius utilitzades habitualment per a caracteritzar oligonucleòtids, en cap cas es va aconseguir detectar la massa dels oligonucleòtids cATNL i cDTNL. Fent una recerca bibliogràfica es va trobar descrit l'ús de co-matrius bàsiques per a millorar els espectres i també es va plantejar la utilització de 6-aza-2-tiotimina (ATT)⁵⁷ com a matriu. Utilitzant com a analit l'oligonucleòtid DTNL purificat, es van realitzar un seguit de proves. Emprant THAP (0,5 M) com a matriu, s'han afegit, en diferents experiments, TEA (1 mM) i imidazol (1mM) com a co-matrius. Si la co-matriu és CA (0,1 M) aleshores la concentració utilitzada de la dissolució de THAP és 1 mM. Amb ATT les co-matrius han estat TEA (1 mM) i CA (20 mM). De totes les proves realitzades només es va aconseguir detectar la presència del producte quan s'utilitzava ATT amb citrat amònic com a co-matriu.

A partir d'aquests resultats es va decidir utilitzar ATT com a matriu per a analitzar els oligonucleòtids. La utilització d'aquesta matriu comporta un canvi en la metodologia de preparació de les mostres per a analitzar-les. Es prepara una dissolució 70 mM d'ATT i una 20 mM de CA i es prepara una barreja 1:1 d'aquestes dues solucions. A continuació es barregen 1 μ L d'analit amb 1 μ L d'ATT+CA i es diposita 1 μ L a la placa per a que cristal·litzi.

A la següent taula queden recollits els resultats de l'anàlisi per espectrometria de masses MALDI-TOF dels diferents oligonucleòtids cíclics sintetitzats:

Oligonucleòtid	(M-H) ⁻ observada	(M-H) ⁻ calculada
cATNL	5561,2	5560,5
cDTNL	5619,9	5619,5
c12PO	3689,2	3692,4

2.2.6. Valoració de les síntesis

S'ha aconseguit sintetitzar els oligonucleòtids cíclics necessaris per als estudis biològics a realitzar, si bé els rendiments obtinguts han estat força baixos. S'ha de tenir present que la ciclació d'un oligòmer que conté 18 nucleòtids implica la formació d'un cicle de 108 (18x6) àtoms. La gran mida del cicle fa que la reacció de ciclació sigui entròpicament molt desfavorable. En el cas del dodecàmer, el cicle és de 72 àtoms. A priori, s'espera que el rendiment de la ciclació creixi a mesura que disminueix la longitud de l'oligòmer i, efectivament, els rendiments obtinguts per a c12PO són superiors als de cATNL i cDTNL. Un altre factor que influeix en la reacció de ciclació és la seqüència de l'oligonucleòtid. En el cas de cATNL es dona per atac d'una citosina sobre una timina però aquesta citosina té 3 bases púriques a continuació en la seqüència i aquestes poden influir significativament sobre el rendiment de la ciclació. També influeixen les condicions experimentals, ja que cal recordar que tant l'elongació com la reacció de ciclació són molt sensibles a la presència d'humitat.

La purificació d'oligonucleòtids de mida superior a uns 12 nucleòtids s'havia realitzat en el nostre grup per PAGE en condicions desnaturalitzants. Degut als baixos rendiments de purificació obtinguts tant per a cATNL com per a cDTNL s'ha introduït una modificació en el procediment de purificació. S'elimina la urea del gel de poliacrilamida de manera que l'electroforesi ja no és en condicions desnaturalitzants. La mobilitat electroforètica dels oligonucleòtids en el gel augmenta significativament de manera que no es poden utilitzar com a referències els mateixos marcadors que es fan servir en electroforesi en condicions desnaturalitzants, però els rendiments de purificació han augmentat significativament, des d'un 4% a un 25%.

Un punt difícil ha estat la caracterització dels oligòmers cATNL i cDTNL, ja que en les condicions habituals de MALDI-TOF per a oligonucleòtids no s'ha aconseguit detectar cap dels dos productes i ha calgut assajar diverses combinacions de matrius i co-matrius fins a trobar unes que funcionin prou bé com per a aconseguir caracteritzar els oligonucleòtids.

2.3. Síntesi de l'oligonucleòtid lineal fosforotioat (12PS)

Amb l'oligonucleòtid 12-mer cíclic es pretenia estudiar la influència de la longitud de l'oligonucleòtid en la seva activitat antisentit. A més, es volia realitzar el mateix tipus de comparació entre oligonucleòtid cíclic fosfodiester i lineal fosforotioat. Per això es va sintetitzar l'oligonucleòtid lineal fosforotioat de seqüència CGGTCAACCAT (12PS).

2.3.1. Síntesi de l'oligonucleòtid

El suport sòlid utilitzat han estat boles de vidre que es troben funcionalitzades amb el nucleòsid timidina, en una escala de 1 μmol . Les diferències fonamentals entre la síntesi d'aquest oligonucleòtid i la dels oligonucleòtids fosfodiester cíclics són:

- l'etapa d'oxidació ha estat substituïda per una etapa de sulfurització, utilitzant el reactiu sulfuritzant de Beaucage⁵⁸
- per als oligonucleòtids fosfodiester l'oxidació es realitza després de l'etapa d'acetilació mentre que per als fosforotioats primer es realitza la sulfurització i després l'acetilació per tal d'evitar una prematura oxidació del fosfit triester⁵⁸.

La síntesi de l'oligonucleòtid 12PS va tenir els següents rendiments:

Escala inicial	Rdt promig etapa	Rdt global	cadena lineal
1 μmol	97,6%	78,6%	0,63 μmol

S'observa que el rendiment dels acoblaments en aquesta síntesi ha estat menor que en el cas de la síntesi dels oligonucleòtids cíclics sobre el copolímer de polietilenglicol i poliestirè (TentaGel). De totes maneres es tracta d'un rendiment prou elevat com per a obtenir el dodecàmer lineal amb un rendiment global proper al 80%.

L'etapa de desprotecció dels fosfats i de desancoratge del suport sòlid es va realitzar per tractament amb amoníac a temperatura ambient durant 1 hora. A

continuació, es van desprotegir les bases nitrogenades, igual que en el cas dels oligonucleòtids fosfodiester cíclics, per tractament amb NH_3 a 55°C durant 12 hores. El rendiment d'aquestes etapes va ser pràcticament quantitatiu i es disposava de 73,5 OD_{260} de cru per a purificar.

2.3.2. Anàlisi, purificació i caracterització

Es va analitzar el cru per HPLC en fase reversa (C18). La tècnica escollida per a purificar el producte va ser l'HPLC semi-preparatiu. A la figura 1.14 es poden veure els cromatogrames, tant del cru com del producte purificat. En els oligonucleòtids fosforotioats el fet d'haver substituït un dels dos oxígens no enllaçants, units a l'àtom de fòsfor, per un sofre indueix quiralitat en l'àtom de fòsfor. S'obtenen 2^{n-1} diastereòmers per a un oligonucleòtid lineal amb n nucleòsids. Aquesta naturalesa diastereomèrica dels oligonucleòtids fosforotioats fa que siguin difícils d'analitzar per HPLC en fase reversa^{59,60} doncs els seus cromatogrames acostumen a presentar pics amples.

Es van obtenir 63 OD_{260} de producte purificat amb un grau de puresa del 96%, de manera que el rendiment de la purificació va ser del 86%. Finalment, es va caracteritzar l'oligonucleòtid obtingut per espectrometria de masses de MALDI-TOF. Es va obtenir una massa de 3779 (M-H⁻), per una massa calculada (M-H⁻) de 3773.

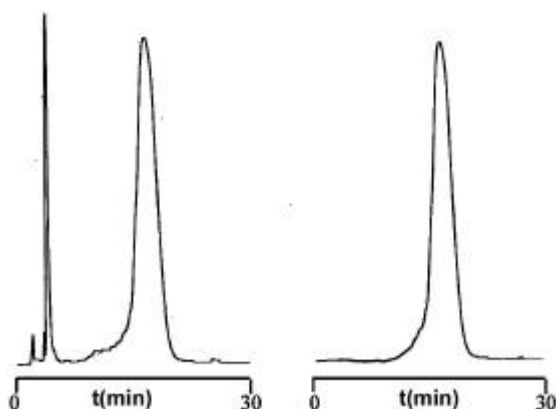


Figura 1.14. Cromatogrames del cru de síntesi de 12PS i de 12PS purificat. Gradient: 5 → 35% de B en 30 min

3. ASSAIG DE L'ACTIVITAT CITOTÒXICA DELS OLIGONUCLEÒTIDS CÍCLICS

La citotoxicitat com a agents antitumorals de diversos oligonucleòtids contra el mRNA de la DHFR havia estat estudiada prèviament². Els estudis realitzats pel grup del Dr. Ciudad s'havien realitzat utilitzant la línia cel·lular parental K1 d'ovari de hámster xinès (CHO). Amb aquestes cèl·lules s'havia establert, en primer lloc, la concentració idònia del liposoma catiònic utilitzat (DOTAP). L'objectiu havia estat aconseguir la màxima activitat citotòxica dels complexos oligonucleòtid/liposoma sense tenir efectes citotòxics deguts al liposoma. La concentració escollida va ser de 10 μM de DOTAP per a 1000 cèl·lules i amb períodes d'incubació llargs (1 setmana).

A continuació, escollint l'oligonucleòtid ATNL lineal fosforotioat com a model, es va determinar el marge de concentracions en les que l'activitat citotòxica era màxima, trobant-se que estava entre 1 i 4 μM . Si s'utilitzaven concentracions d'oligonucleòtid inferiors o superiors l'efecte era menys pronunciat. La incubació amb ATNL però sense DOTAP no causava citotoxicitat.

També es va fer un estudi dels temps mínim d'actuació de l'ATNL. A partir de les 48 hores de tractament la citotoxicitat era molt pronunciada i després de 3 dies les cèl·lules eren pràcticament incapaces de formar colònies. A més, es va comprovar l'especificitat de l'oligonucleòtid sobre la DHFR. Quan s'incuben les cèl·lules en medi de cultiu complet en presència de glicina, hipoxantina i timidina, que són els productes finals de l'activitat de la DHFR, no s'observa cap citotoxicitat.

En el nostre cas, amb els oligonucleòtids cíclics sintetitzats es va realitzar el mateix tipus d'estudis de citotoxicitat. Aquests experiments van tenir lloc al laboratori del Dr. Ciudad a la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona, amb la col·laboració de la Dra. Mercè Rodríguez.

En primer lloc es va realitzar un estudi preliminar i es van assajar els dos oligonucleòtids cATNL (1 μM) i cDTNL (1 i 2 μM) en combinació amb 10 μM DOTAP, utilitzant 1000 cèl·lules K1 de CHO, en medi selectiu (sense glicina, hipoxantina o timidina, -GHT). A la figura 1.15 es representa el % de cèl·lules de CHO que sobreviuen als tractaments amb els corresponents oligonucleòtids antisentit. Com a referència es prenen les cèl·lules no tractades (1) i aquelles que han estat en contacte només amb liposomes (2).

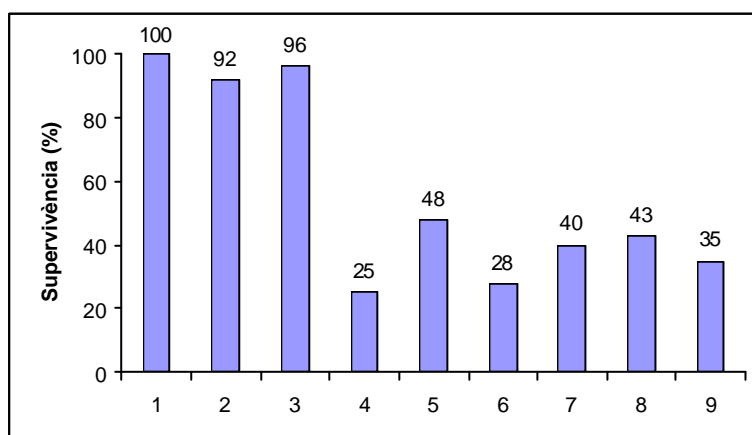


Figura 1.15. Estudi preliminar de l'activitat de cATNL i cDTNL. Les categories de l'eix d'abscisses corresponen als agents amb els que són tractats les cèl·lules de CHO i que són: 1: control, 2: DOTAP 10 μM , 3: ATNL-PO 1 μM , 4: ATNL-PS 1 μM , 5: cATNL-PO 1 μM , 6: DTNL-PS 1 μM , 7: DNTL-PS 2 μM , 8: cDTNL-PO 1 μM , 9: cDTNL-PO 2 μM .

L'activitat citotòxica obtinguda per a l'oligonucleòtid cATNL (5) és menor que la de l'oligonucleòtid fosforotioat (4), però molt més gran que la de l'oligonucleòtid lineal fosfodiester (3), que és pràcticament nul·la. Això indica que la naturalesa cíclica de l'oligòmer fa augmentar la seva activitat antisentit. En el cas del DTNL, l'oligonucleòtid

cíclic (8 i 9) ha presentat una activitat citotòxica menor però propera a la del lineal fosforotioat (6 i 7).

Per a ATNL, a la mateixa concentració (1 μM), la toxicitat de l'oligòmer lineal fosforotioat és el doble que la del cíclic fosfodiester (25% de supervivència vs 48%). En el cas de DTNL, quan l'oligonucleòtid és lineal fosforotioat s'observa que la toxicitat és major a una concentració de 1 μM , que no pas a una de 2 μM . En canvi amb el mateix oligòmer cíclic i amb enllaços de tipus fosfodiester, la toxicitat augmenta amb la concentració. Quan el tractament té lloc amb oligonucleòtids a una concentració de 1 μM l'oligonucleòtid que té més activitat és el fosforotioat (28% de supervivència vs 40%) mentre que a 2 μM és millor el cíclic fosfodiester (35% vs 43%).

A partir d'aquests estudis preliminars, es va decidir estudiar l'efecte de la concentració de l'oligonucleòtid sobre l'activitat citotòxica. Els resultats obtinguts es recullen al següent gràfic (Figura 1.16), on es representa la toxicitat dels oligonucleòtids cATNL i cDTNL, sobre les cèl·lules de CHO, en funció de la seva concentració. Una toxicitat del 100% indica una supervivència nul·la de les cèl·lules després del tractament amb els oligonucleòtids antisentit.

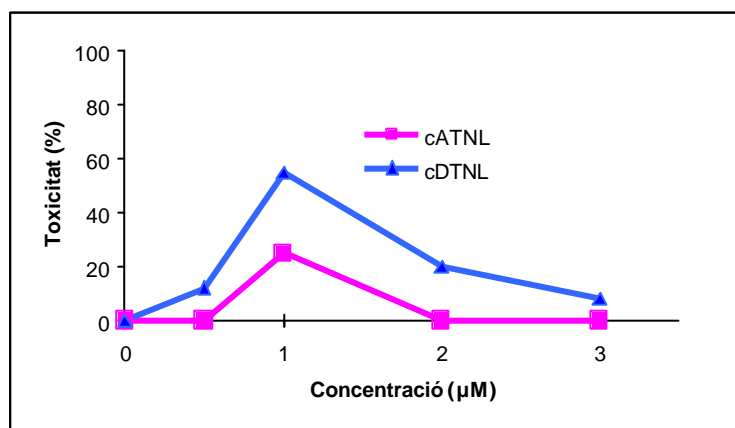


Figura 1.16. Relació de l'activitat de cATNL i cDTNL amb la seva concentració

En el cas de cATNL la concentració òptima és de 1 μM i a altres concentracions l'activitat és pràcticament nul·la. Per al cDTNL l'activitat citotòxica és màxima a la concentració de 1 μM i inferior a concentracions majors i menors. Els resultats representats a les figures 1.15 i 1.16 corresponen a dos experiments diferents i les variacions dels valors de toxicitat obtinguts es deuen a l'error del mètode experimental.

El perfil d'activitat obtingut es correspon amb el que s'havia trobat prèviament amb els oligonucleòtids fosforotioats. Hi ha un augment gradual de l'activitat a mesura que augmenta la concentració d'oligonucleòtid fins a arribar a un màxim i, partir d'aquest punt, l'activitat antisentit torna a disminuir gradualment. Aquesta evolució de l'activitat suggereix que hi ha una relació òptima entre la concentració d'oligonucleòtid i la de liposoma. Una elevada relació d'oligonucleòtid/DOTAP porta a la formació de complexos petits degut a la repulsió electrostàtica entre l'excés de càrregues negatives⁶¹ i això pot perjudicar la interacció amb la membrana cel·lular. En aquestes condicions s'ha observat que la incorporació de l'oligonucleòtid és baixa, tant en el citoplasma com al nucli². Si la relació oligonucleòtid/DOTAP és baixa s'observa la formació dels complexos però el grau

d'alliberament de l'oligonucleòtid en les cèl·lules és molt baix. Aquests fets porten a concloure que és molt important mantenir una relació oligonucleòtid/DOTAP concreta per a obtenir els efectes antisentit òptims.

Per tal d'estudiar l'efecte de la longitud dels oligonucleòtids antisentit en la seva activitat citotòxica es van avaluar els dodecàmers c12PO i 12PS.

Es va estudiar l'efecte d'ambdós a diferents concentracions en medi selectiu. Aquest medi no conté glicina, hipoxantina ni timina, que són els productes finals de l'activitat de la DHFR, de manera que per a que les cèl·lules puguin sobreviure la DHFR ha de realitzar la seva funció i produir aquestes molècules bàsiques per al desenvolupament de les cèl·lules.

S'observa que per a c12PO la concentració òptima és de 0,5 μM , mentre que a concentracions més elevades l'activitat és pràcticament nul·la. L'oligonucleòtid 12PS mostra una activitat molt baixa a concentracions 0,5 i 1 μM i en canvi té una citotoxicitat del 100% a les concentracions de 2 i 4 μM . A la figura 1.17 es representa la toxicitat dels oligonucleòtids 12PS i c12PO sobre les cèl·lules de CHO a diferents concentracions.

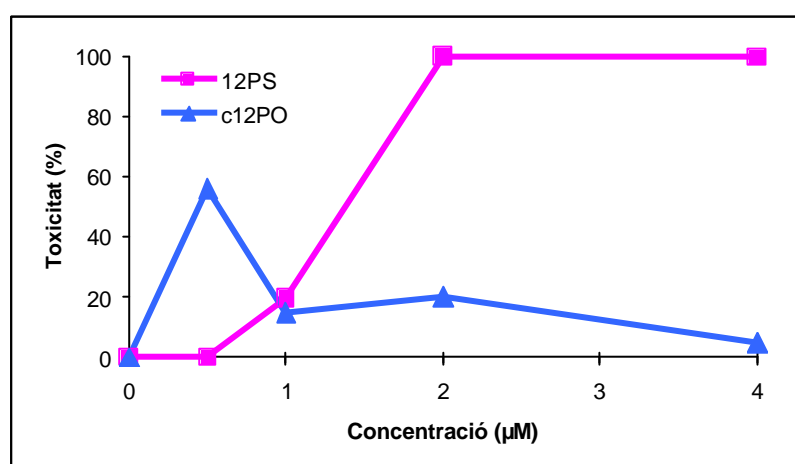


Figura 1.17. Relació de l'activitat de 12PS i c12PO amb la seva concentració

Aquest comportament és diferent al que s'havia observat amb els oligonucleòtids 18-mer i per això es va decidir confirmar l'especificitat de l'activitat antisentit sobre la DHFR. Es van realitzar incubacions amb les mateixes concentracions dels oligonucleòtids però en medi complet (que conté glicina, hipoxantina i timidina). En aquest medi no s'esperava cap efecte dels oligonucleòtids antisentit ja que, encara que no s'expressés la DHFR, els productes de la seva activitat estarien presents en el medi i les cèl·lules podrien sobreviure.

L'anàlisi de l'activitat de c12PO en medi complet no va mostrar cap citotoxicitat, confirmant l'especificitat d'aquest oligonucleòtid respecte a la DHFR. En canvi, per a 12PS es va tornar a obtenir una citotoxicitat del 100% per a les concentracions de 2 i 4 μM (Figura 1.18). Aquest resultat indica que aquest oligonucleòtid no és específic per a la DHFR, i que el fet de tenir enllaços fosforotioat provoca l'aparició d'altres interaccions en les cèl·lules que acaben conduint a la mort cel·lular.

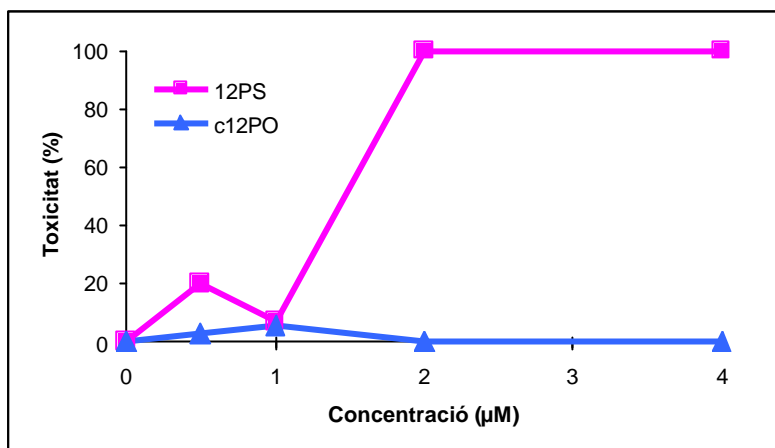


Figura 1.18. Relació de l'activitat de 12PS i c12PO amb la seva concentració en un medi complet, en el que no s'espera cap activitat si l'acció dels oligonucleòtids antisentit és específica sobre la DHFR.

L'oligonucleòtid c12PO sí sembla específic sobre la DHFR i comparant la seva activitat amb la de cATNL s'observa que la concentració òptima és menor per a c12PO (0,5 μM vs 1 μM)

A la figura 1.19 s'ha representat la citotoxicitat dels oligonucleòtids cATNL i c12PO a diferents concentracions. Com es pot veure, el dodecàmer té un nivell de toxicitat màxim superior al del 18-mer (48% vs 20%) i, a més, en cal una concentració menor per a aconseguir aquesta activitat (0,5 μM vs 1 μM). Aquest fet indica que la longitud de l'oligòmer és un factor que influeix en la seva citotoxicitat.

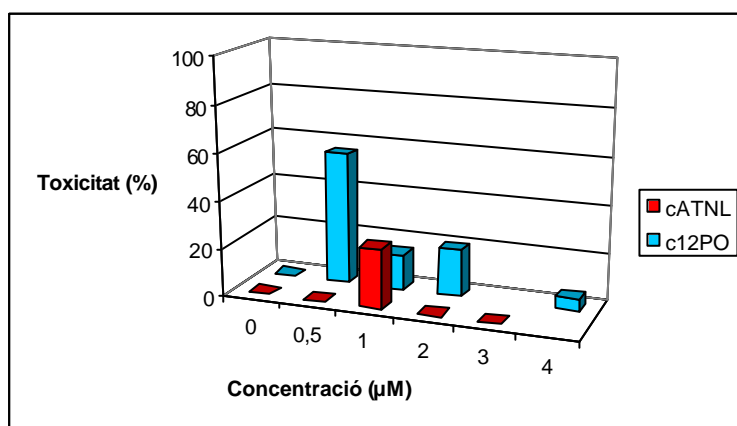


Figura 1.19. Comparació de l'activitat dels oligonucleòtids antisentit en funció de la seva longitud i a diferents concentracions.

En el cas de l'oligonucleòtid 18-mer se sap² que la hibridació és específica amb la regió del mRNA que codifica per a la DHFR en les cèl·lules de CHO. Per tal de comprovar si el dodecàmer és específic per a aquesta mateixa regió hem realitzat una recerca mitjançant el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) en el www.ncbi.nlm.nih.gov. Aquestes anàlisis les hem realitzat en diverses bases de dades i en tots els casos en els que s'ha trobat hibridació en cèl·lules de hamster xinès aquesta ha

estat amb la regió corresponent a la DHFR, de manera que hem comprovat que l'oligonucleòtid dodecàmer és específic.

Comparant les activitats antisentit de les diferents formes de l'oligonucleòtid ATNL es va observar que l'oligonucleòtid lineal fosfodiester és el menys actiu de tots, a continuació està el cíclic diester i el més actiu és el lineal fosforotioat. Tot i que aquest estudi ha estat preliminar i cal realitzar més experiments per a trobar les condicions i seqüències òptimes, la gran diferència de toxicitat entre els oligonucleòtids fosfodiesters, lineals i cíclics, fa que els resultats obtinguts siguin esperançadors des del punt de vista de la utilització dels oligonucleòtids cíclics en teràpia antisentit.

Un punt interessant a estudiar és si la diferència en l'activitat dels diferents tipus d'oligonucleòtids és només deguda a diferències en l'estabilitat o si l'estabilitat és similar per a tots els oligonucleòtids i les diferències es troben en l'afinitat per a l'RNA. Per a esbrinar-ho vam pensar en estudiar la degradació dels tres oligonucleòtids en el medi en el que es realitza el cultiu cel·lular.

Per això es van caracteritzar per HPLC els tres oligonucleòtids de partida i després van ser sotmesos a una incubació a 37°C en medi selectiu durant 2 dies. En els casos dels oligonucleòtids lineal fosforotioat i cíclic fosfodiester no es va veure cap diferència en l'estat de l'oligonucleòtid, mentre que per a l'oligonucleòtid lineal fosfodiester es van detectar nombrosos productes de degradació. Aquests resultats ens han permès afirmar que, com era d'esperar, l'estabilitat de l'oligòmer lineal fosfodiester és molt menor que la de l'oligonucleòtid cíclic i el lineal fosforotioat i aquesta és molt probablement la causa de la seva baixa, gairebé nul·la, activitat en la inhibició del creixement de les cèl·lules de CHO. Les diferències d'activitat entre els oligòmers cíclic i el lineal fosforotioat no es poden explicar en termes d'estabilitat dels agents antisentit, ja que no s'han detectat diferències significatives en aquest aspecte.

4. OLIGONUCLEOTIDS CÍCLICS FOSFOROTIOAT

Els resultats obtinguts amb els oligonucleòtids cíclics fan ser optimistes respecte a la possible aplicació d'aquest tipus d'oligòmers en la teràpia antisentit. Per tal d'obtenir mímics d'oligonucleòtids estables, tant a exo- com a endonucleases s'ha plantejat com a segon objectiu d'aquesta part del treball la síntesi d'oligonucleòtids cíclics fosforotioat, en els que la circularitat dels oligòmers els fa ser resistents a les exonucleases i la naturalesa dels enllaços internucleosídics fa que no siguin susceptibles a l'acció degradativa de les endonucleases.

4.1. Propietats dels oligonucleòtids fosforotioat

Els oligonucleòtids fosforotioats⁶² són anàlegs isoelectrònics dels fosfodiesters naturals en els quals un dels àtoms d'oxigen que no participa en enllaços internucleosídics ha estat reemplaçat per un àtom de sofre. Els radis de van der Waals, la longitud dels enllaços i les càrregues electrostàtiques dels àtoms de sofre i oxigen són molt semblants, però degut a que presenten diferent distribució de càrregues i polaritzabilitat, els oligonucleòtids fosforotioats poden presentar enllaços iònics i

d'hidrogen de diferent intensitat que els fosfodiester i això pot afectar a l'afinitat per l'RNA⁶³.

La substitució de l'oxigen per sofre es postula que té dos efectes locals, per una banda provoca un canvi en la localització de la càrrega negativa, que en el cas dels fosfodiesters es troba repartida entre els dos oxígens no-enllaçants mentre que en els fosforotioats es troba situada principalment sobre el sofre. Per una altra banda, es debilita la capacitat acceptora d'enllaç d'hidrogen⁶⁴. Normalment s'assumeix que aquests efectes estan localitzats en el lloc de la substitució i que no afecten de manera significativa a l'estructura general ni a l'estabilitat dels oligonucleòtids. De fet, les estructures cristal·lines de dúplexs de DNA modificats amb fosforotioats i sense modificar són molt similars⁶³.

La diferència més significativa entre els compostos fosforotioats i els fosfodiester són que l'enllaç internucleosídic és resistent a l'acció de les nucleases en el primer cas, fet que els fa atractius per a ser utilitzats com a agents antisentit per a inhibir l'expressió gènica. Un altre tret diferencial consisteix en l'aparició de quiralitat sobre el fòsfor degut a la presència de l'àtom de S, que alhora permet el marcatge isotòpic degut a la possibilitat d'introduir un ³⁵S (Figura 1.20).

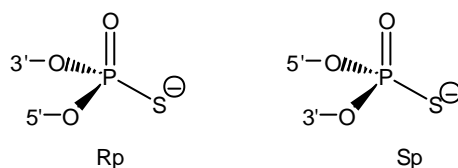


Figura 1.20. Configuracions d'unions oligointernucleosídiques de tipus fosforotioat

El fet d'introduir enllaços internucleosídics fosforotioats aïllats o amb una distribució uniforme en una cadena de DNA que forma dúplex amb RNA té un efecte mínim en l'estructura general del dúplex, però provoca que les desoxiriboses adjacents tendeixin a adoptar una conformació C3'-endo. Aquest comportament s'ha observat amb ambdós diastereoisòmers Rp i Sp (Figura 1.19), fet que sembla indicar que la quiralitat de l'enllaç fosforotioat no és un factor determinant en aquest aspecte. Per altra banda⁶⁵, el diastereòmer Sp és força resistent a les nucleases mentre que l'isòmer Rp presenta la mateixa resistència que els oligonucleòtids amb enllaços fosfodiester. El diastereoisòmer Rp és millor substrat de la RNasa H i s'hibrida amb més afinitat (valors de temperatura de fusió més grans) que no pas l'isòmer Sp o barreges dels dos diastereòmers. Els oligonucleòtids fosforotioats hibriden efectivament amb RNA i intervenen en l'expressió gènica per inhibició de la traducció i per escissió d'RNA mediat per RNasa H. El seu efecte antiviral va ser descrit per primer cop al 1970⁶⁶. També poden provocar efectes farmacològics que no tenen res a veure amb la teràpia antisentit⁶⁷.

Un gran inconvenient dels oligonucleòtids fosforotioats en aplicacions farmacològiques és que s'han descrit efectes secundaris, independents de la seqüència, per unió a proteïnes que no eren les seves dianes⁶⁸. El principal factor que determina la unió del DNA a proteïnes és la seva càrrega. En el cas dels oligonucleòtids fosforotioats aquesta afinitat és d'aproximadament 1-3 ordres de magnitud més gran que per als oligonucleòtids amb enllaços internucleosídics de tipus fosfodiester. Aquesta diferència en l'afinitat és probablement deguda al fet que, com a mínim amb algunes proteïnes, la

velocitat de dissociació del complex oligonucleòtid fosforotioat-proteïna és molt més baixa que la del corresponent oligonucleòtid fosfodiester.

4.2. Mètodes de síntesi

L'aproximació a la síntesi d'oligonucleòtids fosforotioats s'ha abordat des de dues estratègies, en dissolució i en fase sòlida.

Els primers exemples de síntesi es van centrar en l'obtenció estereoselectiva⁶⁹ de dinucleòtids fosforotioats, que van ser utilitzats posteriorment per a obtenir oligòmers^{70,71} i com a substrats clau en l'elucidació de l'estereoquímica de diverses reaccions enzimàtiques⁷². El grup protector més habitual del fosfat internucleosídic és el cianoetil, però també es troba descrit l'ús d'altres.

La síntesi automàtica en fase sòlida d'oligonucleòtids es troba descrita seguint dues estratègies, l'aproximació de l'H-fosfonat⁷³ i la del fosfit triester⁷⁴. En el primer cas, un cop sintetitzat tot l'oligòmer H-fosfonat es procedeix amb una única reacció de sulfurització. Aquesta estratègia no permet obtenir oligonucleòtids que combinin enllaços naturals i enllaços fosforotioats. El mètode del fosfit triester necessita una reacció de sulfurització de fosfit triester a fosforotioat per cada monòmer incorporat, els rendiments d'acoblament de cada nucleòtid són més elevats que en el cas de l'H-fosfonat i, a més, permet alternar de fosfodiesters i fosforotioats en la mateixa seqüència^{58,75} (Figura 1.21).

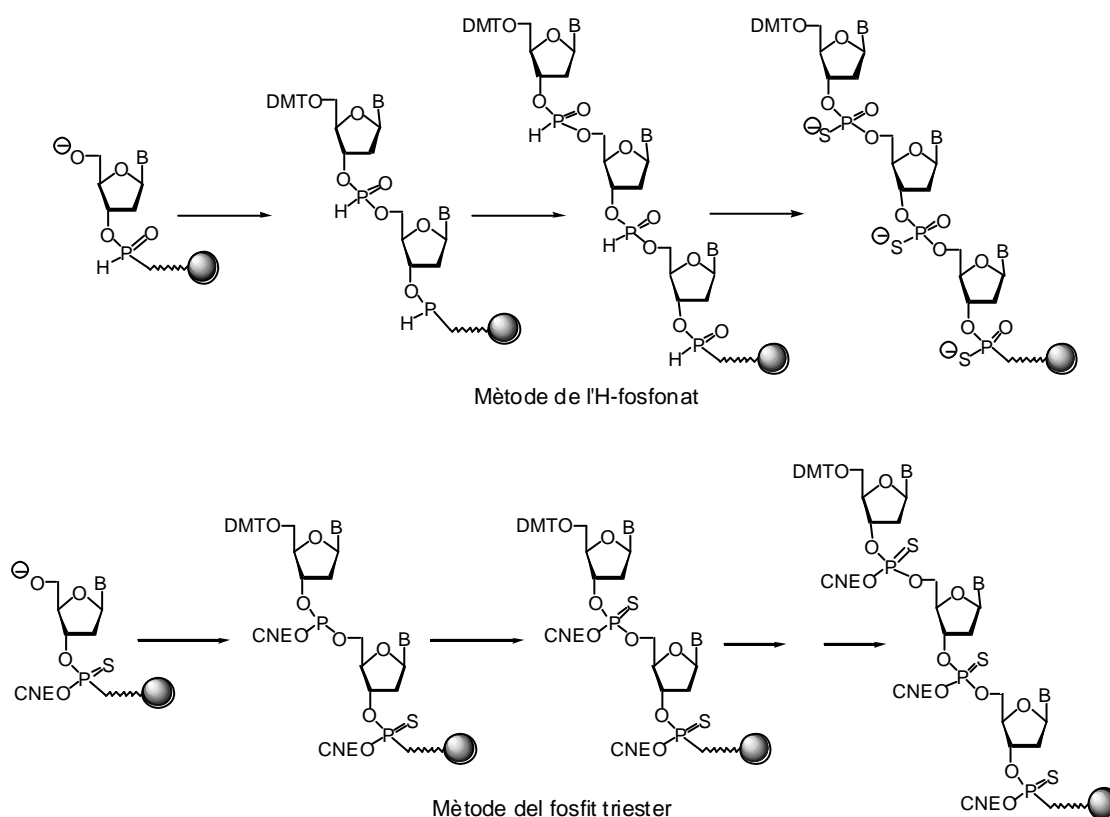


Figura 1.21. Esquemes de síntesi dels oligonucleòtids fosforotioats pels mètodes de l'H-fosfonat i del fosfit triester

En la reacció de sulfurització, el reactiu clàssic de sulfurització era el sofre elemental dissolt en CS_2 ⁷⁷ però el mètode utilitzat presentava dos problemes fonamentals a l'hora d'aplicar-lo en una síntesi automàtica, la reacció és lenta (7,5 minuts) i el S_8 és insoluble en la majoria de dissolvents orgànics, de manera que s'obturen les línies dels sintetitzadors automàtics.

Per tal de facilitar la síntesi dels fosforotioats s'han desenvolupat diferents agents sulfuritzants⁷⁸ que són fàcils de preparar i estables en les condicions de treball. A més han de ser solubles en els dissolvents utilitzats en la síntesi, la reacció ha de ser ràpida i efectiva, sense provocar modificacions en les nucleobases.

En la síntesi de fosforotioats pel mètode del fosfit triester, el reactiu de sulfurització més emprat és el 1,1-diòxid de 3H-1,2-benzoditiol-3-ona⁶² (reactiu de Beaucage). Aquest compost és soluble en acetonitril (adiant per a síntesi automàtica), la reacció de sulfurització és ràpida (aproximadament 30 segons) i eficient (rendiment superior al 96%) i, a més, el reactiu és estable en dissolució durant un mes, com a mínim.

Conceptualment, els tiosulfonats són reactius atractius per a reaccions de transferència de sofre. El mecanisme de sulfurització (Figura 1.22) parteix d'un atac nucleòfil del fosfit triester sobre l'àtom de sofre del grup sulfenil de l'anell de ditiolona i es produeix l'obertura del cicle. L'efecte electroatraient del carbonil i del grup sulfonil afebleix l'enllaç S-S, de manera que l'atac resulta afavorit. En una segona etapa l'anió sulfinat efectua un atac nucleòfil intramolecular sobre el centre electròfil adjacent i la transferència de S resulta completa.

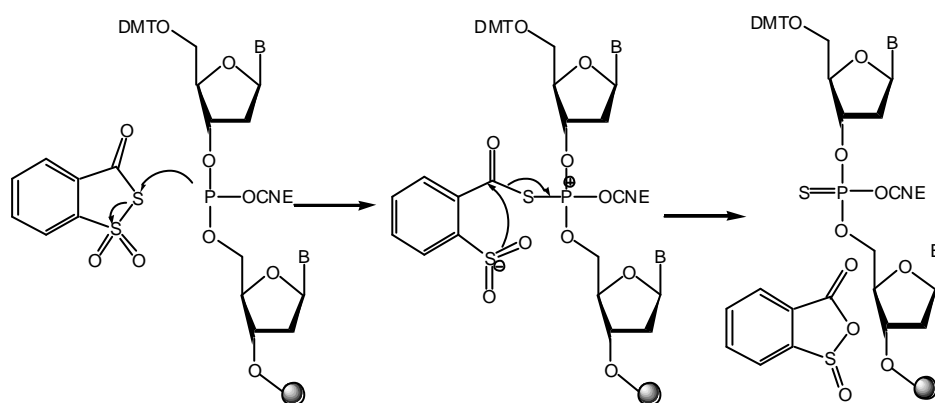


Figura 1.22. Mecanisme de sulfurització d'enllaços internucleosídics mitjançant el reactiu de Beaucage

En la síntesi automàtica de fosforotioats se substitueix l'agent oxidant per un sulfuritzant i, a més, l'etapa de "capping" s'ha de realitzar després de la sulfurització, per tal de no oxidar l'enllaç fosfit.

4.3. Síntesi de dímers cíclics fosforotioat

En una aproximació a la síntesi d'oligonucleòtids cíclics fosforotioat es va decidir prendre com a model el dímer cTT i es va plantejar com a objectiu la síntesi de les tres

possibles combinacions d'enllaços internucleosídics: el dímer completament fosforotioat $c(T_{PS}T_{PS})$, el parcialment fosforotioat $c(T_{PS}T_{PO})$ i el completament fosfodiester $c(T_{PO}T_{PO})$.

4.3.1. Estratègia convencional de síntesi

A. Síntesi de $c(T_{PO}T_{PO})$

Es va utilitzar una resina prèviament preparada per a la síntesi d'oligonucleòtids cíclics. (veure l'apartat 2.2.1.). Aquesta resina es trobava funcionalitzada amb 92 μmol de timidina per gram de resina. Es va realitzar la síntesi del dímer a escala de 2 μmol . Després de la ciclació, la desprotecció del fosfat del segon nucleòtid i el desancoratge, es va obtenir un rendiment de cru del 35%. La purificació va tenir lloc per HPLC en fase reversa i el rendiment global de síntesi va ser del 7%. El producte cíclic es va analitzar per HPLC (Figura 1.23) i es va caracteritzar per espectrometria de masses d'electrosprai. La massa obtinguda va ser de 607 ($M_{\text{calculada}} = 608,4$).

B. Síntesi de $c(T_{PS}T_{PO})$

Utilitzant la mateixa resina que en cas del dímer $c(T_{PO}T_{PO})$ es va sintetitzar el producte cíclic mitjançant el cicle de síntesi característic d'oligonucleòtids fosforotioats sobre un suport de polietilenglicol-poliestirè. Com ja s'ha comentat anteriorment, les diferències fonamentals entre els dos mètodes de síntesi (per a fosfodiesters i per a fosforotioats) són la substitució de l'oxidant per sulfuritzant i el canvi en l'ordre de dues etapes ja que en el cas de la síntesi d'oligonucleòtids fosforotioats s'ha de situar l'etapa d'acetilació després de la de sulfurització per tal d'evitar l'oxidació prematura de l'enllaç fosfit durant l'etapa d'acetilació.

La síntesi es va realitzar en una escala de 3,5 μmol i el rendiment del cru després de l'elongació, la ciclació, la desprotecció del fosfat del segon nucleòtid i el desancoratge va ser del 29%. Igual que en el cas anterior, el cru es va analitzar per HPLC en fase reversa. Es van obtenir dos productes de diferent temps de retenció a l'HPLC (Figura 1.23). Aquests, un cop separats, es van caracteritzar per EM-ES i tots dos van tenir una massa de 623 ($M_{\text{calculada}} = 624,5$). Aquest fet sembla indicar que es tracta dels dos diastereoisòmers del producte cíclic esperat $c(T_{PS}T_{PO})$.

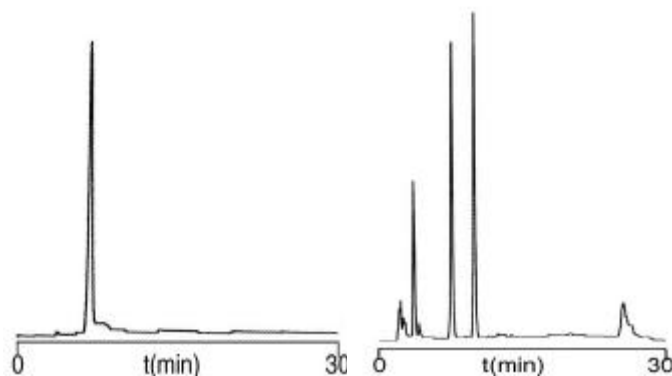


Figura 1.23. Cromatogrames dels crus de síntesi de $c(T_{PO}T_{PO})$ i $c(T_{PS}T_{PO})$

C. Intent de síntesi de c(T_{PS}T_{PS})

Per tal de procedir a la síntesi del dímer cíclic c(T_{PS}T_{PS}) cal obtenir en primer lloc una resina convenientment funcionalitzada amb un nucleotidil-espaiador que contingui un enllaç fosforotioat. L'esquema de síntesi és equivalent al de la síntesi d'oligonucleòtids cíclics descrit a l'apartat 2.2.1. d'aquest capítol, canviant l'etapa d'oxidació per una sulfurització (Figura 1.24 R=Cl).

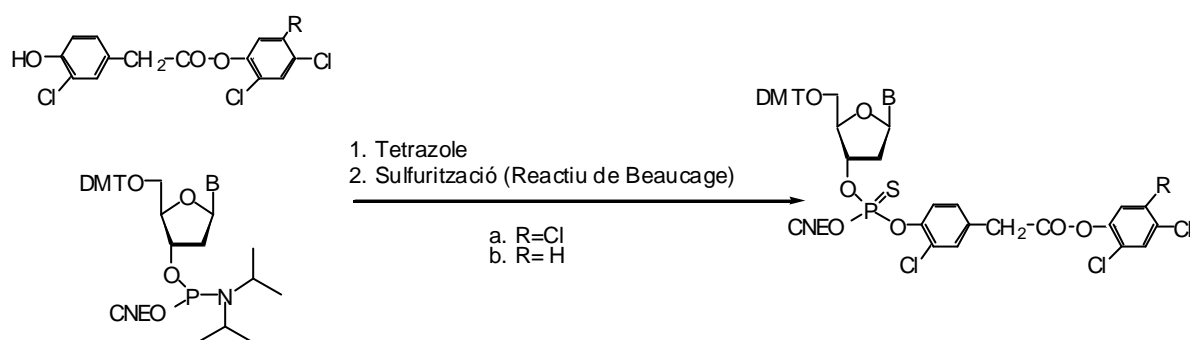


Figura 1.24. Síntesi del nucleotidil-espaiador.

En un primer intent de síntesi del nucleotidil-espaiador fosforotioat es decideix utilitzar el mateix temps de reacció per a l'etapa de sulfurització que per a l'oxidació en el cas dels oligonucleòtids fosfodiester. Segons l'espectre de ³¹P-RMN del cru de reacció enregistrat (Figura 1.27 A), s'observa la formació de tres productes. Les corresponents estructures es recullen a la figura 1.25 juntament amb els desplaçaments químics respectius.

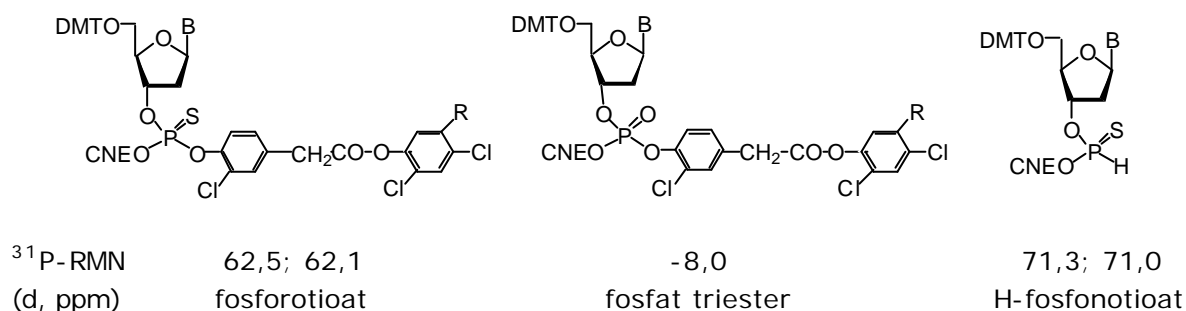


Figura 1.25. Productes formats en la reacció d'obtenció del nucleotidil-espaiador i els respectius desplaçaments químics

Com que no es detecta la presència de l'hidrogen-fosfonat derivat de la hidròlisi del fosforamidit, per al qual s'espera un desplaçament químic al voltant de 7-8 ppm, això fa pensar que la tercera molècula formada podria ser el H-fosfonotioat. A la bibliografia es troba descrita la sulfurització de H-fosfonats⁷⁹ mitjançant el reactiu de Beaucage i altres agents sulfuritzants, i estudien la proporció de producte sulfuritzat respecte a l'oxidat per RMN.

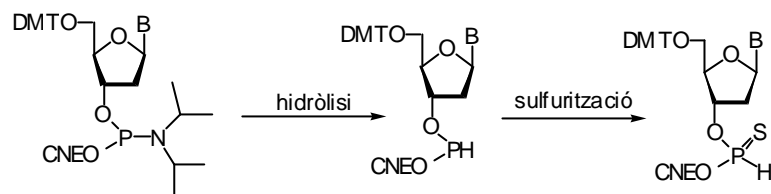


Figura 1.26. Obtenció del H-fosfonotioat a partir del fosforamidit

Per tal de comprovar que el tercer producte obtingut en la síntesi del nucleotidil-espaiador fosforotioat és el H-fosfonotioat, se sintetitza aquest producte hidrolitzant una petita quantitat de fosforamidit i sulfuritzant-lo (Figura 1.26). El producte obtingut en aquesta reacció presenta uns desplaçaments químics de 72 ppm i 72,1 ppm (corresponents als dos diastereoisòmers), fet que concorda amb la hipòtesi establerta anteriorment.

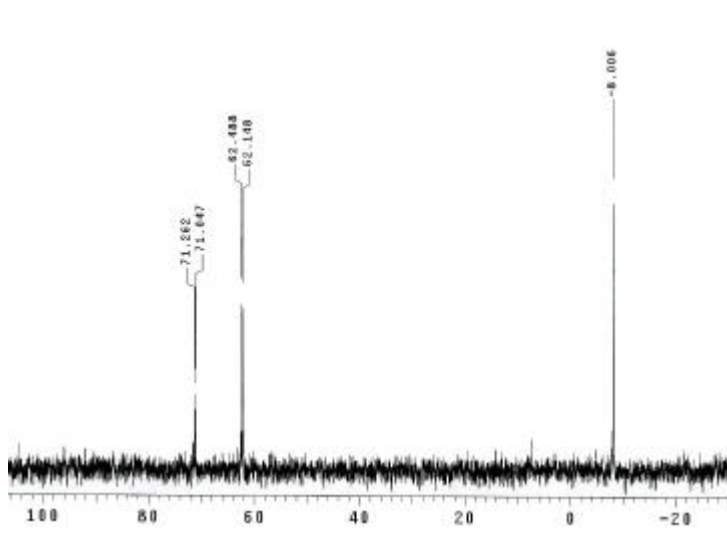
Si es realitza la reacció d'acoblament del cru de síntesi del nucleotidil-espaiador fosforotioat a la resina hi ha dos productes que s'hi podrien ancorar. Aquests són els dos derivats amb funció triclorofenil ester. La presència del derivat amb unió fosfodiester representa un problema important i cal eliminar-lo del cru abans de procedir a la funcionalització del suport sòlid.

Degut a què la reacció de sulfurització no té com a únic producte el nucleotidil-espaiador fosforotioat, s'ha de trobar un mètode de purificació del cru de reacció. Estudis anteriors realitzats en l'equip havien indicat la impossibilitat de purificar el nucleotidil-espaiador per cromatografia en gel de sílice degut a la seva elevada reactivitat. En canvi, la cromatografia resultava eficient quan l'espaiador utilitzat era el 3-cloro-4-hidroxifenilacetat de 2,4-diclorofenil, que és menys reactiu. Per aquest motiu es decidí preparar el nucleotidil-connector en forma de diclorofenil ester (Figura 1.24 R=H).

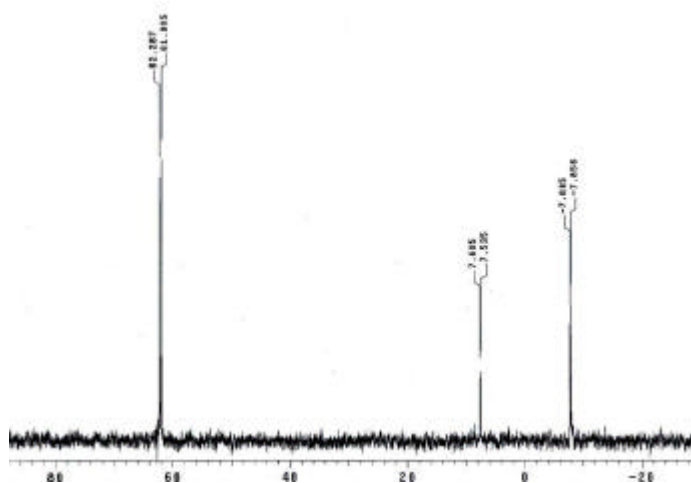
El producte 3-cloro-4-hidroxifenilacetat de 2,4-diclorofenil es va sintetitzar seguint la mateixa metodologia que en el cas del tricloro, substituint el 2,4,5-triclorofenol pel 2,4-diclorofenol, i el rendiment de la reacció va ser del 35%.

Un cop obtingut l'espaiador, es va dur a terme la síntesi del nucleotidil-espaiador. El cru d'aquesta reacció es va compondre de dos productes amb desplaçaments químics de -7,8 i 72 ppm. Tot i que no s'observava la presència del producte esperat, es va utilitzar aquest cru per a intentar trobar unes condicions de purificació adients. Els intents van resultar infructuosos ja que en tots els casos els productes aïllats per cromatografia sobre gel de sílice resultaven de la descomposició de les molècules inicials i en cap cas presentaven senyal en l'espectre de ^{31}P -RMN. Això ens va fer pensar que tot i que el nucleotidil-espaiador no és tan reactiu com en el cas del tricloroderivat, encara és massa reactiu com per a poder ser purificat per cromatografia sobre gel de sílice.

A.



B.



C.

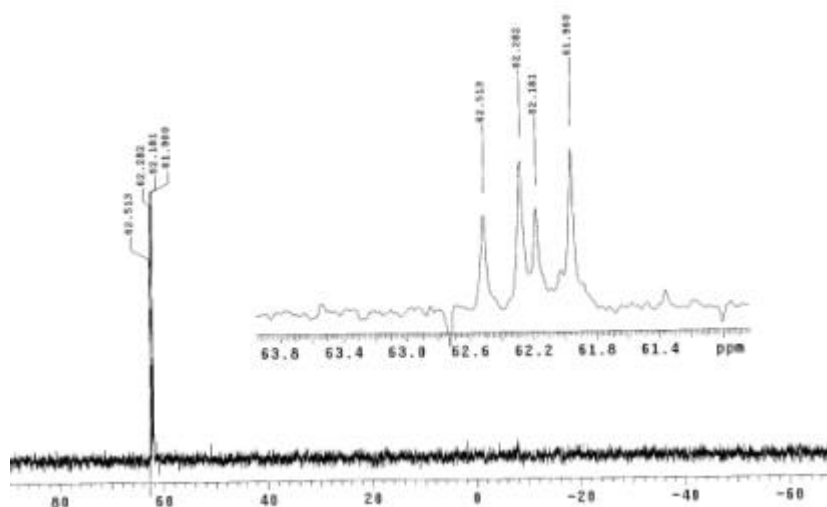


Figura 1.27. RMN dels productes obtinguts utilitzant diferents temps de sulfurització.
 A: sulfurització durant 10 minuts; B: sulfurització durant 2 minuts; C: sulfurització durant 1 minut.

Un cop descartada aquesta possibilitat de purificació, els esforços es van centrar en trobar les condicions òptimes de reacció per a eliminar la presència del fosfat triester com a subproducte. En la reacció de sulfurització el reactiu de partida es transforma en una nova molècula oxidant (Figura 1.22), de manera que, si el temps de reacció és massa llarg, la sulfurització pot evolucionar a oxidació. Per això, la primera variació introduïda en el mètode de síntesi va consistir en reduir el temps de sulfurització de 10 a 2 minuts. En aquest cas en el cru de reacció s'hi van trobar el fosforotioat, com a producte majoritari, i com a subproductes el fosfat triester i l'H-fosfonat (-7,8 i 7,6 ppm) (Figura 1.27 B).

Una nova reducció del temps de sulfurització a 1 minut, acompanyada d'un augment en la proporció de sulfuritzant respecte a l'amidit, va portar a un cru amb quatre senyals al voltant de 62 ppm en l'espectre de ^{31}P -RMN (Figura 1.27 C). Aquests senyals corresponen a dos diastereòmers de dues molècules, que són en ambdós casos el nucleotidil-espaiador, un amb el grup DMT protegint l'hidroxil 5' i l'altre sense el DMT. Durant la purificació del nucleotidil-espaiador, per precipitació, es va observar l'aparició d'una coloració taronja intensa en el cru, que correspon a l'alliberament del grup DMT, possiblement degut a la presència d'algun contaminant àcid.

El fet de tenir una barreja de les dues molècules pot provocar l'obtenció de valors erronis en voler determinar la funcionalització de la resina, ja que de totes les molècules ancorades a la resina, només aquelles que presentin el grup DMT seran quantificades.

El nucleotidil-espaiador fosforotioat es va incorporar a la resina en les mateixes condicions utilitzades per al fosfodiester, en presència de DCC i HOBt, tot i que el temps de reacció va ser més llarg (70 hores). Amb això es volia evitar la necessitat d'haver de repetir l'acoblament si la substitució era massa baixa. Tenint part dels extrems 5' desprotegits, la repetició de l'acoblament podria donar com a subproducte la incorporació d'un nou nucleotidil-espaiador sobre aquest hidroxil 5'.

La funcionalització mesurada és de 15 $\mu\text{mol/g}$. Com que era possible que part dels nucleòtids ancorats no tinguessin el grup protector en l'extrem 5', la reacció d'acetilació de les amines lliures es va fer en condicions més suaus que les habituals per tal d'evitar així l'acetilació dels hidroxils 5' lliures, amb 20 equivalents d'anhidrid acètic i un de DIEA, enlloc dels 20 equivalents habituals per al DIEA.

Un cop acetilats els grups amino, es va eliminar el grup cianoetil, protector de l'extrem 3' i a continuació es va dur a terme l'elongació de la cadena lineal en una escala d'1,5 μmol , suposant que la funcionalització mesurada era correcta. Es va determinar l'escala real de treball per quantificació dels grups DMT procedents de la desprotecció del segon nucleòtid incorporat. Es van obtenir 2,9 μmols de cadenes lineals, fet que confirmava la hipòtesi de la presència inicial del nucleotidil-espaiador amb i sense DMT, ja que així, la funcionalització calculada per a la resina era menor que la real. Suposant un rendiment d'elongació del 98%, la funcionalització real de la resina resulta ser de 30 $\mu\text{mol/g}$ enlloc dels 15 $\mu\text{mol/g}$ calculats a partir de l'absorbància dels grups DMT alliberats.

Un cop realitzades les reaccions de ciclació, d'eliminació del restant grup cianoetil i de desancoratge del producte cíclic, es va obtenir un cru que estava format principalment per dos productes (Figura 1.28). Es van analitzar els dos productes obtinguts per

espectrometria de masses, i ambdós presentaven una massa de 624, que correspon al producte cíclic $c(T_{PS}T_{PO})$.

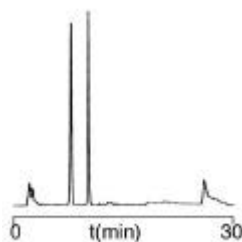


Figura 1.28. Cromatograma del cru de l'intent de síntesi de $c(T_{PS}T_{PS})$

Si s'enregistrés l'espectre de ^{31}P -RMN de la resina que conté el producte de síntesi després de l'etapa de ciclació, per al producte cíclic $c(T_{PS}T_{PS})$ ancorat a resina s'esperarien quatre senyals, corresponents a les possibles combinacions dels diastereoisòmers (RR, RS, SR i SS). En canvi per $c(T_{PS}T_{PO})$ ancorat a resina s'esperarien dos senyals a la zona dels esters fosforotioats (al voltant de 60 ppm) i un a la zona dels fosfats triester (aproximadament a -8 ppm).

En al cas de la síntesi de $c(T_{PS}T_{PS})$ en analitzar per RMN la resina que contenia ancorat el producte cíclic es van observar senyals a 62, 60 i -7 ppm. Aquest fet sembla indicar que la pèrdua de la funcionalitat fosforotioat es dona en l'etapa de ciclació i que cal introduir canvis en el mètode de síntesi.

4.3.2. Assaig d'una nova estratègia per a la síntesi d'oligonucleòtids cíclics completament fosforotioat

Degut als problemes que presenta la metodologia original de síntesi d'oligonucleòtids cíclics per a obtenir oligòmers completament fosforotioats, es decideix intentar una alternativa que havia funcionat amb èxit per a obtenir tioesters⁸⁰. Aimoto⁸¹ va idear un espaiador propil-tioester que proporciona suficient activació al carbonil per a permetre introduir diferents modificacions per desplaçament nucleòfil o reductiu⁸².

El procediment a desenvolupar en el nostre cas consistiria en funcionalitzar una resina amb un nucleotidil-espaiador tal que permetés la síntesi d'un oligonucleòtid, seguida d'una etapa de ciclació i finalment en el desancoratge rendís una funcionalitat tioester (Figura 1.29).

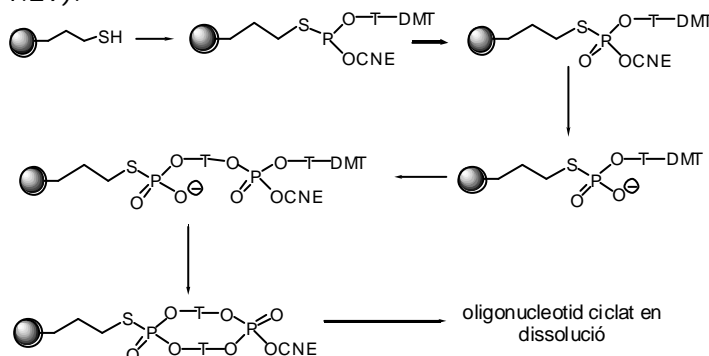


Figura 1.29. Possible esquema sintètic per a l'obtenció d'oligòmers cíclics amb tots els enllaços internucleosídics en forma d'esters fosforotioats

La primera part de la síntesi (Figura 1.30) consisteix en obtenir el derivat d'àcid 3-mercaptopropiònic ancorat a la resina. Això té lloc en tres etapes. Es va començar incorporant l'àcid 3-bromopropiònic a la resina, en forma d'anhidrid simètric, comprovant que l'acoblament havia tingut lloc mitjançant un assaig de ninhidrina. Seguidament, un tractament de la bromopropionamido-resina amb un excés d'àcid tioacètic en presència de DIEA va portar al S-acetil derivat de la propionamido-resina a través d'una reacció de tipus S_N2 . Finalment, un tractament de tiòlisi amb β -mercaptoetanol i DIEA en DMF va permetre obtenir la 3-mercaptopropionil-resina, comprovant-se la presència de grups tiol amb el test d'Elman^{83,84}.

A continuació, sobre la resina convenientment funcionalitzada amb l'espaiador, es va incorporar el primer nucleòtid, seguint el procediment habitual de les síntesis pel mètode del fosfit triester, amb tetrazole com a agent activant. L'oxidació va tenir lloc per tractament amb hidroperòxid de *tert*-butil durant 3 minuts. Es va quantificar la funcionalització per tractament d'una alíquota de la resina amb TCA i es va mesurar de l'absorbància, a 498 nm, dels cations dimetoxitritil que s'havien alliberat amb aquest tractament. La funcionalització, després de dues reaccions d'acoblament va ser de 194 μmol per cada gram de resina. La resina funcionalitzada amb el primer nucleòtid es va analitzar també per ^{31}P -RMN presentant un únic senyal a 26,2 ppm.

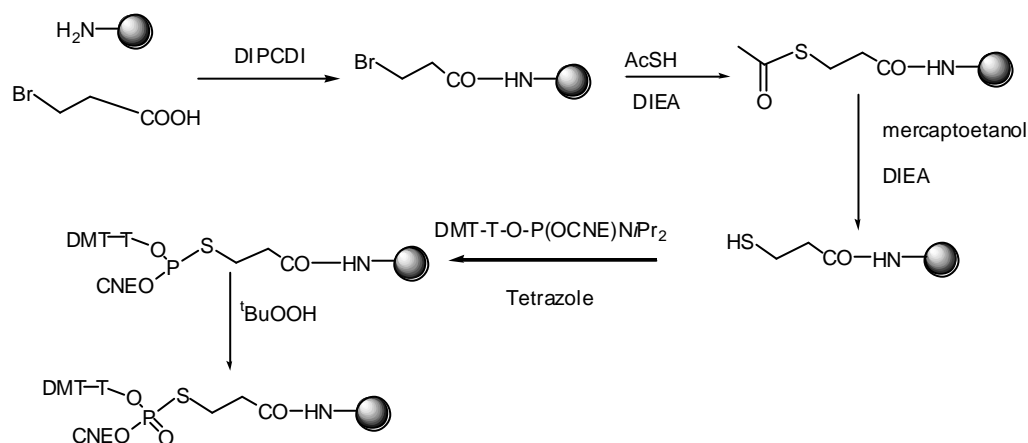


Figura 1.29. Procediment sintètic seguit per a obtenir la nucleotidil-resina convenientment preparada per a realitzar estudis de desancoratge

Està descrit^{82a} que l'enllaç tioester és làbil en presència d'amines, rendint amides, i podria ser que durant el tractament amb TEA i piridina, per a eliminar el grup CNE, es donés el desancoratge del nucleòtid unit a la resina.

En primer lloc es va tractar una fracció de la nucleotidil-resina amb TEA i piridina en les condicions habituals d'eliminació de grups CNE. L'anàlisi, per ^{31}P -RMN, de la resina resultant no presentava cap senyal de fòsfor de manera que l'enllaç tioester no és estable en aquestes condicions i, per tant, aquest procediment de síntesi tampoc no sembla adient per a obtenir oligonucleòtids cíclics que presentin tots els enllaços internucleosídics en forma de fosforotioat.

4.4. Discussió dels resultats

Amb els resultats obtinguts en aquesta part del treball s'ha demostrat que el mètode de síntesi dels oligonucleòtids cíclics desenvolupat al grup d'investigació permet obtenir oligonucleòtids cíclics en els que tots els enllaços internucleosídics, excepte un, siguin de tipus fosforotioat. L'enllac fosfodiester és el que correspon al nucleòsid directament ancorat a la resina. Degut a la naturalesa cíclica dels oligòmers es pot decidir en quina posició introduir l'enllaç fosfodiester ja que qualsevol punt de la seqüència pot ser pres com a punt de partida per a la síntesi del precursor de l'oligòmer lineal que posteriorment serà ciclat.

Com ja ha estat comentat anteriorment, els oligonucleòtids completament fosforotioats presenten problemes a l'hora de ser utilitzats en teràpia antisentit. Hi ha estudis publicats^{85,86} sobre oligonucleòtids amb esquelets mixtes fosfodiester/fosforotioat que fan ser optimistes sobre la viabilitat dels oligonucleòtids cíclics mixtes com a agents antisentit. Aquestes molècules sí que poden ser obtingudes mitjançant la metodologia descrita en el present capítol.

5. BIBLIOGRAFIA

- ¹ Maher III, L.J.; Dolnick, B.J. **Specific hybridization arrest of dihydrofolate reductase mRNA *in vitro* using anti-sense RNA or anti-sense oligonucleotides**, *Arch. Biochem. Biophys.* **1987**, *253*(1), 214-220
- ² Rodriguez, M.; Noe, V.; Alemany, C.; Miralles, A.; Bemí, V.; Caragol, I.; Ciudad, C.J. **Effects of anti-sense oligonucleotides directed toward dihydrofolate reductase RNA in mammalian cultured cells**, *Int. J. Cancer*, **1999**, *81*, 785-792
- ³ Prakash, G.; Kool, E.T. **Structural effects in the recognition of DNA by circular oligonucleotides**, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3523-3527
- ⁴ a) Guvakova, M.A.; Yakubo, L.A.; Vlodavsky, I.; Tonkinson, J.H.; Stein, C.A. **Phosphorothioate oligodeoxynucleotides bind to basic fibroblast growth factor, inhibits its binding sites on extracellular matrix**, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*(6), 2620-2627. b) Agrawal, S. *Antisense therapeutics*, Humana Press, Totowa, N.J. 1996 c) Chadwick, D.J.; Ardew, G. **Oligonucleotides as therapeutic agents**, John Wiley&Sons, West Sussex, UK, 1997
- ⁵ Rowley, P.T.; Kosciulek, B.A.; Kool, E.T. **Circular antisense oligonucleotides inhibit growth of chronic myeloid leukemia cells**, *Molecular Medicine*, **1999**, *5*, 693-700
- ⁶ Johnson, L.F. **Expression of dihydrofolate reductase and thymidylate synthetase genes in mammalian cells**. In: *Recombinant DNA and cell proliferation* G.S. Stein & G.L. Stein Eds. Academic Press, Inc., New York, 1984, pp. 25-47
- ⁷ Gorlick, R.; Goker, E.; Trippett, T.; Waltham, M.; Banerjee, D.; Bertino, J.R. **Drug therapy: intrinsic and acquired resistance to methotrexate in acute leukemia**, *N. Engl. J. Med.* **1996**, *335*, 1041-1048
- ⁸ Schweitzer, B.I.; Dicker, A.P.; Bertino, J.R. **Dihydrofolate reductase as a therapeutic target**, *FASEB J.* **1990**, *4*, 2441-2452
- ⁹ Luo, D.; Saltzman, W.M. **Synthetic DNA delivery systems**, *Nature biotechnol.* **2000**, *18*, 33-37
- ¹⁰ Schreier, H. **The new frontier: gene and oligonucleotide therapy**, *Pharm. Acta Helv.* **1994**, *68*, 145-159
- ¹¹ Zabner, J.; Fasbender, A.J.; Moninger, T.; Poellinger, K.A.; Welsh, M.J. **Cellular and molecular barriers to gene transfer by cationic lipid**, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 18997-19007

- ¹² Pedroso de Lima, M.C.; Simoes, S.; Pires, P.; Gaspar, R.; Slepishkin, V.; Düzgünes, N. **Gene delivery mediated by cationic liposomes: from biophysical aspects to enhancement of transfection**, *Mol. Membr. Biol.* **1999**, *16*, 103-109
- ¹³ Li, S.; Huang, L. **Nonviral gene therapy: promises and challenges**, *Gene Ther.* **2000**, *7*, 31-34
- ¹⁴ Stephens, D.J.; Pepperkok, R. **The many ways to cross the plasma membrane**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2001**, *98*(8), 4295-4298
- ¹⁵ Knoblauch, M.; Hibberd, J.M.; Gray, J.C.; van Bel, A.J.E. **A galinstan expansion femtosyringe for microinjection of eukaryotic organelles and prokaryotes**, *Nature Biotechnol.* **1999**, *17*, 906-909
- ¹⁶ Zauner, W.; Ogris, M.; Wer, E. **Polylysine-based transfection systems utilizing receptor-mediated delivery**, *Ad. Drug. Del. Rev.* **1998**, *30*, 97-113
- ¹⁷ Felgner, P.L.; Gadek, T.R.; Holm, M.; Roman, R.; Chan, H.W.; Wenz, M.; Northrop, J.P.; Ringold, G.M.; Danielsen, M. **Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1987**, *84*, 7413-7417
- ¹⁸ Hughes, M.D.; Hussain, M.; Nawaz, Q.; Sayyed, P.; Akhtar, S. **The cellular delivery of antisense oligonucleotides and ribozymes**, *Drug Discovery Today*, **2001**, *6*(6), 303-315
- ¹⁹ Tirlapur, U.K.; König, K. **Targeted transfection by femtosecond laser**, *Nature*, **2002**, *418*, 290-291
- ²⁰ Barre, F.-X.; Mir, L.M.; Lecluse, Y.; Harel-Bellan, A. **Highly efficient oligonucleotide transfer into intact yeast cells using square-wave pulse electroporation**, *BioTechniques*, **1998**, *25*(2), 294-296
- ²¹ Bangham, A.D.; Standish, M.M.; Watkins, J.C. **Difusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids**, *J. Mol. Biol.* **1965**, *13*, 238-252
- ²² Gregoriadis, G. **Drug entrapment in liposomes**, *FEBS Lett.* **1973**, *36*, 292-296
- ²³ Felgner, P.L.; Gadek, T.R.; Holm, M.; Roman, R.; Chan, H.W.; Wenz, M.; Northrop, J.P.; Ringold, M.G.; Danielsen, M. **Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1987**, *84*, 7413-7417
- ²⁴ Lappalainen, K.; Urtti, A.; Söderling, E.; Jääskeläinen, I.; Syrjänen, K.; Syrjänen, S. **Cationic liposomes improve stability and intracellular delivery of antisense oligonucleotides into CaSki cells**, *Biochim. Biophys. Acta*, **1994**, *1196*, 201-208
- ²⁵ Chesnoy, S.; Huang, L. **Structure and function of lipid-DNA complexes for gene delivery**, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2000**, *29*, 27-47
- ²⁶ Kim, T.W.; Chung, H.; Kwon, I.C.; Sung, H.C.; Jeong, S.Y. **Optimization of lipid composition in cationic emulsion as *in vitro* and *in vivo* tranfection agents**, *Pham. Res.* **2001**, *18*(1), 54-60
- ²⁷ Zelphati, O.; Szoka Jr, F.C. **Cationic liposomes as an oligonucleotide carrier: mechanism of action**, *J. of Liposome Res.* **1997**, *7*(1), 31-49
- ²⁸ Regelin, A.E.; Fankhaenel, S.; Gürtesch, L.; Prinz, C.; von Kiedrowski, G.; Massing, U. **Biophysical and lipofection studies of DOTAP analogs**, *Biochim. Biophys. Acta*, **2000**, *1464*, 151-164
- ²⁹ Mel'nikova, Y.S.; Mel'nikov, S.M.; Löfroth, J-E. **Physico-chemical aspects of the interaction between DNA and oppositely charged mixed liposomes**, *Biophys. Chem.* **1999**, *81*, 125-141
- ³⁰ Maclean, L.J.; Khokhar, A.R.; Tyle, P.; Perez-Soler, R. **Intrasomial chemical activation patterns of liposomal cis-bis-neodecanoato-trans-R,R-1,2-diaminocyclohexane-platinum (II) (L-NDDP)-a potential antitumour agent**, *J. Microencapsulation*, **2000**, *17*, 307-322
- ³¹ Perez-Soler, R.; Shin, D.M.; Siddik, Z.H.; Murphy, W.K.; Huber, M.; Lee, S.J.; Khokhar, A.R.; Hong, W.K. **Phase I clinical and pharmacological study of liposomes-entrapped NDDP administres interpleurally in patients with malignant pleural effusions**, *Clin. Cancer Res.* **1997**, *3*, 373-379
- ³² Bernsdorff, C.; Reszka, R.; Winter, R. **Interaction of the anticancer agent Taxol (paclitaxel) with phospholipid bilayers**, *J. Biomed. Mater. Res.* **1999**, *46*, 141-149

- ³³ Nabel, G.J.; Nabel, E.G.; Yang, Z.Y.; Fox, B.A.; Plautz, G.E.; Gao, X.; Huang, L.; Shu, S.; Gordon, D.; Chang, A.E. **Direct gene transfer with DNA-liposome complexes in melanoma: expression, biologic activity, and lack of toxicity in humans**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1993**, *90*, 11307-11311
- ³⁴ McLachlan, G.; Ho, L.P.; Davidson-Smith, H.; Samways, J.; Davidson, H.; Stevenson, B.J.; Carothers, A.D.; Alton, E.W.; Middleton, P.G.; Smith, S.N.; Kallmeyer, G.; Michaelis, U.; Seeber, S.; Naujoks, K.; Greening, A.P.; Innes, J.A.; Dorin, J.R.; Porteous, D.J. **Laboratory and clinical studies in support of cystic fibrosis gene therapy using pCMV-CFTR-DOTAP**, *Gene Ther.* **1996**, *3*, 1113-1123
- ³⁵ a) Hsu, C.-Y.J.; Dennis, D.; Jones, R.A. **Synthesis and physical characterization of bis 3'→5' cyclic dinucleotides (Np-Np): RNA polymerase inhibitors**, *Nucleosides & Nucleotides*, **1985**, *4*, 377-389 b) De Vroom, E.; Broxterman, H.J.G.; Sliedregt, L.A.J.M.; Van der Mrel, G.A.; Van Boom, J.H. **Synthesis of cyclic oligonucleotides by a modified phosphotriester approach**, *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 4607-4627. c) Rao, M.V.; Reese, C.B. **Synthesis of cyclic oligodeoxyribonucleotides via the "filtration" approach**, *Nucleic Acids Res.* **1989**, *17*, 8221-8240
- ³⁶ Gait, M.J.; Singh, M.; Sheppard, R.C.; Edge, M.D.; Greene, A.R.; Heathcliffe, G.R.; Atkinson, T.C.; Newton, C.R.; Markham, A.F. **Rapid synthesis of oligodeoxyribonucleotides. IV. Improved solid phase synthesis of oligodeoxyribonucleotides through phosphotriester intermediates**, *Nucleic Acids Res.* **1980**, *8*, 1081-1096.
- ³⁷ Gait, M.J.; Matthews, H.W.D.; Singh, M.; Sproat, B.S.; Titmas, R.C. **Chemical and Enzymatic Synthesis of Gene Fragments**, Ed. H.G. Gassen, A. Lang, Verlag Chemie, Weinheim, 1982, 1-42
- ³⁸ Zeng, F.; Jones, R. A. **Synthesis of cyclic dinucleotides by an H-phosphonate method in solution**, *Nucleosides & Nucleotides*, **1996**, *15*, 1679-1686
- ³⁹ Reese, C.B.; Song, Q. **The H-phosphonate approach to the solution phase synthesis of linear and cyclic oligonucleotides**, *Nucleic Acids Res.* **1999**, *28*, 5727-5728.
- ⁴⁰ a) Letsinger, R.L.; Lunsford, W.B. **Synthesis of thymidine oligonucleotides by phosphite triester intermediates**, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 3655. b) Caruthers, M.H.; Barone, A.D.; Beaucage, S.L.; Dodds, D.R.; Fisher, E.F.; McBride, L.J.; Matteucci, M.; Stabinsky, Z.; Tang, J.-Y. **Chemical synthesis of deoxyoligonucleotides by the phosphoramidite method**, *Methods Enzymol.* **1987**, *154*, 287-313. c) Beaucage, S.L.; Iyer, R.P. **Advances in the synthesis of oligonucleotides by phosphoramidite approach**, *Tetrahedron*, **1992**, *48*, 2223.
- ⁴¹ De Napoli, L.; Messere, A.; Montesarchio, D.; Piccialli, G.; Santacroce, C. **Polyethylene glycol supported synthesis of cyclic oligodeoxyribonucleotides**, *Nucleosides and Nucleotides*, **1993**, *12*, 21-30
- ⁴² Barbato, S.; De Napoli, L.; Mayol, L.; Piccialli, G.; Santacroce, C. **Solid phase synthesis of cyclic oligodeoxyribonucleotides**, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 5727-5728.
- ⁴³ De Napoli, L.; Mayol, L.; Piccialli, G.; Santacroce, C. **Phosphotriesters synthesis of unprotected polydeoxyribonucleotides anchored to a polymeric support**, *Gazz. Chim. Ital.* **1986**, *116*, 643-646.
- ⁴⁴ Luebke, K.J.; Dervan, P.B. **Nonenzymatic sequence-specific ligation of double helical DNA**, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 7447-7448.
- ⁴⁵ Dolinnaya, N.G.; Blumenfeld, M.; Merenkova, I.N.; Oretskaya, T.S.; Krynetskaya, N.F.; Ivanovskaya, M.G.; Vasseur, M.; Shabarova, Z.A. **Oligonucleotide circularization by template-directed chemical ligation**, *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 5403-5407.
- ⁴⁶ Rubin, E.; Rumney, S.; Kool, E.T. **Convergent DNA synthesis: a non-enzymatic dimerization approach to circular oligodeoxynucleotides**, *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23*, 3547-3553.
- ⁴⁷ Kanaya, E.; Yanagawa, H. **Template directed polymerization of oligoadenylates using cyanogen bromide**, *Biochemistry*, **1986**, *25*, 7423-7430.

- ⁴⁸ Ashley, G.A.; Kushlan, D.M. **Chemical synthesis of oligodeoxynucleotide dumbbells**, *Biochemistry*, **1991**, *30*, 2927-2933.
- ⁴⁹ Wemmer, E.; Benington, S. **Preparation and melting of single strand circular DNA loops**, *Nucleic Acids Res.* **1985**, *13*, 8611-8621.
- ⁵⁰ Alazzouzi, E.; Escaja, N.; Grandas, A.; Pedroso, E. **A straightforward solid-phase synthesis of cyclic oligodeoxyribonucleotides**, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, *36*, 1506-1508.
- ⁵¹ Bentzley, C.M.; Johnston, M.V. **Oligonucleotide sequence and composition determined by matrix-assisted laser desorption/ionisation**, *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 2141-2146
- ⁵² Schwöpe, I.; Bleczyński, C.F.; Richert, C. **Synthesis of 3',5'-dipeptidyl oligonucleotides**, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 4749-4761
- ⁵³ Simmons, T.A.; Limbach, P. A. **The use of a co-matrix for improved analysis of oligonucleotides by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry**, *Rapid Communications Mass Spectrom.* **1997**, *11*, 567-572
- ⁵⁴ Tang, W.; Nelson, C.M.; Zhu, L.; Smith, L.M. **Positive ion formation in ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionisation analysis of oligonucleotides by using 2,5-dihydrobenzoic acid**, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *8*, 218-224
- ⁵⁵ Simmons, T.A.; Limbach, P.A. **Influence of Co-matrix proton affinity on oligonucleotide ion stability in matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry**, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1998**, *9*, 668-675
- ⁵⁶ Shahgholi, M.; Garcia, B.A.; Chiu, N.H.L.; Heanet, P.J.; Tang, K. **Sugar additives for MALDI matrices improve signal allowing the smallest nucleotide change (A:T) in a DNA sequence to be resolved**, *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29(19)*, e91
- ⁵⁷ Lecchi, P.; Le, H.M.T.; Pannell, L.K. **6-Aza-2-thiothymine: a matrix for MALDI spectra of oligonucleotides**, *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23(7)*, 1276-1277
- ⁵⁸ Iyer, R.P.; Phillips, L.R.; Egan, W.; Regan, J.B.; Beaucage, S.L. **The automated synthesis of sulfur-containing oligodeoxyribonucleotides using 3H-1,2-denzodithiol-3-one 1,1-dioxide as a sulfur-transfer reagent**, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 4693-4695
- ⁵⁹ Metelev, V.; Agrawal, S. **Ion-exchange high-performance liquid chromatography analysis of oligodeoxyribonucleotide phosphorothioates**, *Anal. Biochem.* **1992**, *200*, 342-346
- ⁶⁰ Stec, W.J.; Grajkowski, A.; Kobylanska, A.; Karwowski, B.; Koziolkiewicz, M.; Misiura, K.; Okruszek, A.; Wilk, A.; Guga, P.; Boczkowska, M. **Diastereomers of nucleoside 3'-O-(2-thio-1,3,2-oxathia(selena)phospholanes): building blocks for stereocontrolled synthesis of oligo(nucleoside phosphorothioates)s**, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 12019-12031
- ⁶¹ Jääskeläinen, I.; Mönkkönen, J.; Urti, A. **Oligonucleotide-cationic liposome interactions. A physicochemical study**, *Biochim. Biophys. Acta*, **1994**, *1195*, 115-123
- ⁶² Iyer, R.P.; Egan, W.; Regan, J.B.; Beaucage, S.L. **3H-1,2-benzodithiole-3-one 1,1-dioxide as an improved sulfurizing reagent in the solid phase synthesis of oligodeoxyribonucleoside phosphorothioates**, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 1253-1254.
- ⁶³ Smith, J.S.; Kikonowicz, E.P. **Phosphorothioate substitutions can substantially alter RNA conformation**, *Biochemistry*, **2000**, *39(19)*, 5642-52
- ⁶⁴ Horton, T.E.; Maderia, M.; DeRose, V.J. **Impact of phosphorothioate substitutions on the thermodynamic stability of an RNA GAAA tetraloop: an unexpected stabilization**, *Biochemistry*, **2000**, *39*, 8201-8207
- ⁶⁵ Lebedeva, I.; Stein, C.A. **Antisense oligonucleotides: promise and reality**, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2001**, *41*, 403-419
- ⁶⁶ DeClerq, E.; Eckstein, F.; Sternbach, H.; Merigan, T.C. **The antiviral activity of thiophosphate-substituted polyribonucleotides in vitro and in vivo**, *Virology*, **1970**, *42*, 421
- ⁶⁷ a) Matsukura, M.; Zon, G.; Shinozuka, K.; Stein, C.A.; Mitsuya, H.; Cohen, J.S.; Broder, S. **Synthesis of phosphorothioate analogues of**

oligodeoxyribonucleotides and their antiviral activity against human immunodeficiency virus (HIV), *GENE*, **1988**, 72(1-2), 343-7. b) Leiter, J.M.E.; Agrawal, S.; Palese, P.; Zamecnik, P.C. **Inhibition of Influenza Virus Replication by Phosphorothioate Oligodeoxynucleotides**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1990**, 87, 3430-3434

⁶⁸ Stein, C.A. **Phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotides: questions of specificity**, *TIBTECH*, **1996**, 14, 147-149

⁶⁹ a) Jin, Y.; Biancotto, G.; Just, G. **A stereoselective synthesis of dinucleotide phosphorothioates using chiral phosphoramidites as intermediates**, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37(7), 973-976. b) Wang, J.C.; Just, G. **A stereoselective synthesis of dinucleoside phosphorothioate triesters through a chiral indol-oxazaphosphorine intermediate**, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38(5), 705-708. c) Cosstick, R.; William, D.M. **An approach to the stereoselective synthesis of Sp-dinucleoside phosphorothioates using phosphotriester chemistry**, *Nucleic Acids Res.* **1987**, 15 (23), 9921-9932. d) Püschl, A.; Kehler, J.; Dahl, O. **Solution phase synthesis of dithymidine phosphorothioate by a phosphotriester method using new S-protecting groups**, *Nucleotides & nucleosides*, **1997**, 16 (1-2), 145-158.

⁷⁰ Krotz, A.H.; Klopchin, P.; Cole, D.L.; Ravikumar, V.T. **Improved impurity profile of phosphorothioate oligonucleotides through the use of dimeric phosphoramidite synthons**, *Nucleotides & nucleosides*, **1997**, 16 (7-9), 1637-1640

⁷¹ Krotz, A. H.; Klopchin, P.G.; Walker, K.L.; Srivatsa, G.S.; Cole, D.L.; Ravikumar, V.T. **On the formation of longmers in phosphorothioate oligodeoxyribonucleotide synthesis**, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38 (22), 3875-3878.

⁷² Eckstein, F. **Nucleoside phosphorothioates**, *Annu. Rev. Biochem.* **1985**, 54, 367

⁷³ Reese, C.B.; Song, Q. **A new approach to oligonucleotide synthesis in solution**, *Nucleosides & Nucleotides*, **1998**, 17(9-11), 2027-2031

⁷⁴ Wright, P.; Lloyd, D.; Rapp, W.; Andrus, A. **Large scale synthesis of oligonucleotides with phosphoramidite nucleosides and a high loaded polystyrene support**, *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34(21), 3373-3376

⁷⁵ Marchan, V.; Gibert, M.; Messeguer, A.; Pedroso, E.; Grandas, A. **Use of dimethyldioxirane for the oxidation of 1,2-dithiolan-3-ones to 1-oxides or 1,1-dioxides. Preparation of 3H-1,1-benzodithiol-3-one 1,1-dioxide (Beaucage sulfurizing reagent)**, *Synthesis*, **1999**, 1, 43-45

⁷⁶ Iyer, R.P.; Phillips, L.R.; Egan, W.; Regan, J.B. **The automated synthesis of sulfur containing oligodeoxyribonucleotides using 3H-1,2-benzodithiol-3-on 1,1-dioxide as a sulfur transfer reagent**, *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 4693-4699

⁷⁷ Eckstein, F. *Oligonucleotides and analogues: A practical Approach*; Oxford University Press, 1991, 87-103

⁷⁸ a) Kamer, P.C.J.; van den Elst, H.C.P.F.; van der Marel, G.A.; van Boom, J.H. **An efficient approach toward the synthesis of phosphorothioate diesters via the schönberg reaction**, *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 6757-6760. b) Roelen, H.C.P.F.; Kamer, O.C.J.; Van den Elst, H.; van der Marel, G.A.; van Boom, J.H. **A study on the use of phenyl acetyl disulfide in the solid-phase synthesis of oligodeoxynucleoside phosphorothioates**, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, **1991**, 110(7-8), 325-331. c) Vu, H.; Hirschbein, B.L. **Internucleotide phosphite sulfurization with tetraethylthiuram disulfide. Phosphorothioate oligonucleotide synthesis via phosphoramidite chemistry**, *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 3005-3008. d) Stec, W.J.; Uznanski, B.; Wilk, A.; Hirschbein, B.L.; Fearon, K.L.; Bergot, B.J. **Bis(O,O-diisopropoxy phosphinothioyl) disulfide - a highly efficient sulfurizing reagent for cost-effective synthesis of oligo(nucleoside phosphorothioate)s**, *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 5317-5320. e) Vaman Rao, M.; Reese, C.B.; Zhengyun, Z. **Dibenzoyl tetrasulphide - A rapid sulphur transfer agent in the synthesis of phosphorothioate analogues of oligonucleotides**, *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 4839-4842. f) Vaman Rao, M.; Macfarlane, K. **Solid phase synthesis of phosphorothioate oligonucleotides using benzyltriethylammonium tetrathiomolybdate as a rapid sulfur transfer reagent**, *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35,

- 6741-6744. g) Xu, Q.; Musier-Forsyth, K.; Hammer, R.P.; Barany, G. **Use of 1,2,4-dithiazolidine-3,5-dione (DtsNH) and 3-ethoxy-1,2,4-dithiazoline-5-one (EDITH) for synthesis of phosphorothioate-containing oligodeoxyribonucleotides**, *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 1602-1607. h) Wyrzykiewicz, T.K.; Ravikumar, V.T. **Efficiency of sulfurization in the synthesis of oligodeoxyribonucleotide phosphorothioates utilizing various sulfurizing reagents**, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 1519-1522. i) Cheruvallath, Z.S.; Cole, D.L.; Ravikumar, V.T. **Sulfurization efficiency in the solution phase synthesis of deoxyribonucleoside phosphorothioates-comparison of sulfur triethylamine with various sulfurizing agents**, *Nucleotides & Nucleosides*, **1996**, *15*, 1441-1445. j) Efimov, V.A.; Kalinkina, A.L.; Chakhmakhcheva, O.G.; Schmaltz Hill, T.; Jayaraman, K. **New efficient sulfurizing reagents for the preparation of oligodeoxyribonucleotide phosphorothioate analogues**, *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23*, 4029-4033
- ⁷⁹ a) Stawinski, J.; Thelin, M. **Nucleoside H-phosphonates 13. Studies on 2H-1,2-benzodithiol-3-one derivatives as sulfurizing reagents for H-phosphonate and H-phosphonothioate diesters**, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 5169-5175. b) Zain, R.; Stawinski, J. **Nucleoside H-phosphonates 17. Synthetic and ³¹P-NMR studies on the preparation of dinucleoside H-phosphonothioates**, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 6617-6622.
- ⁸⁰ Yamashiro, D.; Li, C.H.; **New segment synthesis of a-inhibin-92 by the acyl disulfide method**, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1988**, *31*, 322
- ⁸¹ Hojo, H.; Aimoto, S. **Polypeptide synthesis using the S-alkyl thioester of a partially protected peptide segment. Synthesis of the DNA-binding domain of c-Myb protein (142-193)-NH₂**, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1991**, *64*, 111-117
- ⁸² a) Camarero, J.A.; Cotton, G.J.; Adeva, A.; Muir, T.W. **Chemical ligation of peptides directly from a solid support**, *J. Peptide Res.* **1998**, *51*, 303-316. b) Goldstein, A.S.; Belb, M.H. **An alternate preparation of thioester resin linkers for solid-phase synthesis of peptide C-terminal thioacids**, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 2797-2800. c) Camarero, J.A.; Adeva, A.; Muir, T.W. **3-Thiopropionic acid as a highly versatile multidetachable thioester resin linker**, *Lett. Pept. Sci.* **2000**, *7*, 17-21
- ⁸³ Badyal, J.P.; Cameron, A.M.; Cameron, N.R.; Coe, D.M.; Davis, B.G.; Oates, L.J.; Oye, G.; Steel, P.G. **A simple method for the quantitative analysis of resin bound thiol groups**, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 8531-8533
- ⁸⁴ Rienes, C.K.; Kada, G.; Gruber, H.J. **Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine**, *Anal. Bioanal. Chem.* **2002**, *373*, 266-276
- ⁸⁵ Galderisi, U.; Di Bernardo, G.; Melone, M.A.B.; Galano, G.; Cascino, A.; Giordano, A.; Cipollaro, M. **Antisense inhibitory effect: a comparison between 3'-partial and full phosphorothioate antisense oligonucleotides**, *J. Cell. Biochem.* **1999**, *74*, 31-37
- ⁸⁶ Agrawal, S. **Importance of nucleotide sequence and chemical modifications of antisense oligonucleotides**, *Biochim. Biophys. Acta*, **1999**, *1489*, 53-68

CAPÍTOL 2: ABRAÇADORES DE GUANINA

1. INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS

Les nucleobases, com ja s'ha comentat a la introducció general, són una part dels oligonucleòtids sobre la que s'han introduït un gran nombre de modificacions químiques¹.

Amb l'objectiu d'influir positivament en l'estabilitat de dúplexs de DNA, hi ha diferents factors sobre els que es pot actuar², com són el nombre d'enllaços d'hidrogen formats, les interaccions electrostàtiques, la hidrofobicitat, les interaccions p-p per apilament de les bases, etc.

La formació de dúplexs implica el reconeixement entre oligonucleòtids, fet que requereix l'establiment d'enllaços d'hidrogen entre les nucleobases de les cadenes complementàries. Aquests es poden donar en dues regions de les nucleobases. Per una banda hi ha els descrits per Watson i Crick (en línia contínua a la figura 2.1) i per una altra els de tipus Hoogsteen (línia discontinua a la figura 2.1).

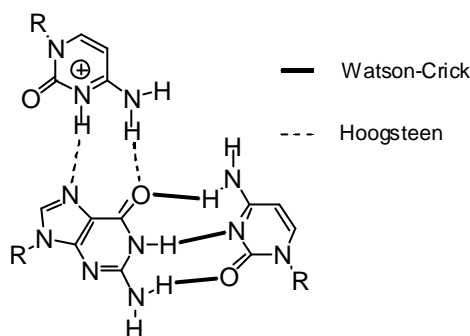


Figura 2.1. Exemple dels enllaços d'hidrogen que pot formar una guanina amb dues unitats de citosina, una de les quals es troba protonada. Els enllaços representats amb una línia contínua gruixuda són de tipus Watson-Crick i el de tipus Hoogsteen són els discontinus.

La introducció de modificacions químiques en les nucleobases pot afectar els enllaços d'hidrogen. Per una banda es pot jugar amb el nombre d'enllaços a formar i per altra banda, per tal d'augmentar la seva força es pot incrementar l'acidesa dels grups donadors d'electrons o la basicitat dels acceptors.

L'apilament és un procés complex. Aquest tipus d'interaccions es donen entre els sistemes π de les bases nitrogenades en trobar-se les unes disposades sobre les altres en un dúplex i depenen de múltiples factors (electrostàtics, de polaritzabilitat, hidrofobicitat...) això fa que quan s'incorpora una nucleobase modificada en un oligonucleòtid els efectes siguin difícils de predir. En general, per a obtenir anàlegs que afavoreixin aquestes interaccions per apilament cal un sistema π més extens que el de les nucleobases naturals.

En la formació de dúplexs de DNA també hi ha un factor electrostàtic, que és la repulsió entre les càrregues negatives de les cadenes que formen la doble hèlix. En els darrers anys s'han desenvolupat estratègies per tal de disminuir aquesta repulsió com per exemple modificar l'esquelet de manera que sigui neutre o tingui càrrega positiva. Aquestes variacions respecte a l'esquelet original poden portar a una reducció o fins i tot eliminació de la repulsió electrostàtica o poden generar una atracció entre l'oligonucleòtid i la seva diana. Com ja s'ha comentat a la introducció, una de les modificacions més habituals en l'esquelet dels oligonucleòtids són els àcids nucleics peptídics.

El treball descrit en aquest capítol consisteix en la síntesi de dues nucleobases derivades de la citosina per a utilitzar-les com a abraçadores de guanina.

1.1. Anàlegs de citosina

En el cas de la citosina es troben descrites un gran nombre de modificacions de la nucleobases sintetitzades amb diversos objectius¹. Les dues posicions més habituals per a introduir aquestes variacions són G-5 i un dels hidrògens de grup amino en C-4.

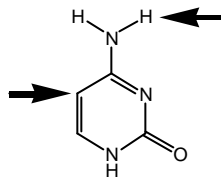


Figura 2.2. Posicions més habituals de la citosina en les que s'introdueixen modificacions químiques

En el cas de C-5 els productes sintetitzats han presentat, en un gran nombre de casos, propietats biològiques interessants. Es tracta d'una zona de la nucleobase que no participa en els aparellaments per enllaç d'hidrogen amb altres nucleobases i, a més està exposada als dissolvents.

El grup amino en C-4 té dos àtoms d'hidrogen susceptibles de ser substituïts. Aquest grup amino participa en la formació d'enllaços d'hidrogen amb les unitats de guanina de les cadenes complementàries. Per tant, un dels àtoms d'hidrogen ha de ser respectat en les modificacions si es vol mantenir la formació del corresponent enllaç d'hidrogen.

A la bibliografia es troben un seguit de nucleobases derivades de la citosina que es construeixen introduint, simultàniament, modificacions en aquestes dues posicions (C-4 i C-5) i, a més, augmentant les interaccions per apilament. Es tracta de sistemes bicíclics i tricíclics, i la majoria de treballs han estat realitzats pel grup de Matteucci³⁻⁹.

Al 1995³ es va publicar la síntesi de dos nucleòsids modificats en forma de fenoxazina i fenotiazina (Figura 2.3, A i B), aquests van ser incorporats en oligonucleòtids i es van determinar les seves propietats d'hibridació. Tant la fenoxazina com la fenotiazina tenen una estructura tricíclica plana que permet una gran interacció de tipus p-p per apilament. En concret, aquests nucleòsids s'hibriden específicament amb la guanina i confereixen una estabilitat tèrmica superior a la de la 5-metilcitosina.

Posteriorment, al 1996⁴ es va proposar una modificació de la fenoxazina i es va sintetitzar una nucleobase que contenia un esquelet de carbazole (Figura 2.3 C) i que quan era incorporat a oligonucleòtids, s'hibridava específicament a guanines. Els dúplexs que resulten d'oligonucleòtids que contenen aquest derivat de carbazole i l'RNA complementari tenen elevats valors de temperatura de fusió.

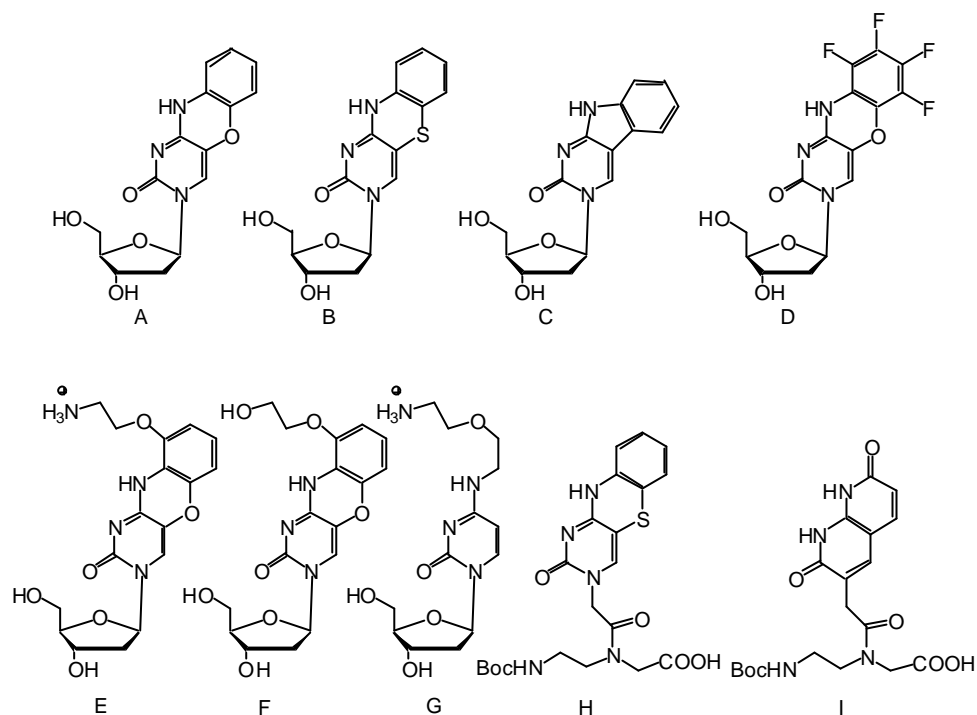


Figura 2.3. Exemples d'anèlegs de citosina. A: nucleòsid derivat de la fenoxazina; B: nucleòsid derivat de la fenotiazina; C: nucleòsid derivat del carbazole; D: nucleòsid derivat de la tetrafluorofenoxazina; E: nucleòsid derivat de la 2-aminoetoxifenoxazina (G-clamp); F: nucleòsid derivat de la 2-hidroxietoxifenoxazina; G: nucleòsid acíclic; H: monòmer de PNA derivat de la fenotiazina; I: monòmer de PNA derivat de la 1,8-naftiridin-2,7-(1,8H)-diona

Un derivat de la fenoxazina és la tetrafluorofenoxazina⁵ (Figura 2.3 D) que és capaç de reconèixer adenina i guanina en una hèlix de DNA amb més efectivitat que timina i citosina respectivament.

L'estructura de la fenoxazina fa que se li puguin incorporar apèndixs per tal d'augmentar les interaccions amb la guanina. Al 1998, Matteucci⁶, va dissenyar dues bases nitrogenades derivades de la fenoxazina que podrien formar alhora ambdós tipus d'enllaços d'hidrogen, Watson-Crick i Hoogsteen, amb una guanina. Aquestes dues modificacions contenen els apèndixs $\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_3^+$ i $\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$ (Figura 2.3, E i F). Estudis de modelització molecular indicaven que el grup amino protonat d'aquest apèndix podria formar un enllaç d'hidrogen específic amb l'O6 de la guanina. El grup hidroxil de l'anèleg F de la figura 2.3 s'esperava que no proporcionés un increment considerable de l'afinitat comparat amb E, degut a que el grup amoni és un millor grup donador d'enllaços d'hidrogen que no pas l'hidroxil. Aquest fet va ser comprovat experimentalment. Un anèleg monocíclic d'aquesta abraçadora de guanina (Figura 2.3 G), que no té restriccions conformacionals, fa disminuir lleugerament l'estabilitat del dúplex.

Per tal d'estudiar la viabilitat en teràpia antisentit dels nous nucleòsids sintetitzats s'han preparat oligòmers en els que s'incorporen les noves nucleobases. S'ha analitzat l'activitat biològica⁷ d'aquests oligonucleòtids així com la seva capacitat de penetració cel·lular⁸ i la seva resistència a nucleases⁹. S'han realitzat experiments *in vitro* que mostren que la presència de fenoxazina en heptanucleòtids augmenta l'activitat RNasa H, la introducció i la distribució cel·lular i l'activitat antisentit respecte

als controls amb oligonucleòtids fosforotioats. L'augment de l'activitat és encara més pronunciat en el cas de l'abraçadora amino de guanina.

Per tal d'optimitzar el disseny d'oligonucleòtids que continguin aquestes modificacions heterocícliques, és important avaluar l'efecte de les noves nucleobases en l'estabilitat dels oligòmers a les nucleases. Els resultats obtinguts mostren que una única modificació a l'extrem 3' de l'oligonucleòtid proporciona una total estabilitat a l'acció de 3'-exonucleases⁹, sembla ser degut a que s'uneixen al centre actiu d'aquests enzims de manera competitiva i reversible i no són hidrolitzats.

L'any 2000, el grup de Nielsen¹⁰ va descriure la síntesi d'un derivat de la 3,5-diaza-4-oxofenotiazina en forma de monòmer de PNA (Figura 2.3 H). Els oligòmers que contenen aquesta nucleobase formen dúplexs més estables que els no modificats i amb un elevat grau de fluorescència. Aquest mateix grup ha publicat^{11,12} la síntesi d'altres monòmers de PNA amb nucleobases modificades. Com a exemple d'un anàleg de citosina trobem la 1,8-naftiridin-2,7-(1,8H)-diona (Figura 2.3 I), que conté un sistema bicíclic que és un mimíc d'una citosina protonada i té un sistema aromàtic més extens que la nucleobase natural i pot donar interaccions d'apilament més eficients.

1.2. Objectius

En el present treball es pretén sintetitzar una nucleobase, la 9-(2-guanidino-etoxifenoxazina) que pot formar fins a 5 enllaços d'hidrogen amb la guanina, substituint el braç amino de l'abraçadora de guanina de Matteucci⁶ per un apèndix amb funcionalitat guanidino, que permeti formar ponts d'hidrogen tant amb l'O6 com amb el N7 de la cara Hoogsteen de la guanina (Figura 2.4). El grup guanidino és molt bàsic ($pK_a \sim 12,5$) i pla. El fet que tingui una valor de pK_a més gran que el grup amino fa que la seva presència comporti l'existència d'una càrrega positiva en un marge de pH força ample.

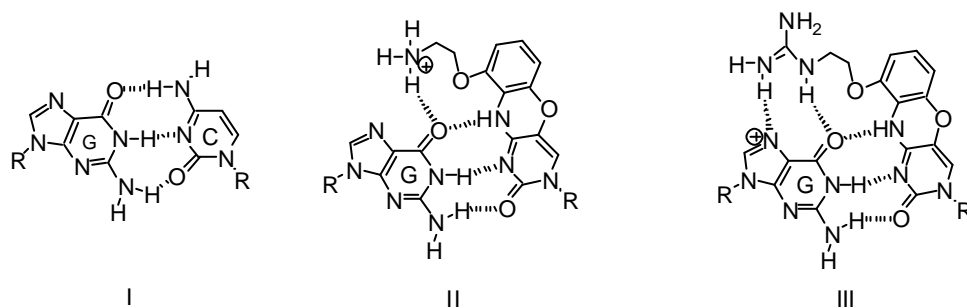


Figura 2.4. Comparació de les interaccions per enllaços d'hidrogen entre guanina i: I) C, II) abraçadora amino de guanina, III) abraçadora guanidino de guanina

Tot i que la novetat del treball consisteix en la síntesi de l'abraçadora guanidino, calia sintetitzar també l'abraçadora amino per a poder comparar l'efecte sobre l'hibridació de totes dues nucleobases respecte a la citosina i entre elles.

A més a més, per tal de reduir les interaccions electrostàtiques entre cadenes es va decidir incorporar les nucleobases modificades (abraçadores de guanina amb grups amino i guanidino) a un esquelet de PNA donat l'ample ventall d'aplicacions potencials^{13,14} que tenen.

Cal dir que al llarg del desenvolupament de la present tesi doctoral s'han publicat dos treballs en els que apareixen oligonucleòtids que contenen abraçadores guanidino de guanina. El grup de Manoharan¹⁵ ha descrit la síntesi d'aquests oligonucleòtids per guanidinilació dels oligonucleòtids que contenen l'abraçadora amino de guanina. La segona publicació¹⁶ consisteix en la descripció de l'estructura de rX d'oligòmers de DNA amb una unitat de l'abraçadora guanidino de G i en la determinació de l'estabilitat de diversos dúplexs per UV.

2. DISSENY DE LA SÍNTESI DE LES ABRAÇADORES DE GUANINA

Tot i que l'objectiu principal descrit en aquest capítol és sintetitzar els monòmers de PNA de les abraçadores amino i guanidino de guanina, es planteja també la possibilitat de sintetitzar els nucleòsids modificats per tal de poder estudiar els efectes de cadascuna de les variacions introduïdes tant en la nucleobase com en l'esquelet. La raó és que se sap que els dúplexs PNA-DNA tenen temperatures de fusió més elevades que els corresponents dúplexs DNA-DNA.

Així doncs, encara que els esforços sintètics s'han de centrar en la síntesi dels monòmers de PNA, s'ha considerat la possibilitat de trobar una via de síntesi comú per als monòmers DNA i PNA amb una etapa final que permeti diferenciar les dues molècules.

El primer pas consisteix en dissenyar els esquemes de síntesi per a les diferents molècules objectiu. En el cas de la síntesi del nucleòsid de l'abraçadora amino de guanina el producte de partida és la 5-bromodesoxiuridina. Per a desenvolupar un esquema sintètic semblant al que es troba en la literatura, el producte de partida de les diferents rutes que es plantegen en el present treball (Figura 2.5) és el 5-bromouracil.

La primera possibilitat (Ruta 1 en la figura 2.5) consisteix en sintetitzar la nucleobase modificada (B) a partir del 5-bromouracil (A) en primer lloc. A continuació es poden seguir dos camins, afegir l'estructura peptídica per a sintetitzar el monòmer de PNA (F) o incorporar una ribosa per tal d'obtenir el nucleòsid (C) i poder utilitzar aquesta base modificada en la síntesi d'oligonucleòtids.

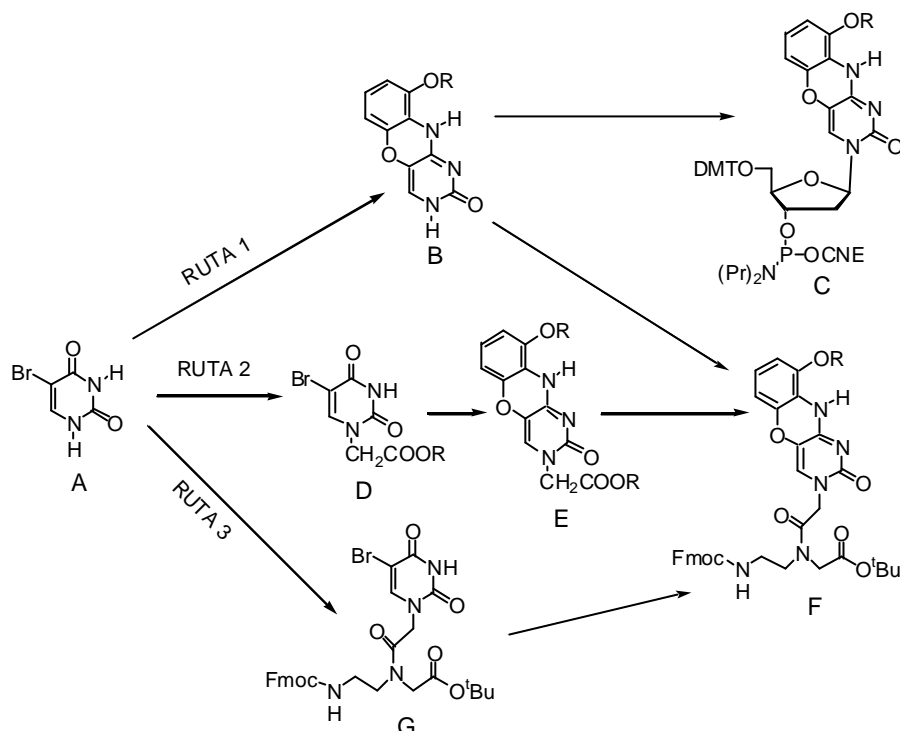


Figura 2.5. Rutes sintètiques dissenyades per a l'obtenció dels monòmers de PNA i DNA de les abraçadores de G

En la segona possibilitat (Ruta 2 de la figura 2.5) se sintetitza en primer lloc l'alcoxycarbonilmetil derivat (D) del 5-bromouracil (A) sobre aquest derivat es construeix la nucleobase (E) i, a continuació, s'afegeix l'esquelet d'aminoetilglicina per a obtenir el corresponent monòmer (F).

La tercera alternativa plantejada (Ruta 3 de la figura 2.5) consisteix en sintetitzar primer el monòmer de PNA corresponent al 5-bromouracil (G) i a partir d'aquesta estructura bàsica introduir les modificacions sobre l'uracil per a obtenir el monòmer de PNA de les abraçadores de guanina (F).

La primera ruta és més atractiva degut a la possibilitat de dur a terme la síntesi dels dos tipus de molècules (monòmer DNA i monòmer PNA) amb una gran part d'intermedis comuns. Però, experiències prèvies en el grup amb el 5-bromouracil fan preveure problemes de solubilitat d'aquesta molècula que poden dificultar la síntesi dels diferents intermedis. De manera que, tot i que es començarà intentant la síntesi per aquesta via, queda molt oberta la possibilitat d'utilitzar alguna de les altres dues.

Una primera comparació de les rutes 2 i 3 fa veure que la primera és molt més convergent, ja que se sintetitzen els dos fragments principals del monòmer per separat. Per una banda s'obté l'esquelet d'aminoetilglicina convenientment protegit i per una altra banda la base nitrogenada (E) construïda a partir del 5-bromouracil que havia estat derivatitzat prèviament en forma d'alcoxycarbonilmetil derivat (D).

En la ruta 3, la síntesi de la base nitrogenada té lloc sobre una estructura peptídica amb dos grups protectors ortogonals (G), de manera que cal controlar molt

més les condicions en les que tenen lloc les diferents reaccions per tal que no s'eliminïn els dos grups. Aquests fets fan que sigui preferible abordar la síntesi de la base nitrogenada per la ruta 2 abans que per la 3.

Resumint, en primer lloc s'abordarà la síntesi de la base nitrogenada sobre el 5-bromouracil i, a continuació, sobre el seu d'alcoxycarbonilmetil derivat. Uns altres aspectes que cal plantejar-se són l'ordre en el que tenen lloc les diferents etapes de la síntesi del sistema tricíclic, del que parlarem més endavant, i els grups protectors a utilitzar.

L'estratègia triada per a la síntesi de PNAs implica la utilització dels grups Fmoc i ^tBu com a protectors dels extrems amino i àcid de l'aminoetilglicina respectivament. A més, cal triar un protector adient per als grups amino i guanidino de les abraçadores de guanina, que ha de ser estable en les condicions bàsiques d'eliminació del grup Fmoc i en el medi àcid necessari per a la desprotecció dels àcids carboxílics que es troben en forma d'esters *tert*-butílics. Es decideix utilitzar el grup benziloxycarbonil (Z) que compleix les condicions anteriors i es pot eliminar per hidrogenació o en condicions àcids més fortes que les necessàries per a desprotegir els àcids carboxílics.

3. SINTESI DELS MONÒMERS DE PNA

3.1. Intent d'una via comú per als dos monòmers de DNA i PNA

La idea inicial que es va voler desenvolupar consistia en una via de síntesi de la base nitrogenada comú per a DNA i PNA i, a continuació, construir els dos monòmers (Ruta 1 de la figura 2.5).

El nucleòsid s'obtidria per glicosidació de la base (B de la figura 2.5) i el monòmer de PNA primer formant l'alcoxycarbonil derivat de la base nitrogenada (E de la figura 2.5) i introduint aquest sobre un esquelet d'aminoetilglicina convenientment protegit.

Per a obtenir la base nitrogenada derivada de la fenoxazina, la primera etapa consistiria en la introducció del 2-aminoresorcinol en la posició 4 del 5-bromouracil, a través d'una substitució nucleòfila aromàtica (Figura 2.6).

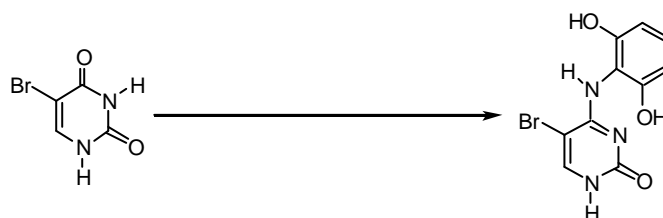


Figura 2.6. Introducció del 2-aminoresorcinol sobre 5-bromouracil

El 2-aminoresorcinol no és comercial i cal obtenir-lo per reducció del 2-nitroresorcinol que sí que ho és. A la bibliografia^{17,18} es troben descrits diversos mètodes de reducció de grups nitro aromàtics a grups amino. Un primer intent de reducció ha consistit en tractar el 2-nitroresorcinol amb NaHS en metanol a reflux.

Com que el resultat ha estat negatiu i no s'ha pogut obtenir el producte esperat s'ha substituït el NaSH per ditionit sòdic (Figura 2.7). En aquest cas es dissol el 2-nitroresorcinol en etanol i se li afegeix l'agent reductor dissolt en aigua. La solució inicial és de color taronja intens i la seva temperatura va augmentant a mesura que s'afegeix el ditionit. A més, la coloració va evolucionant fins a arribar a un color groc pàl·lid. La reacció ha acabat quan el cru de reacció recupera la temperatura ambient. Els rendiments que s'han obtingut amb aquesta reacció oscil·len entre el 60 i el 70%.

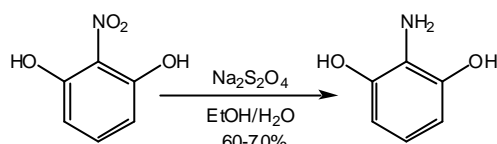


Figura 2.7. Síntesi del 2-aminoresorcinol a partir del 2-nitroresorcinol

En la bibliografia^{19,20} es troba descrita l'activació de la posició 4 del 5-bromouracil, en nucleòsids, mitjançant la introducció d'un àtom de clor, utilitzant CCl_4 i Ph_3P (Figura 2.8).

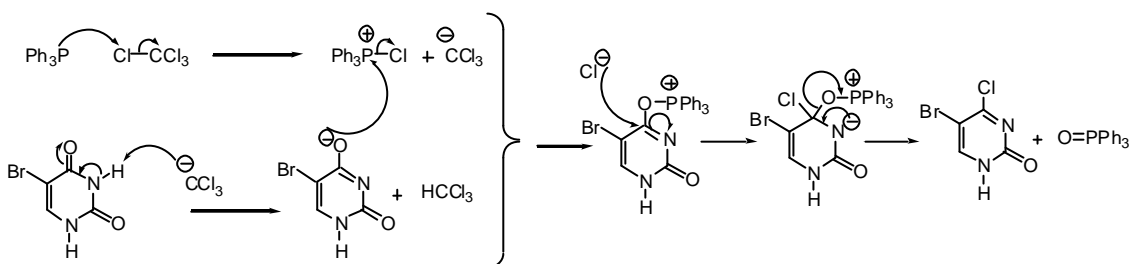


Figura 2.8. Mecanisme d'activació del C-4 del 5-bromouracil amb CCl_4 i trifenilfosfina

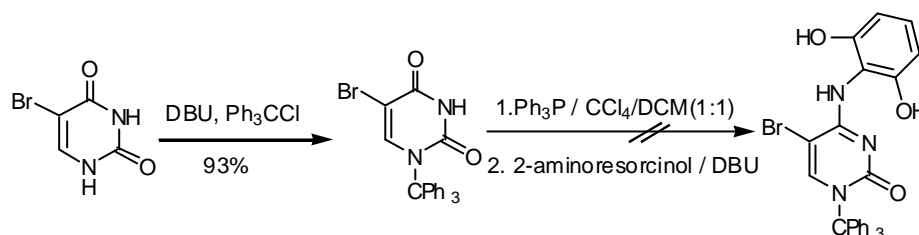
El principal problema que presenta la reacció d'introducció del 2-aminoresorcinol sobre el 5-bromouracil (Figura 2.6) és que tant el 2-aminoresorcinol com el 5-bromouracil son insolubles en el medi de reacció (DCM , CCl_4), de manera que la reacció gairebé no evoluciona i en cap dels intents de síntesi s'ha aconseguit aïllar el producte esperat.

Per tal de solucionar el problema de la solubilitat del 5-bromouracil es va decidir introduir-hi modificacions, de manera que augmentés la seva solubilitat en la barreja DCM/CCl_4 , en la que té lloc la reacció amb el 2-aminoresorcinol.

La introducció temporal del grup trifenilmetil (trítol) en el N-1 del 5-bromouracil va semblar una opció adequada ja que fa augmentar sensiblement l'apolaritat de la molècula i la seva labilitat en medi àcid fa que sigui fàcilment eliminable al final de la síntesi de les nucleobases.

La reacció d'introducció del grup trítol consisteix en una substitució nucleòfila del 5-bromouracil sobre el clorur de trifenilmetil (Figura 2.9). Per tal d'augmentar la nucleofilia del N-1 del 5-bromouracil s'utilitza DBU, que en genera la base conjugada. El producte se sintetitza amb un rendiment del 93% i presenta una elevada solubilitat

en DCM. A continuació, seguint el procés de síntesi descrit per Matteucci⁶, s'intenta introduir el 2-aminoresorcinol sobre la posició C-4 del 5-bromo-*N*¹-trifenilmetiluracil,



mitjançant l'activació en forma de clorur, sense resultats positius (Figura 2.9).

Figura 2.9. Intent d'incorporació del 2-aminoresorcinol sobre el 5-bromo-*N*¹-trifenilmetil-uracil

Com que no ha funcionat l'activació de la posició 4 amb $\text{CCl}_4/\text{Ph}_3\text{P}$ es decideix intentar l'activació en forma d'un derivat triazòlic (Figura 2.10), que s'obté amb un rendiment del 72%. Però no va ser possible la síntesi de 5-bromo-4-*N*-(2,6-dihidroxifenil)-*N*¹-trifenilmetilcitosina a partir d'aquest producte.

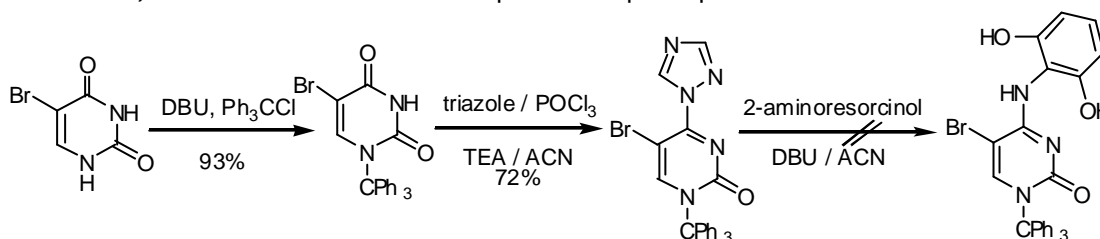


Figura 2.10. Segon intent d'incorporació del 2-aminoresorcinol sobre el 5-bromouracil

Degut als problemes que s'han trobat per a intentar introduir el 2-aminoresorcinol, seguint un esquema de síntesi que permetia una ruta sintètica comú, es decideix canviar l'estratègia de síntesi i procedir per una via diferent per a obtenir els monòmers de PNA.

3.2. Obtenció dels monòmers de PNA de les abraçadores de guanina

3.2.1. Incorporació del 2-aminoresorcinol al 5-bromouracil

Seguint la ruta 2 descrita a la figura 2.5, la primera etapa de la síntesi de les abraçadores de guanina consisteix en la preparació de l'alcoxicarbonilmetil derivat del 5-bromouracil. Diversos autors han descrit la incorporació de la funcionalitat carboximetil a les nucleobases naturals. En general es troben dues estratègies. Per una banda una síntesi en dues etapes, primer per reacció amb un bromoacetat de metil, d'etil o de *tert*-butil i, a continuació, desprotegint l'àcid carboxílic²¹. L'alternativa consisteix en preparar el derivat de l'àcid ja desprotegit directament per tractament de la base nitrogenada corresponent amb àcid bromoacètic²².

En el nostre cas, degut a les possibles interferències que podria provocar la presència d'una funcionalitat àcid carboxílic en les posteriors reaccions que tenen lloc en la síntesi de la base nitrogenada i per a augmentar la solubilitat dels diversos intermedis de síntesi, hem decidit utilitzar la primera alternativa. En primer lloc s'obté un 1-alcoxicarbonilmetil-5-bromouracil i es deixa la desprotecció de l'àcid acètic com

a etapa final abans de la incorporació de la base nitrogenada a l'esquelet d'aminoetilglicina.

El primer ester triat va ser el metílic. Per reacció del 5-bromouracil (**1**) amb bromoacetat de metil en DMF, en medi bàsic generat per carbonat potàssic, s'obté l'1-metoxycarbonilmetil-5-bromouracil (**2-Me**) amb uns rendiments de reacció que es troben al voltant del 85% (Figura 2.11).

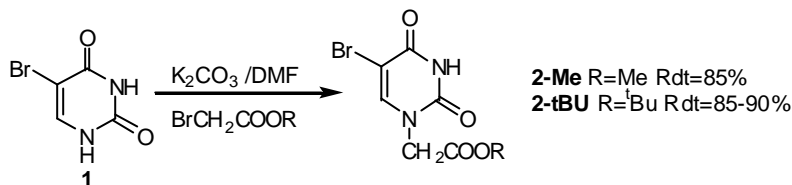


Figura 2.11. Síntesi dels N¹-alcoxicarbonilmetil-5-bromouracils

En la bibliografia hi ha descrits diferents procediments per a aïllar aquest producte de síntesi, la majoria d'ells impliquen una etapa de purificació per cromatografia sobre gel de sílice. En el nostre cas, després de diverses variacions assajades, el procediment d'aïllament de **2-Me** consisteix en una primera filtració per tal d'eliminar els carbonats insolubles en el medi de reacció. A continuació s'elimina parcialment la DMF, es dilueix el cru amb un gran volum d'acetat d'etil i es realitzen rentats amb aigua per tal d'eliminar la resta dels carbonats i arrossegar la major part de la DMF. Després d'assecar la fase orgànica i eliminar l'acetat d'etil, el producte queda dissolt en un petit volum de DMF. Si s'afegeix aigua a aquesta solució s'obté el producte en forma d'un abundant precipitat blanc. Aquest nou procediment per a aïllar el producte és ràpid, no necessita una etapa de cromatografia i, a més, els rendiments de reacció obtinguts són superiors als descrits a la bibliografia.

La segona etapa de la síntesi és la introducció del 2-aminoresorcinol en la posició 4 de l'uracil. En primer lloc, seguint el mètode de síntesi descrit pel grup de Matteucci⁶, s'intenta l'activació mitjançant CCl₄ i Ph₃P (Figura 2.12). En una successió de dues etapes de síntesi, sense purificació del primer intermedi format, s'aconsegueix obtenir el producte esperat, però molt impurificat amb grans quantitats de Ph₃PO i el rendiment és inferior al 20%.



Figura 2.12. Síntesi de **4-Me** mitjançant l'activació de C-4 amb Ph₃P i CCl₄

Aquestes reaccions presenten dos problemes. En primer lloc, la solubilitat de **2-Me** tot i ser més elevada que la de 5-bromouracil, no és prou alta com per a que es dissolgui totalment en la barreja DCM/CCl₄ en la que acostumen a tenir lloc aquestes etapes de síntesi. A més, la presència de Ph₃PO, com a subproducte de reacció, dificulta, en gran manera, l'aïllament de **4-Me** pur, fent necessàries diverses etapes de purificació per cromatografia en columna.

Per tal d'evitar la presència de l'òxid de trifenilfosfina com a subproducte, que dificulta la purificació, es decideix canviar el mètode d'activació del carbonil en C-4. En primer lloc es decideix buscar una fosfina que tingui un òxid soluble en aigua i per això es prova la trietilfosfina. Es fa reaccionar **2-Me** amb trietilfosfina/ CCl_4 en les mateixes condicions en les que havia funcionat la reacció amb la trifenilfosfina, però en aquest cas no s'aconsegueix trobar el producte esperat en el cru de reacció.

Com que la introducció del 2-aminoresorcinol sobre l'uracil té lloc en dues etapes sense purificació intermitja no està gaire clar en quina de les etapes es troben els problemes. Per això es decideix intentar aïllar el derivat de 5-bromouracil activat que es forma en la primera etapa i procedir a continuació amb la introducció del 2-aminoresorcinol. Es prepara una solució de **2-Me** i trietilfosfina en tetraclorur de carboni i es deixa reaccionar a temperatura ambient durant 2 hores. El cru obtingut s'analitza per ^{13}C -RMN i els senyals que s'obtenen corresponen al producte de partida junt amb un nou senyal a 135,5 ppm que correspon al carboni unit al clor. Per CCF, en el cru només s'havia vist un producte però al llarg del temps en contacte amb l'aigua del DMSO emprat per a enregistrar l'espectre de ressonància aquest va descomposant i dona una barreja de productes. Això indica que, tot i que el producte es forma, no sembla gaire estable.

Després d'aquests resultats es decideix canviar completament la naturalesa del grup funcional que activarà la posició C-4. El primer intent realitzat és amb clorur de 2,4,6-trimetilbenzesulfonyl (TMBS-Cl) en medi bàsic²³ (Figura 2.13). La reacció entre el clorur de trimetilbenzensulfonyl i **2Me** rendeix un cru en el que no s'ha aconseguit aïllar el derivat de **2Me** activat per a poder introduir a continuació el 2-aminoresorcinol.

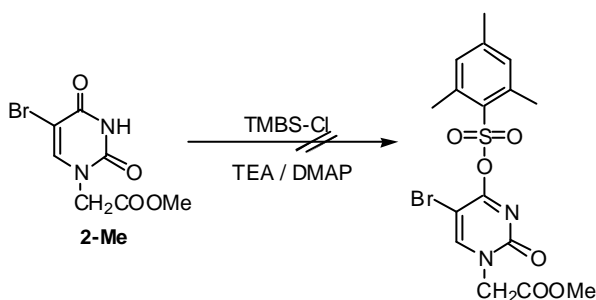


Figura 2.13. Intent d'activació de **2-Me** amb TMBS

Una altra alternativa provada consisteix en fer servir el triazole²⁴ com a grup sortint, enlloc del clorur. La reacció d'introducció del triazole sobre **2-Me** té dues parts (Figura 2.14). En primer lloc es fan reaccionar POCl_3 amb un excés de triazole en medi bàsic per a formar el $(\text{triazole})_3\text{PO}$ que, a continuació, reacciona amb **2-Me** per a formar el triazolil derivat **3-Me**.

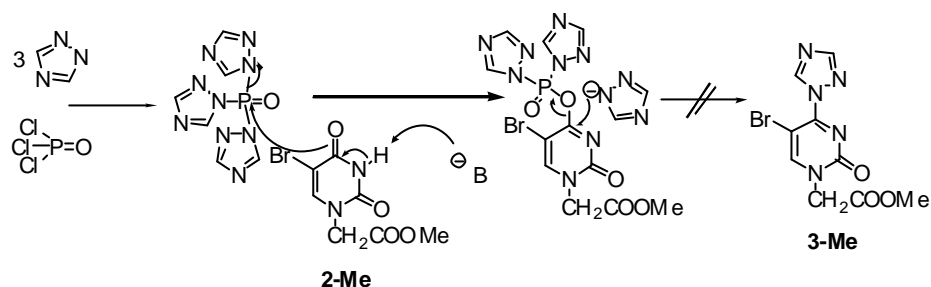


Figura 2.14. Mecanisme de la reacció d'introducció de triazole sobre C-4

Sembla que els problemes de solubilitat continuen dificultant l'evolució de les reaccions, ja que tampoc no s'ha aconseguit sintetitzar el triazole derivat **3-Me**.

Per tal d'augmentar la solubilitat dels intermedis de reacció es canvia el grup protector de l'àcid carboxílic per l'èster *tert*-butílic. La síntesi de **2-tBu** (Figura 2.11) té lloc amb bromoacetat de *tert*-butil en les mateixes condicions que per a **2-Me**, i els rendiments oscil·len entre el 85 i el 90%.

A partir de **2-tBu** se sintetitza el corresponent triazole derivat **3-tBu** i s'obtenen rendiments al voltant del 90% (Figura 2.15). El cru obtingut en aquesta reacció es compona en un 90-95% del producte **3-tBu**. Com que el producte **3-tBu** no és prou estable en contacte amb la sílice, es decideix no purificar-lo i procedir amb la següent pas de síntesi.

Aquest és la introducció del 2-aminoresorcinol en la posició de l'uracil activada amb el triazole (Figura 2.15). La reacció es realitza en ACN, en presència de DBU. El producte **4-tBu** s'aïlla per precipitació en medi lleugerament àcid (en el que es soluble l'excés de resorcinol) i s'obtenen rendiments al voltant del 80%.

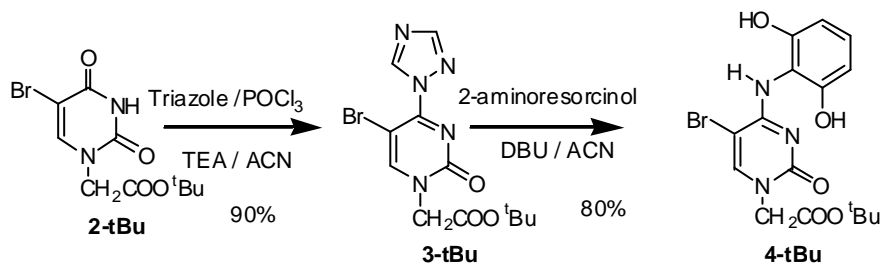


Figura 2.15. Esquema de síntesi escollit per a l'obtenció de **4-Bu**

3.2.2. Ciclacions i reaccions de Mitsunobu

Un cop arribat a aquest punt, com es pot veure a la figura 2.16, es presenten dues possibilitats. Es pot procedir a la introducció dels braços, tan amino com guanidino (**5a** i **5b**), per alquilacions de Mitsunobu d'un dels dos hidroxil fenòlics, i a continuació ciclar (**7a** i **7b**). O bé, primer fer la reacció de ciclació (**6**) i introduir després, sobre l'únic hidroxil lliure, el braç corresponent (**7a** i **7b**).

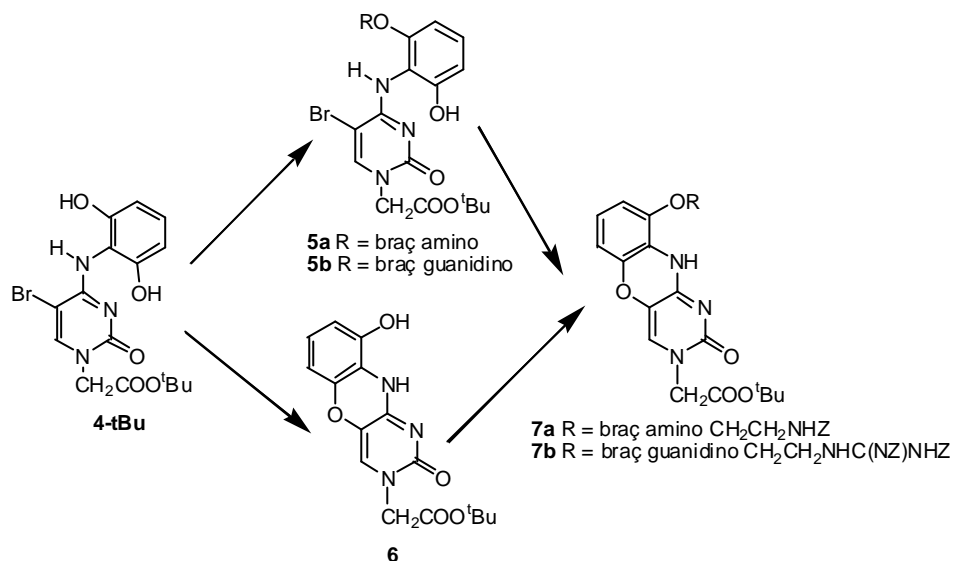


Figura 2.16. Possibles camins a seguir a partir de **4-tBu** per obtenir **7a** i **7b**

En el cas de la síntesi descrita per Matteucci⁶, per al nucleòsid, primer té lloc l'etapa d'introducció del braç i després es dona la ciclació. Això es deu a que les condicions de reacció de la ciclació també provoquen la desprotecció dels hidroxils de la desoxiribosa. Si s'intentés la introducció del braç sobre la molècula amb els hidroxils del sucre lliures es podrien formar molts subproductes que disminuirien el rendiment de la reacció (Figura 2.17).

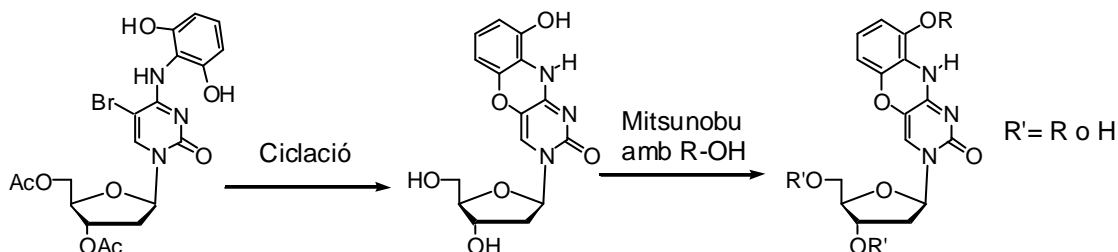


Figura 2.17. Possibles subproductes que es podrien formar en la síntesi del nucleòsid si es realitza en primer lloc la reacció de ciclació i a continuació la incorporació del braç amino

En el nostre cas, en no tenir la ribosa, desapareix aquesta necessitat d'introduir el braç abans de ciclitzar. A més, si s'intenta en primer lloc la introducció del braç ens trobem amb 2 grups fenòlics sobre els que es pot donar la reacció, de manera que cal controlar molt bé les condicions de reacció per tal d'evitar que es doni la doble alquilació. Un altre punt a favor de realitzar la ciclació en primer lloc és el fet de tenir el màxim nombre d'etapes possible comuns per a la síntesi dels dos monòmers amb funcionalitat amino i guanidino. Malgrat tot, s'intentaran totes les possibilitats per tal d'estudiar les diferents reaccions i poder decidir en quin cas els rendiments són més elevats.

Comentarem en primer lloc l'obtenció dels alcohols necessaris per a l'alquilació del fenol. Dels dos braços, la N-Z-etanolamina és un reactiu comercial, però el derivat necessari per a introduir el braç guanidino s'ha de sintetitzar. És veritat que també existeix la possibilitat d'introduir el braç amino i, un cop sintetitzada la nucleobase,

guanidinilar la funcionalitat amino, o bé guanidinilar directament els grups amino en l'estructura d'un oligòmer¹⁵. Però la preparació del braç amb funcionalitat guanidino suposa tenir un esquema de síntesi més convergent i sembla més convenient.

Les guanidines es poden preparar per reacció d'amines amb sals de S-metilisotiurea²⁵. Aquest darrer reactiu s'ha de modificar per tal de generar guanidines protegides amb el grup benziloxycarbonil (Z). Per això la síntesi del braç té lloc en dues etapes, com es pot veure a la figura 2.18.

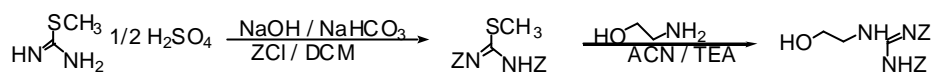


Figura 2.18. Esquema de síntesi del braç guanidino

La primera reacció consisteix en la protecció dels grups amino de la isotiurea²⁶ i té lloc per tractament del sulfat de S-metilisotiurea amb clorur de benziloxycarbonil (ZCl) en medi bàsic. S'obté el producte desitjat amb un rendiment del 51%. La segona reacció és la guanidinilació de l'etanolamina amb S-metilisotiurea en medi bàsic²⁷, que té lloc amb un rendiment del 36%. Tots dos productes es purifiquen per cromatografia en gel de sílice i l'alcohol necessari per a introduir el braç guanidino és un sòlid blanc amorf estable durant mesos a -20°C .

La reacció d'introducció del braç es una reacció de Mitsunobu entre un alcohol i un fenol. Els reactius emprats són els habituals per a aquest tipus de reacció (Ph_3P i DEAD). Bittner²⁸ i Manhas²⁹, entre d'altres, han descrit la formació d'aquil aril èters a partir de fenols i alcohol utilitzant la reacció de Mitsunobu. Aquesta és la reacció que té lloc en la formació de les abraçadores de guanina.

Durant el transcurs d'aquesta tesi el DEAD va deixar de ser un reactiu comercial i va haver de ser substituït per l'azodicarboxilat d'isopropil (DIPAD). Amb aquest, els rendiments de les reaccions han estat del mateix ordre tot i que els temps de reacció són lleugerament més llargs.

Un subproducte important de la reacció es Ph_3PO . Quan s'intenta aïllar el producte de la Mitsunobu son necessàries varies cromatografies per tal de separar completament el producte del Ph_3PO , amb les conseqüents disminucions del rendiment després de cada cromatografia.

Per tal d'eliminar la presència de Ph_3PO , que és soluble en el cru de reacció, es troba descrit l'ús de trifenilfosfina unida a un suport polimèric³⁰. D'aquesta manera el Ph_3PO que es forma queda unit al suport i pot ser separat per filtració. Això comporta una important simplificació del cru de reacció.

El primer intent realitzat, seguint l'esquema de síntesi descrit per Matteucci per al nucleòsid⁶, va ser per a introduir primer el braç i després ciclar. Però entre els productes de la reacció d'incorporació dels braços, en el cas del braç amino es detecta

la presència d'una molècula (un 8% del cru de síntesi) en la que s'ha donat una doble substitució i presenta dos braços amino (Figura 2.19).

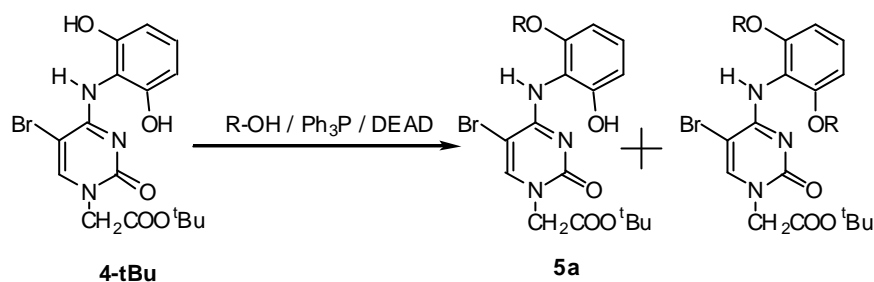


Figura 2.19. Reacció d'incorporació del braç amino sobre **4-tBu**

Els rendiments d'obtenció de **5a** i **5b** han estat del 63% i 34% respectivament, utilitzant trifenilfosfina immobilitzada sobre el suport polimèric.

Per a evitar la formació del subproducte de dialquilació de **4-tBu** es proposa la possibilitat de primer ciclar i a continuació introduir els braços. D'aquesta manera el substrat de la segona reacció només té una posició sobre la que es pot incorporar el braç.

La reacció de ciclació és una substitució nucleòfila aromàtica intramolecular. Per tal d'evitar reaccions intermoleculars cal que la ciclació tingui lloc en condicions d'elevada dilució.

A la bibliografia⁶ està descrita la reacció del derivat nucleosídic amb amoníac dissolt en alcohol metílic a temperatura ambient. Provant aquestes condicions de reacció, per CCF s'observa la desaparició del producte de partida, però en cap cas s'ha aconseguit aïllar el producte ciclat.

Com a alternativa a l'amoníac es procedeix a generar el medi bàsic necessari tractant el producte amb KF en alcohol etílic a reflux. En aquest cas, s'aïlla el producte cíclic, per cromatografia en columna de gel de sílice. El rendiment de la reacció de ciclació de **4-tBu** és del 76%. En les mateixes condicions, les ciclacions del **5a** i **5b** tenen rendiments del 36% i del 74% respectivament.

Quan es realitza en primer lloc la reacció de Mitsunobu (Figura 2.16) es parteix de **4-tBu**. En el cas del producte amb el braç amino la ciclació a **7a** s'aconsegueix amb un rendiment del 36%. El rendiment global des de **4-tBu** és del 22%. Per a l'abraçadora guanidino, el rendiment de ciclació és del 74% per a obtenir **7b**, de manera que el rendiment global resulta ser del 25%.

En la segona ruta (Figura 2.16), en primer lloc es realitza la ciclació de **4-tBu** a **6**, reacció que, com ja s'ha indicat anteriorment, té un rendiment del 76%. La reacció de Mitsunobu sobre **6** amb el braç amino té un rendiment del 40% i del 39% amb el braç guanidino. El rendiment global en ambdós casos és del 30%. Totes aquestes reaccions de Mitsunobu tenen lloc emprant la trifenilfosfina unida al polímer. A la figura 2.20 es resumeixen aquests resultats.

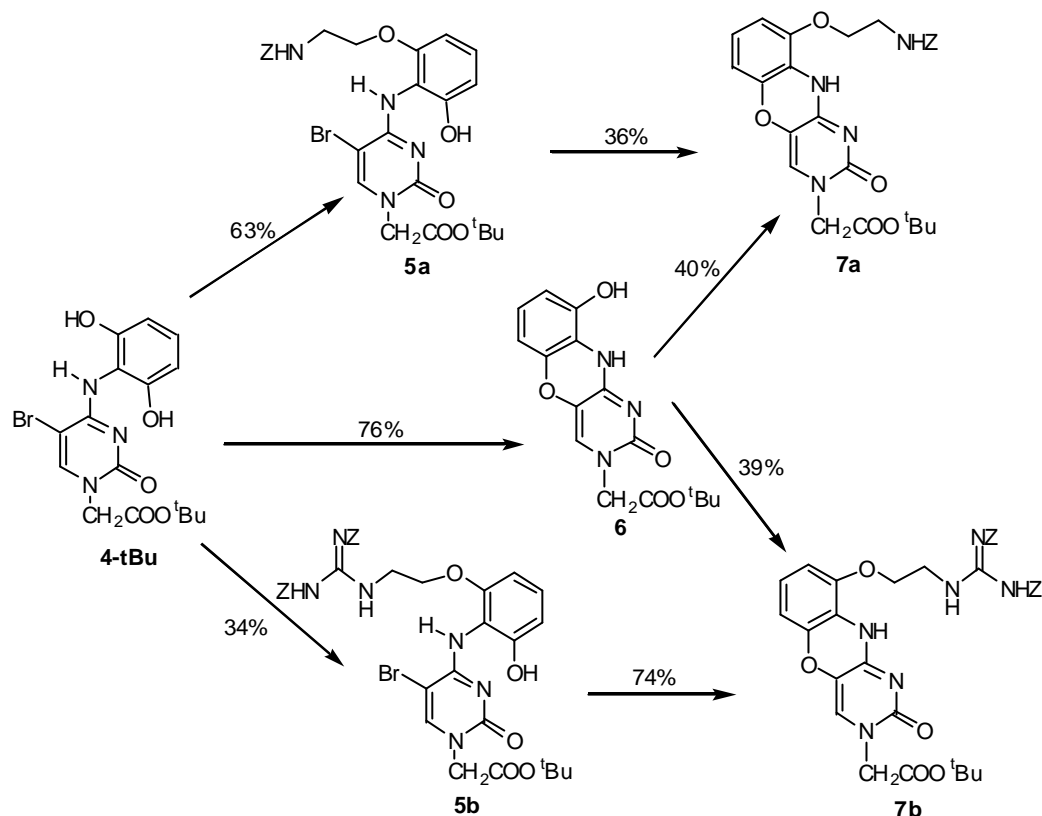


Figura 2.20. Resum dels resultats obtinguts en les reaccions de ciclació i de Mitsunobu.

Ruta de síntesi	Rendiment global
4-tBu → 5a → 7a	22%
4-tBu → 5b → 7b	25%
4-tBu → 6 → 7a	30%
4-tBu → 6 → 7b	30%

A més a més de tenir un rendiment superior, la ruta sintètica en la que la ciclació té lloc abans que la introducció del braç permet tenir un nou intermedi de reacció comú per a les dues vies, reduint així el nombre d'etapes sintètiques a realitzar per a obtenir els dos monòmers de PNA.

3.2.3. Incorporació de les nucleobases a l'esquelet d'aminoetilglicina

Un cop sintetitzades les bases nitrogenades **7a** i **7b** cal desprotegir la funció àcid carboxílic per a poder formar l'enllaç amida entre l'esquelet d'aminoetilglicina i aquests derivats.

En la bibliografia es troben descrits diversos mètodes de desprotecció de l'àcid. Thomson³¹ fa servir HCl_(g) en dioxà o TFA en funció de quina base nitrogenada tingui; en el cas de la citosina utilitza HCl.

D'entre les diferents possibilitats descrites, es decideix portar a terme la reacció de desprotecció per tractament amb HCl 4N en dioxà d'una suspensió de **7a** o **7b** durant 16 hores. En el cas de **7a** el rendiment de la desprotecció per donar **8a** ha estat del 95%. **8b** s'obté amb un rendiment del 98% (Figura 2.21). En ambdós casos el producte desprotegit s'aïlla per precipitació.

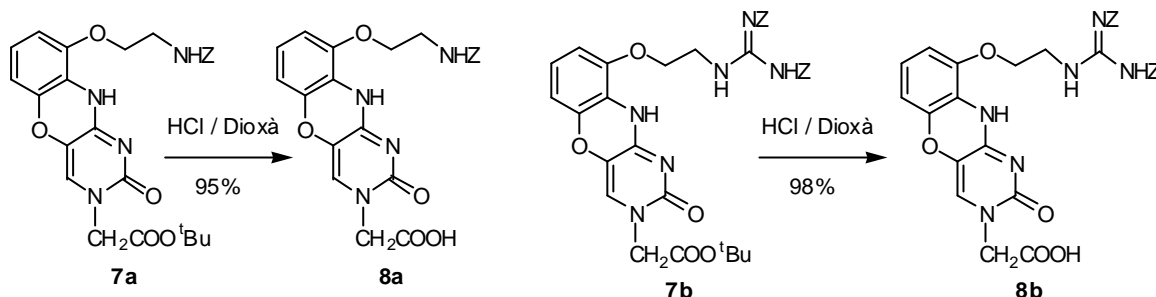


Figura 2.21. Reaccions de desprotecció dels àcids carboxílics de **7a** i **7b**

Per a procedir a la darrera part de la síntesi dels monòmers de PNA cal preparar l'aminoetilglicina convenientment protegida. El grup de Breipohl ha abordat la síntesi de l'esquelet peptídic seguint diverses estratègies en funció del grup protector de l'extrem amino-terminal de l'aminoàcid. Han utilitzat Fmoc³², Mmt³³, i Boc³⁴.

Degut a que l'ús de química Fmoc en la protecció dels monòmers de PNA precisa condicions de síntesi més suaus i els monòmers són més solubles, en el cas del present treball s'ha decidit utilitzar aquesta estratègia i seguir el mètode de síntesi descrit per Thomson³¹, en el qual l'obtenció de l'esquelet d'AEG té lloc en dues etapes (Figura 2.22).

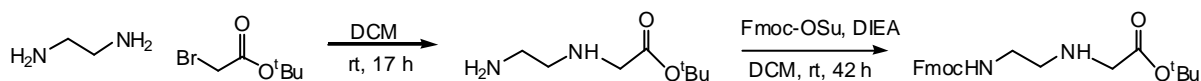


Figura 2.22. Esquema de síntesi de la 2-aminoetilglicina convenientment protegida (Fmoc-AEG-tBu)

En primer lloc s'alquila l'etilendiamina amb bromacetat de *tert*-butil i a continuació es protegeix el grup amino primari amb el grup Fmoc. L'alquilació d'un excés d'etilendiamina amb bromoacetat de *t*-butil porta a l'obtenció de *N*-(2-aminoetil)glicinat de *tert*-butil. Després d'un "work up" aquós s'obté una solució del producte en DCM que és utilitzada en la següent etapa de reacció sense més purificacions. Per tal de caracteritzar el producte, es concentra a sequedat una alíquota de la solució i s'analitza per ¹H-RMN i per espectrometria de masses, confirmant la presència del producte esperat.

A continuació es procedeix amb l'etapa de protecció de la funcionalitat amino terminal. El grup Fmoc s'incorpora sobre l'amina primària selectivament. Segons la bibliografia³¹ el producte es purifica per cromatografia en gel de sílice, però en el nostre cas en intentar analitzar el cru de la reacció per CCF es troba que és molt complex. En canvi, per HPLC el cromatograma obtingut mostra un aspecte molt més senzill. Aquest fet sembla indicar que el producte no és estable en contacte amb el gel

de sílice i no es pot purificar mitjançant el mètode descrit per Thomson. Per això es decideix realitzar la purificació per cromatografia HPLC en fase reversa semi-preparativa.

Una dissolució diluïda del producte en AcOEt es pot conservar a -20°C i utilitzar-la quan calgui, però es dona una progressiva pèrdua del grup Fmoc amb el pas del temps. Una solució per a aquest problema consisteix en rentar el cru de reacció amb una solució aquosa diluïda d'HCl i conservar-la a -20°C durant 12 hores, per a facilitar la precipitació. L'hidroclorur de N-2-(N-9-fluorenilmetoxicarbonil)-aminoetilglicinat de *tert*-butil, s'aïlla per filtració i es pot guardar a -20°C indefinidament.

A la bibliografia es troba descrit l'ús de diferents agents activants per a la reacció d'incorporació dels derivats àcid carboxílics de les bases nitrogenades a l'esquelet d'aminoetilglicina, alguns d'ells queden recollits a la figura 2.23. Una pràctica àmpliament estesa consisteix en utilitzar reactius d'uroni com a activants, com són HATU (hexafluorofosfat de 9-(7-azabenzotriazo-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluroni)³⁵ i TOTU (tetrafluoroborat de O-[(etoxicarbonil)cianometilnamino]-N,N,N',N'-tetrametiluroni)^{32,34,36} També es pot procedir a l'activació de la base nitrogenada com a anhídrid mixte³⁷, com a pentafluorofenil ester³⁸, com a ester d'hidroxibenzotriazole^{21,39}. Les carbodiimides també han estat utilitzades³⁵.

El grup de Thomson³¹ diferencia entre purines i pirimidines a l'hora de triar el mètode d'activació de la base nitrogenada. Han trobat que BOP/HOBt (hexafluorofosfat de benzotriazole-1-il-oxi-tris(dimetilamino)fosfoni)/(1-hidroxibenzotriazole) per a purines i EDC (hidroclorur de 1-(3-dimetilamino-propil)-3-etilcarbodiimida) per a pirimidines són els reactius més senzills i que donen millors rendiments.

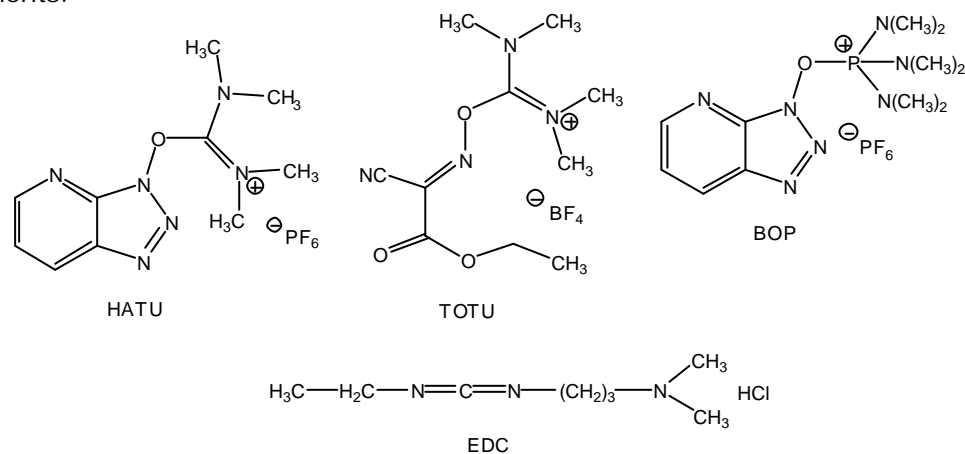


Figura 2.23. Agents activants utilitzats en la preparació de monòmers de PNA

Per tal de posar a punt les condicions de reacció que permetin l'alquil·lació de l'amina del N-2-(N-9-fluorenilmetoxicarbonil)-aminoetilglicinat de *tert*-butil, s'ha realitzat una primera prova amb N¹-carboximetil-5-bromouracil com a base nitrogenada i EDC com a agent activant. Per a alliberar novament la base es renta una dissolució de l'hidroclorur en DCM amb una dissolució aquosa saturada de NaHCO_3 . La reacció d'incorporació de la nucleobase a l'esquelet d'aminoetilglicina es

controla per HPLC i la purificació del producte final té lloc per HPLC semi-preparativa en fase reversa.

Com que els resultats amb el N¹-carboximetil-5-bromouracil han estat positius es decideix procedir amb la següent etapa de la síntesi de les abraçadores de guanina (Figura 2.24) utilitzant EDC com a agent activant i en DMF com a dissolvent. Igual que en la prova anterior, el seguiment de la reacció té lloc per HPLC. El procediment d'aïllament dels productes descrit a la bibliografia consisteix en una precipitació, però en el cas de la nucleobase modificada amb el braç amino, la suspensió de **9a** no es pot filtrar de manera que es procedeix a obtenir el producte per extraccions amb DCM. El rendiment de l'acoblament és del 63%. En el cas de l'abraçadora guanidino el producte de la reacció, **9b**, sí que es pot aïllar per precipitació i no cal recórrer a les extraccions amb DCM. En aquest cas del rendiment ha estat del 71%.

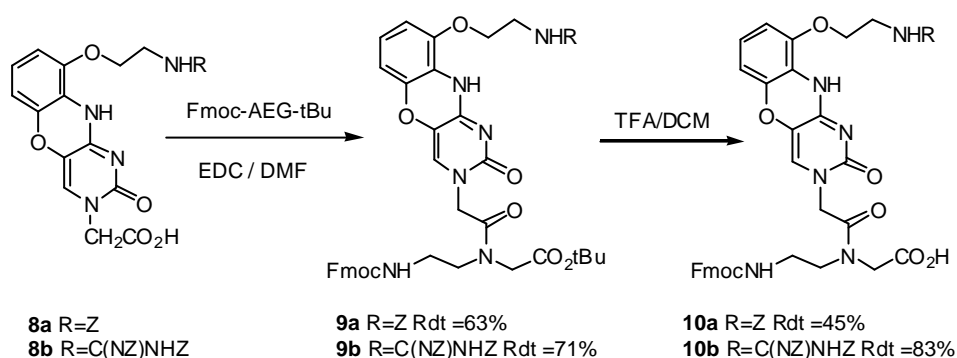


Figura 2.24. Incorporació de les nucleobases a l'aminoetilglicina i darrera etapa de desprotecció dels àcids carboxílics dels monòmers de PNA

La darrera etapa de la síntesi dels monòmers consisteix en la desprotecció de l'àcid carboxílic de l'aminoetilglicina, que es troba en forma d'ester *tert*-butílic (Figura 2.24). Thomson³¹ descriu un tractament amb TFA al 80% en DCM durant 30 minuts a 0°C i, a continuació, entre 1 i 2 hores a temperatura ambient. En el cas del monòmer de PNA de l'abraçadora amb el grup guanidino el reactiu de partida s'ha consumit després d'una hora a 25°C, a continuació es concentra el cru i el producte **10b** precipita en afegir èter etílic. El rendiment obtingut amb aquest procediment ha estat del 83%.

Quan s'intenta reproduir el mateix procediment amb l'abraçadora amino, el rendiment obtingut ha estat només del 20%. Per tal de millorar el resultat d'aquesta etapa s'han provat diferents mètodes. En primer lloc s'ha intentat utilitzar les mateixes condicions que en l'acidòlisi de **7a/b** per a rendir **8a/b**, és a dir, amb HCl /dioxà, però el rendiment, del 22%, no és satisfactori. Pensant que potser la concentració del TFA al 80% era massa elevada es decideix fer la desprotecció amb TFA al 40%, però el rendiment torna a ser del 22%. Pensant que el problema pot haver estat durant el processat del cru i que en eliminar el dissolvent, el producte format no sigui estable a la concentració d'àcid generada, superior al 80%, es repeteix la reacció amb TFA al 80% i s'afegeix èter al cru sense concentrar prèviament. En aquest cas el rendiment obtingut és del 45%. Tot i no ser òptim, és el millor que s'ha pogut aconseguir.

A la següent figura es recullen els cromatogrames dels monòmers de PNA de les abraçadores de guanina, un cop purificats.

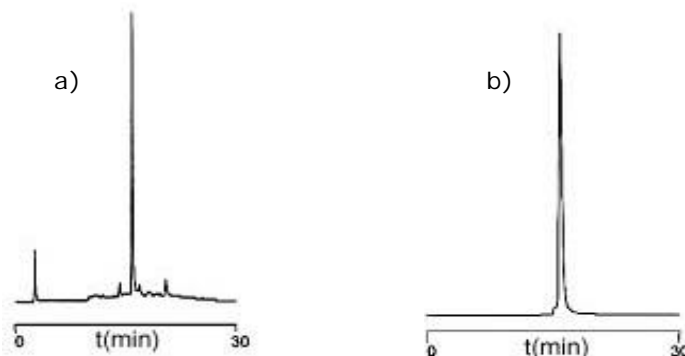


Figura 2.25. Cromatogrames corresponents als monòmers de PNA, abraçadores de guanina a) **10a** i b) **10b**. Eluent A: H₂O, eluent B: ACN, gradient: 0→50% de B en 30'.

3.3. Valoració global de la síntesi dels monòmers de PNA

Els monòmers de PNA de les abraçadores amino i guanidino de guanina s'han obtingut, en 8 etapes, a partir del 5-bromouracil amb rendiments globals del 5% i del 10% respectivament (Figura 2.26). Cal optimitzar particularment el rendiment de dues etapes, per una banda la introducció dels braços amino i guanidino i per altra banda la desprotecció final de l'àcid carboxílic del monòmer amino.

Tot i que el punt de partida per a la síntesi dels monòmers de PNA de les abraçadores de guanina havia estat el treball de Matteucci⁵, al final la síntesi realitzada en el nostre cas és força diferent de l'original. Hi ha diferències evidents derivades del fet de voler obtenir monòmers de PNA enlloc de nucleòsids. Les etapes que es troben en totes dues síntesis són la introducció de 2-aminoresorcinol sobre el C-4 de l'uracil, la incorporació dels respectius braços i la reacció de ciclació que permet obtenir l'esquelet tricíclic derivat de la fenoxazina.

És diferent el mètode d'activació de C-4 de l'uracil per a poder introduir el 2-aminoresorcinol, però el rendiment global obtingut és del mateix ordre. En el nostre cas hem assajat sense èxit el mètode d'activació que funciona per al nucleòsid. El principal problema ha estat la insolubilitat dels reactius en el medi de reacció.

Per a sintetitzar el nucleòsid, Matteucci incorpora en primer lloc el braç amino i a continuació cicla el producte obtenint el derivat de la fenoxazina. En el nostre cas hem introduït una millora en la reacció de Mitsunobu substituint la trifenilfosfina per una fosfina immobilitzada sobre un suport polimèric. Això ha eliminat la presència d'òxid de trifenilfosfina en la dissolució del cru, que en la síntesi del nucleòsid era una impuresa tant important que mai no havia arribat a ser eliminada del tot.

La reacció de ciclació té lloc en medi bàsic, Matteucci el genera amb NH₃/MeOH, però en el nostre cas aquesta opció no ha donat resultat, i en cap intent s'ha arribat a aïllar el producte ciclat. En canvi, una dissolució etanòlica de KF i **4-tBu** escalfada a reflux rendeix el derivat de fenoxazina amb un rendiment del 76%. La resta de les etapes de síntesi a partir d'aquest punt són completament diferents en

els dos esquemes de síntesi degut a la naturalesa dels monòmers que es volen obtenir en cada cas.

En primer lloc es realitza la desprotecció de la funcionalitat àcid carboxílic de **7a** i **7b** seguint les condicions descrites àmpliament a la bibliografia (HCl en dioxà) per a aquest tipus de reacció i els rendiments són pràcticament quantitius.

L'obtenció de **9a** i **9b**, per incorporació de les corresponents nucleobases sobre l'esquelet d'aminoetilglicina té lloc amb rendiments acceptables (63% i 71% respectivament). La principal modificació introduïda en aquesta etapa respecte al que es troba descrit a la bibliografia és el mètode de purificació. Enlloc de la cromatografia en gel de sílice, s'utilitza cromatografia en fase reversa ja que els productes de reacció no són del tot estables en contacte amb la sílice.

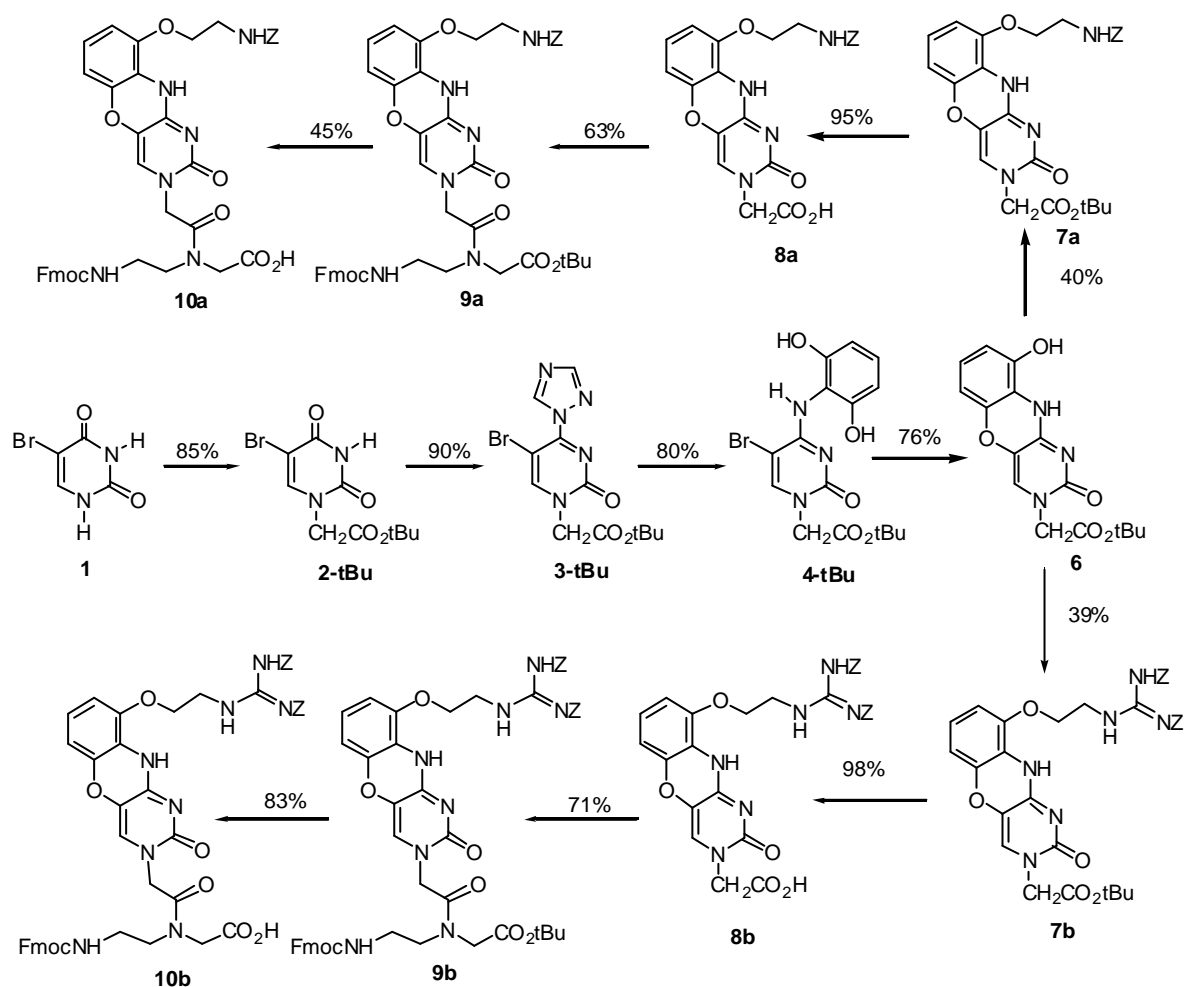


Figura 2.26. Síntesi de les abraçadores amino i guanidino de G

La darrera etapa de la síntesi és una de les que més problemes ha presentat. En el cas de l'abraçadora guanidino se segueix la metodologia habitual de la síntesi de monòmers de PNA (TFA al 80%) i s'obté un rendiment del 83% que, tot i no ser òptim, és acceptable. En el cas de l'abraçadora amino el rendiment obtingut en les mateixes condicions és molt baix. Després de diversos intents, variant els reactius i els procediments d'aïllament, el millor rendiment és del 45% amb TFA al 80% i

precipitant el producte sense concentrar prèviament. Cal seguir optimitzant aquesta reacció per a trobar unes condicions que permetin obtenir un rendiment millor.

Aquesta síntesi dels dos monòmers de PNA ha estat publicada recentment⁴⁰. Molt poc després va aparèixer a la bibliografia una síntesi alternativa del monòmer de PNA de l'abraçadora amino de G, en aquest cas utilitzant el grup Boc com a protector de l'amino terminal de l'aminoetilglicina⁴¹, que ha posat de manifest que els autors han ensopegat amb les mateixes dificultats que nosaltres.

Comparant l'esquema general de les dues síntesis, s'observa que l'estratègia és molt semblant en ambdós casos. Manoharan i col·laboradors⁴¹ també preparen per una banda el derivat de la base nitrogenada en forma d'alcoxycarbonilmetil derivat i per una altra banda el derivat d'aminoetilglicina amb els corresponents grups protectors (Boc per al grup amino i ester etílic per a l'àcid). Totes dues síntesis parteixen del 5-bromouracil, però a diferència del nostre cas, ells han sintetitzat **2** en forma de derivat etílic enlloc del *tert*-butílic.

Per a poder introduir el 2-aminoresorcinol sobre l'uracil, també activen la posició 4 amb triazole i el rendiment global de les dues etapes és similar al nostre, essent el seu lleugerament superior (76% vs 72%). A continuació realitzen la reacció de Mitsunobu amb trifenilfosfina i DEAD. No comenten cap problema de polisubstitució i tenen un rendiment del 80%. Com que no han descrit amb detall les condicions experimentals no es pot comparar el nombre d'equivalents utilitzats per a saber si això pot tenir importància en el fet de tenir una reacció de monosubstitució sobre els hidroxils fenòlics i no tenir doble introducció del braç.

La ciclació la duen a terme amb CsF i Cs₂CO₃ enlloc de KF, amb rendiment comparable al nostre. La següent etapa és la desprotecció de l'àcid carboxílic per a poder incorporar-lo a l'esquelet d'aminoetilglicina, que en totes dues síntesis té lloc amb rendiments pràcticament quantitius.

Per a incorporar la base nitrogenada a l'esquelet d'aminoetilglicina, en el nostre cas el reactiu d'acoblament és una carbodiimida, l'EDC, mentre que Manoharan utilitza DCC (*N,N*-diciclohexilcarbodiimida) i DhbtOH (3,4-dihidroxi-3-hidroxi-4-oxo-1,2,3-benzotriazina). Tot i que els nostres rendiments encara es poden optimitzar (63% i 71%) són millors que el descrit per Manoharan per al monòmer Boc (50%).

La desprotecció final de l'ester de l'àcid carboxílic de **9a** i **9b**, en el seu cas (ester etílic) funciona perfectament i nosaltres (ester *tert*-butílic) encara no hem aconseguit uns rendiments òptims en una reacció que previsiblement hauria de ser senzilla.

El rendiment global que obté Manoharan⁴¹ és del 21%. En general, els seus rendiments parcials són lleugerament superiors als nostres. Les diferències fonamentals es troben en la reacció de Mitsunobu en la que el seu rendiment és el doble que el nostre (80% vs 40%), en l'etapa final de la síntesi, que en el nostre cas encara s'ha d'optimitzar, i en l'etapa d'incorporació de la nucleobase a l'esquelet d'aminoetilglicina, en la que els nostres rendiments són millors.

4. BIBLIOGRAFIA

- ¹ Luyten, I.; Herdewijn, P. **Hybridization properties of base-modified oligonucleotides within the double and triple helix motif**, *Eur. J. Med. Chem.* **1998**, *33*, 515-576
- ² Herdewijn, P. **Heterocyclic modifications of oligonucleotides and antisense technology**, *Antisense Nucleic Acid Drug*, **2000**, *10*, 297-310
- ³ Lin, K-Y; Jones, R.J.; Matteucci, M. **Tricyclic 2'-deoxycytidine analogs: syntheses and incorporation into oligodeoxynucleotides which have enhanced binding to complementary RNA**, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3873-3874
- ⁴ Matteucci, M.D.; Von Krosigk, U. **Hybridization properties of oligonucleotides bearing a tricyclic 2'-deoxycytidine analog based on a carbazole ring system**, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37(29)*, 5057-5060
- ⁵ Wang, J.; Lin, K-Y.; Matteucci, M.D. **Synthesis and binding property of an oligonucleotide containing tetrafluorophenoxazine**, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 8385-8388
- ⁶ Lin, K-Y; Matteucci, M. **A cytosine analogue capable of clamp-like binding to a guanine in helical nucleic acids**, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8531-8532
- ⁷ Flanagan, W.M.; Wolf, J.J.; Olson, P.; Grant, D.; Lin, K.-Y; Wagner, R.W.; Matteucci, M. **A cytosine analog that confers enhanced potency to antisense oligonucleotides**, *Proc. Natl. Am. Soc. USA*, **1999**, *96*, 3513-3518
- ⁸ Flanagan, W.M.; Wagner, R.W.; Grant, D.; Lin, K-Y; Matteucci, M. **Cellular penetration and antisense activity by a phenoxazine-substituted heptanucleotide**, *Nature Biotechnol.* **1999**, *17*, 48-52
- ⁹ Maier, M.A.; Leeds, J.M.; Balow, G.; Springer, R.H.; Bharadwaj, R.; Manoharan, M. **Nuclease resistance of oligonucleotides containing the tricyclic cytosine analogues phenoxazine and 9-(2-aminoethoxy)-phenoxazine ("G-Clamp") and origins of their nuclease resistance properties**, *Biochemistry*, **2002**, *41*, 1323-1327
- ¹⁰ Wilhelmsson, L.M.; Holmen, A.; Lincoln, P.; Nielsen, P.E.; Norden, B. **A highly fluorescent DNA base analogue that forms Watson-Crick base pairs with guanine**, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123(10)*, 2434-2435
- ¹¹ Eldrup, A.B.; Nielsen, B.B.; Haaima, G.; Rasmussen, H.; Kastrup, J.S.; Christensen, C.; Nielsen, P.E. **1,8-naphthyridin-2(1H)-ones. Novel bicyclic and tricyclic analogues of thymine in peptide nucleic acids (PNAs)**, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 1781-1790
- ¹² Christensen, C.; Eldrup, A.B.; Haaima, G.; Nielsen, P.E. **1,8-naphthyridin-2,7-(1,8H)-dione, is an effective mimic of protonated cytosine in peptide nucleic acid triplex recognition systems**, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 31221-3124
- ¹³ Deshmukh, R.R.; Leitch, W.E.,II; Sanghvi, Y.S.; Cole, D.L. **Large-scale chromatographic purification of oligonucleotides**. *Separation Science and Technology*, 2(*Handbook of Bioseparations*), 2000, 511-534.
- ¹⁴ Ray, A.; Norden, B. **Peptide nucleic acid (PNA): its medical and biotechnical applications and promise for the future**, *FASEB J.* **2000**, *14(9)*, 1041-1060
- ¹⁵ Maier, M.A.; Barber-Peoc'h, I.; Manoharan, M. **Postsynthetic guanidinylation of primary amino groups in the minor and major grooves of oligonucleotides**, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 7613-7616
- ¹⁶ Wilds, C.J.; Maier, M.A.; Terreshko, V.; Manoharan, M.; Egli, M. **Direct observation of a cytosine analogue that forms five hydrogen bonds to guanosine: guanidino G-clamp**, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41(1)*, 115-117
- ¹⁷ Prelog, V.; Wieser, K. **Zur Kenntiss des Kohlenstoffringes**, *Helv. Chim. Acta*, **1948**, 870
- ¹⁸ Baker, B.R.; McEwen, W.L.; Kinley, W.N. **Biotin VII. Synthesis of dl-epiBiotin**, *J. Org. Chem.* **1947**, 322-327

- ¹⁹ DeNapoli, L.; Messere, A.; Montesarchio, D.; Piccialli, G.; Santacroce, C. **Synthesis of 2',3'-dideoxy-2',3'-didehydronucleoside analogues as potential anti HIV agents**, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, *2*(4), 315-318
- ²⁰ DeNapoli, L.; Messere, A.; Montesarchio, D.; Piccialli, G.; Santacroce, C. **Synthesis of 4-substituted pyrimidine 2',3'-dideoxynucleosides**, *Nucleotides & Nucleosides*, **1991**, *10*(8), 1719-1728
- ²¹ Dueholm, K.L.; Egholm, M.; Behrens, C.; Christensen, L.; Hamsen, H.F.; Vulpius, T.; Petersen, K.H.; Berg, R.H.; Nielsen, P.E.; Buchardt, O. **Synthesis of peptide nucleic acid monomers containing the four natural nucleobases: thymine, cytosine, adenine and guanine and their oligomerization**, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*(19), 5767-5773
- ²² Ferrer, E.; Shevchenko, A.; Eritja, R. **Synthesis and hybridization properties of DNA-PNA chimeras carrying 5-bromouracil and 5-methylcytosine**, *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 291-297
- ²³ Ali, O.M.; Franch, T.; Gerdes, K.; Pedersen, E.B. **Targeting of nucleic acid functions: addressing to a branch point an oligodeoxynucleotide conjugated with an intercalator**, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*(21), 4919-4924
- ²⁴ Robles, J.; Grandas, A.; Pedroso, E. **Synthesis of modified oligonucleotides containing 4-guanidino-2-pyrimidone nucleobases**, *Tetrahedron*, **2001**, *57*, 179-194
- ²⁵ Bergeron, R.J.; McManis, J.S. **Total synthesis of (±)-15-deoxyspergualin**, *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 1700-1703
- ²⁶ Lal, B.; Gangopadhyay, A.K. **A practical synthesis of free and protected guanidine acids from amino acids**, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*(14), 2483-2486
- ²⁷ Ramakrishna, N.V.S.; Moe, T.S.; Khandelwal, Y.; Naik, R.G.; Lal, B.; Gupte, R.D.; Vadlamudi, R.V.S.V. **Synthesis of RDG peptidomimetic analogues of 2,5-diketopiperazine**, *Indian J. Chem.* **1999**, *38B*, 1331-1337
- ²⁸ Bittner, S.; Assaf, Y. **Use of activated alcohols in the formation of aryl ethers**, *Chem Ind.* **1975**, *6*, 281
- ²⁹ Manhas, M.S.; Hoffman, W.A.; Lai, B.; Bose, A.K. **Steroids. Part X. A convenient synthesis of alkyl aryl ethers**, *J. Chem. Soc. Perkin I*, **1975**, *94*, 461-463
- ³⁰ Tunoori, A.R.; Dutta, D.; Georg, G.I. **Polymer bound triphenylphosphine as traceless reagent for Mitsunobu reactions in combinatorial chemistry: synthesis of aryl ethers from phenols and alcohols**, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 8751-8754
- ³¹ Thomson, S.A.; Josey, J.A.; Cadilla, R.; Gaul, M.D.; Hassman, C.F.; Luzzio, M.L.; Pipe, A.J.; Reed, K.L.; Rica, D.J.; Wiethe, R.W.; Noble, S.A. **Fmoc mediated synthesis of peptide nucleic acids**, *Tetrahedron*, **1995**, *51*(22), 6179-6194
- ³² Breipohl, G.; Knolle, J.; Langer, D.; O'Malley, G.; Uhlmann, E. **Synthesis of polyamide nucleic acids using a novel Fmoc/Mmt protecting-group combination**, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*(6), 665-670
- ³³ Will, D.W.; Breipohl, G.; Langner, D.; Knolle, J.; Uhlmann, E. **The synthesis of polyamide nucleic acids using a novel monomethoxytrityl protecting-group strategy**, *Tetrahedron*, **1995**, *5*(44), 12069-12082
- ³⁴ Breipohl, G.; Will, D.W.; Peyman, A.; Uhlmann, E. **Novel synthetic routes to PNA monomers and PNA-DNA linker molecules**, *Tetrahedron*, **1997**, *53*(43), 14671-14686
- ³⁵ Seitz, O.; Köhler, O. **Convergent strategies for the attachment of fluorescing reporter groups to peptide nucleic acids in solution and in solid phase**, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*(18), 3911-3925
- ³⁶ Lutz, M.J.; Will, D.W.; Breipohl, G.; Benner, S.A.; Uhlman, E. **Synthesis of a monocharged peptide nucleic acid (PNA) analog and its recognition as substrate by DNA polymerases**, *Nucleosides & Nucleotides*, **1999**, *18*(3), 393-401
- ³⁷ Kosynkina, L.; Wang, W.; Liang, T.C. **A convenient synthesis of chiral peptide nucleic acid (PNA) monomers**, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*(29), 5173-5176

- ³⁸ Stetsenko, D.A.; Lubyako, E.N.; Potapov, V.K.; Azhikima, T.L.; Sverdlov, E.D. **New approach to solid phase synthesis of polyamide nucleic acids analogues (PNA) and PNA-DNA conjugates**, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*(20), 3571-3574
- ³⁹ Falkiewicz, B.; Kolodziejczyk, A.; Liberek, B.; Wisniewski, K. **Synthesis of achiral and chiral peptide nucleic acid monomers using Mitsunobu reaction**, *Tetrahedron*, **2001**, *57*, 7909-7917
- ⁴⁰ Ausín, C.; Ortega, J-A.; Robles, J.; Grandas, A.; Pedroso, E. **Synthesis of amino- and guanidino-G-clamp PNA monomers**, *Org. Lett.* **2002**, *4*(23), 4073-4075
- ⁴¹ Rajeev, K.G.; Maier, M.A.; Lesnik, E.A.; Manoharan, M. **High-affinity peptide nucleic acid oligomers containing tricyclic cytosine analogues**, *Org. Lett.* **2002**, *4*(25), 4395-4398

CAPÍTOL 3: SÍNTESI DE PNAs
INCORPORANT LES ABRAÇADORES DE
GUANINA I ESTUDI DE L'ESTABILITAT
DELS DÚPLEXS PNA-DNA

1. INTRODUCCIÓ

Al llarg dels anys s'ha desenvolupat un gran nombre de modificacions químiques dels àcids nucleics per tal de millorar les seves característiques i obtenir productes que poguessin ser aplicats amb més èxit a la teràpia antisentit. D'entre tots ells, un dels anàlegs que ha presentat millors propietats és el PNA (àcid nucleic peptídic) que té característiques habituals dels pèptids, conservant alhora la capacitat de reconeixement dels oligonucleòtids. Algunes de les característiques més positives dels oligòmers de PNA són l'elevada afinitat que presenten per la cadena complementària de DNA o RNA i la seva resistència a nucleases i proteases. Els principals desavantatges són la poca solubilitat en medi fisiològic, ja que no tenen càrrega, i la tendència a autoagregar-se.

El principal objectiu d'aquest capítol és descriure la incorporació de les abraçadores amino i guanidino de guanina en oligòmers de PNA i l'estudi, mitjançant espectroscopia d'ultraviolat, de l'afinitat i selectivitat d'aquests anàlegs de citosina en seqüències de PNA per guanines en oligonucleòtids complementaris.

1.1. Origen dels PNAs

El PNA va aparèixer com a resultat d'una cerca d'anàlegs oligonucleotídics que s'unissin específicament al DNA en forma de doble cadena, com a part de l'anomenada teràpia antigen. Fins a aquell moment, s'utilitzaven oligonucleòtids per a formar una triple hèlix, generalment sobre dianes de tipus homopurina¹.

Per això, en el grup del professor Ole Buchardt en col·laboració amb el grup d'en Peter Nielsen² van voler dissenyar una nova molècula que fos capaç de reconèixer DNA de doble cadena per aparellament de bases de tipus Hoogsteen, mitjançant nucleobases o altres lligands que tinguessin les mateixes propietats de donador i acceptor d'enllaços d'hidrogen.

Les distàncies adients en l'esquelet es van estimar amb un model computacional, construint un tríplex T-A-T en el que s'eliminava l'esquelet de desoxiribosafosfat de la tercera cadena i es construïa un esquelet de poliamida al seu lloc. Segons aquest model, el nombre òptim d'enllaços entre les nucleobases va resultar ser de 12 (el mateix que en el cas de DNA) i el nombre d'enllaços entre l'esquelet i la nucleobase de 2 o 3³.

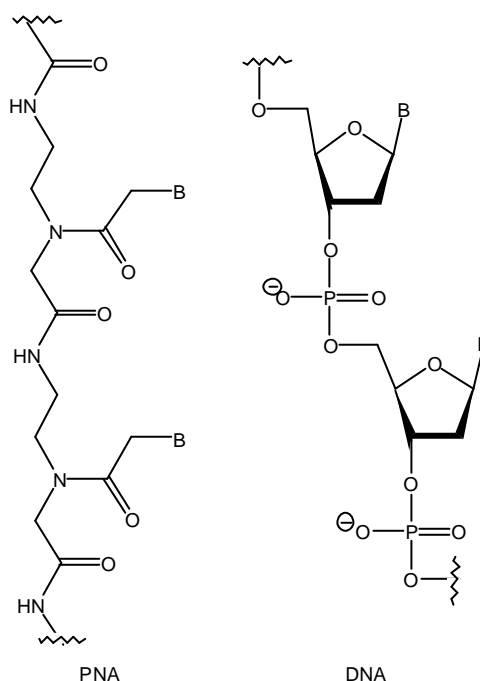


Figura 3.1. Estructures de PNA i DNA, on es pot veure que les distàncies de les bases a l'esquelet i entre dues nucleobases són les mateixes en ambdós casos.

Amb aquests resultats van decidir que l'estructura que s'ajustava millor consistia en unitats de 2-aminoetilglicina a les quals s'unia la nucleobase a través d'un grup metilencarbonil (Figura 3.1). Aquest esquelet té la mateixa forma que el de DNA amb un elevat grau de rigidesa conformacional degut a la presència de 2 grups amida per unitat³. Per al disseny original es va triar la timina com a nucleobase ja que no té cap grup amino exocíclic amb necessitat de protecció. A més, van incloure una lisina en l'extrem C-terminal per tal de reduir fenòmens

d'autoagregació i permetre el càlcul del rendiment de la síntesi mitjançant una anàlisi d'aminoàcids. Un altre avantatge de la presència d'una molècula de lisina és que a pH fisiològic el grup amino de la cadena lateral de l'aminoàcid es troba protonat, de manera que això augmenta les interaccions electrostàtiques amb els oligonucleòtids no modificats¹.

A partir de l'esquelet peptídic inicial format per unitats de 2-aminoetilglicina han aparegut un seguit de modificacions químiques⁴ per tal d'aconseguir millorar les propietats d'aquests mítics de PNA.

1.2. Característiques del PNA

Per convenció, el PNA és representat com un pèptid, començant per l'extrem amino terminal (a l'esquerra) fins a l'extrem C-terminal (a la dreta). Comparant amb el DNA, l'extrem N-terminal és equivalent a 5' i el C-terminal a 3'.

1.2.1. Estabilitat química

A diferència del DNA, que pateix depurinacions quan és tractat amb àcids forts, el PNA és estable als àcids. Això permet sintetitzar PNA utilitzant grups habituals en la química de pèptids que necessiten tractaments amb TFA, TFMSA o HF. A més, el PNA és prou estable a bases febles com per a poder utilitzar grups protectors que s'eliminin per tractament amb reactius habituals de desprotecció com són amoníac i piperidina.

1.2.2. Modes d'unió a DNA

1.2.2.1. Dúplexs PNA-DNA^{5,6}

El PNA es pot unir al DNA de cadena senzilla (ssDNA) amb dues orientacions, paral·lela i antiparal·lela, essent l'antiparal·lela la més habitual^{7,8}, amb l'extrem amino del PNA unit a l'extrem 3' del DNA (Figura 3.2).

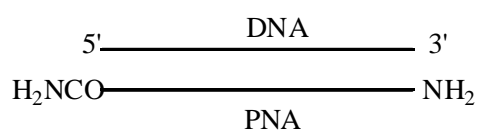


Figura 3.2. Representació d'un dúplex PNA-DNA amb orientació antiparal·lela

Estudis termodinàmics⁷ han mostrat que la disminució entròpica és pràcticament la mateixa en la formació de dúplexs DNA:DNA i PNA:DNA. Això sembla indicar que el PNA monocadena té el mateix grau d'organització que el DNA. Es creu que l'elevada estabilitat dels híbrids PNA:DNA es deu a la manca de repulsió electrostàtica entre les 2 cadenes junt amb la poca flexibilitat de l'esquelet de poliamida del PNA. Una altra dada experimental important indica que la discriminació de seqüència és més eficient en el cas d'interaccions PNA-DNA que per a DNA-DNA.

Les molècules de PNA no tenen un sentit d'helicitat preferit i s'espera que en els dúplexs amb àcids nucleics aquest vingui dirigit per la cadena de DNA o RNA. Efectivament, un dúplex DNA-PNA té una estructura d'hèlix dextrògira de tipus Watson-Crick amb un solc major ample i profund i un solc menor estret i poc profund. L'alçada de l'hèlix és d'aproximadament 42 Å amb uns 13 parells de bases per volta i un diàmetre de 23 Å (Figura 3.3). Els parells de bases estan apilats de diferents maneres però tots es troben desplaçats cap al solc menor permetent que el solc major s'estengui fins a prop del centre de l'hèlix. Els grups carbonil dels connectors entre l'esquelet peptídic i les nucleobases estan orientats al llarg de l'esquelet dirigits cap a l'extrem C-terminal, els enllaços amida primaris estan en conformació trans i les regions d'etilens presenten força heterogeneïtat.

A la figura 3.3 es recullen les estructures promig de diferents tipus de dúplexs en els que participen oligòmers de PNA. Les dues primeres estructures corresponen a dúplexs PNA-DNA, el primer amb orientació antiparal·lela i el segon amb paral·lela. S'observa que l'estructura de les hèlixs és diferent. La tercera estructura correspon a un dúplex PNA-PNA i la seva estructura és més semblant a la del dúplex PNA-DNA antiparal·lel que no pas a la del paral·lel.

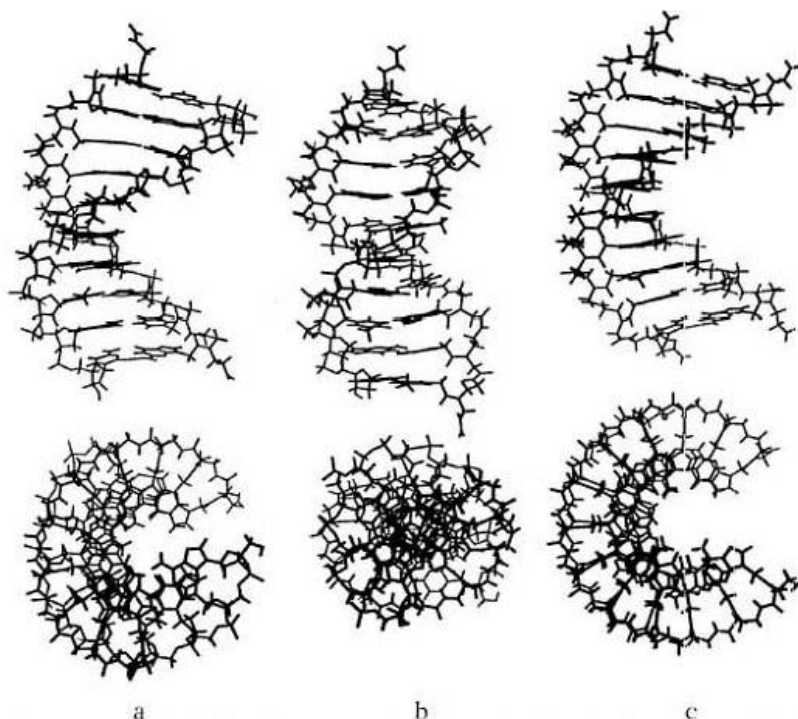


Figura 3.3. Estructures promig dels diferents tipus de dúplexs: (a) PNA-DNA antiparal·lel, (b) PNA-DNA paral·lel i (c) PNA-PNA. Les imatges superiors corresponen a la vista lateral i les inferiors a la superior⁹.

1.2.2.2. Modes d'unió a DNA de doble cadena¹⁰

S'han descrit quatre modes diferents d'unió del PNA amb dúplexs de DNA (Figura 3.4).

1. Unió-tríplex: és una unió convencional de tipus tríplex en la que la cadena de PNA s'uneix al DNA en el solc major de la doble hèlix.

2. Invasió-tríplex: dos oligòmers de PNA, preferiblement antiparal·lels, envaeixen i obren la doble hèlix de DNA i formen un tríplex intern PNA-DNA-PNA de tipus Watson-Crick i Hoogsteen. És el mètode d'unió preferit dels oligòmers de PNA homopirimidínics.
3. Invasió-dúplex: oligòmers de PNA homopurínics, rics en G, formen dúplexs amb els oligodesoxinucleòtids complementaris degut a que tenen una estabilitat tèrmica especialment elevada. Aquest mode d'unió és possible si la doble hèlix de DNA està desestabilitzada.
4. Invasió-doble-dúplex: en aquest mode d'unió, els dos oligòmers de PNA tenen seqüències complementàries i formen dos dúplexs PNA-DNA amb les dues cadenes de DNA en una mateixa regió del dúplex de DNA.

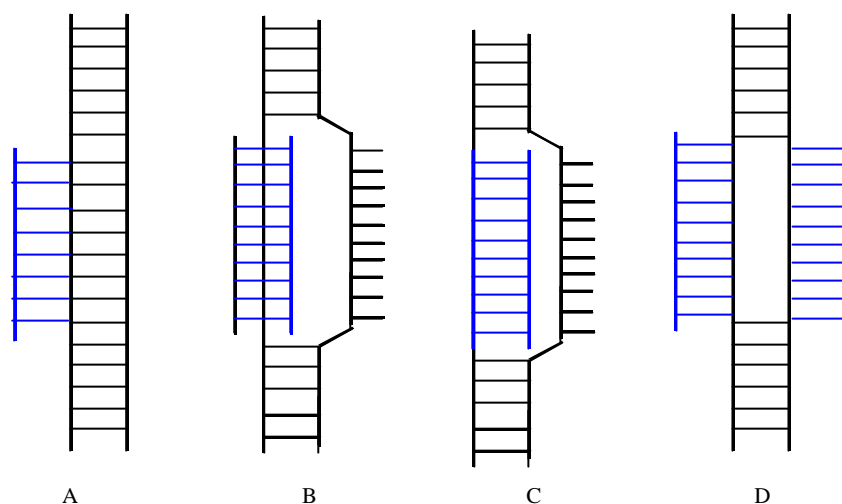


Figura 3.4. Esquema dels modes d'unió de PNA (en blau) al DNA (en negre): A. Unió-tríplex, B. Invasió-tríplex, C. Invasió-dúplex i D. Invasió-doble-dúplex

2. SÍNTESI DE PNA

2.1. Descripció del mètode de síntesi

Els oligòmers de PNA se sintetitzen utilitzant les tècniques tradicionals de síntesi de pèptids en fase sòlida. Tot i que en química de pèptids s'han proposat un gran nombre d'esquemes de protecció, només dues d'aquestes metodologies, en les que els reactius necessaris són comercials, han estat desenvolupades per a sintetitzar PNA. Són les que tenen Boc i Fmoc com a protectors del grup amino terminal dels monòmers.

El principal avantatge de la síntesi en fase sòlida de PNA amb química Fmoc és que es pot adaptar fàcilment als sintetitzadors de DNA comercials.

A més del grup Fmoc com a protector temporal de l'amino primària de l'aminoetilglicina, cal un altre grup protector permanent per a les amines exocíclics de les nucleobases a, c i g (s'utilitzen minúscules per a diferenciar els monòmers de PNA dels nucleòsids). Aquest grup ha de ser estable en les condicions

de síntesi, eliminable en les condicions del desancoratge i, a més, permetre que els monòmers siguin solubles a una concentració prou elevada com per a dur a terme la síntesi. De tots els candidats provats, el grup benzhidriloxicarbonil (Bhoc) va ser el protector que va donar millors resultats. Els monòmers (Figura 3.5) són solubles a una concentració de 0,2 M en N-metilpirrolidona (NMP) i es poden eliminar en menys d'un minut amb TFA.

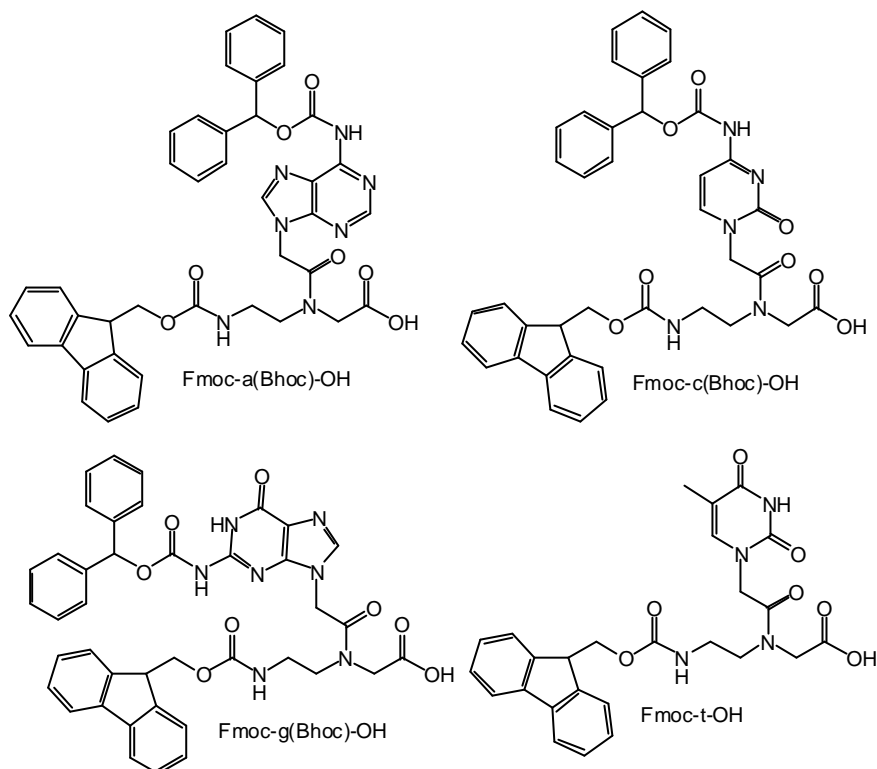


Figura 3.5. Monòmers comercials per a la síntesi de PNA amb química Fmoc

Per a realitzar la síntesi dels oligòmers cal triar el suport sòlid. Tant els grups PAL com XAL han estat utilitzats com a espaiadors, i es poden incorporar sobre un ampli ventall de resines. Els millors resultats, en rendiment i puresa, s'han obtingut amb co-polímers de polietilenglicol-poliestirè (Figura 3.6).

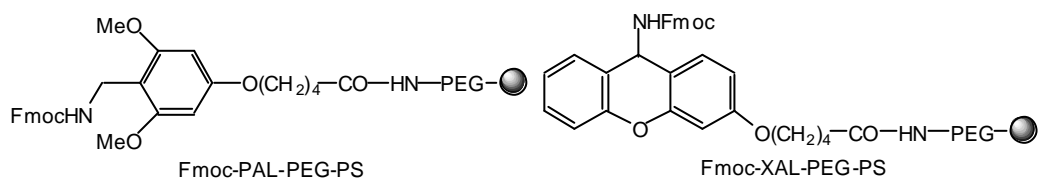


Figura 3.6. Resines amb espaiadors més utilitzats en la síntesi en fase sòlida de PNA amb química Fmoc

Aquests suports són comercials i universals. Quan la resina s'utilitza amb una funcionalització elevada, els oligòmers en creixement tendeixen a agregar-se i això és una de les raons principals per a que una síntesi no funcioni correctament. La funcionalització òptima de les resines sembla estar al voltant de 0,12 mmol/g.

L'obtenció dels oligòmers de PNA s'aconsegueix per repetició d'un cicle que conté les següents etapes: desprotecció, activació+acoblament i bloqueig (Figura 3.7).

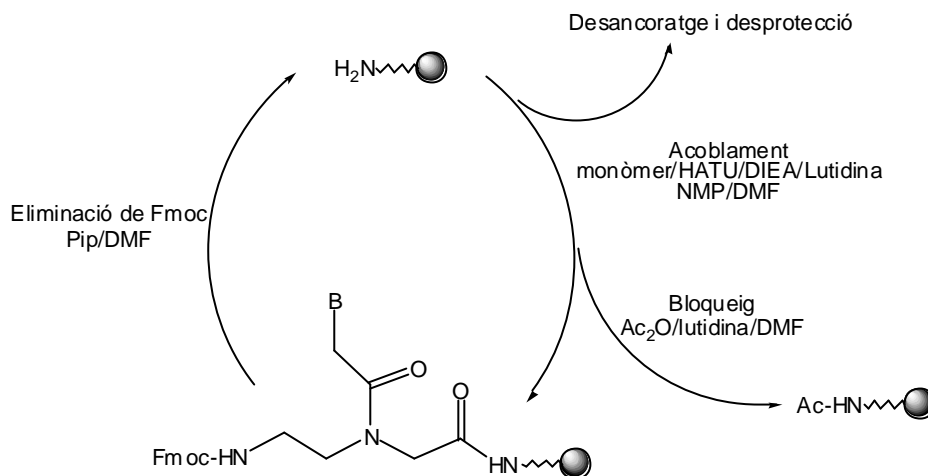


Figura 3.7. Esquema del cicle de síntesi de PNA en fase sòlida

2.1.1 Desprotecció

La reacció d'eliminació del grup protector Fmoc té lloc per tractament de la resina amb una dissolució de piperidina al 20% en DMF.

El valor de pK_a del grup 2-aminoetil en el PNA es troba entre 10 i 11, mentre que el dels grups α -amino dels aminoàcids està entre 9 i 10. Aquesta major basicitat junt amb una geometria favorable per a transposicions, fan que hi hagi una reacció secundària habitual. Aquesta consisteix en la migració dels grups nucleobase-acetil a la posició N-terminal. Es dona quan el grup amino primari de l'extrem amino terminal de l'oligòmer de PNA ataca al carbonil que uneix la nucleobase a l'esquelet peptídic (Figura 3.8, A).

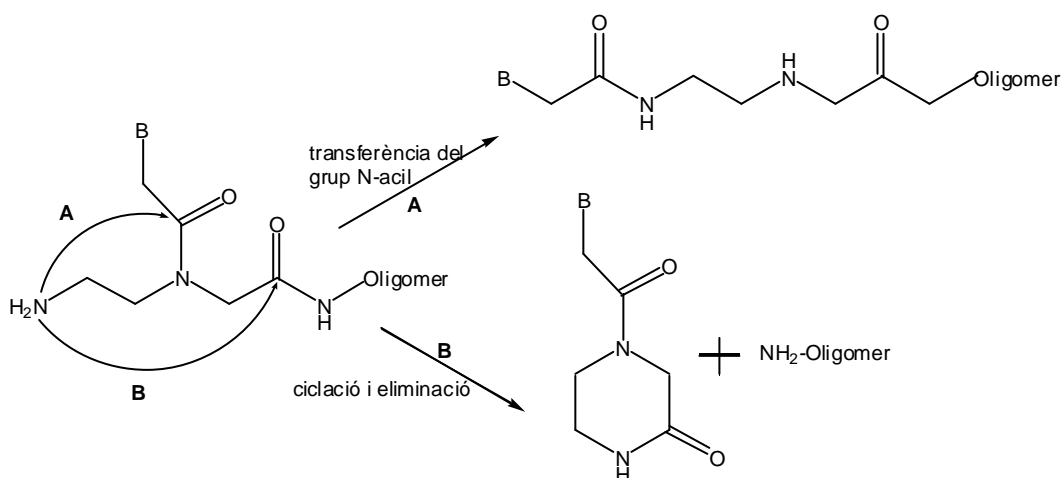


Figura 3.8. Reaccions secundàries que es poden donar en presència del grup amino terminal de l'oligòmer de PNA lliure¹¹

Aquesta migració rendeix un grup amino secundari sobre el que es pot donar un subseqüent acoblament. L'oligòmer que s'obté a partir d'aquesta reacció secundària té la mateixa massa que el producte esperat però les seves propietats d'hibridació són diferents de les de l'oligòmer objectiu de la síntesi. La facilitat amb la que es dona aquesta reacció depèn del pH de la solució. En el cas d'un tractament de 15 minuts amb DIEA al 5% en DCM, es dona un 3-5% de migració⁴.

Una altra reacció secundària intramolecular que es dona en la síntesi de PNA és l'atac de l'amina primària de l'extrem N-terminal sobre el grup carbonil de l'enllaç amida que hi ha entre dos monòmers (Figura 3.8, B). En aquest cas es perd la unitat N-terminal de la seqüència en forma de dicetopiperazina i queda una amina primària a la resina sobre la que es pot incorporar el següent monòmer donant lloc a seqüències de deleció.

2.1.2. Acoblaments

L'activant utilitzat habitualment és l'HATU i necessita la presència d'una base terciària per a desenvolupar la seva funció. La solució bàsica utilitzada amb més èxit és una barreja de DIEA i 2,6-lutidina. La combinació d'aquestes bases és més efectiva que una sola de les bases. La solució d'acoblament es prepara amb 4 equivalents de monòmer respecte als grups amino de la resina, 3,6 equivalents d'HATU, 4,4 equivalents de 2,6-lutidina i 4,4 equivalents de DIEA. L'HATU és un reactiu activant *in situ*, que en presència d'una base terciària activa l'àcid carboxílic en forma d'ester d'hidroxiabenzotriazole (Figura 3.9).

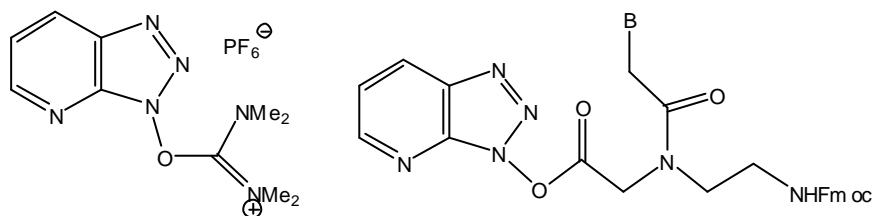


Figura 3.9. Estructura de l'HATU i d'un monòmer activat en forma d'ester d'HOBt

Tot i que l'HATU és el reactiu que dona millors rendiments d'acoblament, s'ha descrit que les sals d'uroní reaccionen amb amines primàries per a formar sals de guanidini¹² (Figura 3.10). Se sap que aquesta reacció bloqueja grups α -amino en la síntesi de pèptids. Les característiques dels grups 2-aminoetil del PNA fan que aquesta reacció sigui encara més probable.

La formació de guanidines entre cadenes de PNA i HATU es dona a una velocitat molt similar a la dels acoblaments dels monòmers activats, de manera que cal una etapa de pre-activació dels monòmers i, a més, tenir un lleuger excés de monòmer respecte a HATU, per a reduir el risc de que es doni aquest bloqueig dels extrems.

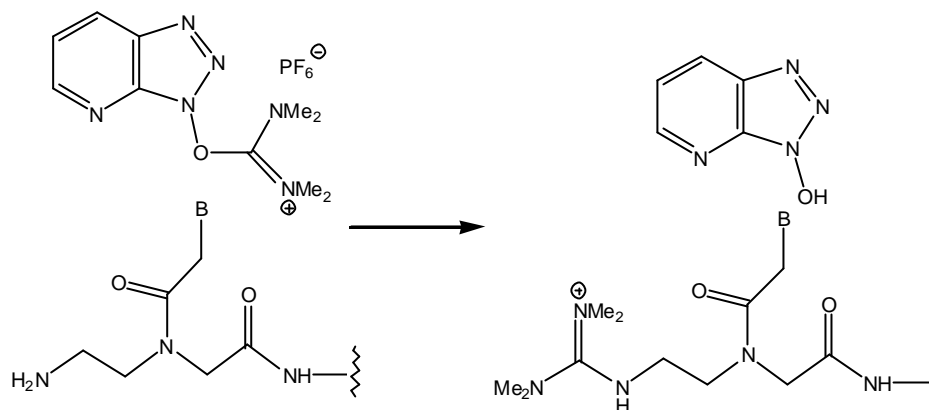


Figura 3.10. Bloqueig de l'extrem amino terminal de les cadenes de PNA en forma de grup guanidini

Per tal d'evitar el creixement de cadenes de PNA errònies, es bloquegen per acetilació, en cada cicle de síntesi, els extrems amino de les cadenes en creixement que no han reaccionat.

2.1.3. Cicle de síntesi

A la següent taula es recullen resumides les etapes del cicle de síntesi de PNA en fase sòlida amb química Fmoc:

Etapa	Reactius	Temps
1. Eliminació del Fmoc	Pip/DMF (20%)	2x10 min
2. Rentats	DMF	3x2 min
	DCM	3x2min
	DMF	3x2min
3. Activació		2 min
4. Acoblament	Monòmer (4eq), HATU(3,6 eq), lutidina (4,4 eq), DIEA (4,4 eq)	45 min
5. Rentats	DMF	3x2 min
	DCM	3x2 min
	DMF	3x2 min
6. Bloqueig	Ac ₂ O (5%), lutidina (6%) en DMF	5 min
7. Rentats	DMF	3x2 min
	DCM	3x2 min
	DMF	3x2 min

Els rentats de la resina són molt importants i necessaris entre cadascuna de les etapes de la síntesi, per a reduir les possibles reaccions secundàries. Els rentats més eficients combinen dissolvents amb diferents propietats, per exemple DCM i un solvent apròtic. El DCM és un bon dissolvent perquè infla la resina de manera molt eficient. Un dissolvent apròtic com la DMF redueix el volum del suport polimèric i aquesta combinació d'inflament i reducció facilita l'eliminació d'impureses residuals. Així la resina es renta successivament amb DMF, DCM i DMF. Just abans de l'acoblament és molt important que el darrer rentat amb DMF sigui amb dissolvent d'elevada puresa i bastant anhidre.

2.1.4. Desancoratge i desprotecció final

La desprotecció de les amines exocíclics de les nucleobases i el desancoratge dels oligòmers de la resina es donen simultàniament amb un tractament amb TFA utilitzant *m*-cresol com a captador de carbocacions. Aquest és necessari per tal d'evitar que els anells aromàtics de les nucleobases, que són rics en electrons, siguin alquilats pels cations benzhidril generats en el tractament amb TFA.

Quan la síntesi té lloc sobre PAL-PEG-PS, el tractament de desancoratge és amb TFA:*m*-cresol 4:1 durant 2 hores. Quan l'espaiador es XAL, el desancoratge pot ser per tractament prolongat amb TFA en baixa concentració (4:1) o en 5 minuts amb TFA:*m*-cresol 19:1. Totes dues resines rendeixen crus de la mateixa qualitat, encara que el desancoratge és més ràpid si l'espaiador és XAL. Els oligòmers desancorats s'obtenen en forma de carboxamides C-terminal com es pot veure a la figura 3.11.

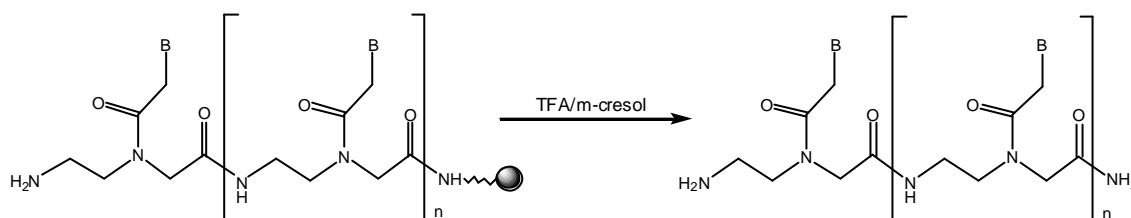


Figura 3.11. Desancoratge de la resina dels oligòmers de PNA, rendint la funcionalitat C-terminal en forma de carboxamida

2.2. Disseny i elecció de les seqüències

Es vol analitzar la validesa com a abraçadores de guanina de les dues nucleobases, la síntesi de les quals es descriu al capítol 2. Per això cal preparar diversos oligòmers de PNA en els que se substituirà alguna citosina per les noves nucleobases. Aquestes molècules de PNA s'hibridaran a les seves seqüències complementàries de DNA i es determinaran els valors de les temperatures de fusió dels diferents dúplexs.

En el moment de dissenyar una seqüència sobre la que estudiar la viabilitat de les abraçadores s'han de tenir presents una sèrie de circumstàncies. Tot i que el PNA es pot unir al DNA en dues orientacions, quan es dissenyen seqüències de PNA es tria l'orientació antiparalela. Com a norma general, el valor de T_M per a un dúplex PNA/DNA es 1°C més alt per a cada parell de bases, quan la concentració de NaCl és 100 mM, comparat amb la T_M del corresponent dúplex DNA/DNA. Per això cal que la seqüència no sigui gaire llarga per a que les variacions de T_M provocades per la presència de les nucleobases modificades donin com a resultat uns valors de T_M encara mesurables. També s'ha de tenir present que oligòmers llargs de PNA, especialment els rics en purines i sobretot en guanina, tenen tendència a agregar i són difícils de purificar i caracteritzar. Com a norma general, no s'han d'incloure més de 6 purines en un fragment de 10 unitats. S'ha d'evitar incloure més de

quatre residus de purina consecutius, i, si es tracta de guanines, el límit baixa fins a tres unitats consecutives.

Altres seqüències a evitar són seqüències autocomplementàries, com són repeticions inverses, hairpins i seqüències palindròmiques. Hi ha unes petites normes que és aconsellable seguir pel que fa a l'autocomplementàrietat en les cadenes de PNA:

- una seqüència de quatre bases complementàries és acceptable sempre i quan no totes siguin c o g.
- regions autocomplementàries de sis o més unitats no són acceptables.

Una altre fet que s'ha observat és que els homopolímers de timina presenten una gran tendència a agregar. Aquest fenomen encara no ha estat ben explicat, però sembla que es redueix quan s'incorporen lisines als dos extrems de l'oligòmer.

En el cas de l'abraçadora amino de guanina en DNA, s'ha descrit que una base modificada implica un augment de 18 graus en la T_M ¹³. Això vol dir que la longitud de l'oligòmer no pot ser gaire llarga per a evitar un valor de partida gran que portaria a valors de T_M no quantificables. En el nostre cas hem triat decàmers.

Els oligòmers de PNA del present treball han estat sintetitzats en part al laboratori de "Development Chemistry" a Isis Pharmaceuticals (Carlsbad, CA) sota la direcció del Dr. Yogesh Sanghvi.

Com a diana es tria l'oligonucleòtid 20-mer de seqüència 5'-TCC-CGC-CTG-TGA-CAT-GCA-TT^{3'} (aquest oligonucleòtid té interès per a Isis Pharmaceuticals i ha estat proporcionat per aquesta empresa) i se sintetitzen 3 decàmers de PNA complementaris a diferents regions d'aquest 20-mer (Figura 3.12). PNA1 (H-aatgcatgtc-NH₂) és complementari a l'extrem 3', PNA2 (H-acaggcggga-NH₂) a l'extrem 5' i PNA3 (H-atgtcacagg-NH₂) és l'oligòmer complementari a la regió central del 20-mer.

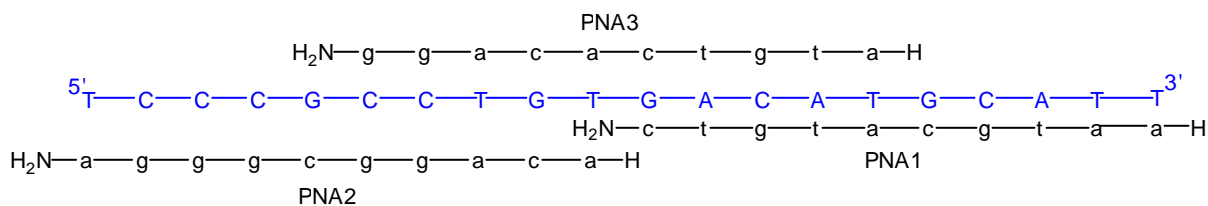


Figura 3.12. Representació dels decàmers de PNA a sintetitzar i les regions de l'oligonucleòtid 20-mer a les que són complementàries.

La seqüència de PNA2 conté cinc unitats de guanina a més de dues de citosina, el que implica la formació de 7 parells C-G en el dúplex DNA-PNA2. Es conegut que el parell C-G és el que té una unió més forta degut a que implica la formació de tres enllaços d'hidrogen, a diferència del parell A-T, que en comporta la formació de dos. Per això s'espera que la temperatura de fusió del dúplex en el que participa PNA2 sigui força elevada. La seqüència de PNA1 tampoc és ideal ja que,

com es pot veure a la figura 3.13, hi ha una regió de sis nucleobases consecutives que són autocomplementàries.

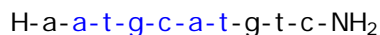


Figura 3.13. Representació de la seqüència de PNA1 on es destaca en blau la regió d'autocomplementarietat

Els monòmers de PNA que contenen les nucleobases tricícliques modificades, un cop incorporats en oligòmers de PNA s'espera que provoquin estabilització dels dúplexs PNA-DNA en els que es trobin. Per això s'incorporaran en els decàmers PNA1 i PNA3 en la posició de les citosines i no en l'oligòmer PNA2, que com després es veurà dóna una temperatura de fusió del dúplex molt elevada. D'aquesta manera els valors de les temperatures de fusió dels nous dúplexs tindran un valor encara mesurable (per sota de 90°C) i es podrà caracteritzar l'eficiència de les noves nucleobases com a abraçadores de guanina. Se sintetitzaran les seqüències representades a la figura 3.14 en les que s'incorporen les abraçadores de guanina.

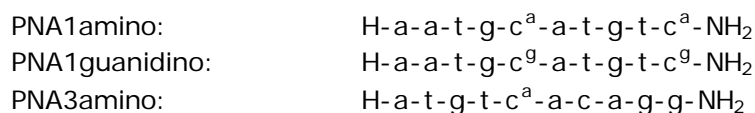


Figura 3.14. Seqüències de PNA que contenen abraçadores de guanina, sintetitzades en el present treball, on c^a representa l'abraçadora amino de guanina i c^g l'abraçadora guanidino de guanina

2.3. Síntesi de PNAs a temperatura ambient

2.3.1. Síntesi dels oligòmers de PNA que contenen les nucleobases naturals

S'escull el suport polimèric (PEG-PS) funcionalitzat amb el grup XAL per a realitzar les síntesis dels oligòmers de PNA. Els decàmers PNA1, PNA2 i PNA3 que contenen les nucleobases naturals se sintetitzen seguint el mètode de síntesi descrit a l'apartat 2.1.

Els tres oligòmers s'han obtingut amb rendiments d'acoblament dels monòmers entre el 95 i el 97%. Aquests resultats no són òptims, però es troben entre els habituals en la síntesi manual de PNA. La quantificació del rendiment dels acoblaments es realitza en cada etapa de síntesi amb una fracció de la resina sobre la que té lloc el creixement de l'oligòmer. S'eliminen els grups Fmoc per tractament amb Pip/DMF (20%) i es mesura l'absorbància a 300 nm de la dissolució procedent de la desprotecció, per a calcular la quantitat de grups Fmoc presents sobre la resina. Si el rendiment no és satisfactori es procedeix a repetir l'acoblament. En el cas de PNA1, ha calgut realitzar un reacoblament del primer monòmer, c, per tal d'obtenir un rendiment de l'acoblament del 95%.

Per al desanoratge dels oligòmers i la desprotecció de les bases nitrogenades es realitza un únic tractament amb TFA/m-cresol (19:1) durant cinc minuts a temperatura ambient. El cru procedent del desanoratge es recull sobre èter fred en el que les molècules de PNA són insolubles. Se separa el sòlid per

centrifugació i a continuació el pellet es renta dos cops amb èter fred per tal d'eliminar el m-cresol i els grups protectors de les bases que es troben en el cru.

Els oligòmers obtinguts, són solubles en H₂O (0,1% TFA) i han estat purificats per HPLC en fase reversa a 50°C. La temperatura elevada és necessària per a disminuir l'agregació de les molècules de PNA i així tenir una millor resolució. Com a eluent A s'utilitza aigua amb un 0,1% de TFA i com a B ACN amb un 0,1% de TFA. Els gradients utilitzats en la purificació varien en funció de la seqüència i de la columna cromatogràfica utilitzada. En general es troben entre 0→30% i 0 → 50% en 30 minuts. A la figura 3.15 es recullen els cromatogrames d'HPLC dels tres decàmers, crus i un cop purificats. Els rendiments de les purificacions han estat força diferents per a cada oligòmer. S'obtenen millors o pitjors resultats en funció de la qualitat del cru.

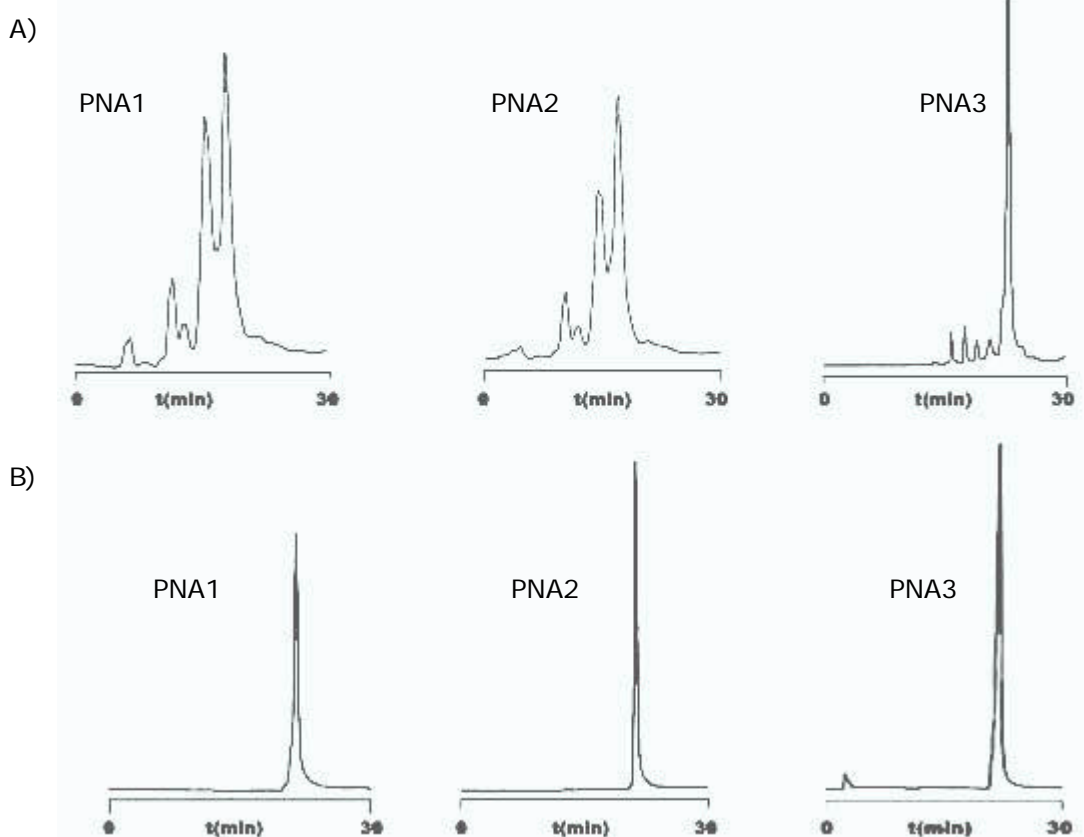


Figura 3.15. Cromatogrames d'HPLC dels oligòmers de PNA PNA1, PNA2 i PNA3. A) crus i B) purificats, Gradient 0→30% en 30' (A: H₂O amb 0,1% TFA, B: ACN amb 0,1%TFA) a 50°C

Els oligòmers de PNA es caracteritzen per espectrometria de masses de tipus MALDI-TOF en mode positiu i amb àcid sinapínic com a matriu. En el cas del 20-mer de DNA s'utilitza THAP com a matriu, CA com a bescanviador de cations i les mesures es realitzen en mode negatiu.

A la següent taula es recullen els rendiments obtinguts en les diferents síntesis i les caracteritzacions dels decàmers.

Seqüència	escala	Rdt síntesi lineal	% producte en el cru	Rdt purificació ¹	Massa obtinguda (m/z)	Massa calculada
PNA1	5 µmol	54%	67%	60%	2748,5	2745,09
PNA2	5 µmol	60%	51%	34%	2852,7	2850,65
PNA3	10 µmol	74%	82%	70%	2751,7	2750,10

¹correspon només a l'etapa de purificació i es calcula com la relació entre la quantitat de producte obtingut i la quantitat de cru purificat, ambdós valors determinats per absorbància a 260 nm.

S'ha observat que els rendiments dels acoblaments milloren, igual que la qualitat dels crus a mesura que augmenta el nombre de síntesis realitzades. Tot i que la mecànica de la síntesi no és difícil, a mesura que augmenta la pràctica, els rendiments són millors. En general l'acoblament més difícil resulta ser el primer i si calen reacoblaments normalment és en aquesta primera etapa de l'elongació. Els millors rendiments que s'han aconseguit per als acoblaments dels monòmers en la síntesi de PNA han estat del 98%. Si es volen sintetitzar oligòmers llargs (>15 nucleobases) caldria millorar aquests resultats. Sinó, a mesura que augmenta la longitud del producte a obtenir baixen molt els rendiments i empitjora la qualitat del cru, dificultant la purificació.

És un fet habitual en la bibliografia el fer referència a la poca solubilitat dels oligòmers de PNA. En el cas dels decàmers sintetitzats durant el present treball no s'han incorporat unitats de lisina a l'extrem c-terminal. Malgrat això, en cap cas s'han trobat problemes per a dissoldre'ls en H₂O (0,1% TFA) a concentracions bastant més elevades que la de 4 µM que és necessària per als experiments d'hibridació amb DNA.

2.3.2. Incorporació de les abraçadores de guanina en els decàmers de PNA

Igual que en el cas de la síntesi dels decàmers de PNA amb nucleobases naturals, el suport polimèric utilitzat per a obtenir oligòmers de PNA que continguin les abraçadores de guanina és el copolímer de PEG-PS funcionalitzat amb el grup XAL. En el moment de realitzar els acoblaments dels monòmers de les abraçadores es manté el nombre d'equivalents de cadascun dels reactius però s'allarga el temps de reacció fins a 1 hora i, malgrat això, els rendiments d'acoblament aconseguits són lleugerament inferiors als de les nucleobases naturals, de l'ordre del 90%.

La principal diferència en la síntesi d'aquests oligòmers es dona en el moment de la desprotecció final de les nucleobases. La presència del grup benziloxicarbonil com a protector de les funcionalitats amino i guanidino en les abraçadores de guanina fa que calgui modificar els reactius d'aquesta etapa.

Per a 10 mg de resina s'afegeixen 100 µL de cadascuna de les dues dissolucions següents:

Dissolució A: 100 µL de TFA + 300 µL de DMS + 100 µL de m-cresol

Dissolució B: 450 µL de TFA + 50 µL de TFMSA

La barreja de TFMSA-TFA-DMS (sulfur de dimetil)¹⁴ serveix per a eliminar els grups benziloxicarbonil i el m-cresol actua com a captador de carbocations. El tractament, més llarg que en les cas de les nucleobases naturals, té lloc durant 1 hora a temperatura ambient. D'aquesta manera s'obtenen els oligòmers desancorats de la resina i completament desprotegits. El cru de desancoratge es recull sobre èter etílic fred en el que els oligòmers de PNA són insolubles. Se centrifuga per tal de separar el pellet i aquest es renta dues vegades amb èter fred fresc.

La qualitat dels crus és del mateix ordre per a totes tres síntesis, al voltant del 60% de producte. I en tots tres casos (excepte en la síntesi de PNA2) s'observa que la quantitat de producte en el cru és inferior que en les síntesis en les que només s'han utilitzat nucleobases naturals.

Els productes obtinguts es purifiquen, igual que els oligòmers amb nucleobases naturals, per HPLC en fase reversa a 50°C (Figura 3.16) i la caracterització també té lloc per espectrometria de masses MALDI-TOF, en mode positiu i amb àcid sinapínic com a matriu.

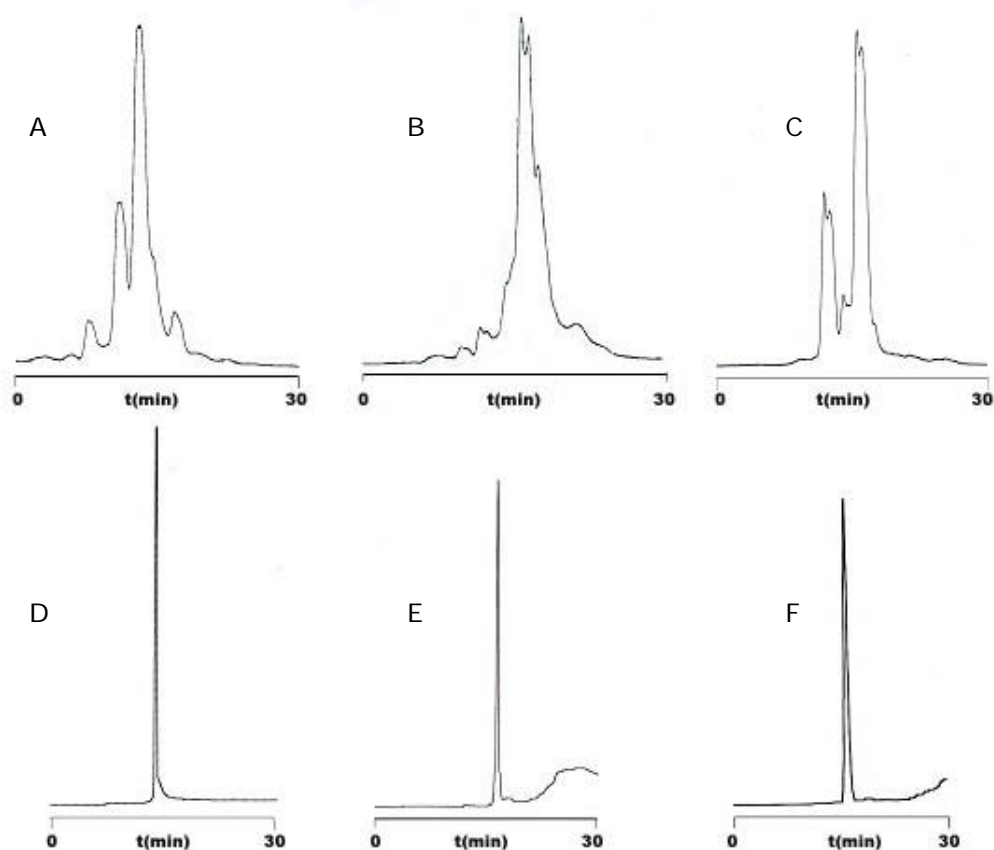


Figura 3.16. Cromatogrames d'HPLC dels oligòmers de PNA A: PNA1amino cru, B: PNA1guanidino cru, C: PNA3amino cru, D: PNA1amino purificat, E: PNA1guanidino purificat i F: PNA3amino purificat. Gradient 0→30% en 30' (A: H₂O amb 0,1% TFA, B: ACN amb 0,1%TFA) a 50°C

A la següent taula es resumeixen els resultats obtinguts en les tres síntesis dels decàmers de PNA que contenen les abraçadores de guanina:

Seqüència	escala	Rdt síntesi lineal	% producte en el cru	Rdt purificació	Massa obtinguda (m/z)	Massa calculada
PNA1amino	8 µmol	56%	62%	28%	3011,7	3011,91
PNA1guanidino	8 µmol	56%	60%	40%	3077,0	3075,24
PNA3amino	7 µmol	63%	61%	54%	2918,3	2918,13

2.4. Síntesi de PNA assistida per microones

En la síntesi d'oligòmers de PNA en fase sòlida l'etapa més llarga és l'acoblament dels monòmers que, a més, té rendiments elevats però no òptims, si es comparen amb els que s'obtenen de manera general en síntesi de pèptids o d'oligonucleòtids. Durant l'estada al laboratori del Dr. Sanghvi a ISIS Pharmaceuticals ens vam plantejar la utilització de l'energia de microones en les etapes d'acoblament dels diferents monòmers en la síntesi de PNA per tal de reduir el temps necessari per a l'acoblament i, a més, intentar millorar els rendiments i la qualitat dels crus.

2.4.1. Introducció a la utilització de microones en química orgànica

En l'espectre electromagnètic, la radiació de microones es troba entre l'IR i les ones de radio. Les microones tenen longituds d'ona entre 1 mm i 1 m, això correspon a freqüències entre 0,3 i 300 GHz. La major part d'aquestes freqüències són utilitzades en telecomunicacions i radars. En general, per tal d'evitar interferències, els aparells de microones domèstics i industrials utilitzen una longitud d'ona de 12,2 cm, que correspon a 2,45 GHz.

És un fet conegut des de fa temps que les microones es poden utilitzar per a escalfar materials. Fa més de 50 anys que s'empren per a escalfar aliments. Als anys 70 es va fer el gran pas en el disseny i construcció del generador de microones, el magnetró, i al final dels 80 va ser quan es va aconseguir un disseny de la cavitat o forn adient per a obtenir els escalfaments desitjats.

Les microones s'utilitzen en química per a reduir els temps de reacció, i per a augmentar els rendiments i la selectivitat. En química inorgànica la tecnologia de microones ha estat utilitzada des dels anys 70, però va trigar fins al 1986 a ser introduïda, simultàniament per Giguere¹⁵ i Gedye¹⁶, en el camp de la síntesi orgànica. Els principals problemes en la síntesi orgànica eren la manca de control i reproduïbilitat i la poca seguretat derivada de la utilització de microones domèstics, amb els que s'han arribat a descriure explosions. Els resultats preliminars obtinguts amb aquests microones van portar al desenvolupament d'equipament de microones dissenyat especialment per a la síntesi orgànica.

Des de mitjans dels anys 90, paral·lel a les millores tecnològiques, s'observa també un augment exponencial del nombre de publicacions en aquest camp. Destaquen dues grans revisions sobre reaccions orgàniques assistides per

microones, la primera recull els treballs publicats fins al 1995¹⁷ i la segona fins al 2000¹⁸. També en el camp de la química combinatòria hi ha un interessant recull de les aplicacions de les microones a la síntesi orgànica¹⁹.

2.4.2. Fonament teòric i aspectes pràctics

Les tècniques d'escalfament convencionals són lentes i de vegades els gradients de temperatura desenvolupats dins de la mostra poden portar a sobreescalfament i descomposició tant del producte com del substrat. L'energia de microones es introduïda al reactor remotament, passa a través de les parets del reactor i escalfa només el dissolvent (no el reactor). Si l'aparell està ben dissenyat, l'augment de temperatura és uniforme a tota la mostra.

Els principals avantatges de la utilització de microones deriven de l'escalfament gairebé instantani dels materials (uns 10°C per segon), de manera homogènia i selectiva. La profunditat de la penetració en materials és del mateix ordre de magnitud que la longitud d'ona. La teoria indica que la velocitat de la reacció es dobla cada 10°C que augmenta la temperatura. Per tant, s'esperen reduccions exponencials del temps de reacció quan augmenti la temperatura.

La radiació de microones es divideix en dues components, elèctrica i magnètica. La primera és la responsable de l'escalfament dielèctric, el qual es dona principalment per dos mecanismes, per polarització dipolar i per conducció.

Per tal que una substància s'escalfi quan és irradiada amb microones ha de tenir un moment dipolar. Un dipol és sensible a camps elèctrics externs i intenta alinear-se amb aquest camp per rotació. El camp aplicat és el que proporciona l'energia necessària per a la rotació.

Quan se sotmet un dipol a la radiació de microones, aquest es reorienta per a alinear-se amb el camp elèctric, el camp ja està canviant i es genera una diferència de fase entre la orientació del camp i la del dipol. Els dipols es mouen contínuament per a intentar estar alineats amb el camp, això provoca que perdin energia per fricció molecular i col·lisions, generant l'anomenat escalfament dielèctric (Figura 3.17).

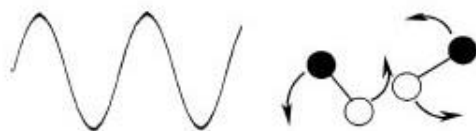


Figura 3.17. Mecanisme pel que les molècules dipolars intenten orientar-se segons el camp electromagnètic canviant

Quan una solució tractada amb microones conté ions, aquests es mouen sota la influència del camp elèctric i es genera una despesa d'energia degut a l'augment del nombre de col·lisions (Figura 3.18). Aquest mecanisme de conducció és molt més important que el mecanisme dipolar pel que respecta a la capacitat de generar calor.

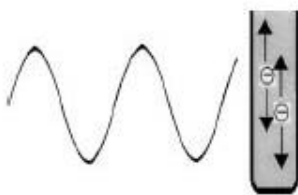


Figura 3.18. Partícules amb càrrega que en solució s'orienten segons el camp electromagnètic que se'ls aplica

La polarització dielèctrica depèn de l'habilitat dels dipols per a reorientar-se en resposta a un camp elèctric. Sembla raonable pensar que com més polar sigui un dissolvent amb més eficàcia s'absorbirà la radiació de microones i més elevada serà la temperatura a la que s'arribarà. Però també s'ha de tenir present la capacitat de cada dissolvent per a absorbir energia de microones i convertir-la en calor.

Aquests dos factors es recullen en l'anomenat angle de pèrdua (d), que normalment s'expressa en forma de tangent:

$$\tan(d) = e'' / e'$$

on e' és la constant dielèctrica i representa la capacitat d'un material dielèctric per a emmagatzemar energia potencial elèctrica sota la influència d'un camp elèctric

e'' és el factor de pèrdua i mesura l'eficiència amb la que l'energia absorbida és transformada en calor.

A la següent taula es recullen els valors de la constant dielèctrica i de l'angle de pèrdua dels dissolvents més habituals:

Dissolvent	Constant dielèctrica (e')	Tangent de la pèrdua ($\tan d$) ¹
Hexà	1,9	
Benzè	2,3	
Tetraclorur de carboni	2,2	
Cloroform	4,8	0,091
Àcid acètic	6,1	0,174
Acetat d'etil	6,2	0,059
THF	7,6	0,047
Clorur de metilè	9,1	0,042
Acetona	20,6	0,054
Etanol	24,6	0,941
Metanol	32,7	0,659
ACN	36,0	0,062
DMF	36,7	0,161
DMSO	47,0	0,825
Àcid fòrmic	58,0	0,722
Aigua	80,4	0,123

¹ valors determinats a 2,45 GHz a temperatura ambient

Comparant l'acetona i l'etanol, segons les seves constants dielèctriques (20,6 i 24,6 respectivament) irradiats amb microones sota les mateixes condicions de potència i temps s'esperaria que l'escalfament fos similar, però el valor de l'angle de pèrdua per a l'etanol és molt més gran que per a l'acetona (0,941 i 0,054) i per aquesta raó s'observa un escalfament molt més gran en el cas de l'etanol que per a l'acetona.

La velocitat a la que es donen els augments de temperatura en una mostra irradiada amb microones depèn tant de l'angle de pèrdua com d'altres factors com la força iònica, la capacitat calorífica específica, la geometria i el volum de la barreja de reacció i de la potència amb la que s'aplica el camp.

Quan les propietats dielèctriques d'una mostra no són prou elevades, el problema es pot solucionar afegint petites quantitats d'additius que absorbeixin l'energia de microones de manera eficient, com són sals i líquids iònics.

Quan les microones entren en una cavitat, són reflexades per les parets. Les reflexions de les ones generen una distribució estacionària tridimensional d'ones dins de la cavitat que s'anomena mode. Segons els modes, hi ha dos tipus de reactors en els que es poden dur a terme les reaccions assistides per microones, multimode i monomode (Figura 3.19).

Entre els reactors multimode es troben els microones domèstics (que estan dissenyats per a tenir entre 3 i 6 modes diferents per a escalfar els aliments de manera adequada). Les microones es distribueixen de manera heterogènia en la cavitat generant zones d'alta i baixa força de camp, els anomenats "llocs calents i llocs freds". L'eficiència d'escalfament és variable al llarg de la mostra i no hi ha control de la temperatura, fets que fan que la reproduïbilitat experimental sigui baixa. Malgrat això, s'han publicat moltes síntesis realitzades amb aquests tipus de reactors fent primer una etapa de calibració de la temperatura corresponent a cada posició de la cavitat escalfant capil·lars que contenen compostos dels quals es coneixen els punts de fusió²⁰.

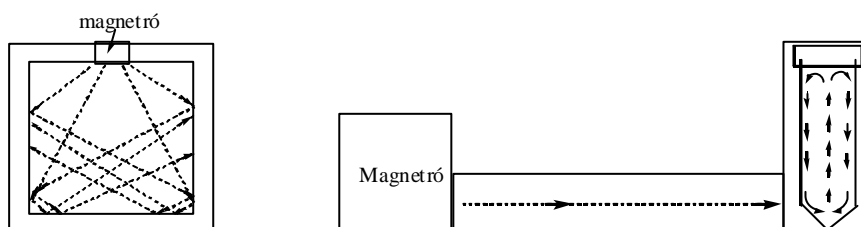


Figura 3.19. Dibuix dels dos tipus de reactor, multimode (a l'esquerra) i monomode (a la dreta).

En les cavitats monomodals les radiacions són dirigides de manera que només es permet que un únic mode entri en la cavitat i s'evita la formació de "llocs

calents i llocs freds". A més, el reactor se situa en una posició determinada, hi ha sistemes adients de control de la temperatura i així s'aconsegueix major reproduïbilitat i predictibilitat.

Les reaccions de química orgànica a les que s'ha aplicat la metodologia de microones es poden dividir en tres grans grups: en dissolució, en fase sòlida i sense dissolvent. La síntesi de PNA assistida per microones desenvolupada en el present treball es troba en el segon grup.

2.4.3. Estudi de l'acoblament de monòmers de PNA en un microones convencional

La síntesi de PNA amb microones no es troba recollida a la literatura. Sí que hi ha alguns exemples de síntesi de pèptids i peptòids en fase sòlida.

Al 1992, el grup de Wang²¹ va descriure una síntesi de pèptids utilitzant un microones convencional i un reactor adaptat per ells mateixos per a la síntesi en fase sòlida en microones. Van aconseguir una millora significativa en els rendiments del acoblaments i una reducció considerable del temps de reacció.

Durant els posteriors 10 anys, en aquest camp, només es troben els treballs posteriors desenvolupats pel grup de Wang. Al 2002 Gogoll²² ha utilitzat un reactor de microones amb irradiació monomodal, control de temperatura, pressió i potència d'irradiació per a sintetitzar pèptids en fase sòlida utilitzant química de tipus Fmoc. Estudia la compatibilitat de diferents agents acoblants amb les elevades temperatures generades per la irradiació amb microones. Els millors resultats els obtenen amb HATU i utilitzant DMF com a dissolvent.

El mateix any, el grup de Kodadek²³ ha descrit la síntesi de peptòids en fase sòlida en un microones convencional. Utilitzen temps d'acoblaments de 30-40 segons amb etapes d'agitació manual cada 10 segons i n'aconsegueixen reduir el temps de síntesi total d'un 9-mer de 32 a 3 hores amb rendiments i pureses millors que les obtingudes a temperatura ambient.

En el present treball com a primera aproximació s'ha utilitzat un microones convencional de cuina (Panasonic 1200W, model NN-L731WF). Les reaccions d'acoblament es duen a terme en els mateixos reactors utilitzats en la síntesi convencional de PNA a temperatura ambient. La resta de les etapes de síntesi (acetilació i eliminació de grups Fmoc) s'han realitzat a temperatura ambient. Els reactors són columnes de vidre d'uns 10 cm de llarg i 1 cm de diàmetre provistes d'un disc de vidre sinteritzat que permet realitzar les etapes de filtració.

És un fet conegut que el monòmer de **c** és el que acostuma a donar pitjors rendiments en els acoblaments. Per tal d'estudiar l'efecte de la irradiació amb microones sobre aquest acoblament, en primer lloc s'abordarà l'obtenció del dímer H-ct-NH₂.

Es treballa a una escala de 3,2 μmol. La primera etapa consisteix en la incorporació dels monòmer **t**, en les condicions habituals, sobre el suport polimèric

XAL-PEG-PS. Es determina el nombre de μmols de **t** acoblats, per quantificació per absorbància a l'UV de la N-(9-fluorenilmetil)piperidina alliberada en l'eliminació dels grups Fmoc amb piperidina per a poder continuar amb la síntesi.

Un cop desprotegit l'extrem amino terminal del sistema **t**-XAL-PEG-PS es procedeix a la incorporació del monòmer **c** en diferents condicions de potència i temps. S'utilitzen el mateix nombre d'equivalents, a les mateixes concentracions i amb els mateixos volums per a totes les síntesis (inclosa la síntesi convencional a temperatura ambient).

L'acoblament té lloc mitjançant tractaments successius de 30'' i agitació manual entre cadascun d'ells. Alhora es realitza la síntesi del mateix dímer en les condicions habituals de síntesi de PNA, per a comparar els resultats. Per tal de conèixer l'efecte del temps d'acoblament i de la potència d'irradiació es fan un seguit de síntesis.

El càlcul dels rendiments es realitza per quantificació de la relació del nombre de grups Fmoc eliminats en els tractaments de les resines Fmoc-ct-XAL-PEG-PS i Fmoc-t-XAL-PEG-PS amb piperidina en DMF. El desancoratge i la desprotecció de les nucleobases té lloc en les condicions habituals amb TFA i m-cresol (19:1). L'anàlisi per HPLC dels crús es fa en les mateixes condicions per a tots ells (0 \rightarrow 30% de B en 40', on A és H₂O amb un 0,1% de TFA i B és ACN amb un 0,1% de TFA). Els resultats obtinguts es recullen a la següent taula:

Síntesi	temps	potència	rendiment	puresa
Convencional	45'	---	94%	86%
1	6x15''	100%	74%	41%
2	4x30''	50%	86%	31%
3	6x30''	50%	88%	57%
4	8x30''	50%	22%	---
5	6x30''	10%	91%	77%
6	6x30''	30%	92%	84%

En la síntesi **1** la potència utilitzada és del 100% i s'observa un escalfament molt gran del cru, tot i fer irradiacions de 15'' i agitant entre cada tractament. La qualitat del cru és força dolenta i per això es decideix reduir la potència de l'aparell en les següents síntesis.

Fixant la potència al 50% fent irradiacions del 30'' s'estudia l'efecte de la durada total dels acoblaments (2,3 i 4 minuts). Amb 2 i 3 minuts els rendiments són del mateix ordre (86-88%) però la qualitat del cru, tot i encara ser baixa, és millor en la síntesi **3** (durant 3 minuts). En l'experiment **4**, en el que la irradiació amb microones té lloc durant 4 minuts amb una potència del 50% el tractament sembla ser massa agressiu per a la resina ja que no s'ha aconseguit detectar la presència del producte H-ct-NH₂ en el cru.

Fins a aquest moment els millors resultats s'han obtingut amb acoblaments de 3 minuts (6x30'') i es decideix estudiar l'efecte en els rendiments de la potència amb la que s'irradien els crús de reacció. Els experiments **5** i **6** donen resultats molt

semblants a la síntesi convencional per que fa al rendiment de l'acoblament. La qualitat del cru és inferior en el cas del tractament amb una potència del 10% i pràcticament igual amb una potència del 30%.

Com a resultat d'aquests experiments d'acoblament de **c** sobre **t**-XAL-PEG-PS es pot dir que quan la reacció té lloc durant 3 minuts (6x30'') amb una potència del 30% s'obtenen rendiments d'acoblament i qualitats del cru del mateix ordre que amb la síntesi a temperatura ambient, en la que la reacció d'acoblament dura 15 vegades més (45 minuts).

En segon lloc es vol veure l'efecte de les microones en els acoblaments de purines. Per això s'estudiarà la reacció d'acoblament del monòmer **g** sobre **a**-XAL-PEG-PS preparada en les condicions habituals. En aquest cas les síntesis es duen a terme en una escala de 1,6 µmol. Es mantenen les mateixes condicions (nombre d'equivalents i concentracions) que per a la síntesi convencional a temperatura ambient. Les quantificacions dels rendiments i de les pureses es realitzen igual que en el cas de l'acoblament de **c** sobre **t**-resina.

S'assagen diferents condicions de temps i de potència per a la reacció d'acoblament del monòmer **a** i els resultats es recullen a la següent taula:

Síntesi	temps	potència	rendiment	puresa
Convencional	45'	---	93%	65%
1	6x30''	10%	96%	88%
2	6x30''	30%	91%	70%
3	8x30''	50%	40%	40%

En el cas de l'experiment **3** (4 minuts i potència del 50%) tot i que els resultats són millors que per a H-ct-NH₂, en les mateixes condicions (aquí si que es detecta la presència del dímer esperat en el cru) el rendiment de l'acoblament és molt baix i la puresa petita. Reduint el temps de l'acoblament a 3 minuts (6x30'') i amb una potència baixa (10-30%) s'aconsegueixen rendiments d'acoblament i pureses del cru del mateix ordre (30% de potència) o superiors (10% de potència) que les que dona la síntesi a temperatura ambient.

Si es comparen els resultats de l'acoblament de **c** sobre **t** amb els de **g** sobre **a** s'observa que coincideixen en el temps òptim (3 minuts) però canvia la potència que dona els millors resultats, que és del 30% per a H-ct-NH₂ i del 10% per a H-ga-NH₂. S'ha de tenir present que la reproduïbilitat dels resultats en un microones multimodal no és senzilla degut a la variació de la temperatura en els diferents punts del forn. Per això aquestes síntesis s'han de prendre com a un estudi preliminar.

Els resultats han estat prometedors i a partir d'ells es decideix utilitzar un microones de cavitat monomodal per a sintetitzar oligòmers de PNA. D'aquesta manera es controlaran millor les condicions de síntesi i es pot arribar a millorar els rendiments (no només reduir el temps d'acoblament) treballant amb més seguretat que amb el microones convencional.

2.4.4. Síntesi de PNA en un microones de cavitat monomodal

El microones utilitzat s'anomena EmrysTM Creator Synthesizer (Personal Chemistry). El seu disseny, amb cavitat monomodal, assegura una distribució uniforme de les microones i de la temperatura. L'aparell està pensat per a treballar amb seguretat ja que consta de diversos dispositius per a evitar accidents.

Les reaccions es poden dur a terme a temperatures entre 60°C i 250°C i la pressió màxima en el vial és de 20 bar. Quan s'arriba a aquest valor, els dispositius de seguretat fan que s'aturi l'escalfament instantàniament.

Els vials en els que es realitzen els experiments són de vidre, amb parets gruixudes i es tanquen amb taps d'alumini que tenen un sèptum de goma. N'hi ha de dues mides, els petits s'utilitzen amb volums de la mescla de reacció d'entre 0,5 i 2 mL i els grans entre 2 i 5 mL. Un volum massa petit fa que les mesures de temperatura no siguin correctes i un excés de volum no deixa prou espai per a les possibles sobre-pressions. El microones disposa d'un sistema d'agitació magnètica i cal afegir sempre un nucli magnètic al cru de reacció abans de procedir a l'escalfament.

Les variables que es poden fixar en el moment de realitzar una reacció assistida pel microones són la temperatura a la que té lloc i el temps que dura l'escalfament.

Algunes barreges de reacció absorbeixen les microones tan bé que l'augment de temperatura és molt ràpid i això activa un dels dispositius de seguretat de l'aparell i s'atura l'escalfament. Per a poder evitar això l'Emrys Creator disposa d'un tercer paràmetre que es pot ajustar, la potència de la irradiació. El microones reconeix dos tipus de dissolvents, els que anomena d'absorció normal i els d'absorció elevada. Quan se li indica que la reacció té lloc en un d'aquests dissolvents d'alta absorció aleshores irradia la barreja a baixa potència per a escalfar-la fins a la temperatura desitjada.

Igual que en el cas del microones convencional de cuina, en primer lloc cal optimitzar les condicions de temps i temperatura per als acoblaments. Per això es comença sintetitzant els dímers H-ct-NH₂ i H-at-NH₂ a escala petita (1,6 µmol) sobre la resina habitual.

Els vials utilitzats per a l'Emrys Creator no permeten realitzar filtracions, de manera que cal transferir la resina a columnes provistes d'un fritat per a poder rentar-la i realitzar les reaccions de desprotecció. A més, els vials més petits dels que es disposa necessiten un volum mínim de mescla de reacció de 0,5 mL. Per a realitzar la síntesi a escala 1,6 µmol utilitzant les mateixes dissolucions de monòmer i d'HATU que en la síntesi a temperatura ambient, els volums totals del reactius són 167 µL (65 µL de monòmer, 1,2 µL de DIEA, 0,8 µL de lutidina i 100 µL d'HATU). Per això cal afegir un altre dissolvent al cru de reacció per a assolir aquest volum mínim de 0,5 mL. S'han assajat tant DMF com DMI (1,3-dimetilimidazolidinona). Com s'ha explicat anteriorment, en funció del dissolvent utilitzat cal fixar un dels paràmetres del microones. La DMF és un dissolvent amb

absorció de microones normal, mentre que la DMI absorbeix molt més i cal fixar la configuració de l'aparell a absorció alta per tal d'evitar sobre-escalfaments.

Per a realitzar els acoblaments de **c** sobre **t**-XAL-PEG-PS, el monòmer **c** es dissol en NMP en una concentració de 0,1 M (la mateixa que en la síntesi a temperatura ambient) i l'activant HATU en DMF i s'afegeixen 400 µL del dissolvent addicional triat en cada cas (DMF o DMI).

La temperatura mínima a la que pot treballar l'Emrys Creator és de 60°C, de manera que es tria aquesta temperatura per a començar a estudiar les reaccions d'acoblament dels monòmers de PNA. Com que l'aparell disposa d'un sistema d'agitació magnètica els tractaments es realitzen seguits sense haver d'aturar la irradiació per a agitar i per a deixar refredar el sistema de síntesi, com passava en els cas del microones convencional.

A la següent taula es recullen els resultats obtinguts en els diferents experiments realitzats per a acoblar **c** sobre **t**-XAL-PEG-PS.

Experiment ¹	temps	Dissolvent	Rendiment	Puresa
Convencional	45'	---	94%	86%
1	120 s	DMF	66%	55%
2	120 s	DMI	74%	75%
3	240 s	DMF	40%	37%
4	240 s	DMI	85%	81%
5	180 s	DMI	76%	65%
6	300 s	DMI	70%	62%
7	240°C	DMI	73%	70%

¹ tots els experiments es realitzen a 60°C excepte el **7** que és a 70°C.

Es fixa 60°C com a temperatura de reacció per als primers experiments i, en primer lloc s'estudia quin efecte té en els rendiments el fet que el dissolvent extra afegit sigui DMF o DMI. Com es pot veure en els experiments **1-4** tant amb un temps d'escalfament de 2 minuts com de 4 minuts els rendiments i les pureses són millors amb DMI. Per això, es decideix utilitzar DMI com a dissolvent per a arribar al volum mínim necessari establert per les especificacions del reactor.

Pel que fa al temps de reacció, a 60°C, els millors resultats s'obtenen amb escalfaments de 4 minuts, i tant increments com disminucions del temps redueixen tant el rendiment de l'acoblament com la qualitat del cru.

Per tal de veure l'efecte de la temperatura es realitza una nova síntesi amb l'acoblament a 70°C durant 4 minuts. El resultat és una disminució del rendiment i de la puresa, comparat amb la síntesi realitzada a 60°C.

Igual que en el cas dels experiments realitzats amb el microones de cuina, a continuació s'estudia la reacció d'acoblament d'una purina. En aquest cas és **a**

sobre t-resina. En algunes d'aquestes experiències s'introdueix una nova modificació que consisteix en utilitzar DMI com a dissolvent tant dels monòmers com de l'activant.

Exp	Dissolvent monòmer	Dissolvent HATU	temps	Temp	Dissolvent	Rdt	puresa
1	NMP	DMF	45'	20°C	---	93%	68%
2	DMI	DMI	45'	20°C	---	89%	68%
3	NMP	DMF	180 s	60°C	DMI	59%	69%
4	NMP	DMF	240 s	60°C	DMI	58%	70%
5	NMP	DMF	300 s	60°C	DMI	64%	80%
6¹	NMP	DMF	240 s	60°C	DMI	87%	90%
7	NMP	DMF	240 s	70°C	DMI	86%	82%
8	DMI	DMI	180 s	60°C	DMI	45%	33%
9	DMI	DMI	240 s	60°C	DMI	97%	91%
10	DMI	DMI	300 s	60°C	DMI	53%	45%
11	DMI	DMI	180 s	70°C	DMI	83%	90%
12	DMI	DMI	240 s	70°C	DMI	90%	89%
13²	DMI	DMI	240 s	60°C	---	99%	97%

¹ s'utilitzen el doble d'equivalents que en les altres síntesis (8 eq d'a, 7,2 eq d'HATU, 8,8 eq de DIEA i 8,8 eq de 2,6-lutidina)

² la síntesi es realitza a escala 12,8 µmol

Els primers experiments de la síntesi del dímer H-at-NH₂ es realitzen a 60°C, amb el monòmer dissolt en NMP, l'HATU en DMF i DMI com a dissolvent extra. A diferència de la síntesi anterior, aquí el temps òptim d'acoblament és de 5 minuts. A 3 i 4 minuts els rendiments dels acoblaments i la puresa dels crus són pràcticament iguals entre ells.

Per tal de veure l'efecte del nombre d'equivalents i la seva concentració (experiment **6**), escalfant a 60°C durant 4 minuts s'augmenta el rendiment del 58% al 87% i la puresa del cru del 70% al 90%.

L'augment de la temperatura a la que té lloc la reacció d'acoblament a 70°C durant 4 minuts (experiment **7**) fa augmentar tant el rendiment com la qualitat del cru.

A partir d'aquí, es decideix utilitzar DMI com a únic dissolvent, tant per al monòmer com per a l'agent acoblant (experiment **8** a **13**). Tant a 60°C com a 70°C el temps òptim per a l'acoblament és de 4 minuts. El millor resultat s'obté a 60°C, en el que el rendiment de l'acoblament és del 97% i la puresa del dímer H-at-NH₂ del 91%. Els resultats, tant en el rendiment com en la qualitat dels crus indiquen que és millor utilitzar DMI com a únic dissolvent.

Per tal d'assegurar que les millores en els rendiments es deuen a les microones i no al canvi de dissolvent també se sintetitza el dímer H-at-NH₂ a temperatura ambient amb DMI com a únic dissolvent (experiment **2**). El rendiment

només és lleugerament inferior que amb NMP i DMF com a dissolvents a temperatura ambient (89% vs 93%) i la puresa del cru és la mateixa (68%).

Cal recordar que totes aquestes síntesis tenen lloc en condicions de dilució molt més elevades que les de la síntesi a temperatura ambient. Per a determinar quin efecte té la dilució es realitza l'experiment **13**, a escala 12,8 μmol per al qual no cal afegir el volum extra de DMI per a arribar als 500 μL de volum mínim. En aquest cas l'acoblament es realitza a 60°C durant 4 minuts, amb DMI com a dissolvent tant per al monòmer com per a HATU i el rendiment que s'obté és del 99% i la puresa del producte és del 97%.

D'aquests resultats es pot concloure que les millors condicions que s'han trobat per a realitzar acoblaments de monòmers de PNA assistits per microones són a 60°C durant 4 minuts. Les dissolucions de reactius utilitzades són 0,1 M dels monòmers en DMI i 0,37 M d'HATU en DMI. Si es recorden els acoblaments realitzats amb el microones convencional, un temps de 4 minuts (8x30'') era massa agressiu per a la resina i els resultats eren força negatius. La diferència entre ambdós aparells, a més de la distribució de les microones en la cavitat on té lloc la reacció, és la potència de les microones. Pot ser que en el cas del microones de cuina els resultats haguessin estat millors amb un potència inferior al 50%, mantenint el temps d'escalfament de 4 minuts.

Un altre punt a estudiar és la compatibilitat dels quatre monòmers de PNA amb l'escalfament amb el microones. Per això se sintetitza el tetràmer H-acgt-NH₂ a una escala de 3,2 mol. Amb acoblaments de 4 minuts a 60°C el cru obtingut conté un 83% en el producte esperat. El mateix tetràmer sintetitzat amb acoblaments de 45 minuts a temperatura ambient té una puresa del 55% (Figura 3.20).

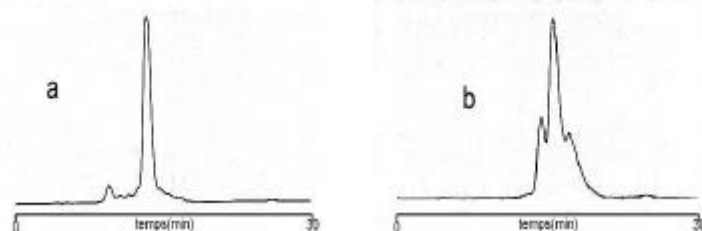
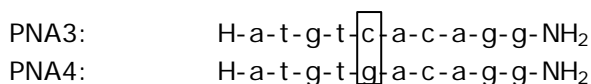


Figura 3.20. Cromatogrames d'HPLC dels crus obtinguts en la síntesi del tetràmer H-acgt-NH₂ assistida per microones (a) i a temperatura ambient (b). El gradient utilitzat és 0 \rightarrow 30% de B en 30' a 50°C, on A és H₂O amb un 0,1% de TFA i B és ACN amb un 0,1% de TFA.

Amb aquests resultats previs, es va decidir sintetitzar el decàmer H-atgtgacagg-NH₂ (PNA4) per a estudiar l'efecte de l'escalfament amb microones en la síntesi d'oligòmers de PNA de mida mitjana. Aquest decàmer PNA4 té la mateixa seqüència que PNA3 però amb un "mismatch" en una posició central i s'utilitzarà per a estudiar l'efecte de la presència de parells no canònics de nucleobases en l'estabilitat dels dúplexs PNA-DNA.



La síntesi de PNA4 té lloc a una escala de 16 μmol sobre la resina habitual en la preparació de PNA (XAL-PEG-PS). Els acoblaments tenen lloc en l'Emrys Creator durant 4 minuts a 60°C. Les dissolucions dels monòmers són d'una concentració de 0,1 M en DMI i la d'HATU de 0,37 M en DMI. Els acoblaments tenen rendiments d'un 98-99%. Per a un decàmer amb aquests rendiments individuals, la síntesi lineal té un rendiment global del 86%. Un cop obtingut l'oligòmer sobre la resina es realitza la reacció de desancorament i la precipitació de l'oligòmer. La caracterització de PNA4 es realitza, com en els casos anteriors, per EM-MALDI-TOF: m/z : 2790,7 (M_{calc} :2790.1). La síntesi té lloc en 6 hores i s'obté un cru que analitzat per HPLC (Figura 3.21, a) mostra un contingut del 73% en el producte esperat.

En la síntesi realitzada a temperatura ambient s'utilitzen dissolucions dels monòmers en NMP i l'HATU es dissol en DMF. Els acoblaments duren 45 minuts i la síntesi global necessita dos dies per a ser completada. El rendiment dels acoblaments està al voltant del 95% (60% de rendiment global per a un decàmer) i el producte esperat té una puresa, determinada per HPLC (Figura 3.21, b), del 53% en el cru escindit de la resina.

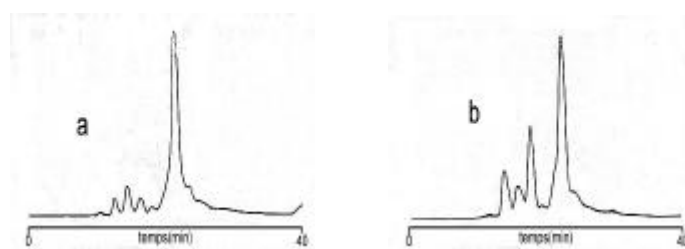


Figura 3.21. Cromatogrames d'HPLC (gradient 0→40% de B en 40 minuts, A: H₂O amb 0,1% TFA i B: ACN amb 0,1% TFA) dels crus obtinguts en la síntesi del decàmer H-atgtgacagg-NH₂ assistida per microones (a) i a temperatura ambient (b).

La utilització d'energia de microones en la síntesi d'aquest decàmer ha permès obtenir el producte desitjat en un temps molt menor que quan els acoblaments es realitzen a temperatura ambient. Els rendiments dels acoblaments són més alts quan s'escalfa el cru i, a més, la qualitat del cru també millora significativament. S'observa que les impureses presents en totes dues síntesis són les mateixes i el que canvia és la proporció en la que es troben.

Actualment, la síntesi de PNA manual, en fase sòlida i assistida per microones utilitzant el microones de Personal Chemistry està limitada per les característiques dels vials en els que es fa la reacció d'acoblament. En el moment en que es disposi d'uns reactors que permetin la filtració del cru, aleshores totes les etapes del cicle de síntesi podran tenir lloc en el mateix reactor i, si és convenient, activades per microones. Així el temps necessari per a l'eliminació a 60°C del grup Fmoc i per al bloqueig dels grups amino que no hagin reaccionat serien menors. A més, en no haver de transferir la resina després de cada acoblament també es reduiria el temps de síntesi i no es donarien pèrdues de resina en les transferències.

3. ESTUDI DE L'ESTABILITAT DELS DÚPLEXS PNA-DNA

3.1. Introducció

Per tal de caracteritzar les hibridacions entre cadenes d'àcids nucleics s'utilitzen tècniques espectroscòpiques (dicroïsmes circular, fluorescència, UV, IR...) i altres com RMN. La més emprada és l'absorbància d'UV, degut a diverses raons. Cal una quantitat molt petita de mostra, els canvis en l'absorbància reflecteixen directament canvis en l'estructura de les macromolècules i la instrumentació necessària es troba present de manera habitual en els laboratoris de química orgànica.

Els oligonucleòtids presenten un màxim d'absorció a una longitud d'ona al voltant dels 260 nm. Aquesta absorció es deu bàsicament a transicions electròniques en les bases púriques i pirimidíniques. La intensitat i la posició de la longitud d'ona de màxima absorció depèn de la composició en bases del fragment oligonucleotídic, de les interaccions d'aparellament i d'apilament, de la concentració salina i del pH. En el cas dels PNAs, en el que també es troben presents les bases nucleotídiques, igualment es troba una longitud d'ona al voltant de 260 nm a la que l'absorció és màxima.

És un fet conegut que els dúplexs de PNA-DNA tenen una estructura comparable a la B-hèlix de DNA-DNA²⁴. Amb aquesta disposició global anàloga s'espera que les interaccions entre les bases nitrogenades que existeixen en els dúplexs de DNA també tinguin lloc en els dúplexs PNA-DNA.

Quan s'escalfa una dissolució que conté un dúplex es produeix una transició de l'estructura de dúplex a dues cadenes senzilles. Aquest fet va acompanyat d'una fenomen d'hipercromicitat, és a dir, un augment de l'absorció a l'UV.

La corba de fusió (absorció vs temperatura) té forma sigmoïdal. Això indica que la transició és cooperativa, cal força energia per a trencar els primers enllaços d'hidrogen entre les bases, però un cop trencats la meitat dels parells és més fàcil desaparèllar la resta de les bases. El punt d'inflexió de la corba es defineix com a temperatura de fusió (T_M) i és la temperatura a la qual hi ha un 50% de molècules estructurades en forma de dúplex i un 50% desestructurades com a cadenes senzilles.

La temperatura de fusió proporciona informació sobre l'estabilitat del dúplex que formen dues cadenes (la força de les interaccions d'apilament i dels enllaços d'hidrogen del dúplex).

Existeixen múltiples intents per a trobar una equació que permeti predir el valor de la temperatura de fusió dels dúplexs DNA-DNA^{25,26,27}. Al 1998 es van publicar dos estudis per part dels grups de Griffin²⁸ i de Nielsen²⁹ en els que intenten predir l'estabilitat dels dúplexs PNA-DNA. Ambdós prenen com a punt de partida els treballs realitzats per als dúplexs de DNA-DNA.

Nielsen arriba a una equació per a calcular T_M en la que els factors que hi influeixen són la longitud de l'oligòmer de PNA, el seu contingut en pirimidines, expressat en forma fraccional (f_{pir}), i la temperatura de fusió del dúplex DNA-DNA equivalent ($T_{M_{nnDNA}}$), calculada utilitzant el model de SantaLucia³⁰:

$$T_{M_{pred}} = 20.79 + 0.83 \cdot T_{M_{nnDNA}} - 26.13 \cdot f_{pir} + 0.44 \cdot longitud$$

Quan es comparen els diferents tipus de dúplexs que pot formar el PNA, s'observa que, en condicions en les que el nivell de sals és moderat, l'estabilitat tèrmica augmenta, principalment degut a la manca de repulsió electrostàtica entre les cadenes dels dúplexs que contenen PNA, en el següent ordre: DNA-DNA < PNA-DNA < PNA-RNA < PNA-PNA³¹. Així, en general, els dúplexs PNA-DNA són lleugerament més estables (aproximadament 1°C/parell de bases) que els corresponents DNA-DNA. Malgrat això, els dúplexs PNA-DNA rics en pirimidina són menys estables i els rics en purina són molt més estables que els corresponents de DNA-DNA.

Les sals influeixen en les propietats (estabilitat, solubilitat, activitat biològica) de les macromolècules de maneres molt diferents. A baixes concentracions (<1 M), les sals generalment exerceixen els seus efectes a través d'interaccions electrostàtiques no específiques que depenen de la força iònica del medi. Per contra, a elevades concentracions salines (>1 M) les contribucions electrostàtiques se saturen i les sals en canvi exerceixen efectes específics sobre els biopolímers que depenen de la naturalesa de la sal i de la seva concentració.

Com a conseqüència de tenir un esquelet neutre, els dúplexs PNA/PNA tenen valors de T_M pràcticament independents de la concentració de sals. Aquest fet contrasta amb els dúplexs DNA/DNA, per als quals la T_M és molt dependent de la força iònica del medi.

3.2. Estabilitat dels dúplexs formats pels PNAs que contenen nucleobases naturals i DNA

Per a enregistrar les corbes de fusió dels diferents productes s'ha seguit la metodologia descrita a l'apartat 3.4. de Materials i Mètodes, en la part experimental. En tots els casos les mesures s'han realitzat a una concentració de dúplex de 4 μ M, a una longitud d'ona de 260 nm i s'ha utilitzat el mateix tampó fosfat sòdic 10 mM i 100 mM de NaCl.

Per tal de calcular la concentració dels PNAs cal conèixer els coeficients d'extinció dels monòmers de PNA, a una longitud d'ona de 260 nm:

- c: 6,6 mL· μ mol⁻¹·cm⁻¹
- t: 8,6 mL· μ mol⁻¹·cm⁻¹
- a: 13,7 mL· μ mol⁻¹·cm⁻¹
- g: 11,7 mL· μ mol⁻¹·cm⁻¹.

Per a cada dúplex s'enregistren tres cops les corbes de fusió de desnaturalització i tres cops les de renaturalització. Els dades obtingudes són

sotmeses a un procés "d'smoothing" mitjançant el programa Origin 5.0 i es calcula la T_M que correspon a la temperatura en la que té un màxim la derivada de la corba de l'absorbància front a la temperatura.

A la següent figura es recorden les seqüències dels decàmers de PNA i la regió del 20-mer de DNA a la que són complementaris:

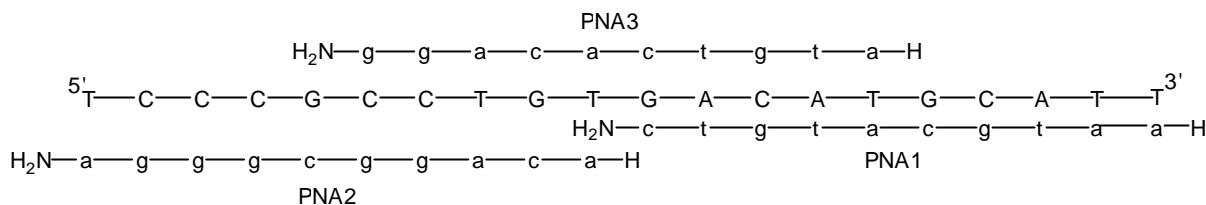


Figura 3.22. Representació dels decàmers PNA1, PNA2 i PNA3 i les regions de l'oligonucleòtid 20-mer a les que són complementàries.

A les figures 3.23, 3.24 i 3.25 es representen les corbes de fusió corresponents als dúplexs PNA-DNA i a la següent taula es recullen les dades de les temperatures de fusió dels dúplexs formats pel 20-mer de DNA i els diferents decàmers de PNA, contenint només nucleobases naturals. A la pàgina web d'Applied Biosystems es pot trobar una funció que permet predir la temperatura de fusió que tindran diferents dúplexs de PNA a unes concentracions determinades (<http://www.appliedbiosystems.com/support/pnadesigner.cfm>). Els valors de T_M que es recullen a la següent taula corresponen a una concentració de dúplex de 1 μ M.

Seqüència	Predicció de T_M	Desnaturalització				Renaturalització			
		Experimental		Promig		Experimental		Promig	
PNA1	53°C	43°C	45°C	46°C	45±1°C	45°C	45°C	45°C	45±1°C
PNA2	76°C	80°C	82°C	82°C	81±1°C	80°C	82°C	82°C	81±1°C
PNA3	58°C	59°C	57°C	57°C	58±1°C	57°C	58°C	58°C	58±1°C

Les prediccions de temperatura de fusió realitzades serveixen per a tenir una idea aproximada dels valors que s'han d'esperar per a cada dúplex. S'ha de tenir present que les condicions experimentals influeixen en la temperatura de fusió d'un dúplex. Per exemple, a diferents concentracions dels dúplexs s'obtenen valors de T_M diferents. Els valors de les temperatures de fusió dels dúplexs de PNA1-DNA, PNA2-DNA i PNA3-DNA segueixen la mateixa tendència que les prediccions, essent la T_M de PNA1-DNA la menor i la de PNA2-DNA la major, com era d'esperar.

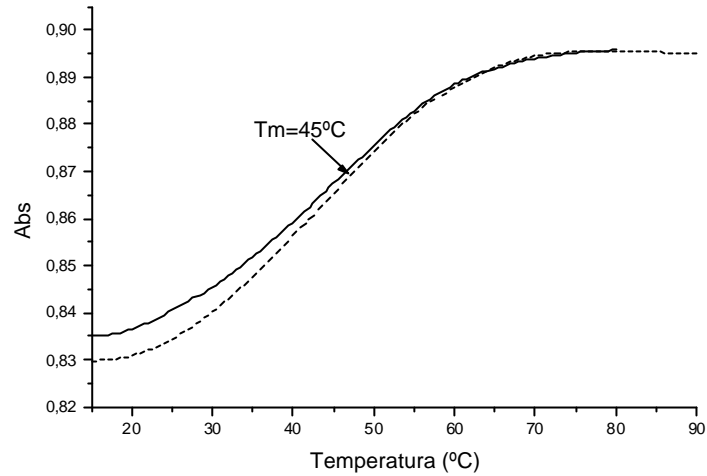


Figura 3.23. Corba de fusió a 260 nm del dúplex PNA1-DNA, per desnaturalització (línia contínua) i per renaturalització (línia discontinua)

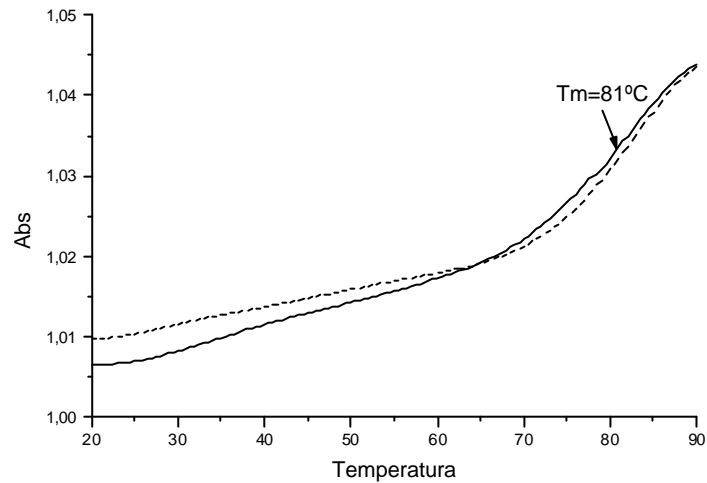


Figura 3.24. Corba de fusió a 260 nm del dúplex PNA2-DNA, per desnaturalització (línia contínua) i per renaturalització (línia discontinua)

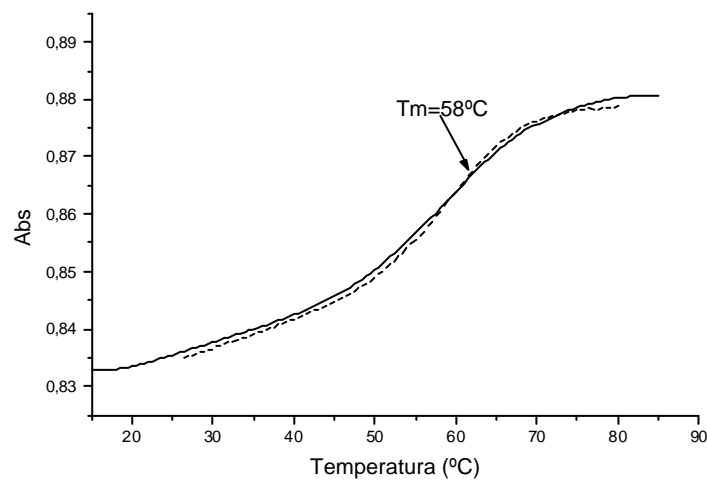


Figura 3.25. Corba de fusió a 260 nm del dúplex PNA3-DNA, per desnaturalització (línia contínua) i per renaturalització (línia discontinua)

La temperatura de fusió de cadascun dels dúplexs és força diferent. Si es representa aquest valor en front del nombre de parells g-c formats s'observa que en el nostre cas hi ha una relació lineal (Figura 3.26). A mesura que augmenta el nombre de parells g-c augmenta proporcionalment la temperatura de fusió.

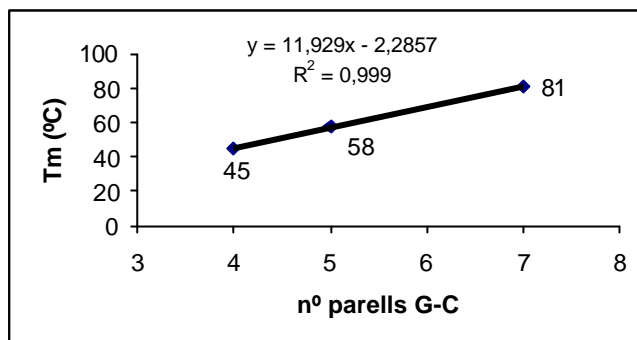


Figura 3.26. Representació de la dependència de la temperatura de fusió amb el nombre de parells g-c presents en el dúplex

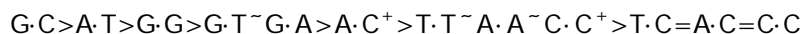
En dúplexs de DNA s'ha observat que la dependència de T_M amb el contingut en parells g-c és lineal i augmenta aproximadament $0,4^\circ\text{C}$ per cada increment en una unitat del percentatge en el contingut en g-c dels dúplexs³². A partir dels resultats obtinguts en el nostre cas, com es pot veure a la següent taula, amb els dúplexs DNA-PNA s'observa que un augment d'un 10% en el contingut en parells g-c provoca un increment d'uns 12°C en la temperatura de fusió. És a dir que un augment d'un 1% implicaria una T_M $1,2^\circ\text{C}$ més elevada. Aquesta dada confirma les conclusions de Nielsen³³ que diu que el valor de la temperatura de fusió d'un dúplex PNA-DNA és molt més dependent del contingut en purines de la cadena de PNA que en els dúplexs de DNA.

Increment de parells g-c	Augment de T_M
10%	13°C
20%	23°C
30%	36°C

Tot i la bona correlació trobada en el present cas, s'ha de tenir en compte que no només el nombre de parells g-c determina la temperatura de fusió sinó també, entre altres factors, la seva posició en la seqüència i el seu entorn.

3.3. Influència d'un "mismatch" en l'estabilitat del dúplex

En el cas dels dúplexs de DNA s'han realitzat diferents estudis³⁴ per a conèixer l'estabilitat que aporten els diferents parells de bases que es poden trobar, tant els parells canònics AT i GC com els parells no canònics o "mismatches". A partir de resultats obtinguts, tant per càlcul com experimentalment, s'observa una tendència general en l'estabilitat.



Aquesta tendència és dependent del context en el que es troben els diferents "mismatches", de manera que de vegades pot ser que l'ordre d'estabilitat variï. En el cas del parell G-G es pot racionalitzar la seva estabilitat (és el més estable de tots el "mismatches") pel seu elevat potencial d'apilament degut als dos anells de purina i, a més, per què les guanines poden formar fins a dos enllaços d'hidrogen, com es pot veure a la figura 3.27. L'estructura que adopten els nucleòsids en la seqüència, en funció del context, ha estat estudiada per diversos grups³⁴.

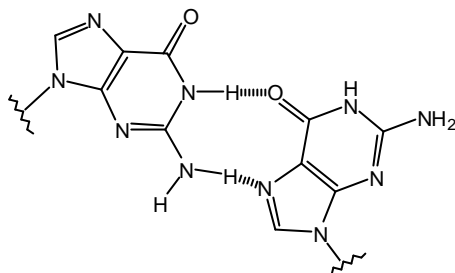


Figura 3.27. Aparellament del "mismatch" G-G en un dúplex de DNA

El PNA presenta una gran especificitat en les unions al DNA complementari. La presència d'un "mismatch" en un dúplex PNA-DNA és més desestabilitzant que el mateix "mismatch" en un dúplex DNA-DNA³⁵. L'efecte de la presència d'un "mismatch" depèn molt del context i s'ha calculat que, en general, és del mateix ordre, o més gran, que el guany produït per dos parells correctes³¹. Un dels motius que poden explicar aquesta diferència és la rigidesa de l'esquelet poliamida del PNA en contrast amb la major flexibilitat de l'esquelet fosfat-ribosa del DNA, que pot adaptar-se a les conformacions necessàries per a permetre interaccions entre les nucleobases tot i que els parells que es formen no siguin els canònics.

S'han realitzat experiments utilitzant diverses tècniques^{36,37} per a estudiar els efectes dels "mismatches" en la formació de dúplexs. Com a conclusions generals es pot dir que hi ha una correlació entre l'estabilitat i la posició del "mismatch". Quan es troben a l'extrem o adjacents a ell, els "mismatches" tenen poc efecte, però s'observa una general pèrdua d'estabilitat a mesura que s'allunyen de l'extrem de la seqüència. A més, la composició dels parells de bases veïns sembla que també influeix en la desestabilització produïda per un "mismatch", i així els parells GC flanquejants sembla que estabilitzen en comparació amb els parells AT.

A la seqüència PNA4, com es pot veure a la figura 3.28 es canvia una **c** d'una posició central de PNA3 per una **g**.

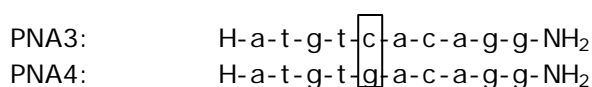


Figura 3.28. Representació de les seqüències de PNA3 i PNA4 on es pot observar el canvi d'una **c** per una **g**

Així, el dúplex PNA4-DNA (Figura 3.29) té un "mismatch" de tipus g-G.

Per a poder veure com d'important és l'efecte del contingut en purines en la cadena de PNA es pot utilitzar el programa d'Applied Biosystems per a predir les temperatures de fusió de diferents dúplexs PNA-DNA. Mantenint constant el nombre de parells g-c s'assagen diverses combinacions de purines i pirimidines en la cadena de PNA1:

seqüències	Nº de g en PNA	Predicció de T_M
H-aatggatgtg-NH ₂	4	58°C
H-aatgcatgtg-NH ₂	3	56°C
H-aatgcatgtc-NH ₂	2	53°C
H-aatgcatctc-NH ₂	1	49°C
H-aatccatctc-NH ₂	0	45°C

A partir d'aquests valors es pot veure que cada disminució del 10% en el contingut en g de la cadena de PNA es reflecteix en una baixada d'uns 3-4°C en la T_M .

En resum, de totes aquestes dades sembla clar que la presència del "mismatch" g-g desestabilitza, en comparació amb el parell canònic g-c, els dúplexs en els que es troba, però la contribució a l'estabilitat dels dúplexs PNA-DNA del parell g-g és semblant (lleugerament inferior) a la del parell a-t.

3.4. Estabilitat dels dúplexs formats pels PNAs que contenen abraçadores de guanina i DNA

El grup de Nielsen ha publicat en els darrers anys la síntesi de monòmers de PNA en els que les nucleobases són mímic de timina, la seva incorporació en oligòmers i la seva avaluació en el reconeixement d'adenines tant en l'estructura de dúplexs com de tríplexs^{38,39}.

A partir dels seus resultats s'observa que el sistema bT (Figura 3.32) és un bon mímic de la T ja que provoca un augment de l'estabilitat de tríplexes PNA₂-DNA quan aquesta base es troba en la cadena Hoogsteen. En l'estructura dúplex de tipus PNA-DNA o PNA-PNA l'especificitat de bT per l'adenina és comparable a la de la timina.

El sistema tricíclic tT (Figura 3.32) es va dissenyar, igual que l'anterior, de manera que es conservés la posició dels acceptors i donadors d'enllaç d'hidrogen de la T.

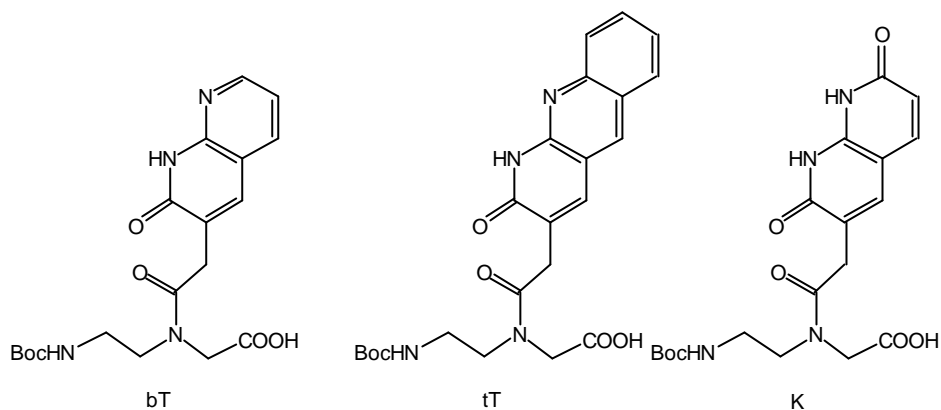


Figura 3.32. Monòmers de PNA que incorporen nucleobases modificades mímic de timina (bT i tT) i de citosina (K) dissenyades pel grup de Nielsen

De fet, els resultats obtinguts pel grup de Nielsen indiquen que hi ha una bona correlació entre la superfície de la nucleobase i el seu efecte estabilitzant de l'hèlix quan aquesta base es troba al final de l'hèlix. Substitucions per nucleobases amb major superfície que les bases naturals poden provocar augments significatius en l'estabilitat d'estructures tant de dúplex com de tríplex.

El grup de Nielsen també ha descrit⁴⁰ la síntesi d'un mímic de la citosina protonada per tal d'utilitzar-lo en la cadena Hoogsteen d'un tríplex per a reconèixer guanines. Aquesta nucleobase bicíclica, K (Figura 3.32), que ha estat incorporada en àcids nucleics peptídics, presenta una superfície aromàtica extensa que hauria de permetre interaccions d'apilament molt eficients amb les bases veïnes i, a més, té una distribució de llocs donadors i acceptors d'enllaç d'hidrogen que permet una interacció específica amb el parell G-C.

La nova nucleobase ha estat incorporada en diferents posicions de la cadena Hoogsteen d'un bis-PNA que s'hibrida amb l'oligonucleòtid complementari i s'ha observat una estabilització del tríplex respecte al que conté citosina i, a més, quan les unitats de K es troben en posicions adjacents s'observa una estabilització cooperativa.

El darrer objectiu del present treball consisteix en avaluar l'eficàcia de les abraçadores de guanina, la síntesi de les quals està descrita al capítol 2. Coneguts els valors de les temperatures de fusió dels dúplexs PNA-DNA que contenen només nucleobases naturals es procedeix a estudiar les hibridacions dels dúplexs PNA-DNA en els que les citosines de la seqüència de PNA han estat substituïdes per les abraçadores de guanina.

En primer lloc s'analitza el cas del PNA1 en el que les dues unitats de citosina han estat substituïdes per les abraçadores de guanina amb grup amino (PNA1amino) i guanidino (PNA1guanidino). A la següent figura es representen els dúplexs PNA1amino-DNA i PNA1guanidino-DNA. Les corbes de fusió s'enregistren en les mateixes condicions que les dels dúplexs de PNA continent nucleobases naturals i DNA. A les figures 3.34 i 3.35 es recullen les fusions obtingudes.

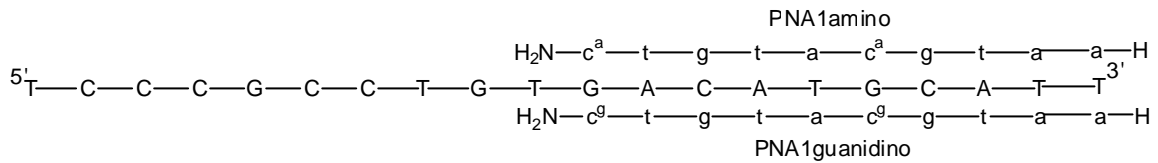


Figura 3.33. Dúplexs PNA1amino-DNA i PNA1guanidino-DNA

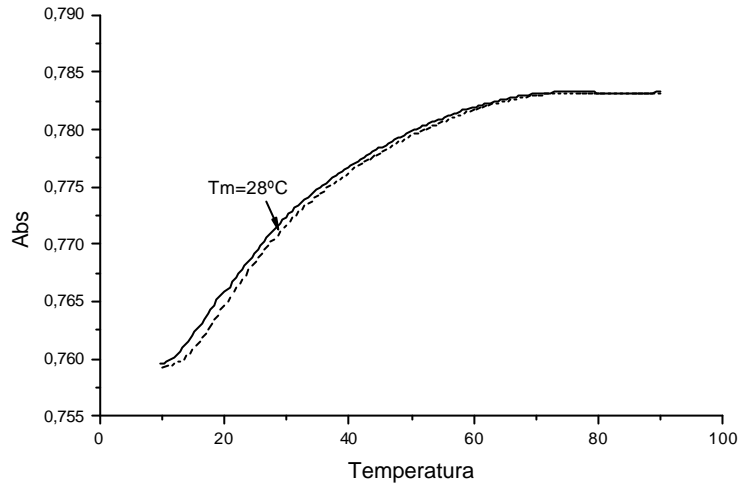


Figura 3.34. Corba de fusió a 260 nm del dúplex PNA1amino-DNA, per desnaturalització (línia continua) i per renaturalització (línia discontinua)

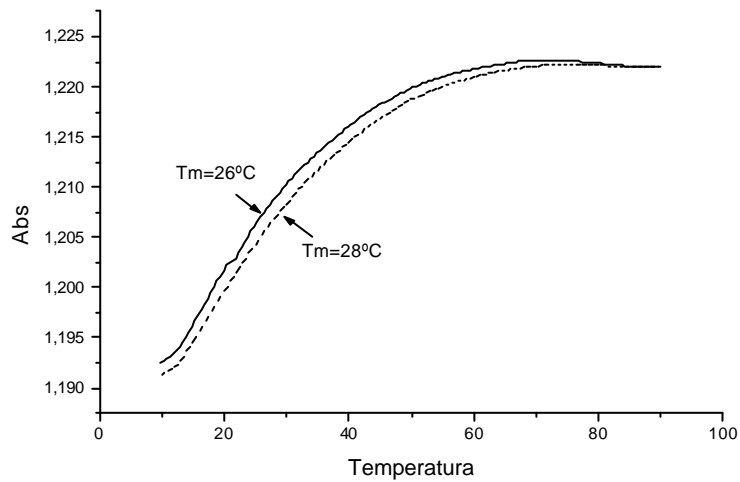


Figura 3.35. Corba de fusió a 260 nm del dúplex PNA1guanidino-DNA, per desnaturalització (línia continua) i per renaturalització (línia discontinua)

A continuació el decàmer de PNA estudiat és el corresponent PNA3 en el que una de les dues citosines (la veïna a timina) ha estat substituïda per l'abraçadora amino de guanina (Figura 3.36).

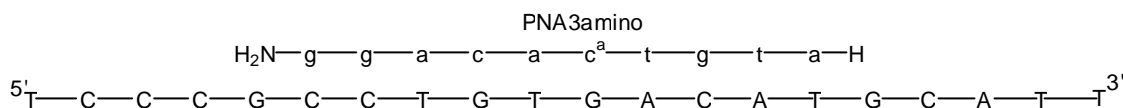


Figura 3.36. Representació del dúplex PNA3amino-DNA

A la següent figura es representa la corba de fusió corresponent al dúplex PNA3amino-DNA.

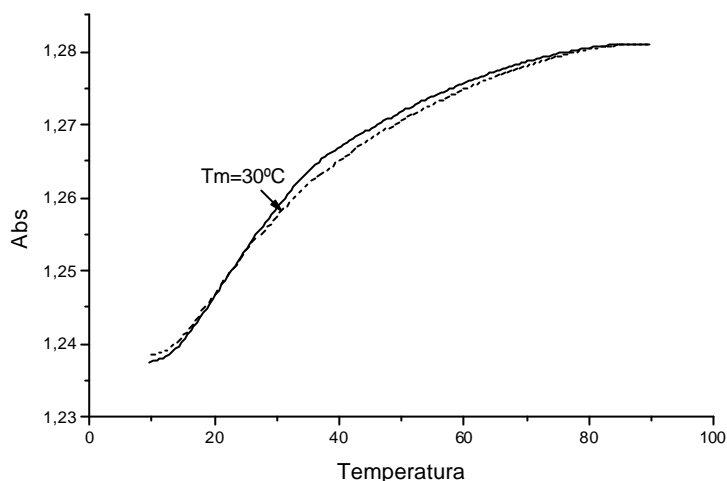


Figura 3.37. Corba de fusió a 260 nm del dúplex PNA3amino-DNA, per desnaturalització (línia contínua) i per renaturalització (línia discontinua)

En tots els casos en els que s'ha introduït les anomenades abraçadores de guanina es pot observar una desestabilització dels dúplexs, ja que els valors de les temperatures de fusió són menors que en el cas dels dúplexs que només contenen nucleobases naturals.

Seqüència	T_M	? T_M
PNA1	45°C	---
PNA1amino	28°C	-17°C
PNA1guanidino	27°C	-18°C
PNA3	58°C	---
PNA3amino	30°C	-28°C

3.5. Discussió dels resultats i nous experiments

En l'estudi^{13,41} de dúplexs DNA-DNA en els que s'incorporen les abraçadores de guanina s'ha arribat a la conclusió que les variacions en les temperatures de fusió degudes a la presència d'aquestes abraçadores tenen una important dependència amb la seqüència en la que es troben. Les seqüències estudiades són completament pirimidíniques, les nucleobases modificades es troben generalment entre dues citosines i s'obtenen increments considerables de les temperatures de fusió. A la següent taula es recullen els valors de les temperatures de fusió de dúplexs amb diferents seqüències:

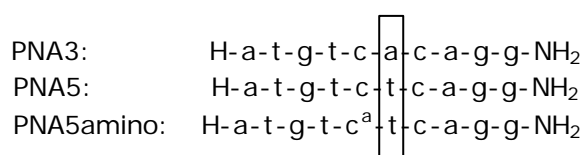
Seqüència	Abraçadora	T _M amb abraçadora	DT _M	Referència
TCTCC ^a CTCTC	Amino	68,5°C	18°C	13
TCTCCCTC ^a TC	Amino	65°C	14,5°C	13
TCTCC ^a CTCTC	Amino	59,2°C	22,1°C	41
TCTCC ^g CTCTC	Guanidino	53,5°C	16,4°C	41

A diferència del nostre cas, per tal de preparar els oligonucleòtids que contenen l'abraçadora guanidino de guanina, com el que es recull a la taula anterior, l'estratègia de síntesi del grup de Manoharan⁴² consisteix en preparar els oligòmers amb la variant amino de l'abraçadora i a continuació convertir els grups amino en guanidino.

En tots dos treballs s'han determinat les temperatures de fusió en les mateixes condicions, per això sorprèn que per a la mateixa seqüència (TCTCC^aCTCTC) descriguin valors de T_M diferents. El que sí és diferent és la nucleobase amb el que comparen les abraçadores. En el cas del primer treball¹³ es tracta de la 5-metilcitosina, mentre que en el segon cas⁴¹ és la citosina.

Com ja s'ha dit, les seqüències de DNA en les que s'ha estudiat la influència de les abraçadores de guanina en l'estabilitat dels dúplexs en els que participen tenen dues característiques comunes, per una banda, l'abraçadora es troba flanquejada per dues citosines i, a més, tota la seqüència es de tipus pirimidínic. En els decàmers de PNA sintetitzats en el present treball, les abraçadores no s'han trobat en aquestes condicions en cap cas.

Per tal d'avaluar la influència de les bases veïnes a les abraçadores se sintetitza una nova seqüència de PNA, derivada de PNA3, en la que es troba una citosina flanquejada per dues timines (PNA5) i es decideix introduir l'abraçadora amino de guanina en la posició de la citosina que hi ha entre les dues timines (PNA5amino).



Seguint la metodologia habitual desenvolupada en el present treball per a la síntesi de PNA en fase sòlida es preparen els dos decàmers PNA5 i PNA5amino. En el cas de PNA5, el rendiment promig dels acoblaments és del 97% i la puresa del producte en el cru del 80%. Per a purificar PNA5 el gradient utilitzat amb una columna més curta que l'anteriorment utilitzada, és de 0→50% de B en 15 minuts, on A és H₂O (0,1% TFA) i B és ACN (0,1% TFA). A la figura 3.38 es poden veure els cromatogrames corresponents a PNA5 i PNA5amino.

En la síntesi de PNA5amino el rendiment global és menor ja que l'etapa d'incorporació de l'abraçadora de guanina amino té un rendiment del 92%. El cru

obtingut s'analitza per HPLC, en les mateixes condicions que PNA5 i la puresa del decàmer és del 68%.

Tots dos decàmers són analitzats per EM-MALDI-TOF en mode positiu i amb àcid sinapínic com a matriu. A la següent taula es recullen els resultats obtinguts:

Decàmer	Massa obtinguda (m/z)	Massa calculada
PNA5	2743,0	2741,10
PNA5amino	2852,7	2853,77

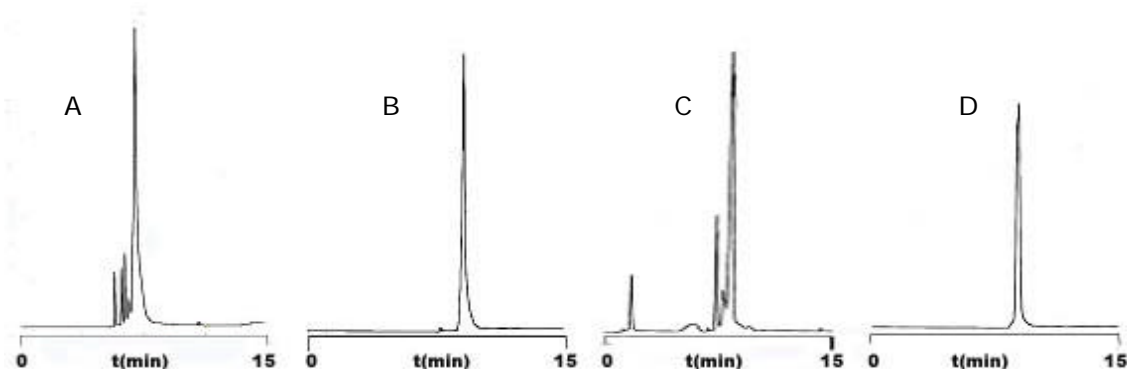


Figura 3.38. Cromatogrames d'HPLC dels oligòmers A) PNA5 cru; B) PNA5 purificat; C) PNA5amino cru i D) PNA5amino purificat. Gradient 0→50% en 15' (A: H₂O 0,1% TFA, B: ACN 0,1%TFA) a 50°C

Obviament, també cal preparar l'oligonucleòtid, anomenat DNA5, complementari a PNA5 (5'-CCT-GAG-ACA-T-3'). Es realitza la síntesi sobre un suport polimèric de boles de vidre que ja té incorporat el primer nucleòsid en una escala de 0,2 μmol. El rendiment de la síntesi ha estat del 83%. La purificació és per HPLC, en les condicions habituals de purificació d'oligonucleòtids i el seu rendiment és del 65%. El producte es caracteritza per espectrometria de masses de MALDI-TOF en mode negatiu amb THAP com a matriu i s'obté una massa de 3181,8 ($M_{\text{calculada}}$: 3179,43). A la següent figura es pot veure el cromatograma corresponent a DNA5 purificat.

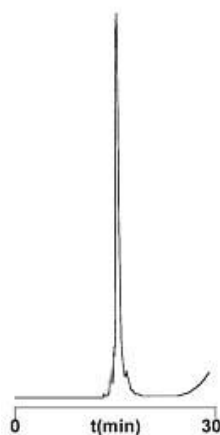


Figura 3.39. Cromatograma d'HPLC del oligonucleòtid DNA5 purificat. Gradient 5→30% en 30' (A: tampó AcONH₄ 0,01 M pH 7, B: ACN/H₂O 1:1)

S'analitza la hibridació de les noves seqüències mitjançant l'enregistrament de les corbes de fusió de desnaturalització i renaturalització, de la mateixa manera que s'ha fet amb la resta de seqüències.

El dúplex PNA5-DNA5 té cinc parells g-c, de manera que s'esperaria una temperatura de fusió al voltant dels 58°C del dúplex PNA3-DNA. En la corba de fusió de PNA5 (Figura 3.40) s'observen dues transicions, que no són gaire clares.

Dúplex	T _M
PNA3-DNA	58°C
PNA5-DNA5	28°C 53°C

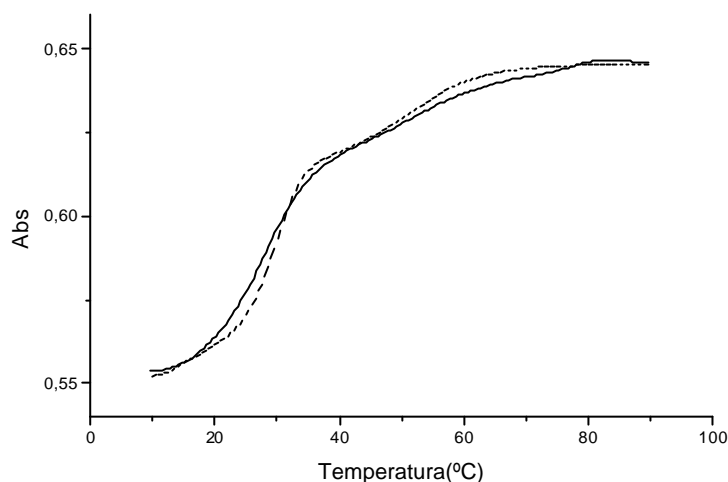


Figura 3.40. Corba de fusió a 260 nm del dúplex PNA5-DNA, per desnaturalització (línia contínua) i per renaturalització (línia discontinua)

Si es comparen PNA3 i PNA5 s'observa que PNA3 conté un 60% de purines per al 50% de PNA5, de manera que s'espera que la temperatura de fusió del dúplex que conté PNA5 sigui inferior a la del de PNA3. A més, utilitzant el programa d'Applied Biosystems, la temperatura de fusió predita per al dúplex PNA5-DNA5 és de 54°C a una concentració de 1 µM. Aquests dos fets poden explicar la inflexió observada a 53°C per a PNA5-DNA5, però no la que es dona a 28°C.

Quan s'analitza la hibridació del dúplex PNA5amino-DNA5 s'obtenen les corbes de fusió de desnaturalització i renaturalització recollides a la figura 3.41.

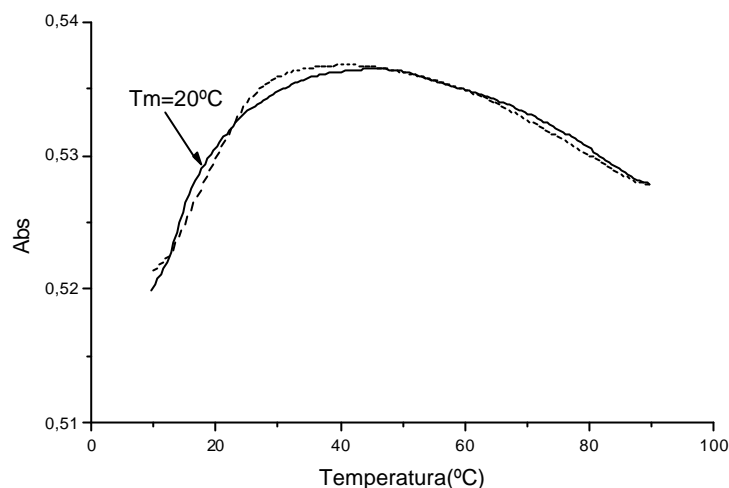


Figura 3.41. Corba de fusió a 260 nm del dúplex PNA5amino-DNA, per desnaturalització (línia contínua) i per renaturalització (línia discontinua)

En aquest cas no s'observa cap corba sigmoïdal i la primera derivada dóna un màxim que suposaria una temperatura de fusió de 20°C. Així doncs, tot sembla indicar que igual que en les experiències anteriors, la presència de l'abraçadora de guanina provoca la desestabilització del corresponent dúplex PNA5-DNA5.

Per tal de comparar els resultats obtinguts amb les abraçadores de guanina en oligòmers de PNA, només es disposa d'un únic treball⁴³ publicat molt recentment en els que es descriuen les hibridacions de dues seqüències de PNA que contenen l'abraçadora de guanina amino amb els corresponents oligonucleòtids complementaris. Les dues seqüències són gtagatc^aact i gtagatcc^act. En la segona seqüència, quan l'abraçadora es troba flanquejada per dues unitats de c s'observa un augment de la temperatura de fusió de 23,7°C (73,5 vs 49,8°C) respecte al dúplex control que té totes les nucleobases naturals. En canvi, en el cas de la primera seqüència, en la que l'abraçadora amino de guanina està flanquejada per t i a, els autors diuen que la fusió no és cooperativa i no donen cap valor de T_M .

Així, el conjunt dels resultats obtinguts fins al moment amb les abraçadores de guanina incorporades a una estructura d'àcid nucleic peptídic, tant en el present cas com en el cas del treball de Manoharan, indiquen que la seva capacitat per a formar parells amb guanina no és ideal i depèn molt de la seqüència i de l'entorn en els que es troben. Sembla que en el cas del treball de Manoharan els resultats òptims es donen quan les noves nucleobases es troben flanquejades per pirimidines.

En el nostre cas, en totes les seqüències assajades la presència de les abraçadores de guanina sempre ha provocat disminucions dels valors de les temperatures de fusió, independentment de l'entorn en el que es trobi la modificació o bé ha portat a resultats difícilment interpretables.

Com a resum es pot dir que els resultats obtinguts en el present treball amb les abraçadores de guanina incorporades en seqüències de PNA són decepcionants

perquè no acompleixen les expectatives que suggerien els treballs publicats amb els nucleòsids. En un dúplex DNA-DNA totes dues cadenes d'àcid nucleic són de tipus aniónic, les abraçadores en tenir càrrega positiva poden ajudar a estabilitzar el sistema en disminuir la repulsió entre les càrregues característica dels dúplexs de DNA. En el cas d'un dúplex de PNA-DNA, la cadena de PNA és neutra de manera que l'efecte estabilitzant de la càrrega positiva de l'abraçadora s'espera que sigui menor, però això no explica la desestabilització que hem trobat en el nostre cas.

De totes maneres cal realitzar més experiments amb noves seqüències en les que les abraçadores es trobin en diferents entorns i posicions dins de la seqüència. A més, seria interessant analitzar els dúplexs PNA-DNA que contenen les abraçadores de guanina mitjançant altres tècniques com són el dicroïsm circular i la RMN.

4. BIBLIOGRAFIA

- ¹ Meier, C.; Engels, J.W. **Peptide nucleic acids. Unusual properties of nonionic oligonucleotide analogues**, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1992**, *31*(8), 1008-1010
- ² Nielsen, P.E.; Egholm, M.; Berg, R.H.; Buchardt, O. **Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide**, *Science*, **1991**, 1497-1500
- ³ Egholm, M.; Buchardt, O.; Nielsen, P.E.; Berg, R.H. **Peptide Nucleic Acids (PNA). Oligonucleotide analogues with an achiral peptide backbone**, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 1895-1897
- ⁴ Nielsen, P.E.; Egholm, M. **Peptide nucleic acids, protocols and applications**, Ed. Nielsen, P.E.; Egholm, M. Horizon Scientific Press, Norfolk (UK), 1999, 6-8
- ⁵ Eriksson, M.; Nielsen, P.E. **PNA-nucleic acids complexes. Structure, stability and dynamics**, *Quarterly Reviews of Biophysics*, **1996**, *29*(4), 369-394
- ⁶ Leijon, M.; Gräslund, A.; Nielsen, P.E.; Buchardt, O.; Norden, B.; Kristensen, S.M.; Eriksson, M. **Structural characterization of PNA-DNA duplexes by NMR. Evidence for DNA in a B-like conformation**, *Biochemistry*, **1994**, *33*, 9820-9825
- ⁷ Egholm, M.; Buchardt, O.; Christensen, L.; Behrens, C.; Freier, S.M.; Driver, D.A.; Berg, R.H.; Kim, S.K.; Norden, B.; Nielsen, P.E. **PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen bonding rules**, *Nature*, **1993**, *365*, 566-568
- ⁸ Wittung, P.; Nielsen, P.E.; Buchardt, O.; Egholm, M.; Norden, B. **DNA-like double helix formed by peptide nucleic acid**, *Nature*, **1994**, *368*, 561-563
- ⁹ Sen, S.; Nilsson, L. **Molecular dynamics of duplex systems involving PNA: structural and dynamical consequences of the nucleic acid backbone**, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 619-631
- ¹⁰ Nielsen, P.E. **Peptide nucleic acid targeting of double-stranded DNA**, *Methods Enzymol.* **2001**, *340*, 329-339
- ¹¹ Uhlmann, E.; Peyman, A.; Breipohl, G.; Will, D.W. **PNA: synthetic polyamide nucleic acids with unusual binding properties**, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2796-2823
- ¹² Koch, T.; Hansen, H.F.; Andersen, P.; Larsen, T.; Batz, H.G.; Otteson, K.; Orum, H. **Improvements in automated PNA synthesis using Boc/Z monomers**, *J. Pept. Res.* **1997**, *49*, 80-88
- ¹³ Lin, K.; Matteucci, M.D. **A cytosine analogue capable of clamp-like binding to a guanine in helical nucleic acids**, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8531-8532
- ¹⁴ Tam, J.P.; Heath, W.F.; Merrifield, R.B. **Mechanism for the removal of benzyl protecting groups in synthetic peptides by trifluoromethanesulfonic acid –**

trifluoroacetic acid – dimethylsulfide, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 5242-5251

¹⁵ Giguere, R.J.; Bray, T.L.; Duncan, S.M. **Application of commercial microwave ovens to organic chemistry**, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 4945

¹⁶ Gedye, R.; Smith, F.; Westway, K.; Ali, H.; Baldisera, L.; Laberge, L.; Rousell, J. **The use of microwave ovens for rapid organic synthesis**, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 279

¹⁷ Caddick, S. **Microwave assisted organic reactions**, *Tetrahedron*, **1995**, *51(38)*, 10403-10432

¹⁸ Lidström, P.; Tierney, J.; Wathey, B.; Westman, J. **Microwave assisted organic synthesis-a review**, *Tetrahedron*, **2001**, *57*, 9225-9283

¹⁹ Lew, A.; Krutzik, P.O.; Hart, M.E.; Chamberlin, A.R. **Increasing rates of reaction: microwave-assisted organic synthesis for combinatorial chemistry**, *J. Comb. Chem.* **2002**, *4(2)*, 95-105

²⁰ Deshayes, S.; Liagre, M.; Loupy, A.; Luche, J.L.; Petit, A. **Microwave activation in phase transfer catalysis**, *Tetrahedron*, **1999**, *55*, 10851-10870

²¹ Yu, H.M.; Chen, S-T.; Wang, K.T. **Enhanced coupling efficiency in solid-phase peptide synthesis by microwave irradiation**, *J. Org. Chem.* **1992**, *57(1)*, 4781-4784

²² Erdélyi, M.; Gogoll, A. **Rapid microwave-assisted solid phase peptide synthesis**, *Synthesis*, **2002**, *11*, 1592-1596

²³ Olivos, H.J.; Alluri, P.G.; Reddy, M.M.; Saony, D.; Kodadek, T. **Microwave-assisted solid-phase synthesis of peptoids**, *Organic Lett.* **2002**, *4(23)*, 4057-4059

²⁴ Eriksson, M.; Nielsen, P.E. **Solution structure of peptide nucleic-acid-DNA duplex**, *Nature Structural Biology*, **1996**, *3(5)*, 410-413

²⁵ Borre, P.N.; Dengler, B.; Tinoco Jr, I.; Uhlenbeck, O.C. **Stability of ribonucleic acid double-stranded helices**, *J. Mol. Biol.* **1974**, *86(4)*, 843-853

²⁶ Owczarzy, R.; Vallone, P.M.; Gallo, F.J.; Paner, T.M.; Lane, M.J.; Benight, A.S. **Predicting sequence-dependent melting stability of short duplex DNA oligomers**, *Biopolymers*, **1997**, *44(3)*, 217-239

²⁷ Santalucia Jr, J.; Allawi, H.T.; Seneviratne, P.A. **Improved nearest-neighbor parameters for predicting DNA duplex stability**, *Biochemistry*, **1996**, *35*, 3555-3562

²⁸ Griffin, T.J.; Smith, L.H. **An approach to predicting the stabilities of peptide nucleic acid: DNA duplexes**, *Anal. Biochem.* **1998**, *260*, 56-63

²⁹ Giesen, U.; Kleider, W.; Berding, C.; Geiger, A.; Orum, H.; Nielsen, P.E. **A formula for thermal stability (T_m) prediction of PNA/DNA duplexes**, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26(21)*, 5004-5006

³⁰ Christensen, L.; Fitzpatrick, R.; Gildea, B.; Petersen, K.M.; Hansen, H.F.; Koch, T.; Egholm, M.; Buchardt, O.; Nielsen, P.E.; Coull, J.; Berg, R.H. **Solid-phase synthesis of peptide nucleic acids**, *J. Pept. Sci.* **1995**, *3*, 175-183

³¹ Ratilainen, T.; Holmen, A.; Tuite, E.; Nielsen, P.E.; Norden, B. **Thermodynamics of sequence-specific binding of PNA to DNA**, *Biochemistry*, **2000**, *39*, 7781-7791

³² **Nucleic Acid hybridization**, M.L.M. Anderson, Ed. D. Rickwood, Bioscientific Publishers, Springer, NY (USA), 1999, pg 5.

³³ Nielsen, P.E. **Peptide nucleic acid: a versatile tool in genetic diagnostics and molecular biology**, *Current Opinion in Biotechnology*, **2001**, *12*, 16-20

³⁴ Peyret, N.; Seneviratne, P.A.; Allawi, H.T.; SantaLucia Jr. J. **Nearest-neighbor thermodynamics and NMR of DNA sequences with internal A·A, C·C, G·G and T·T mismatches**, *Biochemistry*, **1999**, *38*, 3468-3477

³⁵ Ray, A.; Norden, B. **Peptide nucleic acid (PNA): its medical and biotechnical applications and promise for the future**, *FASEB J.* **2000**, *14*, 1041-1060

- ³⁶ Jensen, K.K.; Orum, H.; Nielsen, P.E.; Norden, B. **Kinetics for hybridisation of peptide nucleic acids (PNA) with DNA and RNA studied with the BIAcore technique**, *Biochemistry*, **1997**, *36*, 5072-5077
- ³⁷ Igloi, G.L. **Variability in the stability of DNA-peptide nucleic acid (PNA) single-base mismatched duplexes: real-time hybridisation during affinity electrophoresis in PNA-containing gels**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 8562-8567
- ³⁸ Eldrup, A.B.; Nielsen, B.B.; Haaima, G.; Rasmussen, H.; Kastrup, J.S.; Christensen, C.; Nielsen, P.E. **1,8-naphthyridin-2(1H)-ones – Novel bicyclic and tricyclic analogues of thymine in peptide nucleic acids (PNAs)**, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 1781-1790
- ³⁹ Eldrup, A.B.; Christensen, C.; Haaima, G.; Nielsen, P.E. **Substituted 1,8-naphthyridin-2(1H)-ones are superior to thymine in the recognition of adenine in duplex as well as triplex structures**, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3254-3262
- ⁴⁰ Christensen, C.; Eldrup, A.B.; Haaima, G.; Nielsen, P.E. **1,8-naphthyridin-2,7-(1,8H)-dione is an effective mimic of protonated cytosine in peptide nucleic acid triplex recognition systems**, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 3121-3124
- ⁴¹ Wilds, C.J.; Maier, M.A.; Terreshko, V.; Manoharan, M.; Egli, M. **Direct observation of a cytosine analogue that forms five hydrogen bonds to guanosine: guanidino G-clamp**, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*(1), 115-117
- ⁴² Maier, M.A.; Baber-Peach, I.; Manoharan, M. **Postsynthetic guanidinylation of primary amino groups in the minor and major grooves of oligonucleotides** *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 7613-7616
- ⁴³ Rajeev, K.G.; Maier, M.A.; Lesnik, E.A.; Manoharan, M. **High-affinity peptide nucleic acid oligomers containing tricyclic cytosine analogues**, *Org. Lett.* **2002**, *4*(25), 4395-4398

CONCLUSIONS

1. Utilitzant un mètode de síntesi prèviament desenvolupat s'han obtingut una sèrie d'oligodesoxiribonucleòtids cíclics (un dodecàmer i dos 18-mers) de seqüència complementària al mRNA de la dihidrofolat reductasa (DHFR), comprovant-se que el rendiment de síntesi disminueix en augmentar la mida del cicle i que mentre el dodecàmer es pot purificar per HPLC, per tal de purificar els 18-mers és necessari utilitzar l'electroforesi sobre gel de poliacrilamida en condicions no-desnaturalitzants.
2. Els oligonucleòtids cíclics sintetitzats han mostrat activitat citotòxica sobre cèl·lules de hámster xinès, presumiblement per un mecanisme antisentit que implica la inhibició de l'expressió de la DHFR. La mida de l'oligonucleòtid cíclic influeix en la seva activitat citotòxica i és major per al dodecàmer que per al 18-mer. Per a tots ells existeix una concentració a la que l'activitat és més gran, fet que sembla indicar que hi ha una relació òptima entre la concentració de l'oligonucleòtid i la del liposoma catiònic utilitzat per a la seva vehiculització. L'activitat dels oligonucleòtids cíclics, que és menor que la dels oligonucleòtids lineals amb unions internucleosídiques de tipus fosforotioat, i és molt major que la dels lineals que contenen unions naturals fosfodiester, és atribuïble al seu caràcter cíclic i a la conseqüent resistència front a les exonucleases.
3. Per a possibilitar l'obtenció d'oligonucleòtids cíclics que també siguin resistents a l'acció de les endonucleases, s'ha comprovat que la metodologia general de síntesi és aplicable a l'obtenció d'oligonucleòtids cíclics amb unions internucleosídiques fosforotioat en totes les posicions, excepte en la que uneix l'oligòmer al suport sòlid en el precursor lineal.
4. S'ha desenvolupat un esquema de síntesi per a, a partir de 5-bromouracil i en 8 etapes, obtenir dos nous monòmers d'àcid nucleic peptídic que incorporen com a nucleobase modificada a anàlegs de citosina, anomenats abraçadores de guanina. Aquests incorporen un apèndix amb una funcionalitat terminal de tipus amino una i guanidino l'altra i són potencialment capaços de formar fins a quatre i cinc enllaços d'hidrogen respectivament amb una guanina d'una seqüència complementària.
5. L'elaboració de l'anell de fenoxazina de les abraçadores de guanina ha precisat de la posada a punt d'un procediment que difereix substancialment del descrit per al derivat nucleosídic d'una de les abraçadores. Així, en l'etapa clau d'incorporació

del 2-aminoresorcinol en la posició 4 de l'uracil, s'ha comprovat que de totes les alternatives assajades l'única que transcorre amb bons rendiments és la que: a) parteix del N¹-*tert*-butoxicarbonilmetil derivat del 5-bromouracil, en bona part per la seva major solubilitat respecte a altres derivats obtinguts, i b) activa la posició 4 del 5-bromouracil en forma de triazole derivat per a la substitució nucleòfila amb el 2-aminoresorcinol.

6. En l'esquema desenvolupat, la ciclació de l'aminoresorcinol derivat del 5-bromouracil per a formar la fenoxazina i la incorporació dels apèndixs de 2-etanolamina i 2-hidroxietilguanidina, ambdós protegits amb el grup Z, condueix a millors resultats si es duu a terme en aquest ordre que en l'invers degut a que: a) els esquemes de síntesi de les dues abraçadores tenen un intermedi més comú i els rendiments globals són superiors i b) en la reacció de Mitsunobu que incorpora els apèndixs sobre el producte no ciclat s'obtenen subproductes de dialquilació.

En tots els casos, s'ha comprovat que la utilització de trifenilfosfina immobilitzada sobre un suport polimèric permet separar fàcilment l'òxid de trifenilfosfina que es forma com a subproducte i augmenta els rendiments.

7. S'ha dut a terme la síntesi en fase sòlida mitjançant l'estratègia Fmoc/Bhoc d'una sèrie de decàmers de PNA, uns que contenen únicament nucleobases naturals i uns altres en els que alguna citosina de les anteriors seqüències ha estat substituïda per abraçadores de guanina.

En els acoblaments dels monòmers s'ha emprant HATU (hexafluorofosfat de 9-(7-azabenzotriazo-1-il-1,1,3,3-tetraetiluroni) com a agent activant i han tingut lloc amb rendiments entre el 95 i el 98% per als que contenen nucleobases naturals i lleugerament inferiors (aproximadament del 90%) per als monòmers modificats amb les abraçadores.

Tots els oligòmers de PNA s'han purificat per HPLC en fase reversa a 50°C i s'han caracteritzat per espectrometria de masses de MALDI-TOF.

8. Per primer cop s'ha posat a punt la utilització de l'energia de microones per a activar les reaccions d'acoblament en la síntesi de PNA, comprovant-se que permet reduir substancialment els temps de reacció i, en conseqüència, la durada total de la síntesi. A més a més, la qualitat dels productes crus de síntesi de PNA és millor que quan les reaccions es realitzen a temperatura ambient. La major limitació per a la utilització general d'aquesta tècnica en síntesi de PNA es troba en la necessitat de transvasar la resina abans i després dels acoblaments.

9. Per tal d'avaluar l'afinitat dels decàmers de PNA sintetitzats per les seves seqüències de DNA complementàries s'han enregistrat les corbes de fusió per espectroscòpia d'UV dels corresponents dúplexs PNA-DNA a partir de les quals s'han determinat les temperatures de fusió, T_M .

Per als PNAs que contenen únicament nucleobases naturals s'ha observat una bona correspondència amb els valors predits i una correlació lineal entre les temperatures de fusió i el nombre de parells de bases G-C del dúplex.

La presència en el dúplex d'un "mismatch" provoca una desestabilització de la seva estructura que es tradueix en una disminució de 13°C en la T_M .

10. La substitució en els PNAs d'alguna citosina per abraçadores de guanina, tant si contenen un grup amino com un grup guanidino, produeix una pronunciada desestabilització dels corresponents dúplexs, amb temperatures de fusió inferiors en uns 20°C a les dels dúplexs amb nucleobases naturals.

S'interpreta que la capacitat de les abraçadores de guanina per a estabilitzar dúplexs PNA-DNA és enormement dependent de la seqüència.

PART EXPERIMENTAL

MATERIALS I MÈTODES

1. Dissolvents i reactius generals	163
2. Instrumentació i tècniques generals	163
2.1. Tècniques espectroscòpiques	163
2.2. Espectrometria de masses	164
2.3. Tècniques cromatogràfiques	164
2.4. Altres tècniques	165
3. Mètodes generals	165
3.1. Preparació de dissolucions tampó	165
3.1.1. Bicarbonat de Trietilamoni (TEAB)	165
3.1.2. Acetat amònic (AcNH ₄)	165
3.1.3. Acetat de Trietilamoni (TEAAc)	165
3.2. Electroforesi en gel de poliacrilamida	165
3.2.1. Electroforesi analítica	166
3.2.2. Electroforesi preparativa	166
3.2.3. Electroforesi preparativa sense urea	166
3.3. Dessalat mitjançant columna OPC	167
3.4. Càlcul de temperatures de fusió	167

CAPÍTOL 1: OLIGONUCLEÒTIDS CÍCLICS 169**SÍNTESI D'OLIGONUCLEÒTIDS CÍCLICS: PROCEDIMENT GENERAL**

1. Mètodes generals	171
1.1. Síntesi d'oligonucleòtids	171
1.2. Test Qualitatiu de Ninhidrina	171
1.3. Mesura del factor de funcionalització de la resina	171
1.3.1. Fmoc-resines	171
1.3.2. DMT-resines	172
1.4. Quantificació dels oligonucleòtids	172
1.5. Càlcul de l'eficiència d'acoblament i rendiment global en la síntesi automàtica	173
2. Síntesi de nucleotidil-resines	173
2.1. Obtenció de 3-clor-4-hidroxifenilacetat de 2,4,5-triclorofenil	173
2.2. Obtenció del fosfat de 3'-O-(5'-O-DMT-timidinil)-2-clor-4-(2,4,5-triclorofenoxycarbonil-metil)fenil i 2-cianoetil	174
2.3. Tractament previ dels suports polimèrics	174
2.4. Ancoratge de l'àcid Fmoc-6-aminohexanoic al suport polimèric	174
2.5. Acetilació dels grups amino lliures	175
2.6. Ancoratge del nucleotidil-linker al suport polimèric	175
3. Obtenció d'oligonucleòtids lineals ancorats sobre resina	175
4. Obtenció d'oligonucleòtids cíclics ancorats sobre resina	176
4.1. Reacció de ciclació	176
4.2. Desprotecció dels fosfats de la cadena	176
4.3. Desancoratge de l'oligonucleòtid	176
4.4. Desprotecció de les bases	176
4.5. Dessalat dels oligonucleòtids	176

SÍNTESI D'ATNL I DTNL

1. Síntesi de l'oligonucleòtid cíclic cATNL	177
2. Síntesi de l'oligonucleòtid cíclic cDTNL	177
3. Síntesi a escala gran dels oligonucleòtids cíclics cATNL i cDTNL	177
4. Síntesi de l'oligonucleòtid cíclic CGG·TCG·AAC·CAT (c12)	178
5. Síntesi de l'oligonucleòtid fosforotioat lineal CGG·TCG·AAC·CAT (12PS)	178

6. Proves biològiques amb els oligonucleòtids antisentit	179
6.1. Línia cel·lular	179
6.2. Medis de cultiu	179
6.3. Incubacions cel·lulars amb oligonucleòtids antisentit	179
6.4. Resultats de les proves biològiques	180
<u>SÍNTESI D'OLIGONUCLEÒTIDS FOSFOROTIOATS CÍCLICS</u>	
1. Síntesi de $c(T_{PO}T_{PO})$	181
2. Síntesi de $c(T_{PS}T_{PO})$	181
3. Intent de síntesi de $c(T_{PS}T_{PS})$	181
3.1. Obtenció del tiofosfat de 3'-O-(5'-O-DMT-timidinil)-2-clor-4-(2,4-diclorofenoxycarbonil-metil)fenil i 2-cianoetil	181
3.2. Obtenció de 3-cloro-4-hidroxifenilacetat de 2,4-diclorofenil	181
3.3. Estudi de la influència del temps de sulfurització i de la proporció de reactiu sulfuritzant	182
3.4. Incorporació del nucleotidil-linker a la resina	182
3.5. Síntesi de $T_{PS}T_{PS}$ lineal, ciclació, desprotecció i desancoratge de $c(T_{PS}T_{PS})$	183
4. Linker tioat	183
4.1. Preparació de la nucleotidil-resina	183
4.2. Desancorament del primer nucleòtid	183
4.2.1. Eliminació del grup cianoetil	183
CAPÍTOL 2: ABRAÇADORES DE GUANINA	185
<u>SÍNTESI DE LES ABRAÇADORES AMINO I GUANIDINO DE GUANINA</u>	
1. Reducció del 2-nitroresorcinol	187
2. Preparació del braç guanidino	187
2.1. Síntesi de Z_2 -metilisotiurea	187
2.2. Síntesi del braç guanidino	187
3. Preparació de l'esquelet de PNA per al monòmer	188
3.1. Síntesi de tert-butil N-(2-aminoetil)glicinat	188
3.2. Síntesi de l'hidroclorur de tert-butil-N-[2-(N-9-fluorenilmetoxycarbonil)aminoetil]glicinat	188
3.3. Síntesi de tert-butil-N-[2-(N-9-fluorenilmetoxycarbonil)aminoetil]-N-[(4-N-(benziloxi-carbonil)-5-bromo-uracil-1-il)acetil]glicinat	189
4. Intent de via de síntesi de la base nitrogenada comú per a DNA i PNA	191
4.1. Síntesi de 5-bromo- N^1 -trifenilmetil-uracil	191
4.2. Intent de síntesi de 5-bromo-4-N-(2,6-dihidroxifenil)- N^1 -trifenilmetil-uracil	191
4.3. Síntesi de 5-bromo-4-[N^1 -(1,2,4-triazol)]- N^1 -trifenilmetil-uracil	191
4.4. Intent de síntesi de 5-bromo-4-N-(2,6-dihidroxifenil)- N^1 -trifenilmetil-uracil amb Ph_3P	192
5. Síntesi de la base nitrogenada	193
5.1. Síntesi de l'alcoxicarbonilmetil derivat	193
5.1.1. Síntesi de 5-bromo- N^1 -metoxycarbonilmetiluracil (2-Me)	193
5.1.2. Síntesi de 5-bromo- N^1 -tert-butoxicarbonilmetiluracil (2)	193
5.2. Activació de 5-bromo- N^1 -metoxycarbonilmetiluracil (2Me) amb Ph_3P/CCl_4	193
5.3. Activació de 5-bromo- N^1 -metoxycarbonilmetiluracil (2Me) amb Et_3P/CCl_4	194
5.3.1. Intent d'activació	194
5.3.2. Síntesi del clorur de 5-bromo- N^1 -metoxycarbonilmetiluracil	194
5.3.3. Síntesi de 5-bromo-(2,6-dihidroxifenil)- N^1 -	

(metoxicarbonilmetil)-citosina (4) a partir del clorur	194
5.4. Intent d'activació de 5-bromo-N ¹ -metoxicarbonilmetiluracil (2Me) amb triazole	194
5.5. Intent de síntesi de 5-bromo-(2,6-dihidroxifenil)-N ¹ -(metoxicarbonilmetil)-citosina activant amb clorur de TMBS	195
5.6. Intent d'activació de 5-bromouracil amb trifenilfosfina	195
5.7. Síntesi de 5-bromo-(2,6-dihidroxifenil)-N ¹ -(<i>tert</i> -butoxicarbonilmetil)-citosina (4) amb Ph ₃ P	195
5.8. Activació de 5-bromo-N ¹ - <i>tert</i> -butoxicarbonilmetiluracil (2) amb triazole	195
5.9. Síntesi de 5-bromo-(2,6-dihidroxifenil)-N ¹ -(<i>tert</i> -butoxicarbonilmetil)-citosina (4)	196
5.10. Ciclacions	196
5.10.1. Intents de ciclació amb NH ₃	196
5.10.2. Síntesi de N ¹ -(<i>tert</i> -butoxicarbonilmetil)-6-hidroxifenoxazina (6) per ciclació de 5-bromo-(2,6-dihidroxifenil)-N ¹ -(<i>tert</i> -butoxicarbonilmetil)-citosina (4)	197
5.10.3. Síntesi de N ¹ -(<i>tert</i> -butoxicarbonilmetil)-6-(N-Z-2-aminoetoxi)-fenoxazina (7a) per ciclació de 5-bromo-[2-(N-Z-etanolaminoetoxi)-6-hidroxifenil]-N ¹ -(<i>tert</i> -butoxicarbonilmetil)-citosina (5a)	197
5.10.4. Síntesi de N ¹ -(<i>tert</i> -butoxicarbonilmetil)-6-[2-(N,N'-bis-Z-guanidino)etoxi]-fenoxazina (7b) per ciclació de 5-bromo-[2-(N,N'-bis-Z-guanidino)etoxi-6-hidroxifenil]-N ¹ -(<i>tert</i> -butoxicarbonilmetil)-citosina (5b)	198
5.11. Reaccions de Mitsunobu	198
5.11.1. Síntesi de 5-bromo-[2-(N-Z-etanolaminoetoxi)-6-hidroxifenil]-N ¹ -(metoxicarbonilmetil)-citosina amb trifenilfosfina	198
5.11.2. Síntesi de 5-bromo-[2-(N-Z-etanolaminoetoxi)-6-hidroxifenil]-N ¹ -(<i>tert</i> -butoxicarbonilmetil)-citosina (5a) amb trifenilfosfina sobre suport sòlid	198
5.11.3. Síntesi de 5-bromo-[2-(N,N'-bis-Z-guanidino)etoxi-6-hidroxifenil]-N ¹ -(<i>tert</i> -butoxicarbonilmetil)-citosina (5b) amb trifenilfosfina	199
5.11.4. Síntesi de 5-bromo-[2-(N,N'-bis-Z-guanidino)etoxi-6-hidroxifenil]-N ¹ -(<i>tert</i> -butoxicarbonilmetil)-citosina (5b) amb trifenilfosfina sobre suport sòlid	199
5.11.5. Síntesi de N ¹ -(<i>tert</i> -butoxicarbonilmetil)-6-(N-Z-2-aminoetoxi)-fenoxazina (7a) per Mitsunobu sobre N ¹ -(<i>tert</i> -butoxicarbonilmetil)-6-hidroxifenoxazina (6)	199
5.11.6. Síntesi de N ¹ -(<i>tert</i> -butoxicarbonilmetil)-6-[2-(N,N'-bis-Z-guanidino)etoxi]-fenoxazina (7b) per Mitsunobu sobre N ¹ -(<i>tert</i> -butoxicarbonilmetil)-6-hidroxifenoxazina (6)	200
5.12. Desprotecció dels acetats	200
5.12.1. Síntesi de N ¹ -carboximetil-6-(N-Z-2-aminoetoxi)-fenoxazina (8a)	200
5.12.2. Síntesi de N ¹ -carboximetil-6-[2-(N,N'-bis-Z-guanidino)etoxi]-fenoxazina (8b)	201
6. Síntesi dels monòmers	201
6.1. Síntesi del monòmer amino	201
6.1.1. Síntesi de <i>tert</i> -butil N-[2-(N-9-fluorenilmetoxicarbonil)aminoetil]-N-[carboximetil-6-N-Z-2-aminoetoxi]-fenoxazina]-glicinat (9a)	201
6.1.2. Síntesi de N-[2-(N-9-fluorenilmetoxicarbonil)aminoetil]-N-[carboximetil-6-N-Z-2-aminoetoxi]-fenoxazina]-glicina (10a)	202
6.2. Síntesi del monòmer guanidino	203
6.2.1. Síntesi de <i>tert</i> -butil N-[2-(N-9-fluorenilmetoxicarbonil)aminoetil]-N-[carboximetil-6-[2-(N,N'-bis-Z-guanidino)etoxi]-fenoxazina]-glicinat (9b)	203

6.2.2. Síntesi de N- [2- (N-9- fluorenilmetoxycarbonil)aminoetil] - N- [carboxymetil- 6- [2- N,N'- bis- Z- guanidinoetoxi) - fenoxazina]- glicina (10b)	203
CAPÍTOL 3: SÍNTESI DE PNAs I ESTUDI DE L'ESTABILITAT DELS DÚPLEXS PNA-DNA	205
1. Síntesi de PNA	207
1.1. Procediment general de síntesi	207
1.2. Síntesi de PNA1	207
1.3. Síntesi de PNA2	208
1.4. Síntesi de PNA3	208
1.5. Síntesi de PNA5	208
2. Síntesi de PNA incorporant les abraçadores de guanina	208
3. Síntesi de DNA5	209
4. Síntesi de PNA en un microones convencional multimode	209
4.1. Procediment general de síntesi	209
4.2. Síntesi del dímer H-ct-NH ₂	210
4.3. Síntesi del dímer H-at-NH ₂	210
5. Síntesi de PNA en un microones monomodal	210
5.1. Procediment general de síntesi	210
5.2. Síntesi de H-ct-NH ₂	210
5.3. Síntesi de H-at-NH ₂	211
5.4. Síntesi de H-acgt-NH ₂	211
5.5. Síntesi de H-atgtgacagg-NH ₂ (PNA4)	211

MATERIALS I MÈTODES

1. DISSOLVENTS I REACTIUS GENERALS

- ACN anhidre: es destil·la acetonitril de qualitat HPLC (Scharlau) sobre CaH_2 en pols i es guarda sobre CaH_2 en forma de pedres, sota atmosfera d'argó.
- Aigua: de qualitat Millipore desionitzada i filtrada amb un sistema Milli-Q plus amb una resistivitat superior a $18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$
- DCM: (Scharlau, qualitat Normasolv) es neutralitza fent-lo passar per una columna d' Al_2O_3 bàsica.
- DCM anhidre: es prepara de la forma anterior i es guarda sobre CaH_2 en forma de pedres, sota atmosfera d'argó.
- Dioxà de Merck, pro-analysis
- DMF anhidre: es guarda sobre tamís molecular de 4 \AA activat. Abans d'utilitzar-lo es bombolleja amb N_2 durant unes hores per tal d'eliminar impureses volàtils.
- DMI de Mitsui Chemicals
- Piridina: qualitat Karl-Fisher (Panreac), guardada sobre pedres de CaH_2 .
- Piridina anhidra: es destil·la sobre nínhidrina i es guarda sobre pedres de CaH_2
- THF anhidre: destil·lat sobre sodi en presència de benzofenona, sota atmosfera de nitrogen
- TEA: es destil·la sobre CaH_2 i es guarda sobre KOH
- DCC, HOBt, TCA, ^1H -tetrazole, DBU, DIPCDI de Fluka
- Pip d'Aldrich
- AcOH de Panreac
- Ac_2O de Scharlau
- CaH_2 (Lumps, Mesh 95%) d'Aldrich
- DIEA d'Acros i Merck
- NH_3 (32%, extrapur) de Merck

2. INSTRUMENTACIÓ I TÈCNIQUES GENERALS

2.1. Tècniques espectroscòpiques

Els espectres de ressonància magnètica nuclear de ^1H , ^{13}C i ^{31}P s'han realitzat en aparells Bruker Avance DXR-500MHz, Varian Unity-300MHz i Gemini-200MHz. Els valors de desplaçament químic de ^1H i ^{13}C (δ) s'expressen en ppm respecte al senyal corresponent als protons i els carbonis del tetrametilsilà ($\delta=0$) respectivament, per a ^{31}P s'ha utilitzat H_3PO_4 (85%) ($\delta=0$) com a patró estàndard extern en D_2O i trimetilfosfit en CDCl_3 ($\delta=141,6 \text{ ppm}$). Els experiments de resonància de ^{31}P en fase gel de resines s'han realitzat suspenent les resines en CD_2Cl_2 i en tubs especials de fons pla que, amb l'ajut d'un èmbol, permeten concentrar la mostra en la zona d'irradiació (tub SHIGEMI Co, LDT, Japan).

En els espectres s'expressa en primer lloc el dissolvent en el que estan les mostres i la freqüència de l'aparell. En els espectres d' ^1H -RMN s'indica en primer lloc el desplaçament químic, a continuació (entre parèntesi) el nombre de protons, el tipus de senyal, les constants d'acoblament (J) en Hz i l'assignació del senyal. En els espectres de ^{13}C -RMN s'indica el desplaçament químic del senyal i a continuació la seva assignació entre parèntesi. Com a símbols dels tipus de senyal s'han fet servir: singlet (s), doblet (d), doblet de doblets (dd), triplet (t), multiplet (m).

Els espectres d'absorció d'UV-VIS s'han enregistrat en un aparell Perkin-Elmer Lambda 5 i en un espectrofotòmetre Cary 5E (Varian). Les cubetes emprades són de quars amb un camí òptic d'un cm i una capacitat per a 1,5 mL. Els espectres d'infraroig s'han adquirit en un espectrofotòmetre Nicolet 510 FT-IR.

2.2. Espectrometria de masses

Els espectres de masses s'han realitzat al Servei d'Espectrometria de Masses de la Divisió III de la UB. Els espectres d'impacte electrònic (EM-IE) o d'ionització química (EM-IC) s'han realitzat en un aparell Hewlett-Packard 5988. Els espectres per ionització en electrospray (EM-ES) s'han realitzat en un aparell VG-Quattro (Fison Instruments), utilitzant un voltatge del capil·lar de 3,5 kV i preparant la mostra en forma de dissolució de 1 OD de producte en 50 μL d'ACN/ H_2O (1:1). Els espectres adquirits per bombardeig d'àtoms ràpids (EM-FAB) s'han realitzat en el mateix aparell que els d'ionització per electrospray. Els espectres de masses adquirits mitjançant desorció iònica per làser assistida per matriu, amb detecció de temps de vol (EM-MALDI-TOF) s'han obtingut en un aparell Bruker BiflexTM III, amb un làser de N_2 de 337 nm i polsos de 3 ns.

Preparació de les matrius i co-matrius:

- CA (citrat amònic): 50 mg/mL H_2O
- THAP (2,4,6-trihidroxiacetofenona): 10 mg/mL ACN/ H_2O (1:1)
- HPA (àcid 3-hidroxipicolínic): 50 mg/mL ACN/ H_2O (1:1)
- DHB (àcid 2,5-dihidroxibenzoic): 10 mg/mL ACN/ H_2O
- SA (àcid sinapínic): 10 mg/mL ACN/ H_2O (0,1% TFA)
- ATT (6-aza-2-tiotimina)+CA(1:1): 10 mg ATT/1 mL ACN/ H_2O (1:1) i 6,79 mg CA /1,75 mL H_2O

Preparació de les mostres per a MALDI-TOF:

1. Oligonucleòtids:

- a. Es dissol la mostra en ACN, es pren 1 μL de la dissolució, se li afegeix 1 μL de CA i s'homogeneïtza, a continuació s'afegeix 1 μL de la matriu corresponent (THAP o HPA), es barreja bé i es pren 1 μL , que es diposita sobre a placa i es deixa evaporar el dissolvent abans de realitzar les mesures
- b. Amb ATT: 1 μL de dissolució de l'oligonucleòtid en ACN es barreja amb 1 μL de la dissolució de matriu i co-matriu. Es pren 1 μL per a l'espectrometria.

2. PNA:

Es dissol la mostra en H_2O (0,1% TFA). A 1 μL de dissolució se li afegeix 1 μL de la dissolució d'àcid sinapínic, s'homogeneïtza bé i es pren 1 μL per a determinar la massa.

3. Altres molècules:

A 2 μL de dissolució de la molècula en ACN se li afegeixen 2 μL de la dissolució de DHB, s'homogeneïtza bé i es prenen 2 μL per a determinar la massa.

2.3. Tècniques cromatogràfiques

La cromatografia de capa fina (CCF) s'ha realitzat sobre cromatofolis de gel de sílice amb suport d'alumini (indicador de fluorescència a 254 nm, 0,2 mm, MERCK).

En la cromatografia en columna s'ha utilitzat gel de sílice (Chromatogel, 60Å CC, 35-70 microns, SDS). S'empren 60 g de sílice per cada gram de cru. En el cas de l'addició de mostres en forma de càrrega sòlida, aquesta es prepara amb 5 g de sílice per cada gram de producte

El dessalat dels oligonucleòtids s'ha dut a terme mitjançant filtració molecular a través de Sephadex G-10 (Pharmacia) utilitzant una columna de dimensions 80x2 cm, eluint els productes amb TEAB 0,05 M a flux de 0,8 mL/min. El sistema cromatogràfic es compon a més a més d'un detector UV (LKB Bromma, 2158 UVI CORD SD), un col·lector de fraccions (LKB Bromma, 2070 Ultrorac), un enregistrator (Servoscribe 1S recorder, Houston Instrument) i una bomba mecànica (Pharmacia LKB Pump P-1).

La cromatografia líquida d'elevada resolució (HPLC) analítica s'ha realitzat amb un aparell *Shimadzu*, compostat per un autoinjector *SIL-9A*, un detector d'ona variable *UV SPD-10A*, dues bombes *LC-10AS*, un sistema de control i programació de gradient *SCL-6B* i un enregistrator/integrador *C-R5A*. Les columnes emprades per a la cromatografia líquida en fase reversa contenen reblert de Nucleosil C-18 de 10 μm (Scharlau). En el cas d'oligonucleòtids els eluents són tampó de 0,01 M acetat amònic aquós com a eluent A i ACN/H₂O (1:1) com a eluent B. Per a PNA l'eluent A és aigua (0,1% TFA) i l'eluent B és ACN (0,1% TFA). En el cas d'altres molècules s'empra aigua com a eluent A i acetonitril com a B. En tots els casos el flux és d'1 mL/min. Tant per als oligonucleòtids com per al PNA la detecció es realitza a 260 nm, per a la resta de molècules es trien les longituds d'ona més adient per a cadascun dels casos.

2.4. Altres tècniques

Els punts de fusió s'han mesurat en aparells Gallenkamp.

Les mesures de pH s'han realitzat en un pHmetre Crison micropH 2002.

La liofilització de les dissolucions aquoses s'ha realitzat en aparells Virtis model Freezemobile QD6 o 12EL.

3. MÈTODES GENERALS

3.1. Preparació de dissolucions tampó

3.1.1. Bicarbonat de Trietilamoni (TEAB)

Una proveta d'1 L que conté 278 mL de TEA, s'enrasa amb aigua a 1 L. Aquesta barreja de dues fases, es diposita en un matràs d'Erlenmeyer de 2 L. En un altre recipient se sublima neu carbònica i es fa bombollear a través d'un capil·lar de vidre el corrent de CO₂ resultant sobre la barreja anterior, agitant constantment. Quan desapareixen les dues fases es continua bombollejant fins a ajustar el pH a un valor entre 7 i 8.

3.1.2. Tampó Acetat Amònic, 2 M, pH 7

Es dissolen 71 g d'acetat amònic en aigua, s'ajusta el pH a 7 i s'enrasa el volum a 500 mL. La dissolució es filtra a través d'un filtre de 0,45 μm de porus.

3.1.3. Tampó acetat de trietilamoni (TEAAc) 2 M, pH 7

Es barregen 140 mL de TEA, 58 mL d'AcOH glacial i 250 mL d'aigua, agitant vigorosament. Un cop es refreda la dissolució, s'ajusta el pH a 7 (amb TEA o AcOH segons convingui) i s'enrasa el volum a 500 mL amb aigua. El tampó es filtra a través d'un filtre de 0,45 μm de porus.

3.2. Electroforesi en gel de poliacrilamida

El sistema d'electroforesi emprat és del tipus Hoeffer SE410 (Pharmacia) i es compon d'una cubeta d'electroforesi vertical, plaques de vidre (18x24,5 cm), pintes i espaiadors de diferent gruix. La font de voltatge és LKB 2197 BROMMA.

L'electroforesi es realitza sobre un gel d'acrilamida al 20%. Es prepara una dissolució de 450 g d'urea, 190 g d'acrilamida, 10 g de bisacrilamida i 100 mL de la dissolució de TBE, s'enrasa a 1L amb aigua MilliQ i es filtra a través d'un filtre de 0,45 μm de porus.

Per tal de preparar el gel de poliacrilamida s'utilitzen 60 mL de la dissolució d'acrilamida i se li afegeixen 300 μL de persulfat amònic al 10% en aigua i 20 μL de TEMED, s'introdueix aquesta dissolució entre les plaques de vidre i es deixa polimeritzar durant 1 hora. A continuació es renten els pous amb tampó d'electroforesi, per tal d'eliminar-ne l'urea i es realitza un pre-running de 2 hores. Es

carreguen les mostres i es realitza l'electroforesi en diferents condicions, en funció del tipus d'electroforesi. El tampó de càrrega consisteix en una dissolució 30 M d'EDTA pH 8 i 8 M d'urea. El tampó d'electroforesi (TBE 10X) és 1,3 M Tris, 0,45 M àcid bòric i 25 mM EDTA.

3.2.1. Electroforesi analítica

S'utilitza un gel d'acrilamida al 20% de 0,75 mm de gruix. Com a patrons s'empren el xilenol, que migra com un 22-mer lineal i el blau de bromofenol que migra com un 6-mer lineal. Es dissolen 0,2 OD₂₆₀ de mostra en 20 µL d'aigua i 20 µL de formamida i se centrifuguen. A continuació en mantenen a 95°C durant 1 minut i es conserven en gel fins al moment d'utilitzar-les. En primer lloc es realitza un pre-running a 500 mV durant 2 hores, després es carreguen les mostres i es realitza l'electroforesi a 600 mV. Es tenyeix el gel amb una dissolució de stains all (20 mg en 20 mL de formamida i enrasat a 1 L amb aigua) durant 30 minuts. Es renta amb aigua i es destenyeix sota llum d'IR. A continuació es deshidrata el gel per tal de conservar-lo.

3.2.2. Electroforesi preparativa

S'utilitza la mateixa dissolució d'acrilamida que en el cas anterior però en aquest cas el gruix del gel és de 1,5 mm. El voltatge del pre-running és de 400 mV i el del running de 500 mV. Un cop realitzada l'electroforesi, es diposita el gel sobre un suport de cromatografia de CCF amb indicador de fluorescència (254 nm) i s'observa sota llum UV. Es tallen les bandes corresponents als oligonucleòtids. S'introdueixen en un tub Eppendorf i se suspenen en acetat amònic 2 M es congelen i es descongelen 3 cops i a continuació s'agiten a 37°C durant una nit. Se centrifuguen les suspensions i es recull el sobrenedant que es dessala mitjançant un Sep-Pak. El procediment de dessalat és el següent: en primer lloc s'acondiciona la columna passant 10 mL d'ACN, 10 mL d'aigua mQ i 2 mL d'una dissolució aquosa d'acetat amònic 15 mM. Es fa passar per la columna la dissolució dels oligonucleòtids dos cops, es renta amb aigua (3x10 mL) i s'elueix amb ACN/H₂O (1:1), recollint les fraccions, fins que ja no surt oligonucleòtid.

3.2.3. Electroforesi preparativa sense urea

Es prepara una dissolució de 190 g d'acrilamida, 10 g de bisacrilamida i 100 mL de la dissolució de TBE, s'enrasa a 1 L amb aigua i es filtra a través d'un filtre de 0,45 µm. Es prepara el gel de 1,5 mm de gruix amb 40 mL d'aquesta dissolució, afegint 400 µL de persulfat amònic i 20 µL de TEMED. Es realitza un pre-running de dues hores a 400 mV i el running a 500 V, durant el temps necessari, segons els productes a cromatografiar. Les mostres es preparen dissolent els oligonucleòtids en tampó TE (Tris EDTA pH 7,4 (Fluka)) i afegint glicerol, fins a una concentració final del 10%. Un cop realitzada la cromatografia, es diposita el gel sobre un suport de cromatografia de CCF amb indicador de fluorescència (254 nm) i s'observa sota llum UV. Es tallen les bandes corresponents als oligonucleòtids.

S'introdueixen en un tub Eppendorf i se suspenen en 320 µL d'acetat amònic 5 M i 480 µL de TE i s'agiten a 37°C durant una nit. Per tal de precipitar els oligonucleòtids s'afegeixen 400 µL de fenol i se centrifuga durant 10 minuts a 4°C. Es recull el sobrenedant i se li afegeix el mateix volum d'una dissolució de fenol/CHCl₃ (1:1), s'agita amb un vòrtex se centrifuga durant 5 minuts a 4°C. Es recull la part superior, se li afegeix un volum igual de CHCl₃/alcohol isoamílic (24:1), s'agita en un vòrtex i se centrifuga durant 5 minuts a 4°C. S'agafa la part superior i se li afegeixen 2,5 volums d'etanol i 5 µL d'una dissolució aquosa de glicogen (10 mg/mL). Es manté a -20°C un mínim de dues hores per tal que precipiti l'oligonucleòtid.

3.3. Dessalat mitjançant columna OPC (Oligonucleotide Purification Cartridge)

El protocol és el següent:

1. Passar 5 mL d'ACN a través del OPC, després 3 mL de TEAAc 2 M i finalment 1 mL de TEAAc 0,1 M.
2. Dissoldre 2 OD₂₆₀ de producte en 500 µL d'aigua i eluir la dissolució a través de la columna (1 gota/s).
3. Col·lectar l'eluit i tornar-lo a passar per la columna.
4. Rentar la columna amb 5 mL d'aigua i guardar els eluïts.
5. Eluir gota a gota amb 1 mL d'ACN al 30% i col·lectar l'oligonucleòtid dessalat en dues fraccions.
6. Eluir de nou amb 500 µL d'ACN al 40% i col·lectar.
7. Eluir amb 500 µL d'ACN 100% i col·lectar.

3.4. Càlcul de temperatures de fusió

La temperatura de fusió d'un dúplex (T_M) es defineix com la temperatura a la que el 50% de la mostra es troba en forma de doble cadena. S'han analitzat les temperatures de fusió de dúplexs DNA-PNA obtinguts per barreja equimolar de dues cadenes senzilles. Les mesures es realitzen en un espectrofotòmetre Varian Cary 5E UV-VIS-NIR provist d'un controlador de temperatura. Les corbes de fusió s'han realitzat amb concentracions 4 µM de cada cadena (oligòmer) amb cubetes d'1 cm de pas de llum.

La solució també utilitzada és 100 mM NaCl, 10 mM fosfat sòdic, 5 mM EDTA, pH 7. Es dissolen els dos oligòmers en el tampó i es combinen els volums necessaris de cadascuna de les solucions i de tampó per a tenir la concentració desitjada (0,02 µmol en 5 mL). S'escalfen les dissolucions a 90°C durant 5 minuts, es deixen atemperar lentament i es guarden a 4°C fins al moment de realitzar les mesures.

Per tal de determinar les T_M dels dúplexs es realitzen dos tipus d'experiments. Per una banda es mesura la variació de l'absorbància a 260 nm des de 15°C a 90°C amb increments de temperatura de 0,5°C/min. Es treballa sota atmosfera de nitrogen per evitar la condensació d'aigua en les cubetes. Amb aquestes mesures s'enregistren les corbes de desnaturalització dels dúplexs, i mesurant la variació de l'absorbància a 260 nm des de 90°C fins a 15°C s'obté el valor de la temperatura de fusió a partir de les corbes de renaturalització.

La temperatura de fusió correspon al punt on es dona un canvi en el pendent de la corba enregistrada. El valor numèric s'obté per tractament matemàtic de les corbes, ja que T_M correspon a un màxim en la primera derivada de la corba i a un valor zero en la segona derivada.

CAPÍTOL 1: OLIGONUCLEÒTIDS CÍCLICS

SÍNTESI D'OLIGONUCLEÒTIDS CÍCLICS: PROCEDIMENT GENERAL

1. MÈTODES GENERALS

1.1. Síntesi d'oligonucleòtids

La síntesi té lloc en un sintetitzador automàtic d'Applied Biosystems, model 380B, amb columnes de mida mitjana (cartutx OPC d'Applied Biosystems). Els reactors són equipats amb filtres de teflon, s'hi introdueix la resina (rentada i assecada), es tanca amb taps de plàstic i se segella amb anelles d'alumini. Tot el material utilitzat ha d'estar net, sec a 110°C a l'estufa i temperat en un dessecador. Com a suport polimèric s'ha emprat un co-polímer de polietilenglicol-poliestirè (Tentagel NH₂, RAPP POLYMER) amb una funcionalització en grups amino de 0,24 mmol/g. Les dissolucions dels fosforamidits en DCM (anhidre i filtrat a través de filtres de nylon Pro-XTM, marca Tecnokroma/Lida) s'han de preparar en atmosfera d'argó. En totes les síntesis s'ha treballat segons el mètode del fosfit-triester i amb cianoetil-fosforamidits de la casa Glen. L'espaiador entre el suport polimèric i la cadena nucleotídica és l'àcid N-Fmoc-6-aminohexanoic (Bachem). Altres dissolucions emprades han estat:

- dissolució activant: tetrazole 0,5 M en ACN
- dissolució oxidant: ^tBuOOH 1M en toluè/DCM (Fluka)
- dissolució de capping: Ac₂O / lutidina / THF (1:1:8) + 1-metilimidazole 6,5% en THF
- dissolució de desprotecció: TCA 3% en DCM

s'han adquirit a Applied Biosystems o a Cruachem. El reactiu de ciclació MSNT s'ha adquirit a Peninsula Laboratories. Per al desancoratge dels oligonucleòtids cíclics s'ha emprat el 2-piridinaloximat de TMG (2-piridinalcarbaldehid oxima de Merck; TMG de Fluka).

1.2. Test Qualitatiu de Ninhidrina

Aquest test serveix per a detectar la presència de grups amino primaris lliures sobre la resina funcionalitzada. En un tub de vidre es dipositen 2-3 mg de resina i es tracten amb 3 gotes de reactiu A (40 mg de fenol, 100 mL d'alcohol etílic, 100 mL de piridina, 2 mL de KCN 1 mM) i una gota de reactiu B (500 mg de ninhidrina en 100 mL d'alcohol etílic). A continuació s'escalfa el tub durant tres minuts a 120°C i es refreda ràpidament. Una coloració groga indica absència d'amines primàries lliures i una coloració blava és indicativa de la seva presència.

1.3. Mesura del factor de funcionalització de la resina

1.3.1. Fmoc-resines

Una xeringa de polipropilè de 2 mL equipada amb un disc filtrant de polipropilè es renta amb DCM, DMF i MeOH, per tal d'eliminar el film orgànic de la seva paret interior. Després d'assecar la xeringa, es pesa en ella una alíquota de resina seca d'uns 7-10 mg. A continuació es tracta la resina amb el següent protocol:

1. Rentar amb DCM (3 x 1 min) i DMF (3 x 1 min)
2. Tractar amb Pip/DMF 1:1 (150 µL, 1 x 3 min)
3. Rentar amb DCM (200 µL, 1 x 1 min)
4. Tractar amb Pip/DMF 1:1 (150 µL, 1 x 3 min)
5. Rentar amb DCM (200 µL, 1 x 1 min)
6. Tractar amb DMF (200 µL, 1 x 3 min)
7. Rentar amb DCM

Es recullen tots els filtrats a partir de la segona etapa en un matràs aforat de 10 mL i s'enrasa amb DCM. S'enregistra l'absorbància entre 220 i 320 nm. La N-(9-fluorenilmetil)piperidina, producte dels tractaments, té un màxim d'absorbància a 300 nm ($\epsilon = 7800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). La dissolució de referència conté les mateixes quantitats de DCM, piperidina i DMF (9,45 mL, 350 μL i 200 μL respectivament) que la solució problema. Mitjançant la següent equació, es calcula la funcionalització:

$$f(\text{mmol} / \text{g}) = \frac{A_{300} * V * 10^6}{\epsilon_{300} * l * m}$$

On:

A: Absorbància a 300 nm

V: volum del matràs aforat (mL)

ϵ : Coeficient d'absortivitat molar ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

l: pas de llum a través de la cubeta (cm)

m: quantitat de resina (mg)

1.3.2. DMT-resines

Es prepara una xeringa amb disc filtrant de polipropilè igual que en el cas anterior. Es tracta una alíquota de resina (7-10 mg) amb TCA/DCM 3% diverses vegades, fins que ja no s'observa coloració taronja en la dissolució. Al final es renta amb DCM. Tots els filtrats i rentats es recullen en un matràs i s'evaporen a sequedat. S'obté un oli taronja que es dissol en àcid perclòric/EtOH (3:2). Aquesta dissolució es recull en un matràs aforat. Es mesura l'absorbància deguda al catió 4,4'-dimetoxitritil a 498 nm ($\epsilon = 71700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) i, mitjançant la següent equació, es calcula el factor de funcionalització:

On:

$$f(\text{mmol} / \text{g}) = \frac{A_{498} * V * 10^6}{\epsilon_{498} * l * m}$$

A: Absorbància a 498 nm

V: volum del matràs aforat (mL)

ϵ : Coeficient d'absortivitat molar ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

l: pas de llum a través de la cubeta (cm)

m: quantitat de resina (mg)

1.4. Quantificació dels oligonucleòtids

S'enregistra l'absorbància, d'una dissolució aquosa d'oligonucleòtid, a 260 nm, que és la longitud d'ona a la que les nucleobases tenen un màxim d'absorció. Coneixent el volum de la dissolució i l'absorbància es pot calcular el valor de la densitat òptica (OD_{260}). Es defineix com 1 OD_{260} la quantitat d'oligonucleòtid que, continguda en un mL de dissolució aquosa, dóna una unitat d'absorbància en una cubeta d'1 cm de pas de llum. L'equivalència molar de les OD_{260} es determina a partir de l'aproximació de què l'absorció de l'oligonucleòtid es deu a l'efecte acumulat de l'absorció individual de cada base, corregit per un factor lligat al fenomen d'apilament. A partir de la següent equació es pot calcular el coeficient d'absortivitat molar de l'oligonucleòtid:

$$\epsilon_{oligo} = \left(\sum \epsilon_b \right) \times f_a$$

On ϵ_b són els coeficients individuals de cada base i f_a el factor de correcció (0,9 per a oligonucleòtids de cadena única i 0,8 per a oligonucleòtids autocomplementaris o de doble cadena). Els valors dels coeficients d'absortivitat molar en aigua a 260 nm per a cada base són:

Nucleòsid	T	dA	DG	dC
ϵ_{260}	8830	15200	11500	7700

1.5. Càlcul de l'eficiència d'acoblament i rendiment global en la síntesi automàtica

Els rendiments individuals de cada acoblament es determinen per comparació de les mesures d'absorbància en el visible de les dissolucions que provenen de l'etapa d'eliminació del grup protector DMT. En primer lloc es prepara una dissolució 0,1 M d'àcid p-toluensulfònic en ACN, per dilució de 19 g d'àcid tòxic monohidrat en 1 L d'ACN. Per a la síntesi en l'escala de 2 μ mol es dilueix el contingut dels tubs de destritilació a 25 mL amb la solució anterior. Es mesura l'absorbància de cada dissolució en una cubeta d'1 cm a 495 nm.

Els càlculs a realitzar són els següents:

- Rendiment global = y / x
- Eficiència d'acoblament = $(y/x)^{1/(ny-nx)}$

y: absorbància del darrer tub

x : absorbància del primer tub mesurat

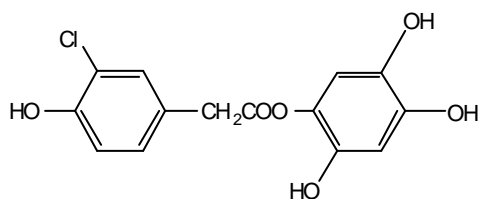
ny: nombre de tubs totals

nx: posició del tub pres com a valor de partida

2. SÍNTESI DE NUCLEOTIDIL-RESINES

2.1. Obtenció de 3-clor-4-hidroxifenilacetat de 2,4,5-triclorofenil

Es dissolen 4,7 g (23,6 mmol) de 2,4,5-triclorofenol i 4,9 g (23,6 mmol) de DCC en 22 mL de DCM i s'hi addiciona lentament una dissolució de 4 g (21,6 mmol) d'àcid 3-cloro-4-hidroxifenilacètic en 130 mL d'AcOEt. Es deixa reaccionar amb agitació magnètica durant 12 hores i se separa per filtració la N,N-diciclohexilurea formada, es refreda el cru de reacció en un bany de gel per tal de precipitar la N,N-diciclohexilurea restant i es torna a filtrar. Es renta el filtrat amb NaHCO_3 (x3), s'asseca la fase orgànica sobre MgSO_4 i s'evapora a sequedat. S'obtenen 8,2 g d'un oli taronjós, que es purifica per cromatografia flash, utilitzant com a eluent hexà / DCM 80:20 i augmentant la proporció de DCM fins al 80%. El producte s'obté per precipitació sobre hexà. S'obtenen 2,54 g (6,9 mmol) de 3-clor-4-hidroxifenilacetat de 2,4,5-triclorofenil, això representa un rendiment global del 32 %.



-Caracterització: sòlid blanc, R_f (hexà/AcOEt 7:3) = 0,33

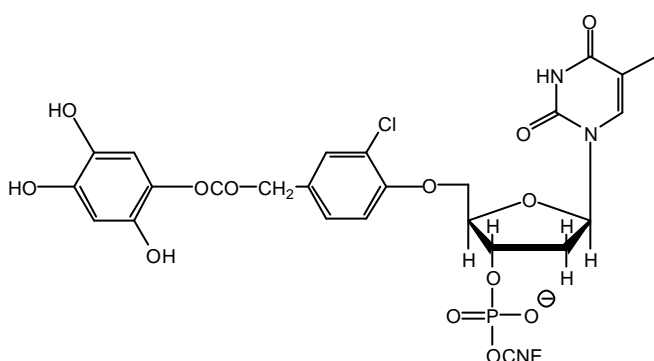
$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 200 MHz): 7,54 (1H, s, H-3'); 7,38 (1H, d, J_{26} 2, H-2); 7,26 (1H, s, H-6'); 7,13 (1H, dd, J_{65} 8,5, J_{62} 2, H-6); 7,04 (1H, d, J_{56} 8,5, H-5); 5,57 (1H, s, OH), 3,84 (2H, s, CH_2).

$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 50 MHz): 167,3 (CO), 150,1 (C-2'), 144,7 (C-4), 131,2 (C-3'), 129,8 (C-1'), 129,5 (C-6'), 128,8 (C-2), 125,1 (C-1), 123,7 (C-6), 119,7 (C-3), 116,3 (C-5), 38,6 (CH_2).

EM-IE: $M^* = 366$, $m/z = 198$, 141, 97.

2.2. Obtenció del fosfat de 3'-O-(5'-O-DMT-timidinil)-2-cloro-4-(2,4,5-triclorofenoxycarbonilmetil)fenil i 2-cianoetil

En un matràs ben sec (prèviament assecat a 120°C i temperat en un dessecador) s'introdueixen 149,4 mg (0,2 mmol) de 5'-O-DMT-timidina 3'-O-(2-cianoetil)-N,N-diisopropilforamidit i 70 mg (0,18 mmol) de 3-clor-4-hidroxifenilacetat de 2,4,5-triclorofenil prèviament assecats en un dessecador, i es dissolen sota atmosfera d'argó en 0,8 mL de DCM anhidre. S'hi addicionen, sota atmosfera d'argó i amb l'ajut d'una cànula, 13,8 mg (0,2 mmol) de tetrazole dissolts en 0,5 mL d'ACN anhidre. S'agita magnèticament sota atmosfera d'argó, a temperatura ambient i durant 1 hora. A continuació s'hi afegeixen 0,5 mL (2 mmol) d'una dissolució ^tBuOOH / toluè i es deixa reaccionar durant 10 minuts. En acabat es dilueix el cru de reacció amb DCM i es renta amb H₂O (2 x 50 mL) i amb una dissolució saturada de NaCl (2 x 50 mL). La fase orgànica s'asseca sobre Na₂SO₄ i s'evapora a sequedat. Es purifica el producte per precipitació sobre hexà. S'obtenen 110 mg (0,11 mmol) de producte, amb un rendiment del 57 %.



-Caracterització: R_f (MeOH / DCM 0,5:9,5) = 0,33
³¹P-RMN(CDCl₃, 120 MHz): -7,96 ppm (7,27, 7,20 impureses d'hidrogenfosfonats)

2.3. Tractament previ dels suports polimèrics

El suport polimèric emprat és el co-polímer de polietilenglicol-poliestirè (TentaGel N NH₂) amb una funcionalització en grups amino de 240 μmol/g.

Abans de la seva utilització, es diposita la resina en una xeringa provista d'un disc filtrant de polipropilè i se la sotmet a la sèrie de rentats recollida a la següent taula:

Dissolvent	Temps (min)
1. DCM	2 x 2
2. 20 % TCA / DCM	2 x 2
3. DCM	2 x 2
4. Pip/DMF 1:1	2 x 2
5. DMF	2 x 2
6. MeOH	2 x 2

Un cop rentada, s'asseca la resina en un dessecador, sobre P₂O₅ i KOH.

2.4. Ancoratge de l'àcid Fmoc-6-aminohexanoic al suport polimèric

La resina un cop rentada i prèviament inflada amb DMF, es tracta amb 1 equivalent d'àcid Fmoc-6-aminohexanoic dissolt en el mínim volum possible de DMF, 1 equivalent de DCC dissolt en DCM i 1 equivalent de HOBt dissolt en DMF. Es deixa reaccionar durant 5 hores amb agitació mecànica, a temperatura ambient. Es renta la resina amb DMF (2x), DCM (2x), MeOH (2x) i se separa una alíquota de resina (7-10 mg) per tal de determinar la funcionalització.

Quan la funcionalització és correcta (100-150 $\mu\text{mol/g}$) es procedeix a l'acetilació dels grups amino que no han reaccionat.

2.5. Acetilació dels grups amino lliures

Es renta la resina amb DCM (3 x 1 min) i DMF (3 x 1 min) i després es tracta amb $\text{Ac}_2\text{O}/\text{DIEA}$ 1:1 (20 eq respecte de les amines lliures sobre la resina) durant 20 minuts (2x10). Es comprova l'acetilació total de les amines lliures amb l'assaig de ninhidrina. Finalment es renta la resina amb DCM (3 x 1 min), DMF (6 x 1 min) i MeOH (3 x 1 min).

2.6. Ancoratge del nucleotidil-linker al suport polimèric

En primer lloc es desprotegeix el grup Fmoc amb una dissolució al 10% de piperidina en DMF. S'asseca el nucleotidil-linker per co-evaporació amb ACN anhidre (2x) i es guarda en un dessecador sobre P_2O_5 i KOH durant una nit. Es diposita la resina en una xeringa provista de disc filtrant de polipropilè i s'hi addicionen 4 equivalents del nucleotidil-linker dissolt en la mínima quantitat de DCM, a continuació s'hi afegeixen 4 equivalents d'HOBt i de DCC (en DMF i DCM respectivament). Es deixa reaccionar a temperatura ambient i agitació mecànica durant 12 hores. Es renta la resina amb DMF (2x), DCM (2x), MeOH (2x) i se separa una alíquota de resina amb la que es determina la seva funcionalització. Posteriorment s'acetilen els grups amino lliures i s'asseca la resina en un dessecador (P_2O_5 i KOH).

S'elimina el grup CNE amb TEA/Pyr 1:1 durant 3 x 1 hora i es caracteritza la nucleotidil-resina per ^{31}P -RMN (-4,3 ppm).

3. OBTENCIÓ D'OLIGONUCLEÒTIDS LINEALS ANCORATS SOBRE RESINA

La síntesi es realitza automàticament seguint el següent protocol:

Etapa	Dissolvents i reactius	Temps (s)
1. Rentats	ACN	1x20
2. Eliminació de DMT	3% TCA/DCM	1x120
3. Rentats	ACN	1x200
	DMF	1x30
	ACN	1x20
	ACN anh	1x45
4. Assecat	Argó	1x45
5. Acoblament	0.1 M fosforamidit en DCM anh + 0,5 M tetrazole en ACN anh	1x900
6. Rentats	ACN	1x30
7. Acetilació	$\text{Ac}_2\text{O}/\text{NMI}^1$	1x120
8. Rentats	ACN	1x45
9. Oxidació	$^t\text{BuOOH}$ /DCM/Hexà o toluè	1x60
10. Rentats	DCM	1x60
	DMF	1x60
	ACN	2x30

¹: $\text{Ac}_2\text{O}/\text{lutidina}/\text{THF}$ 1:18 + 1-metilimidazole 6,5% en THF

Aquest procediment està adaptat a l'escala de 2 μmol i rep el nom de MSPEGPSM (el procediment figura a l'annex).

4. OBTENCIÓ D'OLIGONUCLEÒTIDS CÍCLICS ANCORATS SOBRE RESINA

4.1. Reacció de ciclació

La ciclació es realitza amb una dissolució 0,10-0,15 M de MSNT en piridina anhidra amb un excés de 25 equivalents respecte de l'escala de treball. Es duen a terme tres tractaments de 2x4 h + 1x12 h, canviant en cada cas la dissolució de MSNT emprada. La ciclació té lloc en condicions anhidres i sota atmosfera d'argó, seguint el següent protocol:

Etapa	Dissolvents i Reactius	Temps
1. Assecat	Argó	30 s
2. Rentats	Piridina anh ACN anh	90 s 45 s
3. Assecat	Argó	45 s
4. Ciclació	0,15 MSNT en pyr anh	2x4 h + 1x12 h

4.2. Desprotecció dels fosfats internucleosídics de la cadena

La resina procedent de la ciclació es diposita en una xeringa provista d'un disc filtrant de polipropilè, es renta bé amb DCM i, a continuació, es tracta amb una dissolució de TEA/pyr 1:1 durant tres etapes de 1 h. Es renta la resina amb dioxà i ACN i s'asseca en un dessecador sobre P₂O₅ i KOH.

4.3. Desancoratge de l'oligonucleòtid

Es diposita la resina en una xeringa, provista de disc filtrant de polipropilè, i es tracta amb una dissolució 0,2 M de *syn*-2-piridinaldoximat de N,N,N',N'-tetrametilguanidini en dioxà/H₂O. Es prepara una dissolució de 73 mg (0,6 mmol) d'oxima en 2 mL d'1,4-dioxà i 1 mL d'aigua i s'afegeixen 76 µL de tetrametilguanidina. Es realitzen tres tractaments de 2x4 h i 1x12 h i es renta la resina amb dioxà i aigua. Es recullen els filtrats de cadascun dels tractaments i s'evaporen a sequedat.

4.4. Desprotecció de les bases

El residu procedent del desancoratge es tracta amb 2 mL d'una solució aquosa de NH₃ al 33% a 55°C durant una nit i posteriorment s'evapora a sequedat.

4.5. Dessalat dels oligonucleòtids

Es cromatografia el cru resultant de l'etapa anterior per una columna de filtració molecular Sephadex G-10, emprant com a eluent tampó TEAB 0,05 M. L'oligonucleòtid es dissol en la mínima quantitat d'aigua possible i es diposita en la columna. A continuació es fa passar el tampó i es recullen les fraccions, seguint l'absorbància a 254 nm. La fracció corresponent a l'oligonucleòtid cíclic desprotegit es quantifica per UV i es procedeix a la seva purificació.

SÍNTESI D'ATNL I DTNL**1. SÍNTESI DE L'OLIGONUCLEÒTID CÍCLIC cATNL**

La seqüència a sintetitzar és la següent: GTT CAG CGG TCG AAC CAT.

Es parteix de 18 mg de nucleotidil-resina amb una funcionalització de 125 $\mu\text{mol/g}$, l'escala inicial és de 1,75 μmol . S'obté un rendiment global de síntesi del 62,5%, que correspon a un rendiment mig per etapa del 97,2%. Després de la ciclació i el desancoratge s'obtenen 7,45 OD₂₆₀ (Rdt = 4%), de producte que s'analitza per HPLC i electroforesi.

Es realitza una segona síntesi del producte, partint de 22 mg de nucleotidil-resina, de funcionalització 92 $\mu\text{mol/g}$, treballant en una escala de 1,9 μmol . El rendiment global ha estat del 84% i el rendiment mig per etapa és de 98,9%. S'obtenen 14,7 OD₂₆₀ (Rdt = 4,5%), que es purifiquen per electroforesi en gel de poliacrilamida i es caracteritzen per espectrometria de masses MALDI-TOF: 5561,2 ((M-H)⁻ = 5560,5).

2. SÍNTESI DE L'OLIGONUCLEÒTID CÍCLIC cDTNL

Se sintetitza la següent seqüència: GGA CAC GGC GAC GAT GCA.

Es parteix de 23 mg de nucleotidil-resina amb una funcionalització de 92 $\mu\text{mol/g}$, l'escala inicial és de 1,95 μmol . S'obté un rendiment global de síntesi del 62,8%, que correspon a un rendiment mig per etapa del 97,3%. Després de la ciclació i el desancoratge s'obtenen 16,5 OD₂₆₀ (Rdt = 6,5%), de producte que s'analitza per HPLC i electroforesi.

Es realitza una segona síntesi del producte, partint de 25 mg de nucleotidil-resina, de funcionalització 92 $\mu\text{mol/g}$, treballant en una escala de 2,2 μmol . El rendiment global ha estat del 86,5% i el rendiment mig per etapa és de 99,1%. S'obtenen 22,2 OD₂₆₀ (Rdt = 6%), que es purifiquen per electroforesi en gel de poliacrilamida i es caracteritzen per espectrometria de masses MALDI-TOF: 5619,9 ((M-H)⁻ = 5620,5).

3. SÍNTESI A GRAN ESCALA DELS OLIGONUCLEÒTIDS CÍCLICS cATNL I cDTNL

L'ancoratge de l'espaiador (àcid Fmoc-N-aminohexanoic) dona una funcionalització de 158 $\mu\text{mol/g}$ després de 17 hores de reacció. A continuació es procedeix amb l'ancoratge del nucleotidil-linker (³¹P-RMN: -10,406 (impureses d'hidrogenfosfat: 5,861, 5,560, 4,851)) durant 22 hores fins a una funcionalització de 146 $\mu\text{mol/g}$ (³¹P-RMN: 6,972 ppm, un cop desprotegit el fosfat).

Es realitzen dues síntesis de cadascun dels oligonucleòtids lineals amb els següents rendiments:

	cATNL-1	cATNL-2	cDTNL-1	cDTNL-2
Escala inicial (mmol)	6,0	6,3	6,1	6,2
Rdt global (%)	83,9	88,8	92,1	86,5
Rdt etapa (%)	98,9	99,3	99,5	99,1
mmol de cadenes lineals	5,0	5,6	5,6	5,4

La ciclació consisteix en tres tractaments de 3 hores i un de 12 hores amb un dissolució de MSNT 0,2 M en piridina anhidra. Després de la desprotecció dels grups fosfat, de les bases, el desanclatge i el dessalat, s'obtenen els següents resultats:

Producte	cATNL-1	cATNL-2	cDTNL-1	cDTNL-2
OD ₂₆₀	66	62	103	71
mmol	0,38	0,36	0,55	0,38
mg	2112	1979	3088	2129
Rdt (%)	7,6	6,4	9,8	7,0

Es purifiquen les diferents fraccions per PAGE i es caracteritzen per espectrometria de masses MALDI-TOF.

4. SÍNTESI DE L'OLIGONUCLEÒTID CÍCLIC CGG·TCG·AAC·CAT (c12PO)

c12PO (1): Es parteix de 30 mg de nucleotidil-resina amb una funcionalització de 146 µmol/g, l'escala inicial és de 0,51 µmol. S'utilitza el programa de síntesi MSPEGPSM (veure l'annex) i s'obté un rendiment global de síntesi del 86,6% (0,44 µmol de cadenes per a ciclar), que correspon a un rendiment mig per etapa del 98,7%. Després de la ciclació i el desanclatge s'obtenen 19,3 OD₂₆₀ (Rdt = 39%), de producte que es purifica per HPLC.

Se separen dues fraccions, una de 1,4 OD₂₆₀ corresponent a un t_R de 12,4 min (5 → 35% en 20 minuts) amb un rendiment de recuperació del 7% i una de 9,5 OD₂₆₀ corresponent a una sèrie de pics al voltant del producte "pur" amb un rendiment de recuperació del 49%.

c12PO (2): Es parteix de 32 mg de nucleotidil-resina amb una funcionalització de 146 µmol/g, l'escala inicial és de 4,7 µmol. S'utilitza el programa de síntesi MSPEGPSM i s'obté un rendiment global de síntesi del 78,3% (3,7 µmol de cadenes per a ciclar), que correspon a un rendiment mig per etapa del 97,8%. Després de la ciclació i el desanclatge s'obtenen 66,1 OD₂₆₀ (Rdt = 15%), de producte que es purifica per HPLC, amb un rendiment de purificació del 24%, obtenint-se 16,2 OD₂₆₀ de producte d'un 97% de puresa per HPLC, MALDI-TOF(-) : 3689,2 ((M-H)⁻calculat = 3692,4).

5. SÍNTESI DE L'OLIGONUCLEÒTID FOSFOROTIOAT LINEAL CGG·TCG·AAC·CAT (12PS)

S'utilitza CPG com a suport. Es parteix d'una columna preparada per a la síntesi en l'escala d'1 µmol funcionalitzada amb un nucleòsid T i a partir d'aquest es dona l'elongació, substituint l'etapa d'oxidació habitual per una etapa de sulfurització amb una dissolució 0,15 M de reactiu sulfuritzant de Beaucage en acetonitril anhidre. L'etapa de sulfurització es dona abans de la de "capping" i el programa de síntesi utilitzat és CPGBEAC1 (veure l'annex). La síntesi es realitza automàticament seguint el següent protocol:

Etapa	Dissolvents i reactius	Temps (s)
1. Rentats	ACN	1x20
2. Eliminació de DMT	3% TCA/DCM	1x60
3. Rentats	ACN	1x120
4. Acoblament	4.6 M fosforamidit en ACN anh + 0,5 M tetrazole en ACN anh	1x60 1x45
5. Rentats	ACN	1x45
6. Sulfurització	Beaucage 0,2 M en ACN anh	1x60
7. Rentats	ACN	3x10

8. Acetilació	Ac ₂ O/NMI ¹	1x10
9. Rentats	ACN	2x20

La reacció d'elongació té un rendiment promig per etapa del 97,6%, de manera que el rendiment global és del 78,6%. S'obtenen 0,63 μmol de cadenes. A continuació, es desprotegeixen els grups fosfat i es dona el desancorament per tractament amb NH₃ al 33% a temperatura ambient durant 1 hora. Per tal de desprotegir les bases es tracta el cru obtingut amb al 33% a 55°C durant 12 hores. El rendiment d'aquestes dues etapes és quantitatiu, i es disposa de 73,5 OD₂₆₀ de cru per a purificar per HPLC.

Es realitza una etapa de dessalat mitjançant una columna OPC i es purifica el producte per HPLC. S'obtenen 63 OD₂₆₀ de producte de puresa del 96% amb un temps de retenció de 16,6 min (5 → 35% en 20 minuts) que suposen un rendiment de purificació del 86%.

L'oligonucleòtid obtingut es caracteritza per espectrometria de masses de MALDI-TOF, donant una massa de 3779 ((M-H)⁻: 3773,1).

6. PROVES BIOLÒGIQUES AMB ELS OLIGONUCLEOTIDS ANTISENTIT

6.1. Línia cel·lular

S'han utilitzat cèl·lules d'ovari de hamster xinès (CHO), en concret la línia K1, que és una parental que conté 2 còpies del gen *dihidrofolat reductasa (dhfr)*.

6.2. Medis de cultiu

Les cèl·lules es mantenen rutinàriament en medi de cultiu Ham's F12, al qual s'ha afegit bicarbonat sòdic (1,176 g/L), penicil·lina G sòdica (100 U/mL) i estreptomycina (100mg/L) i se suplementa amb sèrum fetal al 7% (V/V) (GIBCO). Les cèl·lules s'incuben a 37°C en una atmosfera al 5% de CO₂.

Quan les cèl·lules ha arribat a confluència, es procedeix a l'expansió del cultiu mitjançant un tractament amb tripsina (Sigma) al 0,05% en PBS 1x (136,9 mM NaCl, 7 mM Na₂HPO₄·2H₂O, 2,8 mM NaH₂PO₄·2H₂O, pH 7,4) per tal de desenganxar-les de la placa.

Tant els medis de cultiu com la tripsina s'esterilitzen per filtració a través de membranes de 0,2 μm de mida de porus (Schleicher & Schuell).

Per als estudis de la citotoxicitat causada pels oligonucleòtids antisentit, el medi de cultiu utilitzat és el mateix, Ham's F12, però en absència de glicina, hipoxantina i timidina (-GHT, GIBCO), que són els productes finals de l'activitat DHFR. Aquest medi ha estat suplementat amb un 5% (V/V) de sèrum fetal, prèviament dialitzat per tal d'eliminar els productes de baix pes molecular. Addicionalment, es sèrum dialitzat s'ha sotmès a un tractament amb calor (56°C durant 30 min) per tal d'inactivar les nucleases presents en el sèrum.

6.3. Incubacions cel·lulars amb oligonucleòtids antisentit

Per a realitzar els experiments de citotoxicitat se sembren 100 cèl·lules CHO K1 en plaques de 35mm de diàmetre en 1mL de medi selectiu -GHT inactivat per calor i es deixen durant 30 minuts per tal que les cèl·lules quedin adherides a la placa. A continuació són tractades amb les corresponents barreges d'oligonucleòtid antisentit i liposoma catiònic. El liposoma utilitzat és N-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamoni metilsulfat (DOTAP[®], Boehringer Mannheim), que té una càrrega positiva a la molècula, la concentració a la que es utilitza és de 10 μM.

L'oligonucleòtid i el liposoma es barregen en un tub Eppendorf i es deixen 15 min a temperatura ambient perquè tingui lloc la formació del complex, que aleshores s'afegeix a la placa.

Les cèl·lules són incubades durant 1 setmana a 37°C en una atmosfera amb un 5% de CO₂. Després del tractament, les colònies supervivents són fixades amb formaldehid al 2% (V/V), es tenyeixen amb violeta de genciana al 0,5% (p/V) (Sigma) i són contades per tal de valorar la citotoxicitat del tractament. Els resultats són expressats com a percentatge del nombre de colònies supervivents respecte a la incubació amb el liposoma sol.

6.4. Resultats de les proves biològiques

Es fan unes proves preliminars amb els oligonucleòtids cATNL i cDTNL sintetitzats en primer lloc, comparant-los amb oligonucleòtids amb la mateixa seqüència, però en forma lineal i amb enllaços tant fosfodiester com fosforotioat:

Oligonucleòtid	Concentració	% Supervivència
Control	-----	100
ATNL-PO	1 µM	96
ATNL-PS	1 µM	25
cATNL-PO	1 µM	48
DTNL-PS	1 µM	28
DTNL-PS	2 µM	40
cDTNL-PO	1 µM	43
cDTNL-PO	2 µM	35

A continuació es fan estudis de la dependència de l'activitat amb la concentració d'oligonucleòtid amb els oligonucleòtids cATNL i cDTNL sintetitzats a gran escala:

Oligonucleòtid	Concentració	% Toxicitat
Control	-----	0
cATNL	0,5 µM	0
cATNL	1 µM	25
cATNL	2 µM	0
cATNL	3 µM	0
cDTNL	0,5 µM	12
cDTNL	1 µM	55
cDTNL	2 µM	20
cDTNL	3 µM	8

Finalment es realitzen els estudis d'activitat amb els oligonucleòtids 12-mer sintetitzats, tant en medi específic (-GHT) com en medi complert (F12). A la taula es recull el % de supervivència de les cèl·lules després dels diferents tractaments:

Concentració	12PS (-GHT)	12PS (F12)	c12PO (-GHT)	c12PO (F12)
0 µM	100	100	100	100
0,5 mM	100	82,1	44	97,2
1 µM	80,6	92,8	85	94,4
2 µM	0	0	80	100
4 µM	0,3	0	95	100

12PS: 12-mer lineal fosforotioat
 c12PO: 12-mer cíclic fosfodiester

SÍNTESI D'OLIGONUCLEÒTIDS FOSFOROTIOATS CÍCLICS

1. SÍNTESI DE $c(T_{PO}T_{PO})$

Es parteix de 22 mg de nucleotidil-resina amb una funcionalització de 92 $\mu\text{mol/g}$, l'escala inicial és de 2,1 μmol . Se sintetitza el dímer utilitzant el programa de síntesi MSPEGPSM. Després de la ciclació i el desancoratge s'obtenen 11,5 OD₂₆₀ (Rdt = 35%), de producte que es purifica per HPLC. Finalment s'han obtingut 2,5 OD₂₆₀ de producte (rendiment global 7%) del 95% de puresa, $t_R = 3,5$ min (HPLC, gradient de 5 a 35% de B en 20 minuts). Anàlisi de **EM-ES**: 608,3 (teòrica: 608,4)

2. SÍNTESI DE $c(T_{PS}T_{PO})$

Es parteix de 40 mg de nucleotidil-resina amb una funcionalització de 92 $\mu\text{mol/g}$, l'escala inicial és de 3,5 μmol . Se sintetitza el dímer utilitzant el programa de síntesi MSPEGPST. Es procedeix amb la ciclació i el desancoratge, obtenint 10,8 OD₂₆₀ (Rdt = 29%) de producte que es purifica per HPLC. Finalment s'han obtingut dos productes:

- 0,83 OD₂₆₀ del 93% de puresa, $t_R = 7,5$ min (HPLC, gradient de 5 a 35% de B en 20') **EM-ES**: 624 (teòric: 624,5)
- 1,0 OD₂₆₀ del 95% de puresa, $t_R = 9,9$ min (HPLC, gradient de 5 a 35% de B en 20'), **EM-ES**: 624 (teòric: 624,5).

3. INTENT DE SÍNTESI DE $c(T_{PS}T_{PS})$

3.1. Obtenció de 3-cloro-4-hidroxifenilacetat de 2,4-diclorofenil

A una dissolució formada per 3,8 g (23 mmol) de 2,4-diclorofenol i 4,9 g (22 mmol) de DCC en 22 mL de DCM se li afegeix, lentament, mitjançant un embut d'addició de pressió compensada, una dissolució de 4 g (21 mmol) de l'àcid 3-cloro-4-hidroxifenilacètic en 130 mL d'AcOEt. La mescla de reacció es deixa 12 hores amb agitació magnètica a temperatura ambient. Es filtra la N,N-diciclohexilurea formada i es refreda el cru en un bany de gel per tal de precipitar la N,N-diciclohexilurea residual. Es torna a filtrar i el filtrat es renta amb NaHCO₃ (3x). La fase orgànica s'asseca sobre MgSO₄ i s'evapora a sequedat. L'oli groguenc obtingut es cromatografia en columna flash de gel de sílice eluint amb hexà /DCM (80:20) i augmentant la quantitat de DCM fins al 80%. El producte es purifica per precipitació sobre hexà. S'obtenen 2,4 g (7,2 mmol) de producte, el rendiment ha estat del 35%.

-Caracterització: Rf (AcOEt / hexà 3:7) = 0,23

¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz): 7,50 (1H, d, $J_{3'5'}$ 2, H-3'), 7,44 (1H, dd, $J_{5'6'}$ 8, $J_{5'2'}$ 2, H-5'), 7,40 (1H, d, J_{26} 2, H-2), 7,33 (1H, d, $J_{6'5'}$ 8, H-6'), 7,26 (1H, dd, J_{65} 7, J_{62} 2, H-6), 7,12 (1H, d, J_{56} 7, H-5), 3,89 (2H, s, CH₂)

¹³C-RMN (CDCl₃, 50 MHz), 132,2 (Cq Cl2ar), 130,9 (Cq, Cl2ar), 130,5 (Ct, Clar), 129,5 (Ct cl2ar), 126,6 (Ct Clar), 117,9 (Ct clar), 40,0 (CH₂)

3.2. Obtenció del tiofosfat de 3'-O-(5'-O-DMT-timidinil)-2-clor-4-(2,4-diclorofenoxicarbonil-metil)fenil i 2-cianoetil

En un matràs ben sec (prèviament assecat a 120°C i temperat en un dessecador) s'introdueixen 80 mg (mmol) de 5'-O-DMT-timidina 3'-O-(2-cianoetil)-N,N-diisopropilforamidit i 33 mg (mmol) de 3-clor-4-hidroxifenilacetat de 2,4-diclorofenil prèviament assecats en un dessecador, i es dissolen sota atmosfera d'argó en 1 mL de DCM anhidre. S'hi addicionen, sota atmosfera d'argó i amb l'ajut d'una

cànula, 9 mg (mmol) de tetrazole dissolts en 0,5 mL d'ACN anhidre. S'agita magnèticament sota atmosfera d'argó, a temperatura ambient i durant 1 hora. A continuació s'hi afegeixen 2 mL d'una dissolució de reactiu de Beaucage (2,5 % pes/volum) i es deixa reaccionar durant 2 minuts. En acabat es dilueix el cru de reacció amb DCM i es renta amb H₂O (2 x 50 mL) i amb una dissolució saturada de NaCl (2 x 50 mL). La fase orgànica s'asseca sobre Na₂SO₄ i s'evapora a sequedat. Es purifica el producte per precipitació sobre hexà.

3.3. Estudi de la influència del temps de sulfurització i de la proporció de reactiu sulfuritzant

En un matràs ben sec (prèviament assecat a 120°C i temperat en un dessecador) s'introdueixen el 5'-O-DMT-timididina 3'-O-(2-cianoetil)-N,N-diisopropilfoforamidit i el 3-clor-4-hidroxilfenil-acetat de 2,4,5-triclorofenil prèviament assecats en un dessecador, i es dissolen sota atmosfera d'argó en DCM anhidre. S'hi addiciona, sota atmosfera d'argó i amb l'ajut d'una cànula, tetrazole dissolt en ACN anhidre. S'agita magnèticament sota atmosfera d'argó, a temperatura ambient i durant 1 hora. A continuació s'hi afegeix una dissolució de reactiu de Beaucage (2,5% pes/volum) en ACN anh i es deixa reaccionar. En acabat es dilueix el cru de reacció amb DCM i es renta amb H₂O (2 x 50 mL) i amb una dissolució saturada de NaCl (2 x 50 mL). La fase orgànica s'asseca sobre Na₂SO₄ i s'evapora a sequedat. Es purifica el producte per precipitació sobre hexà.

A la següent taula es recullen els temps de reacció i les quantitats del diferents reactius en cadascuna de les experiències:

Exp	Amidit	Linker	Tetrazole	Sulfuritzant	Temps	³¹ P-RMN
1	147 mg (0,2 mmol)	66 mg (0,18 mmol)	14 mg (0,2 mmol)	100 mg (0,5 mmol)	10 min	71,3; 71,0; 62,4; 62,1; -8,0
2	75 mg (0,1 mmol)	33 mg (0,09 mmol)	7 mg (0,1 mmol)	50 mg (0,25 mmol)	2 min	62,3; 62,0; 7,6; 7,5; -7,7; -7,9
3	75 mg (0,1 mmol)	33 mg (0,09 mmol)	7 mg (0,1 mmol)	75 mg (0,38 mmol)	1 min	62,5; 62,3; 62,2; 62,0

3.4. Incorporació del nucleotidil-linker a la resina

En primer lloc es desprotegeix el grup Fmoc amb una dissolució al 10% de piperidina en DMF. S'asseca el nucleotidil-linker per co-evaporació amb ACN anh (2x) i es guarda en un dessecador sobre P₂O₅ i KOH durant una nit. Es disposa la resina en una xeringa provista d'un disc filtrant de polipropilè i s'hi addicionen 4 equivalents del nucleotidil-linker dissolts en la mínima quantitat de DCM, a continuació s'hi afegeixen 4 equivalents d' HOBt i de DCC (en DMF i DCM respectivament). Es deixa reaccionar a temperatura ambient i agitació mecànica durant 70 hores. Es renta la resina amb DMF (2x), DCM (2x), MeOH (2x) i se separa una alíquota de resina amb la que es determina la seva funcionalització, que resulta ser de 15 µmol/g. Com que part del grups DMT poden haver saltat, la funcionalització real de la resina és probable que sigui superior. Els grups amino lliures es bloquegen per acetilació, amb 20 equivalents d'anhidrid acètic, 1 equivalent de DIEA i 1 equivalent de NH₃.

S'elimina el grup CNE amb TEA/Pyr 1:1 durant 3x1 hora i es caracteritza la nucleotidil-resina per ³¹P-RMN (54,9 ppm).

3.5. Síntesi de T_{PS}T_{PS} lineal, ciclació, desprotecció i desancoratge de c(T_{PS}T_{PS})

Es parteix de 100 mg de nucleotidil-resina amb una funcionalització de 15 µmol/g, l'escala inicial és de 1,5 µmol. Se sintetitza el dímer utilitzant el programa de síntesi MSPEGPST. La quantificació del nombre de cadenes lineals a ciclar indica que són 2,9 µmol, consideren un rendiment de l'acoblament del 98%, això vol dir que l'escala inicial de síntesi era de 3 µmol. Després de la ciclació, l'eliminació del grup cianoetil i el desancoratge (en les mateixes condicions que per a la resta d'oligonucleòtids cíclics) s'obtenen 7,5 OD₂₆₀ (Rdt = 16 %). Les dues fraccions principals del cru es purifiquen per HPLC:

- 0,60 OD₂₆₀, t_R = 7,7 min (HPLC, gradient de 5 a 35% de B en 20')
EM-ES: 624
- 0,73 OD₂₆₀, t_R = 9,6 min (HPLC, gradient de 5 a 35% de B en 20')
EM-ES: 624

Ambdues fraccions tenen la massa corresponent al producte c(T_{PS}T_{PO}).

4. LINKER TIOAT

4.1. Preparació de la nucleotidil-resina

Sobre la resina prèviament acondicionada com es descriu a l'apartat 2.3. de la part experimental del capítol 1, s'acoblen 10 equivalents d'àcid 3-bromopropiònic, activats prèviament durant 5 minuts en forma d'anhídrid simètric amb 5 equivalents de DIPCDI en DCM. L'acoblament es controla mitjançant l'assaig de ninhidrina i després de 2 tractaments de 30 minuts és quantitatiu i es renta la resina amb DMF.

Seguidament es tracta la bromopropionil-resina amb una barreja de AcSH i DIEA al 10% en DMF (2x20 min). Després de rentar amb DMF es tracta finalment amb β-mercaptoetanol i DIEA al 10% en DMF (2x20 min) i es renta amb DMF. Es comprova la presència de grups tiol mitjançant el test d'Ellman.

La resina es tracta amb 176 mg (mmol) de CNE-dT en DCM anhidre, 17 mg (mmol) de tetrazole en ACN anhidre durant 18 hores obtenint-se una funcionalització de 194 µmol/g.

S'oxida el fosfit triester obtingut per tractament amb 25 µL de ^tBuOOH en DCM durant 3 minuts, es renta la resina amb DCM i MeOH. S'aceten els grups tiol lliures amb Ac₂O/DIEA fins a obtenir un test d'Ellman negatiu i es caracteritza per ³¹P-RMN, obtenint-se un desplaçament químic de 26,2 ppm.

4.2. Desancorament del primer nucleòtid

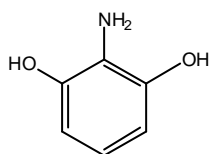
4.2.1. Eliminació del grup cianoetil

S'elimina el grup cianoetil protector del fosfat mitjançant 3 tractaments de 1 hora amb TEA/pyr 1:1. Es renta bé la resina amb dioxà i ACN i s'asseca en un dessecador sobre P₂O₅ i KOH. La caracterització de la resina resultant per ³¹P-RMN no mostra cap senyal corresponent a àtoms de fòsfor.

CAPÍTOL 2: ABRAÇADORES DE GUANINA

G-CLAMP**1. REDUCCIÓ DEL 2-NITRORESORCINOL**

Suspensió de 5 g (32 mmol) de nitroresorcinol en 320 mL d'EtOH i se li va afegint gradualment una dissolució de 22,4 g (129 mmol) de ditionit sòdic en 104 mL d'aigua. La barreja es en agitació a temperatura ambient fins que recupera la temperatura ambient i la dissolució ha passat de color taronja intens a groc pàl·lid. Es filtra el precipitat, es rotavapora i es purifica per cromatografia en gel de sílice. Eluent AcOEt. S'obtenen 2,82 g (22,5 mmol) de producte, el rendiment ha estat del 70%.



Caracterització:

¹H-RMN (D₂O, 200 MHz) : 7,41: (1H, dd, J_a=2, J_b=6, H-5); 6,30: (1H, d, J=1, H-4), 6,29: (1H, d, J=1H-6)

¹³C-RMN (D₂O, 50 MHz) : 144,7 (Cq (OH)); 137,0 (Cq (NH)), 118,8: (CH, C-5), 107,3: (CH, C-6)

EM-ES: *m/z* 126,3 (M_{calc} per C₆H₇NO₂: 125,1)

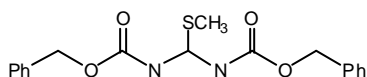
Pf: 152,5°C

Rf(AcOEt) = 0,65

2. PREPARACIÓ DEL BRAÇ GUANIDINO**2.1. Síntesi de Z₂-metilisotiurea**

Es tracten 10 g (35,9 mmol) de sulfat de metilisotiurea amb 1 equivalent de NaOH 1 N, excés de NaHCO₃ sat i 3 equivalents de Z-Cl (18,4 g, 16 mL, 108 mmol) en 50 mL de DCM amb agitació vigorosa, durant 12 h a 0°C i 14 h a temperatura ambient. Un cop acabada la reacció se separen les dues fases, es renta la fase aquosa amb DCM i s'ajunten els extractes orgànics, s'assequen sobre MgSO₄, es filtren i s'elimina el dissolvent. Es purifica el producte per cromatografia en gel de sílice utilitzant AcOEt / Hexà (1:1) com a eluents. S'obtenen 6,5 g (18,2 mmol) d'un oli blanquinós. El rendiment de la reacció és del 51%.

Caracterització:



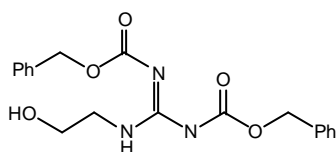
¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz): 11,8 (sa, H amínic), 7,36 (10H, sc, H aromàtics), 5,18 (4H, s, 2xCH₂), 2,41 (3H, s, CH₃)

¹³C-RMN (CDCl₃, 50 MHz): 172,8: (COO), 128,9 (CH ar), 128,7: (CH ar), 128,6: (CH ar), 128,5: (CH ar), 128,3: (CH ar), 73,4: (Cq), 68,4: (CH₂), 68,0: (CH₂), 14,7: (CH₃)

EM-ES (+): *m/z* 359 (M_{calc} per C₁₈H₁₈N₂O₄S: 358,4)

2.2. Síntesi del braç guanidino

Es dissolen 5 g (14 mmol) de Z₂-metilisotiurea i 7,8 mL (56 mmol) de TEA en 170 mL d'ACN anhidre. A la dissolució resultant se li afegixen lentament 8,4 mL (8,5 g, 14 mmol) d'etanolamina dissolts en 17 mL d'ACN anhidre. La dissolució resultant es deixa reaccionar a reflux durant 22,5 hores sota atmosfera de nitrogen. Un cop acabada la reacció s'evapora el cru a sequedat, es dissol en aigua i s'extreu amb DCM. S'asseca la fase orgànica sobre Na₂SO₄ i s'evapora a sequedat. El cru obtingut es purifica per cromatografia en gel de sílice utilitzant DCM com a eluent. Per tal d'eliminar la TEA restant es dissol el producte en dioxà i es liofil·litza. S'obtenen 1,70 g (5,07 mmol) de sòlid blanc, representant un rendiment del 36%.



Caracterització:

¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz): 11,8 (sa, H amínic), 7,36 (10H, sc, H aromàtics), 5,18 (2H, s, CH₂ benzílic), 5,11 (2H, s, CH₂ benzílic), 3,74 (2H, m, CH₂), 3,59 (2H, m, CH₂)

¹³C-RMN (CDCl₃, 50 MHz): 128,8, 128,6, 128,4, 128,3, 127,9 (CH-Ph), 68,3, 67,1 (CH₂ benzílic), 62,4 (CH₂), 44,2 (CH₂).

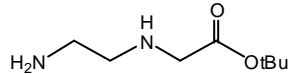
EM-ES (+): *m/z* 372,0 (*M*_{calc} per C₁₉H₂₁N₃O₅: 372,3)

3. PREPARACIÓ DE L'ESQUELET DE PNA PER AL MONÒMER

3.1. Síntesi de *tert*-butil N-(2-aminoetil)glicinat

A una dissolució agitada vigorosament de 11 mL (0,16 mmol) d'etilendiamina en 73 mL de DCM a 0°C se li afegeixen 3 mL (0,018 mmol) de *tert*-butilbromoacetat dissolts en 15 mL de DCM durant 5 hores. La barreja resultant es deixa atemperar lentament fins a temperatura ambient i s'agita durant 17 hores. El cru de reacció es renta amb aigua i les fraccions aquoses combinades es renten amb DCM. S'ajunten les fraccions orgàniques i s'assequen sobre Na₂SO₄. Aquesta dissolució s'utilitza directament en la següent etapa de síntesi. Es porta a sequedat una fracció de la dissolució per tal de caracteritzar el producte obtingut.

Caracterització:



¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz): 3,31: (2H, s, H_A), 2,80: (2H, td, J_t=6, J_d=1, H_B), 2,68: (2H, td, J_t=6, J_d=1, H_C), 1,47: (9H, s, 3x CH₃)

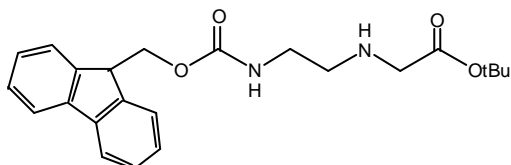
¹³C-RMN (CDCl₃, 50 MHz): 171,5 (COO), 80,6 (CH₂ E), 51,9, 51,3 (CH₂ A i B), 41,5 (CH₂ C), 25,8 (3xCH₃)

3.2 Síntesi de l'hidroclorur de *tert*-butil-N-[2-(N-9-fluorenilmetoxicarbonil)aminoetil]glicinat

A una solució en agitació d'1 g (5,76 mmol) de *tert*-butil N-(2-aminoetil)glicinat en 38 mL de DCM se li afegeixen 960 μL (5,51 mmol) de DIEA. A la dissolució resultant se li afegeix gota a gota durant 5 hores, una dissolució de 1,86 g (5,51 mmol) de N-(9-fluorenilmetoxicarbonil-oxi)succinimida en 11 mL de DCM. S'agita aquesta dissolució durant 42 hores a temperatura ambient. El cru de reacció es renta amb una dissolució aquosa 1 N de HCl i a continuació amb una dissolució aquosa saturada de NaCl. La fase orgànica s'asseca sobre Na₂SO₄ i es concentra parcialment. Es conserva a -20°C durant 48 hores i resulta un precipitat que es filtra i es renta amb DCM fred. El sòlid resultant s'asseca al buit i es caracteritza. S'obtenen 1,84 g (4,69 mmol) de producte, representant un rendiment del 84%.

Per tal d'obtenir la base lliure es dissol la sal en cloroform, es renta amb una dissolució aquosa saturada de NaHCO₃, s'asseca sobre Na₂SO₄ i es concentra al buit per a rendir la base lliure com un oli.

Caracterització:



¹H-RMN (DMSO, 200 MHz): 9,18: (2H, sa, NH), 7,86: (2H, d), 7,64: (2H, t), 7,43-7,23: (4H, m), 4,31: (2H, d, J=7, H₂), 4,20: (1H, t, J=6, H₁), 3,85: (2H, s, H₅), 3,29: (2H, sa, H₄), 2,97: (2H, t, J=6, H₃), 1,43: (9H, s, 3x CH₃)

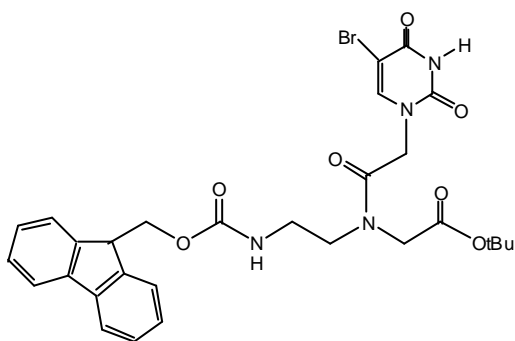
CH₃).

¹³C-RMN (DMSO, 50 MHz): 166,3: (CO-A), 156,8: (CO-B), 144,3: (Cq arom), 141,3: (Cq arom), 128,2: (CH arom), 127,6: (CH arom), 125,5: (CH arom), 120,7: (CH arom), 83,6: (C-1), 66,9: (C-2), 47,9: (C-3), 47,3: (C-4), 37,3: (C-6), 28,3: (CH₃).

EM-ES (+): *m/z* 397,2 (*M*_{calc} per C₂₀H₂₂N₂O₄: 396)

3.3 Síntesi de *tert*-butil-*N*-[2-(*N*-9-fluorenilmetoxicarbonil)aminoetil]-*N*-[(4-*N*-(benziloxicarbonil)-5-bromo-uracín-1-il)acetil]-glicinat

A una dissolució de 150 mg (0,38 mmol) de *tert*-butil-*N*-[2-(*N*-9-fluorenilmetoxicarbonil) aminoetilglicinat en 2 mL de DMF anhidra a 0°C se li afegeixen 105 mg (0,42 mmol) de *N*-carboximetil-5-bromouracil seguits de 161 mg (0,84 mmol) d'EDC. La dissolució es deixa escalfar fins a temperatura ambient i s'agita durant 31 hores (control de la reacció per HPLC A:H₂O B: ACN 30→ 100% en 25', *t_R* =16,5 min). El cru de reacció s'aboca sobre aigua/gel amb agitació. Es filtra el precipitat format, es renta amb aigua freda i s'asseca al buit. El sòlid es dissol en DCM calent i es precipita en hexà. Purificació per HPLC.



Caracterització:

¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz): 7,99: (1H, s, H uracil), 7,73: (2H, d, J=7, H_B), 7,58: (2H, d, J=7, H_A), 7,37: (2H, t, J=7, H_B), 7,28: (2H, t, J=7, H_C), 4,48-4,32: (3H, m, H1, H2), 4,20: (1H, t, J=6, H5), 4,06: (0,4H, s, H5), 3,94: (0,6H, s, H5), 3,58-3,34: (4H, m, H3, H4), 1,48: (9H, s, 3xCH₃).

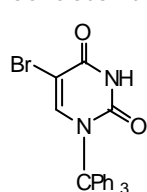
EM-MALDI-TOF(+): *m/z* 627,7 (*M*_{calc} per C₂₆H₂₅BrN₄O₇: 626,6)

4. INTENT DE VIA DE SÍNTESI DE LA BASE NITROGENADA COMÚ PER A DNA I PNA

4.1. Síntesi del 5-bromo-N¹-trifenilmetil-uracil

A una suspensió de 2 g (8,7 mmol) de 5-bromouracil i 3,5 g (12,5 mmol) de clorur de trifenilmetil en 6 mL de DMF anh se li afegeixen 2 mL (12,5 mmol) de DBU. Es deixa reaccionar a temperatura ambient durant 12 hores. S'afegeixen 30 mL d'aigua i es forma un precipitat blanc que no es pot filtrar. S'afegeixen 50 mL de DCM i s'observa la dissolució del precipitat. Se separa la fase orgànica i es renta amb aigua, s'asseca sobre MgSO₄ i s'elimina el dissolvent. Es purifica el cru per cromatografia en gel de sílice, amb DCM/MeOH 15% com a eluent. S'obtenen 3,51 g (8,1 mmol) de producte, el rendiment ha estat del 93%.

Caracterització:



¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz): 7,89 (1H, s, H₆), 7,36-7,22 (15H, m, Ph)

¹³C-RMN (CDCl₃, 50 MHz): 159,4 (C₂, CO), 149,2 (C₄, CO), 140,5 (C₆, CH), 129,4, 128,1, 127,7 (Ph), 96,8 (C₅, C-Br)

EM-MALDI-TOF(+): *m/z* 431,7, 433,7 (M_{calc}: 430,3)

Pf: 194°C

Rf(DCM/MeOH 5%): 0,55

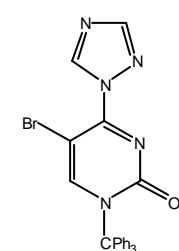
4.2. Intent de síntesi de 5-bromo-4-N-(2,6-dihidroxifenil)-N¹-trifenilmetil-citosina amb Ph₃P

Es dissolen 0,5 g (1,2 mmol) de 5-bromo-N¹-trifenilmetil-uracil i 0,45 g (1,8 mmol) de Ph₃P en 3 mL de DCManh/CCl₄anh (1:1). Es manté a reflux durant 3 hores. Es deixa refredar fins a temperatura ambient i s'afegeixen 0,18 g (1,4 mmol) de 2-aminoresorcinol i 0,34 mL (2,3 mmol) de DBU. Es deixa reaccionar a temperatura ambient durant 12 hores sota atmosfera de nitrogen. S'elimina el dissolvent i es redissol el cru en el mínim volum possible de DCM. S'aboca sobre una dissolució aquosa d'àcid cítric (7 g en 200 mL d'aigua) i no s'observa la formació del producte esperat.

4.3. Síntesi de 5-bromo-4-[N¹-(1,2,4-triazol)]-N¹-trifenilmetil-uracil

Es dissolen 0,95 g (13,8 mmol) de 1,2,4-triazol en 50 mL d'ACN anh. Es refreda la dissolució en un bany de gel, s'afegeixen 3,17 mL (22,9 mmol) de TEA anh, 0,26 mL (2,9 mmol) de POCl₃ i es deixa reaccionar durant 30 minuts a 0°C sota atmosfera d'argó. S'afegeixen 0,63 g (1,4 mmol) de 5-bromo-N¹-trifenilmetil-uracil. Es retira el bany de gel i es deixa reaccionar durant 12 hores a temperatura ambient. S'afegeixen 5 mL de TEAB (2 M) i s'agita durant 5 minuts. S'elimina l'ACN, s'afegeix AcOEt i es renta la fase orgànica amb TEAB 1 M i brine. S'asseca sobre Na₂SO₄ i s'elimina el dissolvent. S'obtenen 0,49 g (1 mmol) de producte. El rendiment ha estat del 72%.

Caracterització:



¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz): 8,10 i 8,09 (2H, 2s, H₃ i H₅ de triazol), 7,9 (1H, s, H₅), 7,36-7,11 (15H, 2m, Ph)

¹³C-RMN (CDCl₃, 50 MHz): 159,4 (C₂, CO), 151,7 (C₄, C-N), 141,7 (C₆, CH), 129,9, 129,4 (C₃ i C₅ del triazol), 128,1, 127,9, 127,8, 127,7 (Ph), 96,8 (C₅, C-Br)

EM-MALDI-TOF(+): *m/z* 484,4, 486,4 (M_{calc}: 483,3)

Pf: 215°C

Rf(AcOEt/Hexà 1:1): 0,59

4.4. Intent de síntesi de 5-bromo-4-N-(2,6-dihidroxifenil)-N¹-trifenilmetil-citosina amb Ph₃P

Es dissolen 0,5 (1 mmol) de 5-bromo-N¹-trifenilmetil-uracil i 0,25 g (2 mmol) de 2-aminoresorcinol en 10 ml de DCM anh. S'afegeixen 0,3 mL (2 mmol) de DBU i s'agita a temperatura ambient durant 12 hores sota atmosfera d'argó. S'elimina el dissolvent i es redissol el cru en el mínim volum possible de DCM. S'aboca sobre una dissolució aquosa d'àcid cítric (7 g en 200 mL d'aigua) i no s'observa la formació del producte esperat.

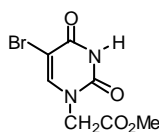
5. SÍNTESI DE LA BASE NITROGENADA

5.1. Síntesi de l'alcoxicarbonilmetil derivat

5.1.1. Síntesi de 5-bromo-N¹-metoxycarbonilmetiluracil (**2-Me**)

Es prepara una suspensió de 2 g (10,5 mmol) de 5-bromouracil i 1,45 g (10,5 mmol) de K₂CO₃ en 5 mL de DMF anhidra i se li afegeix 1 mL (1,62 g, 10,5 mmol) de bromoacetat de metil. La barreja s'agita vigorosament a temperatura ambient sota atmosfera de nitrogen durant 16 hores. El cru de reacció es filtra i s'evapora a sequedat, al buit. S'obtenen 2,06 g (8,93 mmol) de sòlid groc, el rendiment de la reacció és del 85%.

Caracterització:



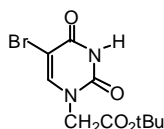
¹H-RMN (DMSO, 200 MHz): 8,37: (1H, s, H aromàtic), 4,61: (2H, d, J=3,4, CH₂), 3,67: (3H, t, 3,4, CH₃)

¹³C-RMN (DMSO, 50 MHz): 169,0: (COO), 161,0: (CO, C₂), 151,5: (CO, C₄), 145,7: (CH, C₆), 95,7: (CBr, C₅), 53,0: (CH₂), 49,3: (CH₃)

EM-IC(+): *m/z*: 263 / 265 (M_{calc}: 262/264)

5.1.2. Síntesi de 5-bromo-N¹-*tert*-butoxicarbonilmetiluracil (**2**)

A una suspensió de 1,03 g (5,4 mmol) de 5-bromouracil i 738 mg (5,4 mmol) de K₂CO₃ en 20 mL de DMF anhidra se li afegeixen 800 μL (1,056 g, 5,4 mmol) de bromoacetat de *tert*-butil i la barreja s'agita vigorosament sota atmosfera d'argó durant 21 hores. Es filtra el cru de reacció. S'afegeix AcOEt i es renta amb aigua per a arrossegar la DMF. S'asseca sobre sulfat sòdic i es rotavapora a sequedat. S'obtenen 1,4 g (4,6 mmol) d'un sòlid blanc, això representa un rendiment del 85%.



Caracterització:

Rf_{AcOEt} = 0,85

¹H-RMN (DMSO, 200 MHz): 8,12: (1H, s, H Uracil), 4,34: (2H, s, CH₂), 1,39: (9H, s, 3 CH₃)

¹³C-RMN (DMSO, 50 MHz): 167,4: (COO), 160,2: (CO(C-4)), 150,8: (CO(C-2)), 146,1: (CH(C-6)), 95,1: (C-Br), 82,7: (Cq), 49,9: (CH₂), 28,3: (CH₃)

EM-FAB(+, NBA): *m/z* 305,1/307,1 (M_{calc} per C₁₀H₁₃BrN₂O₄: 343,2/345,2)

5.2. Activació de 5-bromo-N¹-metoxycarbonilmetiluracil (**2Me**) amb Ph₃P/CCl₄

Es dissolen 1,53 g (5,8 mmol) de 5-bromo-N¹-metoxycarbonilmetiluracil (**2Me**) i 2,27 g (8,6 mmol) de Ph₃P en CCl₄-DCM (8 mL- 8 mL) i s'escalfen a reflux sota nitrogen durant 3 hores. El cru de reacció es deixa refredar a temperatura ambient i, a continuació, se li afegeixen 750 mg (6 mmol) de 2-aminoresorcinol i 1,81 g (12 mmol) de DBU. La dissolució resultant s'agita a temperatura ambient sota nitrogen durant 13h. S'elimina el dissolvent i es redissol el cru en DCM. S'aboca el cru sobre una dissolució aquosa d'àcid cítric (70 g en 2 L) i s'agita. Precipita un sòlid que es filtra. Analitzant per CCF tant el sòlid precipitat com la fase orgànica tenen els mateixos productes, s'ajunten, es rotavaporen i es purifiquen per cromatografia en gel de sílice (eluent AcOEt / Hexà 1:1). S'obtenen 429 mg de producte que per ¹H-RMN és majoritàriament òxid de trifenilfosfina però que per espectrometria de masses mostra la presència del producte esperat.

EM-MALDI-TOF(+): m/z 370,6 / 372,6 (M_{calc} : 369,3 / 371,3)

5.3. Activació de 5-bromo- N^1 -metoxycarbonilmetiluracil (2Me) amb $\text{Et}_3\text{P}/\text{CCl}_4$

5.3.1. Intent d'activació

Una dissolució de 100 mg (0,38 mmol) de 5-bromo- N^1 -metoxycarbonilmetiluracil (**2Me**) i 560 μL de una dissolució 1M de trietilfosfina en 1 mL de CCl_4 i 1 mL de DCM s'agiten a reflux durant 4 hores. Es deixa refredar i s'afegeixen 49 mg (0,39 mmol) de 2-aminoresorcinol i 117 μL (0,78 mmol) de DBU. Després de 13 hores no queda resorcinol i s'atura la reacció. Es rotavapora a sequedat i es dissol el cru en DCM/Hexà 2:1. S'aboca sobre una dissolució aquosa d'àcid cítric. Com que no precipita res es fan rentats de la fase orgànica amb àcid cítric. Se separen els diferents components de la fase orgànica per cromatografia en gel de sílice i en cap d'ells es troba el producte esperat.

5.3.2. Síntesi del clorur de 5-bromo- N^1 -metoxycarbonilmetiluracil

Es dissolen 1 g (3,8 mmol) de 5-bromo- N^1 -metoxycarbonilmetiluracil (**2Me**) i 4,56 mL (4,56 mmol) de trietilfosfina en 15 mL de CCl_4 i s'agiten a temperatura ambient durant 2 hores. S'elimina el dissolvent i es resuspen en DCM. Queda un sòlid blanc que es filtra i s'analitza per ^1H -RMN

(DMSO, 200 MHz, 11,9 ppm \rightarrow NH; 8,21 ppm \rightarrow s, 1H, H uracil; 4,52 ppm \rightarrow s, 2H, CH_2 ; 3,68 ppm (s, 3H, CH_3) Per ^{13}C -RMN els senyals corresponen al producte de partida i apareix una nou senyal a 135,5 ppm que correspon al C unit a Cl. Hi ha barreja dels dos productes, pot ser que el clorur descomposi amb el temps en contacte amb l'aigua del DMSO.

5.3.3. Síntesi de 5-bromo-(2,6-dihidroxifenil)- N^1 -(metoxycarbonilmetil)-citosina a partir del clorur

386 mg (1,37 mmol) de clorur, 177 mg (1,42 mmol) de resorcinol i 309 μL (2,07 mmol) de DBU es dissolen en 15 mL de THF anhidre i s'agiten sota atmosfera inert a temperatura ambient durant 18 hores. Un cop acabada la reacció es rotavapora a sequedat i es redissol en DCM. S'aboca sobre una dissolució aquosa d'àcid cítric i precipita un abundant sòlid blanc que per ^1H -RMN mostra presència d'àcid cítric i DBU. Es renta amb aigua i es purifica per cromatografia (eluent DCM/MeOH 0 \rightarrow 10%). S'obtenen 120 mg de producte. El rendiment és del 23%.

Caracterització:

EM-IC: m/z 369 / 371 (M_{calc}): 368,3 / 370,3)

5.4. Intent d'activació de 5-bromo- N^1 -metoxycarbonilmetiluracil (2Me) amb triazole

Se suspenen 4,9 g (71 mmol) de triazole en 300 mL d'ACN anhidre sota atmosfera d'argó i es refreda la barreja en un bany de gel. A continuació s'afegeixen 1,5 mL (2,4 g, 15,8 mmol) d'oxiclurur de fòsfor i 16,4 mL (12,0 g, 118,4 mmol) de TEA anhidra i es deixa reaccionar durant 30 minuts, observant-se la formació d'un sòlid de color rosa pàl·lid. A continuació es prepara una dissolució de 2,08 g (7,9 mmol) de 5-bromo- N^1 -metoxycarbonilmetiluracil (**2Me**) en 200 mL d'ACN anhidre i s'afegeix gota a gota a la suspensió anterior mitjançant una cànula. Un cop acabada l'addició es retira el bany de gel i es deixa reaccionar a temperatura ambient durant 22 hores. El cru es refreda en un bany de gel, s'afegeixen 5 mL de TEAB 1M, s'agita durant 5 minuts i s'elimina l'ACN del cru. S'afegeixen 100 mL d'AcOEt i la fase orgànica es

renta amb TEAB 1M i dissolució aquosa saturada de NaCl. S'asseca la fase orgànica sobre Na_2SO_4 , es filtra i s'evapora a sequedat. L'espectre de ^1H -RMN indica la presència majoritària de TEA. Es dissol el producte en dioxà i es liofilitza, encara continua havent TEA. Es dissol el cru en DCM i es fan rentats amb TEAB 1M, també continua havent TEA com a producte majoritari.

5.5. Intent de síntesi de 5-bromo-(2,6-dihidroxifenil)- N^1 -(metoxicarbonilmetil)-citosina activant amb clorur de TMBS

Una solució de 1,66 g (7,6 mmol) de clorur de trimetilbenzensulfonil en 5mL de DCM acabat de destil·lar s'afegeix a una suspensió de 1 g (3,8 mmol) de 5-bromo- N^1 -metoxicarbonilmetiluracil (**2Me**) en 3 mL de DCM. A continuació s'afegeixen 2 mL (1,47 g, 14,7 mmol) de TEA acabada de destil·lar i 46 mg de DMAP en 14 mL de DCM. S'agita a temperatura ambient. A les 3 hores no queda producte de partida, es rotavapora i es purifica per cromatografia en gel de sílice (eluent: AcOEt / Hexà 1:1). En cap de les fraccions aïllades es troba el producte esperat.

5.6. Intent d'activació de 5-bromouracil amb trietilfosfina

Se suspenen 200 mg (1,05 mmol) de 5-bromouracil i 1,54 mL (1,54 mmol) de trietilfosfina en 6 mL de CCl_4 i s'agiten a temperatura ambient sota atmosfera d'argó. En 90 minuts no queda producte de partida. S'afegeixen 134,7 mg (1,07 mmol) de resorcinol i 121 μL (127 mg, 2,15 mmol) de DBU i s'agita a temperatura ambient durant 16 hores. S'elimina el dissolvent i es redissol en DCM. Es renta la fase orgànica amb una dissolució aquosa d'àcid cítric i precipita un sòlid que s'aïlla per filtració. En cap de les 3 fraccions (sòlid, fase aquosa i fase orgànica) es troba el producte esperat.

5.7. Síntesi de 5-bromo-(2,6-dihidroxifenil)- N^1 -(*tert*-butoxicarbonilmetil)-citosina (**4**) amb Ph_3P

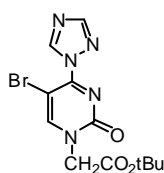
Es dissolen 305 mg (1 mmol) de 5-bromo- N^1 -*tert*-butoxicarbonilmetiluracil (**2**) i 39,3 mg (1,5 mmol) de Ph_3P en CCl_4 -DCM (2 mL- 2 mL) i s'escalfen a reflux sota nitrogen durant 3 hores. El cru de reacció es deixa refredar a temperatura ambient i, a continuació, se li afegeixen 138 mg (1,1 mmol) de 2-aminoresorcinol i 320 μL (315 mg, 2 mmol) de DBU. La dissolució resultant s'agita a temperatura ambient sota nitrogen durant 13h. S'elimina el dissolvent i es redissol el cru en DCM. S'aboca el cru sobre una dissolució aquosa d'àcid cítric (70 g en 2 L) i s'agita. No es forma cap precipitat, es decanta la fase orgànica, s'asseca sobre sulfat sòdic i es purifica el cru per cromatografia en gel de sílice, amb AcOEt/hexà 1:1 com a eluent. S'obtenen 50 mg (0,12 mmol) de producte. El rendiment és del 12%.

5.8. Activació de 5-bromo- N^1 -*tert*-butoxicarbonilmetiluracil (**2**) amb triazole

Se suspenen 6,11 g (88,5 mmol) de triazole en 300 mL d'ACN anhidre sota atmosfera d'argó i es refreda la barreja en un bany de gel. A continuació s'afegeixen 1,9 mL (19,7 mmol) d'oxiclorur de fòsfor i 20,4 mL (14,9 g, 147,4 mmol) de TEA anhidra i es deixa reaccionar durant 30 minuts, observant-se la formació d'un sòlid blanc. A continuació es prepara una dissolució de 3 g (9,8 mmol) de 5-bromo- N^1 -*tert*-butoxicarbonilmetiluracil (**2**) en 70 mL d'ACN anhidre i s'afegeix gota a gota a la suspensió anterior mitjançant una cànula. Un cop acabada l'addició es retira el bany de gel i es deixa reaccionar a temperatura ambient durant 21h. El cru es refreda en un bany de gel, s'afegeixen 5 mL de TEAB 1M, s'agita durant 5 minuts i s'elimina

l'ACN del cru. S'afegeixen 100 mL d'AcOEt i la fase orgànica es renta amb TEAB 1M i dissolució aquosa saturada de NaCl. S'asseca la fase orgànica sobre Na₂SO₄, es filtra i s'evapora a sequedat. S'obtenen 3,17 g (8,9 mmol) d'un sòlid de color vermell fosc (R_f_{AcOEt} = 0,5). El rendiment és del 90%.

Caracterització:



R_f_{AcOEt} = 0,5

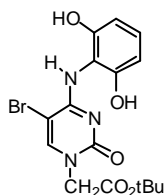
¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz): 9,04: (1H, s, H triazole), 8,26: (1H, s, H triazole), 8,05: (1H, s, H Uracil), 4,58: (2H, s, CH₂), 1,37: (9H, s, 3 CH₃)

¹³C-RMN (CDCl₃, 50 MHz): 153,7: (CH triazole), 153,4: (CH triazole), 145,1: (C-6 resorcinol), 51,7: (CH₂), 28,0: (CH₃)

EM-ES(+): *m/z* 356,0 /358,0 (M_{calc} per C₁₂H₁₄BrN₅O₃ : 355,0 /357,0)

5.9. Síntesi de 5-bromo-(2,6-dihidroxifenil)-N¹-(tert-butoxicarbonilmetil)-citosina (4)

Es dissolen 2,64 g (7,4 mmol) de 5-bromo-N¹-(tert-butoxicarbonilmetil)-4-N¹-(1,2,4-triazolil)-uracil (**3**) i 1,85 g (14,8 mmol) de 2-aminoresorcinol en 50 mL d'ACN anhidre i s'afegeixen 2,3 mL (2,4 g, 15,5 mmol) de DBU i s'agita el cru sota atmosfera d'argó a temperatura ambient durant 20 hores. Es rotavapora a sequedat, es dissol en DCM i s'aboca sobre una dissolució aquosa d'àcid cítric (35 g/L), precipita un sòlid de color marró fosc que es filtra. S'asseca la fase orgànica sobre Na₂SO₄, es filtra i s'elimina el dissolvent. Es purifiquen el sòlid i la fase orgànica per cromatografia en gel de sílice (eluent AcOEt/Hexà 1:1). S'aïllen 2,46 g (5,95 mmol) d'un sòlid marronós, el rendiment és del 80%.



Caracterització:

R_f_{AcOEt} = 0,8

¹H-RMN (CD₃COCD₃, 200 MHz): 8,07: (1H, s, H uracil), 6,81: (1H, t, J=8 H-4 resorcinol), 6,35: (2H, d, J=8, H-3 i H-5 resorcinol), 4,42: (2H, s, CH₂), 1,33: (9H, s, 3 CH₃)

¹³C-RMN (CD₃COCD₃, 50 MHz): 165,1: (COO), 148,9: (C-2 resorcinol), 146,9: (C-6 resorcinol), 125,8: (C-4 resorc), 107,7: (C-3 i C-5 resorc), 97,1: (C-Br), 81,0: (Cq tert-butil), 49,8: (CH₂), 26,4: (CH₃)

EM-MALDI-TOF(+, DHB): *m/z* 412,9/414,9; **EM-MALDI-TOF(-, DHB)**: *m/z* 410,3/412,3; (M_{calc} per C₁₆H₁₈BrN₃O₅: 411,0/413,0)

5.10. Ciclacions

5.10.1. Intents de ciclació amb NH₃

- Intent de ciclació de 5-bromo-(2,6-dihidroxifenil)-N¹-(tert-butoxicarbonilmetil)-citosina (**4**) amb amoníac

Es dissolen 242 mg (mmol) de 5-bromo-(2,6-dihidroxifenil)-N¹-(tert-butoxicarbonilmetil)-citosina (**4**) en 3 mL de MeOH i se li afegeixen 3 mL de NH₃ al 33%. S'agita a temperatura ambient durant 3 dies. S'elimina el dissolvent i es purifica el cru per cromatografia en gel de sílice. No s'aconsegueix aïllar el producte esperat.

- Intent de ciclació de 5-bromo-[2-(N-Z-etanolaminoetoxi)-6-hidroxifenil]-N¹-(metoxycarbonilmetil)-citosina amb amoníac

Es dissolen 125 mg (0,22 mmol) de 5-bromo-[2-(N-Z-etanolaminoetoxi)-6-hidroxifenil]-N¹-(metoxicarbonimetil)-citosina en 17 mL de NH₃/MeOH (preparat). S'agita a temperatura ambient durant 39 hores. S'elimina el dissolvent i es purifica el cru per cromatografia en gel de sílice. No s'aconsegueix aïllar el producte esperat.

- Intent de ciclació de 5-bromo-[2-(N-Z-etanolaminoetoxi)-6-hidroxifenil]-N¹-(*tert*-butoxicarbonimetil)-citosina (**5a**) amb amoníac

Es dissolen 600 mg (1,02 mmol) de 5-bromo-[2-(N-Z-etanolaminoetoxi)-6-hidroxifenil]-N¹-(*tert*-butoxicarbonimetil)-citosina (**5a**) en 100 mL de NH₃/MeOH (comercial). S'agita a temperatura ambient durant 3 dies. S'elimina el dissolvent i es purifica el cru per HPLC semi-preparatiu. S'obtenen 15 mg (0,029 mmol) de producte. El rendiment és del 3%

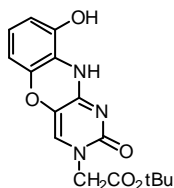
- Intent de ciclació de 5-bromo-[2-(N,N'-bis-Z-guanidino)etoxi-6-hidroxifenil]-N¹-(*tert*-butoxicarbonimetil)-citosina (**5b**) amb amoníac

Es dissolen 185 mg (0,22 mmol) de 5-bromo-[2-(N,N'-bis-Z-guanidino)etoxi-6-hidroxifenil]-N¹-(*tert*-butoxicarbonimetil)-citosina (**5b**) en 10 mL de NH₃/MeOH. S'agita a temperatura ambient durant 66 hores. S'elimina el dissolvent i es purifica el cru per cromatografia en gel de sílice (AcOEt(hexà 1:1), s'obtenen mg (0,031 mmol) de producte, el rendiment és del 14%.

5.10.2. Síntesi de N¹-(*tert*-butoxicarbonilmetil)-6-hidroxifenoxazina (**6**) per ciclació de 5-bromo-(2,6-dihidroxifenil)-N¹-(*tert*-butoxicarbonilmetil)-citosina (**4**)

A una dissolució de 2,26 g (5,5 mmol) de 5-bromo-(2,6-dihidroxifenil)-N¹-(*tert*-butoxicarbonilmetil)-citosina (**4**) en 250 mL d'etanol se li afegeixen 3,2 g (55 mmol) de KF. S'agita a reflux (90°C) durant 20 hores. Es deixa refredar, es filtra el precipitat en suspensió i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda. Es purifica el cru per cromatografia en gel de sílice amb AcOEt/MeOH 0 → 10% com a eluent. S'obtenen 1,39 g (4,2 mmol) de producte. El rendiment ha estat el 76%.

Caracterització:



¹H-RMN (acetona, 200 MHz): 7,15 (s, 1H, H uracil), 6,72 (d, 1H, J = 8 Hz, H-3 resorcinol), 6,53 (dd, 1H, J = 8 Hz, H-4 resorcinol), 6,27 (d, 1H, J = 8 Hz, H-2 resorcinol), 4,38 (s, 2H, CH₂), 1,25 (s, 9H, 3x CH₃).

¹³C-RMN (acetona, 50 MHz): 166,5 (COO), 155,4 (CO), 146,1 (C-6 resorcinol), 129,3 (C-4 resorcinol), 107,9 (C-5 resorcinol), 105,5 (C-3 resorcinol), 86,8 (Cq, *tert*-butil), 55,2 (CH₂), 28,0 (CH₃).

EM-MALDI-TOF(+, DHB): *m/z* 333,9; EM-MALDI-TOF(-, DHB): 329,7 (M_{calc} per C₁₆H₁₇N₃O₅: 331,1)

5.10.3. Síntesi de N¹-(*tert*-butoxicarbonilmetil)-6-(N-Z-2-aminoetoxi)-fenoxazina (**7a**) per ciclació de 5-bromo-[2-(N-Z-etanolaminoetoxi)-6-hidroxifenil]-N¹-(*tert*-butoxicarbonimetil)-citosina (**5a**)

Es prepara una dissolució de 420 mg (0,71 mmol) de 5-bromo-[2-(N-Z-etanolaminoetoxi)-6-hidroxifenil]-N¹-(*tert*-butoxicarbonimetil)-citosina (**5a**) en 150 mL d'etanol i se li afegeixen 412 mg (7,1 mmol) de KF. S'agita a reflux (90°C) durant 20 hores, es deixa refredar, es filtra el precipitat format i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda. El cru de reacció es purifica per cromatografia en gel de sílice amb AcOEt/MeOH 0 → 10% com a eluent. S'obtenen 162 mg (0,32 mmol) de producte, el rendiment ha estat del 45%.

5.10.4. Síntesi de N^1 -(*tert*-butoxicarbonilmetil)-6-[2-(*N,N'*-bis-*Z*-guanidino)etoxi]-fenoxazina (**7b**) per ciclació de 5-bromo-[2-(*N,N'*-bis-*Z*-guanidino)etoxi-6-hidroxifenil]- N^1 -(*tert*-butoxicarbonilmetil)-citosina (**5b**)

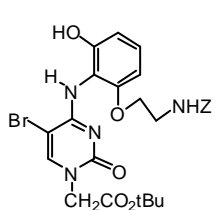
Es prepara una dissolució de 300 mg (0,39 mmol) de 5-bromo-[2-(*N,N'*-bis-*Z*-guanidino)etoxi-6-hidroxifenil]- N^1 -(*tert*-butoxicarbonilmetil)-citosina (**5b**) en 100 mL d'etanol i se li afegeixen 228 mg (3,9 mmol) de KF. S'agita a reflux (90°C) durant 20 hores, es deixa refredar, es filtra el precipitat format i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda. El cru de reacció es purifica per cromatografia en gel de sílice amb AcOEt/MeOH 0 → 10% com a eluent. S'obtenen 198mg (0,29 mmol) de producte, el rendiment ha estat del 73%.

5.11. Reaccions de Mitsunobu

5.11.1. Síntesi de 5-bromo-[2-(*N-Z*-etanolaminoetoxi)-6-hidroxifenil]- N^1 -(metoxycarbonilmetil)-citosina (**5a**) amb trifenilfosfina

Es prepara una dissolució de 72 mg (0,37 mmol) de benzil *N*-(2-hidroxiètil)carbamat, 131 mg (0,50 mmol) de Ph_3P i 124 mg (0,33 mmol) de 5-bromo-(2,6-hidroxifenil)- N^1 -(metoxycarbonilmetil)-citosina (**4**) en 2 mL de DCM anhidre i es refreda en bany de gel. Se li afegeixen 61 μL (87 mg, 0,50 mmol) de DEAD i s'agita a temperatura ambient, sota Ar durant 17 h. El cru de reacció es renta amb aigua, s'asseca sobre Na_2SO_4 i es purifica per cromatografia en gel de sílice (eluent AcOEt / Hexà 1:1). S'obtenen 150 mg de producte impurificat amb DEAD (si fos pur el rendiment seria del 83%).

Caracterització:



$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 200 MHz): 8,09 (s, 1H, H ur), 7,37 (s, 5H, H Ph), 7,05 (t, 8,5 Hz, 1H, H res), 6,70 (d, 8. Hz, 1H, H res), 6,43 (d, 8,5 Hz, 1H, H res), 5,13 (s, 2H, CH_2 benzil), 4,54 (s, 2H, CH_2 acetat), 4,16 (sc, 2H, CH_2 (O-braç)), 3,81 (s, 3H, CH_3), 3,70 (sc, 2H, CH_2 (NH-braç))

$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 50MHz): 167,7 (COO), 150,1 (CO Ur), 145,6 (CH Ur), 128,5, 128,2,

128,1, 127,2 (CH Ph), 114,1 (CH resorc), 102,5 (C-Br Ur), 67,6 (CH_2 Z), 67,0 (CH_2 (O-braç)), 53,0 (CH_3), 50,0 (CH_2 acetat), 40,7 (CH_2 (NH-braç))

EM-IC: m/z 546 / 548 (M_{calc} : 546,5 / 548,5)

5.11.2. Síntesi de 5-bromo-[2-(*N-Z*-etanolaminoetoxi)-6-hidroxifenil]- N^1 -(*tert*-butoxicarbonilmetil)-citosina (**5a**) amb trifenilfosfina unida a suport sòlid

Es prepara una suspensió de 849 mg (2,55 mmol) de trifenilfosfina unida a suport polimèric, 312 μL (2,55 mmol) de DEAD, 700mg (1,7 mmol) de 5-bromo-(2,6-dihidroxifenil)- N^1 -(*tert*-butoxicarbonilmetil)-citosina (**4**) i 497 mg (2,55 mmol) de benzil *N*-(2-hidroxiètil)carbamat en el mínim volum possible de DCM anhidre, per tal que es dissolguin el braç guanidini el 5-bromo-(2,6-dihidroxifenil)- N^1 -(*tert*-butoxicarbonilmetil)-citosina. S'agita a temperatura ambient sota atmosfera inert durant 17 hores. Un cop acabada la reacció es filtra la resina i es renta bé amb DCM. S'elimina el dissolvent i el producte es purifica per cromatografia en gel de sílice (eluent: AcOEt/Hexà 1:1). S'obtenen 630 mg (1,07 mmol) de producte. El rendiment és del 63%. També s'han obtingut 100 mg (0,13 mmol) del producte de doble substitució (rendiment 8%).

Caracterització:

¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz): 11,4 (sa, NH), 10,4 (sa, NH), 8,20 (s, 1H, H uracil), 7,36 (sc, 5H, H de Z), 6,59 (t, 2 Hz, 1H, H resorcinol), 6,48(dd, 8 Hz, 2 Hz, 2H, H resorcinol), 5,06 (s, 2H, CH₂(Z)), 4,54 (s, 2H, CH₂ acetat), 3,80-3,50 (sc, 4H, 2xCH₂ Braç), 1,46 (s, 9H, 3xCH₃)

EM-MALDI-TOF(+): *m/z* 590,3 / 592,3 (*M*_{calc}: 588,5 / 590,5)

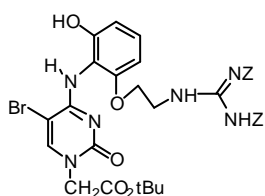
5.11.3. Síntesi de 5-bromo-[2-(N,N'-bis-Z-guanidino)etoxi-6-hidroxifenil]-N¹-(*tert*-butoxicarbonimetil)-citosina (**5b**) amb trifenilfosfina

A una dissolució freda (0°C) de 150 mg (0,36 mmol) de 5-bromo-(2,6-dihidroxifenil)-N¹-(*tert*-butoxicarbonimetil)-citosina (**4**), 149 mg (0,40 mmol) de braç i 143 mg (0,55 mmol) de trifenilfosfina en 5 mL de DCM anhidre se li afegeixen 67 µL (95 mg, 0,55 mmol) de DEAD. S'agita a temperatura ambient durant 17 hores. Es renta el cru amb aigua, s'asseca sobre Na₂SO₄, es filtra i s'evapora a sequedat. El cru es purifica per cromatografia en gel de sílice (eluent AcOEt/Hexà 1:1). S'obtenen 185 mg (0,24 mmol) de producte que està impurificat amb Ph₃PO però que s'utilitzarà així en la síntesi de del proper producte, el rendiment si el producte fos pur seria del 67%.

5.11.4. Síntesi de 5-bromo-[2-(N,N'-bis-Z-guanidino)etoxi-6-hidroxifenil]-N¹-(*tert*-butoxicarbonimetil)-citosina (**5b**) amb trifenilfosfina unida a suport sòlid

Es prepara una suspensió de 582 mg (1,75 mmol) de trifenilfosfina unida a suport polimèric, 214 µL (1,75 mmol) de DEAD, 480 mg (1,16 mmol) de 5-bromo-(2,6-dihidroxifenil)-N¹-(*tert*-butoxicarbonimetil)-citosina (**4**) i 648 mg (1,75 mmol) de braç guanidini en el mínim volum possible de DCM anhidre, per tal que es dissolguin el braç guanidini i el 5-bromo-(2,6-dihidroxifenil)-N¹-(*tert*-butoxicarbonimetil)-citosina. S'agita a temperatura ambient sota atmosfera inert durant 53 hores. Un cop acabada la reacció es filtra la resina i es renta bé amb DCM. S'elimina el dissolvent i el producte es purifica per cromatografia en gel de sílice (eluent: AcOEt). S'obtenen 300 mg (0,39 mmol) de producte. El rendiment és del 34%.

Caracterització:



Rf (AcOEt): 0,5

¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz): 11,6 (sa, NH), 8,65 (sa, NH), 8,25 (s, 1H, H uracil), 7,36 (sc, 13H, H de Z i resorcinol), 5,18 (s, 2H, CH₂(Z)), 5,11 (s, 2H, CH₂(Z)), 4,40 (s, 2H, CH₂ acetat), 3,80-3,40 (sc, 4H, 2xCH₂ Braç), 1,48 (s, 9H, 3xCH₃)

¹³C-RMN (CDCl₃, 50 MHz): 145,6 (C-H uracil), 127,7, 127,5, 127,4, 127,3, 127,3, 127,2, 127,0, 126,9, 126,8 (CH (Z)), 82,8 (Cq ^tBu), 67,2 (CH₂ (Z)), 66,0 (CH₂ (Z)), 61,0 (CH₂ braç (OH)), 49,6 (CH₂ acetat), 43,0 (CH₂ braç (NH)), 28,6 (CH₃ ^tBu)

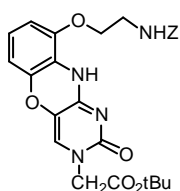
EM-MALDI-TOF(+): *m/z* 761,8 / 763,8 (*M*_{calc}: 765,7 / 766,7)

5.11.5. Síntesi de N¹-(*tert*-butoxicarbonimetil)-6-(N-Z-2-aminoetoxi)-fenoxazina (**7a**) per Mitsunobu sobre N¹-(*tert*-butoxicarbonimetil)-6-hidroxifenoxazina (**6**)

En una xeringa de polipropilè provista de disc filtrant de polietilè porós es prepara una suspensió de 480 mg (1,16 mmol) de N¹-(*tert*-butoxicarbonimetil)-6-hidroxifenoxazina (**6**), 389 mg (2 mmol) de N-Z-etanolamina, 665 mg (2 mmol) de trifenilfosfina polimèrica en 25 mL de DCM anhidre. Se li afegeixen 245 µL (348 mg, 2 mmol) de DEAD i s'agita durant 4 hores a temperatura ambient sota atmosfera d'argó. Un cop acabada la reacció es filtra, es renta bé la resina amb DCM i s'elimina el dissolvent. El producte es purifica per cromatografia en gel de sílice amb

AcOEt/Hexà (1:1) com a eluent. S'obtenen 271 mg (0,53 mmol) de producte. El rendiment ha estat del 40%.

Caracterització:

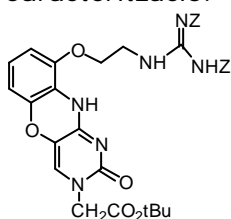


¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz): 11,6 (1H, NH), 10,4 (1H, NH), 7,58 (1H, s, H uracil), 7,36 (5H, m, Z), 6,85 (3H, m, C-H resorcinol), 5,10 (2H, s, CH₂ Z), 4,45 (2H, s, CH₂), 3,82-3,55 (4H, m, 2xCH₂ braç), 1,47 (9H, s, 3xCH₃); **¹³C-RMN** (CDCl₃, 50 MHz): 166,3 (COO), 156,3 (COO), 146,4 (C-H uracil), 136,4 (C-H resorcinol), 128,9, 128,8, 128,5, 128,4 (CH Z), 83,6 (Cq ^tBu), 66,7 (CH₂, Z), 62,2 (CH₂ braç), 50,7 (CH₂ braç), 43,5 (CH₂), 28,0 (CH₃); **EM-MALDI-TOF**(+, DHB): *m/z* 510,2 (*M*_{calc} per C₂₆H₂₈N₄O₇: 508,2)

5.11.6. Síntesi de N¹-(*tert*-butoxycarbonylmetil)-6-[2-(*N,N'*-bis-Z-guanidinoetoxi)]-fenoxazina (**7b**) per Mitsunobu sobre N¹-(*tert*-butoxycarbonylmetil)-6-hidroxifenoxazina (**6**)

En una xeringa de polipropilè provista de disc filtrant de polietilè porós es prepara una suspensió de 664 mg (2 mmol) de N¹-(*tert*-butoxycarbonylmetil)-6-hidroxifenoxazina (**6**), 1,11 g (3 mmol) de braç guanidino, 1 g (3 mmol) de trifenilfosfina polimèrica en 25 mL de DCM anhidre. Se li afegeixen 368 µL (523 mg, 3 mmol) de DEAD i s'agita durant 4 hores a temperatura ambient sota atmosfera d'argó. Un cop acabada la reacció es filtra, es renta bé la resina amb DCM i s'elimina el dissolvent. Es producte es purifica per cromatografia en gel de sílice amb AcOEt/Hexà (1:1) com a eluent. S'obtenen 540 mg (0,79 mmol) de producte. El rendiment ha estat del 39%.

Caracterització:



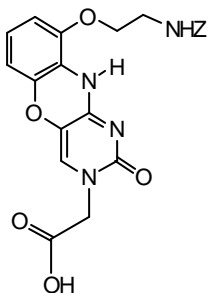
¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz): 11,5 (1H, NH), 8,63 (1H, NH), 7,73 (1H, s, H uracil), 7,34 (13H, m, Z+resorcinol), 5,18 (2H, s, CH₂, Z), 5,12 (2H, s, CH₂, Z), 4,37 (2H, s, CH₂), 3,82-3,40 (4H, m, 2xCH₂ braç), 1,47 (9H, s, 3xCH₃); **¹³C-RMN** (CDCl₃, 50 MHz): 130,8, 128,7, 128,1 (CH, Z), 65,5 (CH₂ Z), 61,7 (CH₂ braç), 29,7 (CH₃); **EM-MALDI-TOF**(+, DHB): *m/z* 682,7 (*M*_{calc} per C₃₅H₃₆N₆O₉: 684,3)

5.12. Desprotecció dels acetats

5.12.1. Síntesi de N¹-carboximetil-6-(*N*-Z-2-aminoetoxi)-fenoxazina (**8a**)

Es prepara una dissolució de 400 mg (0,79 mmol) de N¹-(*tert*-butoxycarbonylmetil)-6-(*N*-Z-2-aminoetoxi)-fenoxazina (**7a**) en 15 mL de DCM anh i se li afegeixen 2 mL de HCl 4N en dioxà. S'agita a temperatura ambient durant 16 hores. S'elimina el dissolvent parcialment i s'afegeix hexà. Precipita un sòlid que es filtra, es renta bé amb DCM i s'asseca. S'obtenen 340 mg (0,75 mmol) de producte. El rendiment ha estat del 95%.

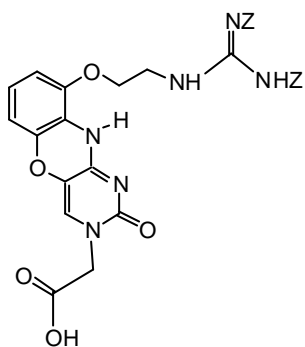
Caracterització:



¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz): 7,34 (6H, m, CH Z, CH uracil), 6,76 (3H, m, CH resorcinol), 5,10 (2H, s, CH₂ Z), 3,68 (2H, m, CH₂ braç), 3,34 (2H, m, CH₂ braç); **¹³C-RMN** (CDCl₃, 50 MHz): 157,0 (COO), 156,7 (CO), 136,3 (CH resorcinol), 128,4, 128,1, 127,6 (CH, Z), 66,9 (CH₂ Z), 62,2 (CH₂ braç), 43,5 (CH₂); **EM-MALDI-TOF**(+, DHB): *m/z* 453,5 (*M*_{calc} per C₂₂H₂₀N₄O₇: 452,1)

5.12.2. Síntesi de N¹-carboximetil-6-[2-(N,N'-bis-Z-guanidinoetoxi)]-fenoxazina (**8b**)

Es prepara una dissolució de 590 mg (0,86 mmol) de N¹-(*tert*-butoxicarbonilmetil)-6-[2-(N,N'-bis-Z-guanidinoetoxi)]-fenoxazina (**7b**) en 15 mL de DCM anh i se li afegeixen 8 mL de HCl 4N en dioxà. S'agita a temperatura ambient durant 17 hores. S'elimina el dissolvent parcialment i s'afegeix hexà. Precipita un sòlid que es filtra, es renta bé amb DCM i s'asseca. S'obtenen 530 mg (0,84 mmol) de producte. El rendiment ha estat del 98%.



Caracterització:

¹H-RMN (DMSO-d₆, 200 MHz): 11,0 (1H, NH), 8,79 (1H, NH), 7,86 (1H, s, H uracil), 7,37 (13H, sc, CH Z, CH resorcinol), 5,23 (2H, s, CH₂ Z), 5,16 (2H, s, CH₂ Z), 4,09-3,88 (4H, m, 2xCH₂ braç), 3,66 (2H, s, CH₂); **¹³C-RMN** (DMSO-d₆, 50 MHz): 130,8, 128,7, 128,1 (CH, Z), 65,5 (CH₂ Z), 61,7 (CH₂ Z); **EM-MALDI-TOF**(+, DHB): *m/z* 626,3 (M_{calc} per C₃₁H₂₈N₆O₉: 628,2)

6. SÍNTESI DELS MONÒMERS

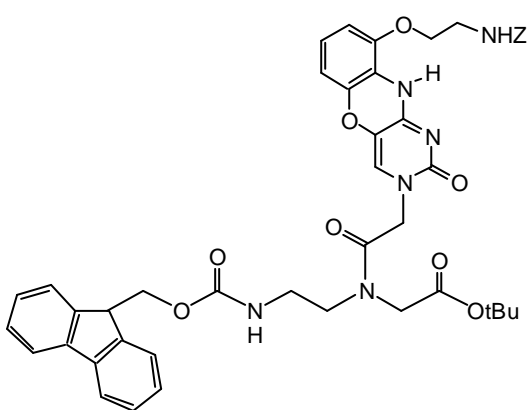
6.1. Síntesi del monòmer amino

6.1.1. Síntesi de *tert*-butil N-[2-(N-9-fluorenilmetoxycarbonil)aminoetil]-N-[carboximetil-6-N-Z-2-aminoetoxi]-fenoxazina]-glicinat (**9a**)

En primer lloc es prepara el Fmoc-AEG a partir de l'hydroclorur. Es dissol l'hydroclorur en DCM i es renta amb una dissolució aquosa saturada de NaHCO₃. S'asseca sobre Na₂SO₄, es filtra i es rotavapora fins que queda com un oli.

A una dissolució de 400 mg (1,2 mmol) de Fmoc-AEG en DMF anhidre a 0°C se li afegeixen 340 mg (0,75 mmol) de N¹-carboximetil-6-(N-Z-2-aminoetoxi)-fenoxazina (**8a**) seguit de 288 mg (1,5 mmol) de EDC. Es deixa que la solució arribi a temperatura ambient i s'agita durant 17 hores. El cru de reacció s'aboca sobre aigua-gel en agitació. Com que el precipitat format no es pot filtrar es fan rentats de la fase aquosa amb DCM, s'asseca la fase orgànica sobre Na₂SO₄, es rotavapora i es redissol en dioxà per a liofilitzar-lo. S'obtenen 390 mg (0,47 mmol) d'un sòlid blanc. El rendiment de la reacció és del 63%.

Caracterització:



¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz): 7,73 (2H, m, CH Fmoc), 7,61 (2H, d, J=7,5 Hz, CH Fmoc), 7,40-7,26 (13H, m, CH Z, CH Fmoc, CH uracil, CH resorcinol), 5,10 (2H, s, CH₂ Z), 4,39 (2H, d, J=7Hz, CH₂ Fmoc), 4,21 (1H, t, J=7 Hz, CH Fmoc), 3,96 (1H, t, J=6 Hz, H-1 aminoetilglicina), 3,69 (2H, m, CH₂ braç), 3,34 (2H, m, CH₂ braç), 3,29 (2H, s, H-2 aminoetilglicina), 2,74 (2H, t, J=5 Hz, H-3 aminoetilglicina), 1,47 (s, 9H, 3xCH₃); **¹³C-RMN** (CDCl₃, 50 MHz): 162,4 (COO), 156,8 (COO), 128,6 (CH, Z), 126,9 (CH, Z), 120,8 (CH, Fmoc), 119,6 (CH, Fmoc), 107,7 (CH, resorcinol), 83,0 (CH₂ Fmoc), 55,4 (CH₂,

aminoetilglicina), 42,9 (CH₂), 27,9 (CH₃); **EM-MALDI-TOF**(+, DHB): *m/z* 831,2 (M_{calc} per C₄₅H₄₆N₆O₁₀: 830,3).

6.1.2. Síntesi de N-[2-(N-9-fluorenilmetoxicarbonil)aminoetil]-N-[carboximetil-6-N-Z-2-aminoetoxi]-fenoxazina]-glicina (**10a**)

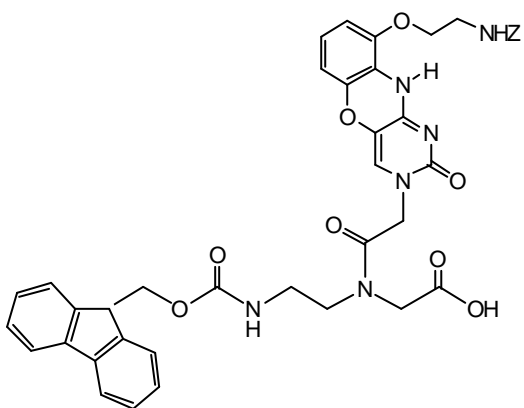
A una suspensió de 390 mg (0,47 mmol) de *tert*-butil N-[2-(N-9-fluorenilmetoxicarbonil)aminoetil]-N-[carboximetil-6-N-Z-2-aminoetoxi]-fenoxazina]-glicinat (**9a**) en 3 mL de DCM anhidre se li afegeixen 5 mL de TFA 100%. S'agita durant 30'a 0°C i després es deixa arribar a temperatura ambient i se segueix agitant durant 1 hora. Es concentra el cru de reacció fins a 1/5 del seu volum i s'afegeix el residu, gota a gota, sobre èter etílic anhidre en agitació. Es filtra el sòlid format. S'obtenen 74 mg (0,096 mmol) de producte. El rendiment ha estat del 20%.

A una suspensió de 438 mg (0,53 mmol) de *tert*-butil N-[2-(N-9-fluorenilmetoxicarbonil)aminoetil]-N-[carboximetil-6-N-Z-2-aminoetoxi]-fenoxazina]-glicinat (**9a**) en 2 mL de DCM se li afegeixen 4 mL de HCl 4N en dioxà. S'agita a temperatura ambient durant 15 hores. S'elimina el dissolvent parcialment i s'afegeix hexà. Precipita un sòlid que es filtra, es renta bé amb DCM i s'asseca. S'obtenen 91 mg (0,12 mmol) de producte. El rendiment ha estat del 22%.

A una suspensió de 371 mg (0,45 mmol) de *tert*-butil N-[2-(N-9-fluorenilmetoxicarbonil)aminoetil]-N-[carboximetil-6-N-Z-2-aminoetoxi]-fenoxazina]-glicinat (**9a**) en 3 mL de DCM anhidre se li afegeixen 2 mL de TFA 100%. S'agita durant 30'a 0°C i després es deixa arribar a temperatura ambient i se segueix agitant durant 1 hora. Es concentra el cru de reacció fins a 1/5 del seu volum i s'afegeix el residu, gota a gota, sobre èter etílic anhidre en agitació. Es filtra el sòlid format. S'obtenen 80 mg (0,1 mmol) de producte. El rendiment ha estat del 23%.

A una suspensió de 530 mg (0,64 mmol) de *tert*-butil N-[2-(N-9-fluorenilmetoxicarbonil)aminoetil]-N-[carboximetil-6-N-Z-2-aminoetoxi]-fenoxazina]-glicinat (**9a**) en 1 mL de DCM anhidre se li afegeixen 5 mL de TFA 100%. S'agita durant 30'a 0°C i després es deixa arribar a temperatura ambient i se segueix agitant durant 30 minuts. S'afegeix el cru, gota a gota, sobre èter etílic anhidre en agitació. Es filtra el sòlid format. S'obtenen 220 mg (0,28 mmol) de producte. El rendiment ha estat del 45%.

Caracterització:



¹H-RMN (DMSO-*d*₆, 200 MHz): 7,74 (2H, m, CH Fmoc), 7,62 (2H, d, 7,5Hz, CH Fmoc), 7,40-7,25 (13H, m, CH Z, CH Fmoc, CH uracil, CH Resorcinol), 5,09 (2H, s, CH₂ Z), 4,37 (2H, d, 7Hz, CH₂ Fmoc), 4,22 (1H, t, 7Hz, CH Fmoc), 3,97 (1H, t, 6Hz, H-1 aminoetilglicina), 3,69 (2H, m, CH₂ braç), 3,32 (2H, m, CH₂ braç), 3,28 (2H, s, H-2 aminoetilglicina), 2,73 (2H, t, 5Hz, H-3 aminoetilglicina); **¹³C-RMN** (DMSO-*d*₆, 50 MHz): 162,4 (COO), 156,8 (COO), 128,6 (CH, Z), 126,9 (CH, Z), 120,8 (CH, Fmoc), 119,6 (CH, Fmoc), 107,7 (CH, resorcinol),

83,0 (CH₂ Fmoc), 55,4 (CH₂, aminoetilglicina), 42,9 (CH₂, aminoetilglicina); **EM-MALDI-TOF** (+, DHB): *m/z*: 774,6 (*M*_{calc} per C₄₁H₃₈N₆O₁₀: 774,3)

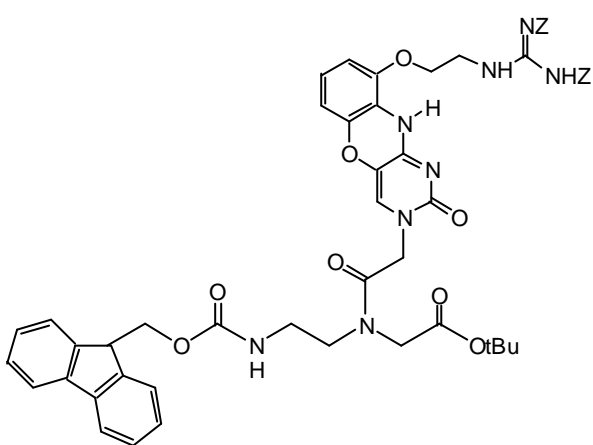
6.2. Síntesi del monòmer guanidino

6.2.1. Síntesi de *tert*-butil N-[2-(N-9-fluorenilmetoxicarbonil)aminoetil]-N-[carboximetil-6-[2-N,N'-bis-Z-guanidinoetoxi]-fenoxazina]-glicinat (**9b**)

En primer lloc es prepara el Fmoc-AEG a partir de l'hidroclorur. Es dissol l'hidroclorur en DCM i es renta amb una dissolució aquosa saturada de NaHCO₃. S'asseca sobre Na₂SO₄, es filtra i es rotavapora fins que queda com un oli.

A una dissolució de 333 mg (0,76 mmol) de Fmoc-AEG en DMF anhidre a 0°C se li afegeixen 530 mg (0,84 mmol) de N¹-carboximetil-6-[2-(N,N'-bis-Z-guanidinoetoxi)]-fenoxazina (**8b**) seguit de 322 mg (1,68 mmol) de EDC. Es deixa que la solució arribi a temperatura ambient i s'agita durant 5 dies. El cru de reacció s'aboca sobre aigua-gel en agitació. El producte s'aïlla per filtració. S'obtenen 600 mg (0,60 mmol) de producte, el rendiment ha estat del 71%.

Caracterització:



¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz): 7,74 (2H, m, CH Fmoc), 7,61 (2H, d, 7Hz, CH, Fmoc), 7,38-7,26 (17H, m, CH Z, CH Fmoc, CH uracil, CH resorcinol), 5,26 (2H, s, CH₂ Z), 5,15 (2H, s, CH₂ Z), 4,36 (2H, m, CH₂ Fmoc), 4,23 (1H, t, 7Hz, CH Fmoc), 3,89 (2H, m, H-1 aminoetilglicina), 3,66 (4H, m, 2xCH₂ braç), 3,27 (2H, m, H-2 aminoetilglicina), 2,75 (2H, m, H-3 aminoetilglicina), 1,47 (s, 9H, 3xCH₃);

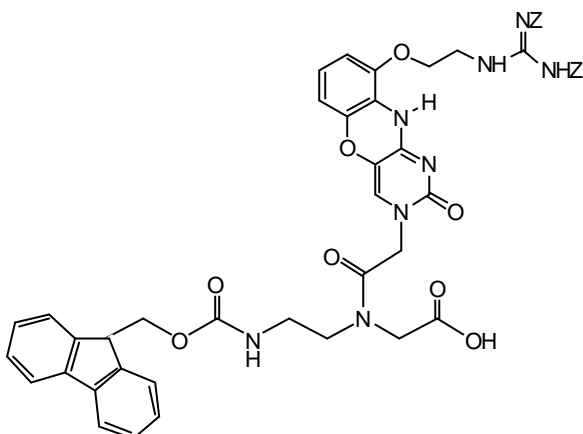
¹³C-RMN (CDCl₃, 50 MHz): 162,5 (COO), 156,9 (COO), 143,9 (CH, uracil), 141,2 (CH, Fmoc), 140,0 (CH,

Fmoc), 137,9 (CH, Fmoc), 136,4 (CH Fmoc), 128,6 (CH, Z), 128,4 (CH, Z), 128,0 (CH, Z), 127,6 (CH, Z), 126,9 (CH, Z), 125,0 (CH, Fmoc), 120,9 (CH, Fmoc), 119,8 (CH, Fmoc), 107,7 (CH, resorcinol), 97,1 (Cq, uracil), 81,5 (CH₂ Fmoc), 66,7 (CH₂ Z), 47,2 (CH₂, aminoetilglicina), 28,1 (CH₃); **EM-MALDI-TOF**(+, DHB): *m/z*: 1005,1 (M_{calc} per C₅₄H₅₄N₈O₁₂: 1006,4)

6.2.2. Síntesi de N-[2-(N-9-fluorenilmetoxicarbonil)aminoetil]-N-[carboximetil-6-[2-N,N'-bis-Z-guanidinoetoxi]-fenoxazina]-glicina (**10b**)

A una suspensió de 146 mg (0,15 mmol) de *tert*-butil N-[2-(N-9-fluorenilmetoxicarbonil)aminoetil]-N-[carboximetil-6-[2-N,N'-bis-Z-guanidinoetoxi]-fenoxazina]-glicinat (**9b**) en 2 mL de DCM anhidre se li afegeixen 4 mL de TFA 100%. S'agita durant 30 minuts a 0°C i després es deixa arribar a temperatura ambient i se segueix agitant durant 90 minuts. Es concentra el cru de reacció fins a 1/5 del seu volum i s'afegeix el residu, gota a gota, sobre èter etílic anhidre en agitació. Es filtra el sòlid format. S'obtenen 114 mg (0,12 mmol) de producte. El rendiment de la reacció ha estat del 83%.

Caracterització:



¹H-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz): 7,92 (2H, m, Fmoc), 7,69 (2H, d, 7Hz, Fmoc), 7,38-7,25 (14H, m, CH Z, CH Fmoc, CH uracil), 6,89 (1H, m, resorcinol), 6,59 (1H, m, resorcinol), 6,47 (1H, m, resorcinol), 5,14 (2H, s, CH₂ Z), 5,10 (2H, s, CH₂ Z), 4,37 (2H, m, CH₂ Fmoc), 4,24 (1H, m, CH Fmoc), 3,91 (2H, s, CH₂), 3,04 (2H, m, H-2 aminoetilglicina), 2,78 (2H, m, H-3 aminoetilglicina); **¹³C-RMN** (DMSO-d₆, 75 MHz): 168,8 (COO), 144,5 (CH, uracil), 141,5 (CH, Fmoc), 128,4 (CH, Z), 127,8 (CH, Z), 127,3 (CH, Z), 125,8 (CH, Fmoc), 120,8

(CH, Fmoc), 117,6 (CH, Fmoc), 102,2 (CH, resorcinol), 81,3 (CH₂ Fmoc), 75,6 (CH, Fmoc), 68,4 (CH₂, aminoetilglicina), 66,3 (CH₂, aminoetilglicina), 47,4 (CH₂, aminoetilglicina); **EM-MALDI-TOF**(+, DHB): *m/z*: 948,9 (*M*_{calc} per C₅₀H₄₆N₈O₁₂: 950,3).

CAPÍTOL 3: SÍNTESI DE PNA's I ESTUDI DE L'ESTABILITAT DELS DÚPLEXS PNA-DNA

1. SÍNTESI DE PNA

1.1. Procediment general de síntesi

La síntesi té lloc en un reactor de vidre provist d'un fritat. Com a suport polimèric s'empra un co-polímer de polietilenglicol-poliestirè amb el grup espaiador Fmoc-XAL (Fmoc-XAL-PEG-PS), de funcionalitat 0,16 mmol/g. La resina i els monòmers s'adquireixen a Applied Biosystems. La resta de reactius utilitzats són:

- HATU: PerSeptive Biosystems
- m-cresol: J.T. Baker
- DCM: Merck
- DMF, 2,6-lutidina, DIEA, NMP, TFA, Et₂O d'Aldrich

Els monòmers de PNA tenen el grup amino de l'aminoetilglicina protegit amb el grup Fmoc i els aminos exocíclics de les nucleobases protegits amb el grup benzhidriloxicarbonil (Bhoc).

Per a eliminar el grup Fmoc es tracta la resina (2x10 min) amb piperidina al 20% en DMF i es renta amb DMF, DCM i DMF. La solució d'acoblament es prepara amb 4 equivalents de monòmer (0,1 M en NMP), 3,6 equivalents d'HATU (en DMF), 4,4 equivalents de DIEA i 4,4 equivalents de 2,6-lutidina. Després d'una pre-activació de 2 minuts, s'afegeix aquesta dissolució a la resina i es deixa reaccionar durant 45 minuts a temperatura ambient amb agitació continua. A continuació es renta la resina amb DMF, DCM i DMF. Es bloquegen els grups amino que no han reaccionat per tractament amb anhídrid acètic al 5% i lutidina al 6% en DMF, durant 5 minuts. Es renta bé la resina amb DMF, DCM i DMF i es torna a repetir el cicle de síntesi. A la següent taula queden recollides les diferents etapes de la síntesi manual de PNA.

Etapa	Temps
Eliminació de Fmoc	2x10'
Rentats amb DMF	3x2'
Rentats amb DCM	3x2'
Rentats amb DMF	3x2'
Acoblament	45'
Rentats amb DMF	3x2'
Rentats amb DCM	3x2'
Rentats amb DMF	3x2'
"capping"	5'
Rentats amb DMF	3x2'
Rentats amb DCM	3x2'
Rentats amb DMF	3x2'

Un cop sintetitzat l'oligòmer desitjat, es procedeix a desancorar-lo de la resina i a desprotegir els grups amino exocíclics de les nucleobases. Per a això, es realitza un tractament amb TFA:m-cresol (19:1) durant 5 minuts a temperatura ambient. S'utilitzen 200 µL de cocktail de desancoratge per cada 10 mg de resina. Un cop acabat el tractament s'afegeix la solució àcida a èter etílic fred. Se centrifuga la suspensió, es decanta l'èter i es resuspen el pellet en èter etílic fresc. Es torna a centrifugar i a decantar l'èter. Es repeteix el procediment de rentat. S'asseca el pellet i es resuspen en H₂O (0,1% TFA).

1.2. Síntesi de PNA1

La seqüència H-aatgcatgtc-NH₂ s'ha sintetitzat seguint el cicle general de síntesi de PNA en una escala de 5 µmol. El rendiment promig dels acoblaments ha estat del

96%. El cru desancorat de la resina es purifica per HPLC en fase reversa fent servir un gradient de 0→30% en 40 minuts. El producte obtingut es caracteritza per espectrometria de masses MALDI-TOF (+, àcid sinapínic): $m/z = 2748,5$ (M_{calc} per a $C_{109}H_{136}N_{58}O_{30} = 2745,09$).

1.3. Síntesi de PNA2

La seqüència H-acagcgcgga-NH₂ s'ha sintetitzat seguint el cicle general de síntesi de PNA en una escala de 5 µmol. El rendiment promig dels acoblaments ha estat del 95%. El cru desancorat de la resina es purifica per HPLC en fase reversa fent servir un gradient de 0→30% en 40 minuts. El producte obtingut es caracteritza per espectrometria de masses MALDI-TOF (+, àcid sinapínic): $m/z = 2852,7$ (M_{calc} per a $C_{110}H_{132}N_{69}O_{27} = 2850,65$).

1.4. Síntesi de PNA3

La seqüència H-atgtcacagg-NH₂ s'ha sintetitzat seguint el cicle general de síntesi de PNA en una escala de 5 µmol. El rendiment promig dels acoblaments ha estat del 97%. El cru desancorat de la resina es purifica per HPLC en fase reversa fent servir un gradient de 0→30% en 40 minuts. El producte obtingut es caracteritza per espectrometria de masses MALDI-TOF (+, àcid sinapínic): $m/z = 2751,7$ (M_{calc} per a $C_{108}H_{135}N_{61}O_{29} = 2750,10$).

1.5. Síntesi de PNA5

La seqüència H-atgtctcagg-NH₂ s'ha sintetitzat seguint el cicle general de síntesi de PNA en una escala de 5 µmol. El rendiment promig dels acoblaments ha estat del 97%. El cru desancorat de la resina es purifica per HPLC en fase reversa fent servir un gradient de 0→50% en 15 minuts. El producte obtingut es caracteritza per espectrometria de masses MALDI-TOF (+, àcid sinapínic): $m/z = 2743,0$ (M_{calc} per a $C_{108}H_{136}N_{58}O_{31} = 2741,10$).

2. SÍNTESI DE PNA INCORPORANT LES ABRAÇADORES DE GUANINA

La síntesi té lloc seguint el mateix esquema de síntesi general que en el cas de les nucleobases naturals. El temps d'acoblament dels monòmers modificats és de 1 hora. El desancoratge i la desprotecció de les nucleobases té lloc per un tractament amb un cocktail que conté 100 µL de dissolució A (100 µL de TFA + 300 µL de DMS + 100 µL de m-cresol) i 100 µL de dissolució B (450 µL de TFA + 50 µL de TFMSA) per cada 10 mg de resina, durant 1 hora a temperatura ambient. Un cop acabat el tractament s'afegeix la solució àcida a èter etílic fred. Se centrifuga la suspensió, es decanta l'èter i es resuspen el pellet en èter etílic fresc. Es torna a centrifugar i a decantar l'èter. Es repeteix el procediment de rentat. S'asseca el pellet i es resuspen en H₂O (0,1% TFA). La caracterització té lloc per EM-MALDI-TOF (+, àcid sinapínic).

Els oligòmers sintetitzats han estat:

Oligòmer	Seqüència	Massa obtinguda	Massa teòrica
PNA1a	H-aatgc ^a atgtc ^a -NH ₂	3011,7	3011,91
PNA1g	H-aatgc ^g atgtc ^g -NH ₂	3077,0	3075,24
PNA3a	H-atgtc ^a acagg-NH ₂	2918,3	2918,13
PNA5a	H-atgtc ^a tcagg-NH ₂	2852,7	2853,77

3. SÍNTESI DE DNA5

S'utilitza CPG com a suport. Es parteix d'una columna preparada per a la síntesi en l'escala de 0,2 μmol funcionalitzada amb un nucleòsid T i a partir d'aquest es dona l'elongació, el programa de síntesi utilitzat és ssce102a (veure l'annex). La síntesi es realitza automàticament seguint el següent protocol:

Etapa	Dissolvents i reactius	Temps (s)
1. Rentats	ACN	1x20
2. Eliminació de DMT	3% TCA/DCM	5x10
3. Rentats	ACN	3x30 1x60
4. Acoblament	4.7 M fosforamidit en ACN anh + 0,5 M tetrazole en ACN anh	1x30
5. Rentats	ACN	1x15
6. Acetilació	Ac ₂ O/NMI	1x1
7. Rentats	ACN	3x10
8. Oxidació	^t BuOOH/DCM 1M	1x30
9. Rentats	ACN	1x20 2x10

La reacció d'elongació té un rendiment promig per etapa del 98%, i el rendiment global és del 83%. S'obtenen 0,17 μmol de cadenes. A continuació, es desprotegeixen els grups fosfat i es dona el desancorament per tractament amb NH₃ al 33% a temperatura ambient durant 1 hora. Per tal de desprotegir les bases es tracta el cru obtingut amb al 33% a 55°C durant 12 hores. Es disposa de 1,7 OD₂₆₀ de cru per a purificar per HPLC.

Es purifica el producte per HPLC. S'obtenen 1,1 OD₂₆₀ de producte de puresa del 98% això suposa un rendiment de purificació del 65%.

L'oligonucleòtid obtingut es caracteritza per espectrometria de masses de MALDI-TOF, donant una massa de 3181,5 (massa calculada per a C₁₀₀H₁₁₉N₄₁O₆₃P₉: 3179,43).

4. SÍNTESI DE PNA EN MICROONES CONVENCIONAL MULTIMODE

Els acoblaments es realitzen en un microones Panasonic 1200W (Model NN-L731WF). Les reaccions s'han dut a terme en els mateixos reactors utilitzats en la síntesi convencional de PNA. La resta de les etapes de la síntesi ("capping" i eliminació de grups Fmoc) s'han realitzat a temperatura ambient.

4.1 Procediment general de síntesi

La resina Fmoc-XAL-PEG-PS es renta amb DMF i DCM. Es realitza un tractament d'eliminació del grup protector Fmoc amb pip/DMF (20%) (2x10 min). A continuació es renta bé la resina amb DMF, DCM i DMF. A una solució 0,1 N de monòmer en NMP (4 equivalents) se li afegeixen 4,4 equivalents de lutidina, 4,4 equivalents de DIEA i 3,6 equivalents d'HATU dissolts en el mínim volum possible DMF. Després de 3 minuts de pre-activació s'afegeix aquesta solució a la resina. S'introdueix el reactor en el microones i es procedeix amb els diferents tractaments de 30 segons a les corresponents potències. Després de cada tractament es retira el reactor del microones i s'agita el contingut. Un cop acabat l'acoblament es renta bé la resina amb DMF, DCM i DMF i es procedeix amb la següent etapa de síntesi.

Un cop ancorats tots els monòmers es realitza l'etapa de desancoratge de l'oligòmer, per tractament de la resina amb una solució de TFA:m-cresol (19:1) durant 5 minuts

a temperatura ambient. S'utilitzen 200 µL de cocktail de desancoratge per cada 10 mg de resina. Un cop acabat el tractament s'afegeix la solució àcida a èter etílic fred. Se centrifuga la suspensió, es decanta l'èter i es resuspen el pellet en èter etílic fresc. Es torna a centrifugar i a decantar l'èter. Es repeteix el procediment de rentat. S'asseca el pellet i es resuspen en H₂O (0,1% TFA).

4.2. Síntesis del dímer H-ct-NH₂

Experiment	Temps	Potència	Rendiment	HPLC
Convencional	45'	---	94%	86%
1	1,25'	100%	74%	41%
2	4x30"	50%	86%	31%
3	6x30"	50%	88%	57%
4	8x30"	50%	22%	---
5	6x30"	10%	91%	77%
6	6x30"	30%	92%	84%

4.3. Síntesis del dímer H-ga-NH₂

Experiment	Temps	Potència	Rendiment	HPLC
Convencional	45'	---	93%	65%
1	6x30"	10%	96%	88%
2	6x30"	30%	91%	70%
3	8x30"	50%	40%	40%

5. SÍNTESIS DE PNA EN MICROONES MONOMODAL

5.1. Procediment general de síntesi

La resina Fmoc-XAL-PEG-PS es renta amb DMF i DCM. Es realitza un tractament d'eliminació del grup protector Fmoc amb pip/DMF (20%) (2x10 min). A continuació es renta bé la resina amb DMF, DCM i DMF. Es transfereix al reactor del microones. Es prepara la solució d'acoblament amb 4 equivalents de monòmer, 3,6 equivalents d'HATU, 4,4 equivalents de DIEA i 4,4 equivalents de lutidina. Després de 2 minuts de pre-activació s'afegeix la dissolució a la resina, es tapa el vial i el cru es irradiat en la cavitat del microones. A continuació, es transfereix la resina a un reactor equipat amb un fritat, es renta amb DMF, DCM i DMF i es repeteix l'etapa de desprotecció per a procedir amb un nou cicle de síntesi. El rendiment dels acoblaments es calcula mesurant l'absorbància dels grups Fmoc eliminats. El desancoratge de la resina i l'eliminació dels grups protectors Bhoc es dona per tractament amb TFA:m-cresol (19:1) durant 5 minuts a temperatura ambient. El cocktail de desancoratge s'afegeix a èter fred, se centrifuga durant cinc minuts, el solvent es decanta i el pellet es renta amb èter fresc.

5.2. Síntesi de H-ct-NH₂

EM-MALDI-TOF(+, àcid sinapínic): m/z : 535,14 (M_{calc} : 534,23)

ct1: síntesi realitzada sobre 10 mg de resina, amb acoblament de 120 s a 60°C. [monòmer] = 0,1M en NMP, [HATU] = 0,06 M en DMF. Co-solvent: 400 µL de DMF.

ct2: síntesi realitzada sobre 10 mg de resina, amb acoblament de 120 s a 60°C. [monòmer] = 0,1M en NMP, [HATU] = 0,06 M en DMF. Co-solvent: 400 µL de DMI.

ct3: síntesi realitzada sobre 10 mg de resina, amb acoblament de 240 s a 60°C. [monòmer] = 0,1M en NMP, [HATU] = 0,06 M en DMF. Co-solvent: 400 µL de DMF.

ct4: síntesi realitzada sobre 10 mg de resina, amb acoblament de 240 s a 60°C.

[monòmer] = 0,1M en NMP, [HATU] = 0,06 M en DMF. Co-solvent: 400 µL de DMI.

ct5: síntesi realitzada sobre 10 mg de resina, amb acoblament de 180 s a 60°C.

[monòmer] = 0,1M en NMP, [HATU] = 0,06 M en DMF. Co-solvent: 400 µL de DMI.

ct6: síntesi realitzada sobre 10 mg de resina, amb acoblament de 300 s a 60°C.

[monòmer] = 0,1M en NMP, [HATU] = 0,06 M en DMF. Co-solvent: 400 µL de DMI.

ct7: síntesi realitzada sobre 10 mg de resina, amb acoblament de 240 s a 70°C.

[monòmer] = 0,1M en NMP, [HATU] = 0,06 M en DMF. Co-solvent: 400 µL de DMI.

5.3. Síntesi de H-at-NH₂

EM-MALDI-TOF(+, acid sinapínic): *m/z*: 559,33 (M_{calc} per C₂₂H₃₀N₁₂O₆ : 558,24)

at3: síntesi realitzada sobre 10 mg de resina, amb acoblament de 180 s a 60°C.

[monòmer] = 0,1M en NMP, [HATU] = 0,06 M en DMF. Co-solvent: 400 µL de DMI.

at4: síntesi realitzada sobre 10 mg de resina, amb acoblament de 240 s a 60°C.

[monòmer] = 0,1M en NMP, [HATU] = 0,06 M en DMF. Co-solvent: 400 µL de DMI.

at5: síntesi realitzada sobre 10 mg de resina, amb acoblament de 300 s a 60°C.

[monòmer] = 0,1M en NMP, [HATU] = 0,06 M en DMF. Co-solvent: 400 µL de DMI.

at6: síntesi realitzada sobre 10 mg de resina, amb acoblament de 240 s a 60°C amb

8 eq de monòmer, 7,2 eq d'HATU, 8,8 eq de lutidina i 8,8 eq de DIEA. [monòmer] = 0,1M en NMP, [HATU] = 0,06 M en DMF. Co-solvent: 300 µL de DMI.

at7: síntesi realitzada sobre 10 mg de resina, amb acoblament de 240 s a 70°C.

[monòmer] = 0,1M en NMP, [HATU] = 0,06 M en DMF. Co-solvent: 400 µL de DMI.

at8: síntesi realitzada sobre 10 mg de resina, amb acoblament de 180 s a 60°C.

[monòmer] = 0,1M en DMI, [HATU] = 0,06 M en DMI. Co-solvent: 400 µL de DMI.

at9: síntesi realitzada sobre 10 mg de resina, amb acoblament de 240 s a 60°C.

[monòmer] = 0,1M en DMI, [HATU] = 0,06 M en DMI. Co-solvent: 400 µL de DMI.

at10: síntesi realitzada sobre 10 mg de resina, amb acoblament de 300 s a 60°C.

[monòmer] = 0,1M en DMI, [HATU] = 0,06 M en DMI. Co-solvent: 400 µL de DMI.

at11: síntesi realitzada sobre 10 mg de resina, amb acoblament de 180 s a 70°C.

[monòmer] = 0,1M en DMI, [HATU] = 0,06 M en DMI. Co-solvent: 400 µL de DMI.

at12: síntesi realitzada sobre 10 mg de resina, amb acoblament de 240 s a 70°C.

[monòmer] = 0,1M en DMI, [HATU] = 0,06 M en DMI. Co-solvent: 400 µL de DMI.

at13: síntesi realitzada sobre 80 mg de resina, amb acoblament de 240 s a 60°C.

[monòmer] = 0,1M en DMI, [HATU] = 0,37 M en DMI.

5.4. Síntesi de H-acgt-NH₂

Síntesi realitzada amb 20 mg de resina, amb acoblaments de 240 s a 60°C.

[monòmer] = 0,1 M en NMP, [HATU] = 0,06 M en DMI. Co-solvent: 200 µL de DMI.

EM-MALDI-TOF(+, àcid sinapínic): *m/z*: 1102,25 (M_{calc} per C₄₃H₅₅N₂₃O₁₃: 1101,43).

5.5. Síntesi de H-atgtgacagg-NH₂ (PNA4)

Síntesi realitzada amb 100 mg de resina, amb acoblaments de 240 s a 60°C.

[monòmer] = 0,1 M en DMI, [HATU] = 0,37 M en DMI. EM-MALDI-TOF(+, àcid

sinapínic): *m/z*: 2790,7 (M_{calc} per C₁₀₉H₁₃₅N₆₃O₂₉: 2790,1).

ANNEX

Programa de síntesi MSPEGPSM:

STEP NUMBER	FUNCTION # NAME	STEP TIME	STEP ACTIVE FOR BASES							SAFE STEP
			A	G	C	T	5	6	7	
1	83 #13 To Waste	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
2	15 #13 To Column	45	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
3	2 Reverse Flush	45	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
4	28 Phos Prep	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
5	+45 Group 1 On	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
6	90 TET to column	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
7	19 B+TET To Col 1	25	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
8	-46 Group 1 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
9	4 Wait	900	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
10	10 #18 To Waste	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
11	9 #18 To Column	30	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
12	2 Reverse Flush	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
13	16 Cap Prep	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
14	+45 Group 1 On	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
15	22 Cap To Col 1	30	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
16	-46 Group 1 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
17	4 Wait	120	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
18	10 #18 To Waste	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
19	9 #18 To Column	45	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
20	2 Reverse Flush	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
21	81 #15 To Waste	7	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
22	13 #15 To Column	30	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
23	4 Wait	60	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
24	18 #16 To Waste	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
25	12 #16 To Column	60	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
26	2 Reverse Flush	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
27	30 #17 To Waste	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
28	11 #17 To Column	60	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
29	2 Reverse Flush	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
30	10 #18 To Waste	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
31	9 #18 To Column	30	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
32	2 Reverse Flush	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
33	9 #18 To Column	30	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
34	2 Reverse Flush	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
35	33 Cycle Entry	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
36	10 #18 To Waste	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
37	9 #18 To Column	20	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
38	2 Reverse Flush	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
39	6 Waste-Port	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
40	5 Advance FC	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
41	82 #14 To Waste	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
42	14 #14 To Column	120	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
43	1 Block Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
44	10 #18 To Waste	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
45	9 #18 To Column	200	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
46	2 Reverse Flush	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
47	1 Block Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
48	7 Waste-Bottle	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
49	30 #17 To Waste	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
50	11 #17 To Column	30	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
51	2 Reverse Flush	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
52	10 #18 To Waste	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
53	9 #18 To Column	20	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
54	2 Reverse Flush	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes

Programa de síntesi CGPBEAC1:

STEP NUMBER	FUNCTION # NAME	STEP TIME	STEP ACTIVE FOR BASES							SAFE STEP
			A	G	C	T	5	6	7	
1	10 #18 To Waste	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
2	9 #18 To Column	60	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
3	2 Reverse Flush	20	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
4	1 Block Flush	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
5	28 Phos Prep	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
6	+45 Group 1 On	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
7	90 TET to column	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
8	19 B+TET To Col 1	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
9	90 TET to column	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
10	19 B+TET To Col 1	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
11	90 TET to column	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
12	19 B+TET To Col 1	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
13	90 TET to column	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
14	-46 Group 1 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
15	4 Wait	45	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
16	2 Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
17	1 Block Flush	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
18	10 #18 To Waste	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
19	9 #18 To Column	45	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
20	2 Reverse Flush	15	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
21	81 #15 To Waste	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
22	13 #15 To Column	20	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
23	10 #18 To Waste	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
24	4 Wait	60	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
25	10 #18 To Waste	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
26	9 #18 To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
27	2 Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
28	9 #18 To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
29	2 Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
30	9 #18 To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
31	2 Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
32	1 Block Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
33	16 Cap Prep	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
34	10 #18 To Waste	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
35	2 Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
36	1 Block Flush	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
37	+45 Group 1 On	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
38	22 Cap To Col 1	30	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
39	-46 Group 1 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
40	4 Wait	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
41	10 #18 To Waste	7	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
42	2 Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
43	1 Block Flush	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
44	10 #18 To Waste	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
45	9 #18 To Column	20	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
46	2 Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
47	9 #18 To Column	20	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
48	2 Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
49	1 Block Flush	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
50	33 Cycle Entry	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
51	10 #18 To Waste	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
52	9 #18 To Column	20	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
53	2 Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
54	1 Block Flush	6	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
55	6 Waste-Port	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
56	5 Advance FC	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
57	82 #14 To Waste	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
58	14 #14 To Column	60	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
59	1 Block Flush	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
60	10 #18 To Waste	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
61	9 #18 To Column	120	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
62	2 Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
63	1 Block Flush	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
64	7 Waste-Bottle	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes

Programa de síntesi: MSPEGPST:

STEP NUMBER	FUNCTION # NAME	STEP TIME	STEP ACTIVE FOR BASES							SAFE STEP
			A	G	C	T	5	6	7	
1	83 #13 To Waste	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
2	15 #13 To Column	45	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
3	2 Reverse Flush	45	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
4	28 Phos Prep	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
5	+45 Group 1 On	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
6	90 TET to column	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
7	19 B+TET To Col 1	25	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
8	-46 Group 1 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
9	4 Wait	900	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
10	10 #18 To Waste	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
11	9 #18 To Column	30	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
12	2 Reverse Flush	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
13	83 #13 To Waste	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
14	15 #13 To Column	25	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
15	2 Reverse Flush	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
16	81 #15 To Waste	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
17	13 #15 To Column	30	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
18	10 #18 To Waste	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
19	4 Wait	120	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
20	2 Reverse Flush	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
21	10 #18 To Waste	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
22	9 #18 To Column	45	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
23	2 Reverse Flush	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
24	18 #16 To Waste	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
25	12 #16 To Column	60	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
26	2 Reverse Flush	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
27	10 #18 To Waste	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
28	9 #18 To Column	45	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
29	2 Reverse Flush	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
30	16 Cap Prep	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
31	+45 Group 1 On	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
32	22 Cap To Col 1	30	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
33	-46 Group 1 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
34	4 Wait	120	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
35	10 #18 To Waste	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
36	9 #18 To Column	45	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
37	2 Reverse Flush	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
38	30 #17 To Waste	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
39	11 #17 To Column	30	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
40	2 Reverse Flush	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
41	10 #18 To Waste	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
42	9 #18 To Column	30	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
43	2 Reverse Flush	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
44	9 #18 To Column	30	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
45	2 Reverse Flush	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
46	33 Cycle Entry	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
47	10 #18 To Waste	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
48	9 #18 To Column	20	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
49	2 Reverse Flush	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
50	6 Waste-Port	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
51	5 Advance FC	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
52	82 #14 To Waste	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
53	14 #14 To Column	120	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
54	1 Block Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
55	10 #18 To Waste	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
56	9 #18 To Column	200	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
57	2 Reverse Flush	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
58	1 Block Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
59	7 Waste-Bottle	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
60	30 #17 To Waste	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
61	11 #17 To Column	30	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
62	2 Reverse Flush	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
63	10 #18 To Waste	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
64	9 #18 To Column	20	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
65	2 Reverse Flush	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes

Programa de síntesi ssce102a:

STEP NUMBER	FUNCTION & NAME	STEP TIME	STEP ACTIVE FOR BASES							SAFE STEP
			B	G	C	T	S	6	7	
1	10 #18 To Waste	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
2	9 #18 To Column	60	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
3	2 Reverse Flush	20	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
4	-1 Block Flush	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
5	28 Phos Prep	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
6	+45 Group 1 On	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
7	.90 TET to column	2	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
8	.19 #1TET To Col 1	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
9	-90 TET to column	2	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
10	.19 #1TET To Col 1	2	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
11	-46 Group 1 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
12	9 #18 To Column	2	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
13	4 Wait	30	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
14	16 Cap Prep	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
15	10 #18 To Waste	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
16	2 Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
17	1 Block Flush	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
18	+45 Group 1 On	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
19	22 Cap To Col 1	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
20	-46 Group 1 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
21	4 Wait	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
22	10 #18 To Waste	7	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
23	2 Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
24	1 Block Flush	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
25	01 #15 To Waste	7	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
26	13 #15 To Column	15	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
27	4 Wait	30	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
28	10 #18 To Waste	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
29	2 Reverse Flush	20	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
30	1 Block Flush	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
31	9 #18 To Column	20	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
32	2 Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
33	9 #18 To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
34	2 Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
35	9 #18 To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
36	2 Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
37	9 #18 To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
38	2 Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
39	1 Block Flush	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
40	33 Cycle Entry	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
41	10 #18 To Waste	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
42	9 #18 To Column	20	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
43	2 Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
44	1 Block Flush	6	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
45	6 Waste-Port	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
46	5 Advance FC	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
47	02 #14 To Waste	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
48	14 #14 To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
49	2 Reverse Flush	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
50	14 #14 To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
51	2 Reverse Flush	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
52	14 #14 To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
53	2 Reverse Flush	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
54	14 #14 To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
55	2 Reverse Flush	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
56	14 #14 To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
57	1 Block Flush	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
58	10 #18 To Waste	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
59	9 #18 To Column	30	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
60	2 Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
61	10 #18 To Waste	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
62	9 #18 To Column	30	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
63	2 Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
64	1 Block Flush	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
65	7 Waste-Bottle	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes

