



# Desenvolupament de lligands de l'estructura secundària d'RNA implicada en el processat alternatiu de l'exó 10 de la proteïna tau

Gerard Artigas Solé

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Programa de doctorat de Química Orgànica

Tesi doctoral

**Desenvolupament de lligands de l'estructura secundària d'RNA  
implicada en el processat alternatiu de l'exó 10 de la proteïna tau**

Memòria presentada per:

**Gerard Artigas Solé**

Dirigida i revisada per:

Dr. Vicente Marchán Sancho  
Dept. Química Orgànica,  
Universitat de Barcelona

Departament de Química Orgànica  
Facultat de Química  
Universitat de Barcelona

Barcelona, Gener 2013



# ÍNDEX

## INTRODUCCIÓ

<b>1 L'RNA: breu presentació</b>	3
1.1 L'RNA: rellevància biològica i terapèutica	4
1.2 Recerca d'agents terapèutics que actuen a nivell de l'RNA	6
1.2.1 Agents terapèutics basats en oligonucleòtids	7
1.2.1.1 Oligonucleòtids antisentit	7
1.2.1.2 RNAi	8
1.2.1.3 Ribozims	8
1.2.2 Agents terapèutics basats en molècules petites: lligands d'RNA	9
1.2.2.1 Antibiòtics aminoglicosídics	9
1.2.2.2 Agents intercalants	10
1.2.2.3 Compostos amb capacitat per reconèixer bases desaparellades	11
1.2.2.4 Molècules tipus Janus	12
1.2.2.5 <i>Riboswitches</i>	14
1.2.2.6 Lligands basats en pèptids i peptidomimètics	15
1.3 Disseny de lligands d'RNA	15
1.3.1 Propietats fisicoquímiques de l'RNA	15
1.3.2 Consideracions farmacològiques dels lligands	16
1.3.3 Estratègies de treball per al desenvolupament de lligands d'RNA	17
1.3.4 Química combinatòria dinàmica (DCC)	18
1.3.4.1 Aplicacions de la DCC en la recerca de lligands de biomolècules	19
1.3.4.2 Recerca de lligands d'àcids nucleics mitjançant DCC	20
1.4 Diances d'RNA terapèuticament rellevants	22
<b>2 L'RNA codificant de la proteïna tau com a diana terapèutica</b>	25
2.1 Processat alternatiu del pre-mRNA	25
2.1.1 Influència de l'estructura secundària del pre-mRNA en el processat alternatiu	27
2.2 Processat alternatiu del pre-mRNA de la proteïna tau	27
2.2.1 Estructura <i>stem-loop</i> a la zona del final de l'exó 10 del pre-mRNA de tau i efecte de les mutacions en la seva estabilitat termodinàmica	29
2.2.2 Interacció de lligands amb l'estructura <i>stem-loop</i> implicada en el processat alternatiu del pre-mRNA de tau	31
<b>3 Objectius</b>	34
<b>4 Bibliografia</b>	35

**RESULTATS I DISCUSSIÓ****Capítol 1. Síntesi i identificació de lligands de l'estructura *stem-loop* del pre-mRNA de tau mitjançant la química combinatòria dinàmica**

<b>Introducció i Objectius</b>	47
<b>1 Preparació de la biblioteca combinatòria dinàmica</b>	55
1.1 Síntesi de compostos heteroaromàtics amb capacitat de reconeixement del parell de bases G-U: molècules tipus Janus	55
1.1.1 Síntesi en solució dels monòmers Janus funcionalitzats amb un grup carboxil	55
1.1.1.1 Síntesi del monòmer Janus A	56
1.1.1.2 Síntesi del monòmer Janus B	66
1.1.2 Síntesi en fase sòlida dels monòmers Janus funcionalitzats amb un grup tiol	72
1.2 Síntesi de derivats de l'ametrantrona	76
1.3 Síntesi de derivats de la neamina	81
1.3.1 Síntesi de NeaminaC <sub>2</sub> tiol	82
1.3.2 Síntesi de NeaminaC <sub>6</sub> tiol	83
<b>2 Química Combinatòria Dinàmica</b>	85
2.1 Preparació dels experiments	86
2.1.1 Biotinilació de l'oligoribonucleòtid	87
2.1.2 Antecedents experimentals	87
2.2 Experiments de Química Combinatòria Dinàmica (DCC)	89
2.2.1 Experiment de DCC en presència de dos compostos intercalants: competició Ametrantrona vs Acridina	89
2.2.2 Experiment de DCC amb els monòmers Janus i Neamina	92
2.2.3 Experiment de DCC amb els monòmers Janus, Ametrantrona i Azaquinolona	94
2.2.4 Experiment de DCC amb els monòmers Janus, Ametrantrona i Neamina	97
2.3 Valoració dels resultats dels experiments de DCC	99
<b>3 Síntesi dels lligands d'RNA</b>	101
3.1 Síntesi dels lligands seleccionats mitjançant DCC	101
3.1.1 Síntesi de lligands Ametrantrona-Neamina	102
3.1.2 Síntesi de lligands Ametrantrona-Azaquinolona	103
3.1.3 Síntesi de lligands Janus-Neamina	104
3.1.4 Síntesi de lligands Ametrantrona-Janus	106
3.2 Síntesi dels lligands de segona generació	107

3.2.1 Síntesi de lligands guanidinilats	108
3.2.1.1 Síntesi de lligands Janus-Guanidinoneamina	108
3.2.1.2 Síntesi de lligands Ametantrona-Guanidinoneamina	110
3.2.2 Síntesi de lligands derivats de l' ametantrona doblement funcionalitzats	112
3.2.2.2 Síntesi del lligand Amt-NeaC <sub>2</sub> ,NeaC <sub>2</sub>	113
3.2.2.3 Síntesi del lligand Amt-NeaC <sub>2</sub> ,Azq	114
<b>Capítol 2. Estudis d'interacció dels lligands amb l'estructura <i>stem-loop</i> del pre-mRNA de tau</b>	
<b>Introducció i Objectius</b>	119
<b>1 Determinació de l'afinitat i l'especificitat dels lligands amb la diana d'RNA</b>	121
1.1 Determinació de constants d'afinitat: visió general	121
1.2 Espectroscòpia de fluorescència	124
1.2.1 Introducció i fonaments teòrics	124
1.2.2 Marcatge fluorescent de l'RNA	126
1.3 Quantificació de la unió RNA-lligand. Determinació de l'afinitat dels lligands amb la diana d'RNA wt	127
1.3.1 Afinitat dels lligands derivats de l' Ametantrona	128
1.3.1.1 Lligands seleccionats als experiments de DCC	128
1.3.1.2 Lligands derivats de l' Ametantrona de segona generació	133
1.3.2 Afinitat dels lligands Janus-Neamina/Guanidinoneamina	137
1.3.2.1 Valoracions de fluorescència amb l'RNA marcat amb fluoresceïna	137
1.3.2.2 Valoracions de fluorescència amb l'RNA marcat amb 2-aminopurina	140
1.4 Determinació de l'especificitat dels lligands cap a la diana d'RNA wt	143
<b>2 Estudi de l'efecte estabilitzant dels lligands a l'RNA diana</b>	151
2.1 Estudi de l'estabilitat d'un dúplex d'RNA per espectroscòpia d'UV	151
2.2 Avaluació de l'efecte estabilitzant dels lligands	153
2.2.1 Efecte estabilitzant dels lligands als RNAs wt, +3, +14 i +16	153
2.2.1.1 Efecte estabilitzant dels lligands de l' ametantrona seleccionats als experiments de DCC	153
2.2.1.2 Efecte estabilitzant dels lligands derivats de l' ametantrona de segona generació	157
2.2.1.3 Efecte estabilitzant dels lligands Janus-Neamina/Guanidinoneamina	160
2.2.1.3a Estudi de l'efecte estabilitzant a 100 mM de NaCl	160
2.2.1.3b Estudi de l'efecte estabilitzant a 50 mM de NaCl	165
2.2.2 Estudi de la influència de la concentració de Na <sup>+</sup> i del pH en els valors de T <sub>m</sub> dels lligands Ametantrona-Neamina	168

---

<b>3 Estudis estructurals dels complexos RNA-l·ligand</b>	173
3.1 Estudi estructural per espectroscòpia d'UV-Visible i de fluorescència	173
3.2 Estudi estructural per ressonància magnètica nuclear (RMN)	180
3.2.1 Introducció a l'estudi per RMN de la interacció RNA-l·ligand	181
3.2.2 Valoracions monodimensionals de l'RNA wt amb els l·ligands derivats de l'ametrantrona	183
3.2.2.1 Espectres monodimensionals de l'RNA wt amb Mtx i Amt	184
3.2.2.2 Espectres monodimensionals de l'RNA wt amb Amt-Azq i Amt-Janus	186
3.2.2.3 Espectres monodimensionals de l'RNA wt amb Amt-NeaC <sub>2</sub> , Amt-NeaC <sub>6</sub> i Amt-NeaC <sub>2</sub> G <sub>4</sub>	188
3.2.2.4 Espectres monodimensionals de l'RNA wt amb Amt-NeaC <sub>2</sub> ,NeaC <sub>2</sub> i Amt-NeaC <sub>2</sub> ,Azq	191
<b>CONCLUSIONS</b>	197
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	203
<b>PART EXPERIMENTAL</b>	
<b>- Materials i Mètodes</b>	
<b>1 Dissolvents, reactius i solucions amortidores de pH</b>	217
1.1 Dissolvents i reactius generals	217
1.2 Dissolucions tampó o amortidores de pH	218
<b>2 Instrumentació i tècniques generals</b>	219
2.1 Tècniques espectroscòpiques	219
2.1.1 Ressonància magnètica nuclear (RMN)	219
2.1.2 Espectroscòpia d'UV-VIS	219
2.1.3 Espectroscòpia de fluorescència	219
2.1.4 Espectroscòpia d'infraroig (IR)	219
2.2 Espectrometria de masses	220
2.2.1 Espectrometria de masses MALDI-TOF	220
2.2.2 Espectrometria de masses <i>Electrospray</i> (ESI-MS)	220
2.3 Tècniques cromatogràfiques	220
2.3.1 Cromatografia de capa prima (TLC)	220
2.3.2 Cromatografia per columna	221
2.3.3 Cromatografia de líquids d'alta pressió (HPLC)	221
2.3.4 Cromatografia de líquids de mitjana pressió (MPLC)	222

---

2.3.5 Cromatografia de líquids d'alta pressió acoblada a espectrometria de masses (HPLC-MS)	222
2.4 Altres tècniques	222
<b>3 Síntesi en fase sòlida</b>	<b>222</b>
3.1 Síntesi de derivats peptídics	222
3.1.1 Instrumentació i reactius generals	222
3.1.2 Estratègies de treball	223
3.1.3 Assaigs i determinació de la funcionalització de resines	225
3.1.3.1 Test de ninhidrina	225
3.1.3.2 Determinació del grau de substitució d'una Fmoc-peptidil-resina	225
3.2 Síntesi d'oligoribonucleòtids en fase sòlida	225
3.2.1 Instrumentació i reactius generals	225
3.2.2 Elongació de la cadena oligoribonucleotídica	226
3.2.3 Desancoratge, desprotecció i purificació	228
3.2.3.1 Procediment estàndard	228
3.2.4 Quantificació dels oligoribonucleòtids	230
<b>4 Experiments de química combinatòria dinàmica (DCC)</b>	<b>231</b>
4.1 Quantificació dels monòmers tiol	231
4.2 Evolució dels experiments	232
4.2.1 Experiments en absència d'RNA	232
4.2.2 Experiments en presència d'RNA	232
4.3 Anàlisi per HPLC-MS	233
4.3.1 Determinació dels coeficients d'extinció molar a 260 nm ( $\epsilon_{260}$ )	234
<b>5 Estudi de la interacció entre l'RNA i els lligands</b>	<b>235</b>
5.1 Determinació de l'afinitat dels lligands	235
5.1.1 Assaig d'unió RNA-lligand	235
5.1.1.1 Valoracions amb RNA wt-fluoresceïna	235
5.1.1.2 Valoracions amb RNA +3-2-aminopurina	235
5.1.1.3 Processat i determinació dels valors d' $EC_{50}$	236
5.1.2 Determinació de l'especificitat dels lligands	236
5.2 Assaig de desnaturalització tèrmica per espectroscòpia d'UV	237
5.3 Estudis estructurals dels complexos RNA-lligand	237
5.3.1 Estudis per espectroscòpia d'UV-Visible	237
5.3.2 Estudis per espectroscòpia de fluorescència	237
5.3.3 Estudis per RMN	238
5.3.3.1 Preparació de les mostres	238
5.3.3.2 Adquisició dels espectres	239



<b>6 Bibliografia</b>	239
<b>- Part Experimental</b>	
<b>1 Síntesi dels monòmers tiol</b>	241
1.1 Síntesi de compostos heteroaromàtics amb capacitat de reconeixement del parell de bases G-U: molècules tipus Janus	241
1.1.1 Síntesi en solució dels monòmers Janus funcionalitzats amb un grup carboxil	241
1.1.1.1 Síntesi del monòmer Janus A	241
• 2,4,6-Tricloropirimidin-5-carbaldehid (2)	241
• 4-(2-Amino-6-cloro-5-formilpirimidin-4-ilamino)butanoat d'etil (3a)	241
• 4-(2-Amino-6-cloro-5-formilpirimidin-4-ilamino)butanoat d'etil (4)	242
• 4-(2-Amino-5-formilpirimidin-4-ilamino)butanoat d'etil (5)	243
• 4-(2-Bis( <i>tert</i> -butoxicarbonil)amino-5-formilpirimidin-4-ilamino)butanoat d'etil (6)	244
• 4-(2-Bis( <i>tert</i> -butoxicarbonil)amino-5-oximpirimidin-ilamino)butanoat d'etil (7)	244
• 4-(2-(Bis( <i>tert</i> -butoxicarbonil)amino)-5-cianopirimidin-4-ilamino)butanoat d'etil (8)	245
• 4-(2-(Bis( <i>tert</i> -butoxicarbonil)amino)-(1-(5-cianopirimidin-4-il)-3-(2,2,2-tricloroetanoïl)ureido)butanoat d'etil (9)	246
• 4-(4-Amino-7-(bis( <i>tert</i> -butoxicarbonil)amino)-2-oxopirimido[4,5- <i>d</i> ]pirimidin-1(2 <i>H</i> )-il)butanoat d'etil (10)	247
• 4-(7-(Bis( <i>tert</i> -butoxicarbonil)amino)-4-( <i>tert</i> -butoxicarbonilamino)-2-oxopirimido[4,5- <i>d</i> ]pirimidin-1(2 <i>H</i> )-il)butanoat d'etil (11)	248
• Àcid 4-(7-(bis( <i>tert</i> -butoxicarbonil)amino)-4-( <i>tert</i> -butoxicarbonilamino)-2-oxopirimido[4,5- <i>d</i> ]pirimidin-1(2 <i>H</i> )-il)butanoic (12)	248
1.1.1.2 Síntesi del monòmer Janus B	249
• Ureidometilenmalonitril (13)	249
• 5-Cianocitosina (14)	250
• 5-(4,6-Diamino-1,3,5-triazin-2-il)citosin-1(2 <i>H</i> )-il)citosina (15)	250
• 2-(5-(4,6-Diamino-1,3,5-triazin-2-il)citosin-1(2 <i>H</i> )-il)etanoat de benzil (16)	251
• Àcid 2-(5-(4,6-diamino-1,3,5-triazin-2-il)citosin-1(2 <i>H</i> )-il)etanoic (17)	251
• 4-(5-(4,6-Diamino-1,3,5-triazin-2-il)citosin-1(2 <i>H</i> )-il)butanoat d'etil (18)	252
• Àcid 4-(5-(4,6-diamino-1,3,5-triazin-2-il)citosin-1(2 <i>H</i> )-il)butanoic (19)	252
1.1.2 Síntesi en fase sòlida dels monòmers Janus funcionalitzats amb un grup tiol	253
1.1.2.1 Síntesi de la Fmoc-Asn(Trt)-Arg(Pbf)-Cys(Trt)-resina (20)	253
1.1.2.2 Síntesi dels monòmers tiol Janus A	254

• 4-(4,7-Diamino-2-oxopirimido[4,5- <i>d</i> ]pirimidin-1(2 <i>H</i> )-il)- <i>N</i> -(2-mercaptoetil)butanamida (23)	254
• 4-(4,7-Diamino-2-oxopirimido[4,5- <i>d</i> ]pirimidin-1(2 <i>H</i> )-il)- <i>N</i> -[Asn-Arg-Cys-NH <sub>2</sub> ]butanamida (21)	256
1.1.2.2 Síntesi dels monòmers tiol Janus B	256
• 4-(5-(4,6-Diamino-1,3,5-triazin-2-il)citosin-1(2 <i>H</i> )-il)- <i>N</i> -(2-mercaptoetil)butanamida (24)	256
• 4-(5-(4,6-Diamino-1,3,5-triazin-2-il)citosin-1(2 <i>H</i> )-il)- <i>N</i> -[Asn-Arg-Cys-NH <sub>2</sub> ]butanamida (22)	257
1.2 Síntesi de derivats de l'Ametantrona	258
• 1,4-Bis((2-((2-hidroxi)etil)amino)etil)amino)antraquinona (Ametantrona) (26)	258
• 1,4-Bis((2-((2-hidroxi)etil)- <i>N</i> -Boc-amino)etil)amino)antraquinona (27)	259
• 1-((2-((2-Hidroxi)etil)- <i>N</i> -Boc-amino)etil)amino)-4-((2-((2-(tioacetil)etil)- <i>N</i> -Boc-amino)etil)amino)antraquinona (28) i 1,4-bis((2-((2-(tioacetil)etil)- <i>N</i> -Boc-amino)etil)amino)antraquinona (29)	259
• 1-((2-((2-Hidroxi)etil)amino)etil)amino)-4-((2-((2-mercaptoetil)amino)etil)amino)antraquinona (30)	261
• 1,4-Bis((2-((2-mercaptoetil)amino)etil)amino)antraquinona (31)	261
1.3 Síntesi de derivats de la neamina	262
1.3.1 Obtenció de la neamina a partir de la Neomicina B	262
• Hidroclorur de 4- <i>O</i> -{2',6'-diamino-2',6'-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopiranosil}-2-desoxistreptamina (32)	262
1.3.2 Síntesi de la NeaminaC <sub>2</sub> tiol	262
• 5- <i>O</i> -(Al·lil)-4- <i>O</i> -{2',6'-didesoxi-3',4'-bis- <i>O</i> -(acetil)-2',6'-bis( <i>tert</i> -butoxicarbonilamino)- $\alpha$ -D-glucopiranosil}-6- <i>O</i> -(acetil)- <i>N,N'</i> -bis( <i>tert</i> -butoxicarbonilamino)-2-desoxistreptamina (34)	262
• 5- <i>O</i> -(2-Hidroxi)etil)-4- <i>O</i> -{2',6'-didesoxi-3',4'-bis- <i>O</i> -(acetil)-2',6'-bis( <i>tert</i> -butoxicarbonilamino)- $\alpha$ -D-glucopiranosil}-6- <i>O</i> -(acetil)- <i>N,N'</i> -bis( <i>tert</i> -butoxicarbonil amino)-2-desoxistreptamina (35)	263
• 5- <i>O</i> -(2-(Tioacetil)etil)-4- <i>O</i> -{2',6'-didesoxi-3',4'-bis- <i>O</i> -(acetil)-2',6'-bis( <i>tert</i> -butoxicarbonilamino)- $\alpha$ -D-glucopiranosil}-6- <i>O</i> -(acetil)- <i>N,N'</i> -bis( <i>tert</i> -butoxicarbonilamino)-2-desoxistreptamina (36)	264
• Trifluoroacetat de 5- <i>O</i> -(2-mercaptoetil)-4- <i>O</i> -{2',6'-diamino-2',6'-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopiranosil}-2-desoxistreptamina (37)	264
1.3.2 Síntesi de la NeaminaC <sub>6</sub> tiol	265
• 4- <i>O</i> -{2',6'-Didesoxi-2',6'-bis(tritilamino)- $\alpha$ -D-glucopiranosil}- <i>N,N'</i> -bis(tritilamino)-2-desoxistreptamina (38)	265
• 4- <i>O</i> -{2',6'-didesoxi-3',4'-bis- <i>O</i> -(4-metoxibenzil)-2',6'-bis(tritilamino)- $\alpha$ -D-glucopiranosil}-6- <i>O</i> -(4-metoxibenzil)- <i>N,N'</i> -bis(tritilamino)-2-desoxistreptamina (39)	266
• 5- <i>O</i> -(6-Bromohexil)-4- <i>O</i> -{2',6'-didesoxi-3',4'-bis- <i>O</i> -(4-metoxibenzil)	

-2',6'-bis (tritolamino)- $\alpha$ -D-glucopiranosil}-6-O-(4-metoxibenzil)- <i>N,N'</i> -bis(tritolamino)-2-desoxistreptamina (41)	266
• 5-O-(6-(Tioacetil)hexil)-4-O-{2',6'-didesoxi-3',4'-bis-O-(4-metoxibenzil)-2',6'-bis(tritolamino)- $\alpha$ -D-glucopiranosil}-6-O-(4-metoxibenzil)- <i>N,N'</i> -bis(tritolamino)-2-desoxistreptamina (42)	267
• Trifluoroacetat de 5-O-{(6-mercaptohexil)-4-O-(2',6'-diamino-2',6'-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopiranosil)}-2-desoxistreptamina (43)	267
<b>2 Síntesi d'RNA</b>	269
2.1 Síntesi dels oligoribonucleòtids wt, +3, +14 i +16	269
2.2 Síntesi de l'oligoribonucleòtid wt biotinitat	270
<b>3 Experiments de química combinatòria dinàmica (DCC)</b>	271
3.1 Experiment de DCC en presència de dos compostos intercalants: competició Ametantrona vs Acridina	271
3.2 Experiment de DCC amb els monòmers Janus i Neamina	272
3.3 Experiment de DCC amb els monòmers Janus, Ametantrona i Azaquinolona	273
3.4 Experiment de DCC amb els monòmers Janus, Ametantrona i Neamina	274
<b>4 Síntesi de lligands d'RNA</b>	276
4.1 Síntesi de lligands seleccionats mitjançant DCC	276
4.1.1 Síntesi de lligands Ametantrona-Neamina	276
• Amt-NeaC <sub>2</sub> (44)	276
• Amt-NeaC <sub>6</sub> (45)	277
4.1.2 Síntesi del lligand Ametantrona-Azaquinolona	277
• Amt-Azq (46)	277
4.1.3 Síntesi de lligands Janus-Neamina	278
• JApept-NeaC <sub>2</sub> (47)	278
• JApept-NeaC <sub>6</sub> (48)	279
• JBpept-NeaC <sub>2</sub> (49)	280
• JBpept-NeaC <sub>6</sub> (50)	281
4.1.4 Síntesi de lligands Ametantrona-Janus	282
• Amt-JApept (51)	282
• Amt-JBpept (52)	283
4.1.5 Síntesi de lligands Janus-Janus	284
• JApept-JApept (53)	284
• JBpept-JBpept (54)	285
4.2 Síntesi de lligands de segona generació	285
4.2.1 Síntesi de lligands guanidinilats	285
• JApept-NeaC <sub>2</sub> G <sub>4</sub> (55)	285
• JApept-NeaC <sub>6</sub> G <sub>4</sub> (56)	287

---

• JBpept-NeaC <sub>2</sub> G <sub>4</sub> (57)	287
• JBpept-NeaC <sub>6</sub> G <sub>4</sub> (58)	288
• Amt-NeaC <sub>2</sub> G <sub>4</sub> (61)	289
• Amt-NeaC <sub>6</sub> G <sub>4</sub> (62)	291
4.2.2 Síntesi de lligands derivats de l'ametatrona doblement funcionalitzats	292
• Amt-NeaC <sub>2</sub> ,NeaC <sub>2</sub> (64)	292
• Amt-NeaC <sub>2</sub> ,Azq (65)	293
<b>ABREVIATURES, ACRÒNIMS I SÍMBOLS</b>	<b>297</b>

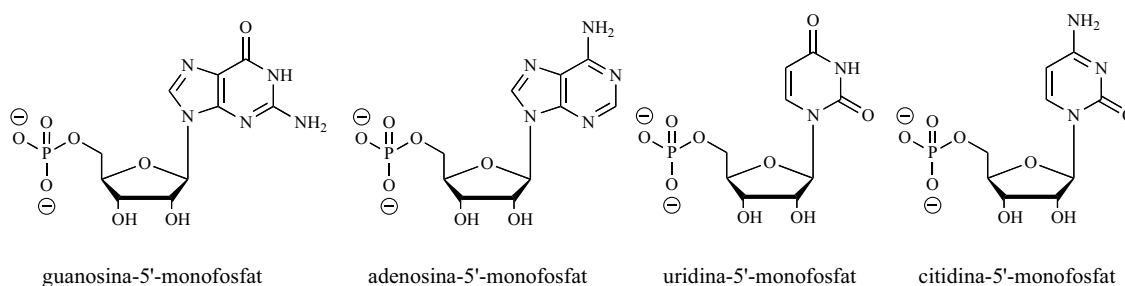


## *Introducció i Objectius*



## 1 L'RNA: breu presentació

Els àcids nucleics són molècules polimèriques llargues formades per la repetició de monòmers anomenats nucleòtids, l'estructura bàsica dels quals consisteix en una molècula de sucre enllaçada, per una banda, a una base nitrogenada heterocíclica a la posició 1' i, per l'altra, a un grup fosfat en l'hidroxil 5'. En el cas de l'RNA, els nucleòtids estan formats per un anell de D-ribose i per les bases nitrogenades puríniques adenina i guanina, i les pirimidíniques citosina i uracil (**Figura 1**).<sup>1a</sup>



**Figura 1.** Estructura dels quatre ribonucleòtids 5'-monofosfat. Per convenció, l'anell de furanosa es dibuixa amb l'àtom d'oxigen al darrera, i els C-2' i C-3' al davant.

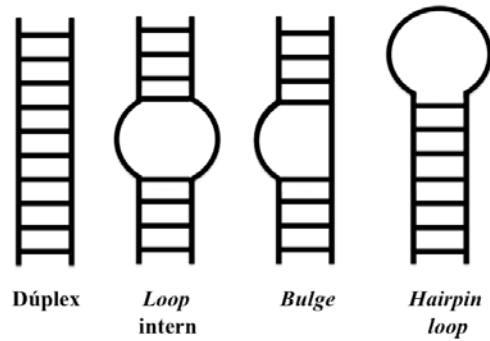
La polimerització d'aquests monòmers mitjançant la unió de l'hidroxil de la posició 3' i del fosfat a 5' per un enllaç fosfodiéster, dona lloc a la cadena oligoribonucleotídica.

A diferència del DNA, on dues cadenes oligonucleotídiques formen una estructura secundària de tipus helicoïdal que pot adoptar diferents conformacions (A-DNA, B-DNA i Z-DNA), l'agrupació intramolecular d'una sola cadena d'RNA també condueix a una estructura secundària que consta d'una doble hèlix amb una conformació similar a la del A-DNA i, per això, s'anomena A-RNA.<sup>1</sup>

Anàlogament a les proteïnes, l'RNA es caracteritza per adoptar estructures primària, secundària, terciària i quaternària.<sup>1b,2,3</sup> En primer lloc, l'estructura primària ve dictada



únicament per la seqüència de les bases nucleotídiques, mentre que les pertorbacions en l'estructura helicoïdal tipus A originen una gran varietat d'estructures secundàries.<sup>1,2</sup> Per exemple, l'estructura secundària més comuna a gairebé tots els RNAs consisteix en una regió de doble cadena anomenada *stem* que, en funció de la seva longitud, a més d'un bucle (*loop*) a la part terminal, conté seqüències de bases desaparellades que originen bonys (*bulges*) o malaparellaments (*mismatches*) (**Figura 2**).<sup>4</sup>



**Figura 2.** Possibles estructures secundàries de l'RNA.<sup>2a</sup>

Per altra banda, quan diferents regions d'una mateixa estructura secundària d'RNA entren en contacte per formar una estructura més complexa, es parla d'estructura terciària.<sup>1b,2a</sup> Un exemple el trobem en els tRNAs, on interaccionen dues de les seves estructures tipus llaç-bucle (*stem-loop*).<sup>2a</sup>

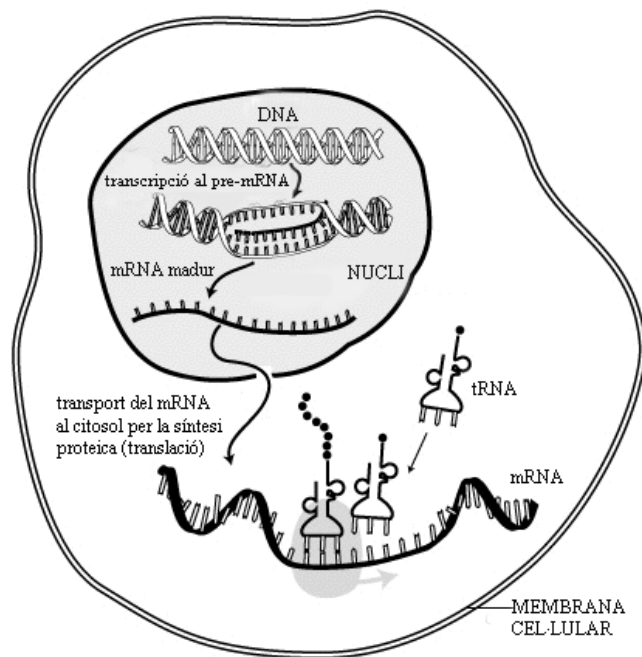
Finalment, un exemple d'estructura quaternària el trobem en complexos on coexisteixen diferents estructures d'RNA i proteïnes, les ribonucleoproteïnes (RNPs). L'exemple més representatiu és el ribosoma, on diferents estructures d'RNA ribosomals interaccionen entre elles i originen macroestructures d'RNA.<sup>1b</sup>

En resum, la capacitat estructural de l'RNA per adoptar una gran varietat d'estructures secundàries i, en major complexitat, estructures terciàries i quaternàries, juntament amb la distribució de grups funcionals a l'espai i la formació de camps electrostàtics, genera cavitats on es poden unir ions, molècules petites i proteïnes. Tot això, tal com s'explicarà al següent apartat d'aquesta introducció, li confereix una gran diversitat funcional i un gran potencial com a diana terapèutica.<sup>5</sup>

## 1.1 L'RNA: rellevància biològica i terapèutica

Amb el descobriment del DNA com a transportador de la informació genètica, el principal dogma de la biologia molecular ha estat durant molts anys que la informació flueix des del DNA cap a l'RNA, i d'aquest cap a les proteïnes. Concretament, en els organismes eucariotes la informació genètica es troba codificada al DNA dins del nucli cel·lular, des d'on es transcriu per formar RNAs nuclears. Aquests transcrits primaris (pre-mRNA) són processats per donar lloc als RNAs missatgers madurs (mRNA) que són transportats al citosol, on es descodifiquen i es realitza la síntesi proteica (traducció o translació) als ribosomes (**Figura 3**).

El transport, l'estabilitat i l'eficiència en la traducció de les seqüències d'mRNA, estan regulats per proteïnes i complexos ribonucleoproteics com el ribosoma i l'esplíceosoma.



**Figura 3.** Esquema general del procés de transcripció i traducció en una cèl·lula eucariota.

En els últims trenta anys, els nous avenços científics han revelat l'existència d'altres RNAs, anomenats *non-coding RNAs* (*ncRNAs*), que inclouen, entre d'altres, miRNA, siRNA, riboswitches i ribozims. Aquests RNAs tenen un paper essencial en la regulació de diversos processos cel·lulars, fet que evidencia que aquesta biomolècula no és només un simple transportador d'informació genètica.<sup>2a,6,7</sup> En són un exemple, el seu paper en la regulació genètica<sup>8</sup> i la seva capacitat catalítica en la síntesi de proteïnes (ribozims).<sup>9</sup>

Actualment, es poden localitzar a la bibliografia un gran nombre de treballs que posen de manifest aquesta capacitat reguladora, al mateix temps que remarquen la necessitat de considerar l'RNA com una diana de gran interès farmacològic. Per exemple, els microRNAs (miRNAs), seqüències de 18 a 24 nucleòtids de longitud, tenen un paper destacat en la regulació de l'expressió gènica. Més concretament, sembla ser que la mala regulació de les seves funcions biològiques està relacionada amb el desenvolupament de malalties com el càncer, desordres immunes, diabetis i trastorns neurodegeneratius o cardiovasculars.<sup>10</sup>

Un altre exemple de la diversitat de funcions de l'RNA a la cèl·lula, el trobem en el procés de l'RNA d'interferència (RNAi). L'RNAi és un mecanisme cel·lular, conservat al llarg de l'evolució, que regula l'expressió genètica en organismes eucariotes mitjançant la degradació de l'mRNA, o bé la inhibició de la translació. Aquesta important funció biològica l'ha convertit en una diana terapèutica rellevant, com s'explicarà més endavant, tant per oligonucleòtids com per molècules petites.<sup>11</sup>

Anàlogament als miRNA i a l'RNAi, el descobriment dels riboswitches també certifica aquesta multiplicitat biològica. Els riboswitches són regions (dominis) de l'mRNA que també tenen la capacitat de regular l'expressió gènica, actuant com a receptors de metabolits o missatgers secundaris.<sup>12</sup> Sense entrar en detalls sobre el seu mecanisme

d'actuació, cal dir que la regulació genètica es basa en canvis conformacionals com a resposta a l'enllaç d'un efector dins d'un domini del mRNA.<sup>7</sup> El fet que es consideri una biomolècula bàsica en el control genètic de bactèries, tot i que també s'ha trobat algun exemple en cèl·lules eucariotes, ha convertit els riboswitches en una diana antibacteriana i antimicrobiana emergent.<sup>12b</sup>

Així doncs, tenint en compte els grans avenços científics dels darrers anys, on s'ha demostrat el paper clau de l'RNA en molts processos biològics rellevants, no és estrany, doncs, que s'hagi convertit en una diana de gran interès terapèutic:

*"The current world can no longer be termed the 'protein' world, but rather as an 'RNA-protein' world."*<sup>13</sup>

## 1.2 Recerca d'agents terapèutics que actuïn a nivell de l'RNA

Avui dia la majoria de fàrmacs en ús clínic són molècules petites dirigides a proteïnes, com ara enzims o receptors, tot i que representen només un petit percentatge del total de les proteïnes cel·lulars. Històricament, la indústria farmacèutica, que s'ha centrat en la recerca de compostos amb capacitat per modular l'activitat de proteïnes produïdes pels gens, ha passat per alt la funció de l'RNA (mRNA), l'intermediari entre el gen i la proteïna.<sup>14</sup> Estudis recents, però, suggereixen que només una petita part de les proteïnes responsables del desenvolupament de malalties tenen la capacitat de ser reconegudes per fàrmacs basats en molècules petites, fet que posa de manifest la necessitat de trobar noves dianes i estratègies terapèutiques.<sup>2a</sup> Tot i això, encara avui dia, la majoria de dianes farmacològiques continuen sent proteïnes,<sup>4</sup> fet que queda evidenciat pel reduït nombre d'estudis estructurals sobre DNA o RNA, en comparació amb el de les proteïnes. Per exemple, al maig del 2012 al *Protein Data Bank (PDB)* hi havien 75884 entrades corresponents a proteïnes (92.6%), 1344 al DNA (1.6%), 912 a l'RNA (1.1%) i 3794 a complexos entre proteïnes i àcids nucleics (4.6%).

Des d'un punt de vista biològic, la gran varietat de funcions de l'RNA, tant en organismes cel·lulars com en virals, juntament amb l'evidència de la seva influència en el desenvolupament de malalties, fa que sigui una diana rellevant per a la recerca de nous agents terapèutics. Per exemple, actualment, se sap que els antibiòtics emprats clínicament durant dècades, com l'eritromicina, deuen la seva capacitat antibacteriana al fet que s'enllacen a l'RNA ribosomal (rRNA) de les cèl·lules procariotes, fet que demostra la capacitat d'aquest RNA per esdevenir una diana antibacteriana.

Per altra banda, cal tenir en compte que l'RNA és el material genètic de molts virus patògens com el VIH o l'hepatitis C. A més, el seu paper primordial en el control de l'expressió genètica en els humans proporciona noves oportunitats per obtenir nous tractaments mèdics mitjançant agents terapèutics específics d'estructures d'RNA relacionades amb el desenvolupament de malalties cròniques i degeneratives.<sup>15</sup>

La recerca de nous agents terapèutics que actuïn a nivell de l'RNA es pot dur a terme mitjançant l'ús d'oligonucleòtids, o bé amb lligands basats en molècules petites. A continuació, de forma més detallada, s'exposen ambdues estratègies.

## 1.2.1 Agents terapèutics basats en oligonucleòtids

En general, els oligonucleòtids emprats com a agents terapèutics tenen com a diana el pre-mRNA i l'mRNA, que són els transportadors de la informació genètica abans de la seva translació a proteïnes, i, per tant, els qui codifiquen totes les proteïnes cel·lulars. Per això, la direcció d'oligonucleòtids als mRNAs ha esdevingut en els últims anys una estratègia alternativa per tractar malalties, on els fàrmacs existents són poc eficaços. Per exemple, la reparació dels gens causants de malalties genètiques, com la distròfia muscular de Duchenne (*DMD*) o l'atròfia muscular espinal (*SMA*), mitjançant la manipulació del DNA o de l'RNA, pot ser una alternativa més eficaç que tractar directament la proteïna involucrada.<sup>16a</sup>

Als següents apartats, s'exposen breument algunes de les principals estratègies terapèutiques basades en oligonucleòtids sintètics que actuen a nivell de l'mRNA.

### 1.2.1.1 Oligonucleòtids antisentit

L'any 1978 Zamecnik i Stephenson van descobrir que una cadena de DNA de 18 nucleòtids de longitud complementària a l'RNA del virus del sarcoma de Rous, modificada químicament en els hidroxils 3' i 5' terminals en forma de derivats d'isourea per augmentar la seva estabilitat enfront de les nucleases cel·lulars, era capaç d'inhibir *in vitro* la replicació i la conseqüent translació proteica. Naixia llavors, el camp dels oligonucleòtids antisentit.<sup>16a,16b</sup>

Els oligonucleòtids antisentit (*ASOs*) són monocadenes sintètiques d'anàlegs d'àcids nucleics que tenen com a diana l'RNA missatge (mRNA). La hibridació a l'mRNA origina una pertorbació conformacional que condueix a la seva degradació per acció de la ribonucleasa H, un enzim que degrada l'RNA en dúplexs RNA-DNA i, per tant, inhibeix la translació a la corresponent proteïna.<sup>16a,16c</sup> Normalment, un oligonucleòtid antisentit representatiu sol tenir una longitud al voltant de 20 nucleòtids amb unions fosforotioat, dels quals 5 a cada costat de la cadena estan modificats químicament per augmentar l'estabilitat *in vivo* davant de les exonucleases. Com a principal inconvenient, cal destacar que els oligonucleòtids antisentit no gaudeixen d'una bona capacitat de penetració a la cèl·lula.<sup>16b</sup>

L'any 1998 es va registrar el que fins a dia d'avui és l'únic fàrmac antisentit que ha arribat al mercat, *Formivirsen (Vitravene)*<sup>i</sup>, emprat en el tractament de la retinitis en pacients amb SIDA. Tot i això, actualment es troben en fases clíniques avançades altres candidats. Un primer exemple és el *Mipomersen*, en fase clínica III, un oligonucleòtid fosforotioat *gapmer*<sup>ii</sup> que té com a diana l'mRNA codificant de l'apiloproteïna B100, involucrada en la producció de lipoproteïnes de colesterol de baixa densitat, a fi de regular-ne els seus nivells en el torrent sanguini. Cal destacar també el *Custirsen*, un altre oligonucleòtid fosforotioat *gapmer*, que té com a diana l'mRNA codificant de la clusterina, una proteïna anti-apoptòtica sobreexpressada a les cèl·lules tumorals.

<sup>i</sup> L'any 2004 va ser retirat del mercat per falta de demanda.<sup>16a</sup>

<sup>ii</sup> Aquest disseny deixa a la zona central un espai (*gap*) de 10 nucleòtids no modificats en l'esquelet fosforotioat (d'aquí ve el nom *gapmer*) que permeten la fragmentació de l'mRNA per l'acció de la ribonucleasa H (RNasa H).

Actualment, es troba en fase clínica III, tot i que en la fase clínica II no va ser efectiu en dones amb càncer de pit amb metàstasi, fet que va suggerir que la seva eficàcia podria ser específica a un tipus de càncer.<sup>16a</sup>

### 1.2.1.2 RNAi

Com s'ha comentat anteriorment, l'RNAi és un procés cel·lular natural de regulació de l'expressió genètica que té una funció rellevant en el mecanisme de defensa de la cèl·lula davant de virus o de transposons (*transposable elements*).<sup>16f</sup>

Tot i que en aquest procés es troben implicats diversos tipus d'RNAs, el desenvolupament de la teràpia d'RNAi es basa principalment en els micro-RNAs (miRNA) i els siRNAs (*small interfering RNAs*).<sup>16f</sup> Per una banda, l'siRNA és un dúplex d'RNA que, mitjançant l'acció d'un complex multiproteic, genera la corresponent monocadena perfectament complementària a l'mRNA diana, que en interaccionar-hi, indueix la seva degradació, amb la consegüent inhibició translacional.<sup>16a,16g</sup> En canvi, els miRNAs són dúplexs d'RNA més curts que generen una monocadena amb menys complementarietat per l'mRNA, de 2 a 8 nucleobases, però que encara tenen tant la capacitat de regular la translació de l'mRNA com de degradar-lo.<sup>16f-h</sup>

En l'actualitat, es troben en assaig clínic 22 possibles fàrmacs pel tractament d'unes 16 malalties.<sup>iii</sup> Ara bé, el fet que aquests siRNAs sintètics es degradin molt ràpidament per acció de les nucleases del torrent sanguini i que s'hagin detectat efectes secundaris a causa de la seva capacitat d'interferir en la funció dels miRNAs, ha provocat un augment de la complexitat de la recerca. Aquest fet ha ocasionat que ens els últims 3 anys la indústria farmacèutica s'hagi mostrat poc confiada en aquesta via d'investigació i hagi reduït o eliminat en alguns casos els seus projectes d'investigació sobre l'RNAi.<sup>16a</sup>

### 1.2.1.3 Ribozims

Els ribozims són molècules d'RNA que, com el enzims, tenen la capacitat per unir-se específicament a un substrat i regular-ne les seves funcions biològiques. Per exemple, la seva habilitat per interaccionar específicament amb l'mRNA els ha convertit en agents terapèutics molt atractius. Actualment, tot i la necessitat de protegir-los químicament de les nucleases, i d'haver-los d'administrar per via local, s'estan duent a terme assaigs clínics amb 7 ribozims,<sup>iii</sup> dels quals 5 són pel tractament del virus VIH, mentre que la resta ho són pel tractament del càncer renal i del virus de l'hepatitis C.<sup>16e</sup>

---

<sup>iii</sup> Per més informació, veure referència 16e, on es recullen les característiques dels diferents fàrmacs, l'empresa, la malaltia a la qual van dirigits i l'estat de la fase clínica en que es troben, entre d'altres.

## 1.2.2 Agents terapèutics basats en molècules petites: lligands d'RNA

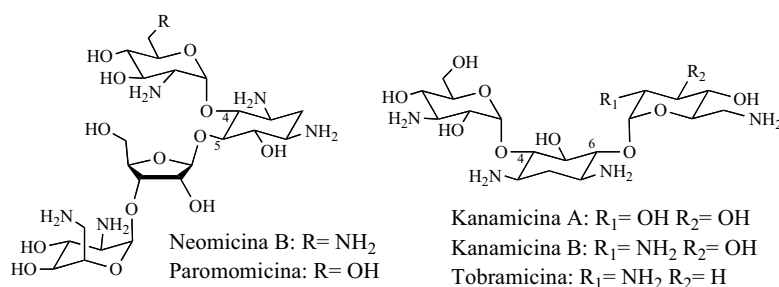
Tot i el potencial dels oligonucleòtids sintètics com agents terapèutics, el fet que, per una banda, siguin poc estables a les nucleases presents al medi fisiològic i, per l'altra, que tinguin poca capacitat de penetració cel·lular, han estat dues de les principals raons per les quals només han arribat al mercat dos fàrmacs: l'oligonucleòtid antisentit *Fomivirsen*, retirat el 2004, i l'aptàmer d'RNA *Macugen*.<sup>16b</sup>

En els últims anys, el desenvolupament de lligands d'RNA basats en molècules orgàniques petites ha adquirit un paper rellevant en la recerca de nous agents terapèutics, amb l'objectiu d'aprofitar la capacitat de l'RNA per adoptar diverses estructures amb característiques físicoquímiques adequades que generin possibles llocs d'unió.

La importància d'aquest camp queda demostrada amb el fet que als darrers anys s'han publicat diversos articles de revisió,<sup>2,6,15</sup> on es recullen nombrosos exemples de molècules orgàniques amb capacitat d'interacció amb l'RNA. A continuació, s'exposen, agrupades en famílies, algunes de les més representatives.

### 1.2.2.1 Antibiótics aminoglicósids

Els aminoglicòsids són antibiòtics d'ampli espectre utilitzats en el tractament d'infeccions bacterianes de tipus Gram-negatiu i determinades Gram-positiu. Químicament, són molècules formades per un anell de 2-desoxiestreptamina (2-DOS) enllaçat glicosídicament amb altres aminosucre (Figura 4), on la llibertat rotacional al voltant de l'enllaç glicosídic concedeix a la molècula cert grau de flexibilitat que li permet adaptar-se adequadament al lloc d'unió de l'RNA. L'abundància de grups amino protonables a pH fisiològic li dona un fort caràcter catiònic, fet que facilita la interacció amb l'esquelet polianiònic de l'RNA mitjançant interaccions electrostàtiques. A més, també poden formar altres interaccions, com els ponts d'hidrogen entre les nucleobases i els hidroxils i els grups amino de l'aminoglicòsid.<sup>17</sup>



**Figura 4.** Estructura d'alguns aminoglicòsids naturals: a) família neomicina (anell 2-DOS 4,5-disubstituit); b) família kanamicina i tobramicina (anell 2-DOS 4,6-disubstituit).

El descobriment a finals dels anys 80 de la capacitat de diferents classes d'antibiòtics, com els aminoglicòsids, per interferir en la biosíntesi proteica bacteriana va demostrar el seu potencial com a agents terapèutics, i va iniciar el camí cap a la recerca de molècules orgàniques petites com a lligands d'RNA.<sup>5</sup>

Actualment, se sap que l'activitat antibacteriana està causada per la seva unió en zones específiques del ribosoma bacterià. Concretament, a la subunitat 30S del ribosoma, el 16S rRNA forma una estructura secundària anomenada *A-site*, on l'aminoglicòsid en interaccionar-hi específicament origina un canvi conformacional que desencadena anomalies en la translació proteica.<sup>2a,6</sup> Tot i la seva habilitat per enllaçar-se preferentment a l'RNA ribosomal procarionta, els aminoglicòsids també tenen certa capacitat per enllaçar-se amb afinitats comparables a altres RNAs, com per exemple els motius estructurals *HIV-1 trans-activating response element (TAR)*, *Rev-response element (RRE)*, ribozims o mRNA humans.<sup>15,17a, 17d,18</sup>

Malgrat que els aminoglicòsids s'enllacen selectivament a les estructures dúplex adoptades per l'RNA (tipus A) davant de les de tipus B, més abundants en el DNA, mostren una afinitat moderada i poca capacitat per discriminar entre diferents seqüències d'RNA.<sup>17a,17e,19</sup> A més, en els darrers anys, la seva activitat antibacteriana s'ha vist reduïda, ja que les bactèries han desenvolupat resistència.<sup>20</sup> Amb l'objectiu de desenvolupar nous antibiòtics més efectius, s'han realitzat diverses modificacions químiques en els aminoglicòsids naturals com per exemple la guanidinilació dels grups amino,<sup>21</sup> les modificacions basades en la restricció conformacional, la substitució de l'enllaç glicosídic per un centre quaternari rígid (anàlegs spiro-bicíclics),<sup>22a</sup> o la síntesi de derivats de neomicina restringits conformacionalment.<sup>22b</sup> També s'ha modificat l'esquelet per originar noves estructures mimètiques, com els dímers de neamina o d'altres aminosucres.<sup>23</sup> Per altra banda, els aminoglicòsids també s'han conjugat a altres tipus de molècules, com ara acridines,<sup>19</sup> nucleobases,<sup>18</sup> dinucleòtids o diPNAs.<sup>24</sup>

Finalment, com a idea general, cal destacar que la gran flexibilitat que presenten els aminoglicòsids per adaptar-se a diverses estructures secundàries presents a l'RNA amb afinitats i selectivitats moderades, ha ocasionat que també s'emprin com a base per a la recerca de nous lligands d'RNA, tal com demostren alguns dels exemples acabats de citar.

### 1.2.2.2 Agents intercalants

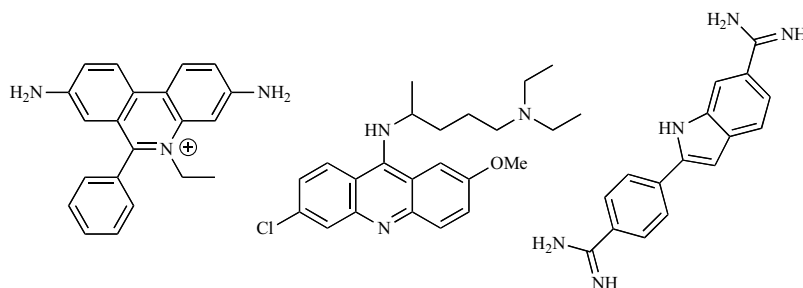
A l'estructura tipus dúplex dels àcids nucleics es pot produir la inserció d'un sistema aromàtic pla entre dos parells de bases nucleotídiques adjacents per originar interaccions tipus  $\pi-\pi$  entre les nucleobases i la molècula aromàtica inserida. Aquest fenomen es coneix com a intercalació, i és el mode d'actuació de molts agents antitumorals i antibiòtics que s'enllacen al DNA.

Tot i les diferències estructurals entre els dúplexs típics de DNA i d'RNA, les molècules amb capacitat d'intercalació no mostren cap selectivitat, i interaccionen de forma similar amb les dues estructures.<sup>25</sup> A la **Figura 5** es mostra l'estructura de tres agents intercalants representatius.

La particularitat d'unir-se preferentment als dúplex dels àcids nucleics ha plantejat la possibilitat de dissenyar lligands més selectius basats, per una banda, en la capacitat per reconèixer més d'un lloc d'unió i, per l'altra, en la generació de noves interaccions, com les electrostàtiques, a través de modificacions químiques d'agents intercalants de DNA ja coneguts.<sup>2a</sup> D'entre els nombrosos estudis descrits a la bibliografia, en són una mostra la funcionalització d'agents intercalants amb cadenes peptídiques o alifàtiques, com per

exemple, conjugats etidi-arginina amb capacitat per reconèixer dos llocs d'unió en l'RNA *TAR* del virus VIH,<sup>26a</sup> conjugats acridina-pèptid per enllaçar-se a un dúplex d'RNA d'un inhibidor proteic viral,<sup>26b</sup> pèptids cíclics (*HTPs*) amb un nucli intercalant amb capacitat per enllaçar-se selectivament a dúplexs d'RNA,<sup>26c</sup> o bé anàlegs de la mitoxantrona com a possibles lligands d'una estructura secundària del pre-mRNA de tau.<sup>26d,26e</sup>

Per altra banda, també s'han descrit compostos en els quals s'ha unit un aminoglicòsid a molècules d'acridina,<sup>19,27</sup> o s'ha conjugat una acridina amb un compost amb capacitat per reconèixer bases desaparellades.<sup>28</sup>



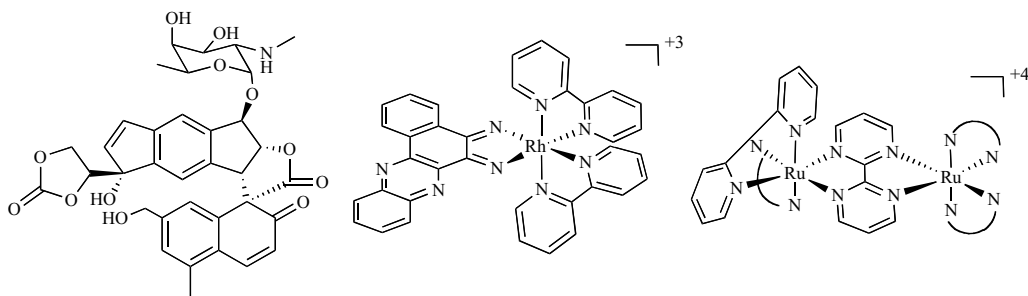
**Figura 5.** Estructura de tres agents intercalants d'àcids nucleics: bromur d'etidi (esquerra), quinacrina (centre) i DAPI (dreta).<sup>2a</sup>

### 1.2.2.3 Compostos amb capacitat per reconèixer bases desaparellades

Tal com s'ha comentat a l'inici d'aquesta introducció, l'RNA pot adoptar una gran diversitat de plegaments i xarxes tridimensionals que originen motius estructurals propis com els *bulges*, on una o més nucleobases es troben desaparellades. A més, és reconeguda la rellevància biològica d'aquestes protuberàncies en processos de reconeixement cel·lular.<sup>2a,29</sup> Contràriament, en el DNA aquest tipus de motius estructurals, juntament amb els parells de bases no canònics (*mismatched*), estan associats a degradacions químiques de les bases nucleotídiques o a errors en l'activitat enzimàtica de la polimerasa, fet que desencadena la formació d'estructures helicoidals imperfectes associades a alteracions en el codi genètic.<sup>30</sup> És per això que, en els últims anys, també s'ha centrat l'atenció en la recerca de molècules orgàniques amb capacitat per reconèixe'ls.

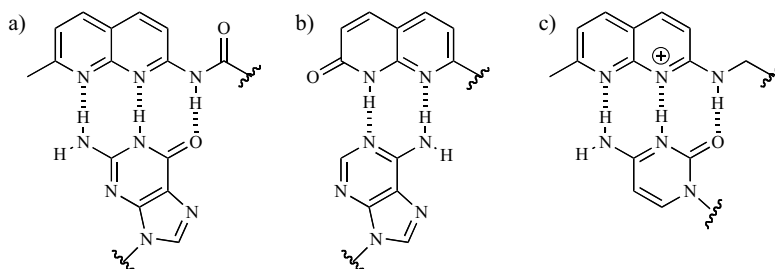
Una de les vies de treball (**Figura 6**) s'ha centrat en el desenvolupament d'anàlegs del cromòfor natural neocarzinostatina, ja que ha demostrat capacitat per unir-se a la regió del *bulge* del dúplex de DNA<sup>31</sup> i d'RNA.<sup>32</sup> També són destacables els compostos intercalants de rodi(III) amb capacitat de reconeixement de bases desaparellades en dúplex de DNA i d'RNA,<sup>2b,33</sup> i els complexos de ruteni(II) amb capacitat per reconèixer els trinucleòtids que formen la regió del *bulge* de l'RNA *TAR*.<sup>34</sup>





**Figura 6.** Estructura de neocarzinostatina (NCSi-gb) (esquerra),<sup>32</sup> del complex intercalant de Rh(III) (centre),<sup>33</sup> i del complex de Ru(II) (dreta).<sup>34</sup>

Per altra banda, també són destacables algunes estructures heteroaromàtiques planes que reconeixen selectivament nucleobases mitjançant la incorporació d'acceptors i donadors d'enllaços per pont d'hidrogen complementaris als de les bases nucleotídiques desaparellades. Una mostra representativa la trobem en els compostos derivats de *N*-acil-2-amino-1,8-naftiridina, azaquinolona i 2-amino-7-metil-1,8-naftiridina protonada amb capacitat per enllaçar-se al dúplex de DNA i d'RNA, preferentment a les bases guanina, adenina i citosina, respectivament (**Figura 7**).<sup>30</sup>



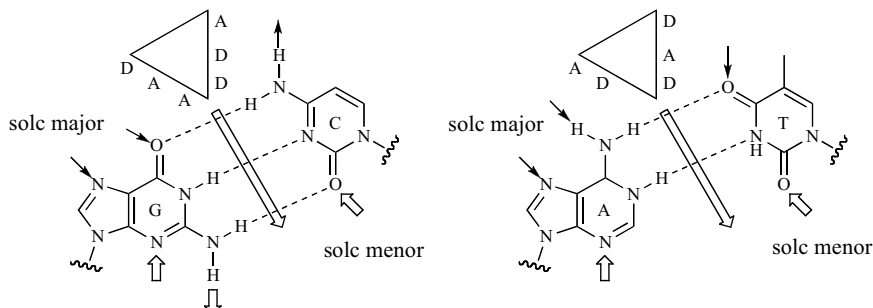
**Figura 7.** Reconeixement de bases desaparellades amb compostos heteroaromàtics: a) una guanina per *N*-acil-2-amino-7-metil-1,8-naftiridina, b) una adenina per 7-metil-2-oxo-1,8-naftiridina (azaquinolona), i c) una citosina per 2-amino-7-metil-1,8-naftiridina protonada.<sup>30</sup>

Aprofitant la selectivitat d'aquest tipus de compostos, també s'han dissenyat noves molècules amb capacitat per reconèixer parells de bases no canònics. Al DNA, en són un exemple el reconeixement d'un parell G-A<sup>35a</sup> o d'una seqüència tipus CAG<sup>35b</sup> per part d'una molècula híbrida azaquinolona-naftiridina. També ho és la unió de dues naftiridines a un parell G-G.<sup>35c</sup> A nivell d'RNA, cal destacar el reconeixement de parells G-A i G-G a l'*stem-loop* IIB de l'mRNA del virus VIH-1 per part de l'heterodímer azaquinolona-naftiridina i de l'homodímer de naftiridina, respectivament.<sup>35d</sup>

#### 1.2.2.4 Molècules tipus Janus

Com s'ha comentat a l'apartat anterior, la formació d'enllaços per pont d'hidrogen complementaris a les nucleobases pot augmentar l'especificitat d'un lligand, basat en una molècula orgànica petita, cap a una seqüència donada de DNA o d'RNA. Amb

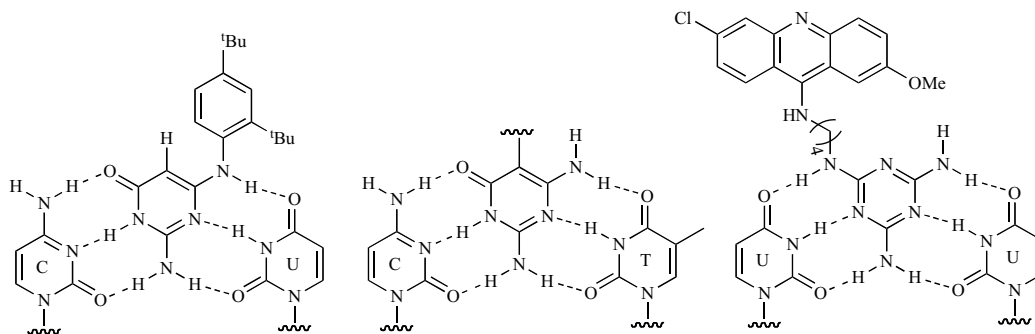
aquest pretext, l'any 1996 Lehn i col·laboradors<sup>36</sup> van introduir el concepte de lligands d'àcids nucleics formats amb una estructura de dues cares amb capacitat per formar enllaços pont d'hidrogen complementaris a les nucleobases, que van anomenar Janus en referència al déu de la mitologia romana (**Figura 8**).



**Figura 8.** Esquema representatiu del concepte *Janus-Wedge* aplicat a lligands d'àcids nucleics (A i D volen dir acceptors i donadors d'enllaç pont d'hidrogen, respectivament). Els triangles representen la molècula tipus Janus com una falca (*wedge*) amb capacitat per formar enllaços pont d'hidrogen a les seves dues cares. L'enllaç es produeix per inserció entre els parells de bases G-C i A-T i forma un triplet que augmenta el nombre d'enllaços per pont d'hidrogen fins a un total de 6 i 5, respectivament. Per altra banda, les fletxes negres (solc major) i blanques (solc menor) indiquen com interaccionen altres molècules que s'enllacen per pont d'hidrogen amb els parells de bases G-C i A-T, sense modificar-ne l'aparellament.<sup>36</sup>

Les molècules Janus són molècules heteroaromàtiques que, tant si es troben aparellades com si no, presenten en cadascuna de les cares dues disposicions d'enllaç de tipus donador i acceptor de pont d'hidrogen. Tal com s'esquematitza a la **Figura 8**, l'enllaç es produeix a través de la inserció entre els parells de bases i augmenta el nombre total d'enllaços pont d'hidrogen, fet que implica un increment en l'afinitat i en l'especificitat. Altrament, cal dir que el concepte *Janus-Wedge* es contraposa amb l'aproximació tradicional on els lligands reconeixen els llocs acceptors i donadors de ponts d'hidrogen que queden lliures.<sup>36</sup> També cal remarcar que, malgrat tenir una estructura complementària als parells de bases canònics, la formació de la tríada base-Janus-base ha de competir amb la necessitat de distorsionar el parell de bases enllaçades, i amb la tendència a autoagregar-se supramolecularment. Per aquest motiu, doncs, s'ha centrat l'ús d'aquest tipus de molècules en el reconeixement de parells de bases no canònics, o parells de bases Watson-Crick desaparellats com el parell *mismatch* C-U.<sup>36</sup>

A la **Figura 9**, es mostren algunes estructures Janus descrites a la bibliografia. Un primer exemple el trobem en una molècula específica del parell no canònic C-U amb capacitat per formar 6 enllaços pont d'hidrogen amb la tríada corresponent.<sup>36</sup> Un altre exemple és la derivatització d'un PNA amb una molècula Janus en cadascun dels seus residus que, a través de la interacció amb el parell de bases no canònic C-T, condueix a la formació i a l'estabilització d'una triple hèlix de DNA.<sup>37</sup> Més recentment, s'ha descrit un derivat triaminotriazina-acridina com a lligand del triplet CUG o CTG amb capacitat per formar ponts d'hidrogen amb els parells de bases U-U o T-T.<sup>28</sup>

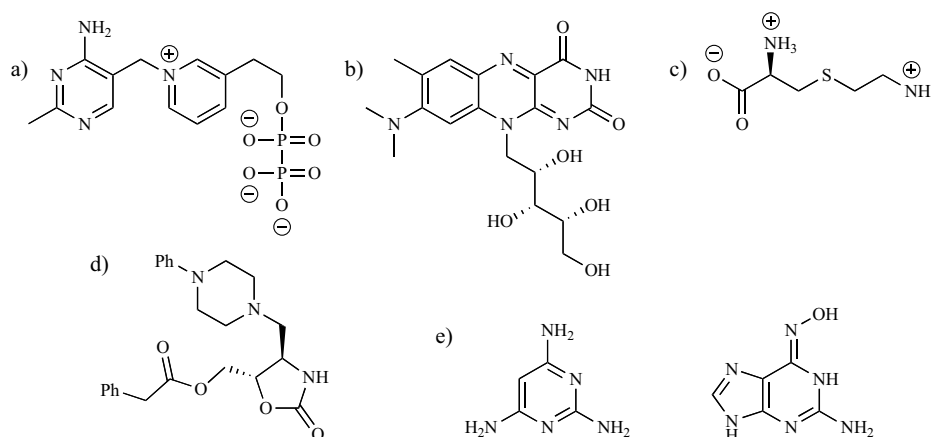


**Figura 9.** Estructura de molècules Janus per parells de bases no canònics: C-U (esquerra),<sup>36</sup> C-T (centre),<sup>37</sup> i U-U (dreta).<sup>28</sup>

### 1.2.2.5 Riboswitches

Com ja s'ha comentat anteriorment (apartat 1.1), els *riboswitches* són regions de l'mRNA localitzades a la regió 5'-UTRs (5' untranslated regions) que no intervenen a la traducció proteica, però que desenvolupen un paper important en la regulació genètica actuant de receptors per metabolits i missatgers secundaris. Aquesta capacitat per reconèixer molècules petites, juntament amb el fet que la vintena de classes de *riboswitches* coneguts actualment es troben únicament en bacteries, a excepció del pirofosfat de tiamina (TPP), i que es localitzen als mRNA codificants de proteïnes essencials per la seva supervivència, els ha convertit en una diana antibacteriana i antimicrobiana emergent per al desenvolupament de nous antibiòtics.<sup>7,12b</sup>

Actualment, es coneixen un gran nombre de molècules petites dissenyades com a anàlegs de metabolits naturals amb capacitat de reconeixement específic de diferents *riboswitches*. Per exemple, el de pirofosfat de tiamina (TPP), el de mononucleòtids de flavina (FMN), el de lisina, el de *T-box*, o els de guanina o adenina (**Figura 10**).<sup>7,12b</sup>



**Figura 10.** Estructura d'alguns compostos amb capacitat per reconèixer *riboswitches*: a) de pirofosfat de tiamina (pirofosfat de piritiamina), b) de mononucleòtids de flavina (roseoflavina), c) de lisina (L-aminoetilcisteïna), d) de *T-box* (oxazolidinona), e) de guanina i adenina (2,4,6-triamino-pirimidina i 2-amino-*N*<sup>6</sup>-hidroxiadenina, respectivament).<sup>12b</sup>

### 1.2.2.6 Lligands basats en pèptids i peptidomimètics

Una de les grans problemàtiques de l'ús de molècules petites en la recerca de lligands inhibidors de complexos ribonucleoproteics, és la poca capacitat que mostren per alterar les interaccions entre l'RNA i la proteïna del complex, ja que acostumen a ser àrees superficials d'interfase massa amples perquè la presència del lligand hi afecti. Per això, amb la finalitat de resoldre aquesta dificultat, el desenvolupament d'agents terapèutics d'origen peptídic o peptidomimètics ha esdevingut una via alternativa, ja que, per una banda, acostumen a ser seqüències amb certa densitat de càrrega positiva que afavoreixen la interacció amb l'RNA i, per l'altra, embolcallen una àmplia àrea superficial en interaccionar-hi.<sup>38,39</sup>

A continuació es recullen alguns exemples de compostos d'aquest tipus amb capacitat d'interacció amb l'RNA *TAR* del virus VIH-1. En primer lloc, podem destacar un pèptid sintètic lineal que interacciona específicament al solc major,<sup>39a</sup> o un pèptid cíclic amb una conformació  *$\beta$ -hairpin*, una estructura mimètica de la proteïna *Tat BIV*, involucrada en el complex ribonucleoproteic *tat-TAR*, amb capacitat per interaccionar al solc major.<sup>39b</sup> Altres exemples importants són la família de pèptids cíclics  *$\beta$ -hairpin*, conformacionalment restringits amb capacitat per interaccionar específicament a la regió del *bulge* i del *loop*,<sup>39c</sup> i el pèptid cíclic *L50*, que mostra activitat antiviral mitjançant la inhibició en la replicació del virus VIH-1.<sup>39d</sup>

## 1.3 Disseny de lligands d'RNA

Donada l'omnipresència de l'RNA en diferents processos biològics, el disseny de molècules amb capacitat per reconèixe'l selectivament i regular-ne les funcions ha esdevingut un objectiu molt rellevant que ha donat lloc a un gran nombre d'aplicacions biotecnològiques i terapèutiques. Malgrat els nombrosos esforços realitzats als darrers anys, el disseny de lligands d'RNA basats en molècules petites continua sent avui dia un repte no assolit completament a causa de la manca d'informació sobre els factors físicoquímics que regulen el reconeixement molecular RNA-lligand, juntament amb la dificultat per aconseguir compostos amb bones propietats farmacològiques. És a dir, l'obtenció d'un bon grau de reconeixement de la seqüència de l'RNA diana sense competència amb altres biomolècules, i una bona capacitat de penetració a la membrana cel·lular.<sup>40</sup>

És per això que, a l'hora de dissenyar un lligand d'RNA, és necessari tenir en compte tant les seves característiques farmacològiques, com algunes de les propietats físicoquímiques de la diana.

### 1.3.1 Propietats físicoquímiques de l'RNA

Una de les principals propietats físicoquímiques que cal tenir en compte és que, anàlogament al DNA, l'RNA és un polianió que deu la seva càrrega negativa als grups fosfat i als grups electronegatius de les nucleobases. Aquest caràcter negatiu ocasiona que, al medi fisiològic, es trobi fortament solvatat per molècules d'aigua i contraions, fet determinant tant a nivell estructural com dinàmic. Per tant, les molècules petites carregades positivament tendiran a enllaçar-se amb l'RNA de forma poc específica i en múltiples llocs d'unió.<sup>38</sup>

Per altra banda, tot i que els àcids nucleics adopten regularment una estructura helicoïdal dextrògira, existeixen algunes diferències entre els dúplex de DNA i d'RNA. En el primer, la conformació més comuna a la natura és la doble hèlix tipus B que es diferencia de la A, adoptada per l'RNA, en el major nombre de bases per volta, fet que ocasiona que els dúplex d'RNA tinguin un solc major més estret i profund, i un solc menor més pla. També és important destacar la presència del grup hidroxil a la posició 2' de la ribosa que ocasiona que, al dúplex, les bases tinguin angles d'inclinació diferents. I, per últim, la conformació dels anells de ribosa ocasiona que la distància entre els grups fosfat sigui més curta.<sup>2</sup>

Aquestes característiques estructurals fan que els solcs major i menor no mostrin unes condicions òptimes perquè s'hi enllacin molècules petites, malgrat que el solc major, gràcies al seu caràcter més electronegatiu, és el lloc d'unió preferent de molècules carregades positivament. Això, en part, explica el fet que hi hagi pocs exemples de molècules petites que s'enllacin al solc major de l'RNA en comparació amb el DNA.<sup>6</sup>

Finalment, també cal tenir en compte la flexibilitat estructural de l'RNA, ja que la unió del lligand pot provocar canvis conformacionals i generar una determinada resposta biològica. Fins i tot, en cas de no haver-hi competència amb una substància endògena, un lligand pot ser terapèuticament rellevant, tot i tenir una baixa afinitat ( $\mu\text{M}$ ), si té prou capacitat per generar canvis conformacionals a l'RNA diana. Un exemple representatiu són els *riboswitches*, on la seva resposta biològica es desencadena a partir dels canvis conformacionals produïts per la interacció de metabolits. Tot això, doncs, posa de manifest la necessitat d'aplicar estratègies que considerin l'RNA també com una diana dinàmica, cosa que dificulta força el disseny de lligands basats en molècules petites.<sup>38</sup>

### 1.3.2 Consideracions farmacològiques dels lligands

Com ja s'ha comentat a l'inici d'aquest apartat, idealment un lligand, a més de tenir una bona capacitat de penetració a la membrana cel·lular, ha de ser selectiu a l'RNA per davant d'altres biomolècules com el DNA i les proteïnes, específic per reconèixer un lloc d'unió concret de la seqüència d'RNA diana, i estable al medi fisiològic. Ara bé, en el disseny de lligands d'RNA també cal tenir en compte les propietats farmacològiques generals establertes pels fàrmacs. Per exemple, bioquímicament han de poder ser absorbits, distribuïts i metabolitzats, mentre que a nivell fisicoquímic han de ser fàcilment sintetitzables, tenir un grau de polaritat adequat per ser solubles en medi aquós i també poder travessar membranes cel·lulars.

A partir de l'observació empírica de les propietats fisicoquímiques de fàrmacs en ús clínic, s'han descrit les anomenades regles de Lipinski, on s'estipulen les característiques farmacològiques ideals que hauria de tenir qualsevol fàrmac. Per exemple, un pes molecular inferior a 500 Da, un coeficient de distribució en dues fases d'una mescla  $\text{H}_2\text{O}$ /dissolvent orgànic ( $\log P$ ) inferior a 5, i un nombre de grups acceptors (O+N) i donadors (O-H, N-H) d'enllaços pont d'hidrogen inferior a 10 i a 5, respectivament. Malgrat aquestes consideracions, cal tenir present que molts fàrmacs utilitzats actualment no compleixen alguna o més d'una d'aquestes normes, com és el cas dels aminoglicòsids, que sobrepassen tant el pes molecular com el grau de polaritat. Cal esmentar, però, que en el cas de l'RNA, que es troba fortament solvatat per molècules d'aigua i contraions, el lligand ha de ser prou polar per desplaçar-les i poder

interaccionar-hi adequadament, encara que sobrepassin el grau de polaritat estipulat per les regles de Lipinski. Per tant, això posa de manifest que a l'hora de dissenyar un lligand, les propietats farmacològiques d'aquest també han d'anar d'acord amb les propietats fisicoquímiques de la diana.<sup>38</sup>

### 1.3.3 Estratègies de treball per al desenvolupament de lligands d'RNA

Tot i el constant esforç dedicat a millorar les estratègies de recerca de nous lligands d'RNA, el principal inconvenient segueix sent el fet que la majoria dels compostos descrits interaccionen amb una gran diversitat de seqüències i d'estructures d'RNA. Així doncs, amb l'objectiu d'obtenir lligands més específics, en els últims anys s'estan dedicant nombrosos esforços al desenvolupament i optimització d'estratègies de treball més eficients. A continuació, es comenten breument les més representatives.

En primer lloc, podem incloure l'estratègia de cribatge coneguda com a *high-throughput screening*, que es basa en l'ús d'una tècnica biofísica per seleccionar els millors lligands d'una determinada diana d'RNA mitjançant la realització d'estudis d'interacció amb una biblioteca de compostos. Algunes de les tècniques emprades habitualment són l'espectroscòpia de fluorescència, la ressonància de plasmó superficial (*SPR*), la ressonància magnètica nuclear (RMN) i l'espectrometria de masses.<sup>26d,41</sup>

Una altra estratègia, més ràpida i econòmica, és la que engloba els anomenats mètodes computacionals o de *docking*, els quals, a partir d'un coneixement estructural previ de la diana, permeten identificar nous lligands a través de la selecció amb una biblioteca de compostos virtual.<sup>38</sup> Malgrat que aquesta metodologia està molt optimitzada per proteïnes, en el camp dels àcids nucleics encara no està prou desenvolupada, ja que cal tenir en compte diferents paràmetres fisicoquímics característics de l'RNA, com els efectes de solvatació a causa de la presència de contraions i molècules d'aigua, els termodinàmics generats per la unió del lligand, o bé la seva flexibilitat estructural.<sup>42</sup>

En tercer lloc, podem incloure les estratègies basades en la unió de fragments (*fragment-based drug design*).<sup>43</sup> Aquestes consisteixen en la realització d'una selecció o cribatge de diversos fragments, que acostumen a ser molècules químicament senzilles amb pocs grups funcionals i amb una capacitat coneguda per interaccionar amb l'RNA. Atès que la majoria de lligands descrits solen tenir poca especificitat, aquesta estratègia pot generar lligands amb capacitat per reconèixer diferents motius estructurals d'una diana i, per tant, compostos més afins i específics.<sup>43</sup> En són un exemple la recerca de lligands de l'rRNA 23S bacterià i del subdomini IIA de l'RNA *IRES* del virus de l'hepatitis C, o bé la identificació de molècules petites que interaccionen amb el *riboswitch thiM* de *E. Coli*.<sup>44</sup>

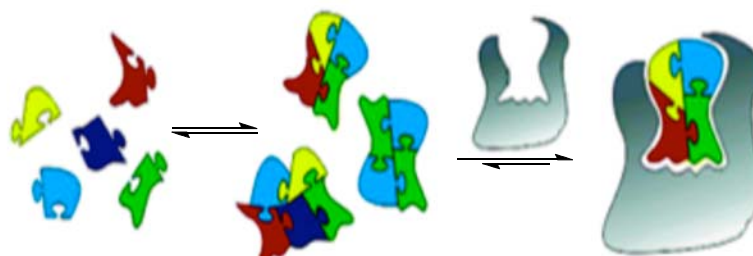
Per altra banda, una altra via d'obtenció de nous compostos és l'optimització de lligands d'RNA ja existents.<sup>38b</sup> L'exemple més destacat és el cas dels aminoglicòsids que, com s'ha explicat anteriorment, s'han realitzat nombrosos treballs per sintetitzar nous aminoglicòsids que millorin la seva baixa especificitat.<sup>19-24</sup>

Finalment, un mètode alternatiu consisteix en utilitzar una estratègia basada en la unió de fragments combinada amb la química combinatòria dinàmica (DCC).<sup>27,45</sup> Aquesta ha estat la metodologia seguida en aquesta tesi doctoral per dur a terme la cerca de lligands d'RNA i sobre la qual se'n donen més detalls al següent apartat.

### 1.3.4 Química combinatòria dinàmica (DCC)

En els últims anys, la química combinatòria dinàmica (DCC) ha esdevingut una eina molt útil per seleccionar compostos amb gran afinitat amb molècules receptores d'interès biològic, com ara proteïnes i àcids nucleics, fet que l'ha convertit en una metodologia alternativa per al desenvolupament de nous lligands.<sup>46</sup>

Generalment, la gran diferència entre la química combinatòria tradicional i la dinàmica recau en el fet que, en la primera d'elles, es prepara una biblioteca estàtica de compostos i, a continuació, s'estudia la seva interacció amb la diana per seleccionar aquells que tenen millor activitat. Per aquest motiu, una ànlisi profunda de totes les possibles combinacions de fragments esdevé un treball molt laboriós.<sup>47</sup> Per contra, a la DCC tant la preparació de la biblioteca com el cribatge o selecció dels millors compostos, es duen a terme en una sola etapa, on tots els membres de la biblioteca es troben sotmesos a un continu intercanvi dinàmic a través de reaccions reversibles (**Figura 11**). Això fa que la composició de la biblioteca dinàmica sigui capaç de respondre davant d'influències externes, com la presència d'una diana i, per tant, que es desplaci l'equilibri termodinàmic i provoqui un augment de la concentració de les espècies seleccionades per sobre d'aquelles que tenen menys afinitat. És a dir, de totes les possibles combinacions, només s'amplifiquen aquelles que generen els compostos amb major capacitat de reconeixement que, posteriorment, s'aïllen directament de la biblioteca i es caracteritzen. La comparació de la composició final de la biblioteca, en absència i en presència de la diana, permet identificar els lligands més afins amb aquesta.<sup>46-49</sup>



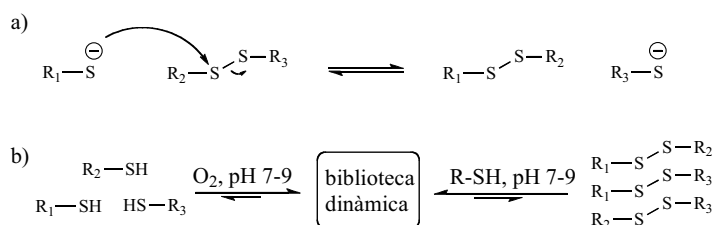
**Figura 11.** Esquema general d'un procés de química combinatòria dinàmica (DCC): els membres de la biblioteca dinàmica estan en constant equilibri entre ells mitjançant reaccions covalents reversibles i interaccions no covalents amb la diana, que selecciona la combinació de fragments més afi.<sup>49</sup>

Tot i que la DCC presenta alguns avantatges respecte la química combinatòria tradicional, el requeriment que la biblioteca dinàmica de compostos estigui sotmesa a un intercanvi continu a través de reaccions reversibles implica, per una banda, que tots els membres de la biblioteca siguin completament solubles al medi de reacció i, per l'altra, que el nombre de reaccions a triar sigui limitat, ja que l'equilibri ha de ser ràpid i les reaccions de bescanvi han de ser compatibles amb el pH del medi (fisiològic quan es treballa amb biomolècules), amb el dissolvent i els diferents grups funcionals presents als membres de la biblioteca i a la diana. A més, el bescanvi ha de transcórrer en condicions de reacció suaus per tal de no interferir en les interaccions de tipus no

covalent involucrades en el reconeixement molecular entre la diana i els lligands. També ha de permetre poder aturar l'equilibri de forma senzilla i innòcua per als membres de la biblioteca, al mateix temps que aïllar i caracteritzar els lligands.<sup>48,49</sup>

A l'hora de preparar una biblioteca combinatòria dinàmica es poden utilitzar reaccions reversibles basades en processos d'intercanvi no covalent, com els enllaços pont d'hidrogen o els de coordinació metall-ligand, tot i que l'aïllament dels compostos seleccionats és un punt problemàtic a causa de la seva labilitat. Més freqüents són els processos d'intercanvi de tipus covalent, d'entre els quals podem destacar les transesterificacions, l'intercanvi d'enllaços amida o d'acetals, l'intercanvi sobre el doble enllaç C=N, la metàtesi d'olefines, o l'intercanvi d'enllaços disulfur, essent aquest últim el més àmpliament emprat en la recerca de lligands, gràcies a la seva compatibilitat amb biomolècules.<sup>46-49</sup>

L'intercanvi d'enllaços disulfur, a més de ser biològicament rellevant en el plegament de proteïnes o en les reaccions redox de la cèl·lula,<sup>49</sup> presenta una sèrie de característiques químiques molt avantatjoses per al desenvolupament de la DCC. Per exemple, en contacte amb l'oxigen atmosfèric, els tiols en solució aquosa s'oxiden ràpidament a disulfurs i en condicions suaus estableixen un intercanvi en presència d'una quantitat catalítica de tiol que, en condicions àcides moderades, es pot aturar sense afectar la diana.<sup>48</sup> Atès que a pH lleugerament bàsic (7-9) hi ha un percentatge de tiol en forma de tiolat, el bescanvi entre enllaços disulfur té lloc a través de l'atac nucleòfil sobre un altre enllaç disulfur, amb la qual cosa provoca el desplaçament d'un altre ió tiolat. En el camp de la DCC, és particularment interessant el fet que aquest procés sigui reversible, ja que d'aquesta manera la generació d'una biblioteca dinàmica es pot dur a terme tant a partir dels monòmers tiol com dels seus corresponents dímers disulfur (**Figura 12**).<sup>49</sup>



**Figura 12.** Mecanisme d'intercanvi d'enllaços disulfur (a). Aproximacions possibles per a la generació d'una biblioteca combinatòria dinàmica mitjançant reaccions reversibles d'intercanvi tiol-disulfur (b).<sup>49</sup>

### 1.3.4.1 Aplicacions de la DCC en la recerca de lligands de biomolècules

Malgrat que la DCC és una metodologia de notable interès en el món de la química supramolecular, una de les aplicacions més atractives és la cerca de lligands de molècules biològicament rellevants, com les proteïnes<sup>50</sup> o els àcids nucleics.<sup>51</sup>

Tot i que l'objectiu d'aquest apartat és exposar l'ús d'aquesta metodologia en la recerca de nous lligands d'àcids nucleics, no podem passar per alt la seva importància en el camp de les proteïnes. En primer lloc, cal destacar com a referència el treball publicat per Lehn i Huc l'any 1997,<sup>52</sup> en el qual es desenvolupa una biblioteca basada en



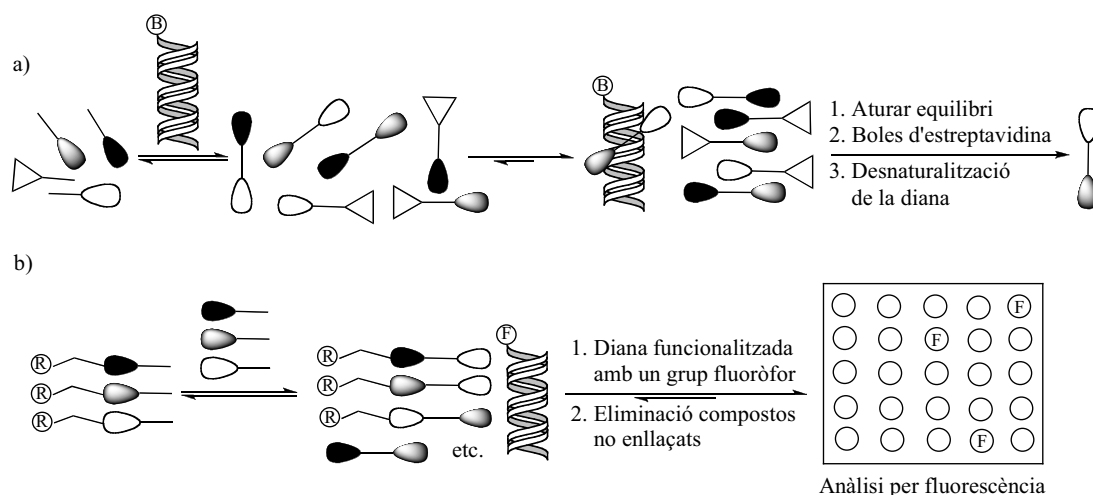
reaccions reversibles d'intercanvi d'enllaços imino amb l'objectiu d'identificar inhibidors de l'enzim anhidrasa carbònica. Posteriorment, els mateixos autors<sup>53</sup> van emprar aquesta metodologia per desenvolupar, d'una banda, inhibidors de l'acetilcolina esterasa, on a partir d'una biblioteca de diferents aldehids i hidrazides van obtenir un compost de tipus bispiridini amb gran capacitat inhibidora, i, de l'altra, un inhibidor de la *Bacillus subtilis* HPr quinasa/fosfatasa, el 2-amino-benzimidazol.<sup>54</sup>

Altrament, les reaccions d'intercanvi de disulfur també han estat àmpliament utilitzades. Per exemple, en el desenvolupament d'una biblioteca de dímers disulfur de carbohidrats com a lligands de la concavalina A,<sup>55</sup> o en la formació d'heterodímers disulfur a partir de derivats dels agents antitumorals tiocolquicina i podofilotoxina.<sup>56</sup> També s'han utilitzat enzims com a catalitzadors de reaccions reversibles, com per exemple, el cas de la formació d'una biblioteca d'anàlegs de l'àcid siàlic mitjançant l'enzim aldolasa.<sup>57</sup>

#### 1.3.4.2 Recerca de lligands d'àcids nucleics mitjançant DCC

Com s'ha comentat anteriorment, en el camp dels àcids nucleics el nombre de reaccions químiques reversibles que es poden emprar és força més limitat, ja que han d'ajustar-se a certes necessitats experimentals, com la congelació de l'equilibri i l'aïllament dels compostos seleccionats. Concretament, cal evitar possibles reaccions de degradació i la desnaturalització de la diana. En segon lloc, tots els membres de la biblioteca han de ser solubles en solució aquosa a pH 5-8, aproximadament. Aquest fet pot ser problemàtic per alguns agents intercalants, com ara alguns cromòfors aromàtics. I, finalment, la reacció química reversible ha de ser compatible amb els grups funcionals presents als àcids nucleics: els grups amino exocíclics, l'esquelet fosfodiéster i les posicions C-4 i C-6 de les pirimidines. A causa d'aquestes limitacions, els exemples que es coneixen d'aplicabilitat de la DCC al camp dels àcids nucleics són més reduïts, tot i que inclouen estudis amb dúplexs de DNA, quadrúplexs de DNA i dianes d'RNA. Ara bé, malgrat que també existeixen alguns exemples d'intercanvi d'enllaços imino o de coordinació amb metalls, les reaccions de bescanvi tiol-disulfur han estat les més emprades, ja que es poden produir en medi aquós a pH fisiològic, i no generen reaccions secundàries amb l'esquelet fosfat dels àcids nucleics ni amb els grups electròfils o nucleòfils dels nucleòtids.<sup>51b</sup>

Generalment, a nivell experimental, la detecció i l'anàlisi dels compostos seleccionats per la diana es realitza a través de la derivatització d'un oligonucleòtid amb biotina, o bé amb un grup fluoròfor. En el primer cas, l'oligonucleòtid biotinitat és immobilitzat mitjançant unes boles magnètiques funcionalitzades amb estreptavidina que, gràcies a la seva forta interacció amb la biotina i a l'ajuda d'un iman, permeten extreure'l de la solució conjuntament amb els compostos que hi han interaccionat. En canvi, a l'altra aproximació, anomenada *resin-bound DCC* (RB-DCC), on la diana es troba funcionalitzada amb un grup fluoròfor, una biblioteca de compostos enllaçats a una resina es combina amb la mateixa biblioteca de monòmers en solució, i s'analitza posteriorment per espectroscòpia de fluorescència (**Figura 13**).<sup>51b</sup>



**Figura 13.** Esquema de la formació d'una biblioteca dinàmica mitjançant el bescanvi d'enllaços disulfur, on la detecció i l'anàlisi dels compostos afins es realitza a través de dues aproximacions: a) diana biotinilada en presència de boles d'estreptavidina, i b) *resin-bound DCC* (RB-DCC).<sup>51b</sup>

A continuació, a partir de l'anàlisi d'alguns treballs publicats als darrers anys, es mostra l'impacte que ha tingut la DCC en el desenvolupament de lligands d'àcids nucleics. El 1997 Miller i col·laboradors<sup>58</sup> van descriure l'obtenció de lligands de DNA a partir de la incubació, en solució aquosa, d'una biblioteca de diverses salicilamides amb  $ZnCl_2$  i un dúplex de DNA immobilitzat a una resina. Un altre exemple representatiu el trobem l'any 2005, quan Balasubramanian i col·laboradors<sup>59</sup> van dissenyar una sèrie de poliamides funcionalitzades amb un grup tiol amb capacitat per enllaçar-se tant a dúplex, com a quàdruplex de DNA. Posteriorment, el 2006 McNaughton i Miller<sup>60</sup> van presentar el concepte de RB-DCC (**Figura 13b**) per al desenvolupament de lligands de dúplex de DNA, on, a diferència de l'altra metodologia (**Figura 13a**), s'evitava la feixuga tasca d'analitzar la biblioteca generada en solució mitjançant cromatografia líquida, i s'obria la possibilitat d'utilitzar biblioteques dinàmiques molt més grans.

Als últims anys, la recerca de lligands amb capacitat per estabilitzar quàdruplex de DNA ha adquirit un gran interès, concretament els quàdruplex de guanina. Com a exemples de l'aplicació de la DCC amb reaccions de bescanvi disulfur, podem destacar el treball realitzat per Balasubramanian i col·laboradors,<sup>61</sup> on s'empra una biblioteca dinàmica basada en la combinació d'un agent intercalant i una seqüència tetrapeptídica, la síntesi de derivats d'acridina,<sup>62</sup> o el desenvolupament de macrocicles oxazol-peptídica amb major especificitat cap el quàdruplex de guanina que cap un dúplex de DNA.<sup>63</sup>

Un altre front a tenir en compte en la recerca de lligands d'àcids nucleics mitjançant la química combinatòria dinàmica, és l'RNA. El primer exemple el trobem al treball de Miller i col·laboradors,<sup>64</sup> on s'utilitza una biblioteca dinàmica basada en reaccions de coordinació entre diferents salicilamides unides a ions de  $Cu(II)$ , que va permetre identificar compostos amb molta més afinitat per unir-se a una estructura d'RNA tipus *hairpin* que a la seva seqüència anàloga de DNA. Altres exemples destacats són, en primer lloc, l'aplicació de la *resin-bound DCC* a través de reaccions de bescanvi tiol-disulfur en el desenvolupament d'una biblioteca de 11.325 compostos, que va permetre

identificar lligands d'una seqüència tipus *hairpin* de 22 nucleòtids, corresponent a una estructura d'RNA del virus VIH-1,<sup>45a</sup> o bé d'una seqüència repetitiva tipus (CUG) involucrada en el desenvolupament de la distròfia miotònica tipus 1 (MD-1).<sup>45b</sup> De fet, per aquest últim exemple, els mateixos autors recentment han demostrat que alguns dels isòsters d'aquests compostos seleccionats mostren, fins i tot, l'activitat biològica desitjada.<sup>65</sup>

En segon lloc, cal destacar el desenvolupament de lligands d'una estructura tipus *stem-loop* del pre-mRNA que codifica la proteïna tau<sup>27</sup> mitjançant la creació d'una biblioteca combinatòria dinàmica formada per una diana modificada amb biotina (**Figura 13a**) i monòmers d'aminoglicòsids, d'agents intercalants i de compostos amb capacitat per reconèixer bases desaparellades.

Tenint en compte els antecedents descrits a la bibliografia sobre l'aplicació de la química combinatòria dinàmica al camp dels àcids nucleics i, en particular, el treball realitzat al nostre grup de recerca,<sup>27</sup> en aquesta tesi doctoral s'han dut a terme els experiments de DCC mitjançant reaccions d'intercanvi d'enllaços disulfur.

## 1.4 Dianes d'RNA terapèuticament rellevants

Tal com s'ha exposat a l'apartat 1.1, l'RNA és una biomolècula molt versàtil dins de la cèl·lula, on hi desenvolupa un gran nombre de funcions biològiques que la converteixen en una diana terapèutica de primer ordre.<sup>6</sup> Per tant, un cop exposats els motius de la seva rellevància, a més de les estratègies emprades en el desenvolupament d'agents farmacològics que actuen a nivell de l'RNA, s'ha considerat convenient descriure algunes estructures secundàries d'RNA que als últims anys han esdevingut dianes d'interès farmacològic. A continuació, classificades en funció de l'organisme al qual pertanyen, es presenten les estructures més destacades.

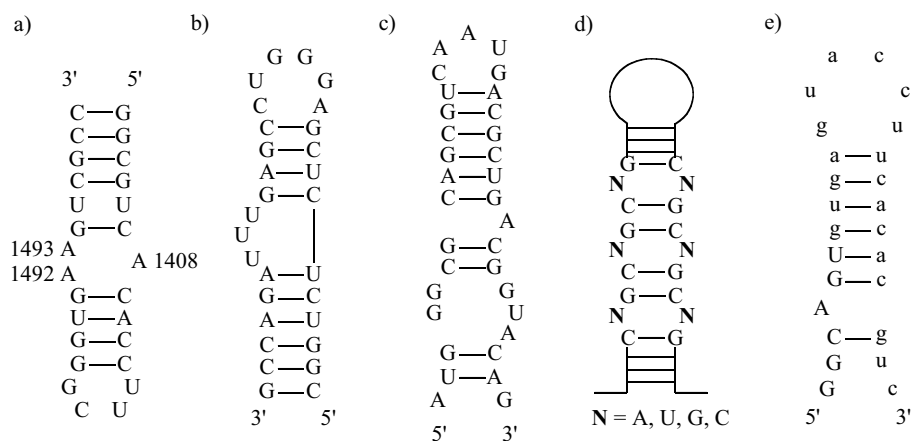
En primer lloc, l'exemple més representatiu el trobem a l'RNA ribosomal dels bacteris, que és una diana bacteriana de gran interès, gràcies a que, d'una banda, representa la majoria dels RNAs cel·lulars i, de l'altra, té un paper essencial a la síntesi proteica.<sup>6,66</sup> El ribosoma procariòtic, constituït per un 65% d'RNA ribosomal (rRNA), està format per dues subunitats, la petita (30S) i la gran (50S), que s'encarreguen de supervisar, respectivament, la correcta incorporació del tRNA en el creixement de la cadena polipeptídica, i de catalitzar la formació de l'enllaç peptídic. Concretament, a la subunitat 30S, l'rRNA 16S forma una estructura secundària anomenada *A-site* (**Figura 14a**) que, en condicions de funcionament adequades, experimenta un canvi conformacional a la regió del *loop* intern quan s'enllaça al corresponent tRNA. Això provoca que les adenines A1492 i A1493 quedin exposades cap enfora de la doble hèlix, fet que ocasiona la correcta incorporació dels aminoàcids a la cadena polipeptídica. Aquest important paper en la translació del material genètic ha ocasionat que l'*A-site* sigui l'estructura secundària d'RNA més explorada, i que s'hagi descobert que compostos com els aminoglicòsids, les macròlides, les tetraciclins i les oxazolidinones deuen la seva activitat antibacteriana al fet d'enllaçar-s'hi i alterar-ne la síntesi proteica.<sup>2a,6</sup> En aquest punt, és important comentar que l'any 2009 es va concedir el premi Nobel de Química a la seva determinació estructural mitjançant cristal·lografia de raigs X.

Una altra diana bacteriana de gran interès terapèutic són els *riboswitches* (veure apartat 1.2.2.5), on agents com la roseoflavina (**Figura 10b**) o el pirofosfat de tiamina (**Figura 10a**) han mostrat capacitat per interrompre el metabolisme cel·lular.<sup>38b</sup>

En una altra categoria podem incloure els RNAs virals que, tenen un paper molt destacat en el desenvolupament de malalties humanes ocasionades per virus o retrovirus, on els punts de regulació es troben localitzats en zones de l'mRNA no codificant.<sup>38b</sup> L'exemple més representatiu correspon al virus d'immunodeficiència adquirida tipus I (VIH-1) que, un cop incorpora el seu RNA al DNA de la cèl·lula hosta, realitza la seva transcripció gràcies a l'acció d'una proteïna, *HIV trans-activator of transcription (Tat)*. Aquesta proteïna reconeix i s'enllaça a la regió del *bulge* d'una estructura secundària d'RNA tipus *hairpin loop*, el *trans-activating response element (TAR)*, i activa la transcripció dels gens virals. És per això que la recerca de molècules petites amb capacitat per reconèixer l'RNA *TAR* (**Figura 14b**) i inhibir la formació del complex *Tat-TAR*, ha esdevingut una estratègia de gran interès terapèutic.<sup>2a,6</sup>

Per altra banda, també cal destacar el paper de la proteïna *Rev*, que té com a funció transportar l'RNA viral al citoplasma mitjançant la unió a un segment d'RNA, anomenat *Rev response element (RRE)*, que està format per diverses estructures secundàries tipus *stem-loop* (**Figura 14c**). Per tant, amb l'objectiu d'inhibir la formació d'aquest complex ribonucleoproteic, i la conseqüent afectació en el procés de maduració i de replicació de l'RNA viral, s'estan buscant molècules petites amb capacitat per reconèixer l'RNA *RRE*, com per exemple els aminoglicòsids.<sup>2a,6</sup>

Altres dianes d'RNAs virals interessants són els fragments del *internal ribosome entry site (IRES)* corresponent al virus de l'hepatitis C (*HVC*), que s'enllaça a la subunitat 40S del ribosoma de la cèl·lula hosta per establir un control en la síntesi proteica.<sup>6</sup> Les estratègies terapèutiques estudiades per la inhibició de l'activitat del *IRES* del virus de l'hepatitis C són la teràpia antisentit i els experiments amb siRNAs.<sup>38b</sup>



**Figura 14.** Representació de l'estructura secundària de: a) RNA *A-site*,<sup>18</sup> b) RNA *TAR* del virus VIH-1,<sup>18</sup> c) RNA *RRE* del virus VIH-1,<sup>15</sup> d) esquema d'un dúplex d'RNA amb repeticions de nucleòtids,<sup>6</sup> e) estructura secundària del pre-mRNA de tau.<sup>67</sup>

Finalment, un altre tipus d'RNAs rellevants són els mRNAs humans, on l'aparició de mutacions provoca alteracions al seu processat alternatiu, i és la causa de moltes

malalties humanes com el càncer, malalties neuromusculars, o malalties neurodegeneratives.<sup>67</sup> Un exemple destacat el trobem en l'expansió de repeticions de nucleòtids localitzades en diverses regions del pre-mRNA i que són la causa de l'aparició d'un gran nombre de malalties (**Figura 14d**). Concretament, la distròfia miotònica s'origina per l'expansió de repeticions de tres i quatre nucleòtids (CTG i CCTG) que, de forma consecutiva, originen l'expansió de regions de bases desaparellades en l'estructura d'RNA, com ara *bulges*, que alteren el seu processat alternatiu a través del bloqueig de l'acció de la proteïna reguladora *MBNL1*.<sup>6</sup> Així doncs, amb l'objectiu de corregir aquesta alteració, diversos grups d'investigació estan centrats en el disseny de molècules petites amb capacitat per reconèixer específicament aquestes repeticions de bases.<sup>6,28</sup>

En segon lloc, una altra diana rellevant és l'estructura *stem-loop* localitzada al final de l'exó 10 del pre-mRNA del gen *MAPT* que codifica la proteïna tau (**Figura 14e**). La presència de mutacions en aquesta seqüència desestabilitza l'estructura secundària i produeix alteracions en el processat alternatiu. Això provoca l'aparició de malalties neurodegeneratives, anomenades tauopaties, com ara la *FTDP-17 (Frontotemporal Dementia and Parkinsonism linked to chromosome 17)*.<sup>68</sup> Així doncs, tal com s'exposarà al següent bloc de forma detallada, una estratègia per corregir aquesta anomalia es basaria en l'ús de lligands capaços d'estabilitzar aquesta estructura secundària.

Finalment, un altre tipus de diana d'RNA important a nivell terapèutic associada a l'aparició del càncer és la telomerasa, una ribonucleoproteïna encarregada de controlar la longitud dels telòmers que, en cèl·lules tumorals, veuen augmentada la seva activitat. Per tant, la recerca d'inhibidors de la seva activitat representa una estratègia de teràpia contra el càncer.<sup>38b,69</sup>

## **2 L'RNA codificant de la proteïna tau com a diana terapèutica**

---

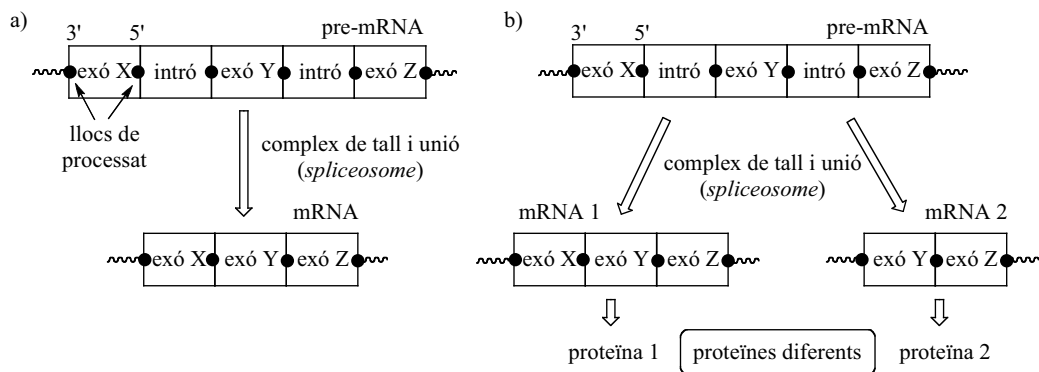
Com s'ha comentat anteriorment, l'mRNA és una diana biològica de gran interès farmacològic, ja que els errors apareguts durant el seu processat acaben desencadenant moltes malalties humanes. Concretament, en aquesta tesi doctoral ens hem centrat en el pre-mRNA que codifica la proteïna tau, atès que les anomalies en el processat alternatiu, tal com s'explicarà a continuació, provoquen l'aparició d'un tipus de malalties neurodegeneratives anomenades tauopaties.

### **2.1 Processat alternatiu del pre-mRNA**

Les seqüències de DNA que codifiquen determinats gens es transcriuen al nucli cel·lular per produir RNAs nuclears molt heterogenis. La majoria d'aquests transcrits primaris (pre-mRNA), que contenen regions no codificants (introns) intercalades entre les regions codificants (exons), són processats per donar lloc als corresponents RNAs missatgers madurs (mRNAs) que, un cop transportats al ribosoma, són traduïts a proteïnes.

El processat (*splicing*) d'aquests transcrits primaris consisteix en l'eliminació de les seqüències no codificants (introns) i la unió dels exons (**Figura 15a**). A les cèl·lules eucariotes, aquest procés està catalitzat per un gran complex ribonucleoproteic anomenat complex de tall i unió (*spliceosome*), que està constituït per cinc complexos ribonucleoproteics més petits, *U-rich small nuclear ribonucleoproteins (UsnRNP)* i un gran nombre de factors proteics, entre els quals s'hi inclouen enzims i proteïnes d'unió amb l'RNA. La seva funció transcorre mitjançant dues reaccions de trans-esterificació successives. En primer lloc, es produeix el reconeixement de seqüències conservades situades a la unió entre exons i introns, anomenades llocs de processat 5' i 3' (*splicing sites*). I, en segon lloc, mitjançant un procés catalític, es produeix l'eliminació dels introns i la unió dels exons.<sup>67,70-74</sup>

Cal destacar que l'mRNA madur obtingut només representa un 10% del total del seu transcrit primari, ja que en un pre-mRNA, al voltant del 90% correspon a seqüències intròniques, de tamany més gran que els exons.<sup>72</sup>



**Figura 15.** Esquemes corresponents als dos tipus de processament del pre-mRNA: a) processament o *splicing*, i b) processament alternatiu o *alternative splicing*.

Per altra banda, als organismes vertebrats, seqüències idèntiques de pre-mRNA poden ser processades de forma diferent per donar lloc a diferents mRNAs madurs i, conseqüentment, a diferents proteïnes (**Figura 15b**). A més, atès que la majoria dels pre-mRNAs experimenten aquest processament alternatiu i que el nombre de gens en humans i en organismes més simples és similar, posa de manifest la importància del processament alternatiu en la diversitat proteínica del genoma humà.<sup>73,75</sup>

És important remarcar que aquesta complexitat biològica, capaç de generar una gran diversitat funcional i una riquesa proteica a partir d'un nombre limitat de gens, és també un punt de vulnerabilitat. L'aparició de mutacions en seqüències del pre-mRNA implicades en el seu processament provoca la desregulació d'aquest procés dinàmic, on intervien diferents interaccions entre RNAs i proteïnes, i causa l'aparició de malalties, particularment malalties neurodegeneratives, neuromusculars, o càncer.<sup>67,76</sup> Aquestes mutacions es poden classificar en funció del seu mecanisme d'afectació al processament del pre-mRNA. En primer lloc, destaquen les que afecten als mecanismes de reconeixement dels llocs de processament (*splicing sites*), localitzades, per una banda, en seqüències situades entre els introns i els exons i, per l'altra, en seqüències internes exòniques i intròniques, fet que afecta la regulació del processament alternatiu i la conseqüent relació de proteïnes isoformes. Les primeres causen aproximadament el 10% dels desordres hereditaris en humans, mentre que les segones són responsables d'un 25%. En són un exemple algunes malalties com la deficiència de l'hormona del creixement, la síndrome de Fraiser, la fibrosi quística, o la demència frontotemporal amb parkinsonisme associada al cromosoma 17 (*FTDP-17*).

Un altre tipus de mutacions són aquelles que afecten la maquinària del processament o els factors reguladors del processament alternatiu. En el primer cas són responsables de l'aparició de malalties com l'atròfia muscular espinal (*SMA*) o la retinitis pigmentosa autosomal dominant (*adRP*), mentre que les altres tenen relació amb l'aparició de varis tipus de càncers o desordres a causa de la repetició de seqüències de trinucleòtids causants de malalties com la distròfia miotònica.<sup>73,76</sup>

Finalment, un altre punt que cal destacar és el fet que el processament alternatiu del pre-mRNA no només està regulat per les seqüències situades als llocs de processament 5' i 3' (*splicing sites*), sinó que també hi intervien altres factors (*splicing regulatory motifs*),

com els elements d'amplificació i de silenciació genètica (*enhancer* i *silencer*) localitzats als introns i exons, l'arquitectura dels exons i introns, la velocitat del processat o, fins i tot, la pròpia estructura secundària del pre-mRNA,<sup>71,77,78</sup> tal com s'exposarà més detalladament al següent apartat.

### 2.1.1 Influència de l'estructura secundària del pre-mRNA en el processat alternatiu

La tendència natural de l'RNA per formar estructures secundàries i terciàries estables té un paper clau en la regulació del processat del pre-mRNA. Una mostra d'això és la capacitat d'una estructura secundària per influir en el reconeixement de l'exó durant el seu processat alternatiu, tant mitjançant la presència d'elements estructurals que dificultin l'accés a les seqüències conservades, com a través de variacions en la seva disposició espacial.<sup>71</sup> Un primer exemple representatiu el trobem al gen *FN* (*fibronectin*), concretament a dues seqüències localitzades a l'exó *EDA*, corresponents als elements d'amplificació i de silenciació genètica (*enhancer* i *silencer*). La introducció, tant en ratolins com en humans, de mutacions en una seqüència del *enhancer* genera canvis conformacionals a una estructura secundària de l'RNA que, com a conseqüència, impedeix la correcta activitat de la proteïna reguladora *SR* i afecta la inclusió de l'exó *EDA* durant el processat alternatiu. D'aquesta manera, els autors d'aquest treball posen de manifest la influència exercida per l'estructura secundària de l'RNA en l'acció d'un element regulador del processat alternatiu.<sup>71,79</sup> Un altre exemple és el que correspon a dues seqüències anomenades *ISE-2* i *ISAR*, situades entre els exons IIIb i IIIc del gen humà *FGFR2*, necessàries per a la regulació del seu processat alternatiu. La substitució d'una de les seqüències per una altra completament diferent, encara que mantingui l'estructura secundària *stem-loop*, no genera cap alteració en el processat alternatiu. D'aquesta manera es demostra que la seva funció reguladora no radica en la seqüència, sinó en la seva estructura secundària.<sup>71,74</sup>

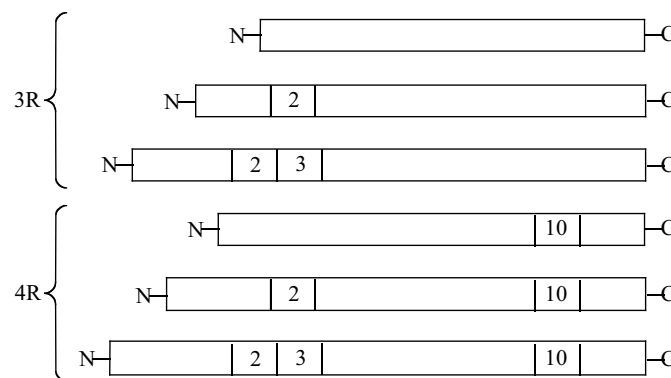
Una altre fet biològicament rellevant és l'efecte que té en el processat alternatiu la desestabilització d'una estructura secundària. Una mostra d'això la trobem en estudis que demostren com les mutacions desestabilitzen l'estructura *stem-loop* localitzada al lloc de processat 5' de l'exó 7 del gen *SMN2* (*survival motor neuron*) i provoquen la inclusió d'aquest exó a l'mRNA madur, així com el conseqüent desenvolupament de l'atròfia muscular espinal (*SMA*).<sup>80</sup> Anàlogament, és particularment interessant destacar la implicació de l'estabilitat d'una altra estructura secundària tipus *stem-loop*, localitzada a prop del lloc de processat (*splice-donor site*) de l'intró posterior a l'exó 10 del gen tau, en el desenvolupament de la demència frontotemporal amb parkinsonisme associada al cromosoma 17 (*FTDP-17*).<sup>68</sup>

## 2.2 Processat alternatiu del pre-mRNA de la proteïna tau

La proteïna tau, particularment abundant als axons de les neurones, és una proteïna microtubular necessària per a la polimerització i l'estabilitat dels microtúbuls, i per al transport axonal de les neurones. Es troba codificada pel gen *MAPT* (*microtubule-associated protein tau*), localitzat al cromosoma 17, i estructuralment consta de dos dominis: l'extrem *N-terminal* (*projection domain*) i l'extrem *C-terminal* (*microtubule-binding domain*), que són els que li confereixen les seves propietats biològiques.<sup>70,81-83</sup>



Al cervell sa d'un humà adult, el processat alternatiu del gen *MAPT* pot generar fins a un total de sis proteïnes (proteïnes isoformes de tau). Més concretament, dels 16 exons que conté el gen, el processat alternatiu dels exons 2, 3 i 10 del pre-mRNA, origina 6 proteïnes isoformes amb els extrems *N* i *C*-terminals diferents. El processat alternatiu dels exons 2 i 3, localitzats a l'extrem *N*-terminal, codifica una seqüència de 29 aminoàcids i dóna lloc a tres isoformes: una amb la presència dels exons 2 i 3, una altra amb només l'exó 2, i una tercera sense ambdós exons. En canvi, el processat alternatiu de l'exó 10, que codifica una seqüència de 31 o 32 aminoàcids i que es troba a l'extrem *C*-terminal, només genera 3 isoformes que el contenen. A més, sembla ser que la inclusió o exclusió d'aquest exó està lligada a la presència de 3 o 4 dominis de tubulina (isoformes de tau 3R i 4R). De manera que, de les 6 proteïnes isoformes, a més de considerar per a cadascuna d'elles les isoformes derivades del processat dels exons 2 i 3, se'n poden diferenciar les 3R, quan no s'hi inclou l'exó 10, i les 4R, que sí l'inclouen. (**Figura 16**). És important recalcar que en un cervell humà sa, la relació entre les isoformes 3R i 4R és aproximadament 1, i la seva variació, que afecta els nivells d'activitat de la regulació de les tau quinases i fosfatases, està relacionada amb l'aparició de malalties neurodegeneratives.<sup>70,81-86</sup>

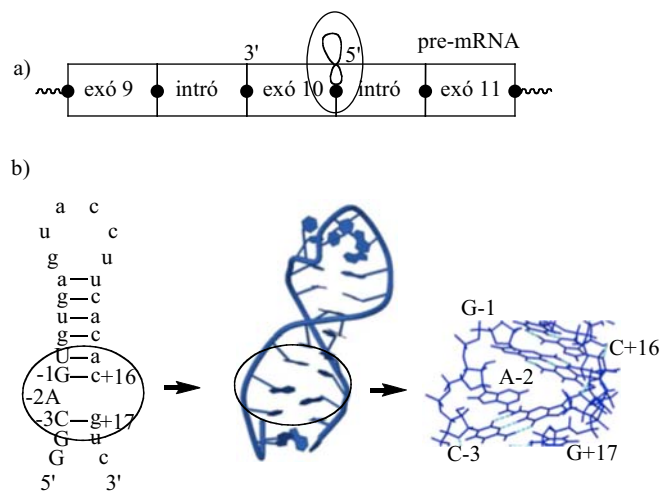


**Figura 16.** Representació esquemàtica de les proteïnes isoformes de tau originades a partir del processat alternatiu del pre-mRNA del gen *MAPT*.<sup>70</sup>

Moltes malalties neurodegeneratives associades a les proteïnes tau, o també anomenades tauopaties, com l'alzèimer o la *FTDP-17*, entre d'altres, tenen en comú la formació d'agregats intraneuronals insolubles formats per filaments de proteïnes tau hiperfosforilades. L'any 1998, estudis independents van demostrar que algunes mutacions al gen *MAPT* ocasionaven disfuncions en la proteïna tau, amb la conseqüent neurodegeneració.<sup>70,87</sup> En estudis posteriors s'han englobat aquestes mutacions en dos grups. Per una banda, les que alteren la capacitat de la proteïna tau per associar-se amb els microtúbuls i, per l'altra, les que afecten el processat alternatiu de l'exó 10 de tau i varien la relació entre les proteïnes isoformes 3R i 4R.<sup>70</sup> A diferència d'algunes malalties, com la síndrome de Down o la malaltia de Pick, on la isoforma 3R es troba sobreexpressada, en el cas de la *FTDP-17* s'ha observat una major presència de la isoforma 4R. Aquest fet posa de manifest que no es pot assegurar quin dels dos casos és més tòxic per la cèl·lula, si una major presència de la isoforma 3R, o una de la 4R. Però el que sí que és significatiu, és que la pèrdua de la seva relació equitativa ocasiona el desenvolupament de les tauopaties.<sup>82</sup>

### 2.2.1 Estructura *stem-loop* a la zona del final de l'exó 10 del pre-mRNA de tau i efecte de les mutacions en la seva estabilitat termodinàmica

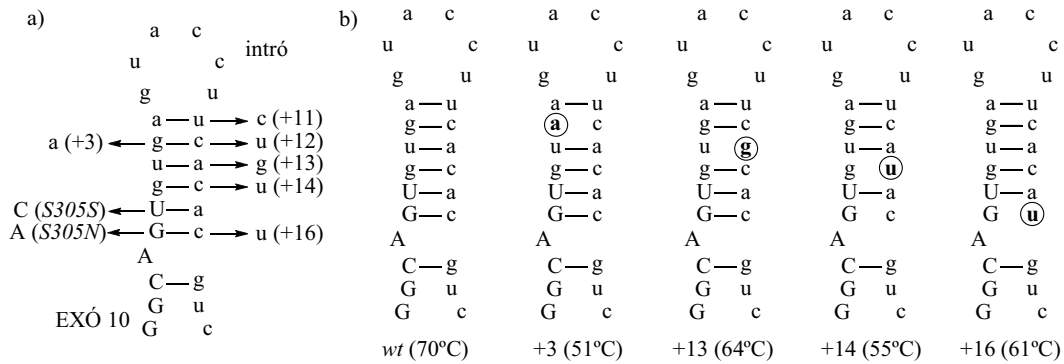
A partir del descobriment de les disfuncions associades a la presència de mutacions en el gen codificant de la proteïna tau, es va plantejar que l'existència d'una estructura secundària, localitzada entre el final de l'exó 10 i el lloc de processat 5' (*splice site*) del pre-mRNA, tindria un paper destacat en la regulació del processat alternatiu. Aquesta hipòtesi es va veure corroborada l'any 1999 quan Varani i col·laboradors<sup>68</sup> van publicar un treball on, mitjançant la ressonància magnètica nuclear, es va determinar l'estructura tridimensional d'un oligoribonucleòtid que engloba la zona d'unió entre l'exó 10 i l'intró del lloc de processat 5'. Aquest estudi estructural en solució va confirmar les anteriors prediccions, i va revelar que en aquesta zona es forma una estructura estable tipus *stem-loop*, on la regió del *stem* consisteix en una doble hèlix de 7 parells de bases. Com a element estructural característic, cal destacar la presència d'una adenina desaparellada que forma una protuberància o *bulge* i que, a més, s'intercala al dúplex de la doble hèlix. La zona del *loop* consta de 6 nucleòtids desaparellats amb capacitat per adaptar múltiples conformacions (**Figura 17**).



**Figura 17.** a) Representació esquemàtica de l'estructura tipus *stem-loop*, localitzada a l'extrem 5' del lloc de processat del pre-mRNA de tau del *H. sapiens*, implicada en la regulació de la inclusió/exclusió de l'exó 10. b) Estructura secundària tipus *stem-loop* descrita per Varani i col·laboradors<sup>68</sup> del pre-mRNA de la proteïna tau (estructura extreta de la base de dades PDB). Les nucleobases en majúscula corresponen a la regió de l'exó 10, i en minúscula a les de l'intró.

L'estudi de pacients amb *FTDP-17* ha permès identificar les mutacions al gen de tau associades amb l'aparició de la malaltia. En funció del seu efecte, es poden diferenciar aquelles que modifiquen la interacció de la proteïna tau amb els microtúbuls (mutacions *missense* o *deletion*), les que alteren el processat alternatiu i generen una relació aberrant entre les isoformes 3R i 4R (mutacions *silent*), o les que causen ambdues accions.<sup>84-86,88</sup> Les diferents mutacions localitzades a la seqüència d'aquesta estructura secundària afecten el processat alternatiu de l'exó 10, concretament, dues d'elles es troben al final de la seqüència d'aquest exó (S305N, S305S), i set es troben localitzades a la seqüència intrònica del lloc de processat de l'intró 10: +3, +11, +12, +13, +14, +16,

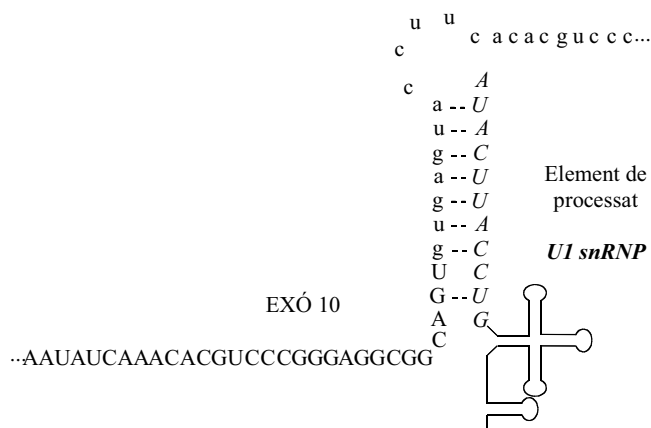
i +19.<sup>85</sup> El fet que aquestes mutacions es trobin a la part superior del dúplex, ocasiona que tinguin un notable efecte desestabilitzant en l'estructura secundària, tal com s'ha demostrat en diversos estudis d'estabilitat tèrmica amb les seqüències mutades incorporades a oligoribonucleòtids model (**Figura 18**).<sup>68</sup>



**Figura 18.** Representació de l'estructura *stem-loop* del pre-mRNA de tau (en majúscules es descriu la seqüència exònica, i en minúscules la intrònica): a) Mutacions de l'estructura *stem-loop* localitzada a l'interfase entre l'exó 10 i l'intró següent.<sup>84</sup> b) Representació de les estructures nativa (*wt*) i mutades (+3, +13, +14, +16).<sup>68</sup> Els valors de temperatura entre parèntesi a la part inferior de cada estructura corresponen a la  $T_m$ , i les nucleobases originades en cada mutació es troben encerclades i en negra.

Tots aquests estudis semblen indicar que hi ha una relació directa entre l'aparició de les mutacions i el desenvolupament de tauopaties, ja que la desestabilització d'aquesta estructura secundària facilitaria l'accés de l'element de processat *UI snRNP* al lloc d'interacció 5', i ocasionaria un augment de la inclusió de l'exó 10.<sup>70,84,87</sup> En canvi, en un cervell sa, aquesta estructura *stem-loop* és prou estable perquè l'accés del complex ribonucleoproteic *UI snRNP* sigui limitat i, per tant, no es generi un augment de les isoformes que contenen l'exó 10 (4R) (**Figura 19**).<sup>68,84</sup>

Per altra banda, estudis posteriors han confirmat l'existència *in vivo* d'aquesta estructura secundària *stem-loop*, i l'existència d'una relació directa entre la seva estabilitat termodinàmica i la regulació de la inclusió de l'exó 10 durant el processat alternatiu. En un estudi publicat l'any 2006<sup>88</sup> es va demostrar la seva existència mitjançant l'ús d'un oligoribonucleòtid antisentit. A més, també es va comprovar que, anàlogament a l'element regulador *UI snRNP*, l'efectivitat d'aquest oligonucleòtid antisentit per inhibir el processat de l'exó 10 estava directament lligada amb l'estabilitat d'aquesta estructura secundària.



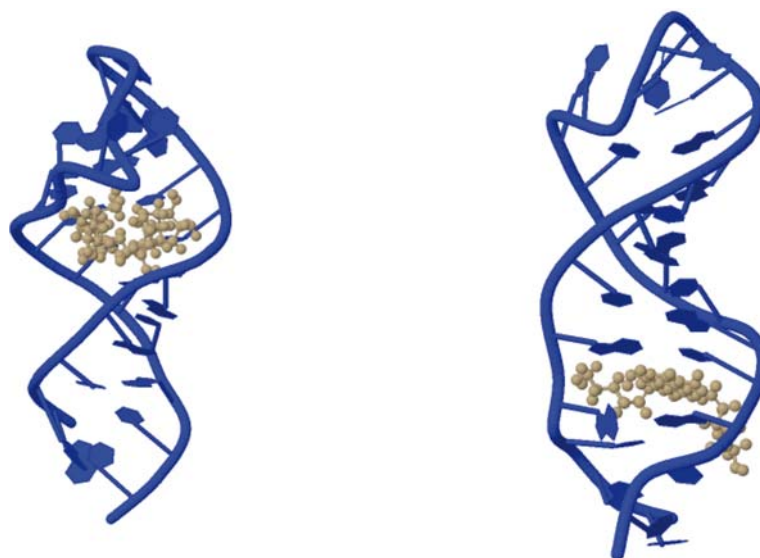
**Figura 19.** Esquema de la funció reguladora del *stem-loop* en la interacció del pre-mRNA amb l'element de processat *U1 snRNP*, on la seva desestabilització en facilita l'accés. En majúscules s'indica la seqüència exònica; en minúscules, la intrònica; i en majúscules i cursiva la seqüència oligoribonucleotídica del complex ribonucleoproteic *U1 snRNP*.<sup>83</sup>

### 2.2.2 Interacció de lligands amb l'estructura *stem-loop* implicada en el processat alternatiu del pre-mRNA de tau

Tal com s'ha comentat a l'apartat anterior, la dependència entre l'estabilitat termodinàmica de l'estructura *stem-loop* localitzada al final de l'exó 10 del pre-mRNA de tau i la seva capacitat de regulació del processat alternatiu, ha ocasionat que es postuli aquesta estructura d'RNA com una diana de gran rellevància per a la recerca de nous agents terapèutics que, a través de la seva estabilització, permetrien regular el processat alternatiu per tal d'evitar el desenvolupament de tauopaties com la *FTDP-17*.

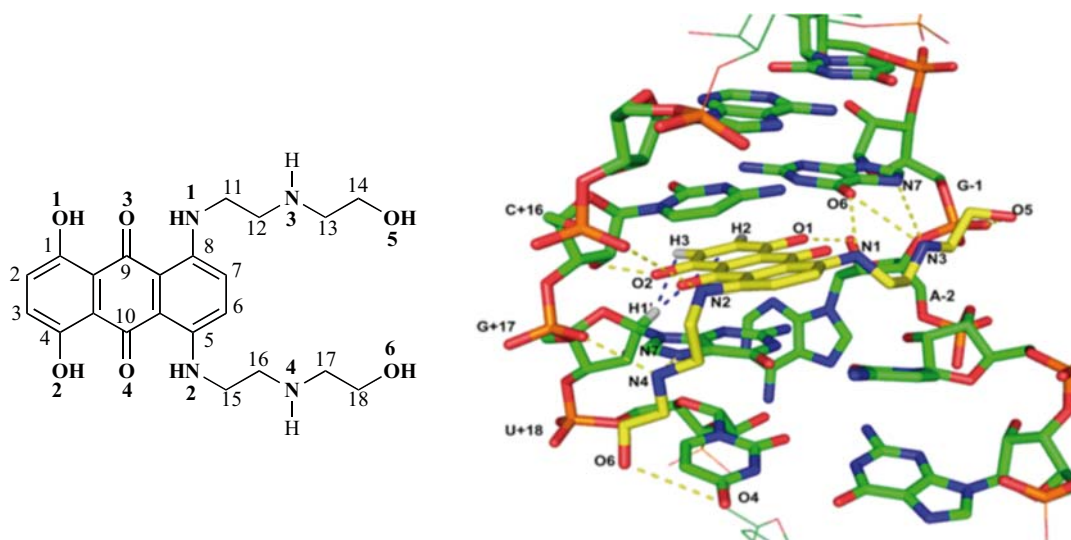
Així doncs, una estratègia molt atractiva consisteix en el desenvolupament de molècules orgàniques petites amb capacitat per unir-se, amb gran afinitat i especificitat, a aquesta estructura a través del reconeixement d'elements estructurals característics, com per exemple, la regió del *bulge* d'adenina. Cal destacar que, malgrat la seva rellevància terapèutica, actualment només s'han descrit a la bibliografia tres famílies de lligands amb certa capacitat estabilitzant. El primer treball correspon a la publicació de Varani i col·laboradors l'any 2000,<sup>89</sup> on es descriu mitjançant un estudi estructural de ressonància magnètica nuclear la unió de la Neomicina B al solc major, molt a prop del *loop*, de la doble hèlix d'RNA (**Figura 20**). A més, els estudis d'estabilitat indiquen que l'aminoglicòsid és capaç d'estabilitzar tant la seqüència nativa com les mutades (+3, +13, +14 i +16), augmentant la temperatura de fusió ( $T_m$ ) entre 8 i 12 °C.

Més recentment, Varani i col·laboradors<sup>90</sup> han descrit que el fàrmac anticancerígen Mitoxantrona, seleccionat d'entre una biblioteca de 110.000 compostos,<sup>26d</sup> té una bona afinitat i una gran capacitat estabilitzant sobre la seqüència nativa de l'RNA diana. A més, l'estudi estructural per RMN del complex RNA-ligand, revela que aquest derivat d'antraquinona s'intercala preferentment a la regió del *bulge* de l'adenina adjacent al parell de bases G-C (**Figura 20**).<sup>90</sup>



**Figura 20.** Complex Neomicina B-RNA (esquerra) i Mitoxantrona-RNA (dreta). L'RNA correspon a l'estructura *stem-loop* del pre-mRNA de tau (*protein data bank*).

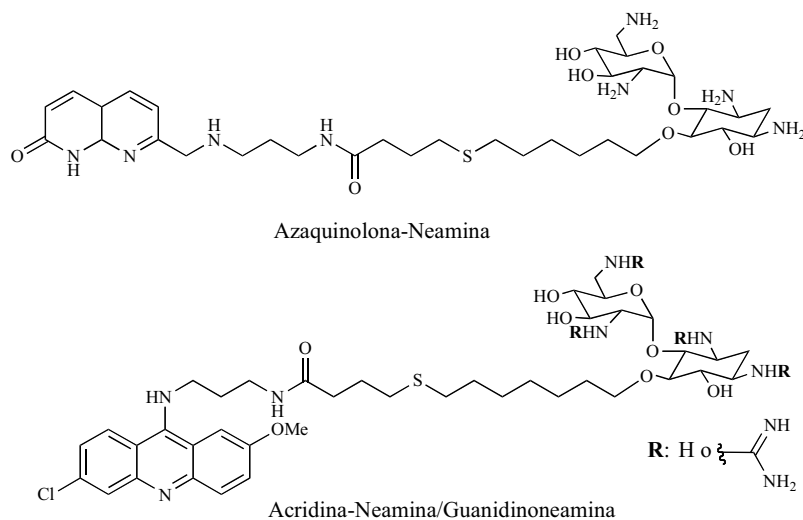
Concretament, tal com es mostra a la **Figura 21**, les interaccions electrostàtiques dels grups amino *N3/4* de la mitoxantrona amb l'*O6* de la G-1 i el *N7* de la G+17, tenen un paper rellevant en el reconeixement específic dels parells G-C. A partir d'aquests resultats prometedors, els mateixos autors van sintetitzar posteriorment diversos anàlegs de mitoxantrona amb una afinitat i una capacitat estabilitzant millorades, per exemple mitjançant la substitució dels hidroxils 5 o 6 per grups amino.<sup>26e</sup>



**Figura 21.** Amplificació de la regió del *bulge* de l'estructura del complex entre la Mitoxantrona i l'estructura *stem-loop* del pre-mRNA de tau representada a la **Figura 20**.<sup>90</sup>

Finalment, l'últim exemple publicat correspon al treball realitzat al nostre grup d'investigació,<sup>27,91</sup> en el qual es van identificar, mitjançant la química combinatòria

dinàmica, una sèrie de lligands basats en la combinació de fragments heteroaromàtics, un derivat d'azaquinolona i dues acridines, amb un aminoglicòsid petit, la neamina o el seu derivat guanidinilat, la guanidinoneamina (**Figura 22**).



**Figura 22.** Estructura d'alguns lligands basats en la combinació de la neamina o la guanidinoneamina, amb un compost amb capacitat per reconèixer adenines desaparellades (azaquinolona) o amb un agent intercalant (acridina).<sup>27,91</sup>

En aquest estudi es va comprovar que els lligands basats en la combinació acridina-neamina eren unes 10 vegades més afins amb l'estructura nativa de l'RNA que el corresponent lligand azaquinolona-neamina. A més, la seva capacitat estabilitzadora era el doble amb la seqüència nativa i amb les mutades +3 i +14 unes 5 i 3 vegades més gran, respectivament. Per tant, a partir d'aquests resultats es va poder corroborar que els lligands més afins eren també els més estabilitzants.<sup>91</sup> A més, els estudis de dicromisme circular van revelar que la interacció dels lligands no generava canvis significatius a l'estructura *stem-loop* i van suggerir, juntament amb altres estudis biofísics, que tenien un lloc d'unió preferent a prop de la regió del *bulge* d'adenina. Així doncs, aquests resultats<sup>27,91</sup> i els descrits prèviament per Varani i col·laboradors,<sup>26e,90</sup> van obrir la porta al desenvolupament de nous lligands d'aquesta estructura *stem-loop* del pre-mRNA de tau.

### 3 Objectius

---

Atès que als últims anys l'RNA ha adquirit gran rellevància biològica, el desenvolupament de molècules petites amb capacitat per interaccionar selectivament i específicament amb una estructura secundària concreta, ha esdevingut una alternativa molt interessant per trobar nous agents terapèutics. Concretament, el descobriment de l'estructura *stem-loop* localitzada al final de l'exó 10 del pre-mRNA del gen codificant de la proteïna tau, la desestabilització de la qual està relacionada amb l'aparició de malalties neurodegeneratives com la *FTDP-17*, l'ha convertit en una diana terapèutica molt rellevant per a la cerca de compostos que la puguin reconèixer i estabilitzar, amb l'objectiu final de restaurar la seva funció reguladora del processat alternatiu.

A partir dels antecedents descrits a la bibliografia,<sup>26e,27,90</sup> l'objectiu principal d'aquesta tesi doctoral ha consistit en el desenvolupament de nous lligands d'aquesta estructura d'RNA més afins, selectius i amb una bona capacitat estabilitzadora, particularment sobre les seqüències mutades. En una primera fase, ens hem centrat en l'ús de la química combinatòria dinàmica, prèviament optimitzada al nostre grup,<sup>91</sup> per identificar noves famílies de lligands que, en la segona fase del treball, han estat avaluats mitjançant diversos estudis biofísics amb les seqüències nativa i mutades associades amb l'aparició de la *FTDP-17*.

La memòria corresponent al treball realitzat en aquesta tesi doctoral s'ha dividit en dos grans capítols:

- En primer lloc, ens hem centrat en la preparació d'una biblioteca dinàmica de compostos, tenint en compte alguns dels motius estructurals de reconeixement específics, com els parells de bases no canònics G-U, localitzats tant a la seqüència nativa com a les mutades, la zona del *bulge* d'adenina, on la mitoxantrona s'intercala amb gran afinitat,<sup>90</sup> o la zona del *loop*, punt d'interacció de la neomicina B.<sup>89</sup>
- Un cop identificats els nous lligands mitjançant experiments de DCC, s'han sintetitzat a gran escala per dur a terme els estudis d'interacció corresponents amb les seqüències nativa i mutades de la diana mitjançant diverses tècniques biofísiques, com ara l'espectroscòpia de fluorescència, d'UV-Visible i la ressonància magnètica nuclear.

---

## 4 Bibliografia

---

1. a) Blackburn, G. M.; Gait, M. J. *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*, capítol 2., *DNA and RNA structure*, Oxford University Press, New York, 1996, pp 16-67; b) Meister, G. *RNA Biology. An Introduction*, Part One., *mRNA Biology. Introduction*, Wiley-VCH, Weinheim, 2011, pp 3-15.
2. a) Hergenrother, P. J.; Thomas, J. R. "Targeting RNA with small molecules". *Chem. Rev.*, **2008**, 108, 1171-1224; b) Chow, C. S.; Bogdan, F. M. "A structural basis for RNA-ligand interactions". *Chem. Rev.*, **1997**, 97, 1489-1513.
3. Holbrook, S. R. "Structural Principles from large RNAs". *Annu. Rev. Biophys.*, **2008**, 37, 445-464.
4. Svoboda, P.; Di Cara, A. "Hairpin RNA: a secondary structure of primary importance". *Cell Mol. Life Sci.*, **2006**, 63, 901-908.
5. Tor, Y. "RNA and the small molecule world". *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1999**, 38, 1579-1582.
6. Guan, L.; Disney, M. D. "Recent advances in developing small molecules targeting RNA". *ACS Chem. Biol.*, **2012**, 7, 73-86.
7. Georgianna, W. E.; Young, D. D. "Development and utilization of non-coding RNA-small molecule interactions". *Org. Biomol. Chem.*, **2011**, 9, 7969-7978.
8. Sharp, P. A. "The centrality of RNA". *Cell*, **2009**, 136, 577-580.
9. Scott, W. G. "Ribozymes". *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2007**, 17, 280-286.
10. a) Hengartner, M.O.; Jovanovic, M. "miRNAs and apoptosis: RNAs to die for". *Oncogene*, **2006**, 25, 6176-6187; b). Kloosterman, W. P.; Plasterk, R. H. "The diverse functions of MicroRNAs in animal development and disease". *Dev. Cell*, **2006**, 11, 441-450; c) Weinberg, M. S.; Wood, M. J. "Short non-coding RNA biology and neurodegenerative disorders: novel disease targets and therapeutics". *Hum. Mol. Genet.*, **2009**, 18, R27-39.
11. a) Sen, G. L.; Blau, H. M. "A brief history of RNAi: the silence of the genes". *FASEB. J.*, **2006**, 20, 1293-1299; b) Deiters, A. "Small molecule modifiers of the microRNA and RNA interference pathways". *APPS J.*, **2009**, 12, 51-60.



12. a) Vicens, Q. "RNA's coming of age as a drug target". *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, **2009**, 65, 171-188; b) Deigan, K. E.; Ferré-D'Amaré, A. R. "Riboswitches: discovery of drugs that target bacterial gene-regulatory RNAs". *Acc. Chem. Res.*, **2011**, 44, 1329-1338.
13. Altman, A. S. "An overview of the RNA world-for now". *Biol. Chem.*, **2007**, 388, 663-664.
14. Zaman, G. J.R.; Michiels, P. J. A. van Boeckel, C. A. A. "Targeting RNA: new opportunities to address drugless targets". *Drug Discov. Today*, **2003**, 8, 297-306.
15. Gallego, J.; Varani, G. "Targeting RNA with small-molecule drugs: therapeutic promise and chemical challenges". *Acc. Chem. Res.*, **2001**, 34, 836-843.
16. a) Kole, R.; Krainer, A. R.; Altman, S. "RNA therapeutics: beyond RNA interference and antisense oligonucleotides". *Nat. Rev. Drug. Discov.*, **2012**, 11, 125-140; b) 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, 280-284; c) Lippi, G.; Favalaro, E. J. "Antisense therapy in the treatment of hypercholesterolemia". *Eur. J. Intern Med.*, **2011**, 22, 541-546; d) Elbashir, S. M.; Harborth, J.; Lendeckel, W.; Yalcin, A.; Weber, K.; Tuschl, T. "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells". *Nature*, **2001**, 411, 494-498; e) Burnett, J. C.; Rossi, J. J. "RNA-based therapeutics: current progress and future prospects". *Chem. Biol.*, **2012**, 19, 60-71; f) Davidson, B. L.; McCray Jr, P. B. "Current prospects for RNA interference-based therapies". *Nature Rev. Genet.*, **2011**, 12, 329-340; g) Pappas, T. C.; Bader, A. C.; Andruss, B. A.; Brown, D.; Ford, L. P. "Applying small RNA molecules to the directed treatment of human diseases: realizing the potential". *Expert Opin. Ther. Targets*, **2008**, 12, 115-127; h) Meister, G.; Tuschl, T. "Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA". *Nature*, **2004**, 431, 343-349.
17. a) Tor, Y. "Targeting RNA with small molecules". *ChemBioChem*, **2003**, 4, 998-1007; b) Hermann, T. "Chemical and functional diversity of small molecule ligands for RNA". *Biopolymers*, **2003**, 70, 4-18; c) Pilch, S. D.; Kaul, M.; Barbieri, C. M.; Kerrigan, J. E. "Thermodynamics of aminoglycoside-rRNA recognition". *Biopolymers*, **2003**, 70, 58-79; d) Mayer, G. *The Chemical Biology of Nucleic Acids*, capítol 6; Xie, Y.; Tam, V. K.; Tor, Y. *The Interactions of Small Molecules with DNA and RNA*, Ed., John Wiley & Sons, Ltd.; Chichester; 2010; pp 115-140; e) Arya, D. P.; Willis, B. "Aminoglycoside (neomycin) preference is for A-form nucleic acids, not just RNA: results from a competition dialysis study". *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 10148-10149.
18. Blount, K. F.; Tor, Y. "A tale of two targets: differential RNA selectivity of nucleobase-aminoglycoside conjugates". *ChemBioChem*, **2006**, 7, 1612-1621.
19. Luedtke, N. W.; Liu, Q.; Tor, Y. "RNA-ligand interactions: affinity and specificity of aminoglycoside dimers and acridine conjugates to the HIV-1 Rev Response Element". *Biochemistry*, **2003**, 42, 11391-11403.
20. Kondo, J. "A structural basis for the antibiotic resistance conferred by an A1408G mutation in 16s rRNA and for the antiprotozoal activity of aminoglycosides". *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, 51, 465-468.
21. a) Luedtke, N. W.; Baker, T. J.; Goodman, M.; Tor, Y. "Guanidinoglycosides: A novel family of RNA ligands". *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 12035-12036; b) Baker, T. J.; Luedtke, N. W.; Tor, Y.; Goodman, M. "Synthesis and anti.HIV activity of

- guanidinoglycosides". *J. Org. Chem.*, **2000**, 65, 9054-9058; c) Staple, D. W.; Venditti, V.; Niccolai, N.; Ellson-Schwab, L.; Tor, Y.; Butcher, S. E. "Guanidinoneomycin B recognition on an HIV-1 RNA helix". *ChemBioChem*, **2008**, 9, 93-102; d) Fair, R. J.; Hensler, M. E.; Thienphrapa, W.; Dam, Q. N.; Nizet, V.; Tor, Y. "Selectively guanidinylated aminoglycosides as antibiotics". *ChemMedChem*, **2012**, 7, 1237-1244.
- 22.** a) Zhao, F.; Zhao, Q.; Blount, K. F.; Han, Q.; Tor, Y.; Hermann, T. "Molecular recognition of RNA by neomycin and a restricted neomycin derivative". *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 117, 5463-5468; b) Cottin, T.; Pyrkotis, C.; Stathakis, C. I.; Mavridis, I.; Katsoulis, I. A.; Anastasopoulou, P.; Kythreoti, G.; Zografos, A. L.; Nahmias, V. R.; Papakyriakou, A.; Vourloumis, D. "Designed spiro-bicyclic analogues targeting the ribosomal decoding center". *ChemBioChem*, **2011**, 12, 71-87.
- 23.** a) Sucheck, S.; Wong, A. L.; Koeller, K.; Boehr, D. D.; Draker, K.; Sears, P.; Wright, G. D.; Wong, C-H. "Design of bifunctional antibiotics that target bacterial rRNA and inhibit resistance-causing enzymes". *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 5230-5231; b) Wu, B.; Yang, J.; Robinson, D.; Hofstadler, S.; Griffey, R.; Swayze, E. E.; He, Y. "Synthesis of linked carbohydrates and evaluation of their binding for 16S RNA by mass spectrometry". *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003**, 13, 3915-3918; c) Udumula, V.; Chittapragada, M.; Marble, J. B.; Dayton, D. L.; Ham, Y. W. "Conjugate of neamine and 2-deoxystreptamine mimic connected by an amide bond". *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, 21, 4713-4715.
- 24.** Alguacil, J.; Defaus, S.; Claudio, A.; Trapote, A.; Masides, M.; Robles, J. "A straightforward preparation of aminoglycoside-dinucleotide-diPNA conjugates via Click ligation assisted by microwaves". *Eur. J. Org. Chem.*, **2010**, 16, 3102-3109.
- 25.** Hermann, T. "Strategies for the design of drugs targeting RNA and RNA-protein complexes". *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**, 39, 1890-1905.
- 26.** a) Peytou, V.; Condom, R.; Patino, N.; Guedj, R.; Aubertin, A-M.; Gelus, N.; Bailly, C.; Terreux, R.; Cabrol-Bass, D. "Synthesis and antiviral activity of ethidium-arginine conjugates directed against the TAR RNA of HIV-1". *J. Med. Chem.*, **1999**, 42, 4042-4053; b) Carlson, C. B.; Spangord, R. J.; Beal, P. A. "Selection of small-molecule mediators of the RNA regulation of PKR, the RNA-dependent protein kinase". *ChemBioChem*, **2002**, 3, 859-865; c) Krishnamurthy, M.; Simon, K.; Orendt, A. M.; Beal, P. "Macrocyclic Helix-threading peptides for targeting RNA". *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, 46, 7044-7047; d) Donahue, C. P.; Ni, J.; Rozners, E.; Glicksman, M. A.; Wolfe, M. S. "Identification of Tau Stem Loop RNA Stabilizers". *J. Biomol. Screen.*, **2007**, 12, 789-799; e) Liu, Y.; Peacey, E.; Dickson, J.; Donahue, C. P.; Zheng, S.; Varani, G.; Wolfe, M. S. "Mitoxantrone analogues as ligands for a stem-loop structure of tau pre-mRNA". *J. Med. Chem.*, **2009**, 52, 6523-6526.
- 27.** a) López-Senín, P.; Gómez-Pinto, I.; Grandas, A.; Marchán, V. "Identification of ligands for the Tau Exon 10 splicing regulatory element RNA by using dynamic combinatorial chemistry". *Chem. Eur. J.*, **2011**, 17, 1946-1953; b) López-Senín, P.; Artigas, G.; Marchán, V. "Exploring the effect of aminoglycoside guanidinylation on ligands for Tau splicing regulatory element RNA". *Org. Biomol. Chem.*, **2012**, 10, 9243-9254.
- 28.** a) Arambula, J. F.; Ramisetty, S. R.; Baranger, A. M.; Zimmerman, S. C. "A simple ligand that selectively targets CUG trinucleotide repeats and inhibits MBNL protein binding". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2009**, 106, 16068-16073; b) Wong, C-H.; Fu,

- Y.; Ramisetty, S. R.; Baranger, A. M.; Zimmerman, S. C. “Selective inhibition of MBNL1-CCUG interaction by small molecules toward potential therapeutic agents for myotonic dystrophy type 2 (DM2)”. *Nucleic Acids Res.*, **2011**, 39, 8881-8890.
29. Hermann, T.; Patel, D. “RNA bulges as architectural and recognition motifs”. *Structure*, **2000**, 8, R47-R54.
30. Nakatani, K. “Recognition of mismatched base pairs in DNA”. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **2009**, 82, 1055-1069.
31. Kappen, L. S.; Lin, Y.; Jones, G. B.; Goldberg, I. H. “Probing DNA bulges with designed helical spirocyclic molecules”. *Biochemistry*, **2007**, 46, 561-567.
32. Meyer, S. T.; Hergenrother, P. J. “Small molecule ligands for bulged RNA secondary structures”. *Org. Lett.*, **2009**, 11, 4052-4055.
33. Barton, J. K. “A rhodium (III) complex for high affinity DNA base-pair mismatch recognition”. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2003**, 100, 3737-3742.
34. a) Spillane, C. B.; Smith, J. A.; Buck, D. P.; Collins, J. G.; Keene, F. R. “Dinuclear ruthenium (II) complexes as potential probes for RNA bulge sites”. *Dalton trans.*, **2007**, 5290-5296; b) Buck, D. P.; Spillane, C. B.; Collins, J. G.; Keene, F. R. “Binding of a dinuclear ruthenium (II) complex to the TAR region of the HIV-AIDS viral RNA”. *Mol. BioSyst.*, **2008**, 4, 851-854.
35. a) Nakatani, K. “Detection of guanine-adenine mismatches by surface plasmon resonance sensor carrying naphthyridine-azaquinolone hybrid on the surface”. *Nucleic Acids Res.*, **2004**, 32, 278-286; b) Nakatani, K.; Hagihara, S.; Goto, Y.; Kobori, A.; Hagihara, M.; Hayashi, G.; Kyo, M.; Nomura, M.; Mishima, M.; Kojima, C. “Small-molecule ligand induces nucleotide flipping in (CAG)<sub>n</sub> trinucleotide repeats”. *Nat. Chem. Biol.*, **2005**, 1, 39-43; c) Peng, T.; Nakatani, K. “Binding of naphthyridine carbamate dimer to the (CGG)<sub>n</sub> repeat results in the disruption of the G-C base pairing”. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, 44, 7280-7283; d) Nakatani, K.; Horie, S.; Goto, Y.; Kobori, A.; Hagihara, S. “Evaluation of mismatch-binding ligands as inhibitors for Rev-RRE interaction”. *Bioorg. Med. Chem.*, **2006**, 14, 5384-5388.
36. Branda, N.; Kurz, G.; Lehn, J.-M. “Janus Wedge: a new approach towards nucleobase-pair recognition”. *Chem. Commun.*, **1996**, 21, 2443-2444.
37. Chen, D. M.; Sharma, S. K.; McLaughlin, L. W. “Formation and stability of a Janus-Wedge type of DNA triplex”. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 70-71.
38. a) Foloppe, N.; Matassova, N.; Aboul-ela, F. “Towards the discovery of drug-like RNA ligands”. *Drug Discovery Today*, **2006**, 11, 1019-1027; b) Aboul-ela, F. “Strategies for the design of RNA-binding small molecules”. *Future Med. Chem.*, **2010**, 2, 93-119.
39. a) Wang, X.; Huq, I.; Rana, T. M. “HIV-1 TAR RNA recognition by an unnatural biopolymer”. *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 6444-6445; b) Leeper, T. C.; Athanassiou, Z.; Dias, R. L. A.; Robinson, J. A.; Varani, G. “TAR RNA recognition by a cyclic peptidomimetic of Tat protein”. *Biochemistry*, **2005**, 44, 12362-12372; c) Davidson, A.; Leeper, T. C.; Athanassiou, Z.; Patora-Komisarska, K.; Karn, J.; Robinson, J. A.; Varani, G. “Simultaneous recognition of HIV-1 TAR RNA bulge and loop sequences by cyclic peptide mimics of Tat protein”. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2009**, 106, 11931-11936; d) Lalonde, M. S.; Lobritz, M. A.; Ratcliff, A.; Chamanian, M.; Athanassiou, Z.; Tyagi, M.; Wong, J.; Robinson, J. A.; Karn, J.; Varani, G. “Inhibition of both HIV-1 reverse transcription and gene expression by a cyclic peptide that binds

the Tat-transactivating response element (TAR) RNA". *PloS Pathog.*, **2011**, *7*, e1002038.

**40.** Bryson, D. I.; Zhang, W.; McLendon, P. M.; Reineke, T. M.; Santos, W. L. "Toward targeting RNA structure: branched peptides as cell-permeable ligands to TAR RNA". *Chem. Biol.*, **2012**, *7*, 210-217.

**41.** a) Warui, D. M.; Baranger, A. M. "Identification of small molecule inhibitors of the HIV-1 nucleocapsid-stem-loop 3 RNA complex". *J. Med. Chem.*, **2012**, *55*, 4132-4141; b) Mayer, G.; Famulok, M. "High-Throughput compatible assay for glmS riboswitch metabolite dependence". *ChemBioChem*, **2006**, *7*, 602-604.

**42.** a) Lang, P. T. "Dock 6: combining techniques to model RNA-small molecule complexes". *RNA*, **2009**, *15*, 1219-1230; b) Fulle, S.; Gohlke, H. "Molecular recognition of RNA: challenges for modelling interactions and plasticity". *J. Mol. Recognit.*, **2010**, *23*, 220-231.

**43.** a) Congrevé, M.; Chessari, G.; Tisi, D.; Woodhead, A. J. "Recent development in fragment-based drug discovery". *Biochemistry*, **2008**, *51*, 3661-3680; b) Murray, C. W.; Rees, D. C. "The rise of fragment-based drug discovery". *Nat. Chem.*, **2009**, *1*, 187-192; c) Moumné, R.; Catala, M.; Larue, V.; Micouin, L.; Tisné, C. "Fragment-based design of small RNA binders: promising developments and contribution of NMR". *Biochimie*, **2012**, *94*, 1607-1619.

**44.** a) Swayze, E. E.; Jefferson, E. A.; Sannes-Lowery, K. A.; Blyn, L. B.; Risen, L. M.; Arakawa, S. O.; Osgood, S. A.; Hofstadler, S. A.; Griffey, R. H. "SAR by MS: a ligand based technique for drug lead discovery against structured RNA targets". *J. Med. Chem.*, **2002**, *45*, 3816-3819; b) Seth, P. P.; Miyaji, A.; Jefferson, E. A.; Sannes-Lowery, K. A.; Osgood, S. A.; Propp, S. S.; Ranken, R.; Massire, C.; Sampath, R.; Ecker, D. J.; Swayze, E. E.; Griffey, R. H. "SAR by MS: discovery of a new class of RNA-binding small molecules for the hepatitis C virus: internal ribosome entry site IIA subdomain". *J. Med. Chem.*, **2005**, *48*, 7099-7102.

**45.** a) McNaughton, B. R.; Gareiss, P. C.; Miller, B. L. "Identification of a selective small-molecule ligand for HIV-1 frameshift-inducing stem-loop RNA from an 11,325 member resin bound dynamic combinatorial library". *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 11306-11307; b) Gareiss, P. C.; Sobczak, K.; McNaughton, B. R.; Palde, P. B.; Thornton, C. A.; Miller, B. "Dynamic combinatorial selection of molecules capable of inhibiting the (CUG) repeat RNA-MBNL1 interaction in vitro: discovery of lead compounds targeting myotonic dystrophy (DM1)". *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 16254-16261; c) Scott, D. E.; Dawes, G. J.; Ando, M.; Abell, C.; Ciulli, A. "A fragment-based approach to probing adenosine recognition sites by using dynamic combinatorial chemistry". *ChemBioChem*, **2009**, *10*, 2772-2779.

**46.** a) Hochgürtel, M.; Lehn, J-M. *Dynamic Combinatorial diversity in drug discovery*, capítol 16., a Jahnke, W.; Erlanson, D. A. *Fragment-based approaches in drug discovery*, Wiley-VCH, Weinheim, 2006, pp 341-363; b) Miller, B. L. *Dynamic Combinatorial Chemistry: An Introduction*, capítol 1., a Miller, B. L. *Dynamic Combinatorial Chemistry: in Drug Discovery, Bioorganic Chemistry, and Materials Science*, John Wiley & Sons, New Jersey, 2010, pp 1-42.

**47.** Lehn, J-M. "Dynamic combinatorial chemistry and virtual combinatorial libraries". *Chem. Eur. J.*, **1999**, *5*, 2455-2463.

48. a) Otto, S.; Furlan, R. L. E.; Sanders, J. K. M. "Dynamic combinatorial chemistry". *Drug Discov. Today*, **2002**, 7, 117-125.
49. Corbett, P. T.; Leclaire, J.; Vial, L.; West, K. R.; Wietor, J-L.; Sanders, J. K. M.; Otto, S. "Dynamic Combinatorial Chemistry". *Chem. Rev.*, **2006**, 106, 3652-3711.
50. Miller, B. L. *Protein-Directed Dynamic Combinatorial Chemistry*, capítol 2., a Miller, B. L. *Dynamic Combinatorial Chemistry: in Drug Discovery, Bioorganic Chemistry, and Materials Science*, John Wiley & Sons, New Jersey, 2010, pp 43-82.
51. a) Miller, B. L., *Nucleic Acid-Targeted Dynamic Combinatorial Chemistry*, capítol 3., a Miller, B. L. *Dynamic Combinatorial Chemistry: in Drug Discovery, Bioorganic Chemistry, and Materials Science*, John Wiley & Sons, New Jersey, 2010, pp 83-117; b) Durai, C. R.; Harding, M. M. "Targeting nucleic acids using dynamic combinatorial chemistry". *Aust. J. Chem.*, **2011**, 64, 671-680.
52. Huc, I.; Lehn, J-M. "Virtual combinatorial libraries: dynamic generation of molecular and supramolecular diversity by self-assembly". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1997**, 94, 2106-2110.
53. Bunyapaiboonsri, T.; Ramström, O.; Lohmann, S.; Lehn, J-M.; Peng, L.; Goeldner, M. "Dynamic deconvolution of a pre-equilibrated dynamic combinatorial library of acetylcholinesterase inhibitors". *ChemBioChem*, **2001**, 2, 438-444.
54. Bunyapaiboonsri, T.; Ramström, H.; Ramström, O.; Haiech, J.; Lehn, J-M. "Generation of bis-cationic heterocyclic inhibitors of *Bacillus subtilis* HPr kinase/phosphatase from a ditopic dynamic combinatorial library". *J. Med. Chem.*, **2003**, 46, 5803-5811.
55. Ramström, O.; Lehn, J-M. "In situ generation and screening of a dynamic combinatorial carbohydrate library against concanavalin A". *ChemBioChem.*, **2000**, 1, 41-48.
56. Danieli, B.; Giardini, A.; Lesma, G.; Passarella, D.; Peretto, B.; Sacchetti, A.; Silvani, A.; Pratesi, G.; Zunino, F. "Thiocolchicine-podophyllotoxin conjugates: dynamic libraries based on disulfide exchange reaction". *J. Org. Chem.*, **2006**, 71, 2848-2853.
57. Lins, R. J.; Flitsch, S. L.; Turner, N. J.; Irving, E.; Brown, S. A. "Enzymatic generation and *in situ* screening of a dynamic combinatorial library of sialic acid analogues". *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, 41, 3405-3407.
58. Klekota, B.; Hammond, M. H.; Miller, B. L. "Generation of novel DNA-binding compounds by selection and amplification from self-assembling combinatorial libraries". *Tetrahedron Lett.*, **1997**, 38, 8639-8642.
59. Ladame, S.; Whitney, A. M.; Balasubramanian, S. "Targeting nucleic acid secondary structures with polyamides using an optimized dynamic combinatorial approach". *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, 44, 5736-5739.
60. McNaughton, B. R.; Miller, B. L. "Resin-bound dynamic combinatorial chemistry". *Org. Lett.*, **2006**, 8, 1803-1806
61. Whitney, A. M.; Ladame, S.; Balasubramanian, S. "Templated ligand assembly by using G-quadruplex DNA and dynamic covalent chemistry". *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, 43, 1143-1146.
62. Bugaut, A.; Jantos, K.; Wietor, J-L.; Rodriguez, R.; Sanders, J. K. M.; Balasubramanian, S. "Exploring the differential recognition of DNA G-quadruplex

- targets by small molecules using dynamic combinatorial chemistry". *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, 47, 2677-2680.
63. Nielsen, M. C.; Ulven, T. "Selective extraction of G-quadruplex ligands from a rationally designed scaffold-based dynamic combinatorial library". *Chem. Eur. J.*, **2008**, 14, 9487-9490.
64. Karan, C.; Miller, B. L. "RNA-selective coordination complexes identified via dynamic combinatorial chemistry". *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123, 7455-7456.
65. Ofori, L. O.; Hoskins, J.; Nakamori, M.; Thornton, C. A.; Miller, B. L. "From dynamic combinatorial 'hit' to lead: *in vitro* and *in vivo* activity of compounds targeting the pathogenic RNAs that cause myotonic dystrophy". *Nucleic Acids Res.*, **2012**, 40, 6380-6390.
66. Yonath, A. "Antibiotics targeting ribosomes: resistance, selectivity, synergism and cellular regulation". *Annu. Rev. Biochem.*, **2005**, 74, 649-679.
67. Cooper, T. A.; Wan, L.; Dreyfuss, G. "RNA and disease". *Cell*, **2009**, 136, 777-793.
68. Varani, L.; Hasegawa, M.; Spillantini, M. G.; Smith, M. J.; Murrell, J. R.; Guetti, B.; Klug, A.; Goedert, M.; Varani, G. "Structure of tau exon 10 splicing regulatory element RNA and destabilization by mutations of frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1999**, 96, 8229-8234.
69. Shay, J. W.; Wright, W.E. "Telomerase therapeutics for cancer: challenges and new directions". *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2006**, 5, 577-584.
70. Garcia-Blanco, M. A.; Baraniak, A. P.; Lasda, E. L. "Alternative splicing in disease and therapy". *Nat. Biotechnol.*, **2004**, 22, 535-546.
71. Buratti, E.; Baralle, F. E. "Influence of RNA secondary structure on the Pre-mRNA splicing process". *Mol. Cell. Biol.*, **2004**, 24, 10505-10514.
72. Tazi, J.; Bakkour, N.; Stamm, S. "Alternative splicing and disease". *Biochimica. Biophys. Acta*, **2009**, 1792, 14-26.
73. Faustino, N. A.; Cooper, T. A. "Pre-mRNA splicing and human disease". *Genes & Dev.*, **2003**, 17, 419-437.
74. Muh, S. J.; Hovhannisyanyan, R. H.; Carstens, R. P. "A non-sequence-specific double-stranded RNA structural element regulates splicing of two mutually exclusive exons of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)". *J. Biol. Chem.*, **2002**, 277, 50143-50154.
75. Warf, M. B.; Berglund, J. A. "Role of RNA structure in regulating pre-mRNA splicing". *Trends Biochem. Sci.*, **2009**, 35, 169-178.
76. Padgett, R. A. "New connections between splicing and human disease". *Trends Genet.*, **2012**, 28, 147-154.
77. Shepard, P. J.; Hertel, K. J. "Conserved RNA secondary structures promote alternative splicing". *RNA*, **2008**, 14, 1463-1469.
78. Hiller, M.; Zhang, Z.; Backofen, R.; Stamm, S. "Pre-mRNA secondary structures influence exon recognition". *Plos Genet.*, **2007**, 3, 2147-2155.
79. Buratti, E.; Muro, A. F.; Giombi, M.; Gherbassi, D.; Iaconcig, A.; Baralle, F. E. "RNA folding affects the recruitment of SR proteins by mouse and human polypurinic enhancer elements in the fibronectin EDA exon". *Mol. Cell. Biol.*, **2004**, 24, 1387-1400.
80. Singh, N. N.; Singh, R. N.; Androphy, E. J. "Modulating role of RNA structure in alternative splicing of a critical exon in the spinal muscular atrophy genes". *Nucleic Acids Res.*, **2007**, 35, 371-389.

81. Ballatore, C.; Lee, V. M.; Trojanowski, J. Q. "Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders". *Nat. Rev.*, **2007**, 8, 663-672.
82. Wang, J-Z.; Liu, F. "Microtubule-associated protein tau in development, degeneration and protection of neuron". *Prog. Neurobiol.*, **2008**, 85, 148-175.
83. Goedert, M.; Jakes, R. "Mutations causing neurodegenerative tauopathies". *Biochimica. Biophys. Acta*, **2005**, 1739, 240-250.
84. Wolfe, M. "Tau mutations in neurodegenerative diseases". *J. Biol. Chem.*, **2009**, 284, 6021-6025.
85. Liu, F.; Gong, C-X. "Tau exon 10 alternative splicing and tauopathies". *Mol. Neurodeg.*, **2008**, 9, 3:8.
86. Zhou, J.; Yu, Q.; Zou, T. "Alternative splicing of exon 10 in the tau gene as a target for treatment of tauopathies". *BMC Neuroscience*, **2008**, 9(Suppl 2):S10.
87. Hutton, M.; Lendon, C. L.; Rizzu, P.; Baker, M.; Froelich, S.; Houlden, H.; Pickering-Brown, S.; Chakraverty, S.; Isaacs, A.; Grover, A.; Hackett, J.; Heutink, P. "Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17". *Nature*, **1998**, 393, 702-705.
88. Donahue, C. P.; Muratore, C.; Wu, J. Y.; Kosik, K. S.; Wolfe, M. S. "Stabilization of the tau exon 10 stem loop alters pre-mRNA splicing". *J. Biol. Chem.*, **2006**, 281, 23302-23306.
89. Varani, L.; Spillantini, M. G.; Goedert, M.; Varani, G. "Structural basis for recognition of the RNA major groove in the tau exon 10 splicing regulatory element by aminoglycoside antibiotics". *Nucleic Acids Res.*, **2000**, 28, 710-719.
90. Zheng, S.; Chen, Y.; Donahue, C. P.; Wolfe, M. S.; Varani, G. "Structural basis for stabilization of the tau pre-mRNA splicing regulatory element by novantrone (mitoxantrone)". *Chem. Biol.*, **2009**, 16, 557-566.
91. López-Senín, Paula. Tesi Doctoral. "Desarrollo de ligandos estabilizantes de les estructura de RNA implicada en el procesado alternativo del exón 10 de la proteína tau mediante química combinatoria dinámica", Universitat de Barcelona, Barcelona, **2010**.

## *Resultats i Discussió*





# Capítol 1

*Síntesi i identificació de lligands de l'estructura stem-loop del pre-mRNA de tau mitjançant la Química Combinatòria Dinàmica*



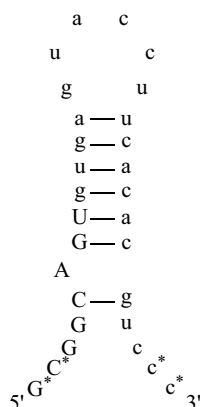
## **Introducció i objectius**

---

Com ja s'ha comentat a l'apartat 2.2.2 de la Introducció general d'aquesta tesi doctoral, algunes malalties neurodegeneratives, com la *FTDP-17*, tenen l'origen en l'alteració del balanç de proteïnes isoformes de tau produïdes durant el processat alternatiu del pre-mRNA del gen *MAPT*. Concretament, certes mutacions a la seqüència intrònica contigua a l'exó 10 tenen un notable efecte desestabilitzant en l'estructura *stem-loop* que regula el processat alternatiu, fet que genera un augment de la inclusió de l'exó 10. Una de les vies proposades per a la correcció d'aquest desequilibri entre les isoformes 3R i 4R estaria basada en l'ús de molècules petites que s'uneixin selectivament a aquesta estructura, particularment a les seqüències mutades, a l'efecte d'estabilitzar-les i, per tant, regular correctament el processat alternatiu.<sup>1-3</sup>

Així doncs, el principal objectiu del treball, detallat en aquest primer capítol, ha consistit en el desenvolupament de nous lligands amb capacitat per reconèixer i estabilitzar aquesta estructura secundària del pre-mRNA que codifica la proteïna tau.

En aquesta tesi doctoral s'ha considerat com a diana d'RNA un oligoribonucleòtid 29-mer que inclou les 25 nucleobases de la seqüència estudiada per Varani i col·laboradors (apartat 2.2.1 de la Introducció),<sup>4</sup> i dos ribonucleòtids addicionals a cada extrem presents a la seqüència nativa del pre-mRNA. Cal comentar que per incrementar l'estabilitat de l'RNA davant de les exoribonucleases, els hidroxils 2' dels quatre ribonucleòtids addicionals s'han protegit amb un grup metil (**Figura 23**). També és important destacar que els valors de temperatura de fusió dels oligoribonucleòtids 29-mer i 25-mer no són gaire diferents,<sup>3</sup> fet que indica que la introducció de dues bases addicionals a cada extrem de la seqüència 25-mer no afecta substancialment l'estabilitat de l'estructura secundària *stem-loop*.<sup>3</sup>



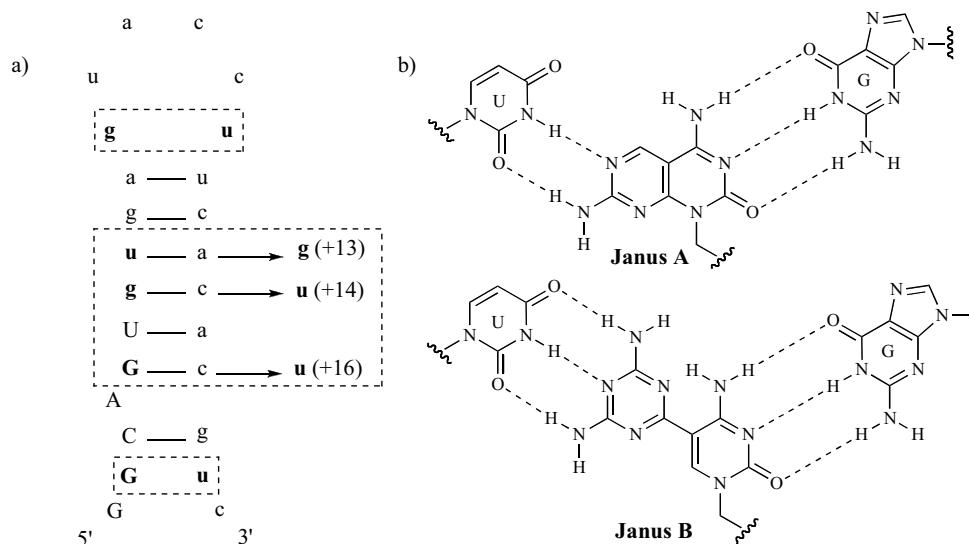
**Figura 23.** Seqüència nativa (*wt*) de l'oligoribonucleòtid 29-mer diana. Als quatre ribonucleòtids marcats (\*) s'han substituït els 2'OH per 2'OMe. Les bases corresponents a la part exònica del pre-mRNA es troben indicades en majúscules, i les intròniques en minúscules.

Per al disseny de nous lligands d'aquesta diana d'RNA, que tinguin propietats millorades respecte als ja existents (afinitat, especificitat i capacitat estabilitzant), hem emprat la DCC en combinació amb una estratègia basada en la unió de fragments. Aquesta metodologia es basa en la premissa que la combinació de diverses unitats presents a una biblioteca combinatòria dinàmica (DCL), amb característiques de reconeixement pròpies, pot generar noves molècules amb millors propietats respecte els seus predecessors aïllats. Una mostra d'això la trobem al treball realitzat al nostre grup d'investigació,<sup>3</sup> on l'ús d'aquesta estratègia ha permès identificar nous lligands d'aquesta estructura d'RNA a través de la combinació de l'aminoglicòsid neamina o guanidinoneamina amb molècules heteroaromàtiques (acridina i azaquinolona).

Així doncs, per a la cerca de lligands d'RNA mitjançant la DCC ha calgut preparar una biblioteca de compostos que presenti una coneguda capacitat d'interacció amb l'RNA. En el nostre cas, de l'ampli ventall de lligands d'RNA coneguts (apartat 1.2.2 de la Introducció), ens hem decantat per quatre tipus de compostos, com els aminoglicòsids, molècules heteroaromàtiques amb capacitat per reconèixer bases desaparellades, agents intercalants i pèptids petits, ja que cadascun d'ells podria interaccionar de forma diferent amb algun dels motius estructurals característics de la diana d'RNA (*loop*, dúplex, *bulge*, etc). Atès que els experiments de DCC es realitzaran a través del bescanvi d'enllaços disulfur (apartat 1.3.4 de la Introducció), tots els compostos monomèrics es funcionalitzaran amb un grup tiol.

En un primer objectiu s'ha plantejat el disseny i la síntesi de molècules orgàniques anomenades Janus (apartat 1.2.2.4 de la Introducció), amb capacitat per reconèixer parells G-U presents a la diana nativa d'RNA i a les seqüències mutades. Per exemple, a la regió del *loop* n'hi ha un de desaparellat, i al dúplex un altre que, segons els estudis d'RMN,<sup>4</sup> tampoc estaria aparellat. A més, és important destacar que cadascuna de les mutacions +13, +14 i +16 genera un parell G-U addicional que, segons les dades descrites per Varani i col·laboradors,<sup>4</sup> podrien estar aparellats en el cas de +13 i +14 (**Figura 24a**). Les molècules Janus es caracteritzen per tenir dues cares amb elements donadors i acceptors d'enllaços pont d'hidrogen, estratègicament localitzats al llarg de

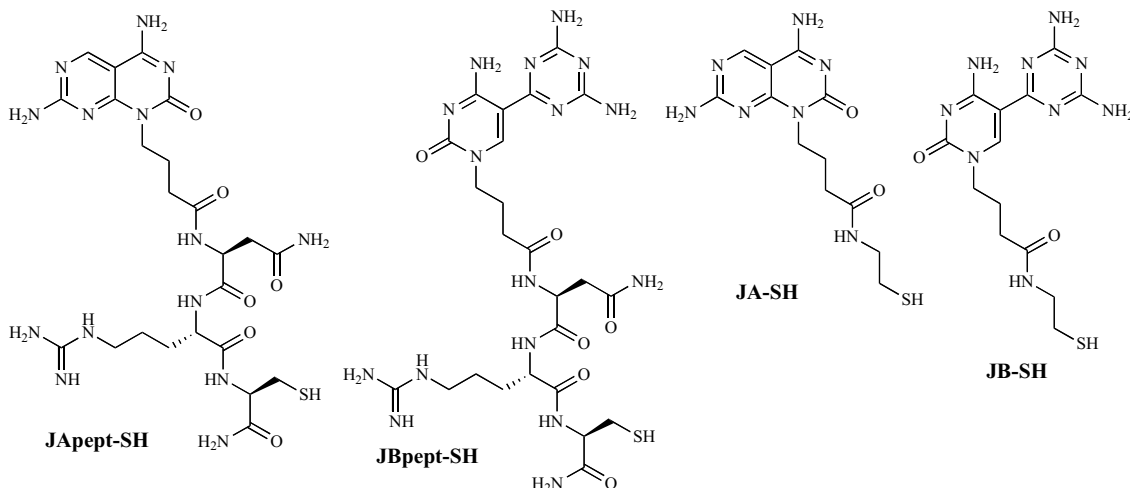
la seva estructura per ser complementaris a les nucleobases diana, en aquest cas, uracil i guanina. Concretament, s'ha optat per realitzar la síntesi de dos tipus de molècules Janus, en una d'elles les dues cares Janus estan fusionades en un únic heterocicle, i, a l'altra, estan unides per un enllaç simple que li concedeix una major flexibilitat conformacional (**Figura 24b**).



**Figura 24.** a) Representació de l'estructura *stem-loop* del pre-mRNA de tau, on s'indiquen els parells G-U de la seqüència nativa i de les mutacions que condueixen a nous parells G-U. b) Esquema del possible reconeixement dels parells G-U mitjançant la interacció amb les dues molècules Janus plantejades. La molècula Janus A, amb els dos anells pirimidínic fusionats, reconeixeria el parell de bases a través de la formació de fins a 5 enllaços pont d'hidrogen. En canvi, la molècula Janus B, amb les dues cares complementàries unides per un enllaç simple, podria formar fins a 6 enllaços pont d'hidrogen.

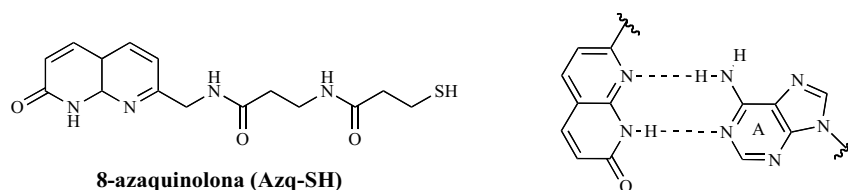
Per tal de derivatitzar les molècules Janus amb el grup tiol, necessari per dur a terme els experiments de DCC, s'ha optat per a la incorporació d'un grup carboxílic als compostos precursors, fet que permetria la seva funcionalització a grup tiol mitjançant una estratègia en fase sòlida. A la **Figura 25**, es mostren els quatre monòmers Janus plantejats. Pel que fa als dos monòmers JApept i JBpept, el residu cisteïna incorporat al tripèptid proporcionarà el grup tiol necessari. Els altres dos aminoàcids, l'asparagina i l'arginina, han estat escollits per afavorir les interaccions de tipus electrostàtic o d'enllaç per pont d'hidrogen. Cal destacar que els residus d'arginina en pèptids i en proteïnes tenen un paper molt rellevant a les interaccions amb l'RNA.<sup>5</sup> Per exemple, a la bibliografia es descriuen algunes seqüències peptídiques que contenen diversos residus d'arginina que tenen una gran afinitat amb estructures d'RNA, com ara l'*RRE* RNA del virus VIH-1.<sup>5</sup> Un altre exemple molt representatiu el trobem a la funció reguladora del processat alternatiu de les proteïnes SR (*serine/arginine-rich*), on els residus d'arginina interaccionen directament amb els parells de bases de la seqüència del pre-mRNA implicat.<sup>6</sup> Per altra banda, a nivell fisicoquímic, a diferència dels grups amini, els grups guanidini són plans, molt més bàsics i presenten direccionalitat en les interaccions per pont d'hidrogen. A més, el grup guanidini de l'arginina presenta un cert grau de flexibilitat gràcies a la seva cadena alifàtica llarga, fet que facilita que tant la cadena

lateral de l'aminoàcid, com el pèptid, tinguin la capacitat d'estar involucrats en interaccions per pont d'hidrogen, Van der Waals o interaccions de tipus iònic.<sup>5</sup> Per altra banda, tal com s'indica a la **Figura 25**, també s'ha plantejat la síntesi dels monòmers JA-SH i JB-SH amb l'objectiu d'avaluar, als experiments de DCC, l'efecte de la derivatització amb la cadena peptídica.



**Figura 25.** Estructures dels monòmers Janus objectiu.

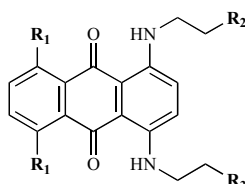
Un altre motiu estructural característic de la diana d'RNA és la protuberància o *bulge* formada per la presència d'una adenina desaparellada intercalada entre els parells G-C de la doble hèlix. És per això, que al nostre grup d'investigació es va considerar interessant sintetitzar el derivat 8-azaquinolona, atesa la seva coneguda capacitat per interaccionar amb adenines desaparellades a través d'enllaços donador-acceptor complementaris (**Figura 26**).<sup>3</sup> A més, aquest compost (apartat 1.2.2.3 de la Introducció) té la propietat de reconèixer específicament nucleobases, tal com s'ha descrit al cas del parell *mismatch* G A present a una estructura *stem-loop* de l'mRNA del virus VIH-1.<sup>7</sup>



**Figura 26.** Estructura del monòmer azaquinolona tiol plantejat (esquerra)<sup>3</sup> i esquema de la interacció del fragment azaquinolona amb una adenina desaparellada (dreta).<sup>8</sup>

Una altra família de compostos que s'ha tingut en compte per dur a terme els experiments de DCC són els agents intercalants, ja que a regions de doble cadena mostren una gran capacitat per intercalar-se o apilar-se amb les nucleobases. En particular, tal com s'ha comentat detalladament a la Introducció (apartat 2.2.2), ens hem basat en els resultats d'un estudi publicat per Varani i col·laboradors<sup>2</sup> durant el transcurs d'aquesta tesi doctoral, en el qual es presenta el compost mitoxantrona (Mtx) com un

l·ligand prometedor de l'estructura *stem-loop* diana amb una afinitat de l'ordre micromolar. Concretament, en aquest treball s'atribueix la selectivitat amb la regió del *bulge* a la capacitat per reconèixer els parells G-C adjacents a l'adenina a través d'interaccions per enllaç pont d'hidrogen entre els grups amino alifàtics i l'O6 de G-1 i el N7 de G+17, i un dels hidroxils alifàtics de la mitoxantrona amb l'O4 d'U+18. Posteriorment, els mateixos autors<sup>9</sup> van descriure la síntesi de diversos anàlegs de la mitoxantrona, a través de diferents canvis estructurals (**Figura 27**), amb l'objectiu de millorar-ne l'afinitat.



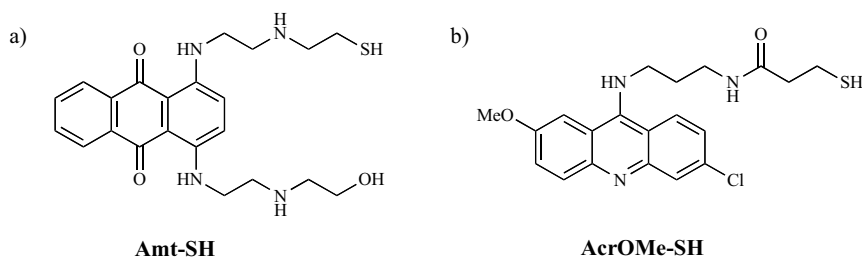
Compost	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	EC <sub>50</sub> (μM)
<b>Mtx</b>	OH	NHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	NHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	0.89
1	OH	NHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	NHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	0.31
2	OH	NHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	NHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	0.16
3	OH	OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	> 50
<b>Amt</b>	H	NHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	NHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	4.3

**Figura 27.** Representació de l'estructura d'alguns dels anàlegs de la mitoxantrona (Mtx) descrits per Varani i col·laboradors,<sup>2,9</sup> juntament amb l'avaluació de la seva afinitat amb l'estructura *stem-loop* diana.

A partir d'ambdós treballs, podem concloure que els grups amino secundaris de les dues cadenes alifàtiques tenen un paper clau, no només en la gran afinitat de la mitoxantrona amb la diana d'RNA, sinó també, com ja s'ha comentat anteriorment, en la seva selectivitat amb la regió del *bulge*. Cal destacar, que la substitució d'un dels hidroxils alifàtics per un grup amino millora lleugerament l'afinitat, mentre que l'eliminació dels hidroxils fenòlics, que condueixen al compost denominat ametantrona (Amt), no provoca una gran disminució de l'afinitat. A més, recentment s'ha descrit que la mitoxantrona és també molt afí amb l'estructura de l'RNA *TAR* del virus VIH-1,<sup>10</sup> fet que posa de manifest el potencial d'aquest tipus de compostos per al desenvolupament de nous lligands d'RNA, tot i que també indica la baixa selectivitat dels agents intercalants. Així doncs, a partir d'aquests precedents, ens vam plantejar la síntesi d'un derivat de l'ametantrona, en el qual el grup hidroxil d'un dels braços de l'anell antraquinona estigués substituït per un tiol (**Figura 28**) a fi d'incloure'l als experiments de DCC, fet que serviria de punt de partida per a la generació de nous lligands de l'RNA diana. Cal dir també, que ens vam decantar per a la síntesi d'un derivat de l'ametantrona enlloc d'un de la mitoxantrona perquè la citotoxicitat presentada per la mitoxantrona és aproximadament unes 10 vegades superior a la de l'ametantrona,<sup>11</sup> amb la qual cosa podria ser un impediment en una futura aplicació d'aquests compostos en el tractament de malalties neurodegeneratives.



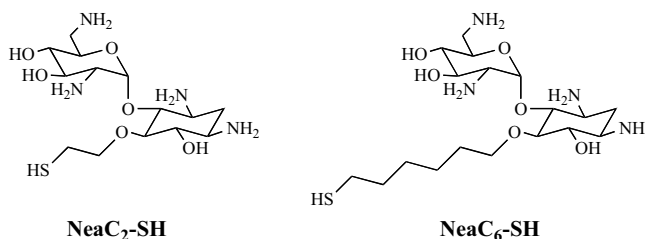
Per altra banda, també s'ha considerat interessant incloure a la biblioteca combinatòria dinàmica un derivat tiol d'acridina, la 6-cloro-2-metoxi-9-amino-acridina, prèviament sintetitzat al nostre grup d'investigació (**Figura 28b**).<sup>3</sup> Les acridines són compostos que s'intercalen amb gran afinitat als dúplex de DNA i mostren, en alguns casos, activitat antitumoral i antimalàrica.<sup>12</sup> Particularment, els seus derivats 6-cloro-2-metoxi han mostrat capacitat per interaccionar amb diverses estructures secundàries d'RNA,<sup>13,14</sup> com per exemple, el lligand format per una molècula Janus i un derivat d'acridina que té una afinitat nanomolar i una bona selectivitat amb els triplets CUG.<sup>14</sup>



**Figura 28.** Estructura dels agents intercalants funcionalitzats amb un grup tiol utilitzats als experiments de DCC: a) ametantrona tiol (Amt-SH) i b) acridina tiol (AcrOMe-SH).

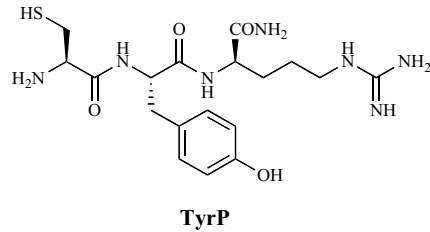
Uns altres tipus de compostos molt rellevants que cal tenir en compte en el desenvolupament de nous lligands d'RNA són els aminoglicòsids, ja que, tal com s'ha comentat a la Introducció (apartat 1.2.2.1), són molècules que, juntament amb la seva activitat antibiòtica, gaudeixen d'unes propietats fisicoquímiques idònies per interaccionar amb l'RNA, tot i que també mostren una baixa especificitat.<sup>15</sup> Malgrat això, és particularment interessant la seva capacitat per diferenciar estructures dúplex tipus A, preferents a l'RNA, de les tipus B, més abundants al DNA.<sup>16</sup> A més, en els últims anys, els aminoglicòsids han estat subjectes a diferents modificacions químiques amb l'objectiu de millorar-ne l'afinitat i l'especificitat amb l'RNA.<sup>17</sup>

Dins del ventall d'aminoglicòsids naturals, ens hem centrat en la neamina, ja que conté els anells I i II de la neomicina B, clau en la interacció dels aminoglicòsids amb l'RNA.<sup>18</sup> Així doncs, s'ha considerat interessant incorporar a la nostra biblioteca de compostos, dos derivats neamina-tiol amb un espaiador de diferent longitud, prèviament sintetitzats al nostre grup d'investigació (**Figura 29**).<sup>3,19</sup>



**Figura 29.** Estructura dels dos monòmers de neamina derivatitzats a la posició 5 amb un grup tiol a través d'un espaiador de diferent longitud.

Finalment, també s'ha tingut en compte el tripèptid catiònic NH<sub>2</sub>-ArgTyrCys-H (**Figura 30**). El residu de cisteïna permet funcionalitzar el pèptid amb un grup tiol, la tirosina aporta una part aromàtica favorable a la formació d'interaccions d'apilament o d'intercalació amb les bases i, per últim, l'arginina, com s'ha comentat anteriorment, conté un grup guanidini que li concedeix la capacitat per formar diferents tipus d'interaccions amb l'RNA.



**Figura 30.** Estructura del monòmer peptídic utilitzat.<sup>20</sup>

Un cop presentades les diferents molècules objectiu, a continuació, en un primer bloc, es descriu la síntesi de tots els monòmers tiol a emprar als experiments de DCC. En un segon bloc, es recullen els resultats dels diferents experiments de DCC i, finalment, en el darrer bloc, es descriu la síntesi a gran escala dels compostos identificats per DCC i d'alguns anàlegs que, en el capítol 2, s'empraran per dur a terme els estudis biofísics amb la diana d'RNA.



## **1 Preparació de la biblioteca combinatòria dinàmica**

---

En aquest apartat es descriu la síntesi dels monòmers tiol Janus, Ametantrona i Neamina emprats als experiments de química combinatòria dinàmica (DCC). Cal comentar però, que no ha calgut sintetitzar els compostos Azq-SH, AcrOMe-SH i TyrP, atès que ja havien estat preparats anteriorment al nostre grup de recerca.<sup>3,20</sup> En el cas dels dos derivats de neamina, s'ha discutit breument la seva síntesi, ja que ha calgut preparar més quantitat, tot i que la metodologia sintètica ja havia estat desenvolupada en treballs anteriors.<sup>3,19</sup>

### **1.1 Síntesi de compostos heteroaromàtics amb capacitat de reconeixement del parell de bases G-U: molècules tipus Janus**

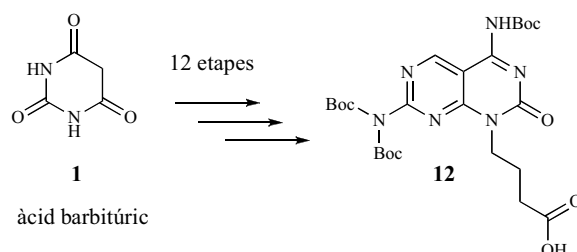
#### **1.1.1 Síntesi en solució dels monòmers Janus funcionalitzats amb un grup carboxil**

Un dels primers objectius ha consistit en la síntesi de les dues estructures Janus funcionalitzades amb un grup carboxil per permetre la seva posterior derivatització. Tal com es mostra a la **Figura 24**, el tret característic d'aquests compostos és el fet que puguin tenir la capacitat de reconèixer el parell de bases G-U a través de la interacció dels elements donadors i acceptors d'enllaços pont d'hidrogen de l'uracil i la guanina amb els àtoms estratègicament localitzats en cadascuna de les cares de les molècules Janus.

Primerament, els esforços es van centrar en la síntesi del monòmer Janus A, que conté dos elements donadors i tres d'acceptors d'enllaços pont d'hidrogen situats en cadascuna de les cares dels dos anells pirimidínic fusionats. Per altra banda, en un segon subapartat es detalla la síntesi del compost Janus B que, a diferència de l'anterior, consta de tres elements donadors i tres acceptors d'enllaços pont d'hidrogen localitzats a cadascuna de les cares complementàries al parell G-U, on els dos anells heteroaromàtics estan units per un enllaç senzill (**Figura 24b**).

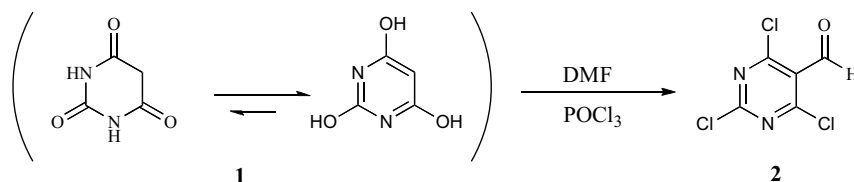
### 1.1.1.1 Síntesi del monòmer Janus A

La síntesi del monòmer carboxilat Janus A (**12**) es va dur a terme a través d'una ruta sintètica lineal de 12 etapes, en la qual es va emprar com a producte de partida l'àcid barbitúric comercial (**1**). A més, tal com es pot observar a la **Figura 31**, es va optar per protegir les funcions amino del monòmer final amb els grups Boc que, posteriorment, serien eliminats en medi àcid en el procés de desprotecció i de desancoratge dels compostos finals de la resina.



**Figura 31.** Esquema general de la síntesi del monòmer Janus A (**12**).

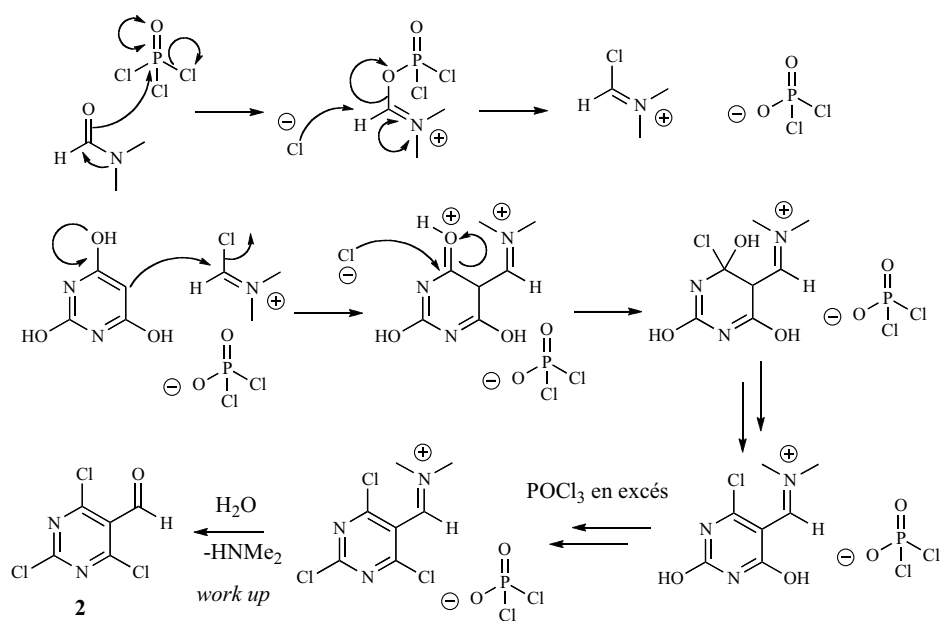
La primera etapa ha consistit en la formilació de l'anell pirimidínic de l'àcid barbitúric (**1**) mitjançant la reacció de Vilsmeier (**Figura 32**), on s'ha fet reaccionar **1** amb 1 eq de *N,N*-dimetilformamida (DMF) i 6.5 eq de clorur de fosforil ( $\text{POCl}_3$ ), seguit d'un *work-up* en medi aquós (una barreja d'aigua i gel).<sup>21,22</sup>



**Figura 32.** Síntesi del producte **2** a partir de l'àcid barbitúric.

Tot i que a l'anàlisi del cru per TLC i RMN de  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  es va observar la formació d'un sol producte, **2**, a causa de la gran quantitat de sals presents al cru, es va decidir purificar-lo mitjançant una filtració sobre sílica per obtenir el compost desitjat amb un rendiment del 42%.

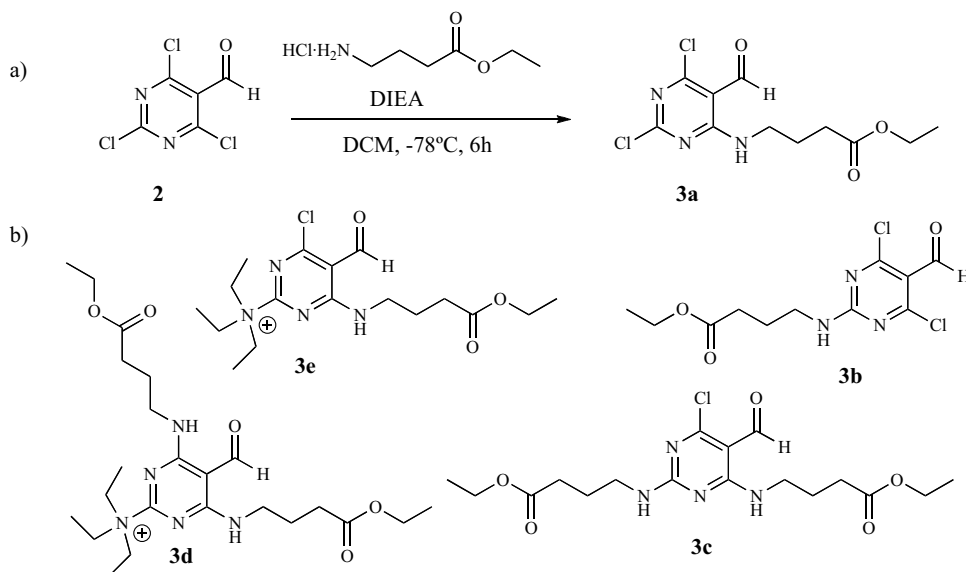
Per altra banda, és interessant comentar que quan es va repetir la reacció a gran escala (140 ml de reactiu  $\text{POCl}_3$ ), va caldre extremar les mesures de seguretat, ja que és molt exotèrmica i allibera gasos àcids. A continuació, a la **Figura 33**, es mostra el mecanisme proposat de la reacció.<sup>23</sup>



**Figura 33.** Mecanisme de la reacció de formilació de l'àcid barbitúric, en el qual la reacció d'una amida substituïda origina el ió clorimini substituït (reactiu de Vilsmeier), que actua com a electròfil i formila l'anell aromàtic.

Per a la síntesi del compost **3a** (**Figura 34**) es van dur a terme diferents proves seguint alguns exemples descrits a la bibliografia.<sup>22,24,25</sup> En un primer assaig, es va fer reaccionar **2** amb 1 eq d'hydroclorur de 4-aminobutirat d'etil i un excés de trietilamina (5 eq), durant una nit en un bany de gel, de manera que s'anés temperant lentament. Desgraciadament, l'anàlisi per espectrometria de masses ESI va revelar la formació del producte disubstituït **3c**. A un altre assaig, on es va emprar també un excés de 5 eq de  $\text{NEt}_3$  a baixa temperatura durant 5 h ( $-78^\circ\text{C}$  fins a  $-20^\circ\text{C}$ ), es van obtenir els productes **3d** i **3e**. Així doncs, les dades experimentals recopilades indiquen que tant la temperatura d'addició com el tipus d'amina terciària són factors clau per a l'obtenció del producte desitjat **3a**. Per tant, atès que l'ús d'una base terciària és necessari per alliberar l'amina primària i neutralitzar l'àcid clorhídric que es genera durant el procés de substitució nucleòfila, i al fet que l'ús de  $\text{NEt}_3$  comporta la formació de la sal de pirimidinilamoni (**3d** i **3e**), vam optar per a l'ús d'una base, com la DIEA, més impedida estèricament.

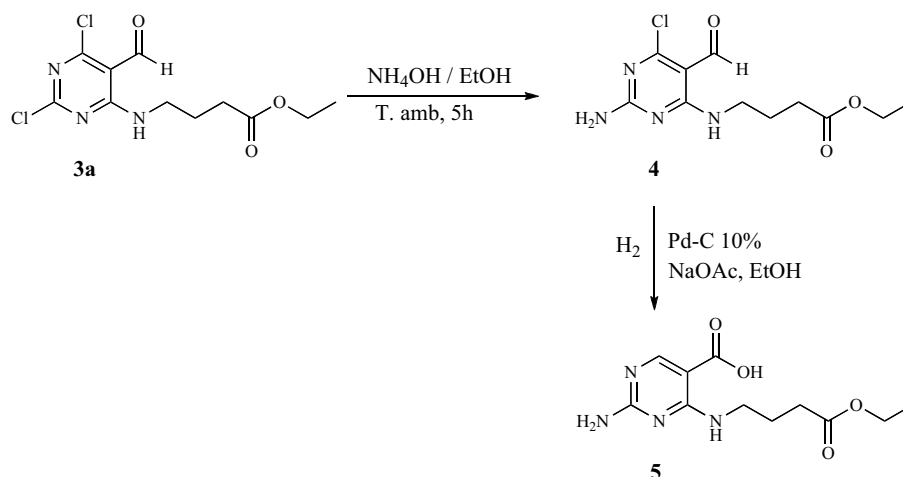
És important destacar el fet que la reacció es va dur a terme a  $-78^\circ\text{C}$ , ja que a mesura que disminueix la temperatura, la substitució nucleòfila transcorre majoritàriament a les posicions 4 i 6 de l'anell pirimidínic, en detriment de la posició 2.



**Figura 34.** Esquema de la reacció optimitzada per a l'obtenció de **3a** a partir de **2** (a) i l'estructura dels diferents productes secundaris obtinguts als assaigs previs (b). Per als productes **3d** i **3e** s'ha representat l'estructura d'un dels regioisòmers possibles, ja que només van ser caracteritzats per espectrometria de masses ESI a causa que les seves sals es perdien a la fase aquosa.

Un cop optimitzades les condicions, es va fer reaccionar **2** amb 1 eq d'hydroclorur de 4-aminobutirat d'etil i 2 eq de DIEA a -78°C durant 6 hores. L'anàlisi del cru per TLC va revelar la presència de dos nous productes, que van ser aïllats i caracteritzats. L'anàlisi per espectrometria de masses ESI va mostrar que ambdós productes, malgrat diferenciar-se per cromatografia, tenien la mateixa massa. A més, els espectres d'RMN de  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  eren pràcticament superposables, a excepció del desplaçament químic de l'amina, que era 9.36 ppm pel compost **3a** i 6.28 ppm pel **3b**. Per tant, l'assignació es va dur a terme mitjançant un experiment NOESY monodimensional que va permetre distingir ambdós regioisòmers en funció de la proximitat espacial entre l'aldehid i la funció amina. En el **3a**, es va observar que en irradiar a la freqüència de 9.36 ppm es produïa un augment de la intensitat del senyal de l'aldehid, en canvi en el **3b**, aquesta correlació no va tenir lloc quan es va irradiar a 6.28 ppm.

La següent etapa va consistir en l'obtenció de **4** mitjançant la reacció de **3a** amb 10 eq d'hidròxid d'amoni a partir d'una mescla al 30% (v/v) de  $\text{NH}_4\text{OH}$  en EtOH, a temperatura ambient durant 5 hores. L'anàlisi del cru per TLC va mostrar únicament la presència de **4**. Atès que la reacció va ser quantitativa i que els espectres d'RMN de  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  del cru eren molt nets, es va decidir que no calia purificar-lo i es va abordar directament la hidrogenació catalítica del cru per obtenir **5** (**Figura 35**).<sup>26</sup> En aquest punt, és interessant comentar que mitjançant assaigs amb un anàleg del producte de partida, amb la posició 4 substituïda per al·lilamina enlloc de l'aminobutirat d'etil, s'havia comprovat que l'aminació a les dues posicions (2 i 4) únicament es produïa amb un rendiment baix (37%) si s'escalfava la reacció a 55°C en presència d'un gran excés d'hidròxid d'amoni, fet que va demostrar la major dificultat per dur a terme la substitució a la posició 4 respecte a la 2.<sup>26a</sup>



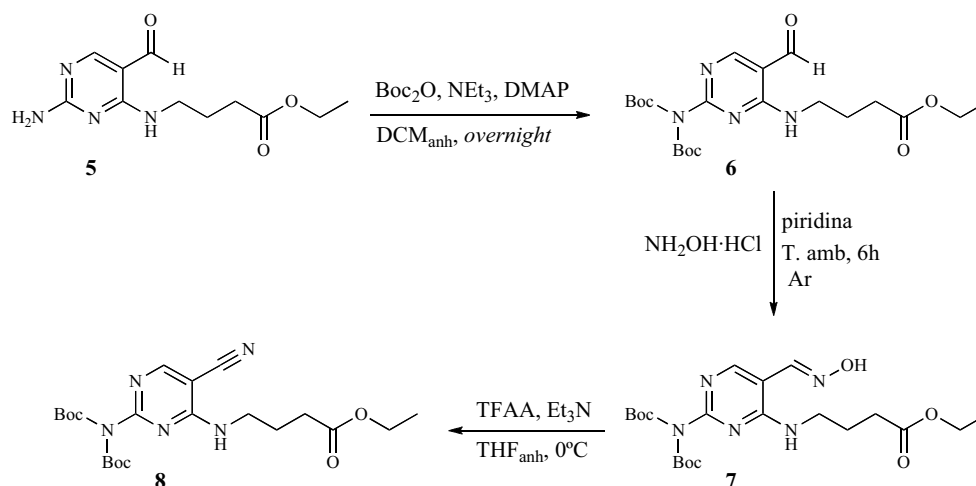
**Figura 35.** Esquema de la síntesi de **5** a partir de l'aminació de **3a** i la reducció catalítica de l'intermedi **4**.

En el procés d'hydrogenació catalítica sobre pal·ladi, la presència d'una base és necessària per impedir una possible reducció parcial o completa de l'anell aromàtic.<sup>26a</sup> En un primer assaig, que no va funcionar, es va fer reaccionar **4** amb 2 eq de NaOH, emprant DCM com a dissolvent, durant unes 15 hores, aproximadament. A una segona prova, es van fer servir 0.027 eq de Pd-C al 10%, 6 eq de NaOAc com a base i EtOH de dissolvent. En aquest cas es va obtenir **5** després de 21 hores de reacció amb un rendiment del 56%. És important destacar que en el procés de filtració del cru sobre celite per eliminar el Pd sobre C, cal realitzar varis rentats amb MeOH a causa de la tendència de les amines a ser adsorbides sobre la superfície de carboni del catalitzador.

El següent pas, va consistir en una doble protecció de la funció amino amb el grup Boc, làbil en medi àcid (**Figura 36**).<sup>25</sup> D'aquesta manera, el compost **6** es va preparar a partir de la reacció de **5**, a temperatura ambient durant tota una nit, amb 2.2 eq d'anhídrid de *tert*-butoxicarbonil (Boc<sub>2</sub>O), 4.4 eq de NEt<sub>3</sub> i una quantitat catalítica de DMAP. L'anàlisi del cru per TLC va revelar la formació d'un nou producte més apolar que, un cop aïllat i caracteritzat per espectrometria de masses i RMN (<sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C), va resultar ser el producte desitjat **6** amb un rendiment del 30%. Cal destacar que en altres proves realitzades a partir de 100 mg i 1.5 g de **5** els rendiments assolits varen ser del 66% i 34%, respectivament, fet que va indicar que l'augment de l'escala de treball feia disminuir el rendiment. És important comentar que també es va aïllar de forma minoritària el producte monoprotegit.

Un cop obtingut el producte **6**, es va dur a terme la transformació de l'aldehid a oxima (**Figura 36**)<sup>24</sup> mitjançant la reacció amb un excés d'hidroxilamina durant 6 hores, en atmosfera d'argó i piridina com a dissolvent. L'anàlisi del cru per TLC va revelar que el nou producte **7** tenia el mateix factor de retenció que el producte de partida **6**. En vista de la puresa de **7** per RMN de <sup>1</sup>H, es va considerar que no era necessari purificar-lo, i el rendiment final va ser de l'ordre del 90%. A més, a partir de l'experiment d'heterocorrelació (gHSQC), es va observar que el protó de l'anell pirimidínic i el de l'oxima tenen el mateix desplaçament químic.

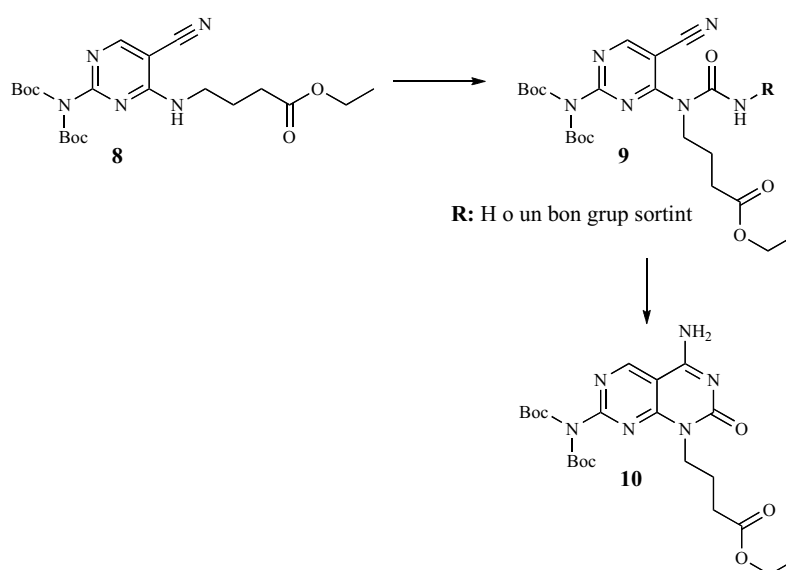




**Figura 36.** Esquema de la preparació del producte **8** a partir de **5**.

La transformació de l'oxima (**7**) a nitril (**8**) es va dur a terme a  $0^{\circ}\text{C}$  a través de la reacció, en condicions anhidres, del producte de partida amb 1.5 eq d'anhidrid de trifluoroacètic (TFAA) i 3 eq de  $\text{NEt}_3$  en THF (**Figura 36**).<sup>24</sup> Un cop finalitzada l'addició dels reactius a baixa temperatura, es va deixar temperar i al cap de dues hores el seguiment per TLC va mostrar que la conversió era total. També, cal destacar que la taca corresponent al nou producte format (**8**), a l'anàlisi per TLC és fluorescent i més apolar que la del producte de partida (**7**). Després de la seva purificació, es va obtenir **8** amb un rendiment del 79%.

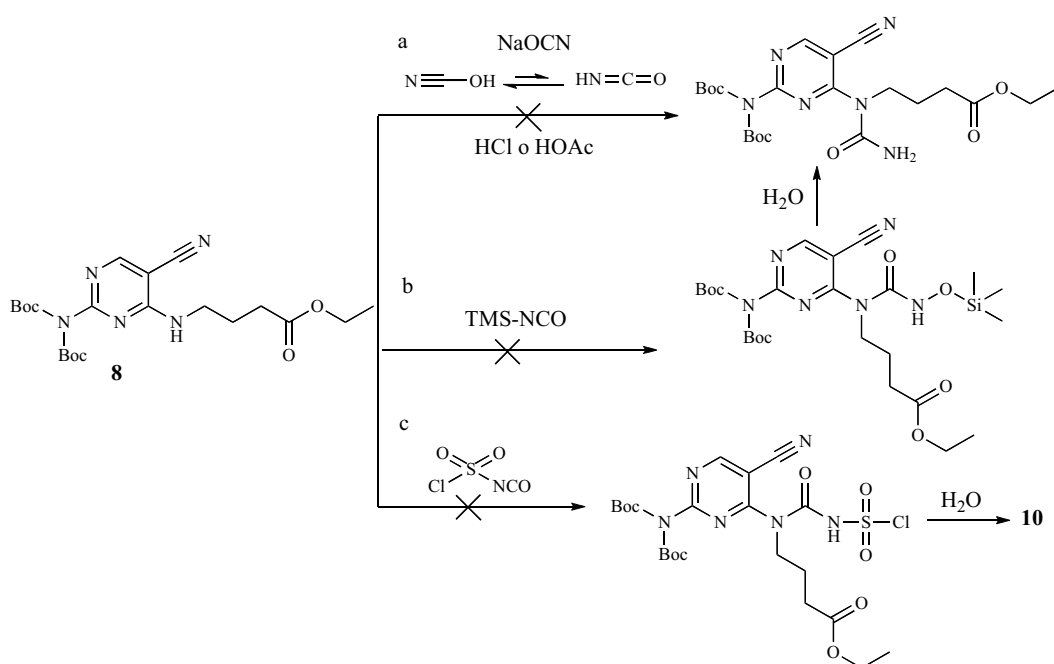
Un cop transformat l'aldehid de l'anell pirimidínic a nitril, l'etapa crítica de la síntesi va consistir en l'obtenció del derivat d'urea, que hauria de permetre la fusió de l'anell de citosina amb la pirimidina (**Figura 37**).



**Figura 37.** Esquema general per a l'obtenció de **10** a partir de **8** via l'intermedi **9**.

En aquest punt de la síntesi, cal destacar que va caldre realitzar un gran nombre d'assaigs amb diversos reactius, àmpliament emprats en aquest tipus de transformació química,<sup>27-32</sup> per tal d'obtenir finalment el compost **10**.

En un primer assaig es va emprar l'àcid isociànic,<sup>27a</sup> ja que està descrit que la reacció d'1 eq de cianat de sodi o de potassi amb una solució diluïda freda d'àcid acètic o de clorhídric genera, *in situ*, l'àcid isociànic, que reacciona amb amines aromàtiques i alifàtiques per formar la urea corresponent (**Figura 38a**).<sup>27</sup> Inicialment, es va fer reaccionar **8** amb 1 eq de NaOCN i una solució diluïda d'AcOH a 0°C (l'àcid isociànic generat és volàtil a temperatura ambient). Després de 3 dies de reacció i d'haver afegit fins a un total de 12 eq de reactiu, l'anàlisi per TLC no va mostrar cap signe d'evolució. A un segon intent, es van emprar directament 10 eq de NaOCN i 10 eq de TFA durant 4 hores, també sense èxit.

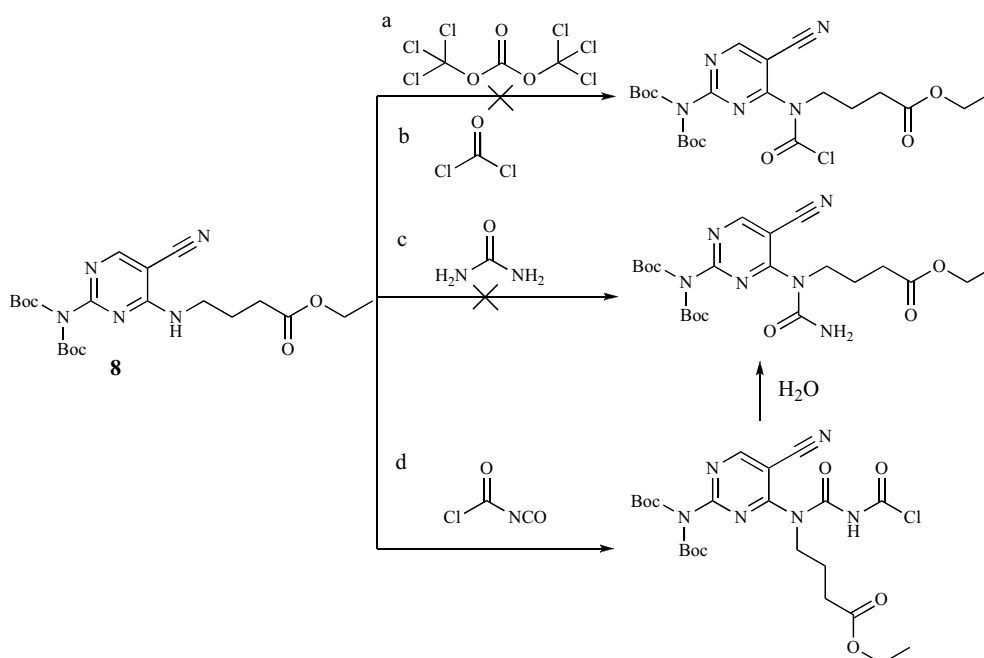


**Figura 38.** Esquema dels intents de síntesi de l'intermedi **9** a partir de **8** mitjançant: a) isocianat de sodi, b) isocianat de trimetilsil·lil, i c) isocianat de clorosulfonil.

El següent reactiu va ser l'isocianat de clorosulfonil (CSI),<sup>28</sup> que experimenta addicions nucleòfiles, tant per part de tiols i fenols com d'amines, per formar el derivat carbamat *N*-clorosulfonil que, en hidrolitzar-se en aigua, origina la urea derivada (**Figura 38c**).<sup>28a</sup> En diferents assaigs, es va dur a terme la reacció en condicions anhidres, a baixa temperatura (-10°C) i amb un ordre d'addició controlat, ja que si el reactiu CSI es troba en proporció limitant respecte el producte de partida es forma l'espècie dimèrica amb dos grups clorosulfonil.<sup>28b</sup> En un primer intent, on es va emprar de 2 a 5 eq de CSI amb un excés de NEt<sub>3</sub> i THF com a dissolvent, es va arribar a la conclusió que la base reaccionava amb el reactiu. No obstant, en repetir el procediment sense NEt<sub>3</sub>, tampoc es va aïllar cap producte, ja que, en addicionar el bicarbonat de sodi i fer els rentats de la fase orgànica, l'anàlisi per RMN de <sup>1</sup>H i EM només mostrava el reactiu de partida. És

per això, que en aquest punt es va optar per realitzar dues proves, tot i que tampoc van funcionar, en les quals es va aturar la reacció afegint bicarbonat o amoníac. I, a un últim assaig, on es va emprar directament 15 eq de CSI i es va deixar temperar la reacció durant tota una nit, els resultats tampoc van ser els esperats.

Un altre reactiu assajat va ser l'isocianat de trimetilsil·lil (TMS-NCO) (**Figura 38b**).<sup>29</sup> A una primera prova, es va fer reaccionar **8** amb 2 eq de TMS-NCO en THF durant 48 hores a 90°C, en presència i en absència de 4 eq de NEt<sub>3</sub>. Després de 24 hores de reacció, l'anàlisi per TLC i per ESI-MS no van revelar cap signe de reactivitat en cap d'ambdós assaigs. Davant d'aquest resultat, es va decidir forçar al màxim les condicions, per una banda, mitjançant la reacció, a temperatura ambient, amb 2 eq de TMS-NCO, 2 eq de DIEA i 2 eq de DMAP en piridina durant 20 hores, i, per l'altra, amb un gran excés de TMS-NCO i DIEA, 20 eq, i una quantitat catalítica de DMAP a 120°C durant 24 h. Tot i això, malauradament en cap cas la reacció va funcionar i també es va descartar l'ús d'aquest reactiu.



**Figura 39.** Esquema dels intents de síntesi de l'intermedi **9** a partir de **8** mitjançant: a) trifosgè, b) fosgè, c) urea, i d) isocianat de clorocarbonil.

Un altre dels reactius utilitzats va ser el trifosgè (**Figura 39a**),<sup>30</sup> un sòlid cristal·lí estable àmpliament utilitzat com a substitutiu del fosgè a causa de la seva alta toxicitat. A nivell de reactivitat, 1/3 d'eq de trifosgè reacciona amb un nucleòfil de forma similar a 1 eq de fosgè.<sup>30b</sup> A més, en presència d'una base inorgànica i d'un dissolvent orgànic halogenat, reacciona amb amines secundàries per formar el clorur de carbamoil corresponent. Concretament, a la bibliografia es descriu que l'ús de bicarbonat i DCM condueixen a rendiments molt alts.<sup>30a</sup> Per tant, primerament, es va afegir sobre **8**, a 0°C i dissolt en DCM, 0.7 eq de trifosgè i 2 eq de bicarbonat de sodi, però l'anàlisi per TLC i ESI-MS a les 24 hores no va mostrar cap signe de reactivitat. A una segona

prova,<sup>30c</sup> es van fer reaccionar 0.4 eq de trifosgè (addicionat a baixa temperatura), 1.4 eq de NEt<sub>3</sub>, una quantitat catalítica de DMAP i THF com a dissolvent. Malgrat que es van addicionar més equivalents de trifosgè al cap d'1.5 hores i es va deixar reaccionar tota una nit, la reacció tampoc va funcionar. Finalment, a l'última prova amb 1.4 eq de DIEA enlloc de la NEt<sub>3</sub>, després de 62 hores el resultat tampoc va ser satisfactori.

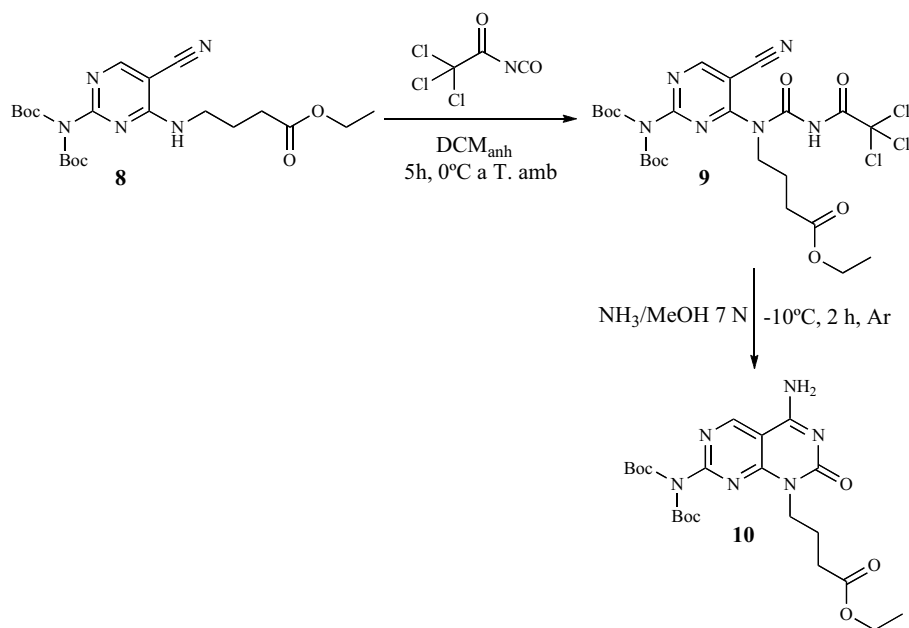
En vista de la baixa reactivitat obtinguda amb el trifosgè, es va optar per fer un assaig amb fosgè, en el qual es va addicionar sobre **8**, molt lentament, a baixa temperatura (0°C) i dissolt en una barreja 1:1 d'una solució aquosa saturada de bicarbonat sòdic i DCM.<sup>31</sup> Transcorreguts 30 min de reacció, es va afegir un excés de fosgè i 5 eq de NEt<sub>3</sub>, i es va deixar reaccionar durant 1 hora a temperatura ambient (**Figura 39b**). L'anàlisi del cru per TLC va revelar només producte de partida i, per tant, també es va descartar aquest reactiu.

A partir de dos procediments localitzats a la bibliografia,<sup>32</sup> es va fer reaccionar **8** amb 10 eq d'urea durant 1.5 hores a 150 °C. En aquest cas, es va detectar per TLC la formació de dos productes nous, que van ser aïllats per cromatografia en columna. L'anàlisi per EM-ESI i MALDI-TOF va donar valors de *m/z* corresponents a la massa del producte de partida **8** i del desitjat cíclic (**10**), però sense els grups protectors Boc (**Figura 39c**). Tot i aquest resultat, també es va descartar aquesta via ja que es va obtenir el producte desitjat en unes condicions més suaus, tal com es descriu a continuació.

Tenint en compte altres reaccions semblants descrites a la bibliografia,<sup>25,28c,33</sup> es va optar per utilitzar l'isocianat de clorocarbonil (CCI) (**Figura 39d**). A una primera prova, en condicions anhidres i a baixa temperatura (0°C), es van addicionar 2 eq de CCI sobre una mescla formada per 4 eq de NEt<sub>3</sub> i **8** en DCM. Després de 24 hores de reacció a temperatura ambient, l'anàlisi del cru per TLC va revelar la formació de nous productes més polars que van ser aïllats per cromatografia en columna, i, posteriorment, analitzats per EM-ESI, on es va detectar molt minoritàriament el producte **10** desitjat. A una segona prova, tot i seguir el mateix procediment experimental i fer l'addició a baixa temperatura (-20°C/-30°C), el resultat no va canviar. Finalment, es va optar per addicionar a baixa temperatura (-10/0°C) la mescla de reacció sobre el CCI atès que està descrit que l'ordre d'addició és un factor molt important, ja que si el reactiu CCI es troba en proporció limitant respecte l'amina secundària és més favorable la formació d'una estructura biuret,<sup>33</sup> tal com s'havia detectat als espectres de masses anteriors. Tot i això, els resultats tampoc van millorar.

Finalment, la reacció de **8** amb 10 eq d'isocianat de tricloroacetil<sup>25,34</sup> va conduir a la formació d'un producte intermedi (**9**) amb un rendiment quantitatiu (**Figura 40**). Així doncs, malgrat que els isocianats orgànics acostumen a ser molt reactius amb les amines, el fet que l'amina secundària de la posició 6 estigui impedida estèricament, va ocasionar que fos necessari l'ús d'un isocianat molt reactiu per formar el carbamat corresponent.

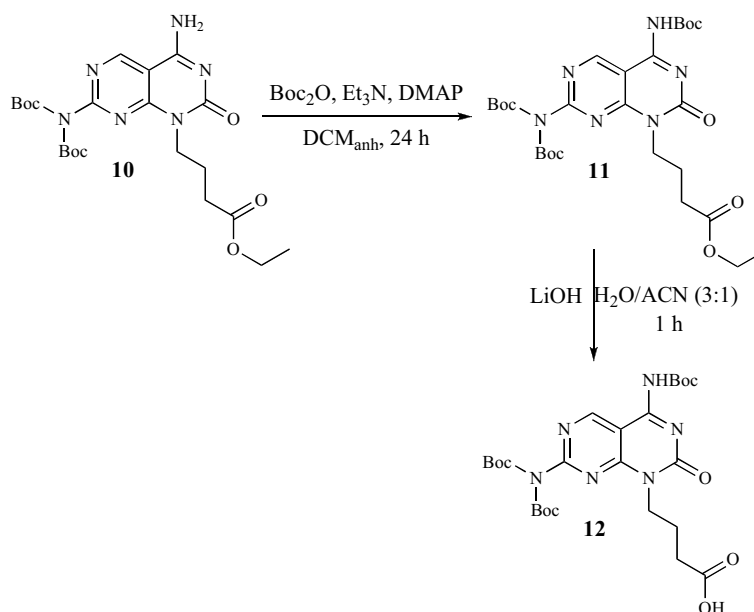
En aquest punt de la síntesi, el següent pas va consistir en la ciclació del producte intermedi (**9**) per reacció amb una dissolució 7 N de NH<sub>3</sub> en MeOH, a baixa temperatura (0°C/-10°C) durant dues hores.<sup>25,34a</sup> Després dels rentats corresponents, l'anàlisi del cru per TLC va revelar la formació del producte desitjat **10**, que un cop aïllat i purificat per cromatografia en columna, va ser obtingut amb un rendiment final del 80%.



**Figura 40.** Esquema de la reacció de **8** amb isocianat de tricloroacetil i de la formació de **10** mitjançant la reacció de l'intermedi **9** amb una solució 7 N de NH<sub>3</sub> en MeOH.

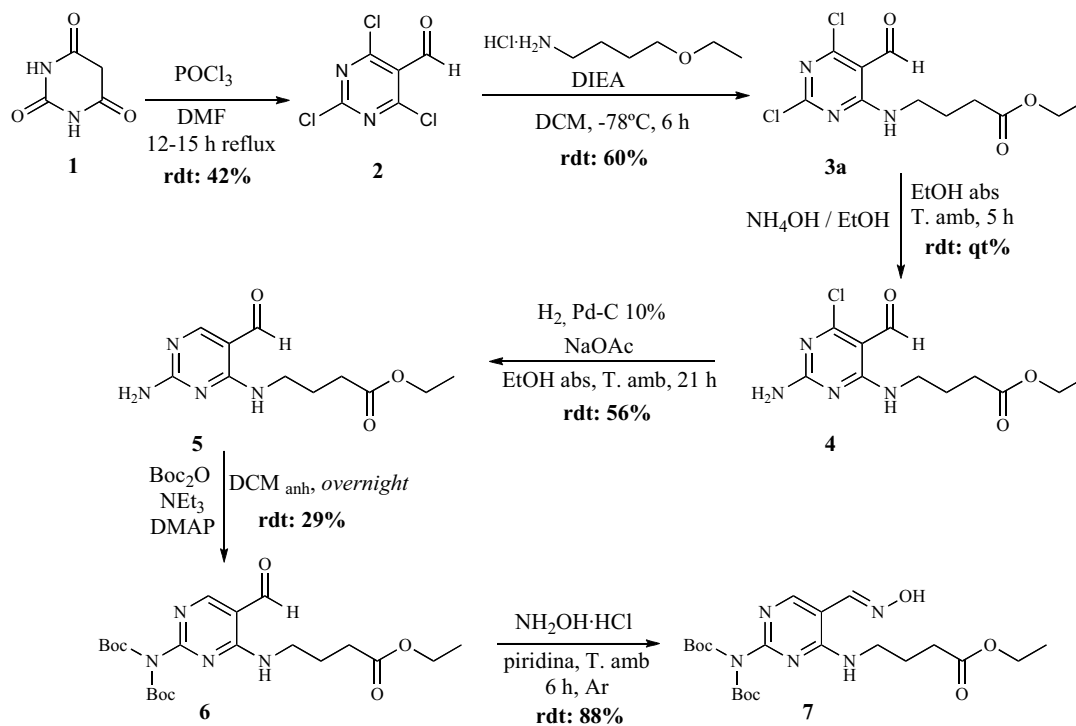
El següent pas, va consistir en la protecció de la funció amino del producte **10** mitjançant el mateix procediment experimental emprat per **6**.<sup>25</sup> Després de 24 hores de reacció, l'anàlisi cromatogràfic del cru va revelar la formació d'un únic producte, que va ser caracteritzat per EM-ESI i RMN (<sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C) com el derivat monoprotegit **11**, que es va obtenir amb un rendiment del 90% (**Figura 41**). Cal comentar que, malgrat que l'objectiu inicial era aconseguir el producte diprotegit, es va donar per bo aquest resultat, ja que la dificultat per introduir un segon grup Boc suggeria que no hi haurien problemes en la futura síntesi dels derivats en fase sòlida.

L'etapa final va consistir en l'obtenció de **12** mitjançant la hidròlisi bàsica d'**11** (**Figura 41**) a través del tractament amb un excés de LiOH (10 eq), dissolt en H<sub>2</sub>O/ACN (3:1), durant 1 hora a temperatura ambient.<sup>35</sup> Després de la purificació per cromatografia en columna, es va aïllar **12** amb rendiment del 27% i es va confirmar la seva estructura final per espectrometria de masses ESI i MALDI-TOF i RMN (<sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C).

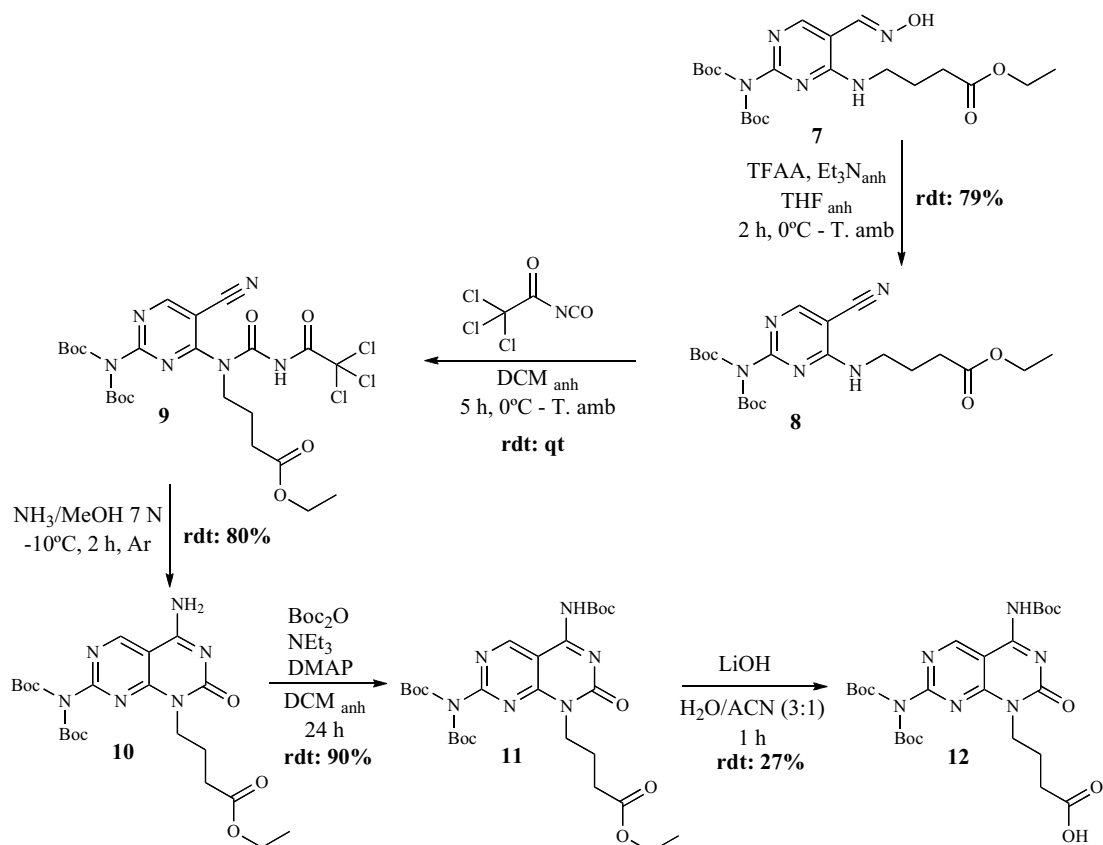


**Figura 41.** Esquema de la reacció de protecció de **10** i de la hidròlisi bàsica de l'èster **11** per donar el producte final **12**.

A continuació, a la **Figura 42**, es mostra l'esquema global de la ruta sintètica emprada per a la preparació de **12**.



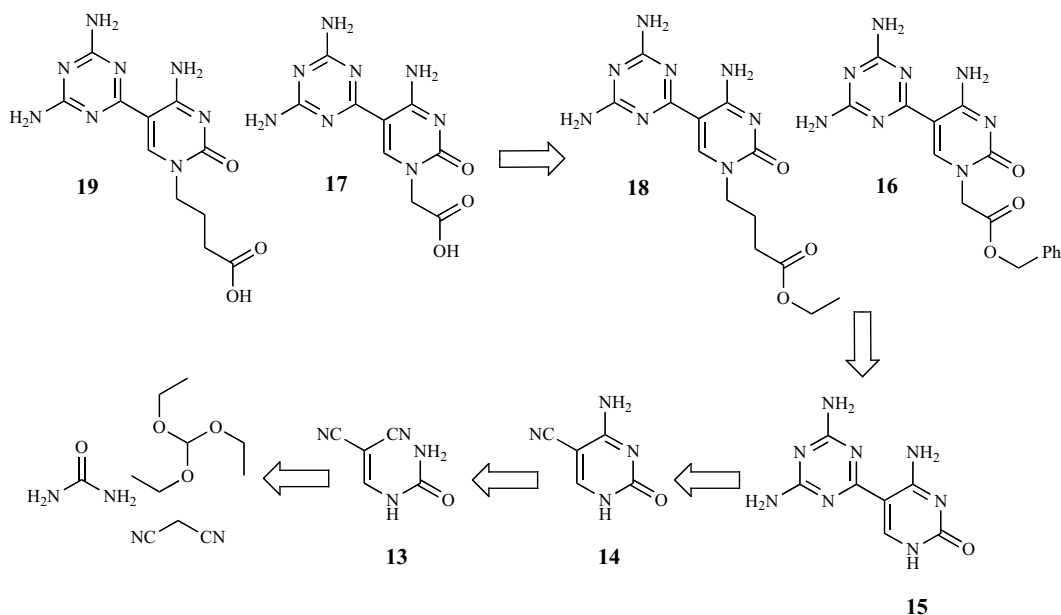
continua a la pàgina següent



**Figura 42.** Esquema de la ruta sintètica completa emprada per a l'obtenció del producte **12**. En negreta s'especifiquen els rendiments obtinguts en cadascuna de les etapes.

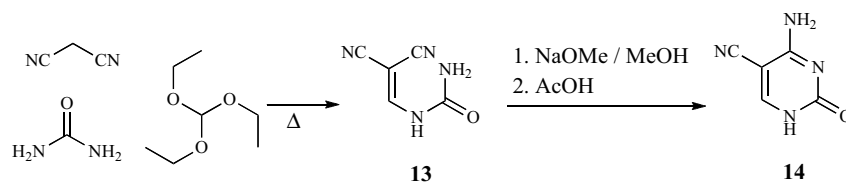
### 1.1.1.2 Síntesi del monòmer Janus B

En aquest apartat s'exposa el desenvolupament d'una ruta sintètica de 5 etapes que ha permès obtenir el monòmer Janus B **19**, convenientment funcionalitzat amb un grup carboxil per permetre la seva derivatització en fase sòlida. Tot i això, cal comentar que inicialment, anàlogament al compost **12**, es va plantejar la protecció de les funcions amino exocíclics amb grups Boc, però en observar la seva baixa reactivitat, es va optar per mantenir-los desprotegits i emprar directament el monòmer en fase sòlida. A la **Figura 43** es mostra l'esquema retrosintètic per a l'obtenció de **19** i el seu anàleg **17**, on la funció carboxil està separada de l'anell citosina amb un únic grup metilè.



**Figura 43.** Esquema retrosintètic general per a la síntesi dels monòmers Janus B.

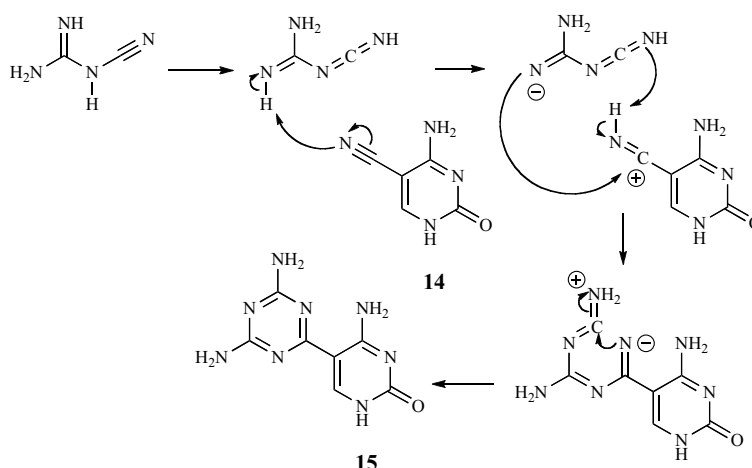
La primera etapa de la ruta sintètica va consistir en la condensació de tres compostos comercials (urea, ortoformiat d'etil i malononitril) per formar **13** amb un rendiment del 71%. A continuació, el cru resultant, sense necessitat de purificació prèvia, es va fer reaccionar amb una solució de NaOMe per obtenir la 5-cianocitosina (**14**) amb un rendiment del 41% (**Figura 44**).<sup>36</sup>



**Figura 44.** Esquema per a l'obtenció de 5-cianocitosina (**14**).

La transformació del grup nitril a l'heterocicle diaminotriazina (DAT), es va dur a terme mitjançant l'ús de dicianidamida seguint alguns procediments descrits a la bibliografia.<sup>37</sup> A continuació, a la **Figura 45** s'indica el mecanisme proposat per a la formació de l'anell diaminotriazina a partir de la reacció del grup nitril de la 5-cianocitosina amb la dicianidamida.





**Figura 45.** Mecanisme proposat per a la formació de l'anell diaminotriazina (DAT). És important que en el medi de reacció no hi hagi un excés de reactiu dicianidamida, ja que dimeritza formant cristalls de melamina.<sup>37b</sup>

Malgrat els nombrosos exemples descrits a la bibliografia per a l'obtenció d'aquest heterocicle a partir d'un grup nitril,<sup>37</sup> cal destacar que la síntesi de **15** no va ser fàcil i va caldre realitzar diversos assaigs.

Inicialment, es va fer reaccionar **14** amb dicianidamida i hidròxid de potassi (triturat), i es van efectuar variacions de la temperatura d'escalfament, del dissolvent, del temps de reacció o fins i tot de la quantitat d'equivalents de base adicionats (**Taula 1**). Tot i això, les anàlisis dels crús corresponents per EM MALDI-TOF, CI i RMN (<sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C) no van revelar en cap cas la formació del producte desitjat.

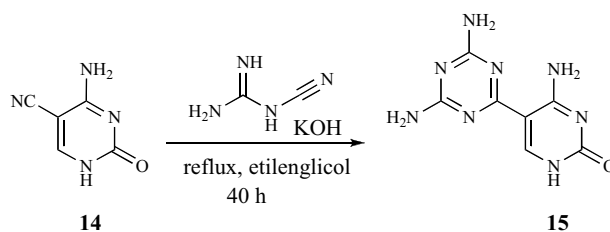
Assaig	base	dissolvent	T (°C)	t (h)
1	2.5 eq KOH	Etilenglicol	135	15
2	1 eq KOH	Isopropanol	80	15
3	1 eq KOH	DMF	160	4
4	2.5 eq KOH	DMF	160	4.5

**Taula 1.** Resum dels diferents assaigs realitzats per a l'obtenció de **15**. En tots els casos es van emprar condicions anhidres.

Posteriorment, enlloc de fer reaccionar tots els reactius conjuntament, es va optar per afegir, a través d'una cànula, una mescla formada per 2 eq de dicianidamida i 4 eq d'hidròxid de potassi en etilenglicol, sobre una solució del producte de partida **14**. Després d'unes 15 hores de reacció a 130°C en condicions anhidres, l'anàlisi del cru per HPLC-MS va revelar la formació del producte desitjat **15**, però molt minoritàriament. Tot i forçar les condicions de reacció mitjançant l'addició d'1 eq més de dicianidamida i de base, el resultat no va canviar. Així doncs, davant d'aquests resultats es va arribar a la conclusió que, a diferència de la timina on sí s'havia descrit amb èxit l'obtenció d'aquest heterocicle a partir del seu ciano-derivat,<sup>37c</sup> la presència del grup amino en

l'anell citosina semblava dificultar la reacció, tal com ho fa la presència de grups funcionals nitril contigus a un anell de benzè.<sup>37b</sup>

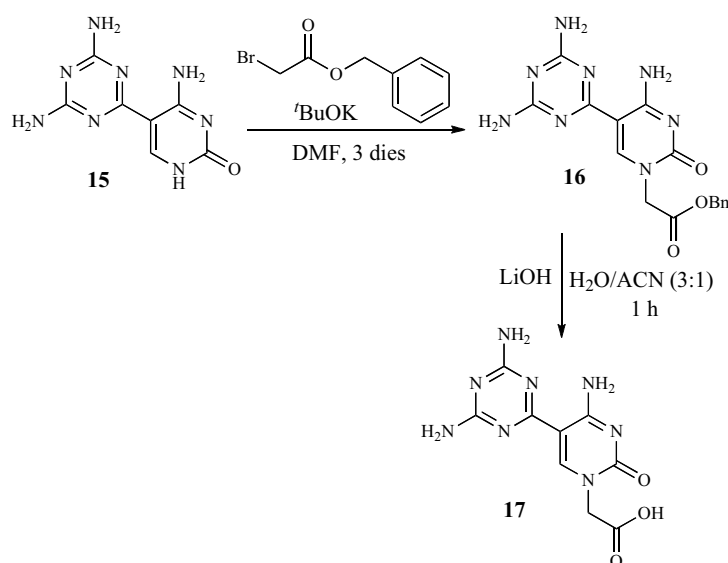
Per tant, basant-nos en aquesta idea, es va decidir efectuar la reacció a través de la irradiació de microones. Primerament, en condicions anhidres, es va fer reaccionar, durant 20 hores a 150 °C i en atmosfera d'argó, una mescla d'1.5 eq de dicianidamina i d'hidròxid de potassi dissolta en el mínim volum d'etilenglicol i addicionada sobre una solució de 200 mg de **14**. Tot i que l'anàlisi per HPLC-MS i RMN (<sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C) havia confirmat la formació del producte **15** desitjat, la principal limitació d'aquest procediment va ser l'escala de treball, ja que no es podien emprar volums superiors als 15 ml atès el tamany del reactor de microones. Tot i això, aquest bon resultat confirmava que calia forçar molt les condicions de reacció. Finalment, es va poder obtenir el compost **15** (**Figura 46**) mitjançant la reacció de 5 g de 5-cianocitosina, 2 eq d'hidròxid de potassi i dicianidamina, escalfant la mescla resultant a 150 °C durant unes 40 hores, que després dels corresponents rentats amb H<sub>2</sub>O, éter i EtOH va poder ser aïllat amb un rendiment del 54 %.



**Figura 46.** Esquema de la síntesi de **15** mitjançant la reacció de **14** amb dicianidamina.

Un cop obtingut el compost **15**, la següent etapa va consistir en l'alquilació del N1 de l'anell citosina<sup>38</sup> a través de la reacció del cru anterior amb 4 eq de bromoacetat de benzil, en presència de 3 eq de *tert*-butòxid de potassi i DMF com a dissolvent. Transcorregudes 15 hores de reacció, es va obtenir **16**, tot i que molt minoritàriament segons l'anàlisi del cru per HPLC-MS. A continuació, tal com s'havia realitzat prèviament per a l'obtenció de **12**,<sup>35</sup> el cru es va sotmetre a una hidròlisi bàsica amb un excés de LiOH (10 eq), dissolt en una solució H<sub>2</sub>O/ACN (3:1) (**Figura 47**).

La purificació de **17** es va dur a terme per cromatografia en fase invertida de mitjana pressió (MPLC), i les fraccions menys impures es van ajuntar i liofilitzar. Malgrat que el percentatge de puresa obtingut va ser baix (49%), no es va considerar necessari repurificar-lo per efectuar la seva derivatització en fase sòlida. En canvi, amb l'objectiu de poder-lo caracteritzar per espectrometria de masses i RMN, es va purificar una petita part per HPLC semipreparatiu, fet que va permetre obtenir **17** amb una puresa del 90%. Per tant, a causa d'aquests problemes a la purificació, no s'ha pogut donar un rendiment global de les tres últimes etapes de síntesi.

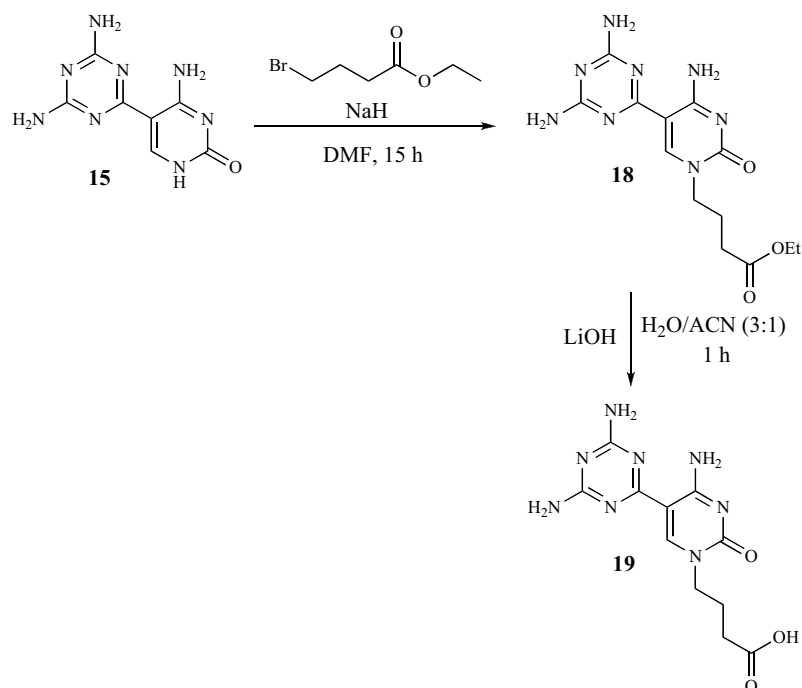


**Figura 47.** Esquema de la síntesi de **17** a través de l'alquilació de **15**, i la hidròlisi bàsica de **16**.

Un cop obtingut el compost **17**, l'objectiu immediat era la seva funcionalització a grup tiol mitjançant la química en fase sòlida, tal com s'explicarà al següent apartat. Ara bé, com a conseqüència dels problemes sorgits durant l'etapa de desprotecció i de desancoratge de la resina, que posaven de manifest la labilitat de l'enllaç amida entre la molècula i el fragment peptídic, es va arribar a la conclusió que la longitud de l'espaiador entre l'anell de la citosina i el grup carboxílic de la molècula Janus no era adequada. Per aquesta raó, es va plantejar la síntesi del monòmer **19**, on el grup carboxílic està separat de l'anell citosina per tres carbonis.

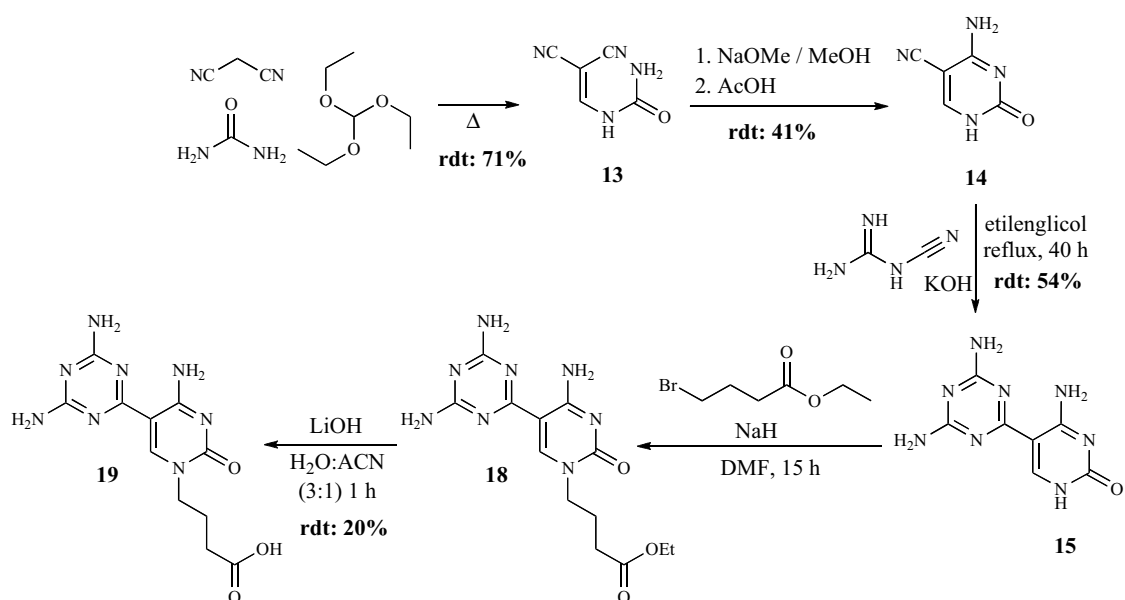
Per tant, anàlogament al compost **16**, es va obtenir **18** a través de la reacció del cru de **15** amb 1.1 eq de bromobutirat d'etil en presència d'1 eq d'hidrur de sodi i DMF com a dissolvent.<sup>38</sup> A continuació, la hidròlisi del cru amb 10 eq LiOH, en una solució de H<sub>2</sub>O/ACN (3:1), va conduir al producte **19** (**Figura 48**).<sup>35</sup>

El cru de **19** va ser purificat per MPLC i després d'ajuntar i liofilitzar les fraccions més pures es va obtenir el producte desitjat amb una puresa del 80%, que es va considerar suficient per acoblar-lo directament en fase sòlida. Tot i això, en aquest cas també es va optar per purificar una petita part mitjançant HPLC semipreparatiu, per tal de caracteritzar-lo per espectrometria de masses i RMN <sup>1</sup>H, fet que va permetre obtenir el compost final **19** amb una puresa del 97%. A més, a diferència del producte **17**, en aquest cas sí que es va poder obtenir un rendiment global de les dues últimes etapes (rdt: 20%).



**Figura 48.** Esquema de la síntesi de **19** a través de l'alquilació de **15** i de la hidròlisi bàsica de **18**.

A continuació, a la **Figura 49** es mostra l'esquema general de la ruta sintètica seguida, que ha permès l'obtenció del monòmer Janus B desitjat **19**.



**Figura 49.** Esquema resum de la ruta sintètica completa emprada per a l'obtenció de **19**. En negreta s'especifiquen els rendiments obtinguts en algunes de les etapes.

### 1.1.2 Síntesi en fase sòlida dels monòmers Janus funcionalitzats amb un grup tiol

Un cop es va disposar dels monòmers Janus **12** i **19**, convenientment funcionalitzats amb un grup carboxil, el següent pas va consistir en aplicar la metodologia de la química en fase sòlida per preparar els derivats tiol que poguessin ser emprats als experiments de DCC. Cal destacar que, un cop obtinguts els productes objectiu, a causa de la ràpida oxidació del grup tiol en condicions atmosfèriques, ha calgut guardar-los sempre en atmosfera d'argó i a baixa temperatura.

En primer lloc, es van sintetitzar els compostos **21** i **22** mitjançant la formació d'un enllaç amida entre el grup carboxil de les molècules heteroaromàtiques **12** i **19**, respectivament, i l'extrem *N*-terminal de la peptidil-resina Fmoc-Asn(Trt)-Arg(Pbf)-Cys(Trt)-resina (**20**). Concretament, es va emprar la resina *MBHA*-Rink-amida que permet obtenir el pèptid amb l'extrem *C*-terminal en forma de carboxamida.

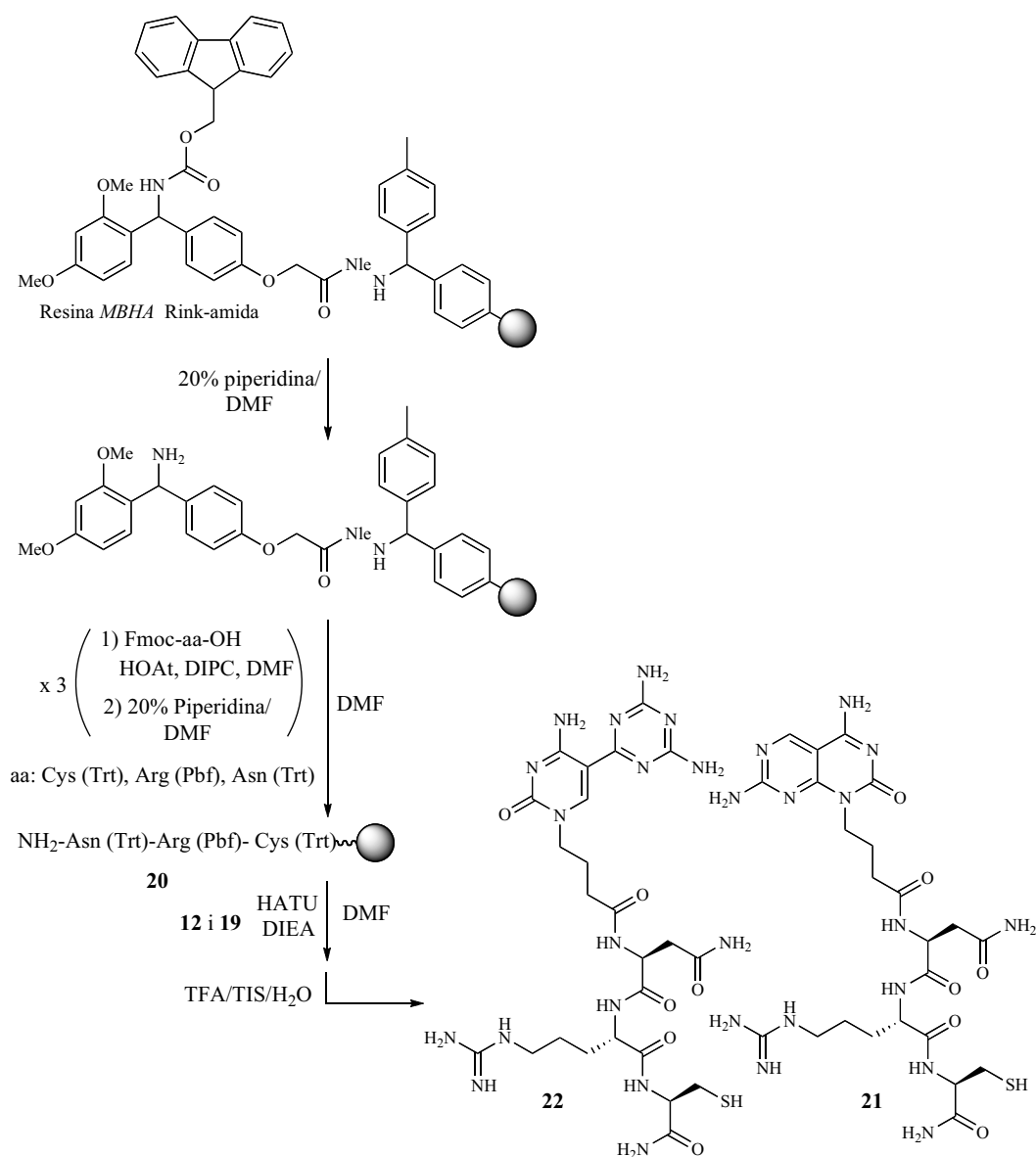
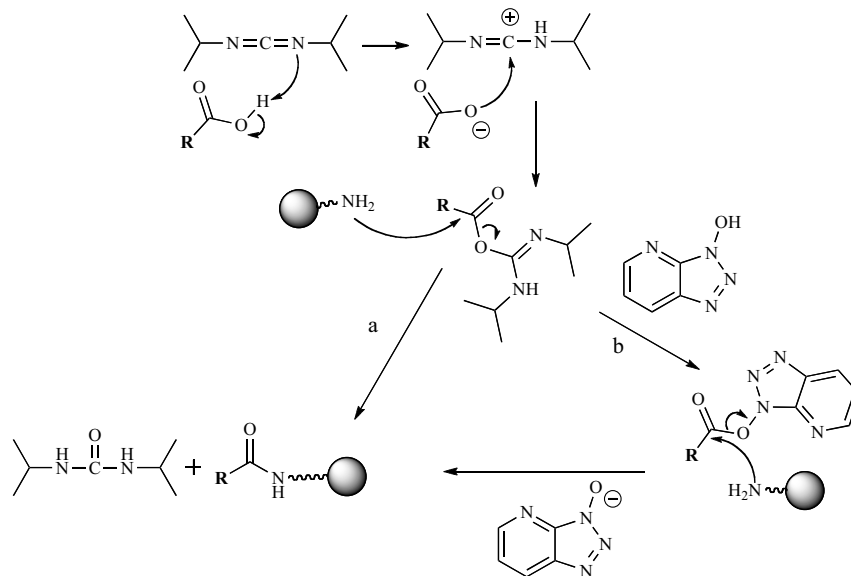


Figura 50. Esquema de la derivatització en fase sòlida dels compostos Janus **12** i **19**.

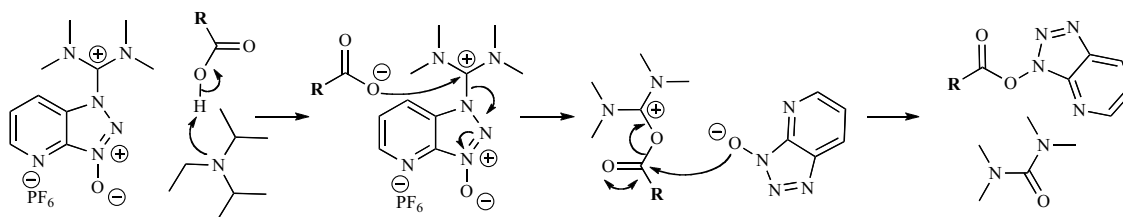
Com es pot observar a la **Figura 50**, atès que el grup amino de l'espaiador Rink-amida de la resina es troba protegit amb el grup protector Fmoc, en una primera etapa, va caldre fer un tractament amb 20% de piperidina en DMF per alliberar la funció amino. A continuació, es van acoblar els Fmoc-aminoàcids, convenientment protegits, la cisteïna (Cys), l'arginina (Arg) i l'asparagina (Asn). L'elongació de la cadena peptídica es va dur a terme amb *N,N*-diisopropilcarbodiimida (DIPC) i HOAt com agents activants. A continuació, a la **Figura 51** es mostra el mecanisme de reacció per formar l'enllaç amida amb aquests compostos.



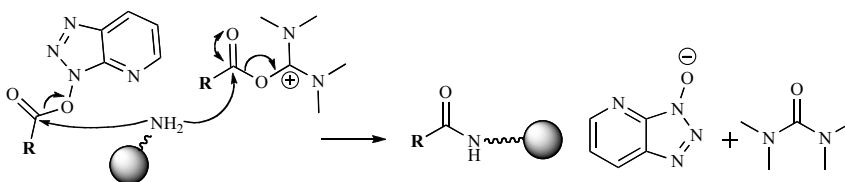
**Figura 51.** Mecanisme de formació d'un enllaç amida amb DIPC en presència d'HOAt.

En canvi, com es mostra a la **Figura 52**, l'acoblament dels monòmers Janus **12** i **19** es va dur a terme amb HATU en presència de DIEA.

**1) Pre-activació:**



**2) Acoplament:**

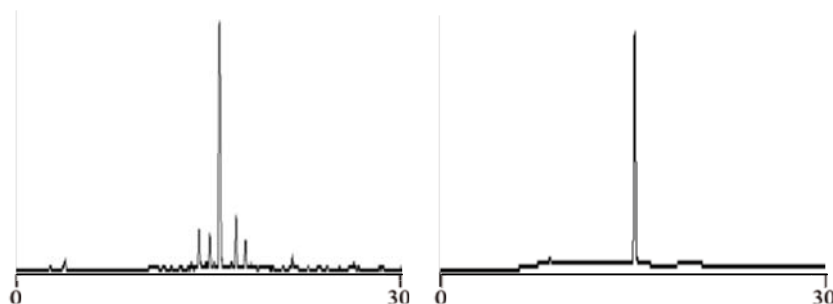


**Figura 52.** Mecanisme de formació d'un enllaç amida amb HATU.

És important comentar en aquest punt que, a diferència de l'ús de DIPC en combinació amb HOAt, amb una sal d'uroní com l'HATU cal realitzar una pre-activació abans de l'addició sobre la resina, ja que si no es produiria la reacció del grup amino lliure de la cadena peptídica amb l'HATU per formar el corresponent derivat tetrametilguanidinilat, i el conseqüent bloqueig de la cadena. És per això que amb aquest tipus d'agents acoblants cal evitar emprar un excés.<sup>39</sup>

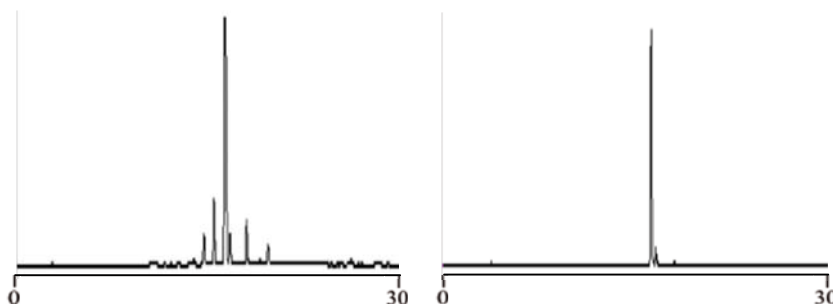
Un cop acoblada la molècula Janus, la darrera etapa de la síntesi va consistir, d'una banda, en l'eliminació dels grups protectors de les cadenes laterals dels aminoàcids i de la molècula Janus **12** i, de l'altra, en el desancoratge de la resina. Aquest procés es va realitzar en una sola etapa mitjançant un tractament àcid (TFA) en presència de capturadors de cations ( $H_2O$  i TIS). Així doncs, a través d'una estratègia en fase sòlida Fmoc/<sup>t</sup>Butil, es van sintetitzar els productes **21** i **22** derivatitzats en forma de carboxamida en l'extrem C-terminal, i funcionalitzats amb el grup tiol proporcionat per la cisteïna. Cal dir, però, que atès que només es va purificar una petita part del cru per a la realització dels experiments de DCC, no s'ha pogut donar els rendiments globals de la síntesi i de la purificació dels productes finals **21** i **22**.

En el cas del compost **21**, l'anàlisi del cru per HPLC en fase invertida va mostrar la presència d'un producte majoritari de  $t_R = 13.1$  min (73%). Després de l'anàlisi per MALDI-TOF del pic col·lectat a la purificació, es va confirmar que el pic majoritari corresponia al producte **21** desitjat (**Figura 53**).



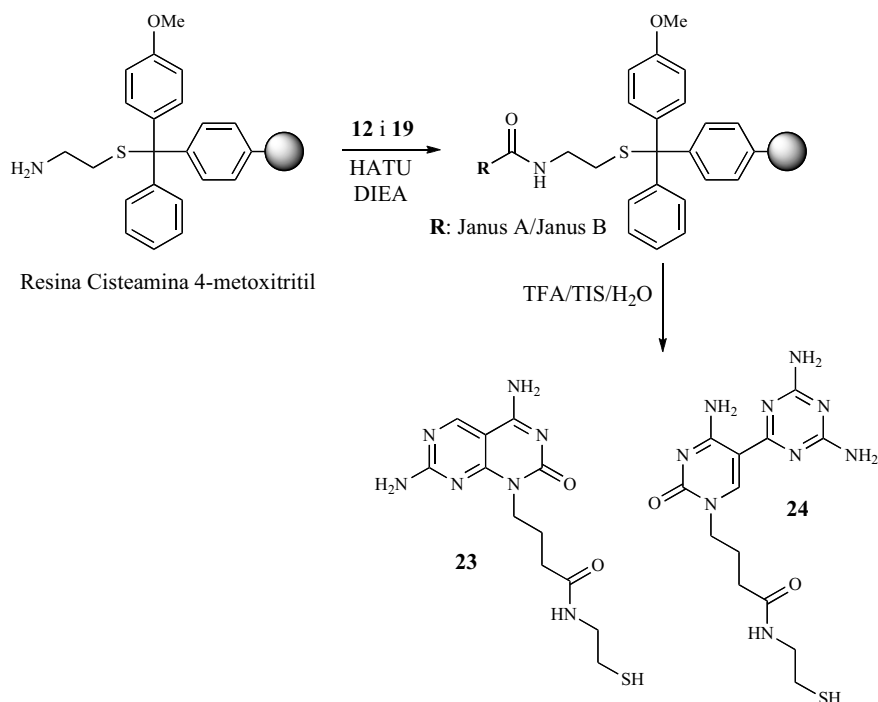
**Figura 53.** Cromatograma del cru (esquerra) i del producte pur **21** (dreta).

En el cas del compost **22**, el producte majoritari per HPLC en fase invertida,  $t_R = 14.1$  min (54%), també va correspondre al producte desitjat (**Figura 54**).



**Figura 54.** Cromatograma del cru (esquerra) i del producte pur **22** (dreta).

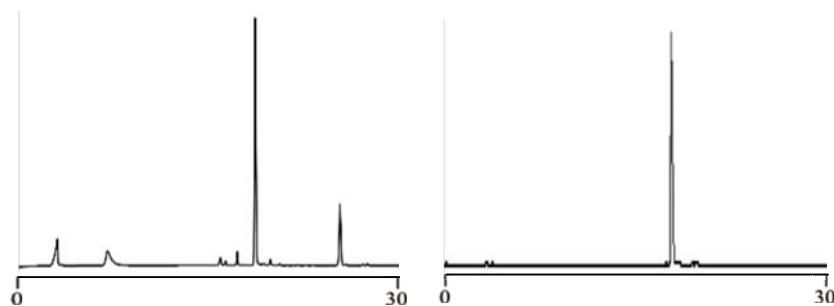
Per altra banda, per a la síntesi dels compostos **23** i **24**, es va emprar la resina Cisteamina 4-metoxitritil (**Figura 55**). En aquest cas, el grup tiol està emmascarat a través de la unió amb el grup tritil de la resina, i és a través de la funció amino lliure que té lloc l'ancoratge de la molècula Janus. En aquest cas també es va emprar l'agent acoblant HATU en presència de DIEA. Un cop format l'enllaç amida, anàlogament als derivats **21** i **22**, el corresponent tractament àcid (TFA), en presència de capturadors de cations ( $H_2O$  i TIS), va permetre el desancoratge de la resina i, en el cas del compost **23**, l'eliminació dels grups protectors Boc.



**Figura 55.** Derivatització en fase sòlida dels compostos heteroaromàtics Janus **12** i **19** mitjançant l'ús de la resina Cisteamina 4-metoxitritil, per donar els monòmers tiol **23** i **24**.

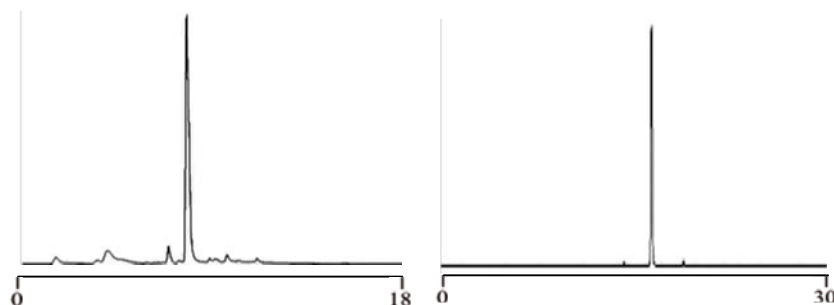
L'anàlisi per HPLC del cru del derivat **23** (**Figura 56**), va mostrar la presència de dos pics majoritaris a  $t_R = 18.6$  min (51%) i a  $t_R = 25.3$  min (35%), l'anàlisi dels quals per espectrometria de masses MALDI-TOF va revelar que es tractava del producte desitjat i del seu dímer disulfur, respectivament. La presència del dímer denota, doncs, l'elevada tendència que tenen els tiols en solució a oxidar-se a disulfur en contacte amb l'oxigen atmosfèric.





**Figura 56.** Cromatograma del cru (esquerra) i del producte pur **23** (dreta).

En canvi, el cru corresponent al compost **24** analitzat per HPLC-MS va revelar que el pic majoritari (74%), amb un  $t_R = 8.9$  min, corresponia al producte desitjat (**Figura 57**).

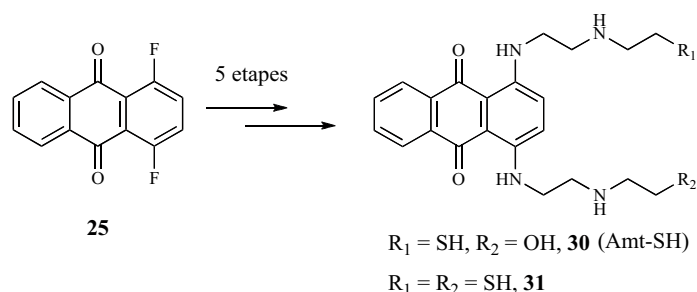


**Figura 57.** Cromatograma d'HPLC-MS del cru (esquerra) i d'HPLC del producte pur **24** (dreta).

Finalment, un cop obtinguts els 4 derivats Janus (**21**, **22**, **23** i **24**), es van quantificar mitjançant el test d'Ellman (apartat 4.1 de Materials i Mètodes).

## 1.2 Síntesi de derivats de l'ametantrona

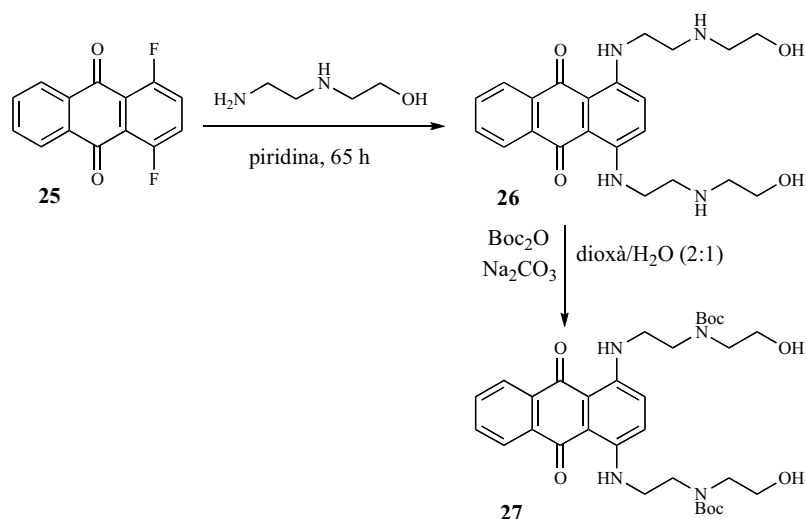
El derivat ametantrona tiol **30** (Amt-SH) s'ha obtingut a través d'una ruta sintètica de 5 etapes en la qual també s'ha aïllat **31**, el derivat amb els dos grups hidroxils originals substituïts per grups tiol (**Figura 58**).



**Figura 58.** Esquema general de l'obtenció dels derivats tiol de l'ametantrona **30** i **31**.

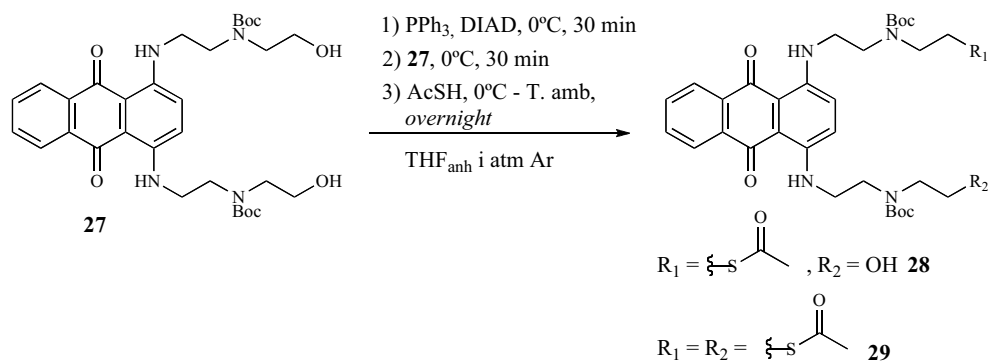
A la primera etapa de la síntesi es va fer reaccionar el producte comercial 1,4-difluoroantracè-9,10-diona (**25**) amb un excés de *N*-(2-hidroxietil)-etilendiamina, en

piridina com a dissolvent (**Figura 59**).<sup>40</sup> És interessant comentar que durant el transcurs de la reacció, a mesura que s'anava produint la substitució nucleòfila aromàtica, el cru de la reacció va anar canviant progressivament d'un color groc inicial a un color blavós, fet que es correlacionava amb l'aparició d'una nova taca que quedava més retinguda per TLC. Després de 3 dies de reacció, l'anàlisi del cru final per espectrometria de masses MALDI-TOF va revelar la formació del producte disubstituit **26** desitjat (ametatrona). Cal comentar, que aquest cru es va emprar directament a la següent etapa, atès que, d'una banda, no era possible la seva purificació per cromatografia en columna de sílica, ja que quedava molt retingut i, de l'altra, no s'observava el producte monosubstituit. Així doncs, es va fer reaccionar el cru durant tota una nit amb 2.4 eq de  $\text{Boc}_2\text{O}$  i  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  en una mescla de dioxà/ $\text{H}_2\text{O}$  (2:1) com a dissolvent, amb l'objectiu de protegir amb el grup Boc les funcions amino dels dos braços de l'ametatrona.<sup>41</sup> Transcorregut el temps de reacció, l'anàlisi del cru per EM-MALDI-TOF va mostrar la formació de **27** que, després de ser purificat per cromatografia en columna, va ser obtingut amb un rendiment del 48%.



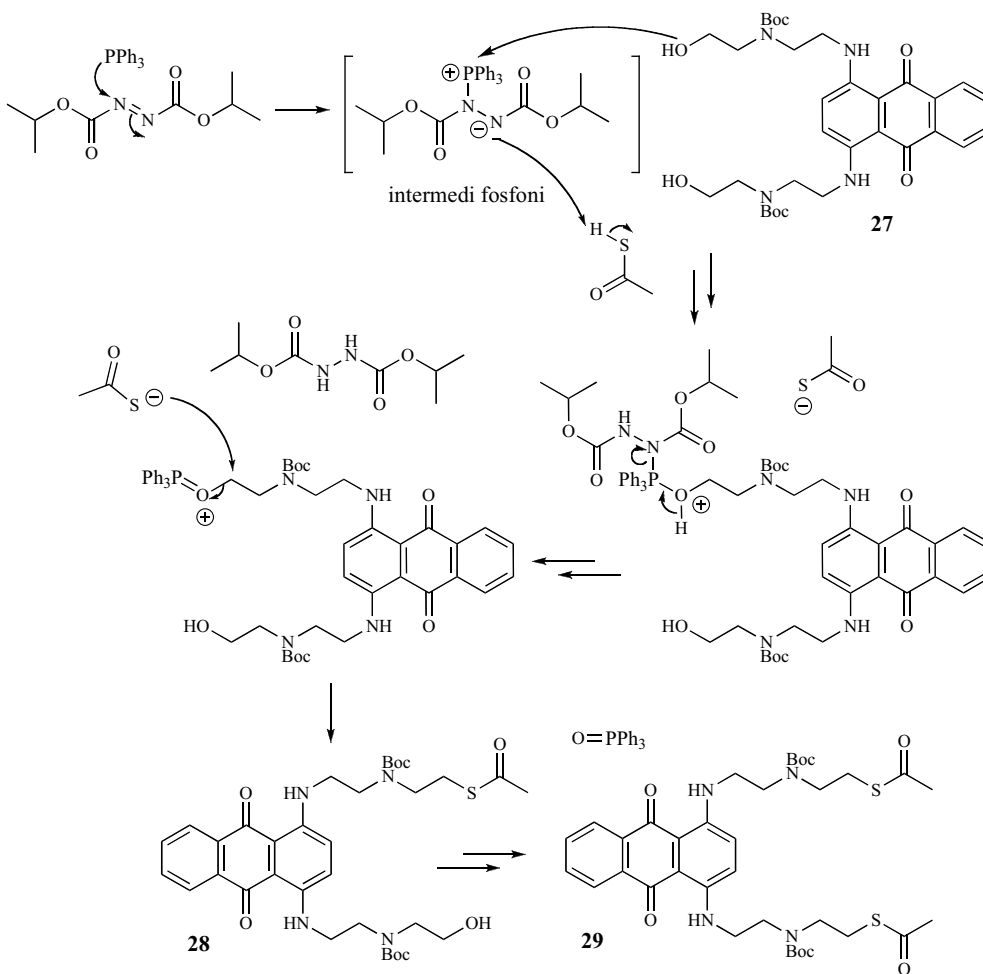
**Figura 59.** Esquema per a l'obtenció de **26** i **27**.

Per a l'obtenció de **28** es va optar per funcionalitzar un dels grups hidroxil mitjançant la reacció de Mitsunobu, ja que permetria obtenir directament el derivat tiol protegit en forma de tioèster. Concretament, a partir de dos procediments descrits a la bibliografia,<sup>42a-c</sup> es va fer reaccionar, a baixa temperatura i en atmosfera d'argó, una mescla equimolar de trifenilfosfina (1 eq) i azodicarboxilat de diisopropil (1 eq) amb una altra mescla, també equimolar, formada per **27** (1 eq) i àcid tioacètic (1 eq) en THF anhidre (**Figura 60**).



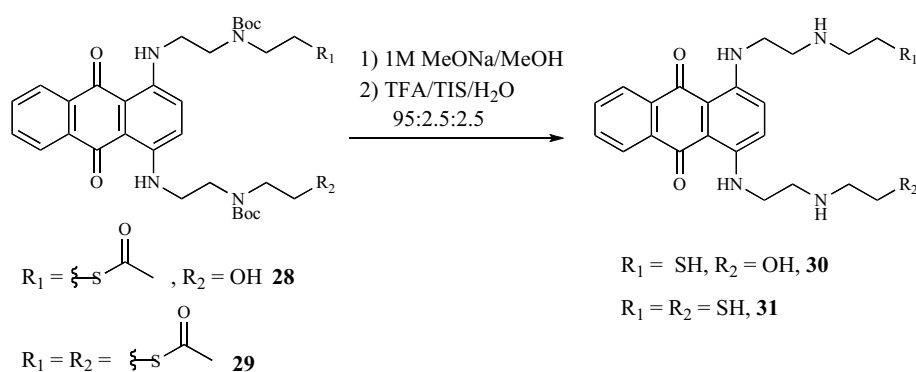
**Figura 60.** Esquema per a l'obtenció de **28** i **29** a partir de **27** mitjançant la reacció de Mitsunobu.

A continuació, a la **Figura 61** es mostra el mecanisme de la reacció on es posa de manifest la importància de l'ordre de reacció, ja que és necessari una activació prèvia de l'agent DIAD amb  $\text{PPh}_3$  durant 30 min. En aquest pas, és indicatiu la formació d'un precipitat blanc.



**Figura 61.** Mecanisme proposat per la reacció de Mitsunobu en la formació de **28** i **29**.

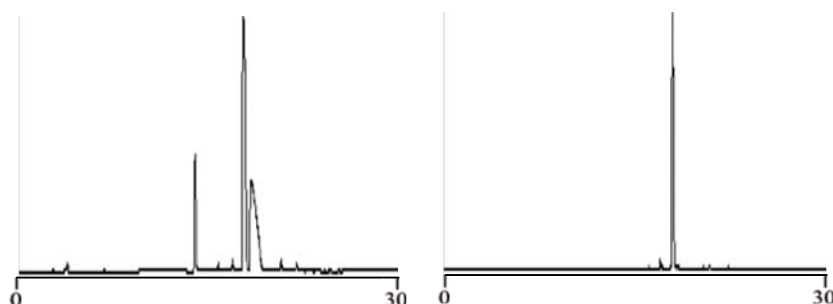
Segons els procediments experimentals seguits, l'addició, lenta i a baixa temperatura, de la mescla del producte de partida amb l'àcid tioacètic sobre l'intermedi fosfoni hauria d'haver conduït al producte desitjat de forma ràpida i amb un bon rendiment. Ara bé, en un primer intent, tot i deixar reaccionar la mescla resultant fins a temperar-se durant 24 h, no es va detectar ni per TLC ni per EM-MALDI-TOF cap signe de reactivitat. Davant d'aquest resultat, es va efectuar un segon assaig en el qual es va escalfar la mescla resultant a 40 °C durant 2 dies, però enlloc dels productes tioacetilats desitjats es van obtenir els compostos acetilats. A partir d'aquest resultat, es va arribar a la conclusió que en presència de l'àcid tioacètic, era l'àtom de sofre qui atacava nucleòfilament a l'intermedi fosfoni en comptes dels hidroxils de **27** i, en formar-se una altra espècie intermèdia, en escalfar fins a 40 °C l'atac nucleòfil dels hidroxils de **27** generava els productes acetilats i el sulfur de trifenilfosfina. Davant d'aquesta hipòtesi, es va optar per seguir un altre procediment<sup>42d</sup> en el qual, per evitar la competència nucleòfila entre l'oxigen i el sofre, s'addicionava primer el producte de partida sobre l'intermedi fosfoni i, posteriorment, s'addicionava l'àcid tioacètic. Així doncs, en aquest tercer assaig, per una banda, es va decidir forçar una mica més les condicions de reacció augmentant l'excés de reactius fins a 2 eq, malgrat el major risc d'obtenir l'espècie disubstituída, i, per l'altra, tal com s'exposa al procediment descrit a la part experimental, es va fer reaccionar, en primera instància, **27** amb l'intermedi fosfoni durant uns 10 min, aproximadament. Finalment, sobre aquesta mescla resultant es va addicionar, molt lentament i a baixa temperatura, l'àcid tioacètic i, en condicions anhidres i de baixa temperatura, es va deixar reaccionar tota una nit. L'anàlisi del cru per TLC va revelar que la reacció havia funcionat, amb la qual cosa es va aïllar **28** amb un rendiment del 36%. En aquest punt, cal tenir en compte que, malgrat que aquest valor pugui semblar baix, el producte majoritari de la reacció va ser **29**. A més, la dificultat d'eliminar l'òxid de trifenilfosfina residual va ocasionar que s'hagués de dur a terme una primera purificació per cromatografia en columna i una segona per cromatografia en fase invertida de mitjana pressió (MPLC).



**Figura 62.** Síntesi de **30** i **31** per hidròlisi bàsica de **28** i **29**, respectivament, seguida d'un tractament àcid amb TFA en presència de capturadors de cations (TIS i H<sub>2</sub>O).

Finalment, l'última etapa de la síntesi va consistir en l'eliminació dels grups protectors per generar els corresponents monòmers tiol desitjats, mitjançant el seguiment d'un procediment experimental anteriorment emprat al nostre grup de recerca.<sup>19</sup> Tal com es mostra a la **Figura 62**, en una primera etapa es va dur a terme la hidròlisi del grup

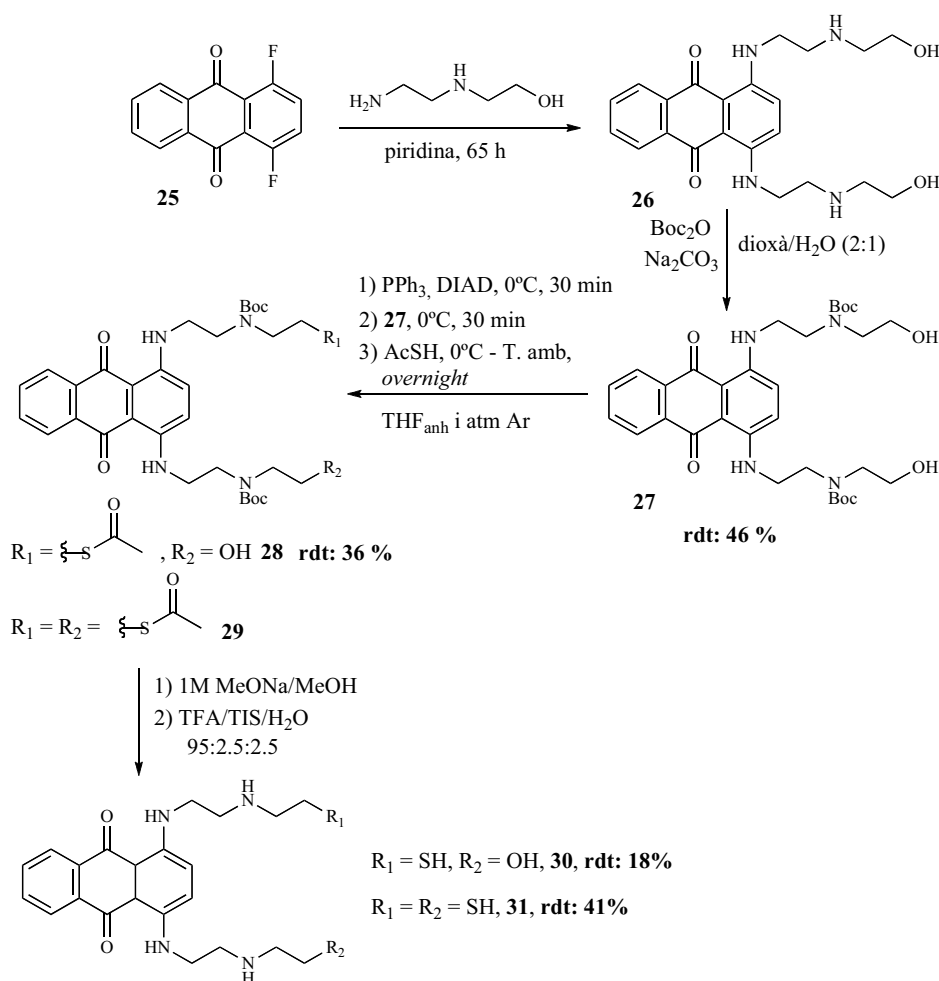
tioéster en atmosfera d'argó a través d'un tractament amb una solució 1 M de MeONa en MeOH i 4 eq de MeONa per grup tioacetat, tal com s'especifica al procediment descrit a la part experimental. Un cop eliminats els grups tioacetil, en segon lloc es van eliminar els grups Boc a través de la reacció, durant 30 min en atmosfera d'argó i a temperatura ambient, del cru amb una mescla formada per 95% TFA/ 2.5% TIS/ 2.5% H<sub>2</sub>O. En el cas de **28**, l'anàlisi del cru per espectrometria de masses ESI va revelar que el producte havia dimeritzat completament, amb la qual cosa va ser necessari realitzar un tractament reductor amb un excés de 24 eq de ditiotreitòl (DTT)<sup>3</sup> per tal de reduir el dímer disulfur. Després de la reducció, es va purificar **30** per MPLC (rdt: 18%) i la seva puresa va ser confirmada a través de l'anàlisi per HPLC (**Figura 63**) i espectrometria de masses ESI i MALDI-TOF.



**Figura 63.** Cromatograma del cru (esquerra) i del producte pur **30** (dreta).

Per altra banda, cal destacar que també es va obtenir el producte **31** mitjançant la desprotecció de **29** que, tal com s'indicarà més endavant, va permetre sintetitzar els lligands derivats de l'amentrona doblement funcionalitzats.

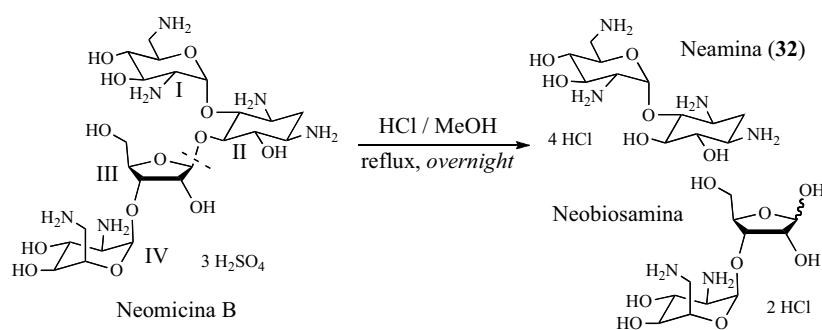
A continuació, a la **Figura 64** es mostra un esquema resum de la ruta sintètica que ha permès l'obtenció dels compostos **30** i **31**.



**Figura 64.** Esquema de la ruta sintètica emprada per a la síntesi dels monòmers tiol **30** i **31**. En negreta s'especificuen els rendiments obtinguts a les diferents etapes.

### 1.3 Síntesi de derivats de la neamina

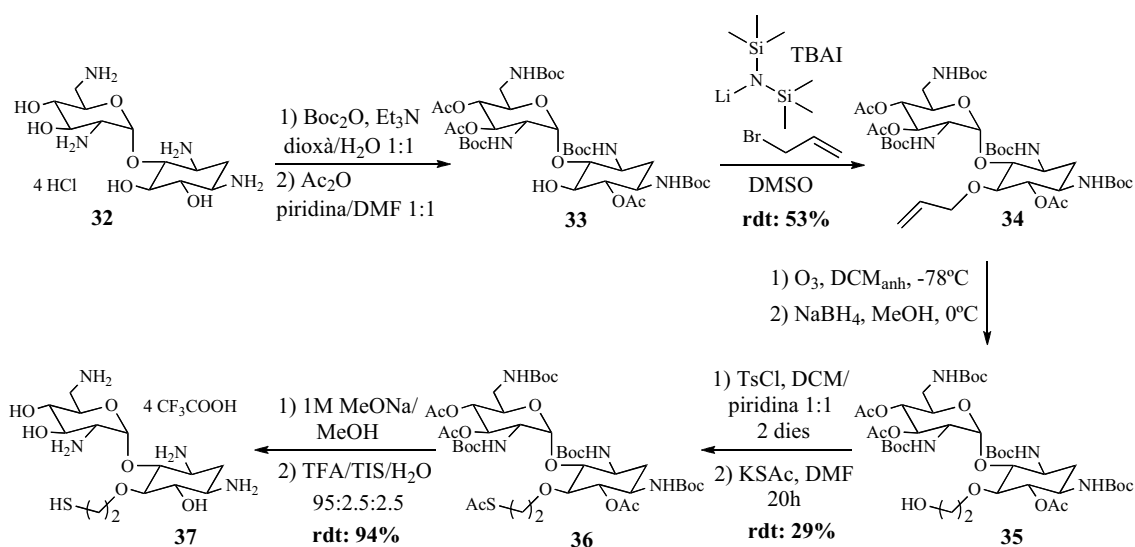
En aquest apartat es descriu la síntesi dels monòmers aminoglicosídics objectiu que s'han basat en la funcionalització del compost neamina (**32**), obtingut a partir de l'hidròlisi àcida del sulfat de neomicina B comercial.<sup>18a</sup> Tal com es descriu a la part experimental, després de tota una nit escalfant-se a reflux en presència d'HCl concentrat, la neomicina B s'hidrolitza per donar lloc als hidroclorets de neamina (anells I i II) i de neobiosamina (anells III i IV). Aquest trencament es produeix com a conseqüència de la labilitat als àcids de l'enllaç  $\alpha$ -glicosídic entre els anells II i III de la neomicina B, ja que, a diferència de la resta d'enllaços glicosídics, presenta menys estabilització per enllaços pont d'hidrogen amb els grups amino veïns.<sup>18a</sup> El producte **32** va ser aïllat directament amb un rendiment del 82% mitjançant precipitació (**Figura 65**). Un cop obtingut, va servir de punt de partida per a la síntesi dels derivats NeaC<sub>2</sub>-SH (**37**) i NeaC<sub>6</sub>-SH (**43**), tal com s'exposa als següents subapartats.



**Figura 65.** Esquema de la reacció d'obtenció de l'aminoglicòsid neamina **32** a partir de l'hidròlisi àcida de la Neomicina B comercial.<sup>18a</sup>

### 1.3.1 Síntesi de NeaminaC<sub>2</sub>-tiol

Per a la síntesi del derivat NeaC<sub>2</sub>-SH (**37**) ens vam basar en el procediment experimental descrit per Soledad Alzina al seu Màster Experimental en Química Orgànica<sup>19</sup> i que, a continuació, es comenta breument. A més, cal indicar que no es va partir del compost neamina **32** totalment desprotegit, tal com s'indica la **Figura 66**, sinó del derivat **33**, on les funcions amino i alcohol estan protegides amb els grups Boc i acetil, respectivament. Així doncs, amb l'hidroxil a la posició 5' lliure es va poder funcionalitzar selectivament la neamina de partida a través d'una reacció d'alquilació amb bromur d'al·lil per obtenir **34** que, mitjançant una ozonòlisi seguida d'un tractament reductor, va conduir al corresponent derivat hidroxilat **35**.<sup>19,43</sup> Posteriorment, es va funcionalitzar en forma de tioacetat (**36**) i, després de la desprotecció anàloga a la realitzada a la síntesi de **30**, es va aïllar el derivat tiol **37** desitjat.



**Figura 66.** Esquema de la ruta sintètica emprada per a la síntesi del monòmer tiol NeaC<sub>2</sub>-SH **37**.<sup>19</sup> En negreta s'especifiquen els rendiments d'algunes etapes.

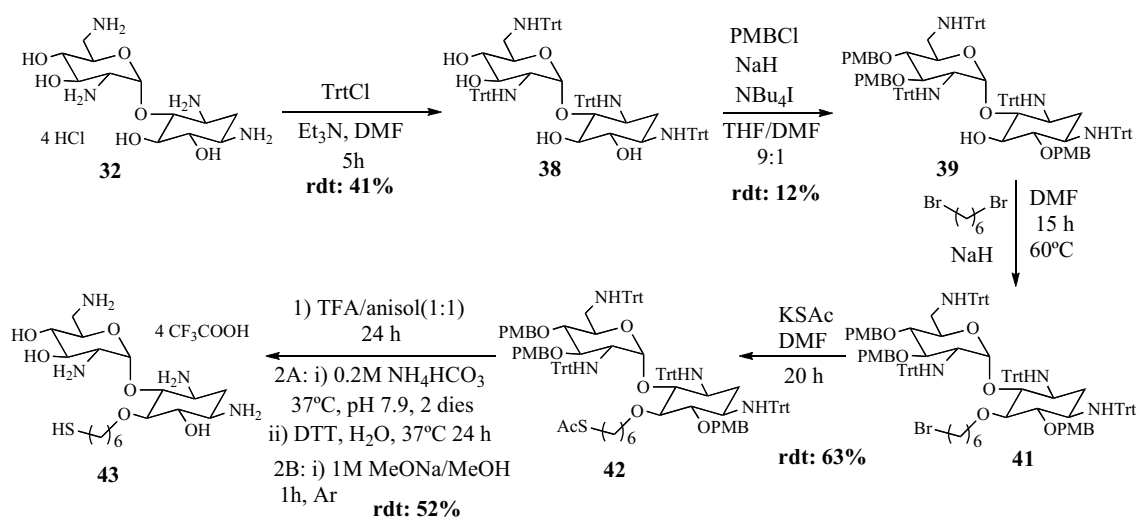
### 1.3.1 Síntesi de NeaminaC<sub>6</sub>-tiol

La síntesi del monòmer NeaC<sub>6</sub>-SH (**43**) amb l'espaiador més llarg està basada en el procediment experimental descrit per Paula López en la seva Tesi Doctoral<sup>3c</sup> i, que a continuació, s'exposa breument (**Figura 67**). Cal destacar que, a diferència del derivat NeaminaC<sub>2</sub>-tiol, en aquest cas es va utilitzar una estratègia de grups protectors basada, d'una banda, en la protecció inicial dels grups amino per reacció amb el clorur de tritil i, de l'altra, dels hidroxils en forma d'éter de *p*-metoxibenzil, sent ambdós grups làbils a àcids. L'impediment estèric ocasionat pels tritils permet dur a terme una protecció selectiva de tres dels quatre hidroxils, on la posició 5 de la neamina és la menys reactiva. A més, el gran caràcter hidrofòbic que li confereixen a la molècula, fa que el derivat de la neamina presenti una gran solubilitat en dissolvents orgànics molt apolars.<sup>17</sup> Així doncs, en una primera etapa es van protegir els grups amino de **32**, i el producte **38** resultant es va fer reaccionar amb 2.5 eq de clorur de *p*-metoxibenzil en presència de NaH i NBu<sub>4</sub>I, que va permetre obtenir, per una banda, el producte triprotegit **39** (rdt: 12%) i, per l'altra, el diprotegit **40** (rdt: 37%), que és un producte de partida interessant per a la síntesi dels derivats neamina doblement funcionalitzats.<sup>17</sup>

Les següents etapes de la síntesi van implicar la funcionalització de **39**, mitjançant una reacció d'alquilació amb 1,6-dibromohexà,<sup>17</sup> i el tractament de **41** amb KSAc<sup>44</sup> per tal de ser transformat en el derivat tioéter **42** desitjat. La desprotecció del grup tiol, per donar lloc a **43**, es va dur a terme mitjançant dos procediments diferents. En el procediment A,<sup>3</sup> en atmosfera d'argó, es van desprotegir els grups amino i els hidroxils de **42** a través d'un tractament àcid amb una mescla de TFA/anisol (1:1) durant unes 15 hores, aproximadament. L'eliminació del grup tioacetat es va dur a terme mitjançant la reacció del cru resultant amb una solució de 0.4 M de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> a pH 7.9 i 37 °C durant 2 dies. Malgrat haver-se produït la desprotecció del grup tiol, l'anàlisi del cru resultant per espectrometria de masses ESI va revelar que en aquestes condicions de reacció tot el producte tiol final havia dimeritzat. Així doncs, va ser necessari un tractament reductor amb un excés de 24 eq de DTT, tal com s'havia realitzat anteriorment durant la desprotecció de **28**, que va permetre després de la purificació per MPLC, aïllar el derivat tiol **43** amb un rendiment del 52%.

Per altra banda, el procediment B va permetre obtenir **43** de forma més simple i amb el mateix rendiment a través de l'eliminació del tioacetat de **42** amb una solució 1 M de MeONa en MeOH, de forma anàloga al tractament realitzat per **28** i **36**, tal com s'especifica a la part experimental. A més, aquest procediment ens va permetre evitar el llarg tractament amb la solució de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 0.4 M i la posterior reducció amb DTT.





**Figura 67.** Esquema de la ruta sintètica emprada per a la síntesi del monòmer tiol NeaC<sub>6</sub>-SH (**43**).<sup>3,17,44</sup>  
 En negreta s'especifiquen els rendiments d'algunes etapes.

## 2 Química Combinatòria Dinàmica (DCC)

---

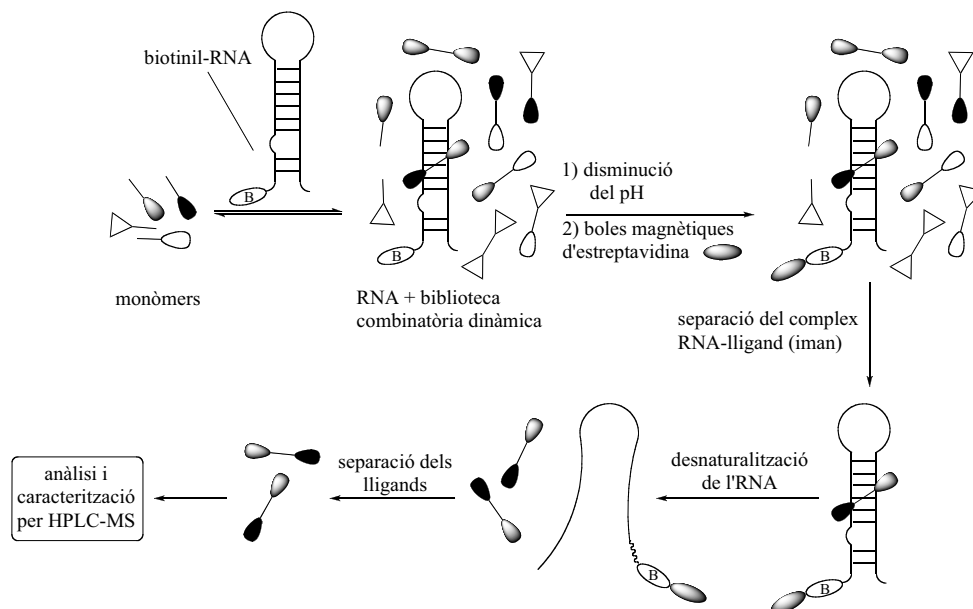
Tal com s'ha exposat a la Introducció general de la tesi (apartat 1.3.4), als últims anys la química combinatòria dinàmica ha esdevingut un mètode molt eficaç per identificar lligands de diferents tipus de receptors. La interconversió dels diferents membres de la biblioteca a través de reaccions reversibles en presència de la diana, permet seleccionar i aïllar de la biblioteca combinatòria dinàmica (DCL) els lligands més afins. En el camp dels àcids nucleics les dues metodologies més habituals són, per una banda, aquella en que la detecció i l'anàlisi dels compostos seleccionats es duen a terme a través de la interacció de l'oligonucleòtid diana funcionalitzat amb biotina i, per l'altra, l'anomenada *RDCC*, on els membres de la DCL estan ancorats a una resina i l'oligonucleòtid incorpora un grup fluoròfor.<sup>45</sup>

Per dur a terme els experiments de química combinatòria dinàmica, en aquest treball ens hem basat en la metodologia descrita per Balasubramanian i col·laboradors,<sup>46</sup> en la qual la diana biotinitilada unida als lligands més afins és extreta del medi de reacció amb un iman, aprofitant la gran afinitat de la biotina per l'estreptavidina unida a les boles magnètiques. L'estreptavidina és una proteïna tetramèrica on la interacció de cadascun dels seus monòmers amb una molècula de biotina dóna lloc a una gran xarxa d'interaccions per pont d'hidrogen. De fet, el complex format, que gaudeix d'una gran aplicabilitat en camps bioanalítics, biotecnològics i en aplicacions terapèutiques, té una constant de dissociació de l'ordre  $10^{-14}$  M i està considerada com una de les interaccions de tipus no-covalent més fortes localitzades a la natura.<sup>47</sup>

Per altra banda, a nivell experimental hem seguit les condicions descrites per Paula López a la seva tesi doctoral,<sup>3</sup> on es va posar a punt aquesta metodologia amb la nostra diana d'RNA definint els diferents paràmetres de treball, com ara les concentracions de la diana biotinitilada, dels lligands i de les solucions tampó o les condicions d'anàlisi.

A nivell pràctic, els experiments de DCC basats en reaccions d'intercanvi d'enllaços disulfur, consten de diverses etapes. En primer lloc, a temperatura ambient i en contacte amb l'aire i sense agitació, la mescla de monòmers tiol que constitueixen la biblioteca combinatòria dinàmica es deixa evolucionar en presència de la diana d'RNA biotinitilada

a l'extrem 5', i en condicions que assegurin la seva correcta estructuració. Un cop s'ha arribat a l'equilibri termodinàmic, s'atura el bescanvi d'enllaços disulfur a través d'una lleugera disminució del pH i, amb l'ajuda de boles magnètiques unides a estreptavidina, se separa la diana amb els lligands adherits. Finalment, la desnaturalització de la diana a 90 °C permet alliberar els lligands, que són analitzats i caracteritzats per HPLC acoblat a espectrometria de masses (**Figura 68**).



**Figura 68.** Representació esquemàtica d'un experiment de DCC.<sup>3,46</sup>

Paral·lelament, sempre es realitza un experiment control (en absència de diana) que, per comparació amb l'experiment en presència de la diana, permet identificar els lligands més amplificats per acció de l'RNA. Generalment, quan es parla d'amplificació es fa referència al desplaçament de l'equilibri cap a la formació d'un lligand concret per acció de la diana, fet que causa un augment de la seva concentració. Així doncs, podem definir el percentatge d'amplificació com la diferència de concentracions relatives d'un lligand en presència i en absència de la diana i, per tant, la comparació de la composició final de la biblioteca, en absència i en presència de la diana, permet identificar els lligands que s'amplifiquen més, que idealment solen ser els més afins.<sup>48</sup>

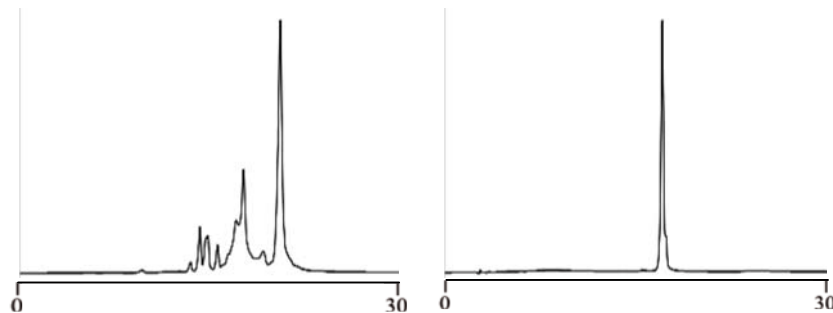
## 2.1 Preparació dels experiments

Malgrat que a nivell conceptual la química combinatòria dinàmica pot semblar un procés ràpid i simple, experimentalment cal tenir en compte una sèrie de factors molt importants per a l'obtenció d'uns bons resultats. És per això, que s'ha considerat oportú descriure en aquest apartat, d'una banda, la síntesi de la diana d'RNA biotinitada i, de l'altra, els antecedents experimentals amb els quals ens hem basat per dur a terme els experiments.

### 2.1.1 Biotinilació de l'oligoribonucleòtid

Un cop obtinguts els diferents derivats tiol (apartat 1, Preparació de la biblioteca combinatòria dinàmica) i definida la metodologia experimental a seguir, el següent pas va consistir en la biotinilació de la diana d'RNA que, com s'ha comentat a l'inici d'aquest capítol, es tracta d'un oligoribonucleòtid 29-mer que inclou l'estructura *stem-loop* del pre-mRNA natiu (wt) de tau.

Pel que fa a la síntesi de l'oligoribonucleòtid biotinilat, descrita detalladament a la part experimental, només comentar que es va optar per derivatitzar l'hidroxil de la posició 5' de la ribosa de l'últim nucleòtid de la seqüència mitjançant l'acoblament manual del fosforamidit comercial de biotina, emprant tetrazole com agent activant. Un cop obtingut el biotinil-oligoribonucleòtid-resina desitjat, es va eliminar el grup DMT de la biotina i es va realitzar el desancoratge de la resina amb la corresponent eliminació de tots els grups protectors. Finalment, el 5'-biotinil-oligoribonucleòtid va ser purificat per HPLC en fase invertida (**Figura 69**).



**Figura 69.** Cromatogrames del 5'-biotinil-oligoribonucleòtid wt: cru (esquerra) i producte pur (dreta).

### 2.1.2 Antecedents experimentals

En aquest subapartat es descriuen breument les condicions experimentals optimitzades per Paula López durant la seva tesi doctoral.<sup>3</sup>

Una de les primeres comprovacions realitzades va ser la determinació de la influència de la biotina a l'estructura *stem-loop* de l'RNA diana. Primerament, mitjançant l'ús de tècniques espectroscòpiques, com ara l'enregistrament de corbes de fusió per espectroscòpia UV i el discroisme circular, es va demostrar, respectivament, que l'estabilitat de la diana no es veia afectada per la unió amb la biotina i que l'estructura secundària d'RNA no sofria cap alteració estructural. D'aquesta manera, doncs, es va concloure que la funcionalització de l'oligoribonucleòtid amb biotina no generava cap canvi significatiu a l'estructura de la diana ni a la seva estabilitat.

Un altre factor important que es va tenir en compte va ser l'elecció d'unes condicions experimentals que permetessin l'intercanvi reversible entre els diferents membres que constitueixen la biblioteca dinàmica. En aquest sentit, es van realitzar tres assaigs amb una mescla equimolar (100  $\mu$ M) de monòmers tiol en la mateixa solució tampó (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl i 0.1 mM Na<sub>2</sub>EDTA). En primer lloc, es va deixar evolucionar a l'aire la barreja sense agitació, tot i estar descrit que en condicions d'alta

dilució el bescanvi d'enllaços disulfur és lent.<sup>49,50</sup> És per això que, a un segon assaig, es va addicionar un excés de glutatió oxidat i reduït que,<sup>46,51</sup> per una banda, provoca que l'intercanvi sigui ràpid i, per l'altra, sembla ser que evita l'autoagregació de certs monòmers en absència de la diana.<sup>46b</sup> Finalment, a una tercera prova es va addicionar un excés de DTT, un agent reductor d'enllaços disulfur molt utilitzat per reactivar les reaccions d'intercanvi disulfur de monòmers tiol oxidats a disulfur,<sup>48-50,52</sup> ja que en oxidar-se forma un anell estable de 6 baules que no interacciona amb els altres membres de la biblioteca.<sup>53</sup> L'anàlisi per HPLC-MS va revelar que a partir de les 24 hores la composició de la mescla als tres assaigs no variava, fet que demostrava que s'havia arribat a un equilibri termodinàmic. A més, també es va observar que, a excepció de l'assaig amb glutatió, on es va detectar la seva interacció amb els membres de la biblioteca, la mescla de compostos tiol, amb i sense DTT, havien evolucionat de forma similar. Per tant, davant d'aquests resultats, es va desestimar l'ús de glutatió i DTT, i es va optar per deixar evolucionar els experiments amb la biblioteca de monòmers tiol en contacte amb l'aire.

Altrament, una tercera consideració que calia tenir en compte era la concentració dels monòmer tiol i de la diana d'RNA, ja que per assegurar que el compost més amplificat correspongui al més afí, la quantitat de diana ha de ser limitant respecte els monòmers.<sup>54</sup> Concretament, es va optar per treballar amb un excés de 4 eq de monòmer, sent la seva concentració de 100  $\mu$ M, tal com havia descrit Balasubramanian i col·laboradors.<sup>46b,46c</sup> A més, a l'any 2010 es va publicar un estudi on s'havia determinat que la relació molar òptima entre els monòmers i la diana està al voltant de 10:1,<sup>55</sup> fet que corroborava que el rang de treball era adequat. També es va comprovar mitjançant assaigs de desnaturalització tèrmica per espectrocòpia UV que a 25  $\mu$ M, tot i ser una concentració elevada, l'RNA no formava agregats.

Un cop determinades les condicions i les concentracions de monòmer i de diana òptima, es va escollir que la solució salina tamponada per dur a terme els experiments tingués un pH proper al fisiològic (7.4-7.7), atès que l'RNA és sensible als canvis de pH i es pot degradar tant en medi àcid com en bàsic. A més, el pH òptim pel bescanvi de l'enllaç disulfur es troba entre 7 i 9.<sup>48</sup> També es va optar per una concentració salina de 100 mM de NaCl, per afavorir l'estructuració de l'RNA, i de 0.1 mM Na<sub>2</sub>EDTA d'un captador de cations divalents, necessari per minimitzar la degradació de l'RNA per part de nucleases.

Per tant, després de tenir presents totes aquestes consideracions, es va concloure que les condicions òptimes de treball consistien en deixar evolucionar a l'aire, a temperatura ambient i sense agitació, la mescla equimolar de tiols (100  $\mu$ M) en presència de la diana biotinilada d'RNA (25  $\mu$ M) en una solució tampó a pH 7.7 de 50 mM de Tris-HCl, 100 mM de NaCl i 0.1 mM de Na<sub>2</sub>EDTA. Finalment, un cop establertes les condicions experimentals, es va voler confirmar que el percentatge d'amplificació dels dímers disulfur formats era només conseqüència de la interacció amb la diana d'RNA. Per exemple, en primer lloc es va comprovar que les boles magnètiques d'estreptavidina no s'enllaçaven de forma significativa a cap dels membres de la DCL o als lligands formats en un experiment en absència d'RNA. També es va corroborar que l'excés de 4 eq dels monòmers tiol respecte a la diana era l'adequat, ja que en realitzar el mateix experiment amb una relació equimolar entre els monòmers i la diana, la composició de la DCL no

variava. I per últim, també es va confirmar que en les condicions experimentals escollides, l'oxidació dels tiols a l'aire era prou lenta perquè els diferents elements de la DCL arribessin a l'equilibri termodinàmic.

## 2.2 Experiments de Química Combinatòria Dinàmica (DCC)

Com s'ha comentat anteriorment i s'exposa detalladament a l'apartat 4 de Materials i Mètodes, als experiments de DCC realitzats s'ha emprat una mescla equimolar de monòmers tiol en un excés de 4 eq respecte al 5'-biotinil-RNA wt. En tots els casos, l'anàlisi de la composició de la biblioteca s'ha realitzat a les 6, 24 i 48 hores. També és important destacar que, malgrat que s'han avaluat fins a un total de 10 compostos diferents, tal com s'ha descrit a l'inici d'aquest capítol, sempre s'ha optat per no emprar biblioteques amb més de 7 monòmers tiol, ja que un major nombre de combinacions de dímers disulfur dificultaria enormement l'anàlisi final per HPLC.

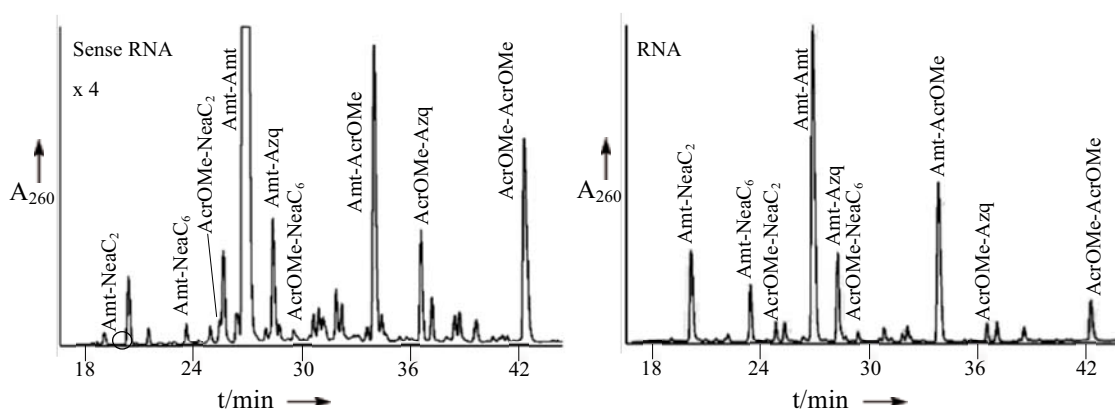
### 2.2.1 Experiment de DCC en presència de dos compostos intercalants: competició Ametatrona vs Acridina

Tal com s'ha plantejat a l'apartat 2.2.2 de la Introducció general d'aquesta memòria escrita i a l'inici d'aquest capítol, els lligands derivats de la mitoxantrona<sup>2,9</sup> i els basats en la combinació acridina-neamina<sup>3</sup> són un bon punt de partida per a la identificació de nous compostos més afins i selectius de l'estructura *stem-loop* de la diana d'RNA diana. En particular, la selectivitat de la mitoxantrona amb la regió del *bulge* de l'estructura secundària i la bona afinitat dels derivats 6-cloro-2-metoxiacridina units a la neamina (2.1 – 5.9  $\mu\text{M}$ ),<sup>3</sup> fa que sigui interessant estudiar la competició entre els dos agents intercalants. Així doncs, en aquest primer experiment de DCC es van avaluar els dos agents intercalants (Amt-SH (**30**) i AcrOMe-SH, en presència de dos derivats de neamina, NeaC<sub>2</sub>-SH (**37**) i NeaC<sub>6</sub>-SH (**43**), del compost heteroaromàtic Azq-SH i del tripèptid policatiònic TyrP. Per tant, teòricament a partir dels 6 monòmers tiol es podien generar fins a un total de 21 nous compostos.

L'experiment va consistir en deixar evolucionar fins a les 48 hores una mescla equimolar (100  $\mu\text{M}$ ) dels monòmers tiol Amt (**30**), AcrOMe, TyrP, NeaC<sub>2</sub> (**37**), NeaC<sub>6</sub> (**43**) i Azq en presència de l'RNA-biotina wt (25  $\mu\text{M}$ ) a temperatura ambient, sense agitació i en una solució amortidora a pH 7.7. A partir de l'anàlisi per HPLC-MS de les alíquotes de 6 h, tant a l'experiment control com en presència d'RNA, es va concloure que s'havia assolit un estat d'equilibri termodinàmic a les 6 h, ja que, per una banda, no hi havia monòmers tiol i, per l'altra, la composició de la DCL no havia sofert grans canvis a les 48 h.

Qualitativament, tal com es pot apreciar comparant ambdós cromatogrames a les 48 h (**Figura 70**), sembla ser que en presència de l'RNA els pics dels compostos que incorporen el fragment Amt s'intensifiquen molt més que els que incorporen AcrOMe i Azq. A nivell quantitatiu, tal com es mostra a la **Figura 71**, una primera observació a tenir en compte és el fet que els dímers disulfur que combinen els fragments neamina amb una molècula heteroaromàtica s'amplifiquen en major proporció que qualsevol altra combinació. Primerament, és particularment interessant remarcar que l'amplificació del dímer Amt-NeaC<sub>2</sub> (~ 3400%) és de l'ordre de 13 i 20 vegades més gran que la d'AcrOMe-NeaC<sub>2</sub> (~ 260%) i d'Azq-NeaC<sub>2</sub> (~ 170%). També és destacable

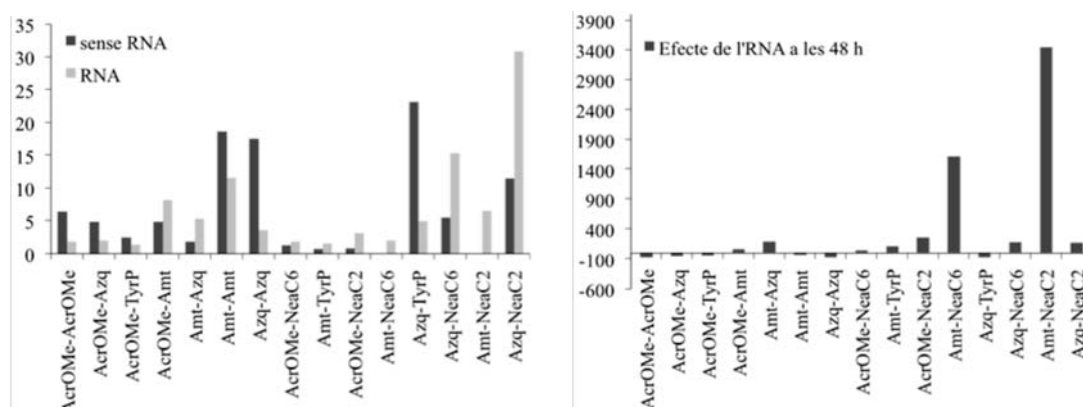
la formació del dímer Amt-NeaC<sub>6</sub> (~ 1600%), amb una amplificació al voltant de 35 i 9 vegades més gran que la d'AcrOMe-NeaC<sub>6</sub> (~ 45%) i d'Azq-NeaC<sub>6</sub> (~ 177%), respectivament. Així doncs, tenint en compte que els compostos més amplificats en DCC solen ser els més afins,<sup>46a,46c,48</sup> a partir d'aquests resultats és esperable que els dímers Amt-Nea siguin molt més afins amb l'RNA que els anteriorment descrits al nostre grup d'investigació basats en la combinació AcrOMe-Nea i Azq-Nea. Una possible explicació d'aquesta gran diferència entre els dos fragments intercalants (Amt i AcrOMe) podria ser la manca en l'acridina dels dos braços, on els grups amino del fragment Amt formarien interaccions per pont d'hidrogen amb els parells de bases G-C adjacents a l'adenina del *bulge*, anàlogament a com ho fa la mitoxantrona.<sup>2</sup>



**Figura 70.** Cromatogrames d'HPLC a 260 nm corresponents a la composició de la DCL en absència (esquerra) i en presència (dreta) de l'RNA-biotina wt a les 48 h. Cal comentar que dels 21 compostos possibles, només s'han indicat els que contenen els fragments Amt i AcrOMe.

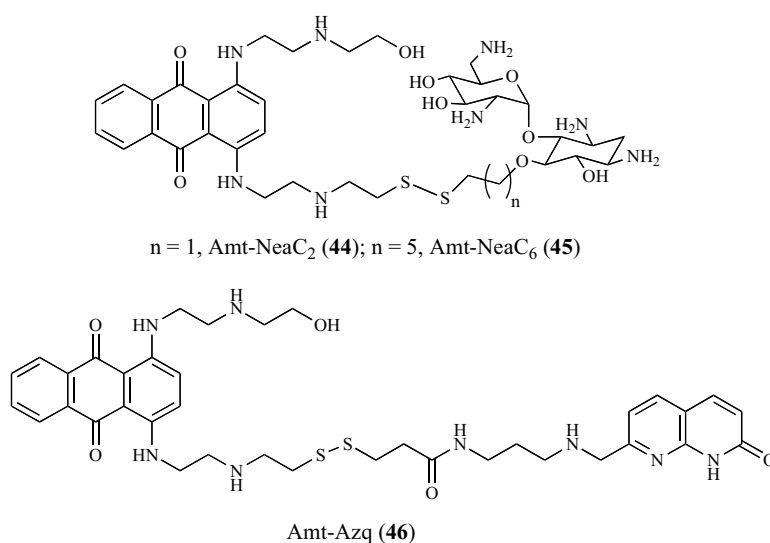
Per altra banda, sembla ser que la longitud de l'espaiador entre el grup tiol i l'aminoglicòsid neamina juga un paper destacat en els dímers Amt-Nea, ja que l'amplificació del més curt (Amt-NeaC<sub>2</sub>) és aproximadament el doble que la del llarg (Amt-NeaC<sub>6</sub>). Aquestes diferències es poden atribuir al fet que l'aminoglicòsid neamina al lligand Amt-NeaC<sub>2</sub> podria generar interaccions favorables amb l'RNA (electrostàtiques o ponts d'hidrogen) més a prop del lloc d'unió preferent de l'acetantrona, de manera que es traduiria en un augment de l'afinitat. Aquest mateix raonament es pot aplicar als dímers AcrOMe-Nea, en el supòsit que l'AcrOMe i l'Amt tinguin el mateix lloc d'unió preferent, ja que AcrOMe-NeaC<sub>2</sub> s'amplifica aproximadament 6 vegades més que AcrOMe-NeaC<sub>6</sub>.

Finalment, és interessant destacar, tot i el seu baix percentatge d'amplificació, la formació del dímer Amt-Azq (~ 190%), ja que la combinació del fragment Azq, amb capacitat per reconèixer adenines desaparellades, i Amt, que podria intercalar-se a la regió del *bulge* anàlogament a com ho fa la mitoxantrona, generaria un lligand molt específic.



**Figura 71.** Histogrames a les 48 hores corresponents a la variació de la composició de cada compost a la DCL (esquerra) i al percentatge d'amplificació de cada espècie per efecte de la presència de l'RNA wt (dreta).

Així doncs, a partir d'aquests resultats, de tots els possibles dímers disulfur generats, s'han seleccionat com a futuribles lligands d'RNA els compostos Amt-NeaC<sub>2</sub> (**44**) i Amt-NeaC<sub>6</sub> (**45**) i Amt-Azq (**46**), sent els dos primers molt atractius, ja que, a més de la seva elevada afinitat, el fragment aminoglicosídic neamina podria aportar certa selectivitat amb l'RNA respecte el DNA.



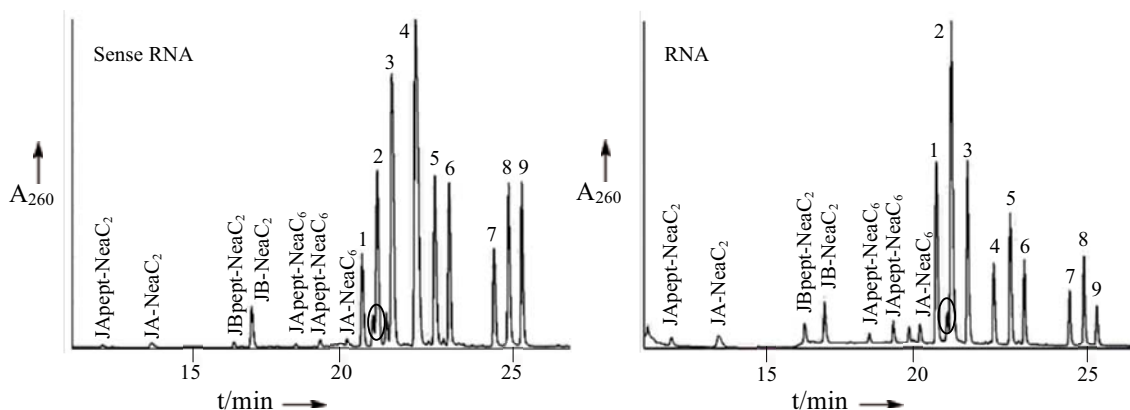
**Figura 71.** Estructura dels lligands Amt-NeaC<sub>2</sub> (**44**), Amt-NeaC<sub>6</sub> (**45**) i Amt-Azq (**46**) identificats.

## 2.2.2 Experiment de DCC amb els monòmers Janus i Neamina

En aquest segon experiment es va plantejar com a objectiu avaluar les estructures Janus A i B en presència dels dos derivats aminoglicosídics. Per una banda, es volia estudiar si la funcionalització a tiol a través del residu cisteïna del tripèptid (**21** i **22**) conferia a la molècula Janus major afinitat amb l'RNA, respecte a tenir-lo unit directament a una cadena alifàtica de dos carbonis (**23** i **24**). A més, també es va considerar oportú avaluar

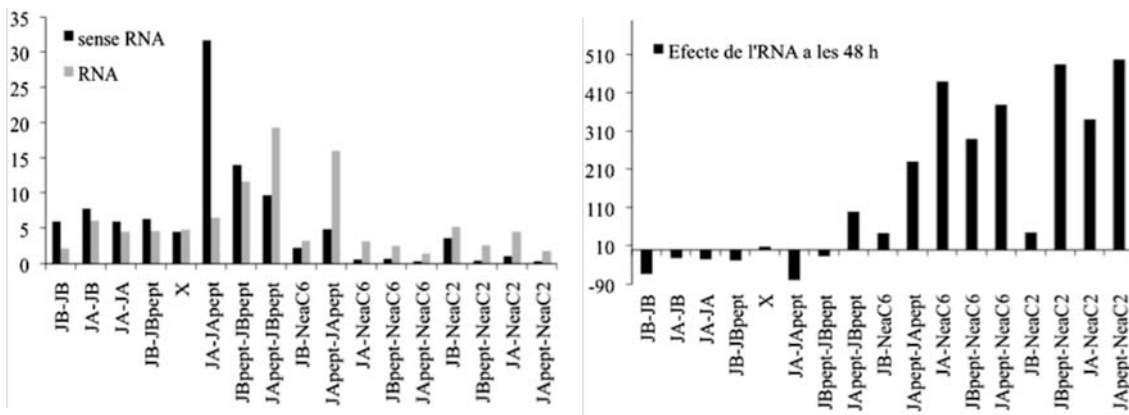


quina influència exercia la longitud de l'espaiador al fragment neamina. Així doncs, es van deixar evolucionar fins a les 48 hores quantitats equimolars (100  $\mu$ M) dels monòmers tiol JApept (**21**), JBpept (**22**), JA (**23**), JB (**24**), NeaC<sub>2</sub> (**37**) i NeaC<sub>6</sub> (**43**) en presència de la diana RNA-biotina wt (**Figura 72**).



**Figura 72.** Cromatogrames d'HPLC a 260 nm corresponents a la composició de la DCL en absència (esquerra) i en presència (dreta) de l'RNA-biotina wt a les 48 h. Els dímers disulfur JA-JBpept i JB-JApept no s'han pogut diferenciar per HPLC-MS. El pic encerclat correspon a JB-NeaC<sub>2</sub>. Els números consecutius de l'1 al 9 corresponen a JApept-JApept, JApept-JBpept, JBpept-JBpept, JA-JApept, JA-JBpept/JB-JApept, JB-JBpept, JA-JA, JA-JB i JB-JB, respectivament.

A diferència de l'experiment anterior, on s'havia assolit l'equilibri termodinàmic a les 6 hores de reacció, l'anàlisi d'aquest segon experiment a les 48 hores en presència d'RNA, va revelar la presència minoritària de monòmers tiol corresponents als compostos Janus de partida. Aquest resultat demostra, per una banda, la capacitat dels monòmers Janus per interactuar per si sols amb l'RNA i, per l'altra, que a les 48 hores encara no s'havia assolit un estat complet d'equilibri. Tot i això, la tendència obtinguda a les representacions gràfiques de la composició de la DCL de les alíquotes a les 6 h, 24 h i 48 h (**Figura 73**) va permetre identificar un nou tipus de lligands de la diana d'RNA, tal com s'exposa a continuació.



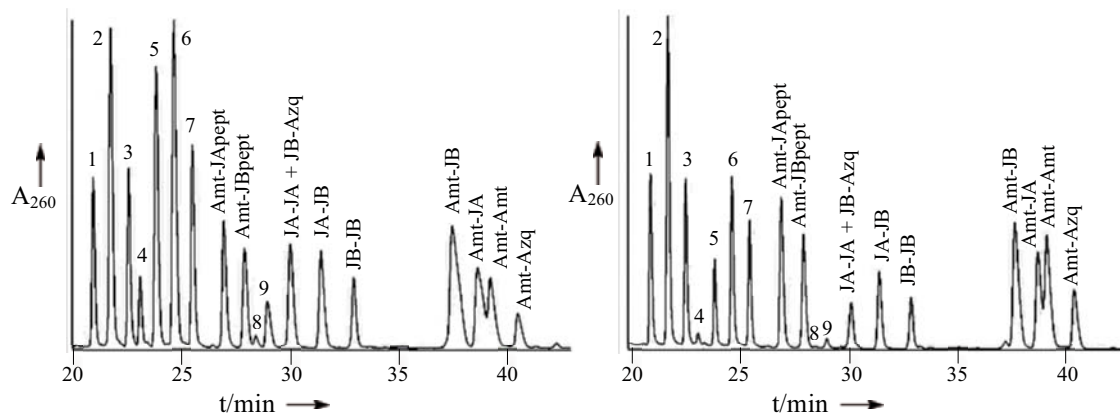
**Figura 73.** Histogrammes a les 48 hores corresponents a la variació de la composició de cada component de la DCL (esquerra) i al percentatge d'amplificació de cada espècie per efecte de la presència de l'RNA wt, on X representa els dímers disulfur JA-JBpept i JB-JApept indiferenciables per HPLC. Cal comentar que en ambdós histogrammes s'ha obviat la presència, tot i que minoritària, dels monòmers tiol.

La primera conclusió que podem extreure és que les amplificacions dels dímers disulfur fruit de la combinació dels fragments Janus i neamina són molt més grans que la resta de les combinacions. Particularment, els resultats més positius s'observen als compostos on el fragment Janus està unit al tripèptid, tot i que en el cas del monòmer Janus A aquestes diferències no són massa significatives, ja que la relació de les amplificacions entre JA-NeaC<sub>6</sub> (~ 440%) i JApept-NeaC<sub>6</sub> (~ 380%) és aproximadament 1.1, i entre JA-NeaC<sub>2</sub> (~ 340%) i JApept-NeaC<sub>2</sub> (~ 500%) és 1.5. Ara bé, en el cas del monòmer Janus B s'observa que JBpept-NeaC<sub>2</sub> (~ 490%) i JBpept-NeaC<sub>6</sub> (~ 290%) s'amplifiquen 10 i 7.2 vegades més que JB-NeaC<sub>2</sub> (~ 45%) i JB-NeaC<sub>6</sub> (~ 43%), respectivament. Per tant, aquests resultats posen de manifest que la presència del tripèptid constituït per asparagina, arginina i cisteïna exerceix un efecte positiu a l'afinitat dels compostos, fet probablement atribuïble a la formació d'interaccions de tipus electrostàtic o de pont d'hidrogen, tal com es comenta a la introducció d'aquest capítol. En aquest mateix punt, també és important remarcar que, tenint en compte els valors similars d'amplificació, no es preveu una diferència significativa a l'afinitat entre ambdós fragments Janus. Tot i això, sí que sembla intuir-se que els dímers amb l'espaiador més curt s'amplifiquen una mica més que els que tenen l'espaiador més llarg. Així, per exemple, JApept-NeaC<sub>2</sub> (~ 500%) i JBpept-NeaC<sub>2</sub> (~ 490%) mostren unes amplificacions de l'ordre d'1.3 i 1.7 vegades major que JApept-NeaC<sub>6</sub> (~ 380%) i JBpept-NeaC<sub>6</sub> (~ 290%), respectivament.

Per altra banda, una altra evidència que reafirma la importància de la presència del tripèptid a les molècules Janus, és el fet que només s'observen amplificacions positives a aquelles combinacions dels fragments Janus que tenen el pèptid incorporat, com per exemple en JApept-JBpept (~ 100%) i en JApept-JApept (~ 230%) amb un percentatge moderat, malgrat l'excepció de JBpept-JBpept (~ -17%).

Finalment, el fet que s'observin algunes discordances, com ara el baix percentatge d'amplificació de l'homodímer JBpept-JBpept, respecte a JApept-JBpept i a JApept-JApept, es podria atribuir al fet de no haver-se arribat a l'equilibri termodinàmic. Tot i això, tenint en compte la tendència general, dels 21 dímers disulfurs possibles, els

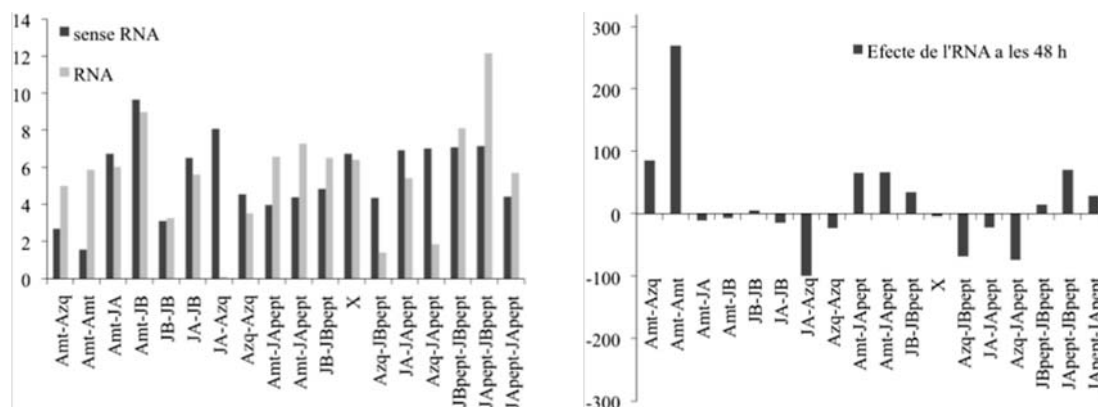




**Figura 75.** Cromatogrames d'HPLC a 260 nm corresponents a la composició de la DCL en absència (esquerra) i en presència (dreta) de l'RNA-biotina wt a les 48 h. Els dímer disulfur JA-JBpept i JB-JApept no s'han pogut diferenciar per HPLC. Els números de l'1 al 9 corresponen a JApept-JApept, JApept-JBpept, JBpept-JBpept, Azq-JApept, JA-JApept + Azq-JBpept, JApept-JB/JBpept-JA, JB-JBpept, Azq-Azq i JA-Azq, JA-JA, respectivament.

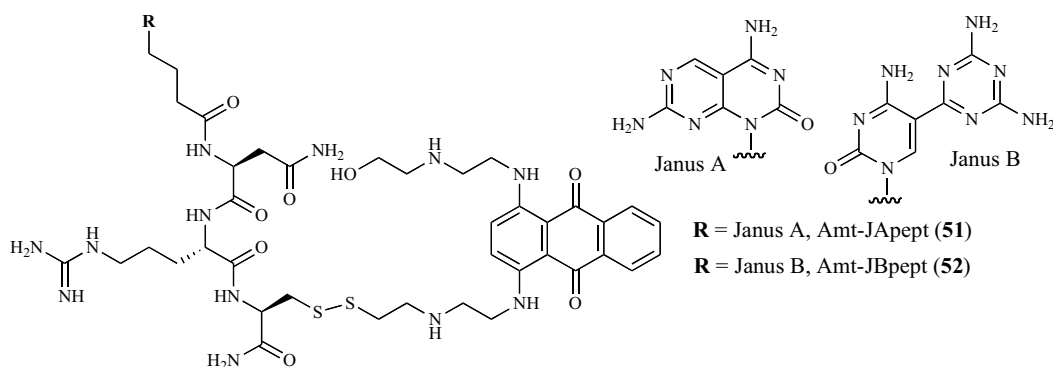
En comparar els experiments en presència i en absència d'RNA (**Figura 76**), es va observar que els heterodímers disulfur que més s'amplificaven corresponen als que tenen el fragment de l'agent intercalant Amt, com ara Amt-Azq (~ 85%), Amt-JApept (~ 66%) i Amt-JBpept (~ 66%). És interessant remarcar que es va confirmar la tendència observada a l'experiment anterior per als lligands Janus-neamina, ja que novament la part peptídica del fragment Janus genera compostos més afins, tal com constaten les amplificacions dels dímers d'Amt-JApept (~ 66%) i Amt-JBpept (~ 66%), unes 70 vegades més grans que les d'Amt-JA (~ -11%) i Amt-JB (~ -7%). A més, és important destacar la similitud de les amplificacions entre ambdós compostos Amt-Janus, com ja s'havia observat anteriorment, fet que suggereix que no hi ha una diferència significativa entre les seves afinitats. Per tant, aquest resultat reafirma altra vegada la importància de les interaccions de tipus electrostàtic o de pont d'hidrogen que poden exercir els aminoàcids del pèptid.

Pel que fa al monòmer Azq, tot i que la combinació amb els derivats Janus en cap cas va donar lloc a valors d'amplificació significatius, és destacable la formació del dímer disulfur Amt-Azq **46** (~ 85%), que està d'acord amb el resultat obtingut al primer experiment de DCC, i que corrobora que pugui ser un lligand atractiu per reconèixer l'adenina desaparellada, atès que l'Amt el situaria a prop de la regió del *bulge*.



**Figura 76.** Histogrames a les 48 hores corresponents a la variació de la composició de cada monòmer a la DCL (esquerra) i al percentatge d'amplificació de cada espècie per efecte de la presència de l'RNA wt, on X representa els dímers disulfur JA-JBpept i JB-JApept indiferenciables per HPLC.

També és important destacar la gran amplificació de l'homodímer disulfur Amt-Amt (~ 270%) respecte Azq-Azq (~ -23%), JApept-JApept (~ 29%), JBpept-JBpept (~ 15%) i JApept-JBpept (~ 70%). Tot i l'aparent discordança entre aquest valor i l'obtingut al primer experiment, on les respectives dades d'amplificació dels compostos Amt-Amt i Azq-Azq eren bastant més negatives, (~ -40%) i (~ -80%), cal destacar que la presència de les neamines al primer experiment va ocasionar un desplaçament de l'equilibri termodinàmic cap a la formació majoritària dels heterodímers Amt-NeaC<sub>2</sub> (~ 3400%), i Amt-NeaC<sub>6</sub> (~ 1600%), fet que va impedir la formació d'altres compostos com l'Amt-Amt. Aquest comportament, doncs, evidencia el fet que cada experiment consta del seu equilibri termodinàmic particular i, per tant, vam considerar dins d'una normalitat l'aparició d'algunes petites discrepàncies. A més, també és important comentar que les tendències generals observades anteriorment coincideixen plenament amb les conclusions obtingudes en aquest experiment.



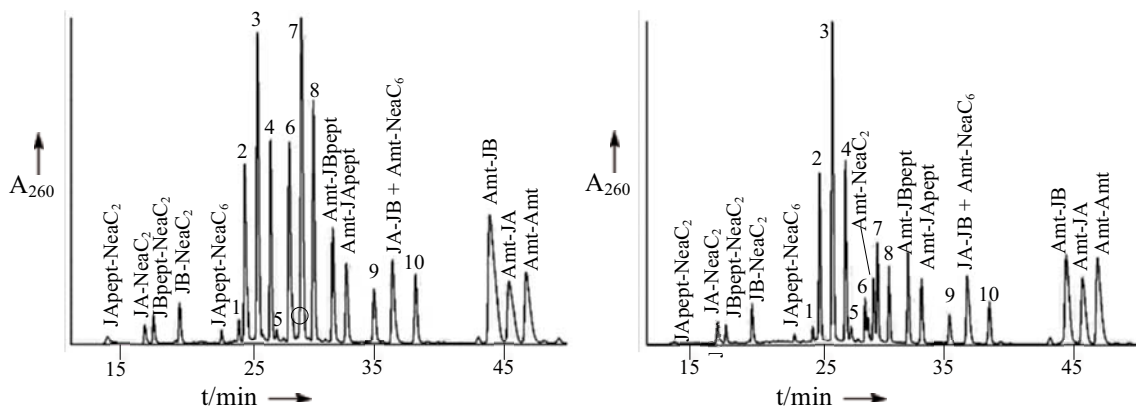
**Figura 77.** Estructura dels lligands Amt-JApept (51) i Amt-JBpept (52) identificats.

Dels diversos compostos identificats en aquest experiment de DCC, es va arribar a la conclusió que els lligands Amt-JApept (51) i Amt-JBpept (52), juntament amb l'anteriorment seleccionat Amt-Azq (46), eren força atractius per a la realització dels

futurs estudis biofísics amb l'RNA. El fet que a prop del suposat lloc d'unió de l'ametrantrona hi hagi un parell G U i, que per acció de les mutacions se'n formi un altre, fa que la combinació del fragment Amt amb les molècules Janus pugui generar nous lligands d'RNA amb capacitat per reconèixer específicament aquests parells G U (**Figura 77**).

## 2.2.4 Experiment de DCC amb els monòmers Janus, Ametrantrona i Neamina

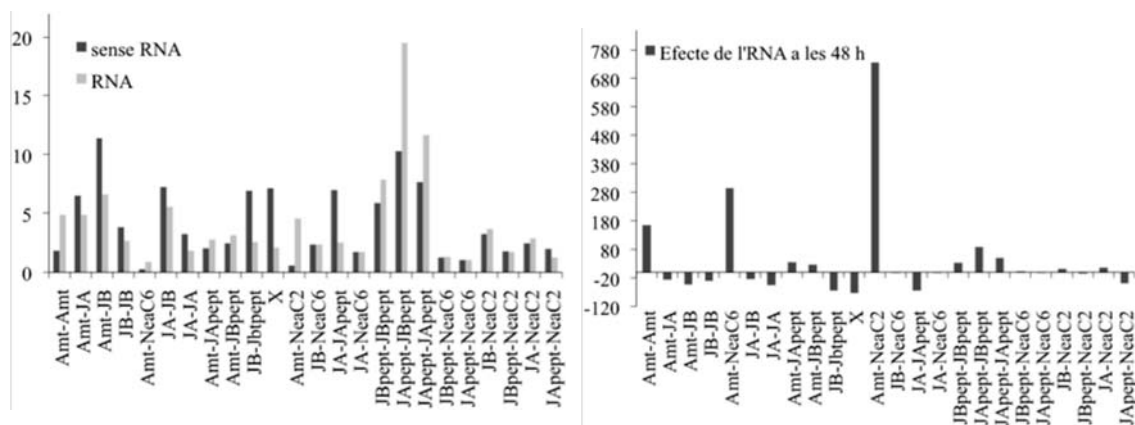
Davant dels resultats dels experiments anteriors, es va considerar oportú realitzar un últim experiment per corroborar, d'una banda, la gran amplificació obtinguda pels dímers derivats d'Amt i, de l'altra, comparar directament la formació dels compostos Amt-Nea i Amt-Janus amb els Janus-Nea. Així doncs, en aquest experiment de DCC es va deixar evolucionar fins a les 48 hores una mescla equimolar (100  $\mu$ M) formada per Amt (**30**), NeaC<sub>2</sub> (**37**), NeaC<sub>6</sub> (**43**), JApept (**21**), JBpept (**22**), JA (**23**), i JB (**24**), en presència de la diana RNA-biotina wt (**Figura 78**). L'anàlisi per HPLC-MS, amb i sense RNA, va revelar que a partir de les 6 hores de reacció la composició de la DCL es mantenia constant, fet que va indicar la consecució de l'equilibri termodinàmic.



**Figura 78.** Cromatogrames d'HPLC a 260 nm corresponents a la composició de la DCL en absència (esquerra) i en presència (dreta) de l'RNA-biotina wt a les 48 h. Els dímers disulfur JA-JBpept i JB-JApept (X) no s'han pogut diferenciar per HPLC. Els números de l'1 al 9 corresponen a JBpept-NeaC<sub>6</sub>, JApept-JApept, JApept-JBpept, JBpept-JBpept, JA-NeaC<sub>6</sub>, JA-JApept+JB-NeaC<sub>6</sub>, X, JB-JBpept, JA-JA, i JA-JB, respectivament. Cal destacar que el compost Amt-NeaC<sub>2</sub> (cercle negre) s'aprecia en forma de petita esquena al pic 7 del cromatograma de l'experiment sense RNA.

A partir de la comparació de l'experiment control amb el realitzat en presència de l'RNA, tal com es mostra als histogrames de la **Figura 79**, es va confirmar novament que els dímers Amt-NeaC<sub>2</sub> (~ 740%) i Amt-NeaC<sub>6</sub> (~ 300%) eren els més amplificats respecte a qualsevol altra combinació de monòmers. Concretament, el lligand amb l'espaiador més curt s'amplificava unes 2.5 vegades més que el que conté l'espaiador llarg. Per tant, aquest resultat indica que la combinació dels fragments Amt i neamina origina lligands molt afins, tal com ja s'ha comprovat anteriorment (apartat 2.2.1). A més, el fet que Amt-NeaC<sub>2</sub> i Amt-NeaC<sub>6</sub> siguin els compostos més amplificats de la biblioteca suggereix que són molt més afins que qualsevol altre de les 28 combinacions

de dímers disulfur possibles. Per exemple, Amt-NeaC<sub>2</sub> s'amplifica entre 750 - 800 vegades més que JApept-NeaC<sub>2</sub> i JBpept-NeaC<sub>2</sub>, i Amt-NeaC<sub>6</sub> al voltant d'unes 300 respecte JApept-NeaC<sub>6</sub> i JBpept-NeaC<sub>6</sub>. Atès que ambdues famílies de lligands, Amt-Nea i Janus-Nea, contenen el mateix fragment aminoglicosídic, segurament les diferències en l'afinitat recauen al fragment heteroaromàtic. En aquest sentit, doncs, aquests resultats recolzarien també la hipòtesi en la qual el derivat Amt interaccionaria amb la diana d'RNA per intercalació entre el parell de bases G-C adjacent a l'adenina del *bulge*, tal com ho fa la mitoxantrona. En canvi, la part heteroaromàtica del lligand Janus-Neamina només aporta la capacitat per formar enllaços pont d'hidrogen amb les nucleobases, que, malgrat ser un tipus d'interacció més específica, és molt més feble que les basades en la intercalació.



**Figura 79.** Histogrammes a les 48 hores corresponents a la variació de la composició de cada monòmer a la DCL (esquerra) i al percentatge d'amplificació de cada espècie (dreta) per efecte de la presència de l'RNA wt, on X representa els dímers disulfur JA-JBpept i JB-JApept, indiferenciables per HPLC.

Per altra banda, també es va veure corroborada la tendència observada anteriorment amb la formació dels heterodímers Amt-Janus, on la major amplificació per Amt-JApept (~ 37%) i Amt-JBpept (~ 30%) respecte Amt-JA (~ -25%) i Amt-JB (~ -42%), confirma el paper del pèptid en la interacció amb l'RNA. A més, tal com s'ha indicat anteriorment, la similitud de les amplificacions dels compostos Amt-Janus suggereix que les afinitats d'ambdós lligands són molt semblants.

Per últim, cal comentar que les amplificacions dels homodímers disulfur Amt-Amt (~ 166%), JApept-JApept (~ 53%), JBpept-JBpept (~ 35%) i JApept-JBpept (~ 90%) mostren una tendència comparable amb la de l'experiment anterior, tot i que en aquest cas les diferències són més petites. Aquest resultat torna a posar de manifest que cada experiment consta del seu equilibri particular i, aquest en concret, la presència dels monòmers aminoglicosídics desplaça l'equilibri cap a la formació majoritària dels dímers Amt-NeaC<sub>2</sub> i Amt-NeaC<sub>6</sub> en detriment d'altres possibles combinacions, com JApept-NeaC<sub>2</sub>, JBpept-NeaC<sub>2</sub>, JApept-NeaC<sub>6</sub> i JBpept-NeaC<sub>6</sub>, que tenen percentatges d'amplificació molt més baixos.

En conclusió, a partir dels resultats d'aquest experiment s'ha confirmat novament el potencial dels compostos Amt-NeaC<sub>2</sub> (44), Amt-NeaC<sub>6</sub> (45), Amt-JApept (51), Amt-



JBpept (**52**), JApept-NeaC<sub>2</sub> (**47**), JApept-NeaC<sub>6</sub> (**48**), JBpept-NeaC<sub>2</sub> (**49**) i JBpept-NeaC<sub>6</sub> (**50**) com a possibles lligands de l'RNA diana.

### 2.3 Valoració dels resultats dels experiments de DCC

A partir dels resultats obtinguts als diferents experiments de DCC, una de les primeres conclusions que podem extreure és la preferència de l'RNA per aquells lligands que contenen l'agent intercalant derivat de l'ametrantrona (Amt) en detriment de l'acridina (AcrOMe). Més concretament, la combinació amb l'aminoglicòsid neamina és la que ha generat les amplificacions més grans, efecte que suggereix que els compostos Amt-NeaC<sub>2</sub> (**44**) i Amt-NeaC<sub>6</sub> (**45**) presenten graus d'afinitat amb la diana d'RNA molt més elevats, on existeix un efecte modulador per part de la longitud de l'espaiador. En segon terme, a més de la unió amb la neamina, la combinació d'Amt amb els fragments heteroaromàtics Azq i Janus també han conduït a la formació de compostos amb capacitat per interaccionar específicament amb l'adenina desaparellada de la regió del *bulge*, (Amt-Azq (**46**)), i amb els parells de bases G-U presents a l'estructura nativa i a les seqüències mutades (Amt-JApept (**51**) i Amt-JBpept (**52**)). Per aquests últims, cal destacar també els dímers Janus-neamina (**47**, **48**, **49**, **50**), tot i que les seves amplificacions són bastant més moderades que les dels seus anàlegs basats en la combinació amb el derivat de l'ametrantrona. Altrament, atès que els lligands Azq-Nea ja havien estat estudiats al nostre grup,<sup>3</sup> no s'han tingut en compte en aquest treball.

En segon lloc, amb les dades extretes del segon experiment (apartat 2.2.2) es pot concloure que les reaccions de bescanvi disulfur entre les molècules Janus i els derivats de neamina són més lentes que en presència d'altres monòmers tiol, tal com revela la presència dels compostos tiol de partida a les 48 hores. En canvi, en aquest mateix experiment en presència del monòmer Amt (apartat 2.2.4), s'assoleix l'equilibri a les 6 hores de reacció. Una possible explicació podria ser la major afinitat del derivat de l'ametrantrona amb l'RNA, amb la qual cosa conduiria a un desplaçament de l'equilibri cap a la formació de productes encara més afins i, per tant, s'arribaria més aviat a un estat estacionari.

Cal esmentar també la gran dificultat de l'anàlisi per HPLC-MS de la composició de la DCL de tots els experiments, ja que ha calgut emprar dos tipus de condicions analítiques per tal d'obtenir una correcta separació cromatogràfica que permetés la quantificació de tots els compostos formats (apartat 3 de la Part Experimental). Aquest obstacle ha estat la principal raó per la qual només s'han emprat 6 i 7 monòmers tiol en cadascun dels experiments de DCC.

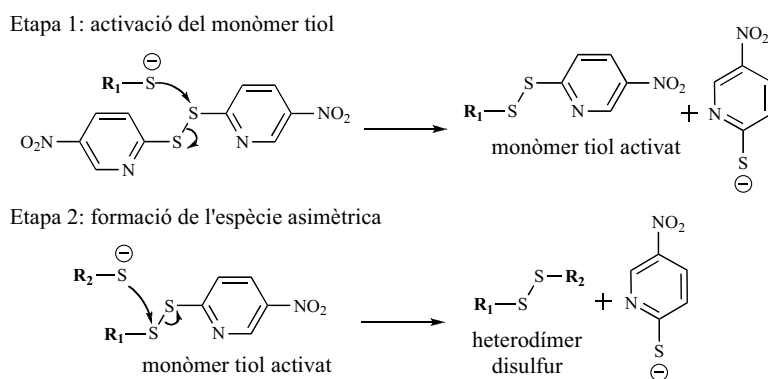




### 3 Síntesi dels lligands d'RNA

#### 3.1 Síntesi dels lligands seleccionats mitjançant DCC

Un cop identificats i seleccionats els 9 lligands més prometedors (compostos **44-52**) amb capacitat per interaccionar amb l'RNA diana, la següent etapa del treball ha consistit en la seva síntesi a gran escala per tal de realitzar els corresponents estudis biofísics amb l'RNA, atès que l'escala dels experiments de DCC era massa petita per aïllar-ne la quantitat necessària. La síntesi dels dímers disulfur asimètrics, provada amb èxit al nostre grup,<sup>3</sup> s'ha basat en una metodologia molt utilitzada en la conjugació de pèptids disulfur,<sup>56</sup> en la qual s'empra el reactiu 2,2'-ditiobis(5-nitropiridina) (DTNP) com a agent activant dels grup tiol. Tal com es mostra a la **Figura 80**, en una primera reacció de bescanvi disulfur es produeix l'atac nucleòfil del grup tiol lliure del primer monòmer per donar l'espècie activada en forma de dímer disulfur estable que, després de tornar a bescanviar l'enllaç disulfur, mitjançant la reacció amb un altre monòmer tiol, dona lloc a l'heterodímer disulfur desitjat.



**Figura 80.** Representació esquemàtica del mecanisme de formació de l'enllaç disulfur asimètric.

Cal destacar que ambdues reaccions de bescanvi d'enllaç disulfur transcorren en atmosfera inert sense l'ús de cap agent oxidant. Particularment, el grup nitro de la posició *para* fa que el tiolat sigui un molt bon grup sortint,<sup>56a</sup> fet que facilita l'atac nucleòfil sobre l'enllaç disulfur activat.

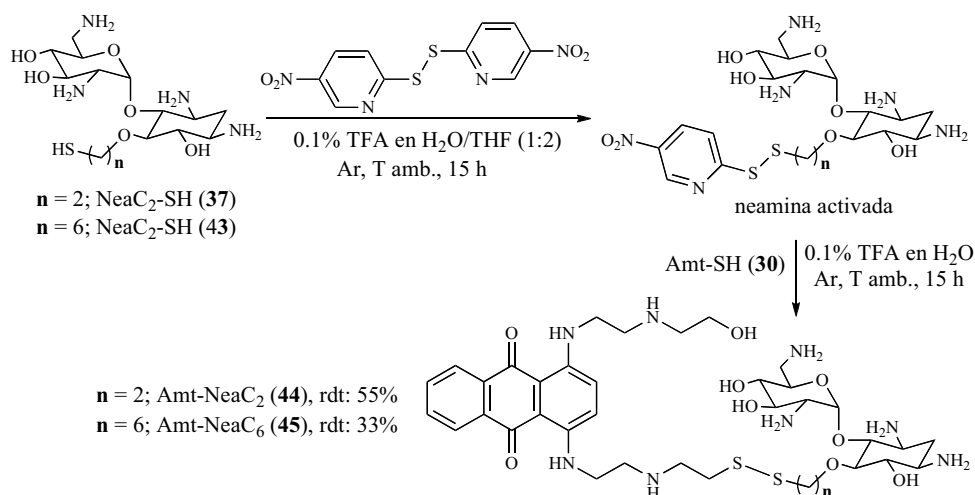
A nivell experimental, inicialment es va optar per seguir el procediment descrit a la tesi doctoral de Paula López,<sup>3</sup> en el qual es feia reaccionar el monòmer tiol amb 12.5 eq de DTNP a temperatura ambient i en atmosfera d'argó, amb el corresponent seguiment per espectrometria de masses ESI, durant unes 15 hores en una mescla H<sub>2</sub>O/THF (1:2) amb 0.1 % TFA. La major proporció de dissolvent orgànic és necessària per dissoldre el reactiu 2,2'-ditiobis(5-nitropiridina). Un cop activada la funció tiol i eliminat completament l'excés de DTNP mitjançant extraccions amb AcOEt, es feia reaccionar amb l'altre monòmer tiol, en les mateixes condicions, per tal d'obtenir el disulfur desitjat. Ara bé, l'obtenció de rendiments baixos i l'elevada proporció de l'espècie homodimèrica, ha ocasionat que en alguns casos s'hagi optat per controlar el pH de la reacció mitjançant l'ús d'una solució amortidora d'AcONH<sub>4</sub> 1 M a pH 3.5, ja que es troba descrit que s'afavoreix la formació de l'enllaç heterodisulfur a pHs entre 3.5 i 6.5.<sup>56a</sup> En el nostre cas, doncs, es van dissoldre els 12.5 eq de l'agent activant DTNP en una mescla THF/AcONH<sub>4</sub> 1 M a pH 3.5 (2:1), seguint les mateixes condicions descrites anteriorment.

Tot i aquestes modificacions experimentals, en alguns casos no va ser possible millorar els rendiments, però com que les quantitats obtingudes eren suficients per realitzar els estudis d'interacció amb l'RNA, es va decidir no optimitzar aquesta metodologia.

### 3.1.1 Síntesi de lligands Ametantrona-Neamina

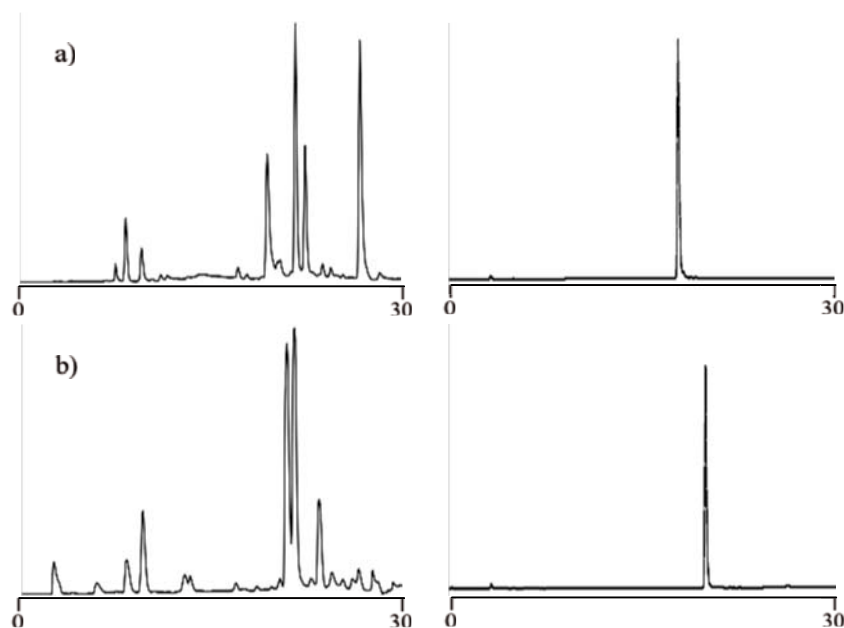
Per a la síntesi d'aquest primer grup de lligands, després de diverses proves es va optar per activar, en primer lloc, els derivats de neamina (**37** i **43**) amb DTNP i, posteriorment, addicionar el monòmer Amt (**30**), fet que va permetre obtenir **44** i **45** amb rendiments del 55 i 33%, respectivament (**Figura 81**).

Cal destacar que malgrat haver obtingut en tots els casos l'espècie homodimèrica Amt-Amt, no es va considerar oportú aïllar-la, ja que, per una banda, el seu grau d'amplificació als experiments de DCC és molt inferior al dels dímers Amt-Neamina i, per l'altra, el fet de tractar-se d'una espècie bis-intercalant farà que sigui un lligand poc específic.



**Figura 81.** Esquema de la síntesi dels dímers disulfur **44** i **45**.

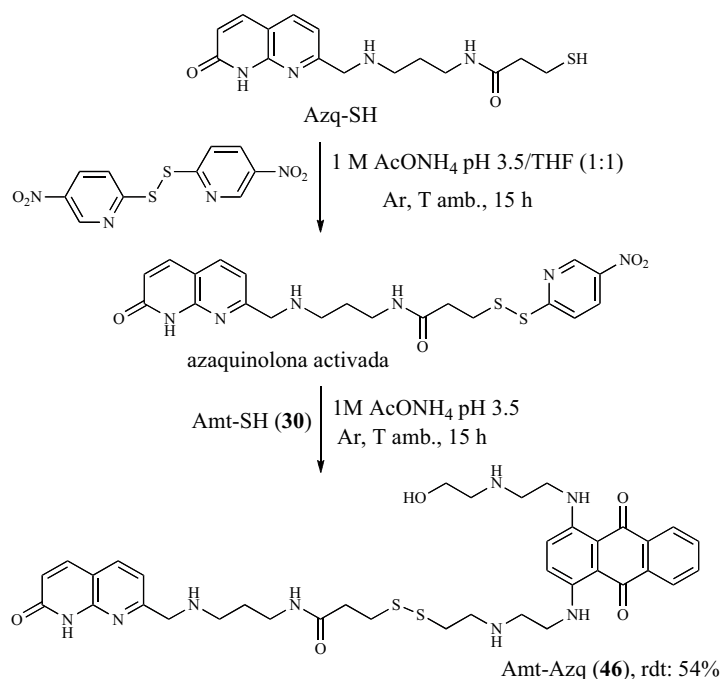
A continuació, a la **Figura 82** es mostren els cromatogrames d'HPLC dels productes **44** i **45**.



**Figura 82.** Cromatograma del cru de síntesi (esquerra) i del producte pur (dreta) de: a) Amt-NeaC<sub>2</sub> (**44**), b) Amt-NeaC<sub>6</sub> (**45**).

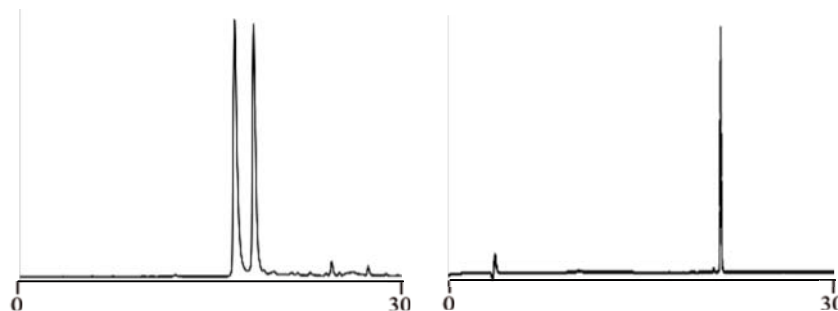
### 3.1.2 Síntesi del lligand Ametantrona-Azaquinolona

Per a l'obtenció del lligand Amt-Azq (**46**) es va fer reaccionar **30**, amb el monòmer Azq prèviament activat amb DTNP, en THF/1M d'AcONH<sub>4</sub> a pH 3.5 (1:1) (**Figura 83**).



**Figura 83.** Esquema de la síntesi del lligand Amt-Azq (46).

És interessant mencionar que a l'hora de realitzar la purificació per HPLC, atès que el subproducte de la reacció Amt-Amt eluïa amb el producte desitjat, va caldre emprar com a eluents mescles amb 0.1 % d'àcid fòrmic enlloc del percentatge de TFA utilitzat habitualment (**Figura 84**).

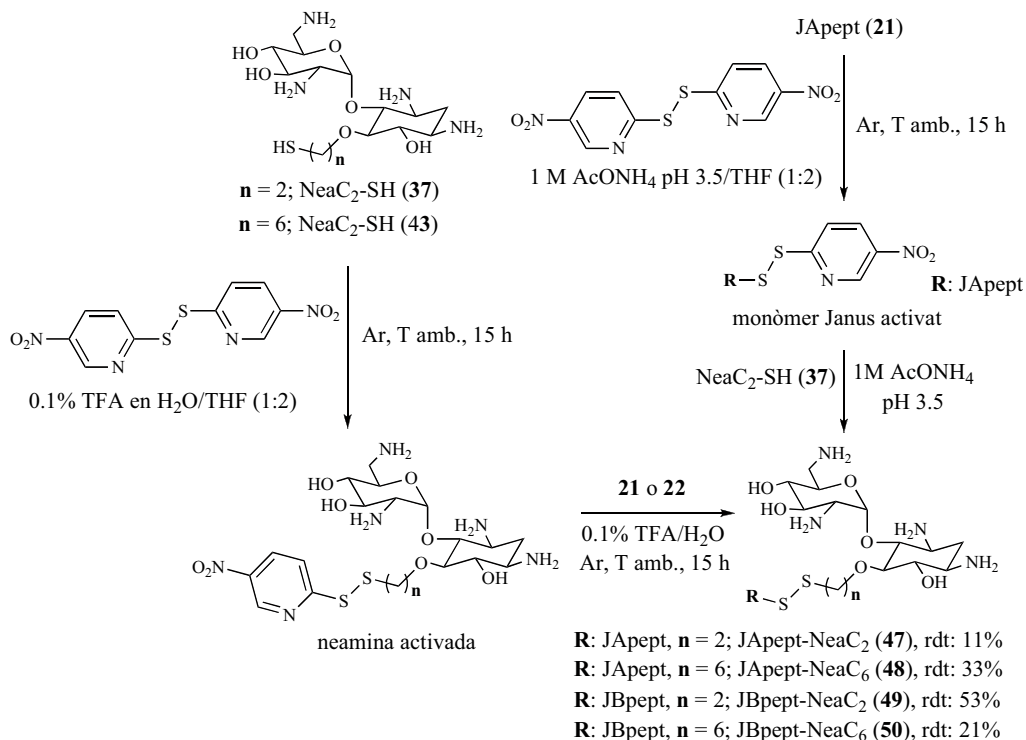


**Figura 84.** Cromatograma del cru de síntesi (esquerra) i del producte pur (dreta) Amt-Azq (46).

### 3.1.3 Síntesi de lligands Janus-Neamina

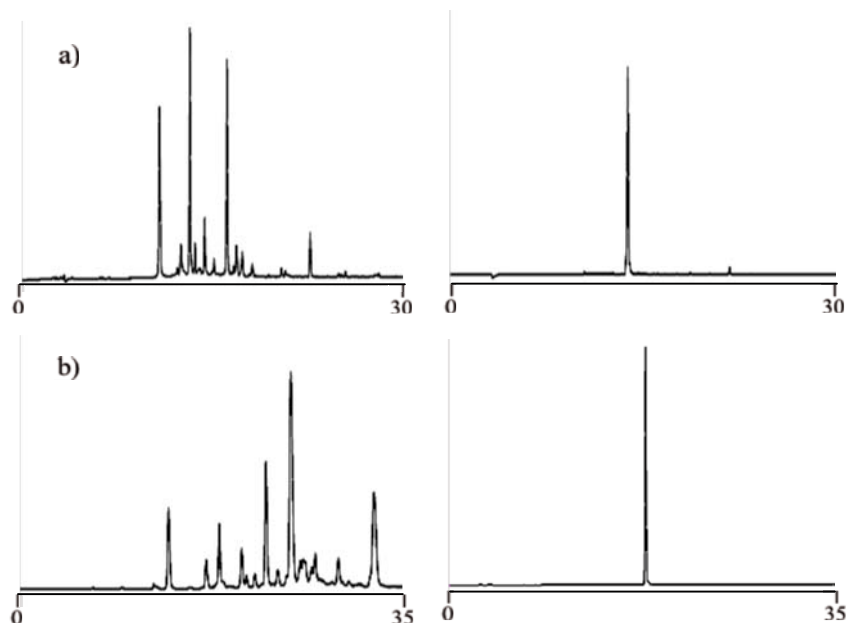
Per a la síntesi d'aquest grup de lligands es va seguir el procediment experimental descrit a l'apartat 3.1.1, en el qual, primerament, es van activar els derivats neamina (**37** i **43**) amb DTNP i, posteriorment, es va afegir la molècula Janus (**21** i **22**) per obtenir **48-50** amb rendiments del 21-53%. Per altra banda, l'activació de **21** amb DTNP en una mescla THF/1M AcONH<sub>4</sub> a pH 3.5 (1:1), i la posterior reacció amb **37** va permetre obtenir **47** amb un rendiment inferior (11%), tal com es troba descrit a la part experimental (**Figura 85**). A més, atès que en tots els casos es va detectar la formació

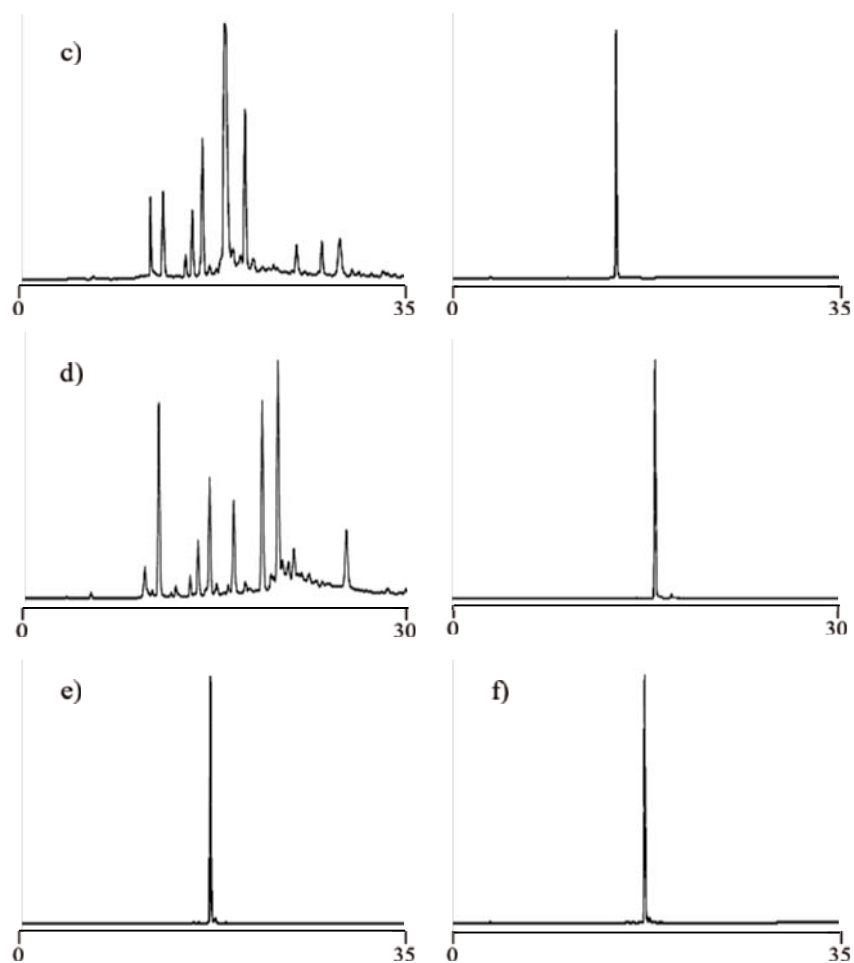
dels homodímers JApept-JApept (**53**) i JBpept-JBpept (**54**), es va decidir aïllar-los i emprar-los als posteriors estudis biofísics amb l'RNA.



**Figura 85** Esquema de la síntesi dels dímers disulfur **47-50**.

A continuació, a la **Figura 86** es mostren els cromatogrames d'HPLC corresponents al cru de reacció i al producte purificat en cada cas.

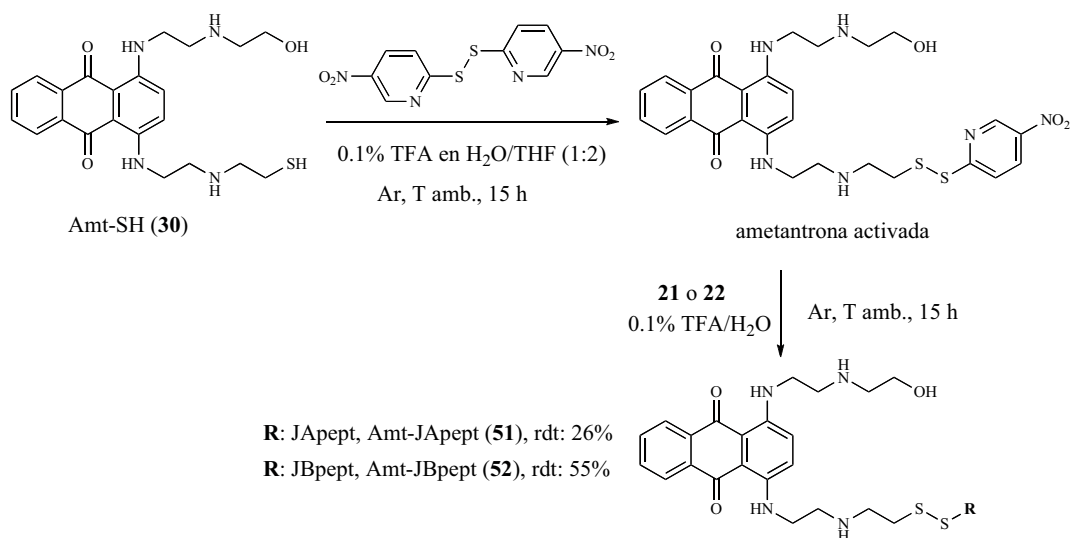




**Figura 86.** Cromatogrames d'HPLC dels crús de síntesi (esquerra) i dels productes purs (dreta) de: a) JApept-NeaC<sub>2</sub> (**47**), b) JApept-NeaC<sub>6</sub> (**48**), c) JBpept-NeaC<sub>2</sub> (**49**) i d) JBpept-NeaC<sub>6</sub> (**50**). Com a subproductes, també s'han aïllat els homodimers: e) JApept-JApept (**53**), i f) JBpept-JBpept (**54**).

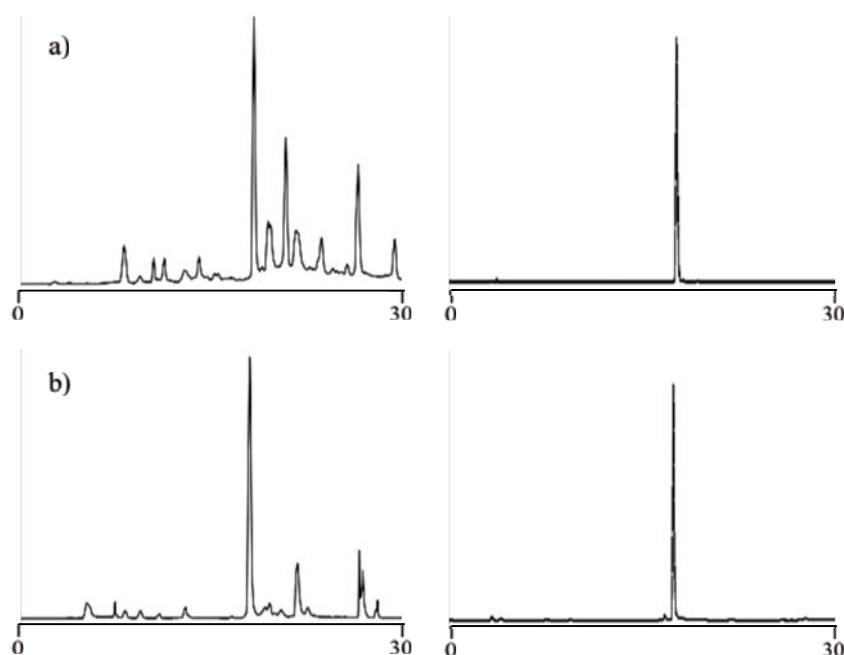
### 3.1.4 Síntesi de lligands Ametantrona-Janus

Per a la síntesi dels compostos Amt-JApept (**51**) i Amt-JBpept (**52**) es va activar primerament la funció tiol del monòmer **30** i, a continuació, es va fer reaccionar amb els monòmers Janus **21** i **22** (**Figura 87**). Cal destacar que, tal com s'havia observat a la síntesi dels compostos Amt-Nea, en aquest cas també es va detectar la formació de l'homodimer Amt-Amt.



**Figura 87.** Esquema de la síntesi dels dímers disulfur 51-52.

A continuació, a la **Figura 88** es mostren els cromatogrames d'HPLC dels productes 51 i 52.



**Figura 88.** Cromatogrames dels crús de síntesi (esquerra) i dels productes purs (dreta) de: a) Amt-JApept (51) i b) Amt-JBpept (52).

### 3.2 Síntesi dels lligands de segona generació

A partir dels resultats obtinguts amb els lligands identificats als experiment de DCC, es va creure convenient modificar-los químicament amb l'objectiu de millorar les seves propietats d'interacció amb l'RNA. Concretament, tal com s'exposa a continuació, es va



optar, d'una banda, per la guanidinilació dels grups amino del fragment neamina i, de l'altra, en una doble funcionalització del fragment ametantrona. Atès que van suposar una millora en les seves propietats fisicoquímiques, es va decidir anomenar-los lligands de segona generació.

### 3.2.1 Síntesi de lligands guanidinilats

Com ja s'ha comentat anteriorment per l'arginina,<sup>5</sup> a la natura els grups guanidini formen, juntament amb diversos grups aniònics com ara els carboxilats o fosfats presents en els enzims o anticossos, fortes interaccions electrostàtiques que contribueixen a l'estabilització de l'estructura terciària. Per tant, no és d'estranyar que en estudis de reconeixement molecular, el disseny i la síntesi de compostos amb grups guanidini tingui un paper molt important.<sup>57</sup>

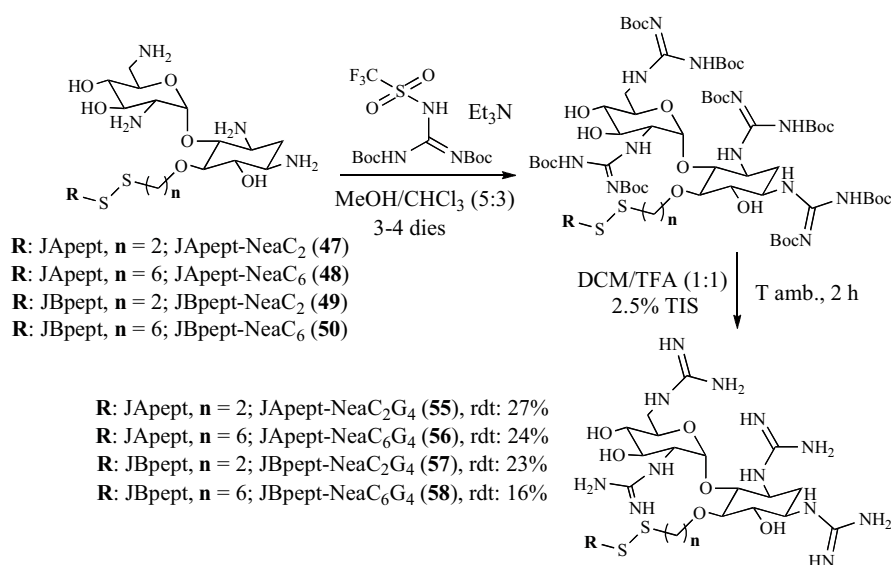
Els grups guanidini desenvolupen una funció essencial en moltes interaccions entre l'RNA i les proteïnes, ja que, a diferència dels grups amoni, tenen una orientació plana que els hi atorga una gran direccionalitat en les interaccions de tipus enllaç pont d'hidrogen. A més, el grup guanidini té un caràcter molt bàsic ( $pK_a \sim 12-13$ ) i, per tant, en un ample rang de pH està protonat, on la seva càrrega positiva es troba deslocalitzada al voltant dels tres àtoms de nitrogen.<sup>57</sup> Per altra banda, la substitució dels grups amino per grups guanidini ha tingut un paper molt destacat en la millora de l'afinitat i l'especificitat amb l'RNA de lligands aminoglicosídics, anomenats guanidinoglicòsids.<sup>58</sup> A més d'una gran afinitat amb l'RNA, els guanidinoglicòsids mostren una gran eficàcia de penetració cel·lular i una capacitat per inhibir la replicació del virus VIH-1 *in vivo*. I, anàlogament als aminoglicòsids, els guanidinoglicòsids s'enllacen preferentment a l'RNA respecte el DNA, fet que demostra la seva selectivitat amb les molècules d'RNA.<sup>58</sup> Així doncs, davant d'aquests precedents bibliogràfics, es va pensar que la guanidinilació dels grups amino dels lligands que contenen el fragment neamina podria ser una bona via per obtenir lligands més afins i específics.

Experimentalment, es va optar per la guanidinilació directa dels grups amino del fragment aminoglicosídic emprant la metodologia descrita per Tor i col·laboradors,<sup>58,59</sup> aplicada prèviament també amb èxit al nostre grup de recerca.<sup>3</sup> Concretament, es va fer reaccionar el compost amb un gran excés (15 eq) de 1,3-di-Boc-2-(trifluorometilsulfonyl)guanidina i  $NEt_3$  a temperatura ambient durant 3-4 dies. Un cop guanidinilat, atès que els grups guanidini incorporats estan protegits amb els grups Boc, ha calgut realitzar la corresponent desprotecció per obtenir el producte desitjat.

#### 3.2.1.1 Síntesi de lligands Janus-Guanidinoneamina

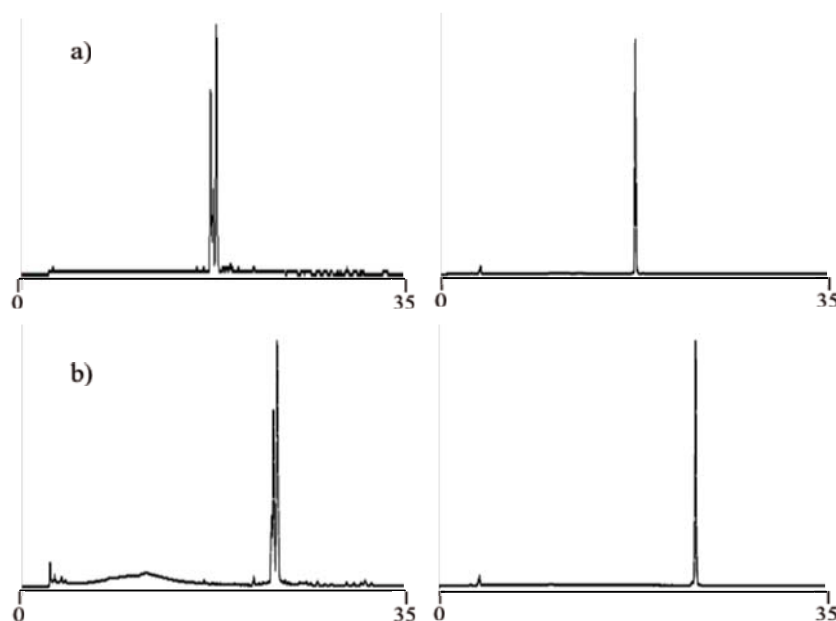
La síntesi dels lligands Janus-Guanidinoneamina, es va dur a terme mitjançant la reacció dels compostos JApept-NeaC<sub>2</sub> (**47**), JApept-NeaC<sub>6</sub> (**48**), JBpept-NeaC<sub>2</sub> (**49**) i JBpept-NeaC<sub>6</sub> (**50**) amb el reactiu guanidinilant (10 eq de per grup amino) en presència de 240 eq de  $NEt_3$ , en una mescla MeOH/ $CHCl_3$  (5:3) durant 3-4 dies, i amb el corresponent seguiment per espectrometria de masses MALDI-TOF. Un cop obtinguts els productes guanidinilats, el següent pas va consistir en l'eliminació dels grups Boc mitjançant un tractament amb una mescla TFA/DCM (1:1), amb 2.5 % TIS com a captador de cations. (**Figura 89**).

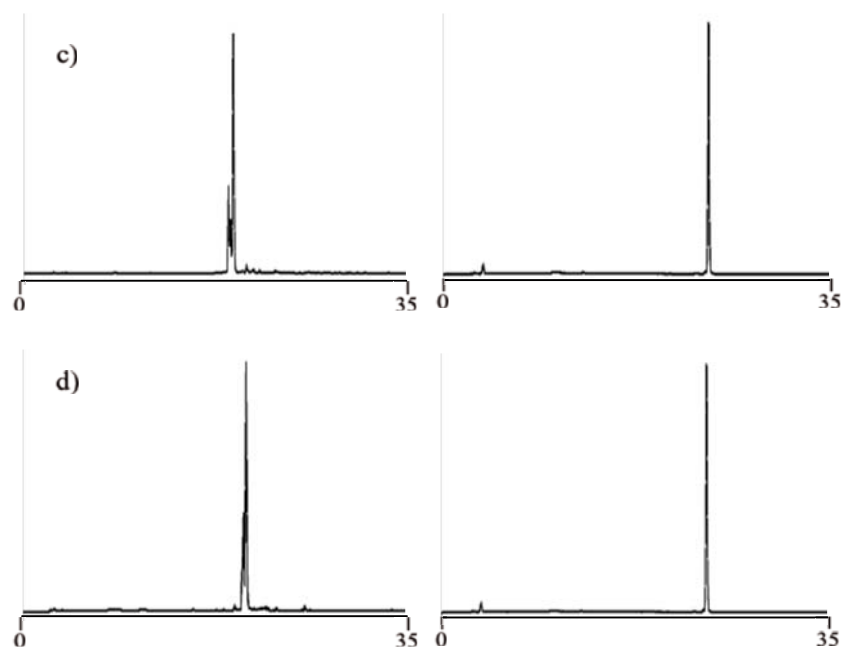
Des del punt de vista cinètic, cal dir que es tracta d'una reacció molt lenta, ja que l'impediment estèric al voltant de cada grup amino esdevé cada vegada més gran i, a més, el fet que s'hagi d'emprar un dissolvent pròtic per dissoldre l'aminoglicòsid, alenteix la reacció de guanidinilació.<sup>59</sup> És per això, doncs, que enlloc d'emprar un dissolvent molt polar com l'H<sub>2</sub>O, s'ha utilitzat una mescla de dissolvents orgànics (MeOH i CHCl<sub>3</sub>) que, amb una polaritat més moderada, permeten solubilitzar tant els lligands com el reactiu guanidinilant.



**Figura 89.** Esquema de la síntesi dels lligands guanidinilats **55-58**.

Cal destacar que en tots els casos els rendiments han estat bastant baixos, ja que també s'ha obtingut el producte amb tres grups guanidini, tal com es pot apreciar als cromatogrames d'HPLC dels corresponents crús de reacció (**Figura 90**).



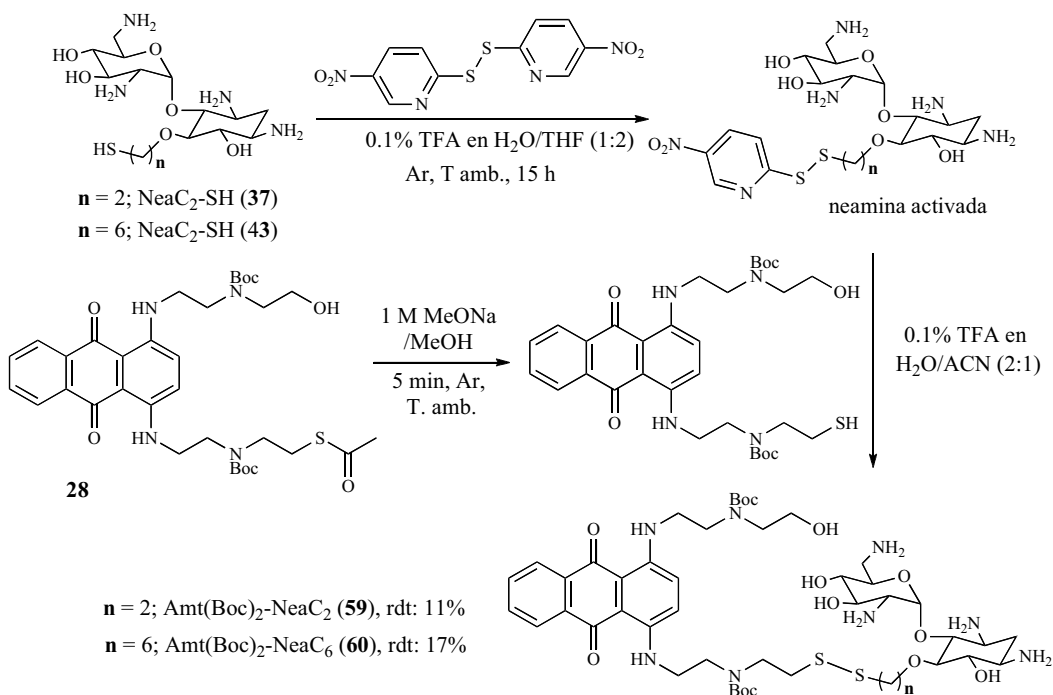


**Figura 90.** Cromatogrames dels crús de síntesi (esquerra) i dels productes purs (dreta) de: a) JApept-NeaC<sub>2</sub>G<sub>4</sub> (**55**), b) JApept-NeaC<sub>6</sub>G<sub>4</sub> (**56**), c) JBpept-NeaC<sub>2</sub>G<sub>4</sub> (**57**) i JBpept-NeaC<sub>6</sub>G<sub>4</sub> (**58**).

### 3.2.1.2 Síntesi de lligands Ametantrona-Guanidinoneamina

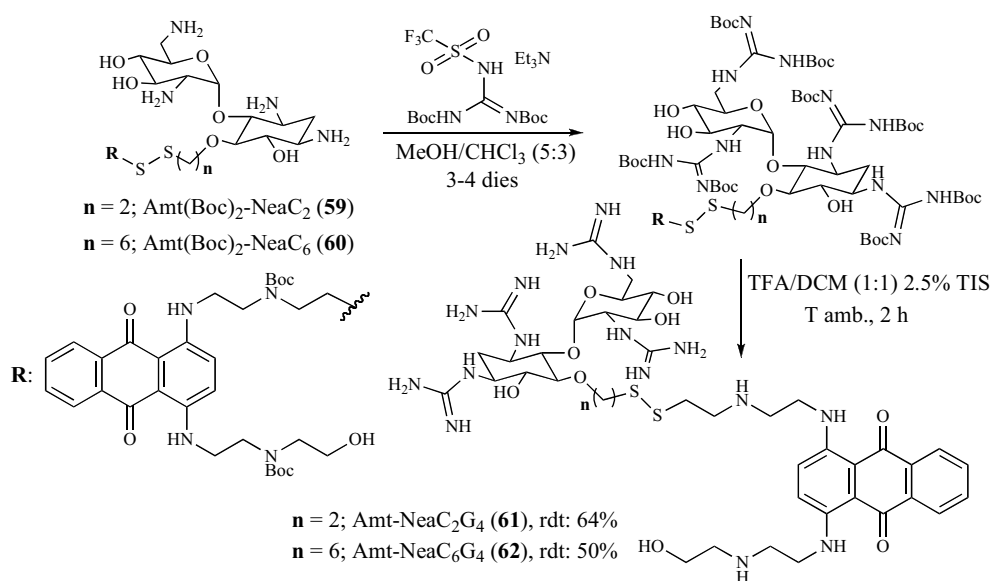
Inicialment es va fer reaccionar directament els lligands Ametantrona-Neamina (**44** i **45**) amb el reactiu guanidinilant en presència de NEt<sub>3</sub>, mitjançant el mateix procediment experimental descrit anteriorment. Després de la desprotecció dels grups Boc, l'anàlisi per HPLC va mostrar un producte majoritari que, un cop aïllat, va resultar tenir la massa del producte tetraguanidinilat desitjat. Ara bé, el fet que l'anàlisi per EM-MALDI-TOF mostrés la presència de productes amb 3, 4, 5 i 6 grups guanidini, ens va fer dubtar que el producte tetraguanidinilat aïllat per HPLC, tot i la simetria del pic cromatogràfic, fos realment una barreja dels diferents regioisòmers originats per la guanidinilació de les amines secundàries del derivat de l' ametantrona. Per tant, es va preferir canviar d'estratègia, tot i que posteriorment es va demostrar per RMN que el producte aïllat inicialment corresponia únicament al producte ametantrona-neamina guanidinilada desitjat.

Així doncs, en una segona estratègia es va optar per sintetitzar els lligands a través de l'activació, en primer lloc, del monòmer tiol neamina (**37** i **43**) amb l'agent activant DTNP, tal com s'ha descrit a l'apartat 3.1. A continuació, es va eliminar el grup tioacetat de **28**, mantenint les amines secundàries protegides amb els grups Boc, i aquest intermedi es va fer reaccionar amb el derivat de neamina activat. Després de la corresponent purificació per HPLC, els productes **59** i **60** van poder ser obtinguts amb uns rendiments del 11 i 17%, respectivament (**Figura 91**).



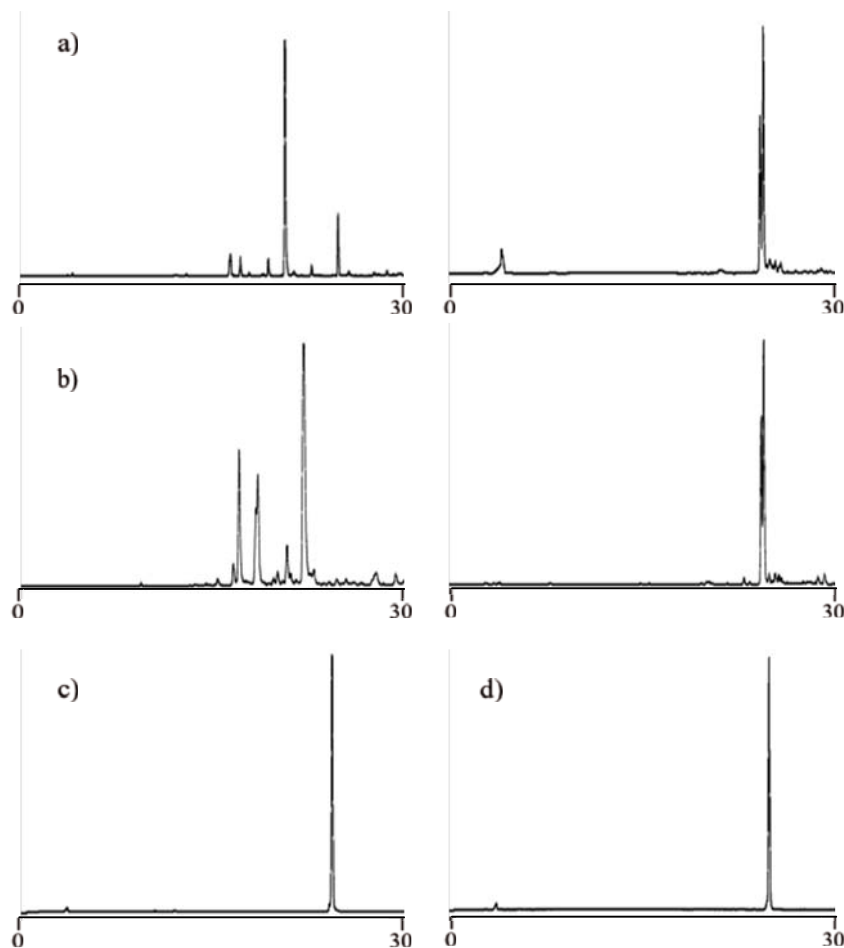
**Figura 91.** Esquema de la síntesi dels dímers disulfur **59** i **60**.

Posteriorment, a partir del mateix procediment experimental anterior (apartat 3.2.1.1), es van fer reaccionar **59** i **60** amb el reactiu guanidinilat, tot i que en aquest cas es van afegir 20 eq de reactiu per grup amino a guanidinilar. Atès que la presència dels grups Boc genera un impediment estèric addicional, van caldre fins a un total de 14 dies de reacció, 360 eq de 1,3-di-Boc-2-(trifluorometilsulfonyl)guanidina i 1680 eq de NEt<sub>3</sub> per obtenir, després de la corresponent desprotecció en medi àcid, els productes guanidinilats **61** i **62** desitjats amb un rendiment del 64 i 50%, respectivament (**Figura 92**).



**Figura 92.** Esquema de la síntesi dels lligands guanidinilats **61** i **62**.

Per altra banda, també cal destacar que, tot i els 14 dies de reacció i la gran quantitat de reactiu guanidinilat addicionat, se seguia detecant la presència dels productes triguanidinilats en el cru de la reacció, tot i que el majoritari corresponia als productes desitjats **61** i **62** (**Figura 93**).



**Figura 93.** Cromatogrames d'HPLC corresponents: a) als crus de síntesi de **59** (esquerra) i de **61** (dreta), b) als crus de síntesi de **60** (esquerra) i de **62** (dreta), c) al producte **61** pur, i d) al producte **62** pur.

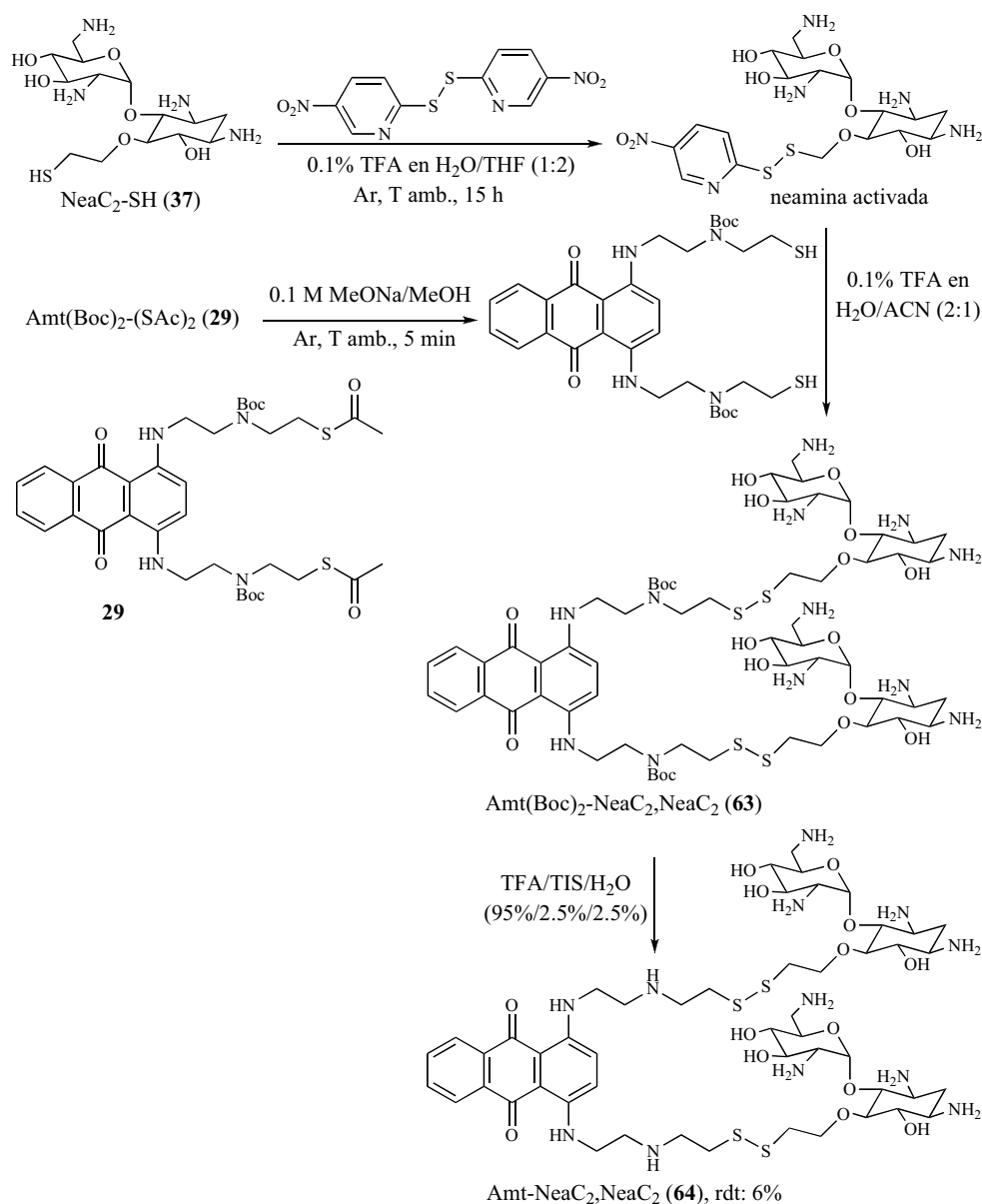
### 3.2.2 Síntesi de lligands derivats de l'ametantona doblement funcionalitzats

L'altra via per obtenir lligands de segona generació va consistir en emprar el derivat **29**, aïllat com a subproducte de la reacció Mitsunobu (apartat 1.2), per modificar el lligand Amt-NeaC<sub>2</sub> (**44**) mitjançant la unió d'un segon fragment al braç alquílic lliure de l'anell d'antraquinona. L'elecció del lligand Amt-NeaC<sub>2</sub> com a producte de partida va estar condicionada pels resultats obtinguts als estudis biofísics que, tal com es descriurà més detalladament al següent capítol, havien revelat una bona capacitat estabilitzadora i una gran afinitat amb l'RNA diana. Per tant, davant de la important millora en les propietats d'interacció de l'ametantona amb l'RNA que havia representat la unió de l'aminoglicòsid neamina, particularment amb l'espaiador més curt, es va plantejar si l'addició d'un tercer fragment podia conduir a lligands encara més afins i amb major especificitat amb la diana. Concretament, es va optar, d'una banda, per la unió d'una segona neamina amb l'objectiu d'afavorir les interaccions electrostàtiques del lligand

amb l'RNA i, de l'altra, del derivat azaquinolona, ja que en cas que el lloc d'unió de **44** fos la zona del *bulge*, la presència d'una molècula heteroaromàtica amb capacitat per reconèixer adenines desaparellades podria concedir al nou lligand una major especificitat.

### 3.2.2.1 Síntesi del lligand Amt-NeaC<sub>2</sub>,NeaC<sub>2</sub>

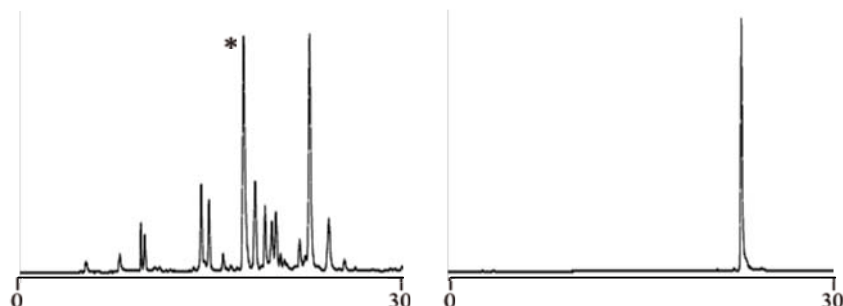
Per a la síntesi d'aquest derivat de l'ametranona doblement funcionalitzat, es va optar per una estratègia similar a la seguida per **61** i **62**. És a dir, es van hidrolitzar els dos grups tioacetat de **29** amb un tractament amb MeONa en MeOH i, amb el manteniment dels grups Boc, es va fer reaccionar amb un excés del monòmer neamina **37**, prèviament activat amb l'agent DTNP, per obtenir el monòmer **63** desitjat protegit amb els grups Boc (**Figura 94**).



**Figura 94.** Esquema de la síntesi del lligand doblement funcionalitzat **64**.

Un cop purificat **63** per HPLC, el següent pas va consistir en l'eliminació dels grups Boc mitjançant el tractament amb una solució àcida (TFA) en presència de H<sub>2</sub>O i TIS. En aquest punt, és important comentar la necessitat d'haver hagut de purificar prèviament el derivat de neamina activat per tal que tingués lloc la següent reacció. Un altre punt crític de la reacció es troba a la hidròlisi dels tioacetats de **29**, ja que es va observar que el tractament habitual amb una solució 1 M de MeONa afavoria la formació de compostos polimèrics derivats de l'ametrantrona. En aquest sentit, doncs, es va optar per diluir 10 vegades la concentració de MeONa, i dur a terme la reacció només durant 5 min en atmosfera d'argó. Un cop confirmada per EM-ESI la presència del monòmer ditiol, es va addicionar immediatament sobre el derivat de neamina activat. També cal esmentar que es van mantenir unes condicions de reacció diluïdes, malgrat que la reacció fos més lenta, per tal de minimitzar la formació d'espècies polidimèriques derivades de l'ametrantrona. Tot i això, sempre es va observar la formació d'un precipitat blau corresponent a aquests subproductes.

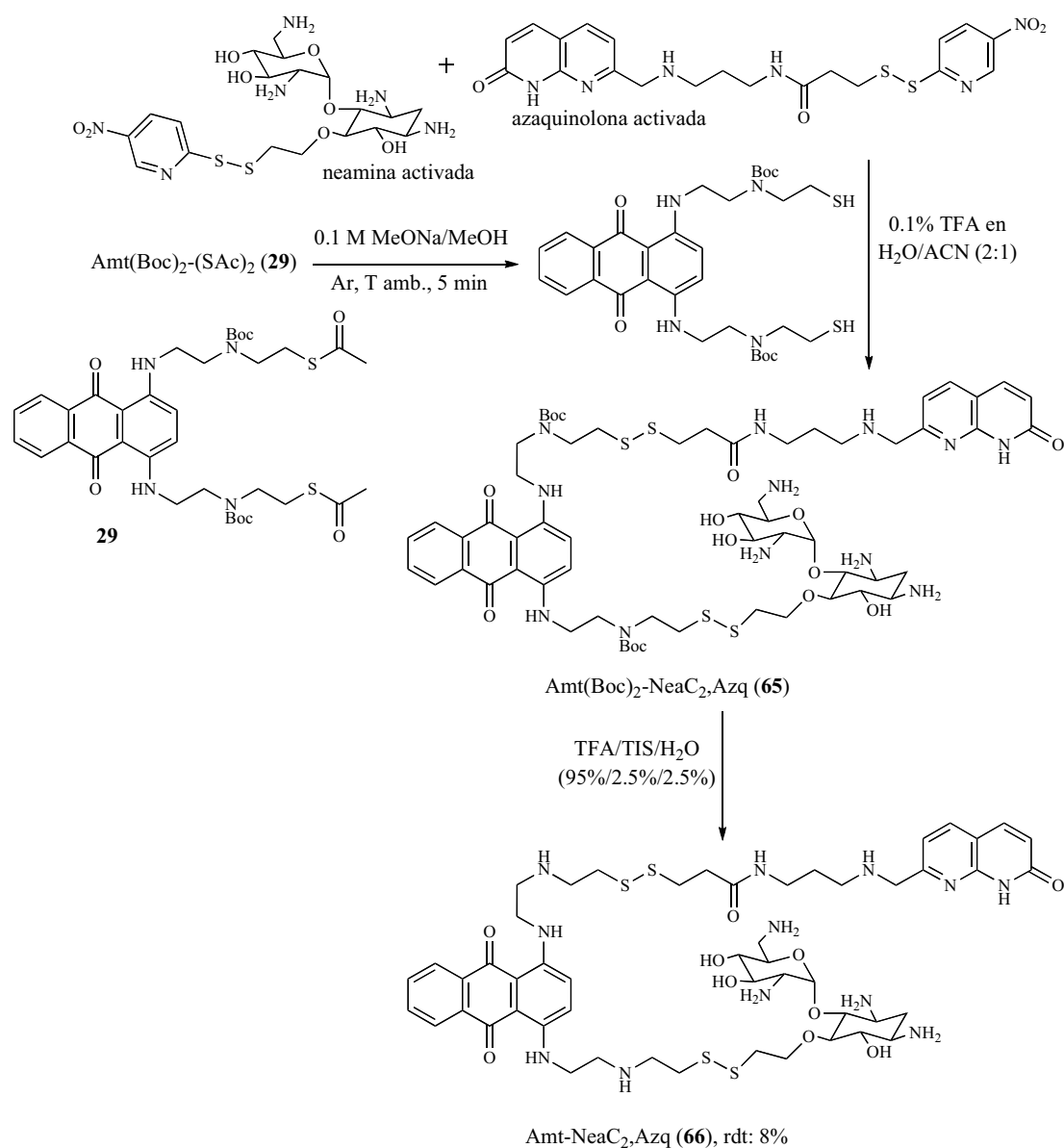
Per altra banda, també es va detectar el producte amb només un fragment de neamina, ja que, com era d'esperar, l'impediment estèric ocasionat per la primera neamina feia que la reacció amb una segona molècula de l'aminoglicòsid fos més lenta, fet que originava una competència entre la dimerització del producte amb una única neamina, i la formació del producte desitjat. Per tant, és per tot això que, malgrat el baix rendiment final, es va considerar tot un èxit l'obtenció de **64** amb suficient quantitat per poder dur a terme els estudis d'interacció amb l'RNA plantejats (**Figura 95**).



**Figura 95.** Cromatogrames d'HPLC corresponents al cru de síntesi d'Amt(Boc)<sub>2</sub>-NeaC<sub>2</sub>,NeaC<sub>2</sub> (**63**) (indicat amb un \*) i al producte pur Amt-NeaC<sub>2</sub>,NeaC<sub>2</sub> (**64**), respectivament.

### 3.2.2.2 Síntesi del lligand Amt-NeaC<sub>2</sub>,Azq

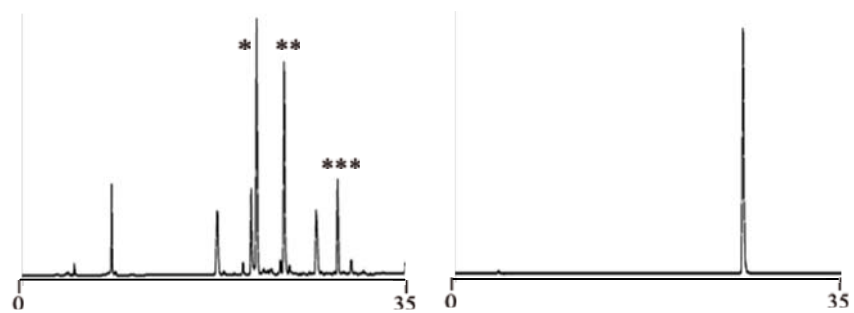
Per a la síntesi de **66** es va seguir el procediment anterior, però en aquest cas es va fer reaccionar el derivat desprotegit de **29** amb el doble d'equivalents del derivat de neamina **37** activat respecte el monòmer tiol activat d'azaquinolona, en atmosfera d'argó durant 6 dies. Transcorregut aquest temps, es va desprotegir l'intermedi **65** mitjançant el mateix tractament àcid realitzat per **63** (**Figura 96**).



**Figura 96.** Esquema de la síntesi del lligand doblement funcionalitzat **66**.

Tal com era d'esperar, l'anàlisi per HPLC i EM-ESI també van revelar la formació del derivat amb dues neamines (**63**) i l'anàleg amb dues azaquinolones (**Figura 97**). Finalment, un cop aïllat per HPLC, el producte **65** va ser tractat en medi àcid i es va obtenir el lligand desitjat **66** amb un rendiment del 8%.





**Figura 97.** Cromatogrames d'HPLC corresponents al cru de síntesi del producte Amt(Boc)<sub>2</sub>-NeaC<sub>2</sub>,Azq (**65**), i al producte pur Amt-NeaC<sub>2</sub>,Azq (**66**), respectivament. A l'anàlisi del cru, a part del producte desitjat **65** (\*\*), també es va detectar **63** (\*) i el compost Amt(Boc)<sub>2</sub>-Azq,Azq (\*\*\*)

## Capítol 2

*Estudis d'interacció dels lligands amb  
l'estructura stem-loop del pre-mRNA de  
tau*



## **Introducció i objectius**

---

Un cop sintetitzats a gran escala tant els lligands seleccionats als experiments de química combinatòria dinàmica (DCC) com alguns anàlegs de segona generació, el següent pas d'aquest treball ha consistit en estudiar la seva interacció amb les seqüències nativa i mutades de la diana d'RNA, amb l'objectiu d'aprofundir en el procés de reconeixement molecular.

A l'actualitat, en el camp de la recerca biomèdica, els mètodes biofísics són àmpliament utilitzats per determinar diversos paràmetres físicoquímics associats amb la capacitat d'enllaç d'un lligand amb la seva diana biològica. Per exemple, les tècniques espectroscòpiques, com ara UV-visible, fluorescència, ressonància magnètica nuclear o dicroisme circular, permeten obtenir informació sobre el mecanisme d'enllaç, la determinació de constants d'afinitat, l'estructura tridimensional del complex RNA-ligand, el tipus d'interacció o el lloc d'unió del lligand.<sup>59,60</sup>

En aquesta segona part del treball, s'ha optat per agrupar els objectius en tres grans apartats:

- La determinació de l'afinitat i l'especificitat dels lligands amb la seqüència nativa.
- L'estudi de l'efecte estabilitzador dels lligands a la seqüència nativa i a les mutades +3, +14 i +16.
- La caracterització del tipus i del lloc d'unió amb la seqüència nativa de la diana d'RNA.

A la següent taula, s'indiquen els diferents lligands emprats als diferents estudis biològics:

	<b>Lligands anàlegs de l'Ametantrona</b>	<b>Lligands Janus-Neamina/ Guanidinoneamina</b>
<b>Seleccionats mitjançant DCC</b>	Amt-NeaC <sub>2</sub> Amt-NeaC <sub>6</sub> Amt-Azq Amt-JApept Amt-JBpept	JApept-NeaC <sub>2</sub> JApept-NeaC <sub>6</sub> JBpept-NeaC <sub>2</sub> JBpept-NeaC <sub>6</sub>
<b>Segona Generació</b>	Amt-NeaC <sub>2</sub> G <sub>4</sub> Amt-NeaC <sub>6</sub> G <sub>4</sub> Amt-NeaC <sub>2</sub> ,NeaC <sub>2</sub> Amt-NeaC <sub>2</sub> ,Azq	JApept-NeaC <sub>2</sub> G <sub>4</sub> JApept-NeaC <sub>6</sub> G <sub>4</sub> JBpept-NeaC <sub>2</sub> G <sub>4</sub> JBpept-NeaC <sub>6</sub> G <sub>4</sub>

**Taula 2.** Taula resum dels lligands estudiats en aquest segon capítol.

## 1 Determinació de l'afinitat i l'especificitat dels lligands amb la diana d'RNA

---

Atès que idealment els compostos més amplificats als experiments de DCC solen ser els compostos amb major afinitat amb la diana,<sup>3,46a,c,48</sup> l'objectiu més immediat va consistir en corroborar aquesta correlació mitjançant la determinació de les constants d'afinitat dels lligands amb la seqüència nativa de l'RNA diana. Per altra banda, també es va considerar interessant estudiar el grau d'especificitat ja que per obtenir lligands amb bones propietats farmacològiques, com s'ha comentat anteriorment (apartat 1.3 de la Introducció), a més d'una bona afinitat, és molt important que la competència amb altres biomolècules sigui mínima.

### 1.1 Determinació de constants d'afinitat: visió general

Per a la determinació de constants d'afinitat de molècules petites amb una seqüència d'RNA es poden emprar diverses tècniques biofísiques, tal com es troba descrit a la bibliografia.<sup>60</sup> A continuació, s'introdueixen breument algunes d'aquestes tècniques, posant especial èmfasi a l'espectroscòpia de fluorescència (apartat 1.2), que ha estat la tècnica escollida en aquest treball.

- **Calorimetria (ITC).** Dins de les tècniques calorimètriques, la ITC (*Isothermal Titration Calorimetry*) representa l'aproximació més utilitzada a l'hora d'estudiar interaccions moleculars entre lligands i biomolècules, siguin proteïnes o àcids nucleics.<sup>60,61</sup> A més, es tracta d'una metodologia molt útil per determinar constants d'afinitat i obtenir informació sobre el mecanisme d'interacció a través de diversos paràmetres termodinàmics, com ara els efectes entròpics i entàlpics, l'energia lliure, o la relació d'estequiometria de la unió entre el lligand i la diana.<sup>60,62</sup> Típicament, un experiment model consisteix en addicionar de forma successiva quantitats creixents de lligand sobre una solució de diana d'RNA, mesurant en cada addició l'energia que es desprèn en formar-se el complex lligand-RNA. Aquesta tècnica és molt adequada per molècules que no presenten cap espectre d'absorció ni d'emissió i, a més, el fet que no

calgui immobilitzar la diana sobre cap suport sòlid ni derivatitzar-la amb un grup fluoròfor, evita possibles pertorbacions que podrien afectar a l'enllaç del lligand amb l'RNA.<sup>62</sup>

Malgrat que és una tècnica molt sensible, com a principal limitació destaca la necessitat d'utilitzar grans quantitats de lligand i de diana per realitzar les valoracions.<sup>60b</sup> Tot i això, a la bibliografia es troben diversos exemples de la seva aplicació a l'hora de determinar constants d'afinitats de petites molècules amb seqüències d'RNA, com per exemple, aminoglicòsids i *riboswitches*.<sup>63</sup>

• **Ressonància de plasmó superficial (SPR).** Als últims 15 anys la ressonància de plasmó superficial també ha esdevingut una tècnica molt utilitzada per a la determinació de diversos paràmetres cinètics, com ara constants d'equilibri associades a la formació de complexos RNA-ligand. A nivell experimental, similarment als experiments de DCC (apartat 2.1.1 del capítol 1), la diana d'RNA es derivatitza a un extrem amb biotina, ja que la unió amb estreptavidina permet la seva immovilització a la superfície metàl·lica sobre la qual flueix com a fase mòbil la solució del lligand.<sup>64,65a</sup> El nom de la tècnica ve donat pel fenomen òptic que es produeix quan una radiació electromagnètica amb un angle concret penetra a l'interfase d'una superfície metàl·lica formada per una làmina d'or molt prima (nanòmetres), anomenada xip SPR, que separa dos medis amb índexs de refracció diferents. Quan els electrons deslocalitzats (plasmons) de l'or absorbeixen una part de l'energia, es produeix una reducció de l'intensitat de la llum reflexada, l'angle de la qual és molt sensible als canvis de refracció del medi extern. Per tant, a mesura que la fase mòbil transcorre sobre la superfície metàl·lica, les interaccions produïdes entre el lligand i la diana, fins que s'arriba a un estat d'equilibri, produeixen variacions en l'índex de refracció del medi aquós que afecten aquest angle i produeixen un canvi a la intensitat del senyal SPR. La monitorització d'aquests canvis amb el temps permet quantificar constants d'equilibri i determinar constants d'afinitat de molècules petites amb l'RNA.<sup>60,64,65a</sup>

Per altra banda, tot i ser una tècnica molt sensible, ja que requereix molt poca quantitat de lligand i d'RNA (de l'ordre de picomols a nanomols), un dels principals inconvenients és la necessitat de derivatitzar l'RNA per fixar-lo al xip SPR. A més, cal comentar que la correlació entre la senyal SPR enregistrada i la concentració de massa sobre la superfície metàl·lica ocasiona que en aquells casos en que s'estudia la interacció d'un lligand de poc pes molecular amb una diana molt gran, les variacions de massa tant petites poden dificultar l'obtenció de valors fiables. I, finalment, l'elevat preu de l'equip i el seu manteniment també són factors a tenir en compte.<sup>61b,64</sup> Malgrat aquests inconvenients, la SPR és una tècnica àmpliament utilitzada per a la determinació de constants d'afinitat entre molècules petites i l'RNA.<sup>65</sup>

• **Espectrometria de masses (ESI-MS).** A nivell conceptual, la característica principal d'aquesta tècnica és el fet que permet determinar la massa molecular de la diana sola i del complex lligand-RNA format en fase gas. Concretament, un dels mètodes més utilitzats per determinar les constants d'afinitat consisteix en addicionar quantitats creixents de lligand sobre una concentració constant d'RNA, i registrar la relació entre la intensitat del pic molecular de l'RNA sol i la del pic corresponent al complex amb el lligand. Per calcular les constants d'afinitat s'assumeix que el procés de ionització de la mostra no afecta a l'equilibri de formació del complex i que la unió del

l·ligand amb la diana no altera la seva ionització. És un mètode molt sensible i ràpid que permet emprar molt poca quantitat de diana i de l·ligand sense haver de dur a terme cap modificació química prèvia. A més, es poden identificar compostos desconeguts i permet obtenir directament informació estequiomètrica del complex a partir del nombre de molècules d'RNA i de l·ligands presents. Tot i això, la principal problemàtica és la presència de sals no volàtils, fins i tot a nivell de traces, presents a la majoria de tampons aquosos que inhibeix la ionització i provoca la pèrdua de senyal, fet que limita la tècnica a l'ús de sals d'amoni, que sí són volàtils.<sup>60a,66</sup> Malgrat aquest desavantatge, l'espectrometria de masses ESI-MS ha estat àmpliament emprada al camp dels àcids nucleics en l'estudi de formació de complexos amb molècules petites a través d'interaccions de tipus no covalent.<sup>64,67</sup>

- **Ressonància magnètica nuclear (RMN).** Per estudiar en detall la interacció de molècules petites amb els àcids nucleics existeixen diverses estratègies basades en la ressonància magnètica nuclear,<sup>68</sup> com per exemple l'anàlisi dels desplaçaments químics de la regió dels protons imino de la diana en funció de la concentració del l·ligand.<sup>68a</sup> En general, és possible determinar valors d'afinitat moderats-baixos (mM), tot i que cal emprar grans quantitats de mostra.<sup>60b,68</sup>

Malgrat que la RMN ha estat molt més emprada per estudiar la unió de l·ligands a proteïnes, també podem trobar a la bibliografia alguns exemples de la seva aplicació al camp dels àcids nucleics.<sup>68a,69</sup>

- **Assaig de retard de mobilitat electroforètica (EMSA).** Tot i que aquesta tècnica s'usa principalment per estudiar els complexos entre proteïnes i àcids nucleics, també permet mesurar la interacció d'enllaç entre l·ligands i l'RNA.<sup>60b</sup> Clàssicament, les solucions de proteïna i d'àcid nucleic, aquest últim marcat amb <sup>31</sup>P, són incubades conjuntament i sotmeses a electroforesi amb un gel de poliacrilamida o d'agarosa, en condicions no desnaturitzants, per determinar la seva distribució a través del seguiment de la seva marca de <sup>31</sup>P. En general, s'observa que la mobilitat del complex àcid nucleic-proteïna és més lenta que la de l'oligonucleòtid lliure.<sup>64,70</sup> Ara bé, malgrat que aquesta metodologia és molt útil per observar interaccions entre pèptids o proteïnes amb l'RNA, en el cas de molècules petites és més difícil. La determinació de constants d'afinitat se sol basar en mesurar el desplaçament produït per aquestes molècules sobre l·ligands coneguts de la diana d'RNA.<sup>60b</sup> Un exemple representatiu és la determinació de la capacitat inhibidora de la formació del complex Rev-RRE per part de molècules orgàniques, com ara derivats d'aminoglicòsids.<sup>71</sup>

- **Fluorescència.** L'espectroscòpia de fluorescència és una de les tècniques analítiques més utilitzades per identificar i caracteritzar interaccions entre les molècules petites i l'RNA, ja que és molt sensible i requereix poca quantitat de mostra. És per això que s'engloba dins del grup de tècniques de cribatge anomenades *high-throughput screening* (apartat 1.3.3 de la Introducció), i el seu cost econòmic és moderat.<sup>60b</sup> Concretament, un experiment típic per determinar constants d'afinitat consisteix en mesurar la variació de la intensitat de fluorescència del l·ligand fluorescent a mesura que s'addicionen quantitats creixents d'RNA.<sup>72</sup> Ara bé, en el cas que el l·ligand no sigui fluorescent, les constants d'afinitat es poden determinar a través d'un assaig de competició,<sup>13a,73</sup> en el qual es monitoritza el desplaçament que realitza una molècula no fluorescent sobre una enllaçada amb l'RNA, que sí ho és, o bé a través de la mesura



directa del canvi de fluorescència d'un grup fluoròfor incorporat a la diana d'RNA, produït per l'addició del lligand.<sup>13a,74</sup>

A causa de la poca disponibilitat d'alguns instruments, com són els casos de la SPR o la ITC, o les grans quantitats de mostra i d'RNA necessàries per RMN, en aquest treball ens hem decantat per l'espectroscòpia de fluorescència com a tècnica per determinar l'afinitat dels compostos sintetitzats al capítol anterior amb la nostra diana d'RNA. Com ja s'ha comentat, a més de ser una tècnica senzilla i de disposar al nostre grup de recerca de la instrumentació adequada, el seu ampli ús al camp de la recerca de lligands d'RNA l'avalen.

## 1.2 Espectroscòpia de fluorescència

En aquest apartat s'ha considerat adient presentar aquesta tècnica espectroscòpica des del punt de vista de la determinació de constants d'afinitat de molècules petites amb l'RNA, a través d'una breu presentació teòrica seguida d'una visió més pràctica, on s'especifiquen qüestions com l'elecció de l'estratègia a seguir, el grup fluoròfor a emprar o el càlcul dels valors d'afinitat.

### 1.2.1 Introducció i fonaments teòrics

Quan una espècie química absorbeix un fotó passa a un estat electrònic excitat. Ara bé, hi ha molècules (fluoròfors) que enlloc de dissipar tot aquest excés d'energia en forma de calor, ho fan emetent un fotó a una freqüència diferent de l'absorbida per donar lloc al fenomen de luminiscència. Concretament, en funció de la naturalesa de l'estat excitat i del mecanisme mitjançant el qual l'espècie torna al seu estat fonamental, es produeix fluorescència o fosforescència que, des d'un punt de vista pràctic, es distingeixen a partir del temps transcorregut entre l'absorció i l'emissió, que és d'uns  $10^{-8}$  s a la fluorescència, i entre  $10^{-3}$  i 10 s a la fosforescència.<sup>75</sup>

Teòricament, tal com s'indica al diagrama de Jablonski (**Figura 98**), quan un electró passa a un nivell energètic superior, en funció de l'estat del seu spin pot donar lloc a un estat singlet excitat ( $S_1$  i  $S_2$ ) o a un triplet excitat ( $T_1$ ), dins dels quals es distingeixen diferents nivells d'energia vibracional ( $v_0, v_1, v_2 \dots v_n$ ). Quan una molècula absorbeix radiació electromagnètica ( $h\nu_A$ ) es produeix el pas d'electrons des de l'estat vibracional fonamental de l'estat fonamental ( $S_0, v_0$ ) als estats vibracionals excitats de l'estat excitat ( $S_1, v_1, v_2 \dots v_n$  o  $S_2, v_1, v_2 \dots v_n$ ). A més, a la vegada i sense emissió de radiació, té lloc un procés de relaxació cap a l'estat vibracional fonamental del mateix estat excitat ( $S_1, v_1, v_2 \dots v_n \rightarrow S_1, v_0$ ) o de l'estat excitat de més baixa energia ( $S_2, v_1, v_2 \dots v_n \rightarrow S_1, v_0$ ), anomenat conversió interna. Altrament, quan es produeix l'emissió d'un fotó des de l'estat excitat a l'estat fonamental ( $S_1, v_0 \rightarrow S_0, v_0, v_1, v_2 \dots v_n$ ) es produeix fluorescència ( $h\nu_F$ ). Per altra banda, quan a dins de l'estat excitat es produeix un canvi a l'spin d'un electró es forma un estat triplet ( $T_1$ ), i aquest fenomen s'anomena creuament entre sistemes. L'emissió d'un fotó des d'aquest estat excitat fins a l'estat fonamental ( $T_1 \rightarrow S_0, v_1, v_2 \dots v_n$ ) es denomina fosforescència ( $h\nu_P$ ).<sup>75</sup>

En fluorescència, la representació de l'espectre de les energies dels fotons emesos durant les diferents transicions electròniques ( $S_1, v_0 \rightarrow S_0, v_0, v_1, v_2 \dots v_n$ ) que formen la radiació de fluorescència ( $h\nu_F$ ) és el que es coneix com a espectre de fluorescència, en el

qual la longitud d'ona màxima ( $\lambda_{exc}$ ) correspon a l'energia del fotó emès a la transició entre el nivell vibracional fonamental ( $S_1, v_0$ ) i el nivell vibracional de més energia de l'estat fonamental ( $S_1, v_n$ ). També cal destacar el paràmetre anomenat rendiment quàntic ( $\Phi$ ), o intensitat de fluorescència, que correspon a la relació entre el nombre de fotons emesos i els absorbits.<sup>75</sup>

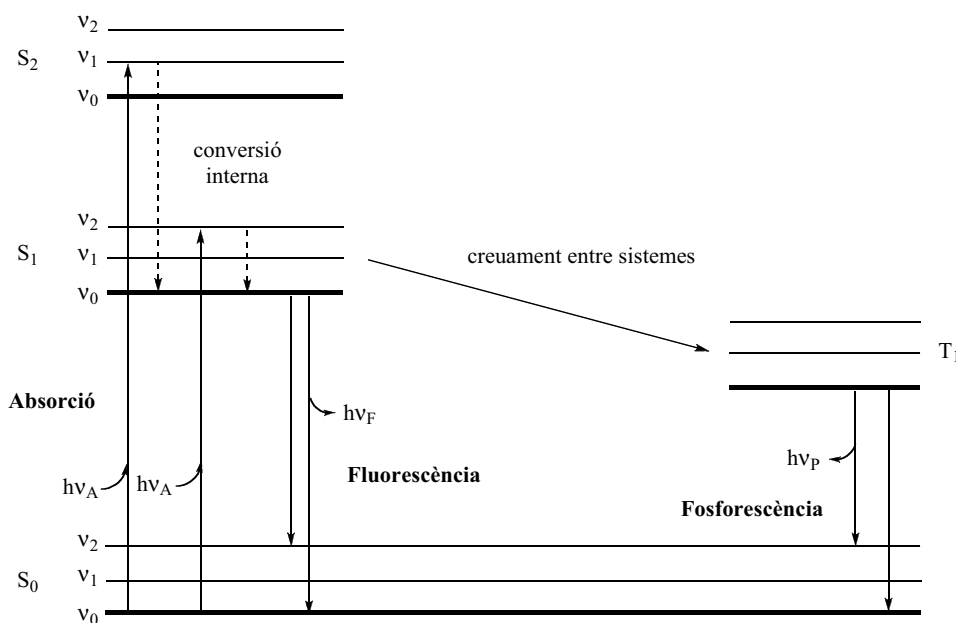


Figura 98. Diagrama de Jablonski.<sup>75a</sup>

Una altra característica destacada és el fet que l'emissió produïda per un fluoròfor és molt sensible al seu entorn. De fet, el seu temps de vida ( $\tau$ ), el temps que transcorre entre el seu estat excitat i el fonamental, es pot veure afectat per diferents mecanismes, com ara col·lisions amb altres molècules en solució, per processos de transferència d'energia, per reaccions de l'estat excitat, o de forma estàtica, que produeixen un procés de pèrdua energètica que es tradueix en una disminució de la intensitat de fluorescència o *quenching*. De fet, moltes molècules amb capacitat per actuar com a fluoròfors, com ara les nucleobases naturals, pateixen aquest procés en solució, de manera que la seva emissió de fluorescència no pot ser observada. Concretament, perquè un fluoròfor pugui ser emprat en assaigs de fluorescència ha de tenir un rendiment quàntic d'almenys el 10%.<sup>75,76</sup>

D'altra banda, tot i que l'objectiu d'aquest apartat no és centrar-se en aspectes instrumentals, val la pena comentar la funció dels monocromadors o seleccionadors de longituds d'ona d'excitació ( $\lambda_{exc}$ ) o d'emissió ( $\lambda_{em}$ ), a partir dels quals s'obtenen els espectres d'emissió i excitació. En el primer cas, s'excita la mostra a una longitud d'ona concreta ( $\lambda_{exc}$ ) enregistrant l'espectre de radiació emesa (espectre d'emissió) a un rang determinat de longituds d'ones. La selecció de la  $\lambda_{exc}$  ve determinada a partir de l'espectre d'absorció. En canvi, per obtenir l'espectre d'excitació es fa un escombratge de longituds d'ona d'excitació i s'enregistra la intensitat de radiació emesa a una longitud d'ona concreta ( $\lambda_{em}$ ). En aquest punt, una de les característiques més importants dels espectres de fluorescència és el fet que l'espectre d'emissió apareix a  $\lambda$

més grans que el d'absorció, ja que la seva energia d'emissió és menor o igual que la d'absorció, amb la qual cosa l'emissió té lloc a energies més baixes. A més, com a conseqüència de la transició energètica que dona lloc al fenomen de fluorescència, l'espectre d'emissió esdevé una imatge especular de la part de l'espectre d'absorció corresponent únicament a la transició  $S_1 \rightarrow S_0$ .<sup>75</sup>

Així doncs, el fet que el procés d'emissió de fluorescència sigui molt més sensible a l'entorn del fluoròfor que el d'absorció, li atorga a aquesta tècnica un alt grau de sensibilitat. De fet es considera que les tècniques basades en fluorescència són al voltant d'unes 1000 vegades més sensibles i versàtils que l'espectroscòpia d'absorció. A més, la gran sensibilitat del cromòfor al medi, com el pH, la polaritat, la viscositat, etc, converteixen la seva excitació en una eina molt efectiva per dur a terme diversos assaigs biofísics i bioquímics *in vitro*, a més de permetre obtenir imatges de cèl·lules *in vivo*.<sup>77</sup>

### 1.2.2 Marcatge fluorescent de l'RNA

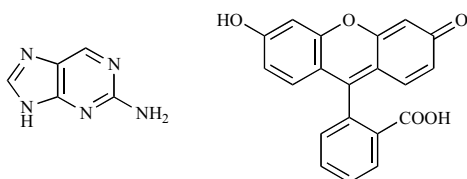
A diferència de les proteïnes, que gràcies als residus de triptòfan, tirosina i fenilalanina gaudeixen de propietats espectroscòpiques favorables, els àcids nucleics manquen d'autofluorescència a causa de la pràcticament inexistent capacitat emissiva de les bases puríniques i pirimidíniques en condicions aquoses neutres.

Com s'ha comentat a l'apartat anterior, a l'hora de caracteritzar les interaccions entre els lligands i l'RNA mitjançant espectroscòpia de fluorescència, cal que almenys una de les dues parts que formen el complex RNA-ligand sigui fluorescent. En el cas que el lligand no ho sigui, és necessari modificar químicament la cadena oligonucleotídica a través de l'incorporació d'un grup fluoròfor a un dels extrems de la seqüència, o bé d'un nucleòsid fluorescent a una zona propera al lloc d'unió del lligand.<sup>60a</sup> Aquesta modificació permetrà mesurar variacions en la fluorescència del fluoròfor com a conseqüència dels canvis conformationals de l'RNA originats a causa de la interacció amb el lligand.<sup>74a,77,78</sup>

En primer lloc, quan l'aproximació de treball es basa en la incorporació d'un marcador fluorescent enmig de la seqüència oligonucleotídica, el procediment més habitual consisteix en l'ús de nucleobases modificades isomòrfiques a les naturals amb unes propietats fluorescents inherents, on el tamany molecular, la capacitat de formació d'enllaços ponts d'hidrogen i l'aparellament Watson-Crick (W-C) no es veuen massa modificats respecte a les nucleobases naturals. L'exemple més representatiu és la 2-aminopurina (2-AP), un isòmer constitucional de l'adenina, amb un alt rendiment quàntic, que mimetitzava l'adenina i que manté la capacitat per formar aparellament W-C amb les nucleobases timina (T) i uracil (U).<sup>60a,77</sup> És per això que la 2-AP (**Figura 99**) s'ha convertit en un dels nucleòsids modificats més utilitzats en estudis d'interacció entre els àcids nucleics i molècules petites,<sup>79</sup> i també en la determinació de constants d'afinitats.<sup>13b,72,80-83</sup>

Pel que fa a la segona aproximació, també molt emprada, la incorporació del fluoròfor a un dels extrems de la cadena oligonucleotídica es realitza mitjançant el corresponent derivat fosforamidit introduït a l'extrem 5' durant l'última etapa de la síntesi química de l'RNA, o a l'extrem 3' mitjançant un espaiador incorporat directament a la resina sobre el qual creix la cadena d'RNA.<sup>76</sup> Dels diversos fluoròfors disponibles comercialment,

com el pirè, la rodamina o la fluoresceïna (**Figura 99**), aquest darrer ha estat àmpliament utilitzat en estudis d'interacció entre lligands i RNA, gràcies al seu excel·lent rendiment quàntic i a la seva bona solubilitat en aigua.<sup>3,72,74a,84-88</sup>



**Figura 99.** Estructura de la 2-aminopurina (esquerra) i de la fluoresceïna (dreta).

Així doncs, basant-nos en aquests precedents bibliogràfics i en el treball previ realitzat al nostre grup d'investigació,<sup>3</sup> per a la determinació de l'afinitat dels lligands de l'estructura *stem-loop* de l'RNA de tau sintetitzats a aquesta tesi doctoral es va optar per derivatitzar l'oligoribonucleòtid 29-mer amb un grup fluoròfor, ja que alguns d'ells no mostraven autofluorescència, i es va monitoritzar els canvis d'intensitat de fluorescència en addicionar quantitats creixents de lligand. Tal com s'exposarà als següents apartats, als estudis amb els lligands que contenen el fragment ametantrona es va optar per funcionalitzar la seqüència nativa de l'RNA amb fluoresceïna a l'extrem 5', i en el cas dels lligands que contenen el fragments heteroaromàtic Janus, es va substituir l'adenina de la regió del *bulge* de la seqüència mutada +3 per la 2-aminopurina.

### 1.3 Quantificació de la unió RNA-ligand. Determinació de l'afinitat dels lligands amb la diana d'RNA wt.

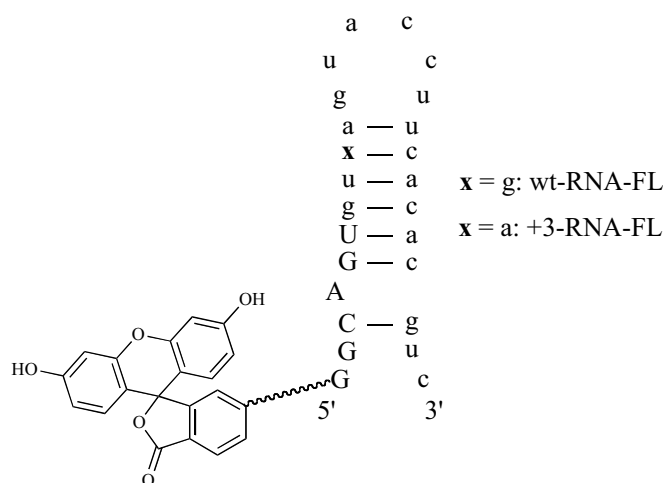
Generalment, tal com s'ha descrit en diversos estudis d'interacció entre l'RNA i molècules petites,<sup>13a,89</sup> per quantificar la unió del lligand a l'RNA cal escollir un model que permeti obtenir el corresponent valor d'afinitat aplicant l'equació matemàtica que més s'ajusti a diversos paràmetres termodinàmics, com ara l'estequiometria del complex o el tipus d'unió del lligand.<sup>90</sup> Ara bé, la principal limitació surgeix del fet d'haver de disposar prèviament d'informació sobre la interacció del lligand per tal d'escollir l'equació matemàtica més adequada. A més, el fet que lligands d'una mateixa família puguin interaccionar amb l'RNA distintament, pot provocar que aquest model no sigui vàlid per tots ells. És per això que per avaluar el grau d'afinitat d'un lligand amb la diana d'RNA, al nostre grup de recerca hem optat per determinar els valors d' $EC_{50}$ <sup>3</sup> que, en aquest context, fan referència a la concentració de lligand a la que l'emissió de fluorescència és el 50% de la inicial. En diferents treballs publicats a la bibliografia, els valors d' $EC_{50}$  es relacionen directament amb l'afinitat del lligand, de manera que com més petit sigui aquest valor, més afí es considera el compost.<sup>3,9,83</sup> Cal dir també que alguns autors comparen els valors d' $EC_{50}$  amb les constants de dissociació ( $K_D$ ).<sup>79b,82</sup> A partir d'aquests precedents, en aquesta tesi doctoral s'ha assimilat l'afinitat dels lligands als valors d' $EC_{50}$  que s'han extret de la corba sigmoïdal dosi-resposta (apartat 5.1.1 de Materials i Mètodes), construïda a partir de la variació de la intensitat de fluorescència a la longitud d'ona del màxim d'emissió del fluoròfor en funció del logaritme decimal de la concentració del lligand.

Als següents apartats s'exposen els resultats obtinguts amb els diferents lligands sintetitzats (**Taula 2**), tant els seleccionats als experiments de DCC com els de segona generació. Primerament, s'han agrupat els lligands que contenen el fragment ametantrona i, en un segon subapartat, els que contenen els residus heteroaromàtics Janus.

### 1.3.1 Afinitat dels lligands derivats de l'Ametantrona

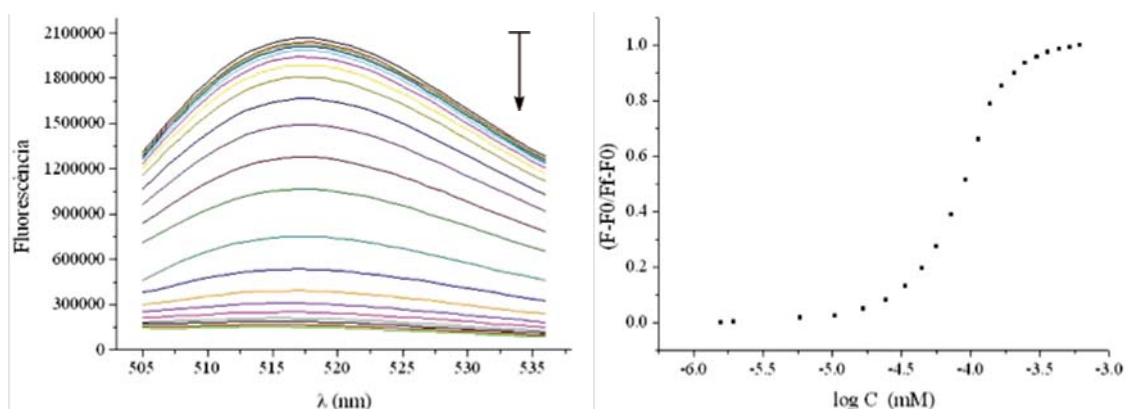
#### 1.3.1.1 Lligands seleccionats als experiments de DCC

Anteriorment, al nostre grup d'investigació s'havien optimitzat les condicions experimentals per determinar l'afinitat dels lligands a través de la fluorescència emesa per la fluoresceïna incorporada a l'extrem 5' de la seqüència nativa de l'RNA (wt-RNA-FL) (**Figura 100**).<sup>3</sup> Concretament, es va fixar la longitud d'ona d'emissió ( $\lambda_{em}$ ) a 517 nm i amb l'enregistrament de l'espectre d'excitació, es va determinar que la longitud d'ona d'excitació ( $\lambda_{exc}$ ) òptima era de 490 nm. A continuació, es va comprovar que en excitar a 490 nm la fluorescència dels lligands que contenen acridina no afectava a l'emissió de la fluoresceïna a 517 nm. A més, per evitar un solapament de les longituds d'ona d'emissió i excitació, es va optar per enregistrar l'espectre d'emissió de la fluoresceïna entre 500-540 nm, un rang prou allunyat de la  $\lambda_{exc}$  (490 nm).



**Figura 100.** Esquema de les seqüències nativa i mutada +3 funcionalitzades a l'extrem 5' amb el fluoròfor fluoresceïna.

A partir d'aquests antecedents, en primer lloc es va comprovar que en cap dels lligands derivats de l'ametantrona l'excitació a 490 nm no generava una emissió significativa. Un cop realitzada aquesta comprovació, es va quantificar l'afinitat dels lligands amb la seqüència nativa de l'RNA mitjançant valoracions de fluorescència (apartat 5.1 de Materials i Mètodes), a través de l'excitació d'una solució 25 nM de wt-RNA-FL en 10 mM de fosfat de sodi a pH 6.8, 100 mM de NaCl i 0.1 mM de Na<sub>2</sub>EDTA a 490 nm, i l'enregistrament de l'emissió entre 505 i 540 nm, tal com es mostra a la **Figura 101** per la valoració de wt-RNA-FL amb Amt-NeaC<sub>2</sub> (**44**).



**Figura 101.** Espectres d'emissió de fluorescència de wt-RNA-FL corresponents a la valoració amb quantitats creixents del lligand Amt-NeaC<sub>2</sub> (**44**) (0-614 nM) (esquerra); la intensitat de fluorescència disminueix a mesura que augmenta la concentració del lligand; la direcció de la fletxa indica la disminució de fluorescència. Representació gràfica de la fluorescència normalitzada a 517 nm respecte el logaritme decimal de la concentració del lligand Amt-NeaC<sub>2</sub> (mM) a cada punt de la valoració (dreta). F<sub>0</sub> correspon a la senyal de fluorescència inicial, F<sub>f</sub> a la fluorescència al final de la valoració, i F a la fluorescència observada en cada punt.

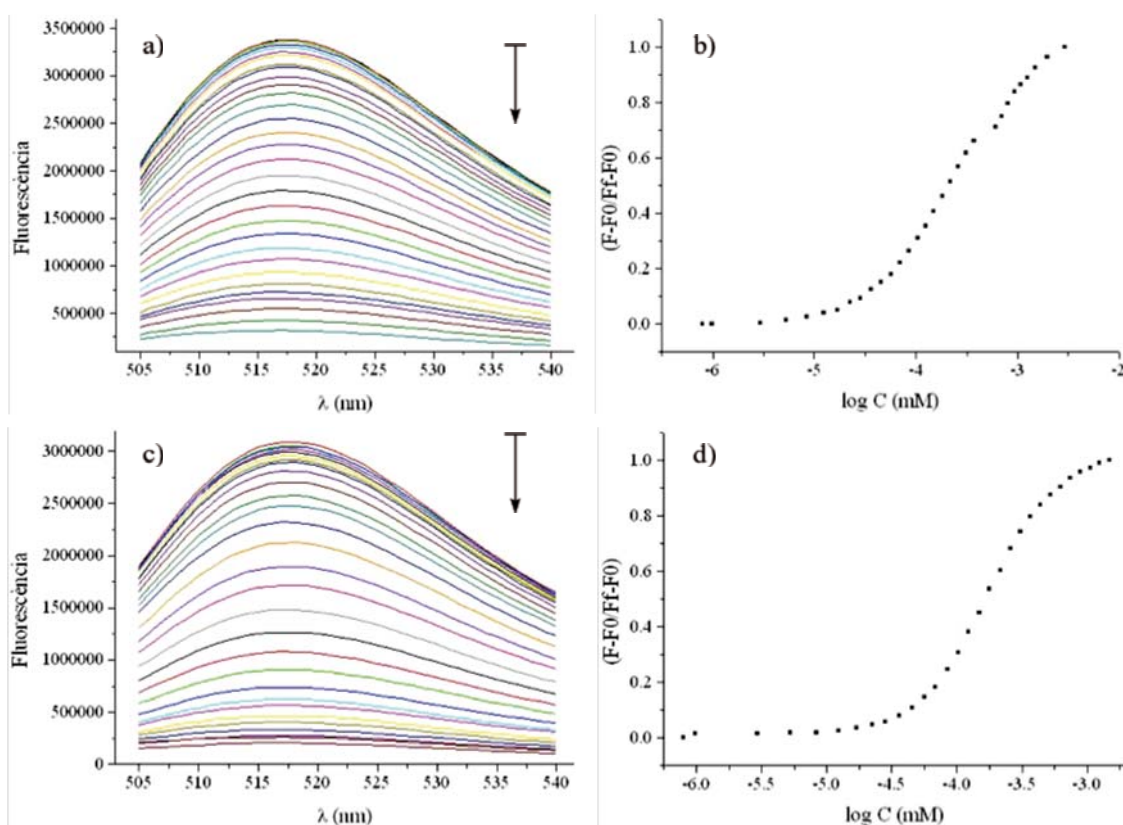
Amb aquest exemple es pot observar que la intensitat de fluorescència va disminuint a mesura que s'addiciona el lligand, i que es produeix el fenomen anomenat *quenching* fins que arriba un moment en que la intensitat de fluorescència es manté constant, que és quan la diana ha quedat saturada. En representar la fluorescència normalitzada a 517 nm (màxim d'emissió de la fluorescència per  $\lambda_{exc} = 490$  nm) en funció de la concentració del lligand, s'obté una gràfica sigmoïdal en la qual les zones o plats inferior i superior corresponen als valors inicials de fluorescència a concentracions baixes de lligand i a la saturació de la diana quan la fluorescència es manté constant, respectivament. Idealment, aquestes gràfiques acostumen a ser molt simètriques respecte a un punt mitjà, la concentració del qual equival al valor d'EC<sub>50</sub>.

A la **Taula 3**, es recullen els valors d'EC<sub>50</sub> dels cinc lligands seleccionats als experiments de DCC que contenen el fragment ametantrona (**44**, **45**, **46**, **51**, **52**), juntament amb els compostos control Ametantrona, Mitoxantrona i Neamina. Per facilitar la discussió s'han inclòs també els valors d'afinitat dels lligands Acridina-Neamina (AcrOMe-Nea), prèviament determinats al nostre grup d'investigació.<sup>3</sup>

Lligand	EC <sub>50</sub> (nM)	Lligand	EC <sub>50</sub> (nM)
Amt-NeaC <sub>2</sub> ( <b>44</b> )	70.6	Ametantrona (Amt)	231.8
Amt-NeaC <sub>6</sub> ( <b>45</b> )	78.8	Mitoxantrona (Mtx)	168.8
Amt-Azq ( <b>46</b> )	162.5	Neamina (Nea)	3.1·10 <sup>6</sup>
Amt-JApept ( <b>51</b> )	288.5	AcrOMe-NeaC <sub>2</sub> *	2.1·10 <sup>3</sup>
Amt-JBpept ( <b>52</b> )	318.2	AcrOMe-NeaC <sub>6</sub> *	5.9·10 <sup>3</sup>

**Taula 3.** Valors d'EC<sub>50</sub> dels lligands derivats de l'ametrantrona determinats amb el 5'-fluoresceïnil-wt RNA, i també dels lligands acridina-neamina (\*), prèviament sintetitzats al nostre grup de recerca.<sup>3</sup>

En primer lloc, podem destacar la lleugera disminució de l'afinitat amb l'RNA diana del compost ametrantrona (231.8 nM) respecte a mitoxantrona (168.8 nM) (**Figura 102**), fet esperable segons les dades descrites prèviament per Varani i col·laboradors,<sup>2,9</sup> en les quals es posa de manifest el paper poc rellevant dels hidroxils fenòlics de Mtx a la interacció amb l'RNA.



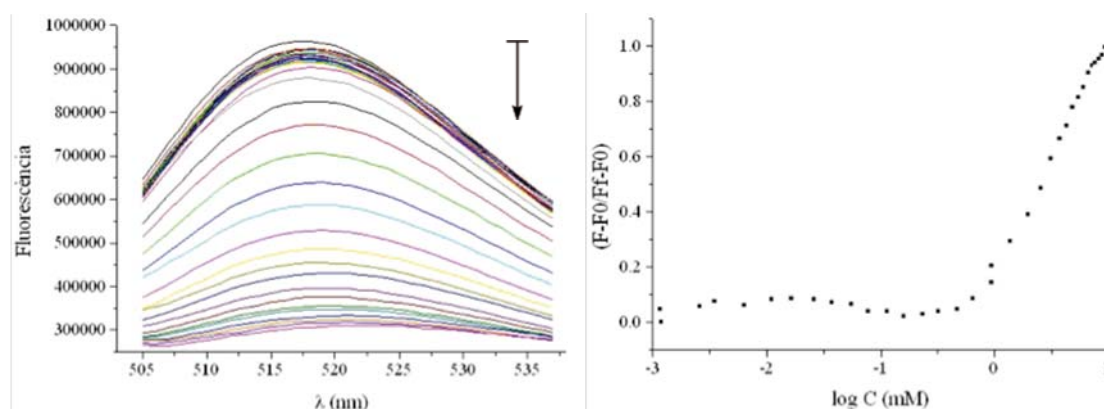
**Figura 102.** Espectres d'emissió de fluorescència de wt-RNA-FL (25 nM) amb Amt (0-2.96 μM) (a) i Mtx (0-1.59 μM) (c); la direcció de la fletxa indica la disminució de fluorescència. Representació gràfica de la fluorescència normalitzada a 517 nm respecte el logaritme decimal de la concentració (mM) d'Amt (b) i Mtx (d).

En segon lloc, si comparem els valors d'EC<sub>50</sub> dels lligands Amt-NeaC<sub>2</sub> (**44**) i Amt-NeaC<sub>6</sub> (**45**) amb els lligands acridina-neamina, prèviament descrits al nostre grup

(AcrOMe-NeaC<sub>2</sub> i AcrOMe-NeaC<sub>6</sub>),<sup>3</sup> podem observar que l'afinitat d'aquests últims queda clarament superada pels lligands que incorporen el fragment ametantrona. Per tant, la combinació ametantrona i neamina no només genera compostos molt més afins (70-80 nM) respecte els compostos acridina-neamina (2-6 µM), sinó també respecte Amt i Mtx.

Tal com ja s'ha comentat anteriorment, l'estudi estructural publicat per Varani i col·laboradors<sup>2</sup> descriu que Mtx s'intercala preferentment a la regió del *bulge* d'adenina entre dos parells de bases G-C de l'estructura *stem-loop* de l'RNA de tau. Si assumim que Amt i els seus derivats actuen de forma similar a com ho fa Mtx, a més de la intercalació de l'anell antraquinònic dels lligands Amt-Nea, la gran flexibilitat conformacional i la capacitat del fragment aminoglicosídic per formar interaccions pont d'hidrogen i electrostàtiques serien les responsables de triplicar l'afinitat d'Amt. Aquest raonament queda reforçat amb el fet que la neamina (**Figura 103**) per si sola mostra una afinitat molt més baixa (3.1 mM), fet esperable tenint en compte que les interaccions per intercalació són molt més fortes que les electrostàtiques.

També és interessant destacar que el lligand Amt-Nea amb l'espaiador més curt és lleugerament més afí que el que conté el de major longitud (EC<sub>50</sub> = 70.6 nM per Amt-NeaC<sub>2</sub> contra EC<sub>50</sub> = 78.8 nM per Amt-NeaC<sub>6</sub>), fet que suggereix que una menor llibertat conformacional condueix a una interacció més favorable i forta a prop del lloc d'unió.



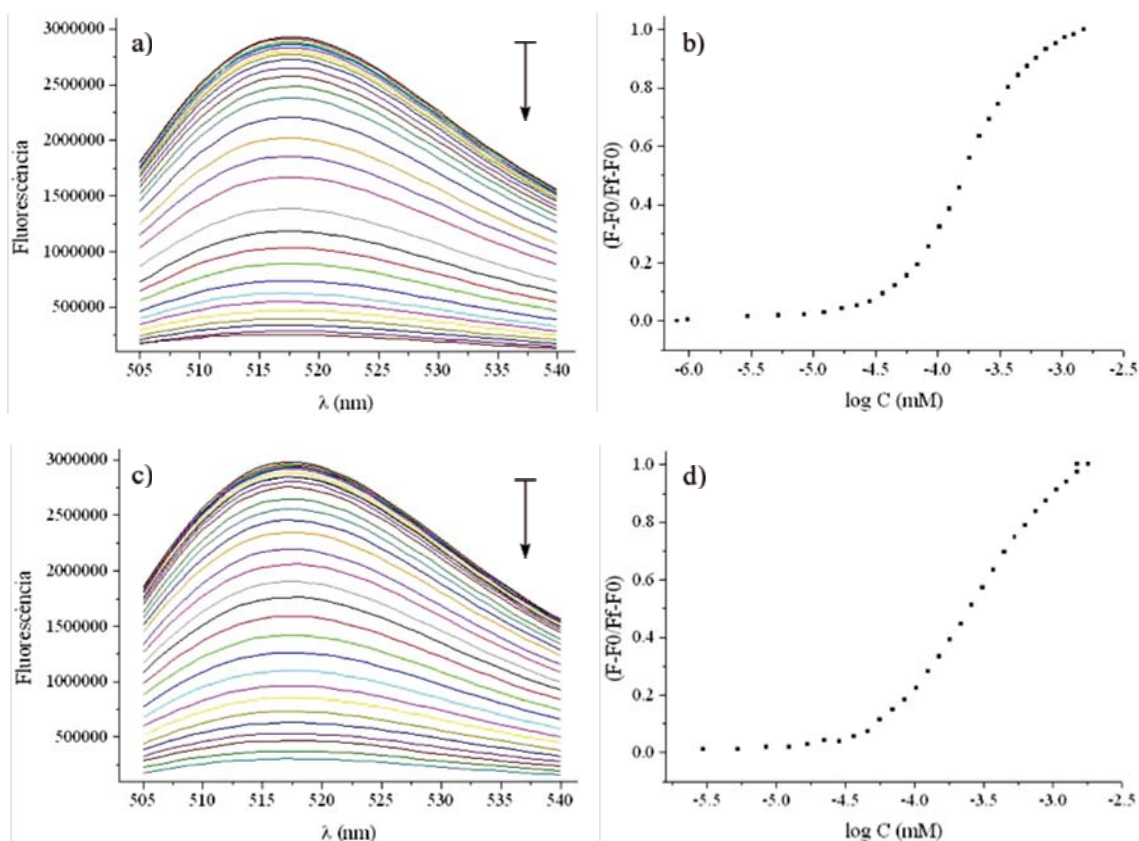
**Figura 103.** Espectres d'emissió de fluorescència de wt-RNA-FL (5 nM) amb Neamina (0-10.5 mM) (esquerra); la direcció de la fletxa indica la disminució de fluorescència. Representació gràfica de la fluorescència normalitzada a 517 nm respecte el logaritme decimal de la concentració de Neamina (mM) (dreta).

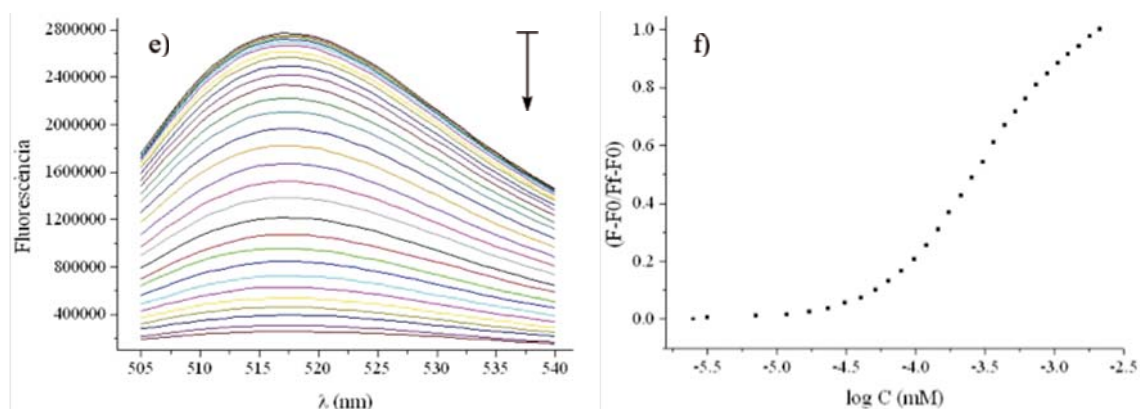
En aquest punt, cal remarcar també la bona correlació entre els valors d'EC<sub>50</sub> dels lligands Amt-Nea i AcrOMe-Nea, i els resultats dels experiments de DCC. Per exemple, a l'experiment on hi participen els monòmers tiol de l'acridina i de l'ametantrona, juntament amb els dos derivats tiol de la neamina (apartat 2.2.1 del capítol 1), l'amplificació dels lligands Amt-Nea és molt més gran que la dels compostos basats en la combinació AcrOMe-Nea (unes 13 i 35 vegades per Amt-NeaC<sub>2</sub> i Amt-NeaC<sub>6</sub>, respecte AcrOMe-NeaC<sub>2</sub> i AcrOMe-NeaC<sub>6</sub>, respectivament), amb la qual cosa, a més de comprovar-se que els compostos més amplificats en DCC són els més afins,<sup>3,46a,46c,48</sup> es



confirma la major capacitat d'interacció de l'ametranona amb l'estructura *stem-loop* de l'RNA diana respecte l'acridina.

Per altra banda, als valors d' $EC_{50}$  recollits a la **Taula 3** també indiquen que la combinació d'Amt amb molècules heteroaromàtiques que puguin reconèixer parells G-U (Janus) o una adenina desaparellada (Azq), condueix a lligands amb menor afinitat respecte la combinació amb neamina, fet que indica que les interaccions electrostàtiques de l'aminoglicòsid amb l'RNA són molt més fortes que les que puguin establir les molècules azaquinolona o Janus. En aquest context, és interessant destacar que el valor d' $EC_{50}$  del monòmer Amt és lleugerament inferior al dels lligands Amt-JApept i Amt-JBpept. En canvi, la unió entre Amt i Azq genera un compost una mica més afí que Amt (al voltant d'1.4 vegades major). En aquest cas, també és possible establir un cert paral·lelisme entre aquests valors d'afinitat i les amplificacions de l'experiment de DCC realitzat amb els monòmers tiol Janus, Azq i Amt (apartat 2.2.3 del capítol 1), ja que els percentatges d'amplificació del lligand Amt-Azq (~ 85%), Amt-JApept (~ 66%) i Amt-JBpept (~ 66%) segueixen la mateixa tendència observada als valors d'afinitat, ja que Amt-Azq ( $EC_{50} = 162.5$  nM) és una mica més afí que Amt-JApept ( $EC_{50} = 288.5$  nM) i Amt-JBpept ( $EC_{50} = 318.2$  nM), on aquests últims tenen una afinitat del mateix ordre (**Figura 104**).





**Figura 104.** Espectres d'emissió de fluorescència de wt-RNA-FL (25 nM) amb Amt-Azq (0-1.50  $\mu$ M) (a), Amt-JApept (0-2.61  $\mu$ M) (b) i Amt-JBpept (0-2.61  $\mu$ M) (c); la direcció de la fletxa indica la disminució de fluorescència. Representació gràfica de la fluorescència normalitzada a 517 nm respecte el logaritme decimal de la concentració (mM) d'Amt-Azq (b), d'Amt-JApept (d) i d'Amt-JBpept (f).

Així doncs, globalment els valors d' $EC_{50}$  (**Taula 3**) confirmen la tendència general observada als experiments de DCC i demostren el potencial d'aquesta metodologia per identificar lligands d'estructures d'àcids nucleics, tal com s'ha comentat a la Introducció (apartat 1.3.4.2). En aquest cas, la combinació del fragment ametantrona amb altres unitats moleculars ha permès identificar 5 nous lligands de l'RNA diana amb una afinitat de l'ordre nanomolar, dels quals els compostos basats en la combinació Amt-Nea són els més prometedors. A més, tal com es pot observar als diferents espectres d'emissió, l'obtenció d'un perfil de corba de fluorescència únic,<sup>74a</sup> on la intensitat va disminuint progressivament a mesura que augmenta la concentració de lligand, suggereix que aquests lligands interaccionen amb l'RNA d'una única forma.

### 1.3.1.2 Lligands derivats de l'ametantrona de segona generació

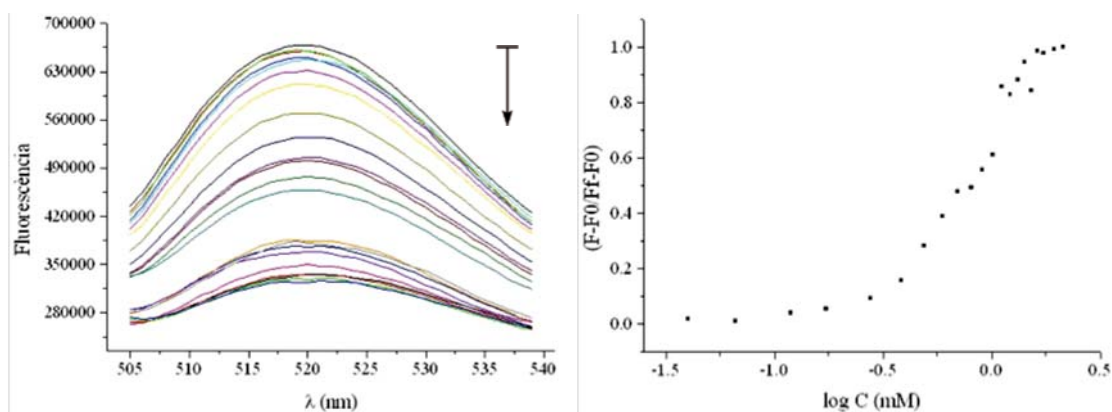
En una segona fase es va avaluar l'afinitat dels lligands anomenats de segona generació, en els quals, d'una banda, s'havien substituït els grups amino del fragment aminoglicosídic per grups guanidini i, de l'altra, s'havia derivatitzat el segon braç de l'anell antraquinònic de l'ametantrona amb una segona molècula de neamina o d'azaquinolona.

A continuació, a les **Taules 4 i 5** es recullen els valors d' $EC_{50}$  d'aquests compostos, conjuntament amb els dels seus lligands originals per facilitar la discussió.

Lligand	EC <sub>50</sub> (nM)	Lligand	EC <sub>50</sub> (nM)
Amt-NeaC <sub>2</sub> ( <b>44</b> )	70.6	Neamina (Nea)	3.1·10 <sup>6</sup>
Amt-NeaC <sub>2</sub> G <sub>4</sub> ( <b>61</b> )	57.2	NeaminaG <sub>4</sub> (NeaG <sub>4</sub> )	0,83·10 <sup>6</sup>
Amt-NeaC <sub>6</sub> ( <b>45</b> )	78.8	AcrOMe-NeaC <sub>2</sub> G <sub>4</sub> <sup>*</sup>	3.6·10 <sup>3</sup>
Amt-NeaC <sub>6</sub> G <sub>4</sub> ( <b>62</b> )	94.5	AcrOMe-NeaC <sub>6</sub> G <sub>4</sub> <sup>*</sup>	2.4·10 <sup>3</sup>

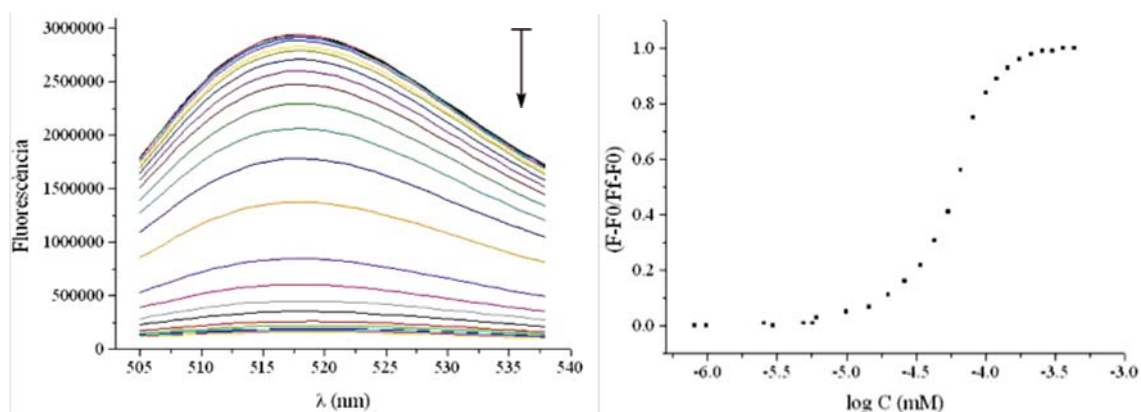
**Taula 4.** Valors d'EC<sub>50</sub> dels lligands guanidinitats derivats de l'ametrantrona determinats amb el 5'-fluoresceïnil-wt RNA i també dels lligands acridina-guanidinoneamina (\*), prèviament sintetitzats al nostre grup de recerca.<sup>3b</sup>

En general, tal com s'ha comentat anteriorment (apartat 3.2.1 del capítol 1), la guanidinitació d'aminoglicòsids té un efecte positiu en l'afinitat d'aquests compostos amb l'RNA a causa de la major basicitat dels grups guanidini i de l'augment de la direccionalitat dels enllaços d'hidrogen que es formen en interaccionar-hi.<sup>57,58</sup> En el nostre cas (**Taula 4**), la guanidinitació de l'aminoglicòsid neamina també ha tingut un efecte positiu (**Figura 105**), ja que el valor d'afinitat del compost resultant (guanidinoneamina) pràcticament duplica (EC<sub>50</sub> = 0.83 mM) el del seu antecessor no guanidinitat (EC<sub>50</sub> = 3.1 mM).



**Figura 105.** Espectres d'emissió de fluorescència de wt-RNA-FL (5 nM) amb NeaG<sub>4</sub> (0-2.14 mM) (esquerra); la direcció de la fletxa indica la disminució de la fluorescència. Representació gràfica de la fluorescència normalitzada a 517 nm respecte el logaritme decimal de la concentració (mM) (dreta).

Ara bé, aquesta tendència no s'ha confirmat als lligands basats en la combinació ametrantrona-neamina, ja que la guanidinitació ha tingut un efecte oposat en funció de la longitud de l'espaiador que separa ambdós fragments. D'aquesta manera, la guanidinitació d'Amt-NeaC<sub>2</sub> ha originat un compost més afí (EC<sub>50</sub> = 57.2 nM per Amt-NeaC<sub>2</sub>G<sub>4</sub>) (**Figura 106**), mentre que en el cas d'Amt-NeaC<sub>6</sub> ha conduït a una disminució de l'afinitat (EC<sub>50</sub> = 94.5 nM per Amt-NeaC<sub>6</sub>G<sub>4</sub>).



**Figura 106.** Espectres d'emissió de fluorescència de wt-RNA-FL (25 nM) amb Amt-NeaC<sub>2</sub>G<sub>4</sub> (0-335 nM) (esquerra); la direcció de la fletxa indica la disminució de la fluorescència. Representació gràfica de la fluorescència normalitzada a 517 nm respecte el logaritme decimal de la concentració (mM) (dreta).

Aquests resultats, aparentment contradictoris, es podrien atribuir a la major llibertat conformacional d'Amt-NeaC<sub>6</sub>G<sub>4</sub>, que dificultaria que el fragment guanidinoneamina establís les interaccions més favorables amb l'RNA. En canvi, al lligand amb l'espaiador més curt, Amt-NeaC<sub>2</sub>G<sub>4</sub>, i, per tant, amb menys llibertat conformacional, l'allotjament del fragment heteroaromàtic podria fixar el guanidinoglicòsid en un lloc d'unió més adient. Cal afegir, però, que aquesta tendència es contraposa amb els resultats anteriors del nostre grup d'investigació,<sup>3b</sup> on s'havia observat que la guanidinilació dels lligands acridina-neamina amb l'espaiador més curt tenien un efecte negatiu a l'afinitat ( $EC_{50} = 2.1 \mu\text{M}$  per AcrOMe-NeaC<sub>2</sub> respecte  $EC_{50} = 3.6 \mu\text{M}$  per AcrOMe-NeaC<sub>2</sub>G<sub>4</sub>) en oposició als de major longitud ( $EC_{50} = 5.9 \mu\text{M}$  de Amt-NeaC<sub>6</sub> respecte  $EC_{50} = 2.4 \mu\text{M}$  de Amt-NeaC<sub>6</sub>G<sub>4</sub>). En aquest cas, l'efecte negatiu de la guanidinilació suggereix que la introducció dels quatre grups guanidini podria generar al lligand AcrOMe-NeaC<sub>2</sub> un impediment estèric més gran que ocasionaria la pèrdua d'afinitat.

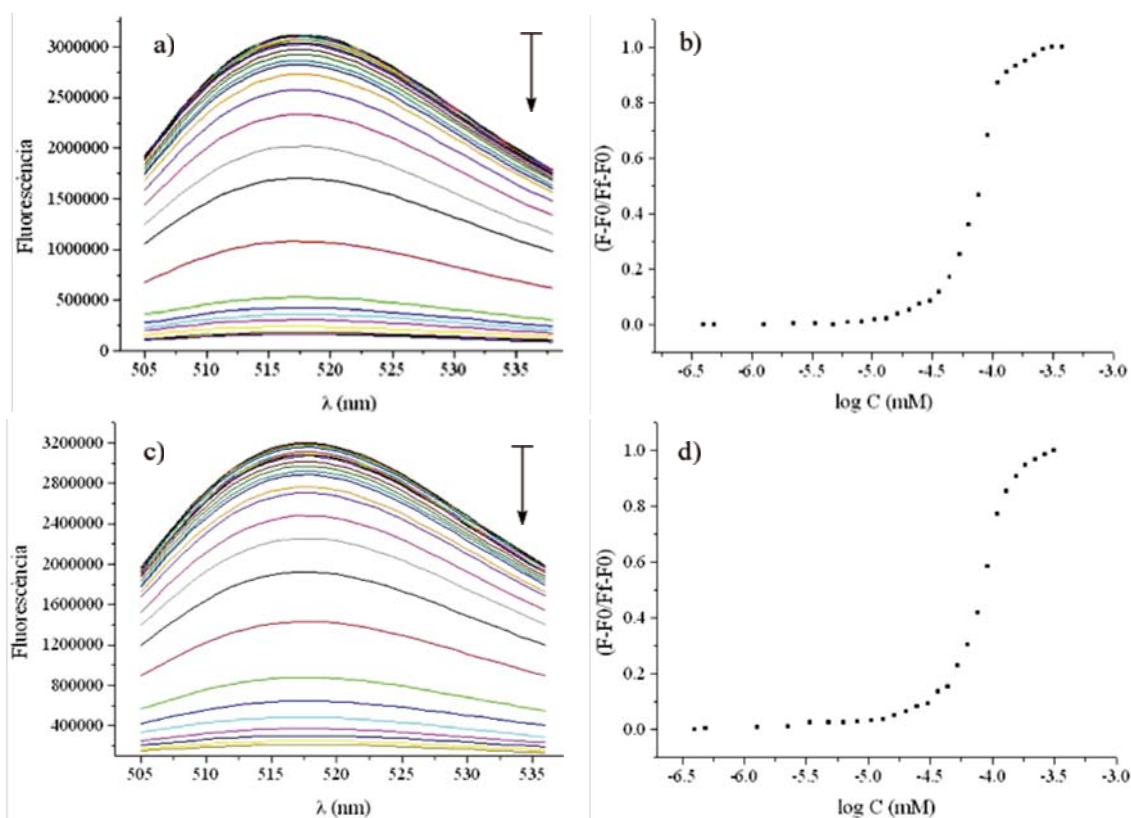
Per altra banda, a la **Taula 5**, es mostren els valors d' $EC_{50}$  obtinguts amb els lligands de segona generació on s'ha derivatitzat el segon braç de l'anell antraquinònic del lligand Amt-NeaC<sub>2</sub> a través de la incorporació d'una segona molècula de neamina (Amt-NeaC<sub>2</sub>,NeaC<sub>2</sub>), o de l'heterocicle azaquinolona amb capacitat per reconèixer l'adenina desparellada del *bulge* (Amt-NeaC<sub>2</sub>,Azq).

Lligand	$EC_{50}$ (nM)	Lligand	$EC_{50}$ (nM)
Amt-NeaC <sub>2</sub> ,NeaC <sub>2</sub> ( <b>64</b> )	76.2	Amt-NeaC <sub>2</sub> ( <b>44</b> )	70.6
Amt-NeaC <sub>2</sub> ,Azq ( <b>66</b> )	84.5	Amt-Azq ( <b>46</b> )	162.5

**Taula 5.** Valors d' $EC_{50}$  dels lligands derivats de l'ametantona de segona generació determinats amb el 5'-fluoresceïnil-wt RNA

En el cas del lligand Amt-NeaC<sub>2</sub>,Azq, l'efecte produït en l'afinitat a causa de la doble funcionalització depèn de si es compara amb Amt-NeaC<sub>2</sub> o amb Amt-Azq. Així, per

exemple, aquest nou lligand és el doble d'afi ( $EC_{50} = 84.5$  nM) que Amt-Azq (162.5 nM), fet atribuïble a les interaccions favorables de l'aminoglicòsid. En canvi, si es compara amb el valor d' $EC_{50}$  d'Amt-NeaC<sub>2</sub>, podem apreciar una lleugera disminució de l'afinitat, probablement com a conseqüència de l'impediment estèric generat per la derivatització del segon braç amb el residu heteroaromàtic. Tot i això, el fet que la introducció de l'azaquinolona al segon braç capaciti el lligand per reconèixer específicament l'adenina del *bulge*, obre la porta a l'obtenció de lligands molt més específics (Figura 107).



**Figura 107.** Espectres d'emissió de fluorescència de wt-RNA-FL (25 nM) amb Amt-NeaC<sub>2</sub>,NeaC<sub>2</sub> (0-374 nM) (a) i Amt-NeaC<sub>2</sub>,Azq (0-313 nM) (c); la direcció de la fletxa indica la disminució de la fluorescència. Representació gràfica de la fluorescència normalitzada a 517 nm respecte el logaritme decimal de la concentració (mM) d'Amt-NeaC<sub>2</sub>,NeaC<sub>2</sub> (b) i Amt-NeaC<sub>2</sub>,Azq (d).

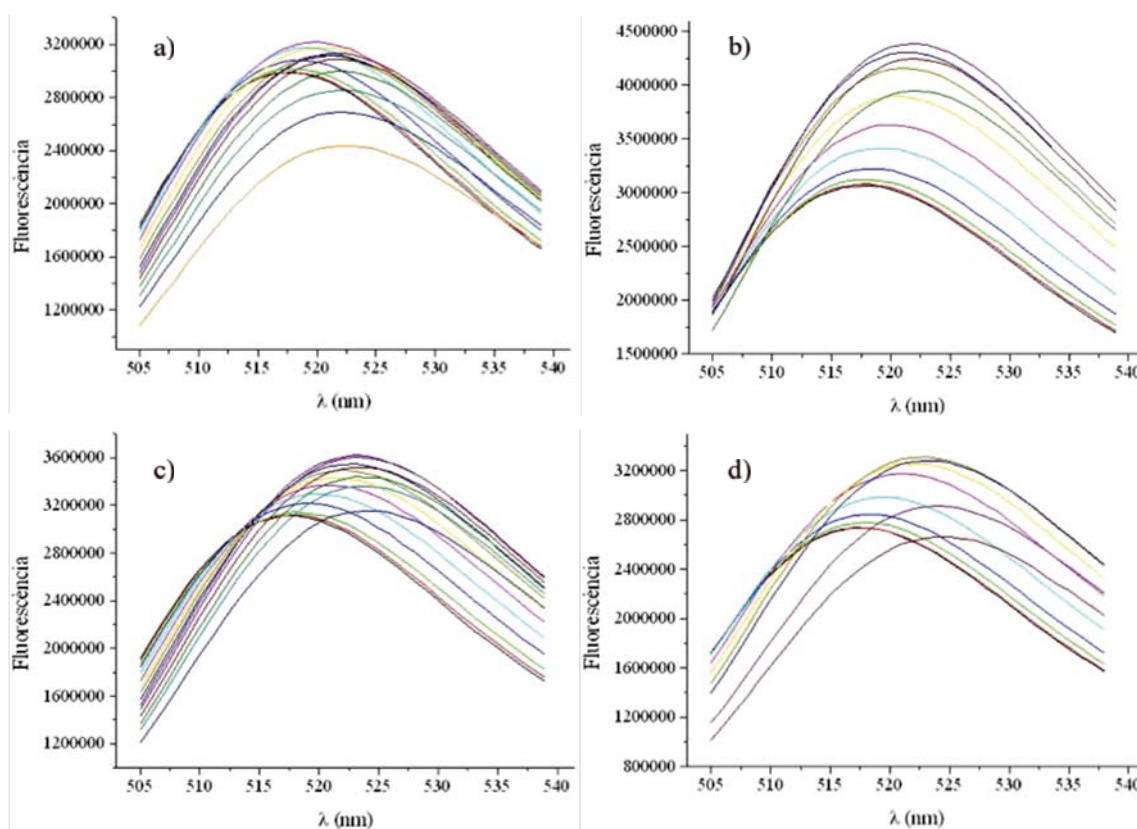
Per últim, el valor d' $EC_{50}$  d'Amt-NeaC<sub>2</sub>,NeaC<sub>2</sub> (76.2 nM) sembla indicar que la introducció d'una segona molècula de neamina provoca una lleugera disminució a l'afinitat del lligand amb l'RNA diana. Com es comentarà més endavant (apartat 3.2.2 del present capítol), l'estudi per RMN ha revelat que en aquest cas les dues neamines semblen modificar el lloc d'unió del lligand original (Amt-NeaC<sub>2</sub>), de manera que hi haurien dos llocs d'unió que competirien amb una afinitat diferent i, per tant, el valor d' $EC_{50}$  hauria de ser un valor promig.



### 1.3.2 Afinitat dels lligands Janus-Neamina/Guanidinoneamina

#### 1.3.2.1 Valoracions de fluorescència amb l'RNA marcat amb fluoresceïna

Per a la determinació de l'afinitat dels lligands basats en la combinació dels fragments Janus A i Janus B amb neamina, inicialment es va emprar l'RNA derivatitzat a l'extrem 5' amb fluoresceïna seguint la metodologia emprada a l'apartat anterior. En primer lloc, un cop comprovat que cap dels quatre lligands tenia una intensitat de fluorescència significativa en excitar a 490 nm, es va procedir a fer la valoració amb una solució 25 nM de wt-RNA-5'FL en 10 mM de fosfat de sodi a pH 6.8, 100 mM de NaCl i 0.1 mM de Na<sub>2</sub>EDTA, i es va enregistrar l'emissió entre 505 i 540 nm. En una primera prova, on es va valorar l'RNA amb els lligands JApept-NeaC<sub>2</sub> i JBpept-NeaC<sub>2</sub>, es va observar que en augmentar la quantitat de lligand es produïa un desplaçament del màxim d'emissió i un increment de la intensitat de fluorescència; posteriorment, la intensitat del senyal d'emissió començava a disminuir a la longitud d'ona del nou màxim. En el cas de JApept-NeaC<sub>2</sub> el desplaçament va ser de 517 nm a 522 nm fins a l'addició d'un total de 500 eq de lligand, mentre que per JBpept-NeaC<sub>2</sub> va ser de 517 nm a 524 nm i el senyal no va disminuir fins a una addició d'un total de 1000 eq de lligand.

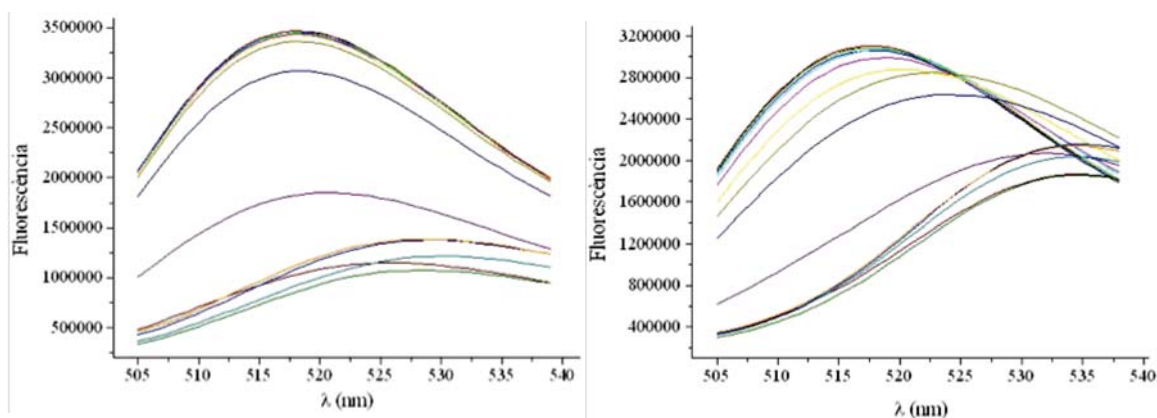


**Figura 108.** Espectres d'emissió de fluorescència de wt-RNA-FL (25 nM) amb: a) JApept-NeaC<sub>2</sub> (0-11.9 μM), b) JApept-NeaC<sub>6</sub> (0-1.26 mM), c) JBpept-NeaC<sub>2</sub> (0-632.4 μM) i d) JBpept-NeaC<sub>6</sub> (0-316.5 μM).

Posteriorment, aquest comportament també es va reproduir als lligands amb l'espaiador més llarg. A JApept-NeaC<sub>6</sub> el màxim es va desplaçar de 517 nm a 522 nm, un cop addicionats fins a un total de 640 eq; i en el cas de JBpept-NeaC<sub>6</sub>, el desplaçament va

ser de 517 nm a 525 nm, un cop assolits els 320 eq (**Figura 108**). Aquesta tendència, comuna als dos tipus de molècules Janus, es pot atribuir al fet que el lligand interacciona amb l'RNA a través de varis llocs d'unió, o bé que ho fa directament amb la fluoresceïna.<sup>72,74a</sup>

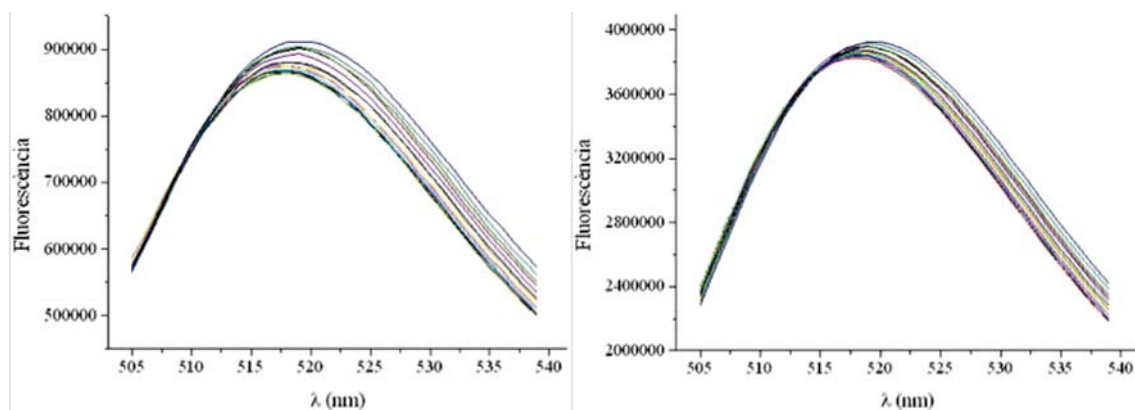
En aquest punt, es va decidir comprovar si aquesta alteració de fluorescència de la fluoresceïna era atribuïble a la combinació Janus-Nea o només a la del derivat Janus, amb la qual cosa es va considerar oportú realitzar les valoracions amb els compostos JApept-JApept i JBpept-JBpept. Els resultats corresponents van mostrar en tots dos lligands una tendència similar a l'observada amb els compostos Janus-Neamina, però en aquest cas el desplaçament dels màxims d'emissió va ser més pronunciat. Per exemple, en el cas de l'homodímer Janus A, el màxim es va desplaçar de 517 nm fins a 529 nm (12 nm respecte als 5 nm de JanusA-Nea); i al de Janus B, dels 517 nm fins als 534 nm (17 nm respecte als 7-8 nm de JanusB-Nea). També cal comentar que un cop assolit aquest nou màxim d'emissió, la intensitat de fluorescència no va començar a disminuir fins després d'haver addicionat un total de 630 eq i 950 eq dels lligands JApept-JApept i JBpept-JBpept, respectivament (**Figura 109**).



**Figura 109.** Espectres d'emissió de fluorescència de wt-RNA-FL (25 nM) amb: a) JApept-JApept (0-19.7 μM) i b) JBpept-JBpept ((0-27.6 μM).

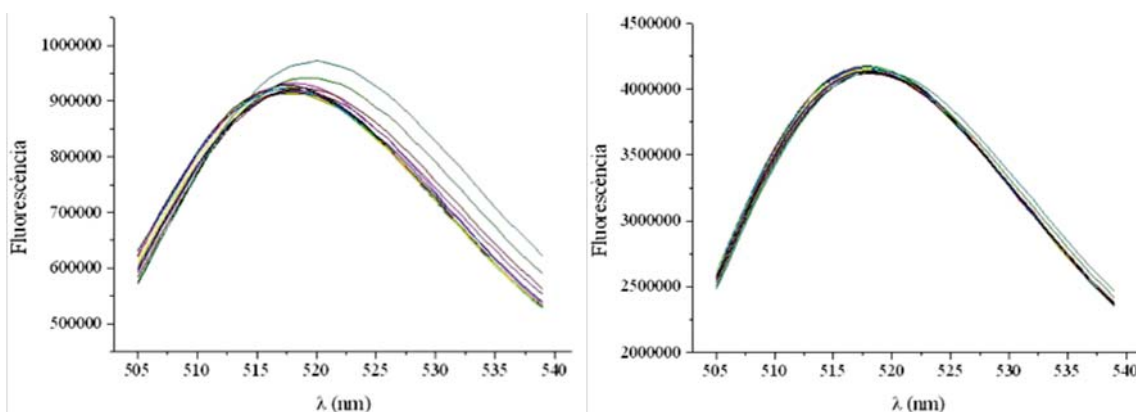
Davant d'aquests resultats, es va optar per repetir la valoració del compost JApept-NeaC<sub>2</sub> amb la diana wt-RNA-FL i amb +3-RNA-FL (**Figura 110**), aprofitant que es disposava d'aquest darrer oligoribonucleòtid.<sup>3</sup> També es va plantejar reduir fins a la meitat la concentració de ions sodi del medi (50 mM NaCl), ja que, tal com s'exposarà més endavant (apartat 2.2.1.3b del present capítol), s'havia observat en altres lligands un augment de l'estabilització de la seqüència mutada +3 en aquestes condicions.

Com es pot apreciar a la **Figura 110**, similarment a com ja s'havia observat anteriorment a una concentració 100 mM de NaCl, a mesura que la quantitat de lligand augmenta, la intensitat del senyal d'emissió també ho fa i el màxim es desplaça, tant al cas de la diana nativa com al de la mutada +3.



**Figura 110.** Espectres d'emissió de fluorescència corresponents a la valoració de JApept-NeaC<sub>2</sub> (0-3.6 μM) amb wt-RNA-FL (5 nM) (esquerra) i +3-RNA-FL (dreta).

Davant d'aquesta situació, per no malgastar més lligand, es va decidir no continuar la valoració i es va repetir el mateix experiment amb el lligand guanidinilat JApept-NeaC<sub>2</sub>G<sub>4</sub>, per veure l'efecte dels grups guanidini (**Figura 111**).



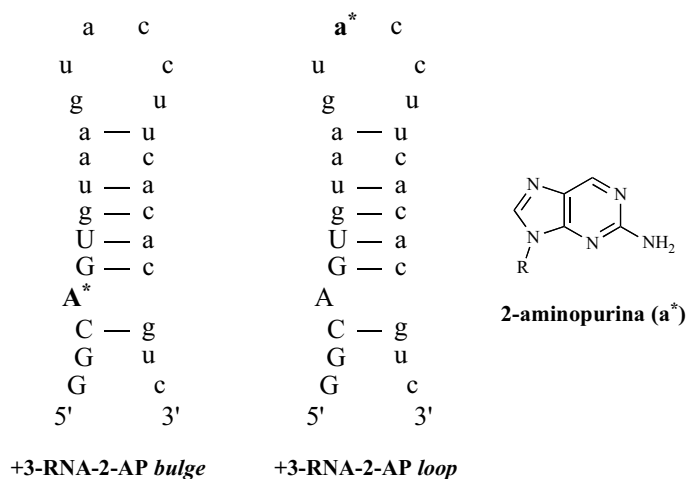
**Figura 111.** Espectres d'emissió de fluorescència corresponents a la valoració de JApept-NeaC<sub>6</sub>G<sub>4</sub> (0-52.1 μM) amb wt-RNA-FL (5 nM) (esquerra) i +3-RNA-FL (dreta).

Tot i la presència dels grups guanidini, es va observar el mateix comportament global, malgrat que en el cas de la seqüència mutada +3 els canvis van ser menys pronunciats. Per tant, tenint en compte els resultats de tots aquests experiments, podem concloure que aquest fluoròfor no és adequat per avaluar l'afinitat dels lligands Janus-Neamina. Ara bé, si es compara aquesta tendència amb l'observada pels compostos derivats d'Amt, sembla ser que la interacció d'aquests lligands ocasiona canvis conformacionals a l'RNA que alteren el comportament de la fluoresceïna, fet que fa impossible ajustar les dades de fluorescència a una corba sigmoïdal que permeti determinar un valor fiable d'EC<sub>50</sub>.



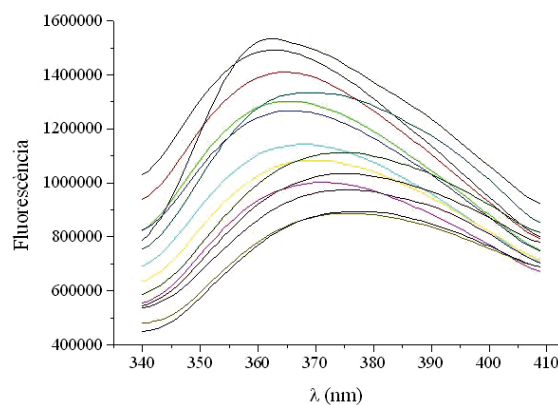
### 1.3.2.2 Valoracions de fluorescència amb l'RNA marcat amb 2-aminopurina

Com a alternativa a la fluoresceïna, es va optar per l'ús de la 2-aminopurina (2-AP) en substitució d'una de les adenines de la seqüència, tal com s'ha descrit amb altres dianes d'RNA.<sup>13b,72,80</sup> Atès que anteriorment al nostre grup d'investigació s'havia sintetitzat la seqüència mutada +3<sup>c</sup> amb l'adenina del *bulge* o la del *loop* substituïdes per aquest fluoròfor (**Figura 112**), es va plantejar dur a terme les valoracions de fluorescència amb aquests dos oligoribonucleòtids.



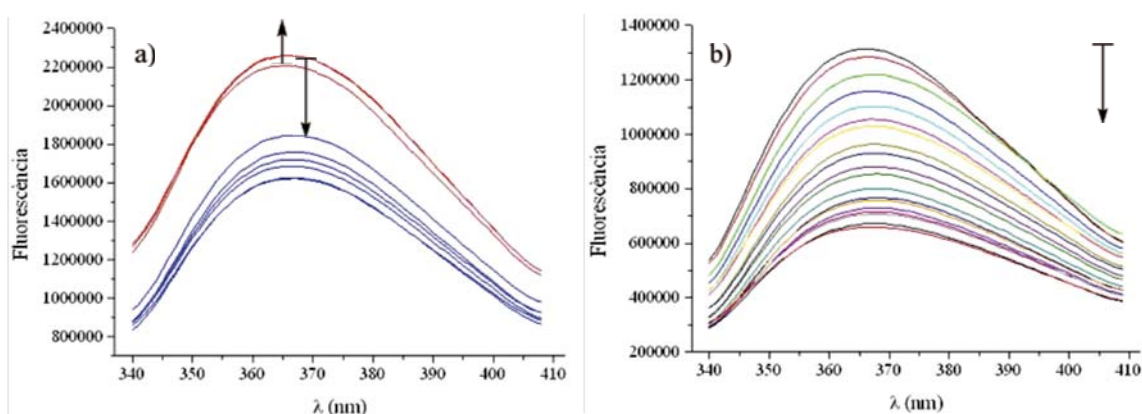
**Figura 112.** Esquema de la seqüència mutada +3 funcionalitzada amb 2-aminopurina (2-AP) a la regió del *bulge* (esquerra) i al *loop* (dreta).

Experimentalment, el canvi de fluoròfor implica trobar les condicions d'excitació i d'emissió adequades (apartat 5.1.1.2 de Materials i Mètodes). Un cop optimitzades, les valoracions de fluorescència de la seqüència mutada +3 marcada amb 2-AP, en presència dels lligands Janus-Nea, es van dur a terme mitjançant l'ús d'una solució 83 nM de +3-RNA-2-AP en 10 mM de fosfat de sodi a pH 6.8, 50 mM de NaCl i 0.1 mM de Na<sub>2</sub>EDTA, excitant a  $\lambda_{exc} = 290$  nm en un rang d'emissió de 340 a 410 nm. Malauradament, els lligands amb el fragment Janus A van mostrar una gran emissió de fluorescència en aquesta longitud d'ona d'excitació, fet que distorsionava la fluorescència del fluoròfor i, per tant, impedia la construcció d'una gràfica dosi-resposta adequada. Per exemple, la valoració amb el lligand JApept-NeaC<sub>2</sub> (**Figura 113**), a més de disminuir inicialment la intensitat de fluorescència, també es va produir un desplaçament del màxim d'emissió cap a longituds d'ona més grans (de 363 nm a 370 nm). Posteriorment, en presència d'1.5 eq de lligand la intensitat de fluorescència va augmentar i el màxim d'emissió es va tornar a desplaçar cap a longituds d'ona més petites (366 nm). Atès que a concentracions elevades de lligand la seva pròpia fluorescència emmascara la del fluoròfor, no va ser possible determinar cap valor d'EC<sub>50</sub> pels lligands JApept-Nea.



**Figura 113.** Espectres d'emissió de fluorescència corresponents a la valoració de JApept-NeaC<sub>2</sub> (0-1.1 μM) amb +3-RNA, on la 2-AP està localitzada a la regió del *bulge* (83 nM).

En canvi, pels lligands amb el fragment Janus B no vam trobar aquesta problemàtica. Primerament, es van dur a terme en paral·lel les valoracions entre els lligands JBpept-NeaC<sub>2</sub> i JBpept-NeaC<sub>6</sub>, i les seqüències +3-RNA amb l'aminopurina a la regió del *bulge* o al *loop*, per tal de determinar si el valor d'afinitat variava en funció de la posició del fluoròfor a l'RNA. La representació de la fluorescència normalitzada a 365 nm en funció de la concentració va permetre obtenir els corresponents valors d'EC<sub>50</sub>. Sorprenentment, l'afinitat de JBpept-NeaC<sub>6</sub> amb la seqüència d'RNA modificada amb 2-AP al *bulge* era de l'ordre de 5 vegades més petita (EC<sub>50</sub> = 1.53 μM) que l'obtinguda amb la seqüència modificada al *loop* (EC<sub>50</sub> = 296.7 nM). A més, tal com es pot apreciar a la **Figura 114**, mentre que als espectres d'emissió de +3-RNA-2-AP *loop* se seguia una tendència única, on la intensitat del senyal d'emissió disminuïa progressivament, a la seqüència +3-RNA-2-AP *bulge*, inicialment augmentava fins que, en presència de 0.75 eq de lligand, tornava a disminuir. En el cas del lligand JBpept-NeaC<sub>2</sub> també es va observar la mateixa tendència i l'afinitat amb l'RNA modificat al *loop* (EC<sub>50</sub> = 213.4 nM) va ser entre 4-5 vegades major que la del modificat al *bulge* (EC<sub>50</sub> = 1.11 μM).



**Figura 114.** Espectres d'emissió de fluorescència corresponents a la valoració de JBpept-NeaC<sub>6</sub> (0-5.43 μM) amb +3-RNA (83 nM): a) 2-AP localitzada a la regió del *bulge*; en vermell i blau es representen els punts de la valoració on la intensitat del senyal de fluorescència augmenta (0-87.3 nM) i disminueix (1.08-3.48 μM), respectivament. b) 2-AP localitzada a la regió del *loop*; la direcció de la fletxa indica la disminució de la fluorescència.

Per tant, en línees generals sembla ser que quan la 2-AP se situa al *bulge*, el comportament de fluorescència canvia, tal com també es descriu a la bibliografia. Per exemple, al treball realitzat per Hermann i col·laboradors,<sup>79b</sup> en valorar amb un aminoglicòsid una seqüència d'RNA similar a l'A-site, on una de les adenines del *loop* intern s'havia substituït per 2-AP, l'augment de fluorescència s'atribueix al fet que el lligand desplaça l'adenina exposant-la al dissolvent, ja que quan està apilada amb les altres bases la fluorescència és més baixa. Per altra banda, Schroeder i col·laboradors,<sup>81</sup> van observar el mateix fenomen en valorar un aptàmer d'RNA amb neomicina B, on una adenina no aparellada havia estat substituïda per la 2-AP. En aquest cas, també s'atribueix l'augment de fluorescència al fet que l'aminoglicòsid desplaça l'adenina modificada i l'exposa al dissolvent, mentre que la disminució s'atribueix a l'excés de lligand que provoca una reorganització de l'estructura que minimitza aquesta exposició. A partir d'aquests antecedents bibliogràfics, podem atribuir que l'augment de fluorescència observat durant l'addició dels lligands JBpept-NeaC<sub>2</sub> i JBpept-NeaC<sub>6</sub> sobre la seqüència +3 amb la 2-AP al *bulge*, podria ser conseqüència d'una major exposició de l'adenina modificada al dissolvent per acció del lligand. Per contra, la unió del lligand a la seqüència amb la 2-AP al *loop* no provocaria aquest fenomen ja que d'entrada es troba molt més exposada al dissolvent.

Així doncs, a l'hora de determinar l'afinitat dels lligands tipus JBpept-Nea i la dels seus derivats guanidinilats, vam considerar més adient emprar la seqüència +3 modificada amb l'aminopurina al *loop*. En aquest punt cal comentar que en el transcurs de les valoracions es va observar que a partir de l'addició d'uns 18-28 eq de lligand, l'emissió de fluorescència del propi compost era cada cop més important, fet que va desplaçar el màxim d'emissió de la 2-AP i va augmentar la intensitat de fluorescència. Tot i això, considerant únicament els punts de valoració anteriors a aquest fenomen (**Figura 114b**), es van poder assimilar les dades a una corba sigmoïdal i extreure'n els corresponents valors d'EC<sub>50</sub> per cadascun dels lligands (**Taula 6**).

Lligand	EC <sub>50</sub> (nM)	Lligand	EC <sub>50</sub> (nM)
JBpept-NeaC <sub>2</sub> ( <b>49</b> )	213.4	JBpept-NeaC <sub>2</sub> G <sub>4</sub> ( <b>57</b> )	122.8
JBpept-NeaC <sub>6</sub> ( <b>50</b> )	296.7	JBpept-NeaC <sub>6</sub> G <sub>4</sub> ( <b>58</b> )	216.2

**Taula 6.** Valors d'EC<sub>50</sub> dels lligands JanusB-Neamina/Guanidinoneamina determinats amb la seqüència +3-RNA amb la modificació 2-AP inserida al *loop*.

En primer lloc, si es comparen aquestes dades amb els valors d'EC<sub>50</sub> dels lligands Amt-Neamina, malgrat que tant la seqüència de l'RNA com la concentració de ions sodi en el medi són diferents, es pot observar la mateixa tendència a les dues famílies de lligands. És a dir, els compostos més afins són aquells que tenen la longitud de l'espaiador entre els dos fragments més curta (EC<sub>50</sub> = 213.4 nM per JBpept-NeaC<sub>2</sub>, respecte EC<sub>50</sub> = 296.7 nM per JBpept-NeaC<sub>6</sub>). En segon terme, a diferència dels lligands ametantrona-neamina (apartat 1.3.1.2 del present capítol), on la guanidinilació d'Amt-NeaC<sub>6</sub> genera una lleugera disminució de l'afinitat, en aquest cas la guanidinilació dels grups amino de la neamina produeix un efecte positiu a l'afinitat, independentment de la longitud de l'espaiador. I, finalment, és també interessant comentar que la relació d'afinitats entre els lligands JBpept-Nea es correlaciona amb les amplificacions observades als

experiments de DCC (apartat 2.2.2 del capítol 1), on el lligand JBpept-NeaC<sub>2</sub> s'amplifica al voltant d'1.7 vegades més que JBpept-NeaC<sub>6</sub>. A més, atès que en aquest mateix experiment el comportament entre JApept-Nea i JBpept-Nea és pràcticament idèntic (JApept-NeaC<sub>2</sub> s'amplifica 1.3 vegades més que JApept-NeaC<sub>6</sub>), és possible preveure que la relació d'afinitats entre els dos lligands que contenen el fragment Janus A sigui similar. De fet, aquesta hipòtesi va d'acord amb els resultats obtinguts per DCC (apartat 2.2.4 del capítol 1), on els lligands Amt-Nea s'amplifiquen molt més que els Janus-Nea (l'amplificació d'Amt-NeaC<sub>2</sub> era unes 750-800 major que JApept-NeaC<sub>2</sub> i JBpept-NeaC<sub>2</sub> i la d'Amt-NeaC<sub>6</sub> al voltant de 300 vegades respecte JApept-NeaC<sub>6</sub> i JBpept-NeaC<sub>6</sub>), amb la qual cosa és raonable que aquesta gran diferència d'amplificacions també quedi reflectida a l'afinitat dels lligands amb la diana d'RNA.<sup>48</sup> Per tant, sembla ser que la longitud de l'espaiador i la presència de grups guanidini són dos punts clau per augmentar la capacitat d'interacció dels lligands Janus-Neamina amb l'RNA.

#### 1.4 Determinació de l'especificitat dels lligands cap a la diana d'RNA wt

En una situació ideal, un lligand d'RNA, a més de poder discriminar l'estructura diana objectiu d'entre la multitud d'altres seqüències d'RNA presents a la cèl·lula, ha de tenir un lloc d'unió preferent dins d'aquesta. Per tant, a l'hora de valorar l'especificitat d'un lligand cal considerar, d'una banda, la interacció específica amb la diana biològica i, de l'altra, si té un lloc d'unió preferent. En aquest apartat, s'ha avaluat el concepte d'especificitat des del punt de vista de la preferència dels lligands cap a la seqüència nativa de l'RNA de tau en presència d'altres dianes d'RNA (competidors), tal com s'ha descrit a la bibliografia en diversos treballs.<sup>3,73c,78a,91</sup> Concretament, atès que un 10-15% del total de l'RNA cel·lular correspon a molècules d'RNA de transferència (tRNA), se'l considera el competidor d'RNA més abundant a dins de la cèl·lula.<sup>92</sup> En el nostre cas hem emprat una mescla comercial de tRNAs (tRNA<sup>mix</sup>) formada per més de 30 molècules diferents de pre-tRNAs i tRNA madurs extretes de la bactèria *Escherichia coli*.

Així doncs, tenint en compte els antecedents bibliogràfics i els del nostre grup d'investigació, els assaigs d'especificitat es van dur a terme mitjançant la realització de valoracions de fluorescència, tal com s'ha descrit anteriorment per a la determinació de les afinitats amb l'RNA marcat amb fluoresceïna (apartat 1.3.1). A nivell experimental, es va enregistrar l'emissió de fluorescència després de cada addició de lligand a una solució 25 nM de wt-RNA-FL en 10 mM de fosfat de sodi a pH 6.8, 100 mM de NaCl i 0.1 mM de Na<sub>2</sub>EDTA, en presència d'un excés de 10 eq d'una mescla comercial de tRNA<sup>mix</sup>. A partir de la representació de la fluorescència normalitzada a 517 nm respecte la concentració de lligand, es van determinar els valors d'EC<sub>50</sub>, que corresponen a l'afinitat del lligand en presència de tRNA<sup>mix</sup>. Amb la comparació d'aquest valor amb l'afinitat en absència del competidor s'obté la relació d'especificitat (apartat 5.1.2 de Materials i Mètodes). Això implica que el grau màxim d'especificitat que pot tenir un lligand cap a una diana concreta és la unitat.<sup>15</sup>

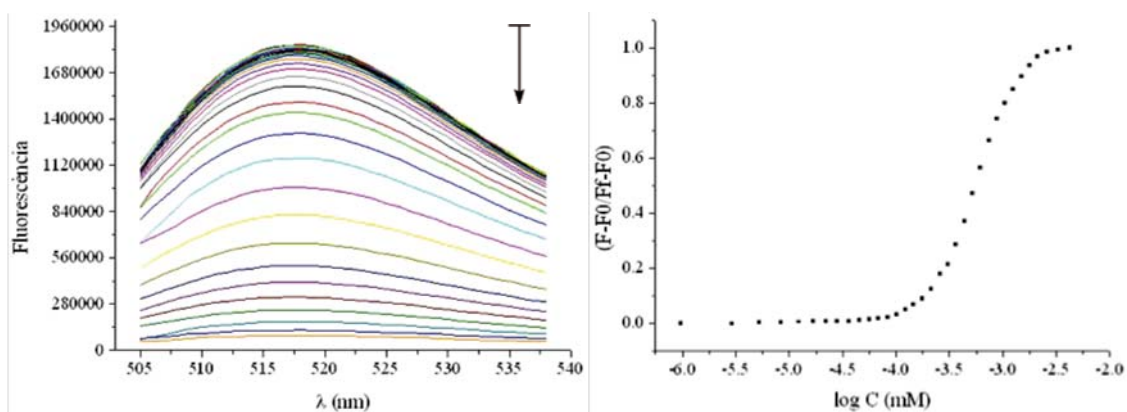
A continuació, a la **Taula 7** es recullen els valors d'EC<sub>50</sub> dels diferents lligands derivats de l'ametantona, en presència i en absència de tRNA<sup>mix</sup>, juntament amb la relació d'especificitat corresponent. També s'hi inclouen, per facilitar la discussió, els resultats

dels lligands acridina-neamina (AcrOMe-Nea), prèviament determinats al nostre grup d'investigació.<sup>3</sup> En aquest punt cal comentar que no es va poder determinar l'especificitat dels lligands Janus-neamina/guanidinoneamina a causa de la poca quantitat de producte disponible.

Lligand	EC <sub>50</sub> (nM)	EC <sub>50</sub> (nM) + tRNA <sup>mix</sup>	r.e
Amt-NeaC <sub>2</sub> ( <b>44</b> )	70.6	569.8	8.1
Amt-NeaC <sub>6</sub> ( <b>45</b> )	78.8	714.2	9.1
Amt-Azq ( <b>46</b> )	162.5	570.7	3.1
Amt-JApept ( <b>51</b> )	288.5	749.3	2.6
Amt-JBpept ( <b>52</b> )	318.2	713.9	2.2
Ametantrona (Amt)	231.8	675.6	2.9
Mitoxantrona (Mtx)	168.8	803.3	4.8
AcrOMe-NeaC <sub>2</sub> *	2100	47000	22.4
AcrOMe-NeaC <sub>6</sub> *	5900	63100	10.7

**Taula 7.** Valors d'EC<sub>50</sub> determinats amb wt-RNA-FL en absència i presència de tRNA<sup>mix</sup> i també dels lligands acridina-neamina (\*), prèviament sintetitzats al nostre grup de recerca.<sup>3</sup> Els valors corresponents a l'absència de competidor són els mateixos que els indicats a la **Taula 3**. L'abreviatura "r.e" fa referència a la relació d'especificitat.

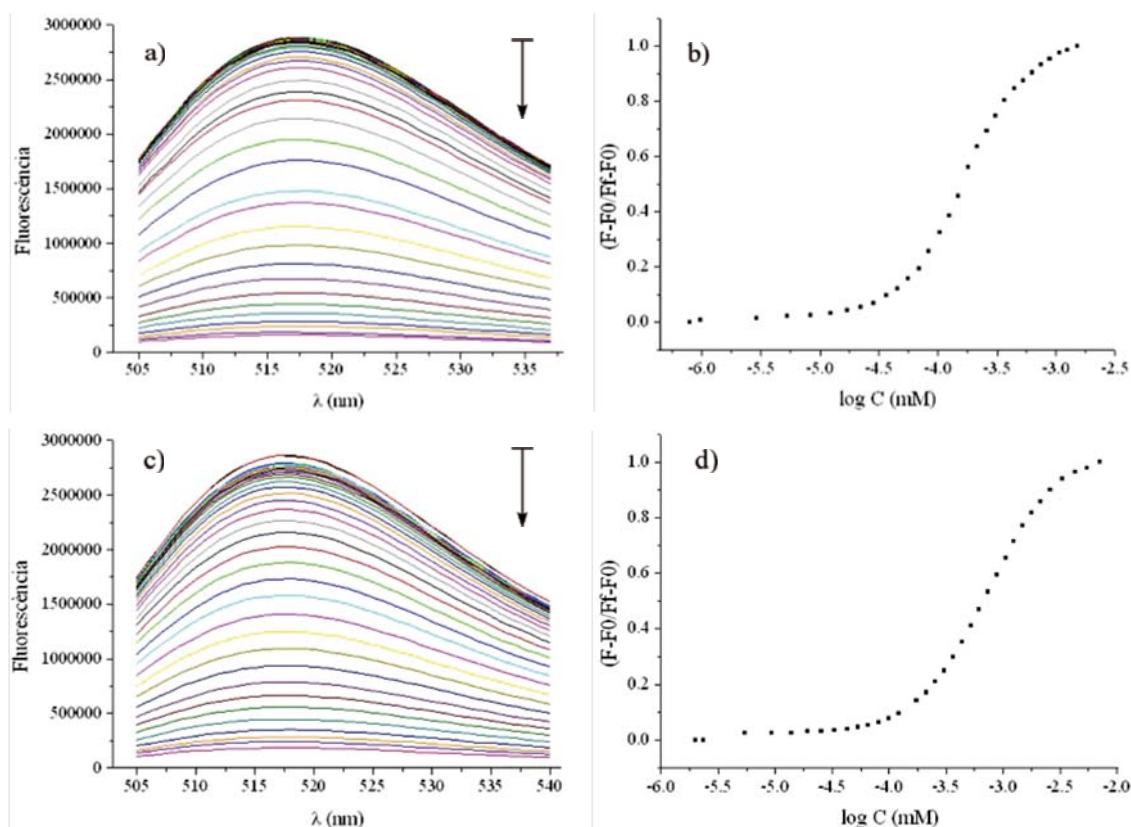
A partir dels valors d'EC<sub>50</sub>, primerament, podem concloure que l'afinitat dels compostos Amt-NeaC<sub>2</sub> (EC<sub>50</sub> = 569.6 nM) i Amt-NeaC<sub>6</sub> (EC<sub>50</sub> = 714.2 nM) disminueix 8 i 9 vegades, respectivament, en presència del competidor (**Figura 115**).

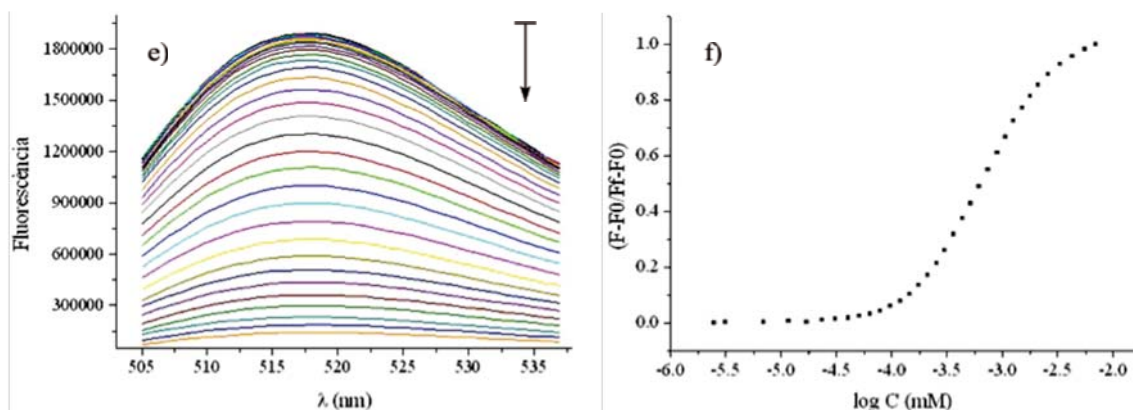


**Figura 115.** Espectres d'emissió de fluorescència de wt-RNA-FL (25 nM) amb Amt-NeaC<sub>2</sub> (0-4.27 μM) (esquerra); la direcció de la fletxa indica la disminució de la fluorescència. Representació gràfica de la fluorescència normalitzada a 517 nm respecte el logaritme decimal de la concentració (mM) d'Amt-NeaC<sub>2</sub> (dreta).

En canvi, pels lligands Amt-Azq (EC<sub>50</sub> = 570.7 nM), Amt-JApept (EC<sub>50</sub> = 749.3 nM) i Amt-JBpept (EC<sub>50</sub> = 713.9 nM) l'afinitat només disminueix entre 2 i 3 vegades (**Figura 116**). Això implica que els lligands Amt-Nea són menys específics que aquells que

combinen l'ametantona amb el fragment heteroaromàtic Azq o Janus. De fet, aquest resultat no és sorprenent atès que els aminoglicòsids, gràcies a les seves característiques estructurals, gaudeixen d'una gran adaptabilitat conformacional que els fa ser molt propicis a interaccionar amb diversos motius estructurals presents a l'RNA. Aquesta tendència està d'acord amb els resultats obtinguts prèviament al nostre grup de recerca, ja que els lligands formats per la combinació acridina-neamina en presència de tRNA<sup>mix</sup> veuen també reduïda la seva afinitat entre 10 i 20 vegades.<sup>3</sup> El fet que la relació d'especificitat sigui més baixa en Amt-Nea que en AcrOMe-Nea suggereix que el fragment ametantona li concedeix als lligands que el contenen una major especificitat cap a la diana d'RNA que no pas ho fa l'acridina. Un altre tret interessant dels lligands Amt-Nea és el fet que la longitud de l'espaiador entre els dos fragments té certa influència en l'especificitat. Per exemple, el lligand Amt-NeaC<sub>2</sub> és lleugerament més específic que Amt-NeaC<sub>6</sub>, tal com també s'havia observat a la bibliografia en conjugats acridina-neomicina B amb l'RNA HIV-1 RRE,<sup>73c</sup> on un espaiador curt conferia als lligands major especificitat. En canvi, aquest comportament s'oposa a la tendència observada als lligands acridina-Nea.





**Figura 116.** Espectres d'emissió de fluorescència wt-RNA-FL (25 nM) amb Amt-Azq (0-5.22  $\mu$ M) (a), Amt-JApept (0-7.12  $\mu$ M) (c) i Amt-JBpept (0-7.12  $\mu$ M) (e); la direcció de la fletxa indica la disminució de la fluorescència. Representació gràfica de la fluorescència normalitzada a 517 nm respecte el logaritme decimal de la concentració (mM) d'Amt-Azq (b), Amt-JApept (d) i Amt-JBpept (f).

Per altra banda també és interessant indicar que l'ametrantrona és un compost més específic cap a la diana d'RNA de tau que la mitoxantrona. Per tant, aquest resultat suggereix que els lligands basats en la combinació Mtx-Nea haurien de ser menys específics que els compostos Amt-Nea. Així doncs, des del punt de vista farmacològic no només resulta més adient emprar l'ametrantrona per la seva menor citotoxicitat respecte la mitoxantrona,<sup>11</sup> sinó també perquè generaria lligands més específics amb l'estructura secundària de l'RNA de tau.

I, finalment, també és important comentar que, en línies generals, s'observa que els lligands menys afins derivats de l'ametrantrona semblen ser més específics. Per exemple els compostos que combinen Amt amb el fragment heteroaromàtic Azq o Janus tenen una relació d'especificitat més baixa que els Amt-Nea. Tot i això, si es comparen els lligands AcrOMe-Nea ( $\mu$ M) amb els compostos Amt-Nea (nM) aquesta tendència no es compleix, ja que els lligands amb el fragment acridina segueixen sent molt menys específics, fet que manifesta de nou la major selectivitat del fragment Amt amb la diana d'RNA respecte AcrOMe.

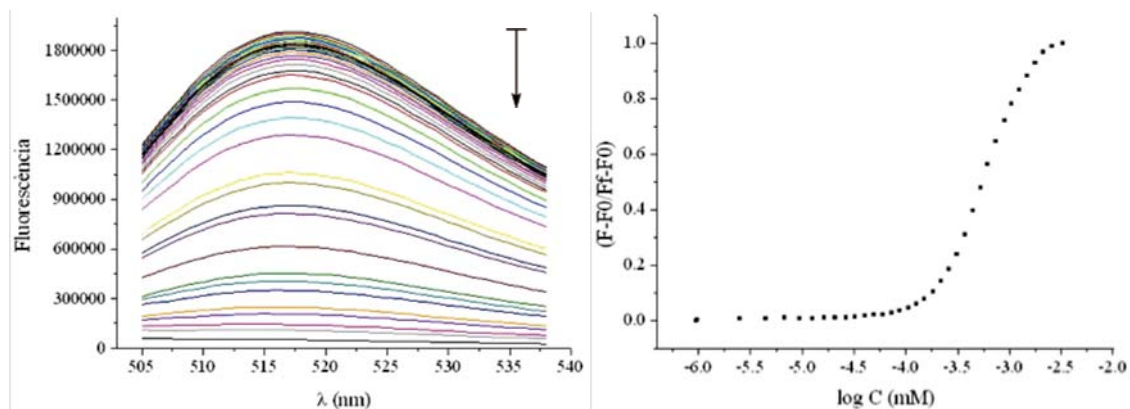
Pel que fa als lligands de segona generació, l'efecte produït per les modificacions a l'especificitat ha estat divers, tal com revelen els valors d' $EC_{50}$  corresponents als derivats guanidinilats recollits a la **Taula 8**, on també es mostren els resultats dels lligands acridina-Guanidinoneamina, determinats anteriorment al nostre grup de recerca.<sup>3b</sup>



Lligand	EC <sub>50</sub> (nM)	EC <sub>50</sub> (nM) + tRNA <sup>mix</sup>	r.e
Amt-NeaC <sub>2</sub> ( <b>44</b> )	70.6	569.8	8.1
Amt-NeaC <sub>2</sub> G <sub>4</sub> ( <b>61</b> )	57.2	580.1	10.2
Amt-NeaC <sub>6</sub> ( <b>45</b> )	78.8	714.2	9.1
Amt-NeaC <sub>6</sub> G <sub>4</sub> ( <b>62</b> )	94.5	762.1	8.1
AcrOMe-NeaC <sub>2</sub> *	2100	47000	22.4
AcrOMe-NeaC <sub>2</sub> G <sub>4</sub> *	3600	50900	14.1
AcrOMe-NeaC <sub>6</sub> *	5900	63100	10.7
AcrOMe-NeaC <sub>6</sub> G <sub>4</sub> *	2400	24900	10.4

**Taula 8.** Valors d'EC<sub>50</sub> determinats amb wt-RNA-FL en absència i en presència de tRNA<sup>mix</sup>, i també dels lligands acridina-guanidinoneamina (\*), prèviament sintetitzats al nostre grup de recerca.<sup>3b</sup> Els valors en absència de competidor són els mateixos que els recollits a les **Taules 3 i 4**. L'abreviatura "r.e" fa referència a la relació d'especificitat.

En primer lloc, els valors d'EC<sub>50</sub> en presència del competidor mostren una pèrdua d'afinitat en els lligands Amt-Guanidinoneamina (entre 8 i 10 vegades) del mateix ordre que la dels seus anàlegs sense guanidinilar (entre 8 i 9 vegades). L'anàlisi detallada de la relació d'especificitat indica, però, que la guanidinilació del lligand amb l'espaiador més curt ha tingut un efecte lleugerament negatiu (r.e = 10.2 per Amt-NeaC<sub>2</sub>G<sub>4</sub> respecte a r.e = 8.1 per Amt-NeaC<sub>2</sub>), mentre que en el cas del de longitud més gran s'aprecia un petit augment de l'especificitat (r.e = 8.1 per Amt-NeaC<sub>6</sub>G<sub>4</sub> respecte a r.e = 9.1 per Amt-NeaC<sub>6</sub>) (**Figura 117**).



**Figura 117.** Espectres d'emissió de fluorescència de wt-RNA-FL (25 nM) amb Amt-NeaC<sub>2</sub>G<sub>4</sub> (0-3.31 μM) (esquerra); la direcció de la fletxa indica la disminució de la fluorescència. Representació gràfica de la fluorescència normalitzada a 517 nm respecte el logaritme decimal de la concentració (mM) (dreta).

Ara bé, quan es comparen aquests valors amb els resultats dels lligands AcrOMe-guanidinoneamina,<sup>3b</sup> s'observa una tendència diferent, ja que l'efecte dels grups guanidini en l'especificitat dels lligands acridina-neamina cap a l'estructura diana d'RNA era positiu (AcrOMe-NeaC<sub>2</sub>G<sub>4</sub>) o mínim (AcrOMe-NeaC<sub>6</sub>G<sub>4</sub>). Tot i aquesta discrepància, el conjunt dels resultats semblen indicar que la guanidinilació dels



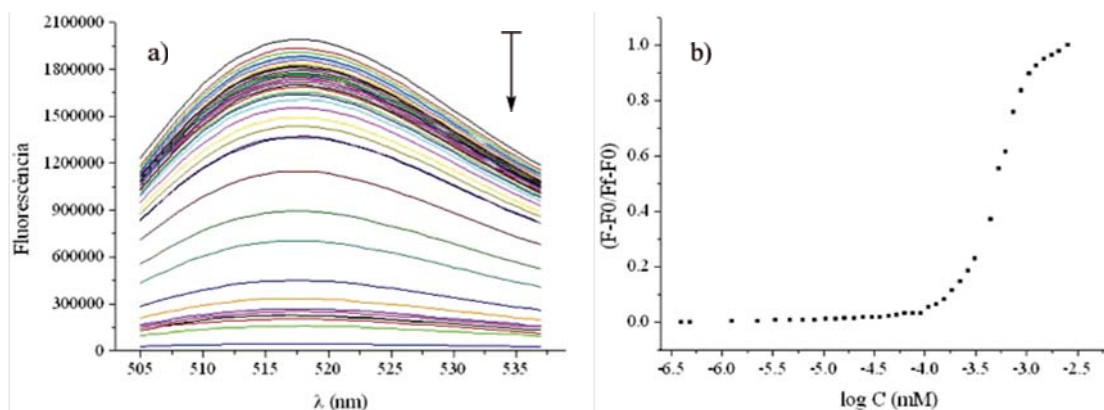
l·ligands Amt-Nea, independentment de la longitud de l'espaiador, no té un efecte molt gran a l'especificitat, a diferència del que passa amb els l·ligands AcrOMe-Nea.

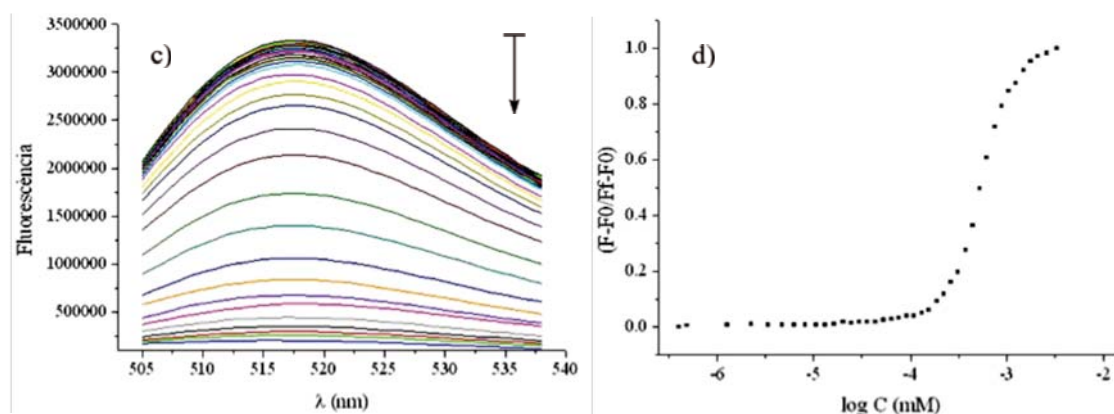
En segon terme, es van realitzar els assaigs d'especificitat amb els l·ligands doblement funcionalitzats (Amt-NeaC<sub>2</sub>,NeaC<sub>2</sub> i Amt-NeaC<sub>2</sub>,Azq) (**Figura 118**). A continuació, per facilitar la discussió a la **Taula 9** es recullen els valors d'EC<sub>50</sub> obtinguts en presència i en absència del competidor tRNA<sup>mix</sup>, juntament amb els valors dels l·ligands Amt-NeaC<sub>2</sub> i Amt-Azq.

L·ligand	EC <sub>50</sub> (nM)	EC <sub>50</sub> (nM) + tRNA <sup>mix</sup>	r.e
Amt-NeaC <sub>2</sub> ,NeaC <sub>2</sub> ( <b>64</b> )	76.2	519.7	6.8
Amt-NeaC <sub>2</sub> ,Azq ( <b>66</b> )	84.5	558.6	6.6
Amt-NeaC <sub>2</sub> ( <b>44</b> )	70.6	569.8	8.1
Amt-Azq ( <b>46</b> )	162.5	570.7	3.1

**Taula 9.** Valors d'EC<sub>50</sub> determinats amb wt-RNA-FL en absència i en presència de tRNA<sup>mix</sup>. Els valors corresponents a l'absència de competidor són els mateixos que els recollits a les **Taules 3** i **5**. L'abreviatura "r.e" fa referència a la relació d'especificitat.

En primer lloc, podem concloure que el l·ligand Amt-NeaC<sub>2</sub>,Azq presenta una especificitat intermèdia entre Amt-NeaC<sub>2</sub> (r.e = 8.1) i Amt-Azq (r.e = 3.1). Aquest resultat és especialment interessant, perquè posa de manifest l'efecte diferent que ha tingut aquesta modificació respecte els l·ligands originals per separat. D'una banda, podem pensar que la introducció de l'Azq en un segon braç amb capacitat per interaccionar específicament amb l'adenina del *bulge*, li confereix al l·ligand Amt-NeaC<sub>2</sub> una major especificitat. En canvi, si el comparem amb l'Amt-Azq, l'especificitat és menor a causa de la disposició de la neamina per interaccionar amb diversos RNAs. Ara bé, les dades d'especificitat corresponents a Amt-NeaC<sub>2</sub>,NeaC<sub>2</sub> són sorprenents, ja que davant de la introducció d'una segona molècula de neamina haguéssim esperat una menor especificitat.





**Figura 118.** Espectres d'emissió de fluorescència de wt-RNA-FL (25 nM) amb Amt-NeaC<sub>2</sub>,NeaC<sub>2</sub> (0-3.31 μM) (a) i Amt-NeaC<sub>2</sub>,Azq (0-3.31 μM) (b); la direcció de la fletxa indica la disminució de la fluorescència. Representació gràfica de la fluorescència normalitzada a 517 nm respecte el logaritme decimal de la concentració (mM) Amt-NeaC<sub>2</sub>,NeaC<sub>2</sub> (b) i Amt-NeaC<sub>2</sub>,Azq (d).

Així doncs, a grans trets podem concloure que en la majoria dels lligands hi ha una correlació inversa entre afinitat i especificitat, fet que va d'acord amb els anteriors resultats, tant del nostre grup d'investigació<sup>3</sup> com dels descrits per Tor i col·laboradors,<sup>73c,89a</sup> A més, sembla ser que els lligands que no contenen la neamina, com ara Amt-JApept, Amt-JBpept i Amt-Azq, no pateixen una reducció de l'especificitat tan acusada, probablement a causa del menor pes de les forces electrostàtiques en la interacció amb l'RNA.



## **2 Estudi de l'efecte estabilitzant dels lligands a l'RNA diana**

---

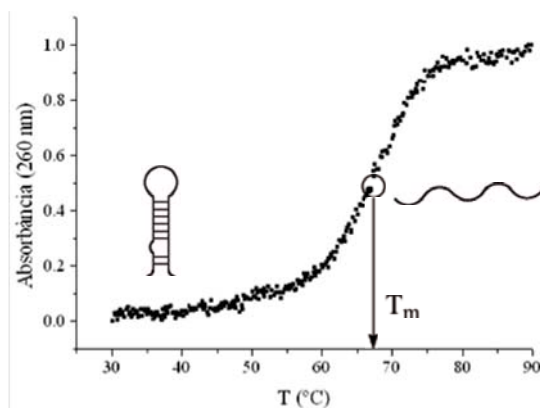
Com ja s'ha comentat a l'Introducció d'aquest treball (apartat 2.2.1), la dependència entre l'estabilitat termodinàmica de l'estructura secundària localitzada al final de l'exó 10 del pre-mRNA que codifica la proteïna tau i la correcta regulació del processat alternatiu, ocasiona que l'avaluació de l'efecte estabilitzant dels lligands amb aquesta estructura *stem-loop* sigui de gran importància. Per aquesta raó, el següent gran objectiu d'aquest capítol s'ha centrat en l'avaluació per espectroscòpia d'ultravioleta de l'efecte estabilitzant dels diferents lligands desenvolupats en el transcurs d'aquesta tesi doctoral, ja que, a més de mostrar una bona afinitat i especificitat amb la diana d'RNA, cal que també l'estabilitzin, especialment a les seqüències mutades.

### **2.1 Estudi de l'estabilitat d'un dúplex d'RNA per espectroscòpia d'UV**

Abans d'exposar els resultats experimentals, és interessant comentar que les transicions electròniques tipus  $\pi-\pi^*$ , que tenen lloc als anells aromàtics de les bases pirimidíniques i puríniques, són les responsables de la capacitat d'absorció dels àcids nucleics a la regió d'ultravioleta. A més, presenten un màxim d'absorció al voltant de 260 nm i tenen un coeficient d'extinció molar de l'ordre de  $10^4 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ . Tot i això, aquestes propietats espectroscòpiques estan influenciades per diversos factors, com ara la composició de les bases nucleotídiques, les interaccions d'apilament o *stacking*, la temperatura, la concentració salina del medi o el pH de la solució. A més, els espectres d'UV de l'RNA i del DNA són força sensibles als canvis conformacionals que puguin patir les seves estructures helicoidals. Per exemple, quan en una estructura dúplex les nucleobases es troben apilades de forma regular té lloc una disminució de l'absorció, fenomen denominat hipocromisme. Per tant, un oligonucleòtid en forma de dúplex presenta una absorbància a 260 nm menor que quan està desestructurat.<sup>75c,93</sup>

Per altra banda, a diferència de les proteïnes, on el procés de desnaturalització normalment és irreversible, als àcids nucleics quan es refreda la mostra es torna a renaturalitzar l'estructura. Gràcies a aquesta propietat, juntament amb l'efecte

hipocròmic de les nucleobases, és possible estudiar per espectroscòpia d'UV-Vis l'estabilitat de les estructures secundàries de l'RNA i del DNA mitjançant l'enregistrament de la variació de l'absorbància a 260 nm en funció de la temperatura, on el gràfic sigmoidal resultant s'anomena corba de fusió (**Figura 119**).<sup>94</sup> A partir del seu perfil es pot observar fàcilment que a mesura que augmenta gradualment la temperatura també ho fa l'absorbància, com a conseqüència de la disminució de les interaccions d'apilament de les bases en desnaturalitzar-se el dúplex, en aquest cas d'RNA. El paràmetre  $T_m$  indicat a la figura fa referència a la temperatura de fusió (*melting temperature*) del dúplex, que és la temperatura a la qual el 50% de les molècules d'oligonucleòtid es troben desnaturalitzades. Conseqüentment, la determinació d'aquest paràmetre en presència d'un lligand ha esdevingut un bon sistema per avaluar la seva capacitat estabilitzant, ja que en el cas d'un efecte positiu, s'observarà un increment de la  $T_m$  de l'estructura d'RNA.<sup>94</sup>



**Figura 119.** Representació gràfica de la corba de fusió corresponent a wt-RNA (1  $\mu$ M) realitzada en 10 mM de fosfat de sodi a pH 6.8, 100 mM de NaCl i 0.1 mM de Na<sub>2</sub>EDTA.

A nivell experimental, atès que es tracta d'un procés reversible, on ambdues corbes de fusió haurien de ser superposables,<sup>94</sup> la valoració es pot dur a terme a partir de la mostra estructurada a través d'un escalfament gradual, o bé a l'inrevés, reestructurant la mostra a partir de la disminució controlada de la temperatura. En aquest treball, tal com es detalla a l'apartat 5.2 de Materials i Mètodes, s'ha optat per iniciar sempre les valoracions a partir de la mostra completament desnaturalitzada per tal de garantir l'equilibri termodinàmic inicial.

Un altre factor a tenir en compte és el paper que desenvolupa la solució reguladora de pH, ja que ha de tenir un  $pK_a$  significativament invariable amb la temperatura.<sup>94</sup> Per aquest motiu, enlloc de la solució tampó Tris, utilitzada als experiments de DCC, s'ha emprat la mateixa solució fosfat emprada als experiments d'afinitat, atès que el seu  $pK_a$  (6.81 a 25°C) no varia significativament amb la temperatura.

Així doncs, en línies generals podem afirmar que l'assaig de desnaturalització tèrmica per UV és un mètode idoni per determinar la capacitat estabilitzadora dels lligands, ja que es necessita molt poca quantitat de mostra, el tractament de dades es duu a terme de forma ràpida i senzilla a través de programes informàtics (Origin o Kaleidagraph), i no

requereix un alt cost econòmic. És per tot això, doncs, que s'ha optat per aquesta tècnica a l'hora de realitzar els assaigs d'estabilitat.

## 2.2 Avaluació de l'efecte estabilitzant dels lligands

En aquest apartat es descriuen els resultats dels assaigs de desnaturalització tèrmica realitzats al llarg d'aquesta tesi doctoral, amb l'objectiu d'estudiar l'efecte estabilitzant dels diferents lligands sobre els oligoribonucleòtids 29-mer (wt, +3, +14 i +16), prèviament sintetitzats (apartat 3.2 de Materials i Mètodes). En tots els casos s'han enregistrat les corbes de fusió dels oligonucleòtids en presència d'1 eq del corresponent lligand.

En un primer subapartat, s'exposen els resultats dels lligands de primera i de segona generació amb les seqüències nativa i mutades, i es comparen amb les afinitats i les amplificacions obtingudes als experiments de DCC. Finalment, en el segon subapartat, s'estudia l'efecte de la força iònica i del pH del medi en l'estabilització causada per alguns dels lligand derivats de l'ametrantrona.

### 2.2.1 Efecte estabilitzant dels lligands als RNAs wt, +3,+14 i 16

Les corbes de fusió s'han enregistrat a 260 nm, tal com es detalla a l'apartat 5.2 de Materials i Mètodes. S'ha emprat una concentració 1  $\mu$ M d'RNA i de lligand en un tampó 10 mM de fosfat de sodi a pH 6.8, 100 mM NaCl i 0.1 mM de Na<sub>2</sub>EDTA, a excepció dels casos indicats, on ha estat de 50 mM de NaCl. Als següents subapartats s'agrupen els lligands derivats de l'ametrantrona, tant els de primera com els de segona generació, i els que combinen el residu heteroaromàtic Janus amb la neamina o la guanidinoneamina.

#### 2.2.1.1 Efecte estabilitzant dels lligands derivats de l'ametrantrona seleccionats als experiments de DCC

En primer lloc, es va estudiar l'estabilitat de les seqüències d'RNA diana (wt, +3, +14 i +16) en absència de lligand. Els resultats obtinguts, que es recullen a la **Taula 10**, van confirmar la tendència descrita per Varani i col·laboradors,<sup>4</sup> en la qual les mutacions +3 ( $T_m = 51.4^\circ\text{C}$ ), +14 ( $T_m = 53.5^\circ\text{C}$ ) i +16 ( $T_m = 59.6^\circ\text{C}$ ) desestabilitzen clarament l'estructura *stem-loop* nativa ( $T_m = 66.5^\circ\text{C}$ ). Cal indicar que l'estabilitat termodinàmica d'aquesta estructura secundària del pre-mRNA de tau és especialment sensible a les mutacions puntuals que es troben a la zona del dúplex, tal com s'ha descrit anteriorment a la Introducció d'aquesta memòria (**Figura 18**).

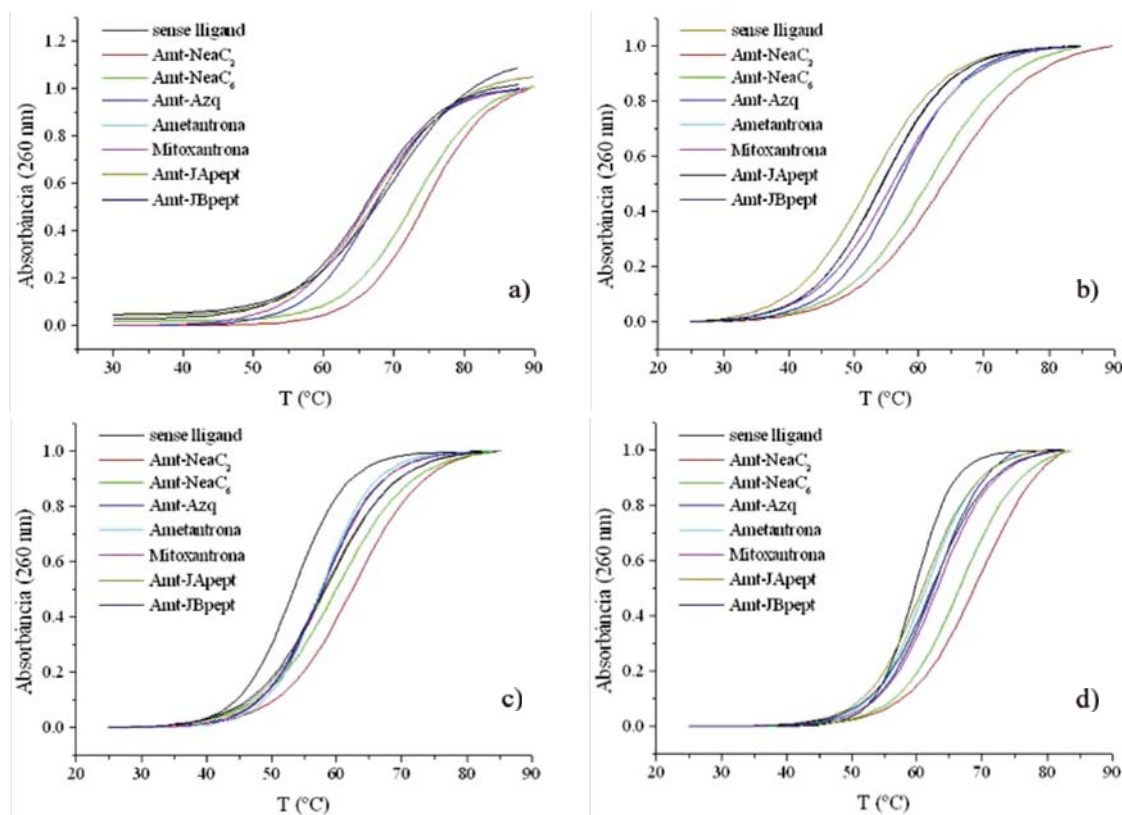
	$T_m$ wt	$\Delta T_m$	$T_m$ +3	$\Delta T_m$
Sense lligand	66.5	-	51.4	-
Amt-NeaC <sub>2</sub>	75.4	+8.9	64.3	+12.9
Amt-NeaC <sub>6</sub>	72.9	+6.4	60.7	+9.3
Amt-Azq	67.8	+1.3	56.1	+4.7
Amt-JApept	67.8	+1.3	55.2	+3.8
Amt-JBpept	70.0	+3.5	55.1	+3.7
Ametantrona	67.1	+0.5	54.2	+2.8
Mitoxantrona	69.2	+2.7	57.1	+5.7
Neamina	66.9	+0.4	51.5	+0.1
AcrOMe-NeaC <sub>2</sub> *	68.8	+2.3	56.5	+5.1
AcrOMe-NeaC <sub>6</sub> *	68.5	+2.0	53.6	+2.2

	$T_m$ +14	$\Delta T_m$	$T_m$ +16	$\Delta T_m$
Sense lligand	53.5	-	59.6	-
Amt-NeaC <sub>2</sub>	63.9	+10.4	69.4	+9.8
Amt-NeaC <sub>6</sub>	60.7	+7.2	66.5	+6.9
Amt-Azq	57.3	+3.8	61.8	+2.2
Amt-JApept	55.0	+1.5	61.5	+1.9
Amt-JBpept	55.7	+2.2	63.0	+3.4
Ametantrona	55.7	+2.2	61.6	+2.0
Mitoxantrona	58.1	+4.6	63.4	+3.8
Neamina	54.0	+0.5	60.1	+0.5
AcrOMe-NeaC <sub>2</sub> *	57.2	+3.7	-	-
AcrOMe-NeaC <sub>6</sub> *	56.0	+2.5	-	-

**Taula 10.** Temperatures de fusió (°C) dels RNAs wt, +3, +14 i +16, en presència i en absència de diferents lligands, i també dels lligands acridina-neamina (\*), prèviament sintetitzats al nostre grup de recerca.<sup>3</sup>  $\Delta T_m$ : variació de  $T_m$ , en presència i en absència de lligand.

El següent pas va consistir en avaluar la capacitat dels lligands que contenen el fragment ametantrona (Amt), prèviament seleccionats als experiments de DCC, per compensar l'efecte desestabilitzant causat per les mutacions i, per tant, restablir l'estabilitat termodinàmica de l'estructura *stem-loop*. Tal com es recull a la **Taula 10**, a grans trets, podem concloure que tots els lligands derivats de l'agent intercalant ametantrona estabilitzen, en major o menor grau, tant la seqüència nativa com les mutades i, pràcticament, en tots els casos se supera clarament l'efecte estabilitzant generat pel propi compost sol. És particularment rellevant el fet que les estabilitzacions produïdes per Amt-NeaC<sub>2</sub> a +3 ( $T_m = 64.3^\circ\text{C}$ ), a +14 ( $T_m = 63.9^\circ\text{C}$ ) i a +16 ( $T_m = 69.4^\circ\text{C}$ ), o Amt-NeaC<sub>6</sub> a +16 ( $T_m = 66.5^\circ\text{C}$ ) restableixen l'estabilitat termodinàmica a un nivell semblant o, fins i tot superior al de la seqüència nativa ( $T_m = 66.5^\circ\text{C}$ ). A més, aquests resultats també demostren que la combinació dels fragments Amt i Nea condueix a la formació

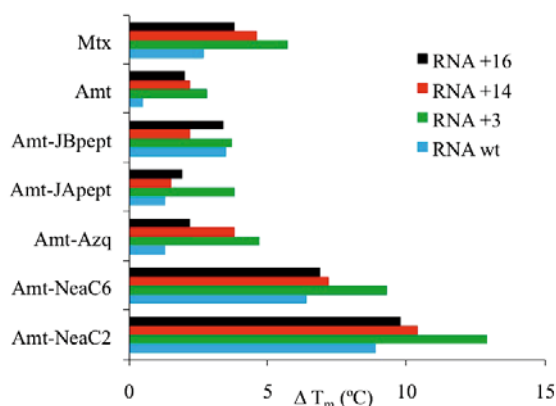
de lligands amb major capacitat estabilitzadora que els seu antecessors monomèrics (Amt o Nea), no només a wt, sinó també a les tres seqüències mutades avaluades (**Figura 120**).



**Figura 120.** Corbes de fusió dels oligoribonucleòtids wt (a), +3 (b), +14 (c) i +16 (d), en absència i en presència d'1 eq de lligand.

Si es representen en un diagrama de barres els valors corresponents als  $\Delta T_m$  pels diferents lligands (**Figura 121**), a més d'apreciar-se que la mutació +3 és la que més s'estabilitza en tots els casos, s'observa clarament que els compostos Amt-Nea mostren una major capacitat estabilitzant que les combinacions Amt-Azq o Amt-Janus. Concretament, els lligands Amt-NeaC<sub>2</sub> ( $\Delta T_m = +8.9^\circ\text{C}$ ) i Amt-NeaC<sub>6</sub> ( $\Delta T_m = +6.4^\circ\text{C}$ ) estabilitzen, respectivament, fins a 7 i 5 vegades més la seqüència d'RNA wt que Amt-Azq ( $\Delta T_m = +1.3^\circ\text{C}$ ) o Amt-JApept ( $\Delta T_m = +1.3^\circ\text{C}$ ), i entre 2 i 3 vegades més que Amt-JBpept ( $\Delta T_m = +3.5^\circ\text{C}$ ). De fet, si es compara l'efecte estabilitzador que exerceix Amt sol sobre RNA wt ( $\Delta T_m = +0.5^\circ\text{C}$ ) amb el que realitzen la resta de lligands es posa de manifest que la unió d'Amt amb l'aminoglicòsid neamina genera un compost amb una funció estabilitzadora molt més gran (entre 17 i 13 vegades més) que quan s'uneix amb els fragments Azq i Janus (el doble en Amt-Azq i Amt-JApept i fins a 7 vegades més en Amt-JBpept), fet que es podria atribuir a la formació d'interaccions electrostàtiques favorables amb l'RNA. A més, en aquest estudi també es demostra la influència de la longitud de l'espaiador entre Amt i Nea en la capacitat estabilitzant del lligand a la seqüència nativa i a les tres mutades, ja que en Amt-NeaC<sub>2</sub>, el lligand amb l'espaiador més curt, el valor de  $\Delta T_m$  és aproximadament 1.4 vegades més gran que en Amt-NeaC<sub>6</sub>, el lligand amb l'espaiador de major longitud.





**Figura 121.** Diagrama de barres on es representen els increments  $\Delta T_m$  (°C) corresponents a l'efecte estabilitzador generat pels lligands derivats de l'ametatrona a les seqüències nativa (wt) i mutades (+3, +14 i +16).

Finalment, també cal remarcar que, tot i que alguns paràmetres termodinàmics mostren una relació directa entre la temperatura de fusió i les constants d'afinitat, el fet que també intervinguin altres factors, com ara el nombre de llocs d'unió, la cooperació entre el lligand i la diana, o l'afinitat amb la forma desestructurada, a més de l'estructurada, ocasiona que no sempre existeixi una equivalència entre els valors  $\Delta T_m$  i les constants d'afinitat.<sup>94</sup> Ara bé, en aquest cas, tal com també s'havia observat anteriorment al nostre grup d'investigació,<sup>3</sup> sí que s'ha pogut apreciar certa correlació entre la capacitat estabilitzant dels lligands sobre l'estructura nativa d'RNA amb la seva afinitat. Per exemple, el lligand Amt-NeaC<sub>2</sub> ha resultat ser el lligand més afí ( $EC_{50} = 70.6$  nM) i el que indueix el major efecte estabilitzant ( $\Delta T_m = +8.9^\circ\text{C}$ ) a RNA wt. Ara bé, malgrat que aquesta mateixa tendència es compleix per la resta de lligands avaluats (Amt-NeaC<sub>6</sub>, Amt-Azq, Amt-Janus, Amt, Mtx i Nea), no existeix una relació directa de proporcionalitat entre els valors d'afinitat i la seva capacitat estabilitzadora.

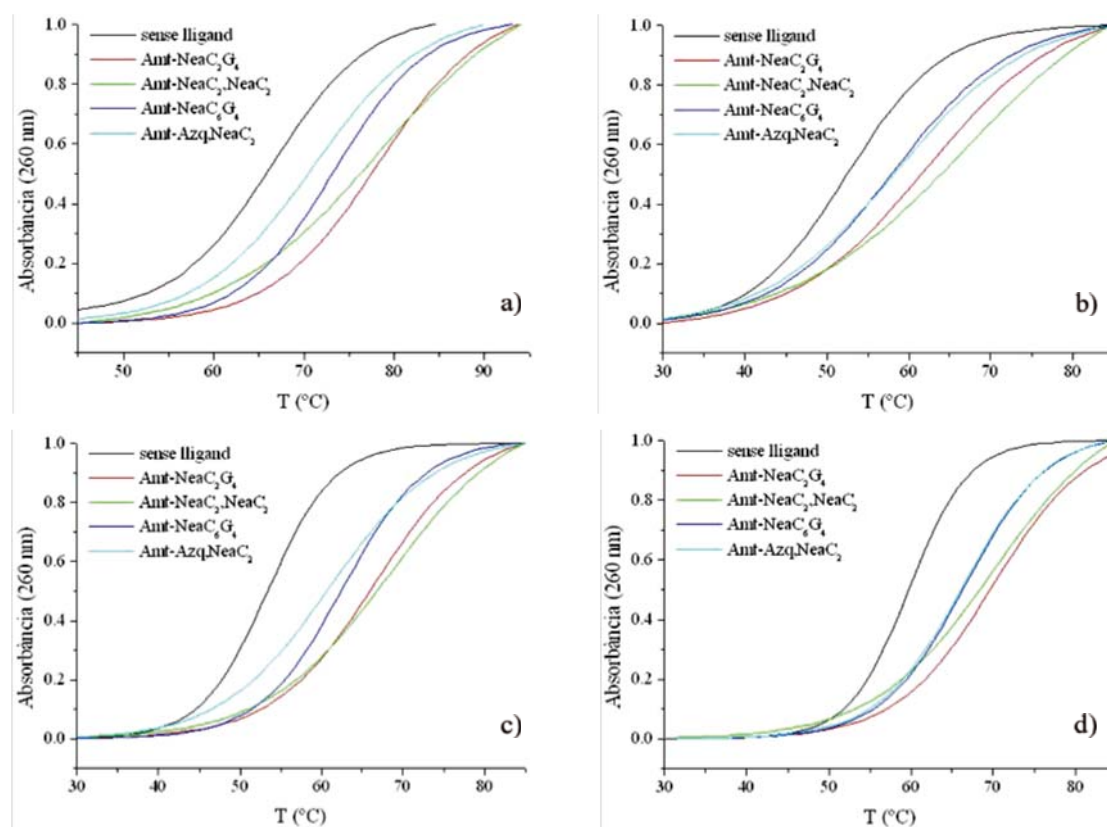
En aquesta línia, també s'ha pogut comprovar que les amplificacions obtingudes als experiments de DCC mostren una bona correlació amb els valors de  $T_m$ , tal com també s'ha descrit prèviament a la bibliografia per altres sistemes.<sup>46b,48,95</sup> És a dir, els lligands més amplificats (Amt-NeaC<sub>2</sub> i Amt-NeaC<sub>6</sub>) han generat graus d'estabilització més alts que els menys amplificats (Amt-Azq, Amt-JApept i Amt-JBpept). Per exemple, en el primer experiment de DCC (apartat 2.2.1 del capítol 1), les amplificacions relatives d'Amt-NeaC<sub>2</sub> (~ 3400%), d'Amt-NeaC<sub>6</sub> (~ 1600%) i d'Amt-Azq (~ 190%) coincideixen també amb la seva capacitat estabilitzant relativa induïda a la seqüència nativa ( $\Delta T_m = +8.9^\circ\text{C}$ ,  $\Delta T_m = +6.4^\circ\text{C}$  i  $\Delta T_m = +1.3^\circ\text{C}$ , respectivament). En un altre experiment (apartat 2.2.4 del capítol 1), també s'observa, a grans trets, la mateixa correlació entre les amplificacions d'Amt-NeaC<sub>2</sub> (~ 740%), d'Amt-NeaC<sub>6</sub> (~ 300%), d'Amt-JApept (~ 37%) i d'Amt-JBpept (~ 30%) amb la capacitat estabilitzant ( $\Delta T_m = +8.9^\circ\text{C}$ ,  $\Delta T_m = +6.4^\circ\text{C}$ ,  $\Delta T_m = +1.3^\circ\text{C}$  i  $\Delta T_m = +3.5^\circ\text{C}$ , respectivament), tot i que als compostos Amt-Janus hi ha una major desviació.

En segon terme, és també interessant comentar la bona correlació que existeix entre les amplificacions, obtingudes a l'experiment de DCC (apartat 2.2.1 del capítol 1), dels

l·ligands AcrOMe-NeaC<sub>2</sub> (~ 260%), AcrOMe-NeaC<sub>6</sub> (~ 45%), Amt-NeaC<sub>2</sub> (~ 3400%) i Amt-NeaC<sub>6</sub> (~ 1600%) i els seus valors de T<sub>m</sub> ( $\Delta T_m = +2.4^\circ\text{C}$  per AcrOMe-NeaC<sub>2</sub>,  $\Delta T_m = +2.1^\circ\text{C}$  per AcrOMe-NeaC<sub>6</sub>,  $\Delta T_m = +8.9^\circ\text{C}$  per Amt-NeaC<sub>2</sub> i  $\Delta T_m = +6.4^\circ\text{C}$  per Amt-NeaC<sub>6</sub>, respectivament), que novament confirmen la major capacitat estabilitzadora del fragment ametantrona respecte el d'acridina sobre l'RNA wt diana. Per tant, a partir d'aquestes dades i dels resultats anteriorment determinats al nostre grup de recerca,<sup>3</sup> podem considerar que, en línies generals, existeix una bona relació directa entre l'amplificació dels l·ligands als experiments de DCC i els seus valors d'afinitat i d'estabilització amb la diana d'RNA.

### 2.2.1.2 Efecte estabilitzant dels l·ligands derivats de l'ametantrona de segona generació

Els assaigs de desnaturalització tèrmica amb els l·ligands de segona generació (**Figura 122**), es van dur a terme amb l'objectiu d'estudiar l'efecte que tenia en l'estabilitat termodinàmica de les estructures nativa i mutades, d'una banda, l'addició d'un segon fragment al braç alquílic de l'anell antraquinona del l·ligand Amt-NeaC<sub>2</sub> i, de l'altra, la substitució dels grups amino per guanidinis als l·ligands Amt-Nea.



**Figura 122.** Corbes de fusió dels oligoribonucleòtids wt (a), +3 (b), +14 (c) i +16 (d), en absència i en presència d'1 eq de l·ligand de segona generació.

En primer lloc, a partir dels valors recollits a la **Taula 11**, podem concloure que la guanidinització de l'aminoglicòsid neamina afecta positivament a la seva capacitat estabilitzant, tant a la seqüència nativa ( $\Delta T_m G = +0.8^\circ\text{C}$ ) com a les mutades ( $\Delta T_m G =$

+0.5 – 1.3°C). A més, el fet que la capacitat estabilitzadora de la neamina i del seu anàleg guanidinilat no sigui molt gran, suggereix que ambdós compostos podrien interaccionar a la zona del *loop* de l'estructura *stem-loop* de l'RNA diana, amb la qual cosa això no implicaria grans canvis en els valors de  $T_m$  de l'oligoribonucleòtid. Ara bé, aquest efecte als lligands Amt-NeaG<sub>4</sub> és molt diferent en funció de la longitud de l'espaiador. Per exemple, la guanidinilació d'Amt-NeaC<sub>2</sub> té un efecte clarament favorable sobre l'estabilitat de l'RNA wt ( $\Delta T_m G = +3.1^\circ C$ ), mentre que en el cas d'Amt-NeaC<sub>6</sub> la incorporació dels quatre grups guanidini pràcticament no fa variar la temperatura de fusió ( $\Delta T_m G = +0.1^\circ C$ ). De fet, a excepció d'algunes discrepàncies observades a la seqüència +3, on la guanidinilació d'ambdós lligands provoca una disminució de la capacitat estabilitzadora, aquest mateix comportament positiu s'observa a les seqüències +14 i +16. Tot i això, cal afegir que aquests resultats es contraposen amb la tendència observada als lligands AcrOMe-guanidinoneamina,<sup>3b</sup> ja que, anàlogament als valors d'EC<sub>50</sub> (apartat 1.3.1.2 del present capítol), la guanidinilació té un efecte més positiu al lligand amb l'espaiador més llarg.

	$T_m$ wt	$\Delta T_m$	$\Delta T_m G$	$T_m$ +3	$\Delta T_m$	$\Delta T_m G$
Sense lligand	66.5	-	-	51.4	-	-
Amt-NeaC <sub>2</sub>	75.4	+8.9	-	64.3	+12.9	-
Amt-NeaC <sub>2</sub> G <sub>4</sub>	78.5	+12.0	+3.1	63.0	+11.6	-1.3
Amt-NeaC <sub>6</sub>	72.9	+6.4	-	60.7	+9.3	-
Amt-NeaC <sub>6</sub> G <sub>4</sub>	73.0	+6.5	+0.1	59.0	+7.6	-1.7
Neamina	66.9	+0.4	-	51.5	+0.1	-
NeaminaG <sub>4</sub>	67.7	+1.2	+0.8	52.8	+1.4	+1.3
AcrOMe-NeaC <sub>2</sub> G <sub>4</sub> *	67.2	+0.7	-1.6	53.7	+2.3	-2.8
AcrOMe-NeaC <sub>6</sub> G <sub>4</sub> *	68.7	+2.2	+0.2	56.7	+5.3	+3.1

	$T_m$ +14	$\Delta T_m$	$\Delta T_m G$	$T_m$ +16	$\Delta T_m$	$\Delta T_m G$
Sense lligand	53.5	-	-	51.4	-	-
Amt-NeaC <sub>2</sub>	63.9	+10.4	-	69.4	+9.8	-
Amt-NeaC <sub>2</sub> G <sub>4</sub>	66.3	+12.8	+2.4	70.1	+10.5	+0.7
Amt-NeaC <sub>6</sub>	60.7	+7.2	-	66.5	+6.9	-
Amt-NeaC <sub>6</sub> G <sub>4</sub>	61.8	+8.3	+1.1	66.6	+7.0	+0.1
Neamina	54.0	+0.5	-	60.1	+0.5	-
NeaminaG <sub>4</sub>	54.5	+1.0	+0.5	61.0	+1.4	+0.9
AcrOMe-NeaC <sub>2</sub> G <sub>4</sub> *	54.5	+1.0	-2.7	-	-	-
AcrOMe-NeaC <sub>6</sub> G <sub>4</sub> *	56.6	+3.1	+0.6	-	-	-

**Taula 11.** Temperatures de fusió (°C) dels RNAs wt, +3, +14 i +16, en presència i en absència dels lligands de segona generació i també dels lligands acridina-guanodinoneamina (\*), prèviament sintetitzats al nostre grup de recerca.<sup>3b</sup>  $\Delta T_m$ : variació de  $T_m$ , en presència i en absència de lligand.  $\Delta T_m G$ : variació de temperatura entre la  $T_m$  d'un lligand guanidinilat i el seu anàleg sense guanidinilar.

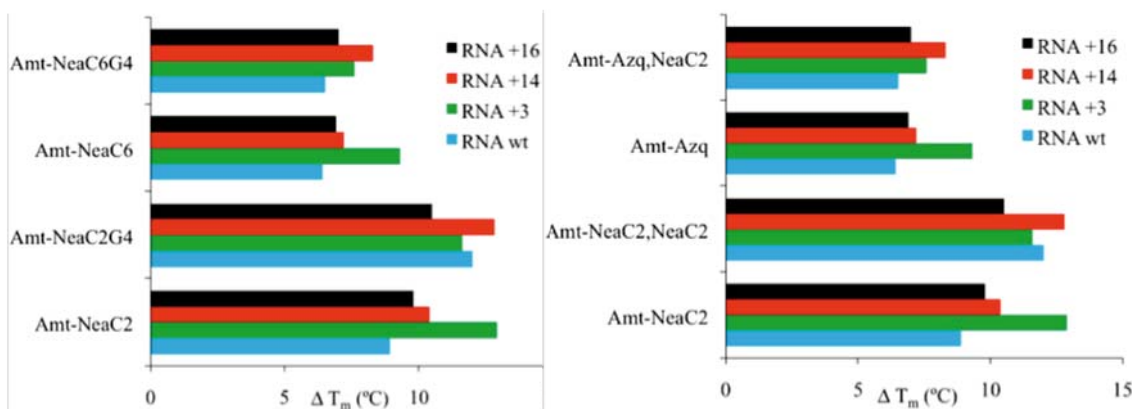
Pel que fa als lligands amb l'anell antraquinònic doblement funcionalitzat (Amt-NeaC<sub>2</sub>,NeaC<sub>2</sub> i Amt-Azq,NeaC<sub>2</sub>), podem concloure que la seva capacitat estabilitzant varia molt en funció de si el segon braç d'Amt-NeaC<sub>2</sub> es derivatitza amb una segona molècula de neamina, o bé amb un derivat d'azaquinolona. A partir dels valors d'estabilitat de la **Taula 12**, es pot concloure que la incorporació del segon fragment de neamina comporta un increment molt important en els valors de T<sub>m</sub> de la seqüència nativa ( $\Delta T_m = +13.0^\circ\text{C}$ ) i de les mutades ( $\Delta T_m = +11.2 - 15.6^\circ\text{C}$ ). De fet, és interessant remarcar que aquest augment de la temperatura de fusió a les seqüències mutades, per acció d'Amt-NeaC<sub>2</sub>,NeaC<sub>2</sub>, és tant gran que permet superar l'estabilitat termodinàmica de la diana nativa d'RNA amb estabilitzacions lleugerament superiors a les obtingudes amb l'anàleg guanidinilat Amt-NeaC<sub>2</sub>G<sub>4</sub> (**Taula 11**). Per contra, l'efecte estabilitzador d'Amt-Azq,NeaC<sub>2</sub> és inferior al d'Amt-NeaC<sub>2</sub>, però superior al d'Amt-Azq.

	T <sub>m</sub> wt	$\Delta T_m$	T <sub>m</sub> +3	$\Delta T_m$
Sense lligand	66.5	-	51.4	-
Amt-NeaC <sub>2</sub> ,NeaC <sub>2</sub>	79.5	+13.0	67.0	+15.6
Amt-NeaC <sub>2</sub> ,Azq	71.2	+4.7	58.2	+6.8
Amt-NeaC <sub>2</sub>	75.4	+8.9	64.3	+12.9
Amt-Azq	67.8	+1.3	56.1	+4.7

	T <sub>m</sub> +14	$\Delta T_m$	T <sub>m</sub> +16	$\Delta T_m$
Sense lligand	66.5	-	51.4	-
Amt-NeaC <sub>2</sub> ,NeaC <sub>2</sub>	67.9	+14.4	70.8	+11.2
Amt-NeaC <sub>2</sub> ,Azq	61.1	+7.6	66.3	+6.7
Amt-NeaC <sub>2</sub>	63.9	+10.4	69.4	+9.8
Amt-Azq	57.3	+3.8	61.8	+2.2

**Taula 12.** Temperatures de fusió ( $^\circ\text{C}$ ) dels RNAs wt, +3, +14 i +16, en presència i en absència d'1 eq dels lligands de segona generació.  $\Delta T_m$ : variació de T<sub>m</sub>, en presència i en absència de lligand.

Finalment, com s'ha comentat a l'apartat anterior, tot i que generalment sí que hi ha una bona correlació entre els valors d'afinitat i els corresponents  $\Delta T_m$ , en aquest grup de lligands doblement funcionalitzats s'han observat algunes discrepàncies. Per exemple, l'augment de l'estabilitat termodinàmica de l'RNA wt en presència d'Amt-NeaC<sub>2</sub>,NeaC<sub>2</sub> ( $\Delta T_m = +13.0^\circ\text{C}$ ) i d'Amt-NeaC<sub>2</sub> ( $\Delta T_m = +8.9^\circ\text{C}$ ) no es correspon amb la diferència observada entre els valors d'afinitat determinats per espectroscòpia de fluorescència, on ambdós lligands presenten valors molt similars ( $EC_{50} = 76.2$  i  $70.6$  nM, respectivament). Anàlogament, si comparem la capacitat estabilitzadora d'Amt-NeaC<sub>2</sub>,NeaC<sub>2</sub> ( $\Delta T_m = +13.0^\circ\text{C}$ ) i Amt-NeaC<sub>2</sub>G<sub>4</sub> ( $\Delta T_m = +12.0^\circ\text{C}$ ) sobre l'RNA wt amb els respectius valors d' $EC_{50}$  ( $76.2$  nM i  $57.2$  nM, respectivament), s'observa una tendència més aviat oposada. Tot i això, globalment podem concloure que tots els lligands de segona generació condueixen a un augment dels valors de T<sub>m</sub> dels oligoribonucleòtids, amb la qual cosa els converteix en compostos molt interessants per dur a terme estudis estructurals (**Figura 123**).



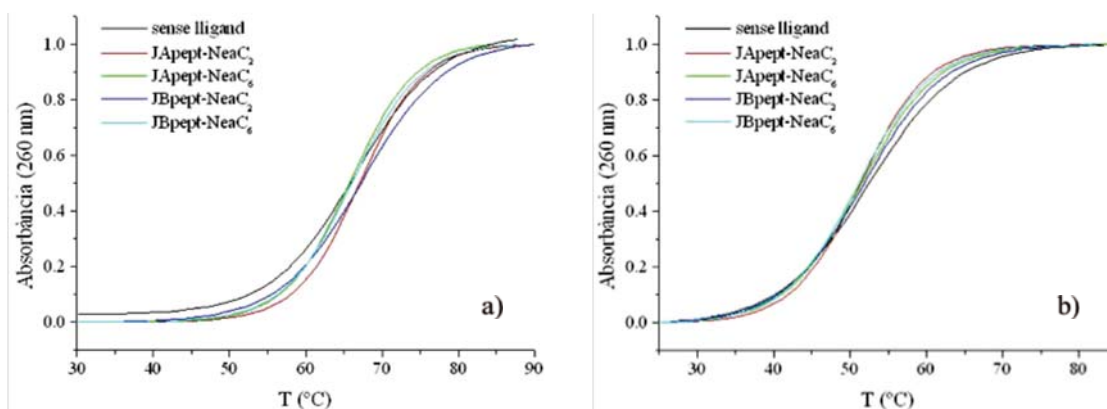
**Figura 123.** Diagrama de barres on es representen els increments  $\Delta T_m$  ( $^{\circ}\text{C}$ ) corresponents a l'efecte generat pels lligands derivats de l'ametrantrona de segona generació a les seqüències nativa (wt) i mutades (+3, +14 i +16): a) lligands Amt-Guanidinoneamina i b) lligands doblement funcionalitzats. Els lligands Amt-NeaC<sub>2</sub>, Amt-NeaC<sub>6</sub> i Amt-Azq s'indiquen per facilitar la comparació.

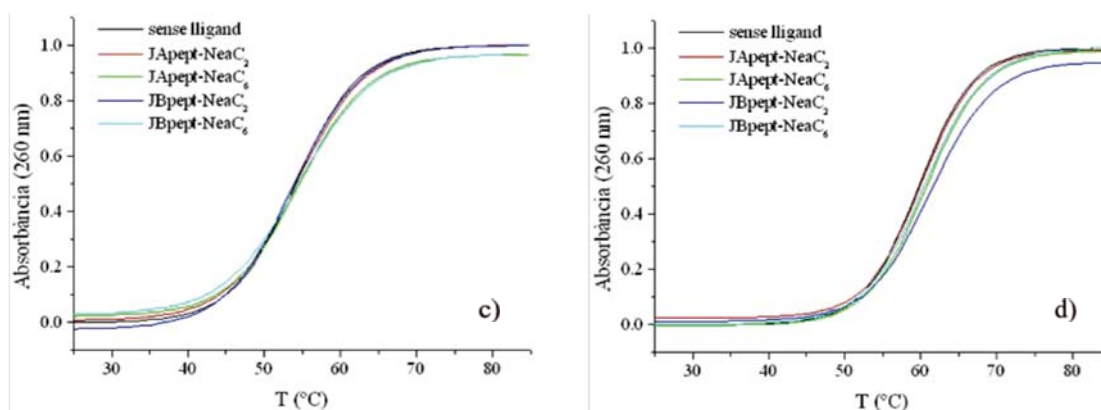
### 2.2.1.3 Efecte estabilitzant dels lligands Janus-Neamina/Guanidinoneamina

En aquest apartat s'exposen els resultats dels assaigs de desnaturalització tèrmica realitzats amb els lligands basats en la combinació dels fragments heteroaromàtics Janus amb la neamina i els dels seus anàlegs guanidinilats. Concretament, en dos subapartats s'exposa l'efecte estabilitzant, d'una banda, en les mateixes condicions emprades pels lligands derivats de l'ametrantrona (tampó 10 mM de fosfat de sodi a pH 6.8, 100 mM de NaCl i 0.1 mM de Na<sub>2</sub>EDTA) i, de l'altra, amb la concentració de ions Na<sup>+</sup> reduïda a la meitat (tampó 10 mM de fosfat de sodi a pH 6.8, 50 mM de NaCl i 0.1 mM de Na<sub>2</sub>EDTA).

#### 2.2.1.3a Estudi de l'efecte estabilitzant a 100 mM de NaCl

En primer lloc, se centrarà l'atenció en els lligands Janus-Neamina seleccionats prèviament als experiment de DCC (apartat 2.2.2 del capítol 1) (**Figura 124**).





**Figura 124.** Corbes de fusió dels oligoribonucleòtids wt (a), +3 (b), +14 (c) i +16 (d), en absència i en presència d'1 eq dels lligands Janus-Neamina.

A partir de l'anàlisi de les dades recollides a la **Taula 13**, podem concloure que aquest tipus de lligands, a diferència dels compostos derivats de l'ametrantrona, presenten una molt baixa o nul·la capacitat estabilitzadora sobre les dianes d'RNA nativa i mutades.

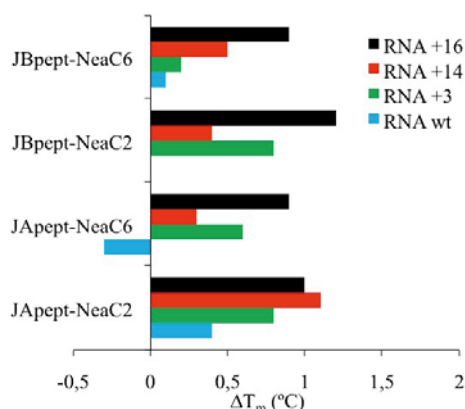
	$T_m$ wt	$\Delta T_m$	$T_m$ +3	$\Delta T_m$	$T_m$ +14	$\Delta T_m$	$T_m$ +16	$\Delta T_m$
Sense lligand	66.5	-	51.4	-	53.5	-	59.6	-
JApept-NeaC <sub>2</sub>	66.9	+0.4	52.2	+0.8	54.6	+1.1	60.6	+1.0
JApept-NeaC <sub>6</sub>	66.2	-0.3	52.0	+0.6	53.8	+0.3	60.5	+0.9
JBpept-NeaC <sub>2</sub>	66.5	0.0	52.2	+0.8	53.9	+0.4	60.6	+1.0
JBpept-NeaC <sub>6</sub>	66.6	+0.1	51.6	+0.2	54.0	+0.5	60.6	+1.0
Neamina	66.9	+0.4	51.5	+0.1	54.0	+0.5	60.1	+0.5
JApept-JApept	66.1	-0.4	51.3	-0.1	54.6	+1.1	60.6	+1.0
JBpept-JBpept	66.1	-0.4	51.5	+0.1	54.4	+0.9	60.6	+1.0

**Taula 13.** Temperatures de fusió (°C) dels oligoribonucleòtids wt, +3, +14 i +16, en presència i en absència dels lligands.  $\Delta T_m$ : variació de  $T_m$ , en presència i en absència de lligand.

La comparació dels valors de  $T_m$  dels lligands Janus-Nea amb el de neamina permet deduir que la unió de l'aminoglicòsid amb les molècules Janus, ja sigui JApept o JBpept, no genera cap estabilització significativa en cap de les dianes d'RNA analitzades. De fet, aquesta baixa capacitat estabilitzadora dels lligands Janus-Nea és comprensible si es té en compte la poca estabilització que imprimeix per sí sol l'aminoglicòsid neamina. A més, la incorporació dels fragments Janus i del pèptid, que haurien de generar únicament un increment d'enllaços d'hidrogen addicionals, té un efecte més reduït en l'estabilitat termodinàmica del dúplex que el fenomen de la intercalació, que té lloc als lligands derivats de l'ametrantrona. En aquest sentit, si tenim en compte les temperatures de fusió obtingudes amb l'RNA wt, s'observa novament una certa correlació entre les estabilitzacions generades pels lligands Janus-Nea i Amt-Nea ( $\Delta T_m = +8.9 - +6.4^\circ\text{C}$ ), i els resultats obtinguts als experiments de DCC (apartat 2.2.4 del capítol 1), ja que Amt-NeaC<sub>2</sub> s'amplifica entre 750 i 800 vegades més que els

l·ligands JApept-NeaC<sub>2</sub> i JBpept-NeaC<sub>2</sub>, i Amt-NeaC<sub>6</sub> al voltant d'unes 300 més que JApept-NeaC<sub>6</sub> i JBpept-NeaC<sub>6</sub>.

En segon terme, com es mostra al diagrama de barres de la **Figura 125**, malgrat que les estabilitzacions induïdes pels l·ligands Janus-Nea siguin poc significatives, és curiós que en el cas de la mutació +16 l'estabilització sigui lleugerament superior a la de les altres seqüències d'RNA ( $\Delta T_m \sim +1^\circ\text{C}$ ). Davant d'aquest resultat i tenint en compte que la mutació +16 suposa la formació d'un nou parell G-U desaparellat adjacent a l'adenina desaparellada del *bulge*, podem especular que aquest petit augment de  $T_m$  podria ser conseqüència del reconeixement d'aquest parell G-U per part del l·ligand Janus-Nea, tot i que caldria confirmar-ho a través d'un estudi estructural per RMN.

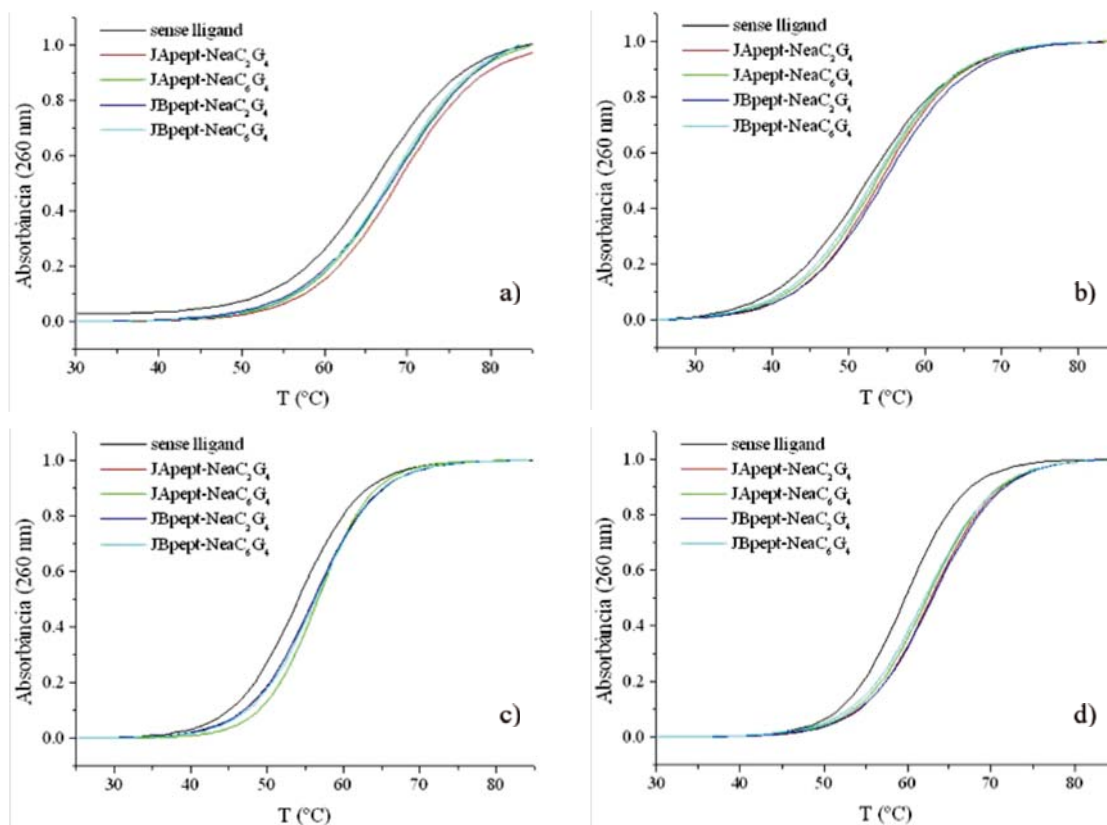


**Figura 125.** Diagrama de barres on es representen els increments  $\Delta T_m$  ( $^\circ\text{C}$ ) corresponents a l'efecte generat pels l·ligands Janus-Nea sobre les seqüències nativa (wt) i mutades (+3, +14 i +16).

Per últim, també cal comentar que, malgrat les baixes estabilitzacions induïdes pels l·ligands Janus-Nea a les seqüències nativa i mutades, això no necessàriament ha d'implacar que siguin l·ligands amb una baixa capacitat d'interacció amb l'RNA diana, ja que en el cas que ho fessin a la zona del solc major o al *loop* de l'estructura *stem-loop*, aquestes interaccions tindrien poc impacte sobre l'estabilitat termodinàmica del dúplex i, per tant, donarien lloc a valors de  $T_m$  poc elevats. Tot i això, el que sí que podem afirmar és que les condicions emprades en aquests assaigs (solució tampó 10 mM de fosfat de sodi a pH 6.8, 100 mM de NaCl i 0.1 mM de Na<sub>2</sub>EDTA) no semblen ser les idònies per avaluar aquest tipus de l·ligands, amb la qual cosa tal com s'exposarà més endavant (apartat 2.2.1.3b), ha calgut repetir l'avaluació en unes condicions més favorables.

Per altra banda, anàlogament als l·ligands derivats de l'ametrantrona, per aquesta família de compostos també es va considerar oportú estudiar l'efecte de la guanidinilació del fragment aminoglicosídic sobre la capacitat estabilitzant de les seqüències nativa i mutades (**Figura 126**).





**Figura 126.** Corbes de fusió dels oligoribonucleòtids wt (a), +3 (b), +14 (c) i +16 (d), en absència i en presència d'1 eq dels lligand Janus-Guanidinoneamina.

En primer lloc, cal comentar que la substitució de totes les funcions amino de la neamina per grups guanidini fa augmentar l'estabilitat termodinàmica al voltant de 2°C a totes les seqüències oligoribonucleotídiques, com per exemple el cas de l'estabilització de la seqüència nativa (**Taula 14**) en presència dels lligands JApept-NeaC<sub>2</sub>G<sub>4</sub> ( $\Delta T_m G = +1.6^\circ\text{C}$ ), JApept-NeaC<sub>6</sub>G<sub>4</sub> ( $\Delta T_m G = +2.2^\circ\text{C}$ ), JBpept-NeaC<sub>2</sub>G<sub>4</sub> ( $\Delta T_m G = +2.1^\circ\text{C}$ ) i JBpept-NeaC<sub>6</sub>G<sub>4</sub> ( $\Delta T_m G = +1.0^\circ\text{C}$ ). A més, a la majoria dels casos aquest efecte és superior al generat a través de la guanidinilació de l'aminoglicòsid neamina ( $\Delta T_m G = +0.8 - +1.5^\circ\text{C}$ ), fet que indica que en la combinació Janus-Guanidinoneamina, el fragment heteroaromàtic Janus també exerceix un cert paper estabilitzador.

Altrament, és també destacable que en els compostos guanidinilats queda més clara la influència de la longitud de l'espaiador que uneix els dos fragments, ja que, a excepció de la seqüències nativa i la mutada +14, on pràcticament no s'observen diferències, a les mutades +3 i +16 els lligands amb l'espaiador més curt condueixen a valors de  $T_m$  lleugerament superiors. Per exemple, l'estabilitat termodinàmica del complex format entre la seqüència mutada +3 i el lligand JApept-NeaC<sub>2</sub>G<sub>4</sub> ( $\Delta T_m = +3.1^\circ\text{C}$ ) és superior a la del complex generat amb JApept-NeaC<sub>6</sub>G<sub>4</sub> ( $\Delta T_m = +1.9^\circ\text{C}$ ).

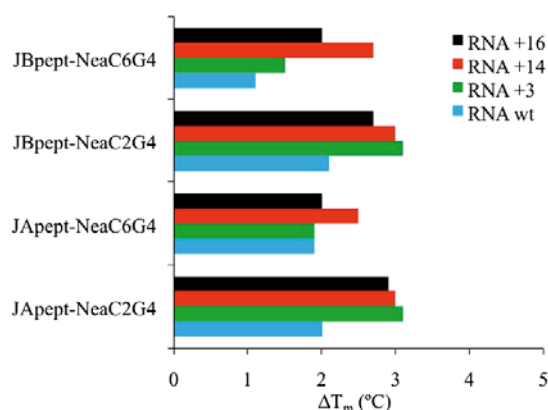


	$T_m$ wt	$\Delta T_m$	$\Delta T_{mG}$	$T_m$ +3	$\Delta T_m$	$\Delta T_{mG}$
Sense lligand	66.5	-	-	51.4	-	-
JApept-NeaC <sub>2</sub> G <sub>4</sub>	68.5	+2.0	+1.6	54.5	+3.1	+2.3
JApept-NeaC <sub>6</sub> G <sub>4</sub>	68.4	+1.9	+2.2	53.3	+1.9	+1.3
JBpept-NeaC <sub>2</sub> G <sub>4</sub>	68.6	+2.1	+2.1	54.5	+3.1	+2.3
JBpept-NeaC <sub>6</sub> G <sub>4</sub>	67.6	+1.1	+1.0	52.9	+1.5	+1.3
Neamina	66.9	+0.4	-	51.5	+0.1	-
NeaminaG <sub>4</sub>	67.7	+1.2	+0.8	52.8	+1.4	+1.3

	$T_m$ +14	$\Delta T_m$	$\Delta T_{mG}$	$T_m$ +16	$\Delta T_m$	$\Delta T_{mG}$
Sense lligand	53.5	-	-	59.6	-	-
JApept-NeaC <sub>2</sub> G <sub>4</sub>	56.6	+3.1	+2.0	62.5	+2.9	+1.9
JApept-NeaC <sub>6</sub> G <sub>4</sub>	56.0	+2.5	+2.2	61.6	+2.0	+1.1
JBpept-NeaC <sub>2</sub> G <sub>4</sub>	56.5	+3.0	+2.6	62.3	+2.7	+1.7
JBpept-NeaC <sub>6</sub> G <sub>4</sub>	56.2	+2.7	+2.2	61.6	+2.0	+1.0
Neamina	54.0	+0.5	-	60.1	+0.5	-
NeaminaG <sub>4</sub>	54.5	+1.0	+0.5	61.0	+1.4	+0.9

**Taula 14.** Temperatures de fusió (°C) dels RNAs wt, +3, +14 i +16, en presència i en absència dels lligands Janus-Guanidinoneamina.  $\Delta T_m$ : variació de  $T_m$ , en presència i en absència de lligand.  $\Delta T_{mG}$ : variació de temperatura entre la  $T_m$  d'un lligand guanidinilat i el seu anàleg sense guanidinilar.

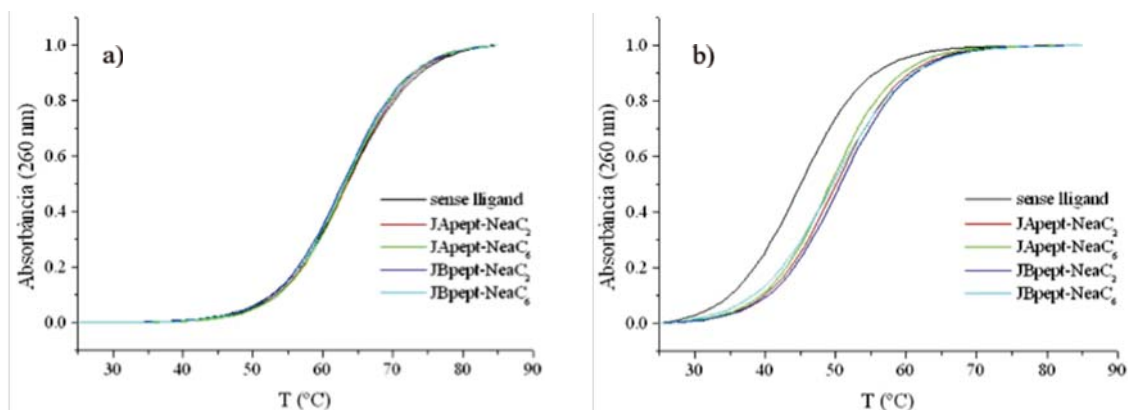
Globalment, doncs, podem concloure que la guanidinilació de l'aminoglicòsid neamina permet millorar la capacitat estabilitzant dels lligands Janus-Nea sobre les seqüències nativa i mutades (+3, +14 i +16) de l'RNA diana (**Figura 127**). En aquest punt és interessant comentar que, en general, les dues estructures Janus dissenyades per reconèixer parells G-U desaparellats tenen un comportament similar. A més, tal com s'ha comentat anteriorment, les baixes estabilitzacions en comparació amb els lligands Amt-Guanidinoneamina suggereixen un lloc d'interacció diferent, probablement el solc major o la regió del *loop* de l'estructura d'RNA diana. Tot i això, també és important remarcar el fet que a la seqüència mutada +16, els lligands Janus-Guanidinoneamina ( $\Delta T_m = +2.0 - +2.9^\circ\text{C}$ ) presenten una capacitat estabilitzadora del mateix ordre que els lligands Amt-Janus ( $\Delta T_m = +1.9 - +3.4^\circ\text{C}$ ).

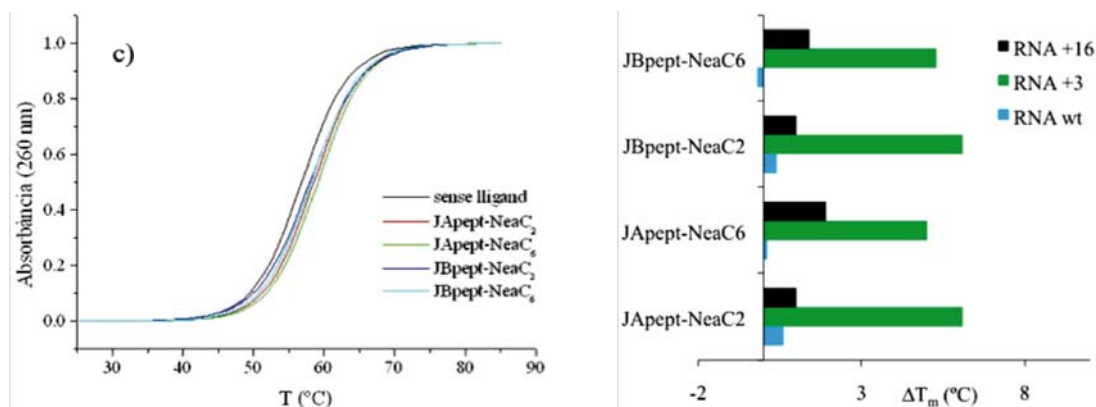


**Figura 127.** Diagrama de barres on es representen els increments  $\Delta T_m$  (°C) corresponents a l'efecte generat pels lligands Janus-Guanidinoneamina a les seqüències nativa (wt) i mutades (+3, +14 i +16).

### 2.2.1.3b Estudi de l'efecte estabilitzant a 50 mM de NaCl

Atès que les interaccions electrostàtiques tenen un paper fonamental en la interacció dels aminoglicòsids amb l'RNA, i la capacitat estabilitzadora dels lligands Janus-Nea sobre les diferents seqüències d'RNA era molt baixa ( $\Delta T_m \sim 0 - +1^\circ\text{C}$ ) a les combinacions descrites a l'apartat anterior, es va considerar oportú repetir els mateixos experiments, a una concentració 50 mM de NaCl (**Figura 128**). A més, també cal tenir en compte que la concentració de ions  $\text{Na}^+$  influeix notablement en l'estabilitat d'un oligonucleòtid.<sup>63,81,96,97</sup> En aquest cas, doncs, a més d'avaluar l'efecte dels lligands sobre la seqüència nativa, es van emprar la mutada +3, la menys estable, i la +16, que havia mostrat una estabilització lleugerament superior a les altres tres seqüències en presència dels lligands ( $\Delta T_m \sim +1^\circ\text{C}$ ). A més, és important remarcar que aquestes condicions salines són més properes a les condicions reals de l'interior de la cèl·lula ja que les concentracions de ions  $\text{Na}^+$  a l'interior i al medi extracel·lular són de l'ordre de 10 mM i 150 mM, respectivament.<sup>98</sup>





**Figura 128.** Corbes de fusió dels oligoribonucleòtids wt (a), +3 (b) i +16 (c), en absència i en presència d'1 eq dels lligands Janus-Neamina. Diagrama de barres on es representen els increments  $\Delta T_m$  (°C) corresponents a l'efecte estabilitzador dels lligands a les seqüències nativa (wt) i mutades +3 i +16.

En primer lloc, es van dur a terme els assaigs de desnaturalització tèrmica amb els lligands Janus-Neamina, la capacitat estabilitzadora dels quals es recull a la **Taula 15**.

	$T_m$ wt	$\Delta T_m$	$T_m$ +3	$\Delta T_m$	$T_m$ +16	$\Delta T_m$
Sense lligand	63.0	-	44.3	-	56.6	-
JApept-NeaC <sub>2</sub>	63.6	+0.6	50.4	+6.1	57.6	+1.0
JApept-NeaC <sub>6</sub>	63.1	+0.1	49.3	+5.0	58.5	+1.9
JBpept-NeaC <sub>2</sub>	63.4	+0.4	50.4	+6.1	57.6	+1.0
JBpept-NeaC <sub>6</sub>	62.8	-0.2	49.6	+5.3	58.0	+1.4
Neamina	62.8	-0.2	48.1	+3.8	56.8	+0.2

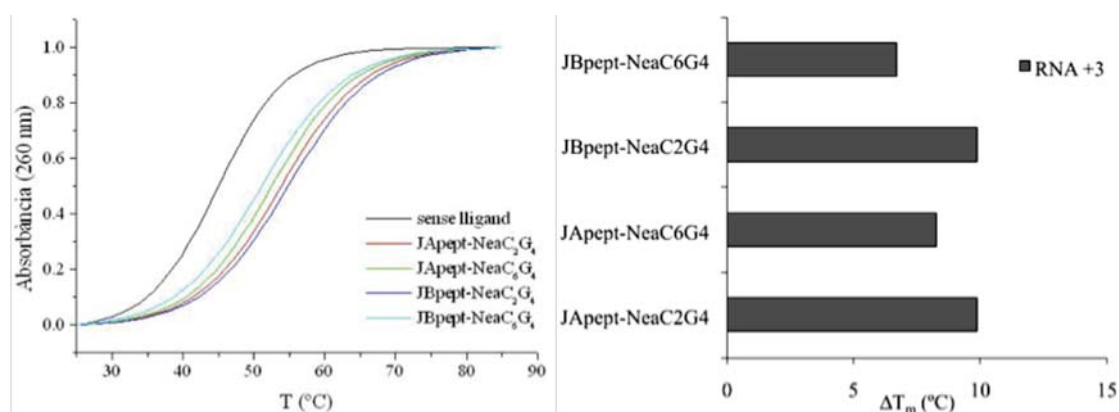
**Taula 15.** Temperatures de fusió (°C) dels RNAs wt, +3 i +16, en presència i en absència dels lligands a 10 mM de fosfat a pH 6.8, 50 mM de NaCl i 0.1 mM Na<sub>2</sub>EDTA.  $\Delta T_m$ : variació de  $T_m$ , en presència i en absència de lligand.

La comparació dels valors de  $T_m$  dels oligoribonucleòtids, en absència de lligand i a 50 mM de NaCl, amb els valors obtinguts, a 100 mM de NaCl (**Taula 13**), revelen que la disminució de la concentració de ions Na<sup>+</sup> ocasiona un descens de l'estabilitat de wt i +16 al voltant de 3°C, i d'uns 7°C en el cas de la seqüència mutada +3. Tot i això, aquest resultat no és estrany, ja que es redueixen les interaccions electrostàtiques favorables entre l'esquelet fosfat de l'oligonucleòtid, carregat negativament, i els ions Na<sup>+</sup> del medi. Per tant, des d'aquest punt de vista sembla normal que a la seqüència +3, en ser més inestable, tingui lloc la major disminució d'estabilitat termodinàmica. Ara bé, en presència dels lligands Janus-Nea, és interessant observar que es produeix un augment considerable de l'estabilitat termodinàmica de l'estructura +3 (de  $\Delta T_m = +0.2 - +0.8^\circ\text{C}$  en 100 mM NaCl a  $\Delta T_m = +5.0 - +6.1^\circ\text{C}$  en 50 mM NaCl). En canvi, a les seqüències wt ( $\Delta T_m = -0.3 - +0.4^\circ\text{C}$  en 100 mM NaCl a  $\Delta T_m = -0.2 - +0.4^\circ\text{C}$  en 50 mM NaCl) i a +16 ( $\Delta T_m = +1.0 - +1.9^\circ\text{C}$  en 100 mM NaCl a  $\Delta T_m = +0.9 - +1.0^\circ\text{C}$  en 50 mM NaCl) pràcticament no hi ha una variació significativa de l'efecte estabilitzant dels

l·ligands a 50 mM de NaCl i a 100 mM de NaCl. Aquest fet implica, doncs, que els l·ligands Janus-Nea podrien tenir certa selectivitat amb la seqüència mutada +3 respecte wt o +16.

Un altre aspecte important és l'efecte de la longitud de l'espaiador entre la neamina i el fragment Janus, ja que en aquest cas la tendència és oposada entre les seqüències wt i +3 respecte +16. Així, per exemple, els l·ligands amb l'espaiador de major longitud ( $\Delta T_m = +1.9$  i  $+1.4^\circ\text{C}$  per JApept-NeaC<sub>6</sub> i JBpept-NeaC<sub>6</sub>, respectivament) tenen una capacitat estabilitzadora de la seqüència +16 lleugerament superior als que contenen l'espaiador curt ( $\Delta T_m = +1.0$  i  $1.0^\circ\text{C}$  per JApept-NeaC<sub>6</sub> i JBpept-NeaC<sub>6</sub>, respectivament). Per contra, a la mutació +3, anàlogament a wt, els l·ligands amb l'espaiador més curt, JApept-NeaC<sub>2</sub> ( $\Delta T_m = +6.1^\circ\text{C}$ ) i JBpept-NeaC<sub>2</sub> ( $\Delta T_m = +6.1^\circ\text{C}$ ), indueixen una estabilització més gran que els de més longitud, JApept-NeaC<sub>6</sub> ( $\Delta T_m = +5.0^\circ\text{C}$ ) i JBpept-NeaC<sub>6</sub> ( $\Delta T_m = +5.3^\circ\text{C}$ ). En aquest context és interessant, doncs, observar que a l'RNA +3 existeix una bona correlació entre la capacitat estabilitzadora dels l·ligands JBpept-Nea i les afinitats determinades per fluorescència (apartat 1.3.2.2), ja que els que tenen l'espaiador més curt són més afins ( $EC_{50} = 213.4$  nM per JBpept-NeaC<sub>2</sub>) respecte els de major longitud ( $EC_{50} = 296.7$  nM per JBpept-NeaC<sub>6</sub>).

En segon lloc, en vista d'aquests resultats prometedors amb la seqüència +3, es va optar per avaluar l'efecte estabilitzador dels l·ligands guanidinilats a 50 mM de NaCl sobre la seqüència d'RNA +3 (**Figura 129**).



**Figura 129.** Corbes de fusió corresponents a l'oligoribonucleòtid +3 (esquerra), en presència i en absència d'1 eq dels l·ligands Janus-Guanidinoneamina. Diagrama de barres on es representen els increments  $\Delta T_m$  ( $^\circ\text{C}$ ) corresponent a l'efecte estabilitzador dels l·ligands a la seqüència +3 (dreta).

A partir de l'anàlisi dels valors de  $T_m$  de la **Taula 16**, es demostra que, tal com s'havia determinat a 100 mM de NaCl, la guanidinilació dels l·ligands Janus-Nea té un efecte positiu en l'estabilització de la seqüència mutada +3 quan els experiments es realitzen a una concentració 50 mM de NaCl, tot i que com era d'esperar, l'efecte estabilitzant és molt superior en reduir la concentració de ions  $\text{Na}^+$ . Ara bé, en aquest sentit cal destacar la diferència entre les estabilitzacions de JBpept-NeaC<sub>6</sub>G<sub>4</sub> ( $\Delta T_mG = +1.4^\circ\text{C}$ ) i la resta de l·ligands ( $\Delta T_mG = +3.3 - +3.8^\circ\text{C}$ ). A més, el fet que en aquest cas també s'observi que la capacitat estabilitzant dels l·ligands és pràcticament el doble que la de la neamina

guanidinilada ( $\Delta T_m G = +2^\circ\text{C}$ ), suggereix que els fragments Janus en aquest tipus de lligands tenen un paper actiu, tal com també s'havia observat a 100 mM de NaCl.

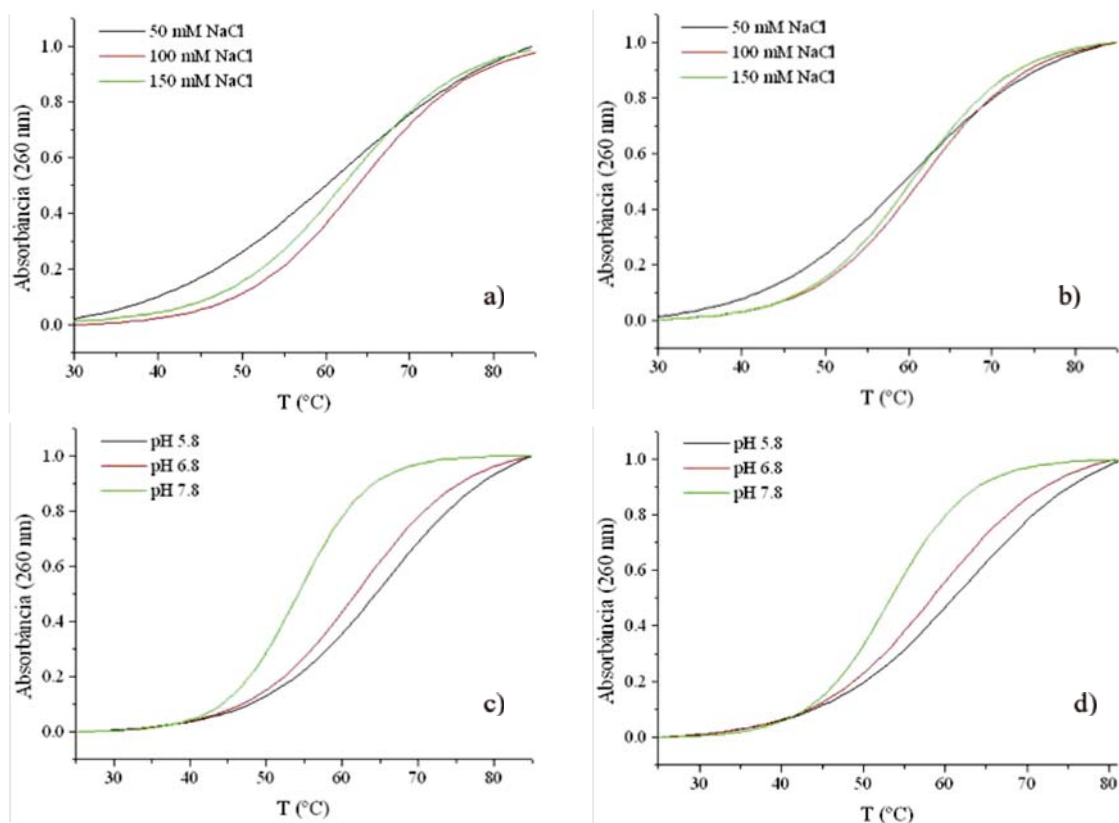
	$T_m +3$	$\Delta T_m$	$\Delta T_m G$
Sense lligand	44.3	-	-
JApept-NeaC <sub>2</sub> G <sub>4</sub>	54.2	+9.9	+3.8
JApept-NeaC <sub>6</sub> G <sub>4</sub>	52.6	+8.3	+3.3
JBpept-NeaC <sub>2</sub> G <sub>4</sub>	54.2	+9.9	+3.8
JBpept-NeaC <sub>6</sub> G <sub>4</sub>	51.0	+6.7	+1.4
NeaminaG <sub>4</sub>	50.1	+5.8	+2.0

**Taula 16.** Temperatures de fusió ( $^\circ\text{C}$ ) de l'oligoribonucleòtid +3, en presència i en absència de lligands a 10 mM de fosfat a pH 6.8, 50 mM de NaCl i 0.1 mM Na<sub>2</sub>EDTA.  $\Delta T_m$ : variació de  $T_m$ , en presència i en absència de lligand.  $\Delta T_m G$ : variació de temperatura entre la  $T_m$  d'un lligand guanidinilat i el seu anàleg sense guanidinilar.

Un altre conclusió destacable és que la guanidinilació de l'aminoglicòsid no modifica l'efecte de la longitud de l'espaiador observat a Janus-Nea, sinó que sembla accentuar-lo, especialment en el cas de Janus B. Així doncs, els lligands amb l'espaiador més curt, JApept-NeaC<sub>2</sub>G<sub>4</sub> ( $\Delta T_m = +9.9^\circ\text{C}$ ) i JBpept-NeaC<sub>2</sub>G<sub>4</sub> ( $\Delta T_m = +9.9^\circ\text{C}$ ) generen valors de  $T_m$  lleugerament superiors als lligands JApept-NeaC<sub>6</sub>G<sub>4</sub> ( $\Delta T_m = +8.3^\circ\text{C}$ ) i JBpept-NeaC<sub>6</sub>G<sub>4</sub> ( $\Delta T_m = +6.7^\circ\text{C}$ ), on la separació entre ambdós fragments és més llarga. A més, en aquest cas, anàlogament als lligands JBpept-Nea, també s'ha pogut constatar una bona correlació entre els valors d'afinitat (apartat 1.3.2.2,  $EC_{50} = 122.8$  nM per JBpept-NeaC<sub>2</sub>G<sub>4</sub> i  $EC_{50} = 216.2$  nM per JBpept-NeaC<sub>6</sub>G<sub>4</sub>) i la seva capacitat estabilitzant.

### 2.2.2 Estudi de la influència de la concentració de Na<sup>+</sup> i del pH en els valors de $T_m$ dels lligands Ametantrona-Neamina

En conjunt, els resultats dels experiments de DCC i dels assaigs d'afinitat i d'estabilitat amb la seqüència nativa de l'RNA diana indiquen que la combinació ametantrona i neamina produeix lligands amb una bona afinitat, de l'ordre nanomolar ( $EC_{50} \sim 70\text{-}80$  nM), i amb una gran capacitat estabilitzadora ( $\Delta T_m \sim 6\text{-}9^\circ\text{C}$ ), que, en part, es pot atribuir a la tendència de l'aminoglicòsid per interaccionar electrostàticament amb l'RNA. A més, la millora d'aquestes propietats, en particular l'augment de la capacitat estabilitzant com a conseqüència de la substitució dels quatre grups amino per grups guanidini, molt més bàsics i amb major capacitat electrostàtica, reafirma el paper clau de l'aminoglicòsid als lligands derivats de l'ametantrona. Per tant, en aquest apartat s'ha plantejat com a objectiu aprofundir en la funció de les interaccions electrostàtiques en la formació del complex format pels lligands Amt-Nea i l'RNA, tenint en compte, d'una banda, els resultats anteriorment obtinguts amb els lligands Janus-Nea a 50 mM de NaCl i, de l'altra, la coneguda dependència de la temperatura de fusió ( $T_m$ ) amb el pH i la força iònica del medi (**Figura 130**), tal com es troba àmpliament descrit a la bibliografia.<sup>63,81,96</sup>



**Figura 130.** Corbes de fusió de l'oligoribonucleòtid +3, en presència i en absència del lligand Amt-NeaC<sub>2</sub> a diferents concentracions de NaCl (a) i a diferents pH 5.8, 6.8 i 7.8 (b), i del lligand Amt-NeaC<sub>6</sub> a diferents concentracions de NaCl (c) i a diferents pH 5.8, 6.8 i 7.8 (d).

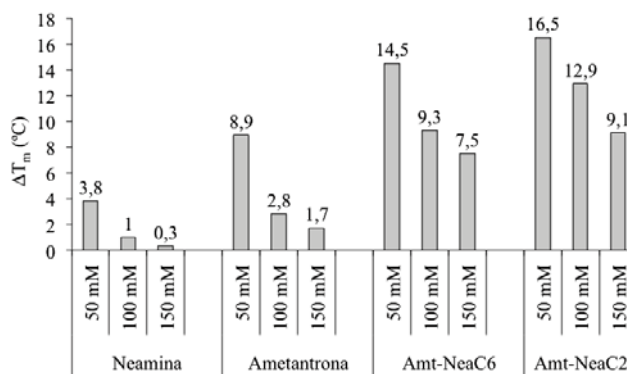
A continuació, a la **Taula 17** s'exposen els resultats de l'avaluació de la influència de la força iònica sobre la capacitat estabilitzadora dels lligands Amt-NeaC<sub>2</sub> i Amt-NeaC<sub>6</sub> sobre la seqüència mutada +3, mantenint el pH constant (10 mM tampò fosfat a pH 6.8).

	50 mM NaCl		100 mM NaCl		150 mM NaCl	
	T <sub>m</sub> +3	ΔT <sub>m</sub>	T <sub>m</sub> +3	ΔT <sub>m</sub>	T <sub>m</sub> +3	ΔT <sub>m</sub>
Sense lligand	44.3	-	51.4	-	52.5	-
Amt-NeaC <sub>2</sub>	60.9	+16.5	64.3	+12.9	61.6	+9.1
Amt-NeaC <sub>6</sub>	58.8	+14.5	60.7	+9.3	60.0	+7.5
Ametantrona	53.2	+8.9	54.2	+2.8	54.1	+1.7
Neamina	48.1	+3.8	51.5	+0.1	52.8	+0.3

**Taula 17.** Temperatures de fusió (°C) de l'RNA +3, en presència i en absència d'1 eq dels lligands en 10 mM de fosfat a pH 6.8, 0.1 mM Na<sub>2</sub>EDTA a diferents concentracions de NaCl. ΔT<sub>m</sub>: variació de T<sub>m</sub>, en presència i en absència de lligand.

Un primer fet destacable és que en augmentar la concentració de ions Na<sup>+</sup>, s'incrementa progressivament l'estabilitat termodinàmica de l'oligoribonucleòtid +3. Aquest comportament, típicament observat als àcids nucleics, es produeix perquè la gran

densitat de càrrega negativa de l'oligonucleòtid provoca que el seu entorn iònic exerceixi molta influència en la seva estabilitat.<sup>97</sup> En el cas d'un complex entre l'RNA i un lligand amb capacitat per establir interaccions electrostàtiques amb els grups fosfats, existeix certa competència amb els ions del medi, de manera que a baixa concentració de ions  $\text{Na}^+$  el lligand policationic podrà interaccionar amb l'RNA per formar un complex més estable.<sup>63b,97</sup> Per tant, des d'aquest punt de vista, és lògic que a una concentració 50 mM de NaCl, els lligands Amt-NeaC<sub>2</sub> ( $\Delta T_m = +16.5^\circ\text{C}$ ) i Amt-NeaC<sub>6</sub> ( $\Delta T_m = +14.5^\circ\text{C}$ ) tinguin una capacitat estabilitzant major que a una concentració 100 mM ( $\Delta T_m = +12.9^\circ\text{C}$  i  $+9.3^\circ\text{C}$ , respectivament). En canvi, a 150 mM, l'efectivitat dels lligands es veu dràsticament reduïda per la gran quantitat de càrrega positiva present al medi. En aquest cas, els lligands segueixen actuant com a polications, però el seu gran tamany respecte els ions  $\text{Na}^+$  provoca que les interaccions electrostàtiques es vegin contrarrestades (**Figura 131**). Aquest mateix comportament el trobem en l'aminoglicòsid neamina, on la seva capacitat estabilitzant a 50 mM de NaCl és gairebé quatre vegades superior que a 100 mM de NaCl.



**Figura 131.** Diagrama de barres on es representen els increments  $\Delta T_m$  ( $^\circ\text{C}$ ) corresponents a l'efecte generat pels lligands Amt-Nea, juntament amb els monòmers Neamina i Ametantrona, en diferents concentracions de NaCl a un pH constant de 6.8.

Una altra dada destacable és el fet que el fragment Amt per si sol, a més d'interaccionar com a agent intercalant, també té un cert comportament electrostàtic en la seva interacció amb l'RNA, ja que la seva capacitat estabilitzant és també molt dependent de la concentració salina del medi. De fet, aquest resultat no és gens sorprenent atès que és d'esperar que la interacció dels grups amino dels dos braços de l'amentantrona amb l'RNA tinguin un paper important, com ja el tenen al seu anàleg mitoxantrona.<sup>2</sup>

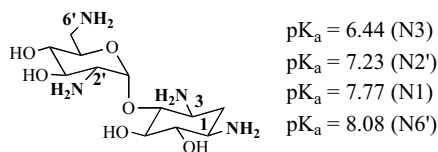
En segon lloc, un cop comprovada la influència de la força iònica en l'estabilització de l'RNA +3 per part dels lligands derivats de l'amentantrona, es va estudiar l'efecte del pH. Concretament, es van enregistrar les corbes de fusió dels lligands Amt-NeaC<sub>2</sub>, Amt-NeaC<sub>6</sub> i Amt-Azq a pH 5.8 i 7.8, mantenint constant la concentració de ions  $\text{Na}^+$  (100 mM NaCl) (**Taula 18**).

	pH 5.8		pH 6.8		pH 7.8	
	T <sub>m</sub> +3	ΔT <sub>m</sub>	T <sub>m</sub> +3	ΔT <sub>m</sub>	T <sub>m</sub> +3	ΔT <sub>m</sub>
Sense lligand	52.4	-	51.4	-	50.9	-
Amt-NeaC <sub>2</sub>	64.6	+12.2	64.3	+12.9	54.6	+3.8
Amt-NeaC <sub>6</sub>	62.5	+10.1	60.7	+9.3	53.4	+2.6
Amt-Azq	57.4	+5.0	56.1	+4.7	51.6	+0.7
Ametantrona	55.6	+3.2	54.2	+2.8	51.9	+1.0

**Taula 18.** Temperatures de fusió (°C) de l'RNA +3, en presència i en absència dels lligands a 100 mM de NaCl, 0.1 mM Na<sub>2</sub>EDTA i 10 mM de fosfat a pH 5.8, 6.8 i 7.8. ΔT<sub>m</sub>: variació de T<sub>m</sub>, en presència i en absència de lligand.

L'anàlisi dels valors recollits a la **Taula 18** indica que, en general, l'augment del pH del medi redueix l'efecte estabilitzant dels lligands estudiats, especialment a pH 7.8. En el cas de l'ametnantrona, s'observa que entre pH 5.8 i 6.8 la variació d'ΔT<sub>m</sub> és molt lleu, mentre que de 6.8 a 7.8 el canvi és molt més pronunciat. Aquest resultat, torna a evidenciar la importància de les interaccions electrostàtiques dels grups amino dels dos braços antraquinònics en l'estabilització del complex amb l'RNA. És per això que, a pH 7.8, en augmentar la proporció de l'espècie neutra, l'efecte estabilitzant és molt més baix, fet també atribuïble a la no intercalació a la zona del *bulge*. Probablement, les interaccions electrostàtiques no es deuen veure minvades quan el pH passa de 5.8 a 6.8, ja que no hi ha una gran disminució de la capacitat estabilitzant (ΔT<sub>m</sub> = +2.8°C a pH 6.8 respecte ΔT<sub>m</sub> = +3.2°C a pH 5.8). En canvi, a pH 7.8, el descens és molt més important (ΔT<sub>m</sub> = +1.0°C), fet que suggereix que el valor de pK<sub>a</sub> dels grups amino deu estar al voltant de 8, tal com es troba descrit per la mitoxantrona (pK<sub>a1</sub> = 7.34 i pK<sub>a2</sub> = 8.00).<sup>99</sup> Així doncs, el conjunt d'aquests resultats indiquen que el fragment Amt, a més del seu caràcter intercalant, té un component iònic en la interacció amb l'RNA.

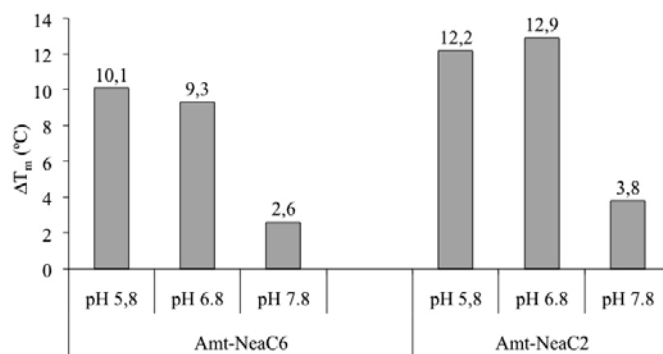
En el cas d'Amt-Azq, s'observa un comportament molt similar al de l'ametnantrona, fet que suggereix que l'estat de protonació de l'azaquinolona no varia en aquest rang de pH i, per tant, l'efecte del pH sobre la capacitat estabilitzadora del lligand és només atribuïble a l'ametnantrona. En canvi, als lligands Amt-Nea l'estat de protonació de l'aminoglicòsid té un paper fonamental sobre la capacitat estabilitzadora d'aquests tipus de compostos. A la **Figura 132** es mostren els valors de pK<sub>a</sub> dels quatre grups NH<sub>2</sub>, segons es recull a la bibliografia,<sup>100</sup> i que s'han emprat per discutir els resultats obtinguts amb aquests lligands.



**Figura 132.** Estructura de la Neamina on s'indiquen els valors de pK<sub>a</sub> dels quatre grups amino, determinats mitjançant <sup>1</sup>H RMN en D<sub>2</sub>O a 25°C.<sup>100</sup>



A partir d'aquests valors de  $pK_a$ , sembla coherent, doncs, que a pH 5.8 l'estabilització induïda a la seqüència mutada +3 per part dels lligands Amt-NeaC<sub>2</sub> ( $\Delta T_m = +12.2^\circ\text{C}$ ) i Amt-NeaC<sub>6</sub> ( $\Delta T_m = +10.1^\circ\text{C}$ ) sigui molt gran, ja que a aquest pH tots els grups amino de l'aminoglicòsid estan protonats i, per tant, l'efecte estabilitzant atribuïble a les interaccions electrostàtiques serà màxim. A pH 6.8, no hi ha un gran canvi en la capacitat estabilitzadora dels lligands, malgrat que el grup amino N3 ( $pK_a = 6.44$ ) només estigui parcialment protonat. El fet que a aquest pH l'efecte estabilitzador d'Amt-NeaC<sub>6</sub> es vegi lleugerament reduït ( $-0.8^\circ\text{C}$ ) i, en canvi, a Amt-NeaC<sub>2</sub> augmenti ( $+0.7^\circ\text{C}$ ), sembla indicar que el grup amino 6' té un paper diferent a la interacció amb l'RNA. En canvi, a pH 7.8 la capacitat estabilitzadora dels lligands es veu molt afectada. En aquest cas, com que el valor del pH és molt similar al  $pK_a$  dels grups amino N1 ( $pK_a = 7.77$ ) i N6' ( $pK_a = 8.08$ ), hi haurà aproximadament un 50% de l'espècie neutre, mentre que pels grups amino N3 i N2' serà superior. És per això que, en aquestes condicions, la pèrdua de caràcter electrostàtic del lligand es tradueix en una gran reducció de la capacitat estabilitzant ( $\Delta T_m = +3.8^\circ\text{C}$  per Amt-NeaC<sub>2</sub> i  $\Delta T_m = +2.6$  per Amt-NeaC<sub>6</sub>) (**Figura 133**).



**Figura 133.** Diagrama de barres on es representen els increments  $\Delta T_m$  ( $^\circ\text{C}$ ) corresponent a l'efecte generat pels lligands Amt-NeaC<sub>2</sub> i Amt-NeaC<sub>6</sub> a diferents valors de pH.

En conclusió, ambdós estudis indiquen que en els lligands derivats de l'ametatrona les interaccions electrostàtiques tenen una funció destacada sobre la seva capacitat estabilitzadora, particularment als compostos Amt-NeaC<sub>2</sub> i Amt-NeaC<sub>6</sub>, on la neamina exerceix un paper destacat. Tot i això, també s'ha pogut verificar que les interaccions electrostàtiques també tenen un paper rellevant a la interacció del fragment antraquinònic amb l'RNA.

### **3 Estudis estructurals dels complexos RNA-ligand**

---

Una de les principals limitacions en el desenvolupament de nous agents terapèutics basats en lligands d'RNA ha estat la poca informació disponible sobre els principis que governen el reconeixement molecular de l'RNA per part de molècules petites, fet que ha dificultat el disseny *de novo* de lligands basats en estudis estructurals. Ara bé, en els últims 15 anys l'aparició de diversos treballs centrats en aquest camp ha permès adquirir nous coneixements i aprofundir en el procés d'interacció entre les molècules petites i l'RNA, com per exemple els treballs realitzats per Varani i col·laboradors<sup>1,2,4</sup> sobre l'estructura secundària involucrada en el processat alternatiu del pre-mRNA de la proteïna tau (Introducció, apartat 2.2.2). Concretament, l'estudi estructural del seu complex amb molècules petites, com ara la neomicina B i la mitoxantrona, han estat clau per recolzar la rellevància terapèutica d'aquesta diana d'RNA i per assentar-ne les bases del disseny de nous lligands. Així doncs, basant-nos en aquests estudis de Varani i col·laboradors<sup>1,2,4</sup> i en el treball prèvi realitzat al nostre grup d'investigació,<sup>3</sup> un cop determinada l'afinitat, l'especificitat i la capacitat estabilitzadora dels lligands amb aquesta estructura d'RNA, es va considerar molt interessant obtenir informació sobre el lloc d'unió i el mode d'interacció dels compostos derivats de l'ametrantrona amb la seqüència nativa de l'RNA diana mitjançant l'espectroscòpia d'UV-Visible i de fluorescència, i la ressonància magnètica nuclear (RMN).

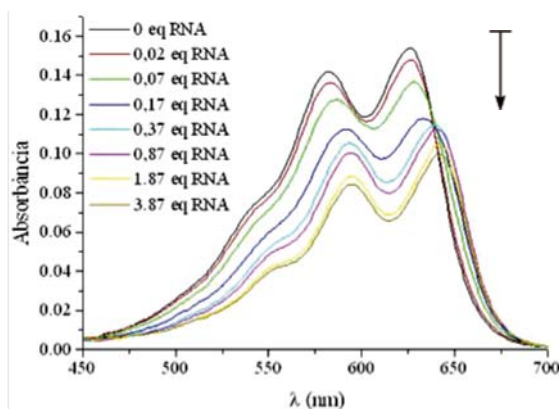
#### **3.1 Estudi estructural per espectroscòpia d'UV-Visible i de Fluorescència**

Quan els compostos aromàtics s'uneixen a macromolècules com els àcids nucleics, es produeixen variacions al seu sistema electrònic que generen alteracions als seus espectres d'absorció o d'emissió de fluorescència. És per això que l'avaluació d'aquests canvis representa una eina molt útil per obtenir informació sobre el mode d'interacció amb els àcids nucleics.<sup>101</sup>

Cal comentar que en aquests estudis únicament s'ha analitzat la interacció dels lligands que contenen el fragment Amt, tant els seleccionats per DCC com els de segona

generació, atès que l'ametrantrona presenta uns espectres d'UV-Vis i de fluorescència característics que permeten avaluar la seva interacció amb la diana nativa d'RNA, ja que aquesta no presenta absorbància a la zona del visible (450 – 700 nm) ni emissió de fluorescència. El procediment experimental, descrit a Materials i Mètodes (apartats 5.3.1 i 5.3.2), es va dur a terme mitjançant l'enregistrament dels espectres d'absorció a la zona visible i d'emissió de fluorescència dels lligands després de l'addició de quantitats creixents d'oligoribonucleòtid.

Pel que fa a l'estudi per espectroscòpia d'UV-Visible, inicialment es va dur a terme la valoració del compost ametrantrona amb l'RNA diana com a control. Tal com es mostra a la **Figura 134**, l'Amt presenta dos màxims d'absorció ben definits al voltant de 582 i 626 nm. En iniciar l'addició de quantitats creixents d'RNA wt, es va observar un desplaçament d'ambdós màxims d'absorció cap a longituds d'ona més grans i un descens de la intensitat de les dues bandes. Per exemple, després de l'addició d'un total de 0.17 eq d'RNA es va produir un efecte hipocròmic del 23 % i un desplaçament batocròmic de 7 nm. Quan la relació RNA/Amt va augmentar fins a 0.37, malgrat que la disminució d'absorbància va ser menys pronunciada, l'efecte batocròmic fou pràcticament el doble i es van establir dos nous màxims d'absorció a 593 i a 641 nm. A partir d'aquest punt de la valoració, tot i la presència d'un excés de fins a gairebé 4 eq d'RNA, els efectes generats van ser poc significatius.

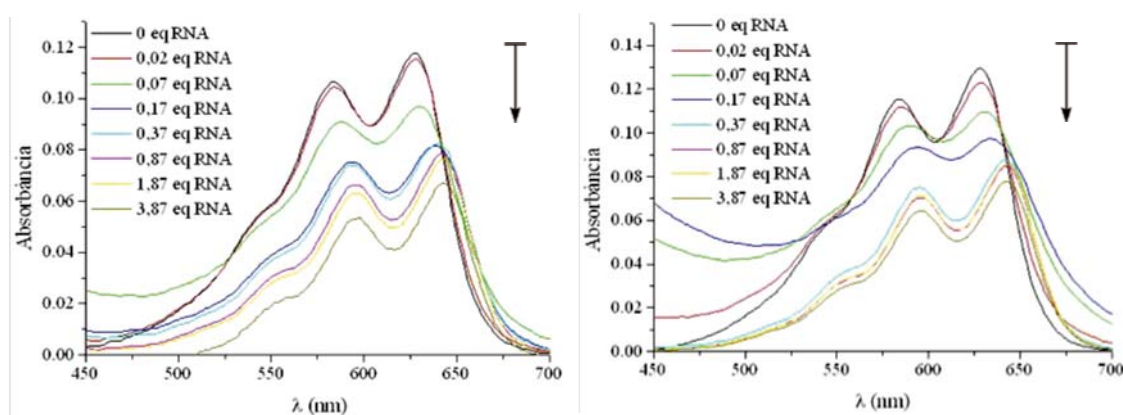


**Figura 134.** Espectres d'absorció del visible d'una dissolució 10 µM d'ametrantrona, en absència i en presència de quantitats creixents d'RNA wt. Les quantitats indicades corresponen al nombre d'equivalents total d'RNA presents a cada moment de l'addició. La direcció de la fletxa indica la disminució de l'absorbància.

En el cas dels lligands Amt-NeaC<sub>2</sub> i Amt-NeaC<sub>6</sub>, els canvis produïts fins a l'addició de 0.17 eq d'RNA van ser força més pronunciats, on l'efecte hipocròmic va representar un 25-30 % i el desplaçament batocròmic va ser entre 8 i 10 nm. En afegir quantitats més grans d'RNA es va reproduir el comportament observat pel monòmer Amt, tot i que l'hipocromisme (35-43%) i l'efecte batocròmic (de fins a 15 nm) van ser més accentuats. Es van establir els dos nous màxims d'absorció a 596 i 643 nm (**Figura 135**). Aquests efectes en conjunt, tot i que als lligands Amt-Nea han estat més pronunciats, s'observen típicament en compostos que s'intercalen entre parells de bases del DNA o de l'RNA, ja que en apropar-se a les nucleobases es produeixen canvis en el

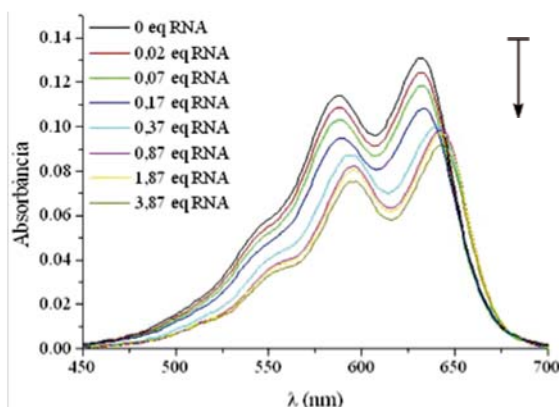
seu sistema electrònic.<sup>102</sup> Per tant, des d'aquest punt de vista podem afirmar que tant l'ametrantrona com el seus derivats Amt-NeaC<sub>2</sub> i Amt-NeaC<sub>6</sub> interaccionen per intercalació o, com a mínim, per apilament (*stacking*) amb l'RNA diana. Ara bé, malgrat que aquests resultats no són una evidència suficient per ubicar-ne exactament la seva zona d'unió, el fet que estigui descrit que la mitoxantrona s'intercala al parell de bases G-C adjacent a la regió del *bulge*<sup>2</sup> fa pensar en aquesta regió com un lloc d'unió molt probable per l'ametrantrona i pels seus lligands derivats Amt-Nea.

Per altra banda, les alteracions observades a l'espectre del visible del cromòfor també permeten establir un cert paral·lelisme amb l'afinitat dels compostos. És a dir, els efectes hipocròmics més forts en presència de poca quantitat d'RNA són un signe de la gran capacitat d'interacció del lligand, resultat que va d'acord amb la major afinitat dels lligands Amt-Nea ( $EC_{50} = 70.8 - 78.8$  nM) respecte Amt ( $EC_{50} = 231.8$  nM).



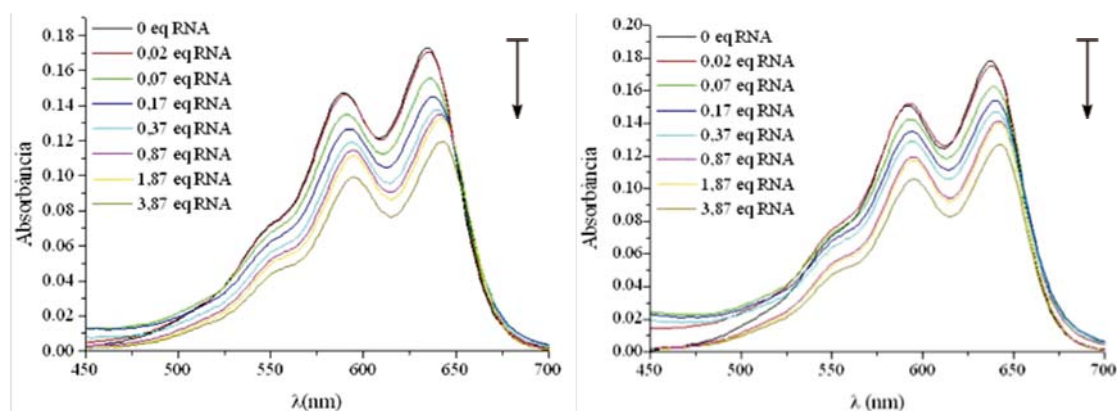
**Figura 135.** Espectres d'absorció del visible d'una dissolució 8.4  $\mu$ M d'Amt-NeaC<sub>2</sub> (esquerra) i 8.4  $\mu$ M d'Amt-NeaC<sub>6</sub> (dreta), en absència i en presència de quantitats creixents d'RNA wt. Les quantitats indicades corresponen al nombre d'equivalents total d'RNA present a cada moment de l'addició. La direcció de la fletxa indica la disminució de l'absorbància.

Pel que fa als lligands Amt-Azq i Amt-Janus, les valoracions han mostrat un comportament molt similar al del monòmer Amt, fet que suggereix que el fragment d'antraquinona en aquests lligands interacciona de forma similar també amb l'RNA. A més, tal com s'observa a la **Figura 136**, els espectres d'absorció obtinguts per Amt-Azq són molt semblants als de l'ametrantrona sola, amb efectes hipocròmics i batocròmics similars, fet poc sorprenent atesa la semblança entre els corresponents valors d'afinitat d'ambdós compostos ( $EC_{50} = 162.5$  nM per Amt-Azq i  $EC_{50} = 231.8$  nM per Amt).



**Figura 136.** Espectres d'absorció del visible d'una dissolució 8.4  $\mu\text{M}$  d'Amt-Azq en absència i en presència de quantitats creixents d'RNA wt. Les quantitats indicades corresponen al nombre d'equivalents total d'RNA present a cada moment de l'addició. La direcció de la fletxa indica la disminució de l'absorbància.

I, per últim, les valoracions dels lligands Amt-JApept i Amt-JBpept, amb valors d'afinitat molt semblants ( $EC_{50} = 288.5$  nM per Amt-JApept i  $EC_{50} = 318.2$  nM per Amt-JBpept), han mostrat perfils pràcticament idèntics, on els efectes hipocròmics i batocròmics són una mica menys pronunciats.

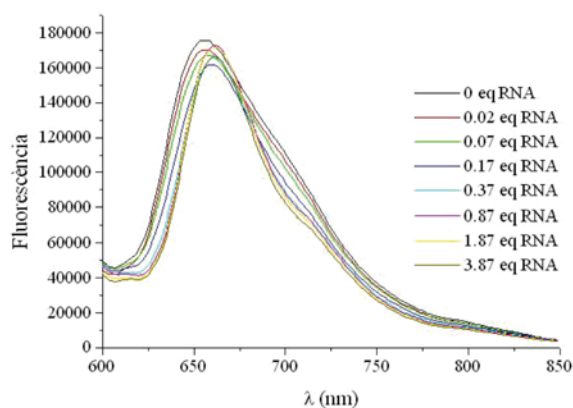


**Figura 137.** Espectres d'absorció del visible d'una dissolució 8.4  $\mu\text{M}$  de JApept-Amt (esquerra) i 8.4  $\mu\text{M}$  d'JBpept-Amt (dreta), en absència i en presència de quantitats creixents d'RNA wt. Les quantitats indicades corresponen al nombre d'equivalents total d'RNA present a cada moment de l'addició. La direcció de la fletxa indica la disminució de l'absorbància.

Un cop realitzades les valoracions d'UV-visible, també es va plantejar dur a terme l'estudi de la interacció dels lligands derivats de l'amantrona amb l'RNA diana mitjançant valoracions de fluorescència, en les quals, anàlogament a les valoracions UV-Visible, també s'addicionen quantitats creixents d'RNA sobre una solució de lligand (apartat 5.3.2 de Materials i Mètodes). En aquest cas, quan s'excita l'amantrona i els seus derivats a 547 nm, s'observa la presència d'un màxim d'emissió de fluorescència al voltant de 656 nm, tot i que en alguns casos es desplaça

lleugerament cap a longituds d'ona més grans. En general, durant les valoracions es va observar un descens de la intensitat de la fluorescència, fet que també s'atribueix a la intercalació del fragment heteroaromàtic.<sup>102</sup> A continuació, s'exposen a grans trets els canvis en la intensitat i en el desplaçament dels màxims d'emissió de fluorescència observats pels diferents lligands derivats de l'ametnantrona, tant els seleccionats als experiments de DCC com els de segona generació.

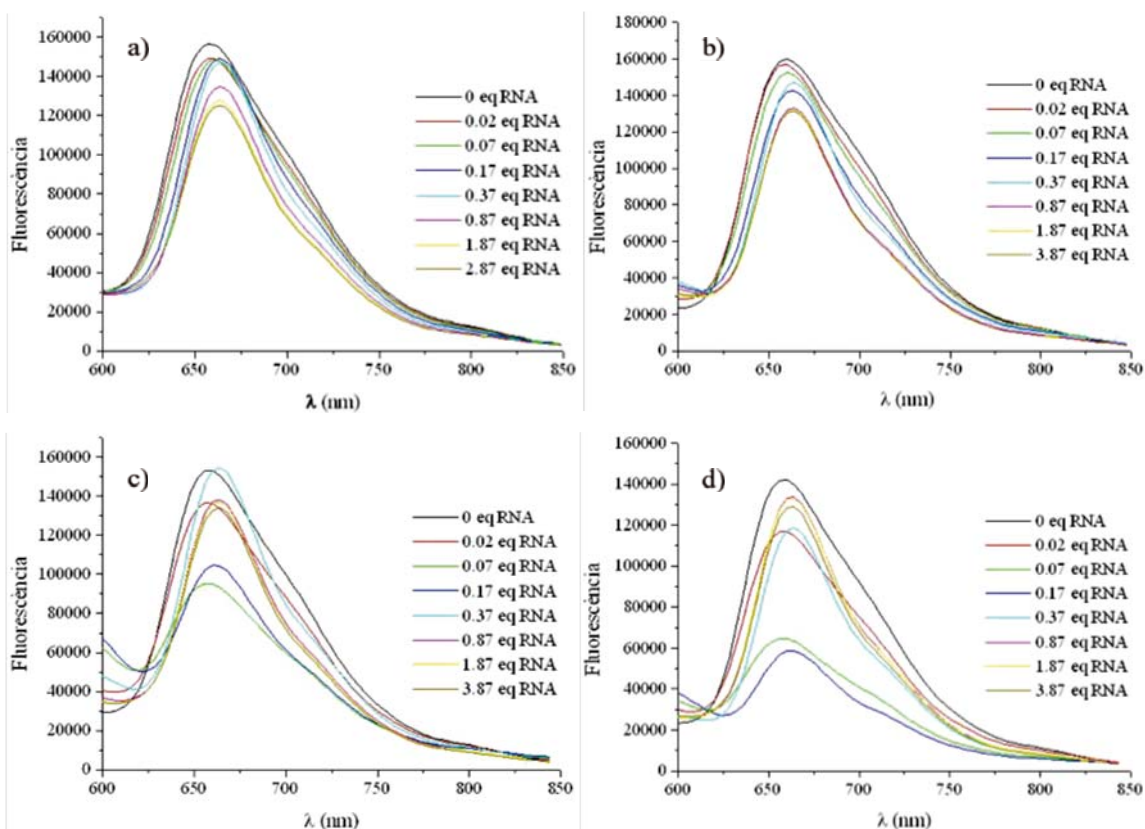
Primerament, a la valoració de l'ametnantrona amb l'RNA, inicialment es va observar una disminució progressiva de la intensitat de fluorescència o *quenching* (al voltant d'un 8%) fins que, en presència d'un total de 0.17 eq d'RNA, també es va desplaçar el màxim d'emissió uns 4 nm. A la següent addició, en presència de 0.37 eq d'RNA, el nou màxim d'emissió es va establir a 662 nm i es va mantenir constant fins al final de la valoració. També en aquest punt es va observar un segon canvi de tendència en el senyal de fluorescència que va implicar un augment de la intensitat d'emissió fins a arribar al seu punt màxim (un increment de fins el 4%) quan la relació RNA/Amt va ser de 0.87 eq, a partir de la qual ja no es van apreciar canvis significatius (**Figura 138**). Així doncs, tot i el petit augment d'emissió de fluorescència observat, podem afirmar que la disminució del senyal de fluorescència i el desplaçament batocròmic (de fins a 6 nm) és atribuïble a la intercalació d'Amt a l'estructura d'RNA.



**Figura 138.** Espectres d'emissió de fluorescència d'una dissolució 2 µM d'ametnantrona, en absència i en presència de quantitats creixents d'RNA wt. Les quantitats indicades corresponen al nombre d'equivalents total d'RNA present a cada moment de l'addició.

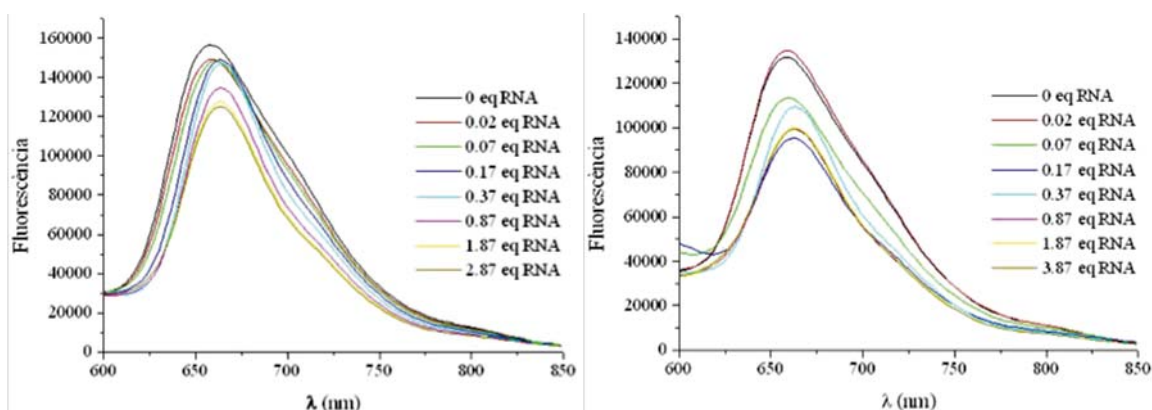
En el cas de les valoracions d'Amt-NeaC<sub>2</sub> i Amt-NeaC<sub>6</sub> (**Figura 139a i 139b**), tot i que en general se segueix una tendència similar a Amt, cal comentar que en ambdós lligands, en presència de 0.37 eq d'RNA, la intensitat de fluorescència va tornar a disminuir fins a mantenir-se constant amb un excés d'uns 4 eq de diana, i el màxim d'emissió va desplaçar-se uns 4 nm. En general, el fet que els seus perfils espectroscòpics mostrin un comportament similar al d'Amt, igual que a les valoracions per espectroscòpia d'UV-Visible, reafirma el mode d'interacció proposat pel fragment antraquinònic. Tot i això, és interessant comentar que els canvis a la intensitat de fluorescència són menys accentuats que les variacions d'absorbància (**Figura 135**) i, per tant, que les diferències d'afinitat dels lligands no es veuen reflectides en una disminució pronunciada de la intensitat de fluorescència.





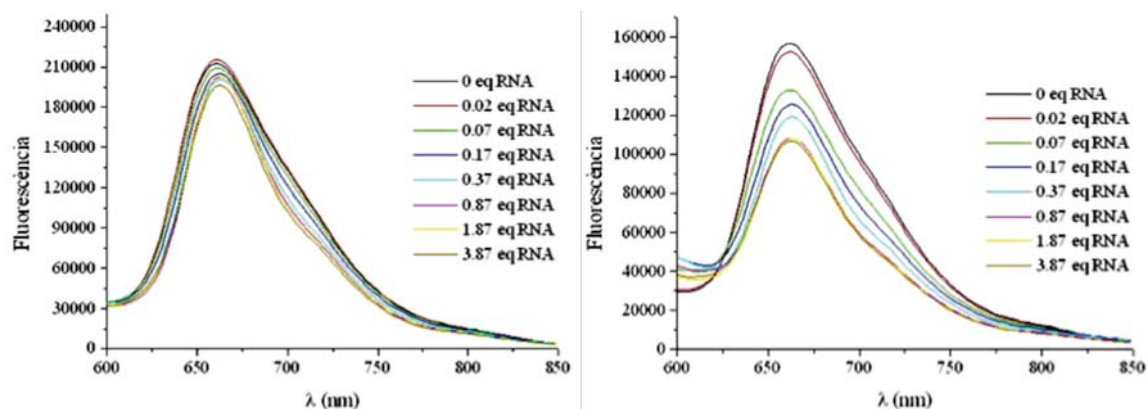
**Figura 139.** Espectres d'emissió de fluorescència d'una dissolució  $2 \mu\text{M}$  de lligand: a) Amt-NeaC<sub>2</sub>, Amt-NeaC<sub>6</sub> (b), Amt-NeaC<sub>2</sub>G<sub>4</sub> (c) i Amt-NeaC<sub>6</sub>G<sub>4</sub> (d), en absència i en presència de quantitats creixents d'RNA wt. Les quantitats indicades corresponen al nombre d'equivalents total d'RNA present a cada moment de l'addició.

Si comparem les corresponents valoracions dels lligands Amt-Nea amb la dels seus anàlegs guanidinilats, Amt-NeaC<sub>2</sub>G<sub>4</sub> i Amt-NeaC<sub>6</sub>G<sub>4</sub> (**Figura 139c i 139d**), s'observa que la disminució de l'emissió de fluorescència és més pronunciada, tot i que el desplaçament del màxim d'emissió és del mateix ordre (4 nm). En aquest sentit, si es té en compte l'alta sensibilitat de la fluorescència, aquesta diferència segurament està més relacionada amb les variacions generades a l'entorn del lligand com a conseqüència de l'augment de la seva capacitat electrostàtica, que no pas amb un canvi en el mode d'interacció respecte els seus precursors sense guanidinilar. Aquesta mateixa tendència, tot i que més suavitzada, també va ser observada a Amt-NeaC<sub>2</sub> amb la incorporació d'un segon fragment de neamina (**Figura 140**).



**Figura 140.** Espectres d'emissió de fluorescència d'una dissolució 2  $\mu\text{M}$  d'Amt-NeaC<sub>2</sub> (esquerra) i Amt-NeaC<sub>2</sub>,NeaC<sub>2</sub> (dreta), en absència i en presència de quantitats creixents d'RNA wt. Les quantitats indicades corresponen al nombre d'equivalents total d'RNA present a cada moment de l'addició.

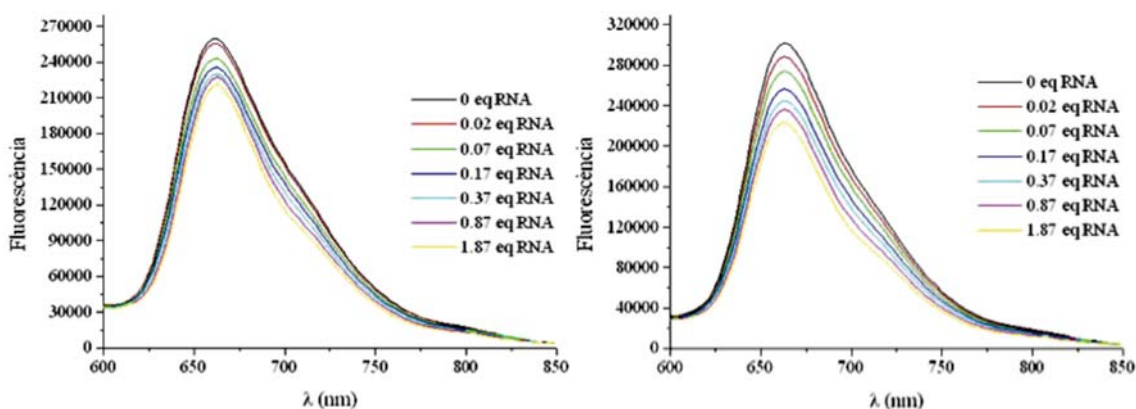
Per altra banda, si comparem els espectres d'emissió de fluorescència dels lligands Amt-Azq i Amt-Azq,NeaC<sub>2</sub> (**Figura 141**), el primer fet observable és que, a diferència del monòmer Amt i dels lligands derivats Amt-Nea, l'augment de la concentració d'RNA no s'acompanya de cap desplaçament del màxim, sinó que únicament es produeix un descens de la fluorescència. En el cas d'Amt-NeaC<sub>2</sub>,Azq, la presència de l'aminoglicòsid genera un major descens respecte el seu precursor Amt-Azq, on la disminució de fluorescència és més suau.



**Figura 141.** Espectres d'emissió de fluorescència d'una dissolució 2  $\mu\text{M}$  d'Amt-Azq (esquerra) i Amt-Azq,NeaC<sub>2</sub> (dreta), en absència i en presència de quantitats creixents d'RNA wt. Les quantitats indicades corresponen al nombre d'equivalents total d'RNA present a cada moment de l'addició.

Per últim, les valoracions dels lligands Amt-JApept i Amt-JBpept van mostrar la mateixa tendència que Amt-Azq. És a dir, no hi va haver cap desplaçament dels màxims d'emissió cap a longituds d'ona més grans, però sí que es va observar una disminució de la intensitat de fluorescència (**Figura 142**).





**Figura 142.** Espectres d'emissió de fluorescència d'una dissolució 2  $\mu\text{M}$  de Amt-JApept (esquerra) i Amt-JBpept (dreta), en absència i en presència de quantitats creixents d'RNA wt. Les quantitats indicades corresponen al nombre d'equivalents total d'RNA present a cada moment de l'addició.

Així doncs, a partir dels resultats extrets de les valoracions mitjançant espectroscòpia d'UV-Visible i de fluorescència dels lligands que contenen el residu Amt, podem concloure que tots els compostos analitzats semblen tenir un mode d'interacció amb l'RNA comú que implicaria la intercalació del fragment heteroaromàtic Amt o l'apilament amb les nucleobases.<sup>102</sup>

### 3.2 Estudi estructural per ressonància magnètica nuclear (RMN)

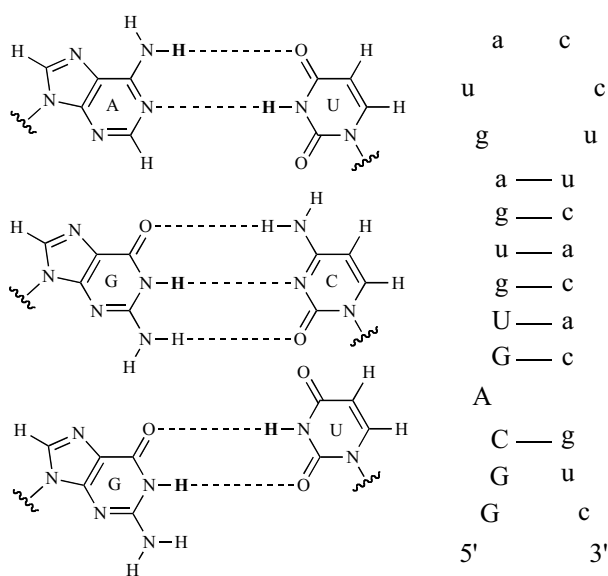
En els últims anys, la ressonància magnètica nuclear (RMN) ha adquirit un paper molt destacat com a eina per obtenir informació estructural detallada dels processos d'interacció entre lligands i àcids nucleics, comparable fins i tot a la informació extreta de tècniques cristal·logràfiques com la difracció de raigs X. La seva rellevància radica en el fet de dur a terme l'estudi en solució, fet que permet realitzar estudis dinàmics que proporcionen informació sobre el reconeixement molecular, com per exemple el lloc d'unió del lligand o el seu mode d'interacció. Ara bé, tot i que inicialment el gran tamany de les biomolècules suposava una limitació, gràcies als avenços tecnològics en l'ús d'imans superconductors d'alt camp (800 MHz per  $^1\text{H}$ ), la introducció de l'espectroscòpia multidimensional, o el marcatge isotòpic de  $^{15}\text{N}$  i  $^{13}\text{C}$ , la determinació d'estructures de fragments de DNA i d'RNA de gran tamany ha esdevingut una metodologia rutinària en molts laboratoris especialitzats.

Per tant, donada la gran utilitat de la RMN per caracteritzar processos dinàmics, com per exemple els mecanismes de reconeixement molecular, no és d'estranyar que en els darrers anys s'hagi convertit en una tècnica molt utilitzada en l'estudi de la interacció de petites molècules amb estructures de DNA<sup>103</sup> i d'RNA.<sup>104</sup> En aquest context s'ha considerat de gran interès l'ús d'aquesta tècnica per estudiar la interacció dels lligands més prometedors desenvolupats durant aquesta tesi doctoral amb l'estructura secundària nativa de l'RNA diana.

### 3.2.1 Introducció a l'estudi per RMN de la interacció RNA-ligand

El primer pas per dur a terme un estudi estructural mitjançant RMN consisteix en enregistrar l'espectre monodimensional de l'oligonucleòtid amb l'objectiu de determinar el desplaçament químic ( $\delta$ ) de cadascun dels nuclis ( $^1\text{H}$ ), o bé del màxim nombre possible. Ara bé, el fet que els àcids nucleics estiguin formats únicament per 4 nucleòtids repetits al llarg de la seqüència representa una gran limitació, ja que existeix un alt solapament de senyals. És per això, que a l'hora de dur a terme una assignació completa cal l'ajuda de diversos experiments bidimensionals, com per exemple la combinació d'experiments de correlació escalar (TOCSY, COSY), emprats per l'assignació dels diferents sistemes d'spin, i experiments de correlació dipolar (NOESY), que permeten assignar sistemes d'spin diferents a residus específics de la cadena de l'àcid nucleic.

En RMN de  $^1\text{H}$  d'un oligonucleòtid, es poden diferenciar dues classes de protons, els no bescanviables, enllaçats a l'àtom de carboni (sucres i aromàtics), i els bescanviables, corresponents als protons amino, hidroxílics i imino. Concretament, els protons imino són particularment rellevants ja que la seva ressonància, a més de produir-se a camps magnètics més baixos que la resta de protons, està directament relacionada amb l'aparellament de les bases. (**Figura 143**).

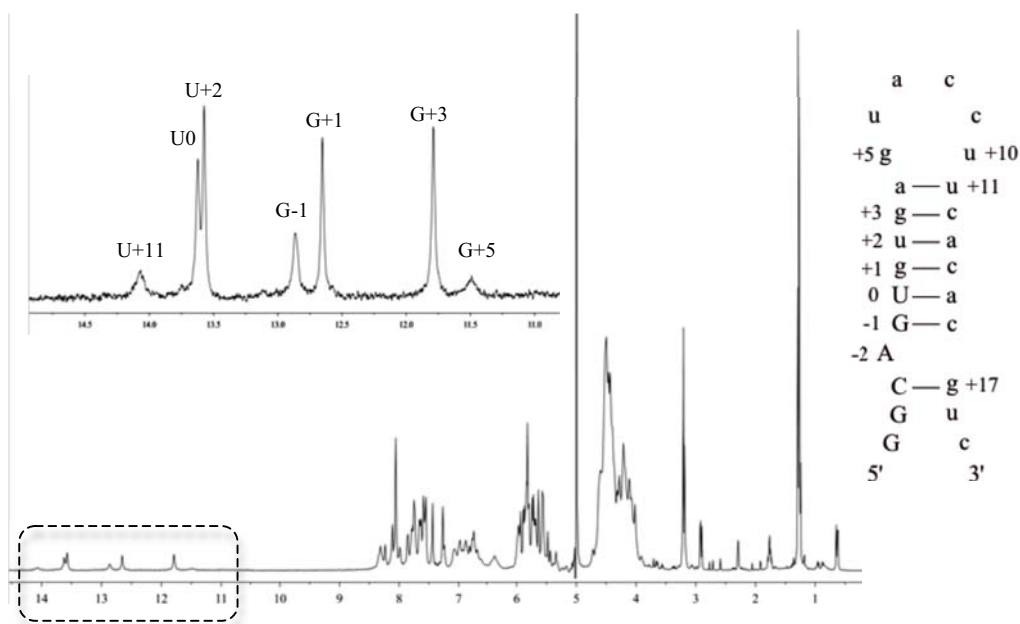


**Figura 143.** Esquema corresponent al parell de bases tipus Watson-Crick (W-C) A-U i G-C que es produeixen a la seqüència nativa de l'estructura d'RNA de treball, i també del parell wobble G-U. En negreta s'indiquen els protons imino.

Per poder observar els protons bescanviables, atès que els protons imino i amino en  $\text{H}_2\text{O}$  estan sotmesos a un bescanvi massa ràpid, cal enregistrar els espectres en aigua lleugera ( $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  9:1) i a baixa temperatura ( $5^\circ\text{C}$ ) mitjançant un sistema de gradients i polsos que permeti eliminar el senyal de l'aigua, com per exemple *watergate* (*water suppression by gradient-tailored excitation*) o *excitation sculpting*, el mètode emprat en aquesta tesi. És interessant remarcar que els protons imino presenten ressonància a una

regió concreta de l'espectre en funció de si estan desaparellats, que apareixen a regions de camp més alt (10–11 ppm), o bé si formen aparellament (11.5–14 ppm), que ho fan a un desplaçament químic característic per cada parell de bases. Per exemple, quan els protons imino formen enllaç pont d'hidrogen amb un altre àtom de nitrogen, com ara els parells Watson-Crick A-U i G-C, presenten ressonància al voltant de 13.0-14.5 ppm i 11.5-13.5 ppm, respectivament. En canvi, quan el grup imino fa pont d'hidrogen amb l'oxigen del carbonil, com és el cas de l'aparellament tipus *wobble* G-U, el senyal apareix entre 10.0 i 12.0 ppm.<sup>105</sup>

Així doncs, l'enregistrament de l'espectre monodimensional d'un oligoribonucleòtid, tot i no servir per fer una assignació completa, sí que pot aportar alguna informació estructural. Un bon exemple d'això és l'espectre monodimensional de <sup>1</sup>H de l'oligoribonucleòtid 25-mer corresponent a l'estructura *stem-loop* de la zona de processat de l'exó 10 de la proteïna tau. A la **Figura 144**, es mostra la regió dels protons imino en la qual és possible observar els senyals corresponents a tres parells G-C (G-1, G+1 i G+3), tres parells A-U (U0, U+2 i U+11) i un parell G-U (G+5).



**Figura 144.** Espectre monodimensional de <sup>1</sup>H corresponent a l'RNA-wt 25-mer (0.07 mM) en 10 mM tampò fosfat a pH 6.8 en D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O (1:9) enregistrat a 5°C. L'ampliació correspon a la zona dels protons imino i l'assignació està basada en els resultats publicats per Varani i col·laboradors,<sup>2</sup> que conclouen que es formen un total de 7 aparellaments de bases. A l'espectre s'ha assignat el senyal G+5 del parell G-U del *loop* i, en canvi, no apareix G+17 que correspon al parell G-C, contràriament a la representació de la figura basada en el treball publicat per Varani inicialment.<sup>4</sup>

Tal com s'ha comentat anteriorment a la Introducció d'aquesta tesi doctoral (apartat 2.2.1), l'any 1999 Varani i col·laboradors<sup>4</sup> van determinar l'estructura tridimensional de l'RNA wt mitjançant RMN amb l'oligoribonucleòtid 25-mer marcat amb <sup>13</sup>C i <sup>15</sup>N. La informació extreta va revelar que la seqüència 25-mer tenia una estructura *stem-loop* formada per una doble hèlix de 6 parells de bases amb una adenina desaparellada, i un *loop* de 6 nucleòtids que adopta múltiples conformacions. Aquesta llibertat conformacional explicava, doncs, que el parell G-U (G+5) no s'observés en aquell

estudi, atès que es va dur a terme a 35°C. En segon lloc, a la part inferior del dúplex, el senyal corresponent al parell G-C (G+17), tot i que es dibuixa com si estigués aparellat, tampoc es veu a causa que està molt exposat al dissolvent.

Posteriorment, al 2009 el mateix autor va publicar l'estudi estructural del complex mitoxantrona-RNA,<sup>2</sup> en el qual, en enregistrar a 4°C l'espectre monodimensional de <sup>1</sup>H de l'RNA wt, sí que es va observar, tot i que amb baixa intensitat, el senyal corresponent al parell *wobble* G-U (G+5) situat entre el dúplex i el *loop*, tal com també hem observat nosaltres (**Figura 144**). Segurament, a baixa temperatura, els intercanvis conformacionals que experimenta el *loop* són més lents i permeten que es formi l'enllaç pont d'hidrogen entre ambdues nucleobases. A més, tant en l'estudi més recent de Varani<sup>2</sup> com en el nostre, tampoc s'observa el senyal G+17 corresponent al parell G-C. Ara bé, quan s'enregistra el mateix espectre en presència de quantitats creixents de mitoxantrona, sí que s'observa l'imino G+17 a causa que el lligand s'intercala preferentment a la zona del *bulge* entre els parells de bases C-G (C+16 i G-1) i G-C (G+17 i C-3), fet que ocasiona que el parell G-C quedi protegit del dissolvent.

Així doncs, atesa la gran dependència dels desplaçaments químics amb el seu entorn, sent particularment sensible a variacions conformacionals de l'oligonucleòtid, l'estudi de l'espectre monodimensional de la zona dels protons imino de l'RNA ha esdevingut una eina molt útil per obtenir informació estructural dels complexos formats amb els lligands. Tot i això, és important remarcar que el tipus d'informació extreta és qualitativa, ja que és necessari l'anàlisi bidimensional complementari per aprofundir en les interaccions que s'estableixen entre un lligand i l'RNA. Per exemple, en el cas de l'estudi del complex RNA-mitoxantrona, la interpretació dels fenòmens observats a les valoracions monodimensionals es van complementar amb l'assignació d'espectres bidimensionals (NOESY) i tridimensionals (NOESY-HSQC) que van permetre determinar l'estructura del complex.<sup>2</sup>

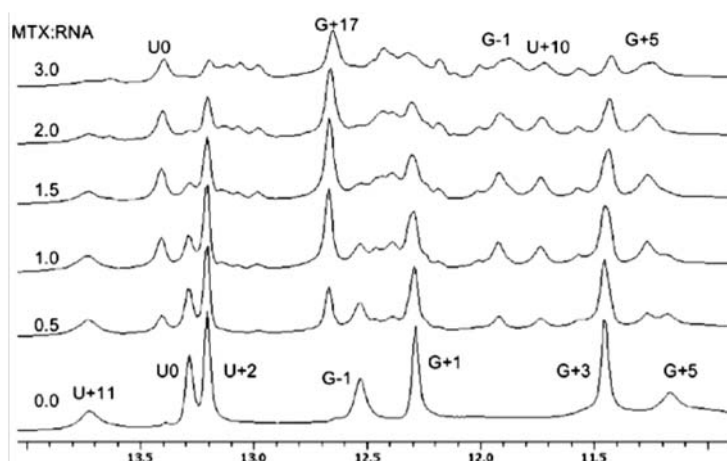
### 3.2.2 Valoracions monodimensionals de l'RNA wt amb els lligands derivats de l'ametrantrona

Un cop avaluats els canvis produïts en els espectres d'absorció i d'emissió dels lligands en presència de quantitats creixents d'RNA, es va optar per dur a terme les valoracions monodimensionals d'RMN per estudiar la variació dels senyals de la regió dels protons imino de l'RNA en augmentar la concentració de lligand. En aquest cas, a diferència dels assaigs per espectroscòpia d'UV-visible i de fluorescència, les valoracions s'han dut a terme addicionant quantitats creixents de lligand sobre una solució d'RNA (0.07-0.1 mM), tal com s'exposa a Materials i Mètodes (apartat 5.3.3).

També és important comentar que, malgrat que hauria estat molt interessant realitzar aquest estudi amb tots els lligands sintetitzats en aquesta tesi, la poca disponibilitat de l'aparell i la gran quantitat de mostra necessària (35-60 nmol d'RNA i fins a 3 eq de lligand) van ocasionar que es prioritzessin les valoracions amb els lligands derivats de l'ametrantrona, els més afins i amb més capacitat estabilitzadora. És per això que no es va poder determinar per RMN si els lligands Janus-Neamina/Guanidinoneamina reconeixen algun parell de bases G-U desaparellat a l'RNA diana.

### 3.2.2.1 Espectres monodimensionals de l'RNA wt amb Mtx i Amt

La gran semblança estructural entre l'ametrantrona (Amt) i la mitoxantrona (Mtx) ens va permetre utilitzar com a referència el treball realitzat per Varani i col·laboradors, en el qual es valorava l'RNA wt amb Mtx mitjançant RMN de  $^1\text{H}$ .<sup>2</sup> Concretament, en aquest estudi es va observar que l'addició de Mtx no produïa variacions significatives al desplaçament químic dels protons imino de la part superior del dúplex (G+1, U+2 i G+3), malgrat que el seu eixamplament creixia en augmentar la presència de lligand. Per contra, sí que es va apreciar una disminució de la intensitat dels senyals de l'RNA lliure propers a la regió del *bulge* (G-1 i U0), que van desaparèixer totalment a partir dels 2 eq de Mtx, i també un canvi en el seu desplaçament químic en formar-se el complex Mtx-RNA (**Figura 145**). A més, també es va veure l'aparició d'un nou grup de senyals a partir d'1.5 eq de lligand, que posava de manifest la inespecificitat de la unió quan Mtx es troba en excés respecte l'RNA.



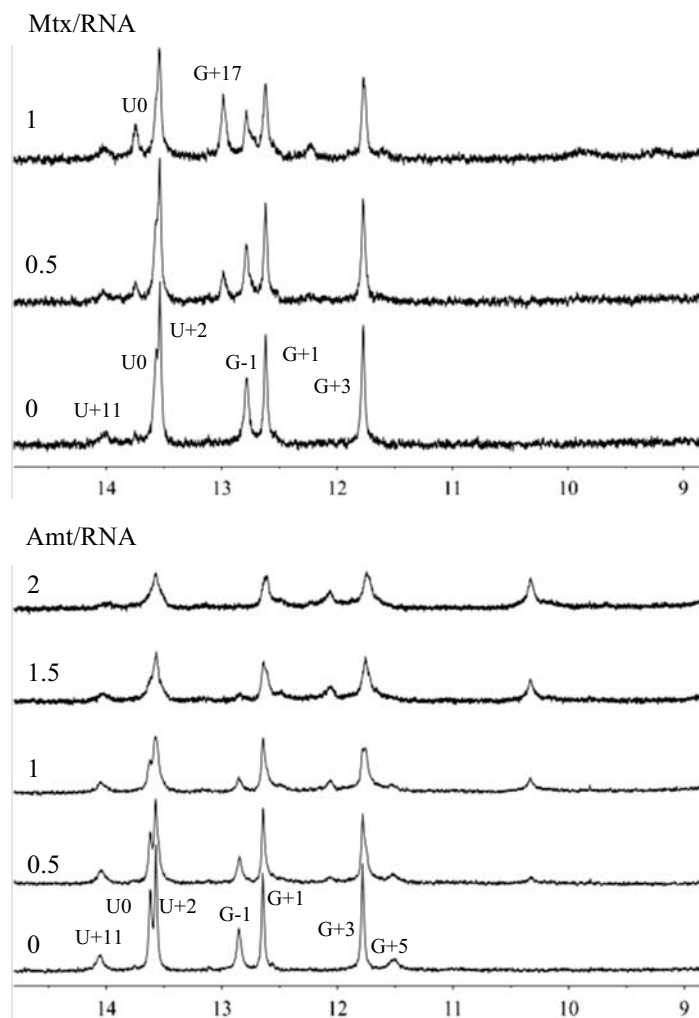
**Figura 145.** Representació de la regió imino corresponent a l'espectre monodimensional de  $^1\text{H}$  de l'RNA-wt 25-mer, en absència i en presència de quantitats creixents de Mtx, extret de l'estudi de Varani i col·laboradors.<sup>2</sup>

En segon terme, l'observació simultània de senyals corresponents a l'RNA lliure i al complex, com a conseqüència d'un bescanvi lent, posa de manifest la gran afinitat de Mtx amb l'RNA, ja que qualitativament la forma dels senyals de ressonància dels protons imino pot proporcionar informació sobre la cinètica d'enllaç i, per tant, de l'afinitat del lligand. És a dir, generalment, a lligands molt afins ( $K_d < 0.5 \mu\text{M}$ ) el bescanvi és molt lent, i es poden observar a la vegada els senyals de l'RNA lliure i del complex. En canvi, quan els lligands són poc afins ( $K_d > 100 \mu\text{M}$ ), els bescanvis solen ser molt ràpids i s'acaba observant un promig de senyals.<sup>103a,106</sup>

Els resultats de la valoració, juntament amb els estudis complementaris mitjançant experiments bidimensionals, van demostrar que Mtx s'unia preferentment a la zona del *bulge* de l'estructura secundària *stem-loop*, fet que també es va confirmar, per una banda, a través dels canvis al desplaçament químic dels protons imino U0 i G-1 i, per l'altra, amb l'observació del senyal imino G+17 com a conseqüència de l'estabilització addicional d'aquest parell G-C per acció de la intercalació de Mtx en aquesta zona. Ara

bé, un cop format el complex 1:1 es va corroborar que una molècula addicional de Mtx s'enllaçava al solc menor, proper a la part superior del dúplex, de forma superficial i inespecífica, amb la qual cosa la formació d'aquest segon complex no indueix canvis conformacionals ni de desplaçament químic significatius.

Així doncs, a partir d'aquests precedents,<sup>2</sup> es va plantejar, en primer lloc, reproduir l'experiment de Varani amb la mitoxantrona i, a continuació, dur a terme la valoració monodimensional amb l'anàleg ametantrona (Amt) per tal de comparar els efectes que indueixen ambdós lligands a l'estructura d'RNA wt (**Figura 146**).



**Figura 146.** Regió imino de l'espectre monodimensional de  $^1\text{H}$  corresponent a l'RNA-wt 25-mer (0.1 mM) en 10 mM tampó fosfat a pH 6.8 en  $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$  (1:9) enregistrat a  $5^\circ\text{C}$ , en absència i en presència de quantitats creixents de mitoxantrona (a dalt) i d'ametantrona (a baix). Des de la part inferior, s'indica la relació molar lligand/RNA.

En primer lloc, malgrat que en el nostre cas només es va arribar a una relació molar Mtx/RNA 1:1, podem afirmar que es van reproduir els resultats publicats per Varani,<sup>2</sup> amb la qual cosa es confirma que, a les condicions experimentals utilitzades al nostre laboratori, Mtx interacciona a la regió del *bulge*. Per exemple, a 0.5 eq de Mtx es va

observar un nou pic entre U+2 i G-1, que correspondria a la formació del parell G-C (G+17), la disminució de la intensitat dels pics U0 i G-1, que indica la interacció a prop de l'adenina del *bulge*, i l'aparició a 1 eq d'un nou pic entre U+11 i U0, que correspondria a U0 en el complex, segons les dades publicades per Varani i col·laboradors.

Altrament, quan s'enregistra la valoració amb Amt, també s'observa que els senyals U0 i G-1 tendeixen a eixamplar-se i a desaparèixer quan el lligand es troba en excés, fet que revela un mode d'interacció similar al de la mitoxantrona. Ara bé, quan es comparen els espectres d'ambdues valoracions a 1 eq, sí que sembla apreciar-se que en el cas d'Amt l'eixamplament dels senyals és més pronunciat. Tot i això, és molt destacable el nou senyal que apareix fora de la zona dels protons imino a l'espectre (10.3 ppm), que indicaria la formació d'un nou pont d'hidrogen entre algun grup amino de l'Amt amb l'RNA, probablement de l'amina secundària d'un dels braços de l'antraquinona. Aquest resultat, doncs, és sorprenent ja que en cap dels espectres del complex Mtx-RNA s'observa cap senyal en aquest zona, malgrat que Mtx i Amt posseeixen els mateixos braços alifàtics. A més, també és interessant el fet que a 0.5 eq no s'observi el senyal corresponent a l'aparellament de les bases C-3 i G+17, tot i que no podem descartar que en el complex RNA-Amt tinguin un desplaçament químic diferent que en RNA-Mtx. I, per últim, el fet que en ambdues valoracions a partir de 0.5 eq s'observin tant els senyals de l'RNA lliure, com els nous senyals del complex, demostra que hi ha un intercanvi lent i, per tant, que tant Mtx com Amt són compostos molt afins, tal com ja s'havia confirmat als corresponents assaigs d'afinitat ( $EC_{50}= 168.8$  nM i  $EC_{50}=231.8$  nM, respectivament).

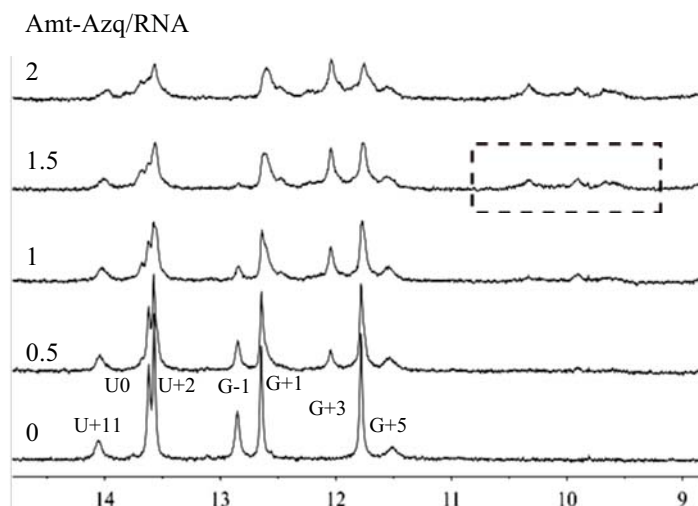
Així doncs, tot i que Amt i Mtx no semblen tenir exactament el mateix mode d'interacció amb l'RNA, les característiques comunes que s'aprecien a les respectives valoracions monodimensionals suggereixen que ambdós compostos interaccionen preferentment a la regió del *bulge* de l'RNA mitjançant intercalació, tal com apunten les evidències observades als seus espectres d'absorció i de fluorescència.

### 3.2.2.2 Espectres monodimensionals de l'RNA wt amb Amt-Azq i Amt-Janus

En un segon experiment, es va valorar l'RNA amb el lligand Amt-Azq amb l'objectiu de determinar quin efecte es genera quan Amt es derivatitza en un dels braços amb el fragment heteroaromàtic Azq, amb capacitat per reconèixer l'adenina desaparellada del *bulge* A-2 (**Figura 147**).

Novament, com en el cas d'Amt, en augmentar la quantitat de lligand s'observa un eixamplament generalitzat dels senyals imino, que és particularment destacat en els senyals corresponents a les bases properes a l'adenina A-2 (U0 i G-1), les quals fins i tot arriben a desaparèixer. Per tant, tot sembla indicar que aquest lligand, per acció del fragment ametantrona, també mostra una lleugera preferència per la regió del *bulge* de l'RNA. Ara bé, quan es compara directament amb l'espectre del monòmer Amt, una diferència important és el fet que el nou senyal que s'observa entre G+1 i G+3 va augmentant fins que s'acaba equiparant en intensitat amb la resta de senyals. Aquest nou senyal, basant-nos en els desplaçaments químics descrits pel complex RNA-Mtx, podria atribuir-se a l'imino G-1 del complex, o bé a G+17.

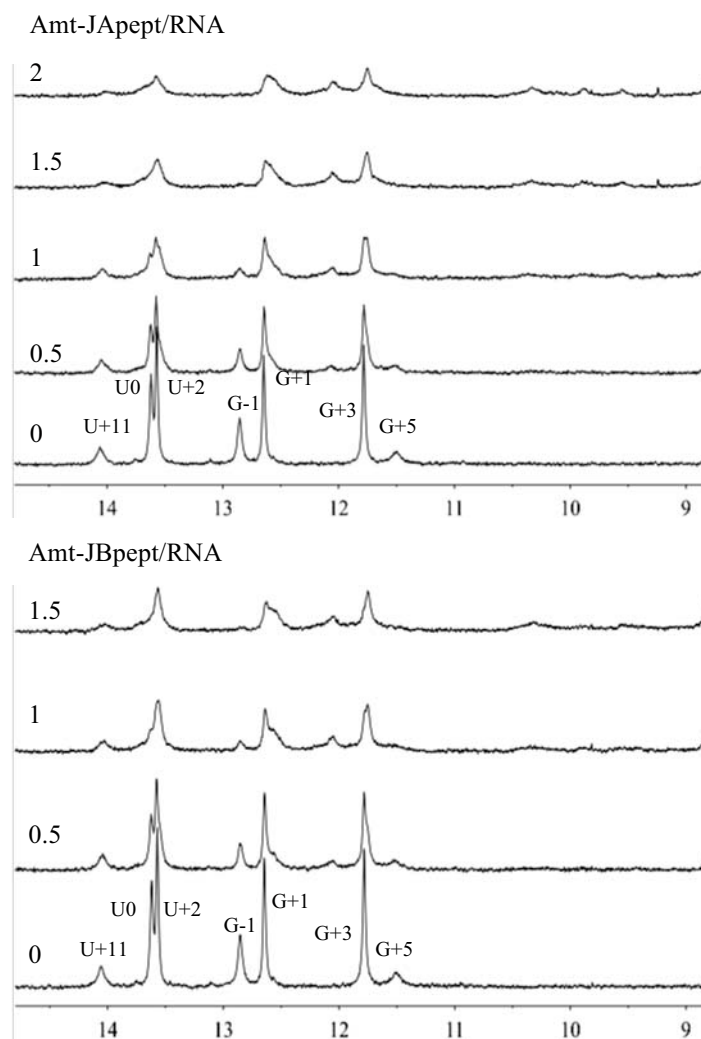
En segon terme, en aquest punt de la valoració són també força significatius el senyal a 10.3 ppm, també observats a la valoració d'Amt, i els nous senyals entre 9.6 i 9.9 ppm, que podrien atribuir-se als grups amino dels braços de l'anell d'antraquinona. Ara bé, la presència de tres senyals implicaria una baixa selectivitat sobre un lloc d'unió preferent, tot i que caldria fer un estudi estructural més complet per confirmar si es produeix l'aparellament entre l'adenina del *bulge* i l'anell d'azaquinolona. Cal dir que, segons dades descrites a la bibliografia,<sup>103c</sup> el senyal imino de l'Azq aparellada a A-2 hauria de tenir un desplaçament químic al voltant de 12.7 ppm.



**Figura 147.** Regió imino de l'espectre monodimensional de  $^1\text{H}$  corresponent a RNA-wt 25-mer (0.1 mM) en 10 mM tampó fosfat a pH 6.8 en  $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$  (1:9) enregistrat a  $5^\circ\text{C}$ , en absència i en presència de quantitats creixents d'Amt-Azq. Des de la part inferior, la superposició dels espectres correspon a la relació molar lligand/RNA. En el requadre s'assenyala el grup de nous senyals entre 10.3 i 9.6 ppm.

En el cas dels lligands on l'ametranona s'ha derivatitzat amb dues molècules Janus amb capacitat per reconèixer parells G-U, com per exemple els presents a l'estructura nativa entre G+5 i U+10, i entre G-4 i U+18, s'ha obtingut un comportament semblant al d'Amt i Amt-Azq, amb un eixamplament dels senyals G-1 i U0 que acaben desapareixent completament. Anàlogament a Amt-Azq, entre 1.5 i 2 eq es va observar l'aparició d'un nou senyal entre G+3 i G+1 ( $\sim 12$  ppm) i també es van apreciar 3 nous senyals entre 9.6 i 10.3 ppm. Per tant, aquests resultats semblen indicar que el mode d'actuació d'aquests compostos no és molt diferent. A més, quan es comparen ambdues molècules Janus entre sí, tampoc sembla intuir-se cap efecte diferencial (**Figura 148**). Ara bé, per tal de determinar si té lloc un possible aparellament entre el fragment Janus i un parell G-U caldria complementar aquesta valoració amb un estudi estructural més exhaustiu.

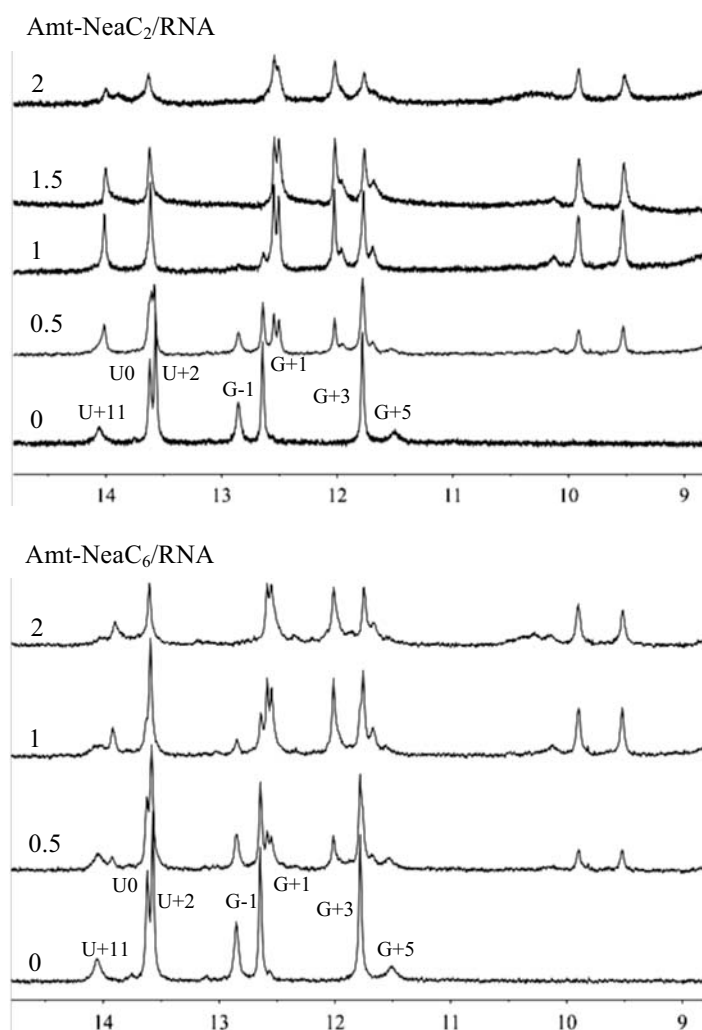




**Figura 148.** Regió imino de l'espectre monodimensional de  $^1\text{H}$  corresponent a l'RNA-wt 25-mer (0.1 mM) en 10 mM tampó fosfat a pH 6.8 en  $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$  (1:9) enregistrat a  $5^\circ\text{C}$ , en absència i en presència de quantitats creixents d'Amt-JApept (a dalt) i Amt-JBpept (a baix). Des de la part inferior, s'indica la relació molar lligand/RNA.

### 3.2.2.3 Espectres monodimensionals de l'RNA wt amb Amt-NeaC<sub>2</sub>, Amt-NeaC<sub>6</sub> i Amt-NeaC<sub>2</sub>G<sub>4</sub>

Pel que fa a les valoracions dels lligands que combinen el fragment ametantrona amb l'aminoglicòsid neamina, Amt-NeaC<sub>2</sub> i Amt-NeaC<sub>6</sub>, el primer fet destacable és que en comparació amb els resultats d'Amt o d'Amt-Azq/Janus, els espectres obtinguts van ser força més nítids i amb els pics molt més estrets, on l'eixamplament dels senyals no es comença a produir fins a un excés de lligand d'entre 1.5 i 2 eq (**Figura 149**). Aquest comportament, doncs, posa de manifest que els lligands basats en la combinació ametantrona-neamina interaccionen preferentment en un únic lloc d'unió, fet que també es corrobora amb la desaparició de pràcticament tots els senyals de l'RNA en presència d'1 eq de lligand i amb l'aparició d'un nou conjunt de senyals atribuïbles al complex lligand-RNA.



**Figura 149.** Regió imino de l'espectre monodimensional de  $^1\text{H}$  corresponent a l'RNA-wt 25-mer (0.1 mM) en 10 mM tampó fosfat a pH 6.8 en  $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$  (1:9) enregistrat a  $5^\circ\text{C}$ , en absència i en presència de quantitats creixents d'Amt-NeaC<sub>2</sub> (a dalt) i d'Amt-NeaC<sub>6</sub> (a baix). Des de la part inferior, s'indica la relació molar lligand/RNA.

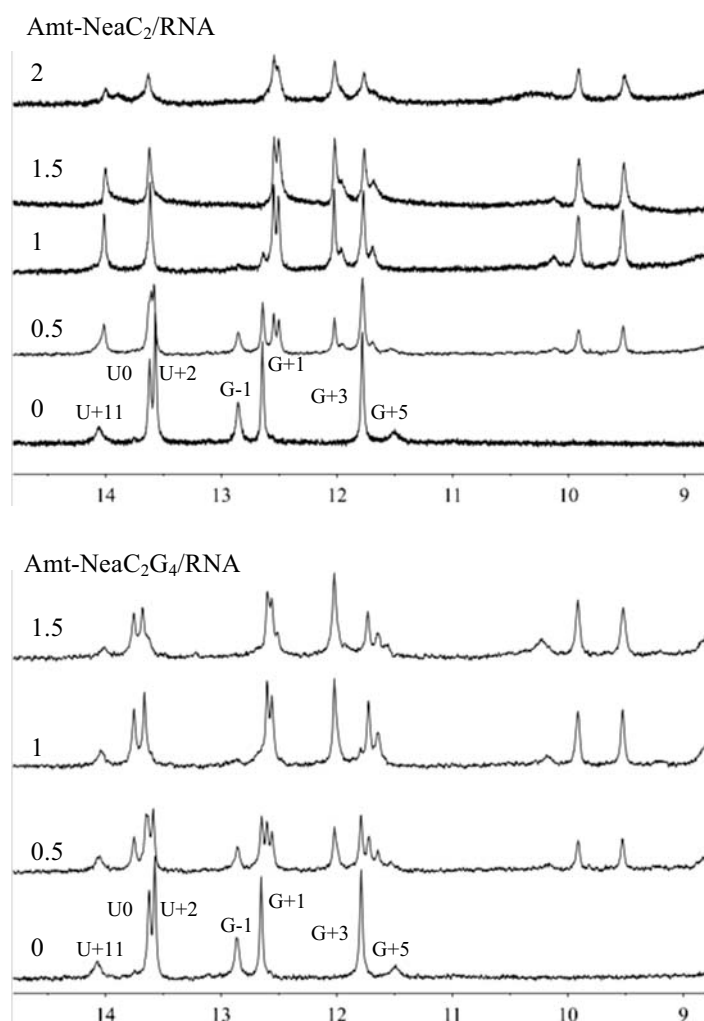
Per tant, l'aparició a 0.5 eq de lligand d'un nou grup de pics molt definits, amb una intensitat i una amplada similar a la dels senyals propis de l'RNA, suggereix que el bescanvi és molt més lent respecte a l'observat a l'Amt i als altres lligands (Amt-Azq, Amt-JApept i Amt-JBpept), fet que estaria d'acord amb la major afinitat dels compostos Amt-NeaC<sub>2</sub> i Amt-NeaC<sub>6</sub> ( $\text{EC}_{50} \sim 70\text{-}80 \text{ nM}$ ) amb l'RNA. A més, en aquest mateix punt de la valoració també s'ha pogut extreure informació sobre el lloc d'unió dels lligands Amt-Nea, ja que els canvis observats als senyals de l'RNA semblen indicar que l'anell antraquinònic s'intercala a la regió del *bulge* i que el fragment aminoglicosídic interacciona amb la part superior del dúplex. Concretament, els grans canvis observats als pics G-1 i U0 podrien explicar-se a través d'un comportament similar al de la mitoxantrona, en el qual l'anell heteroaromàtic s'intercala a la zona del *bulge*, i l'afectació dels senyals G+1, U+2 i, en menor mesura, G+3, suggereix que l'aminoglicosídic neamina podria estar establint interaccions a aquesta regió del dúplex.

Un altre fet també força rellevant, que es contraposa amb l'únic pic a 10.3 ppm observat en la valoració d'Amt, és l'aparició de dos nous senyals a 9.5 i 9.9 ppm, que significaria la formació de ponts d'hidrogen amb l'RNA. Aquest fet, suggereix que ambdós braços de l'Amt estan dirigits cap a punts diferents de l'estructura *stem-loop*, dels quals el derivatitzat amb neamina estaria orientat cap a la regió superior del dúplex. Per tant, aquest comportament permetria explicar que la millora notable de l'afinitat dels compostos Amt-Nea, respecte la mitoxantrona i l'ametrantrona, no és només una conseqüència de l'augment de les interaccions electrostàtiques generades per la neamina, sinó també a causa d'altres interaccions selectives, com els enllaços per pont d'hidrogen entre els braços del lligand i l'RNA.

I, per últim, el fet que les valoracions d'ambdós compostos siguin molt similars demostra que la longitud de l'espaiador no sembla desencadenar grans canvis a la conformació de l'RNA, malgrat que certament es pot apreciar que els nous senyals del complex són una mica més estrets i intensos a la valoració amb Amt-NeaC<sub>2</sub> que en l'equivalent situació amb Amt-NeaC<sub>6</sub>. Aquest resultat podria explicar-se pel fet que un espaiador més llarg augmentaria la llibertat conformacional del fragment aminoglicosídic i, per tant, seria menys selectiu per un lloc d'unió preferent.

En vista dels bons resultats obtinguts a les valoracions amb els lligands Amt-Nea, en un segon pas es va plantejar avaluar l'efecte de la guanidinilació dels grups amino de l'aminoglicòsid mitjançant la valoració amb el lligand Amt-NeaC<sub>2</sub>G<sub>4</sub>. Tal com es pot observar a la **Figura 150**, la introducció dels grups guanidini va donar lloc a espectres de <sup>1</sup>H força similars als obtinguts amb Amt-NeaC<sub>2</sub>, tot i que en aquest cas a 0.5 eq, com evidencien el conjunt de senyals, el complex ja s'havia format completament. De fet, aquest resultat no és estrany si es té en consideració que l'afinitat d'aquest compost és més alta que la del seu antecessor sense guanidinilar (EC<sub>50</sub> = 57.2 nM per Amt-NeaC<sub>2</sub>G<sub>4</sub> respecte EC<sub>50</sub> = 70.6 nM per Amt-NeaC<sub>2</sub>). També és interessant comentar que els notables canvis als desplaçaments químics de tots els senyals imino del complex RNA-Amt-NeaC<sub>2</sub>G<sub>4</sub>, en comparació amb el complex RNA-Amt-NeaC<sub>2</sub>, indiquen la gran influència del fragment guanidinoneamina en la interacció amb l'RNA.

En segon lloc, un altre fet destacable és que, anàlogament a la valoració amb el lligand Amt-NeaC<sub>2</sub>, la gran afectació dels senyals pròxims al *bulge* (U0 i G-1) i de la part superior del dúplex (G+1, U+2 i G+3) indiquen que Amt-NeaC<sub>2</sub>G<sub>4</sub> interacciona al mateix lloc d'unió que el seu precursor no guanidinilat. A més, aquest resultat es veu reforçat amb la presència dels dos senyals a 9.5 i a 9.9 ppm, que reafirmen la hipòtesi sobre la qual ambdós lligands interaccionen a la mateixa zona de l'estructura *stem-loop*.



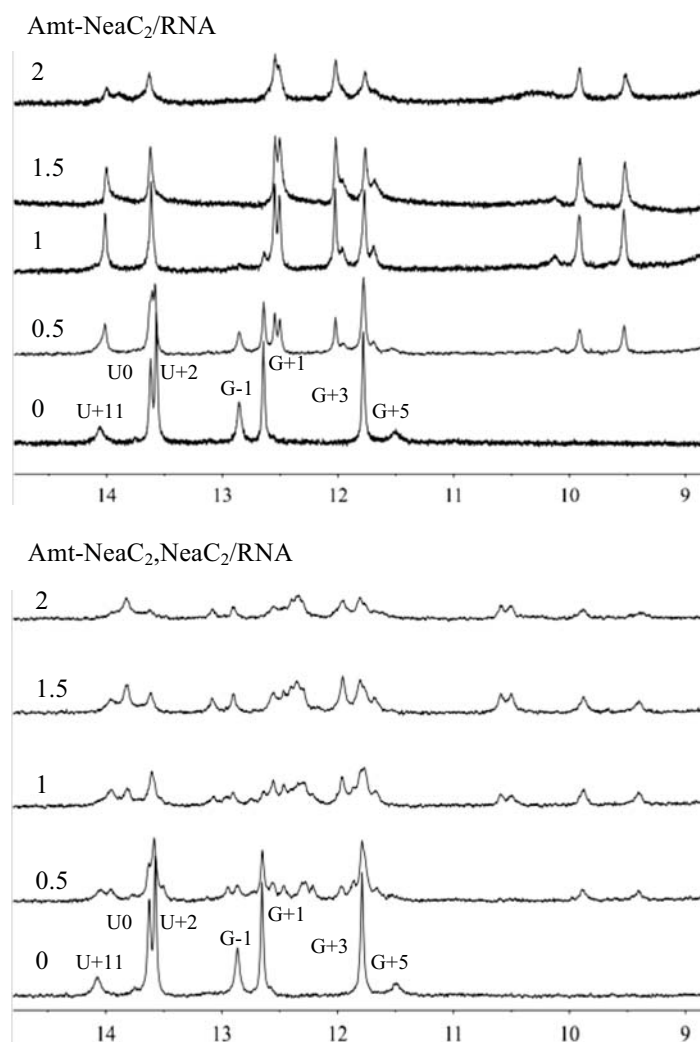
**Figura 150.** Regió imino de l'espectre monodimensional de  $^1\text{H}$ , enregistrat a  $5^\circ\text{C}$ , en absència i en presència de quantitats creixents d'Amt-NeaC<sub>2</sub> (a dalt) i d'Amt-NeaC<sub>2</sub>G<sub>4</sub> (a baix) sobre una solució d'RNA-wt 25-mer 0.1 mM i 0.07 mM, respectivament, en 10 mM tampó fosfat a pH 6.8 en D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O (1:9). Des de la part inferior s'indica la relació molar lligand/RNA.

### 3.2.2.4 Espectres monodimensionals de l'RNA wt amb Amt-NeaC<sub>2</sub>, NeaC<sub>2</sub> i Amt-NeaC<sub>2</sub>, Azq

Finalment, en un últim experiment ens vam plantejar estudiar l'efecte de la derivatització del segon braç del fragment ametantrona del lligand Amt-NeaC<sub>2</sub> amb una segona molècula de neamina o amb l'heterocicle azaquinolona.

Primerament, a la valoració d'Amt-NeaC<sub>2</sub>, NeaC<sub>2</sub> es va observar clarament una tendència molt diferenciada respecte la dels altres lligands derivats de l'ametantrona, ja que en aquest cas l'afectació, tant dels senyals de les bases properes a la regió del *bulge* (U0 i G-1) com els del *loop* (U+11) en presència de només 0.5 eq de lligand, sembla indicar que el lligand interacciona en dues o més zones ben diferenciades de l'RNA (**Figura 151**). A més, aquesta hipòtesi adquireix versemblança també pel fet que amb 1 eq de lligand és possible observar dos parells de senyals, a 10.6 i 10.5 ppm i a 9.9 i 9.4

ppm, sent aquest darrer parell present també a Amt-NeaC<sub>2</sub>. Aquest resultat, doncs, indica que els braços de l'antraquinona interaccionen en quatre entorns diferents i, per tant, suggereix que el lligand Amt-NeaC<sub>2</sub>,NeaC<sub>2</sub> interacciona preferentment a dos llocs d'unió, un dels quals estaria a prop de la zona del *bulge*. Ara bé, el fet que a 0.5 eq es vegin els senyals de 9.9 i 9.4 ppm, i que a partir d'1 eq coexisteixin ambdós grups de senyals (10.6 i 10.5 ppm i a 9.9 i 9.4 ppm), ja que la integració d'ambdós grups de pics es manté aproximadament constant, suggeriria la presència d'un complex RNA-Amt-NeaC<sub>2</sub>,NeaC<sub>2</sub> amb una estequiometria 1:2 en detriment de dos complexos 1:1. És a dir, inicialment el lligand ocuparia el primer lloc d'unió a la zona del *bulge* fins que, en augmentar el nombre d'equivalents, s'ocuparia el segon lloc d'unió. Aquest resultat demostraria, doncs, que a partir d'1 eq de lligand l'alta càrrega electrostàtica dels 8 grups amino dels dos aminoglicòsids superarien la capacitat intercalant del fragment ametantrona i dirigirien el lligand cap a un altre lloc d'unió.



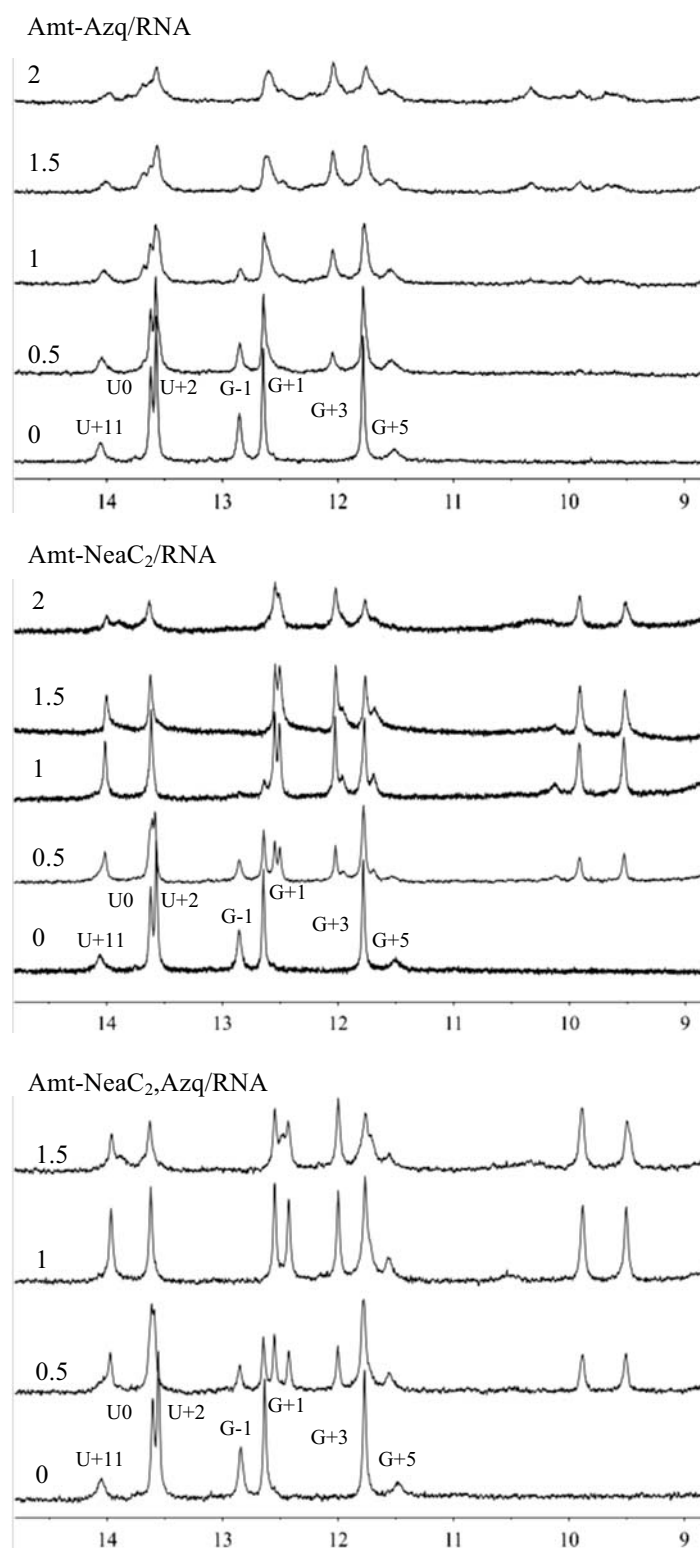
**Figura 151.** Regió imino de l'espectre monodimensional de <sup>1</sup>H, enregistrat a 5°C, en absència i en presència de quantitats creixents d'Amt-NeaC<sub>2</sub> (a dalt) i Amt-NeaC<sub>2</sub>,NeaC<sub>2</sub> (a baix) sobre una solució d'RNA-wt 25-mer 0.1 mM en 10 mM tampó fosfat a pH 6.8 en D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O (1:9). Des de la part inferior, s'indica la relació molar lligand/RNA.

Finalment, es va estudiar l'efecte que produeix la incorporació de l'azaquinolona al segon braç del residu Amt del lligand Amt-NeaC<sub>2</sub> (**Figura 152**). En primer lloc, si es comparen el conjunt dels espectres d'Amt-NeaC<sub>2</sub>,Azq amb els d'Amt-Azq, clarament s'observa una major nitidesa i uns senyals més estrets, tal com s'havia obtingut amb els lligands Amt-Nea. Anàlogament a Amt-NeaC<sub>2</sub> i a Amt-Azq, quan el lligand i l'RNA estan en una relació 1:1 és possible observar la pràctica desaparició de tots els senyals de l'RNA, i la formació d'un nou conjunt de senyals que correspondrien al complex RNA-Amt-NeaC<sub>2</sub>,Azq. Així doncs, en aquest cas tot sembla indicar que el lligand també interaccionaria preferentment a la zona del *bulge*, tal com suggereix la gran afectació dels senyals U0 i G-1.

En segon lloc, cal destacar la presència dels senyals a 9.5 i a 9.9 ppm, característics del lligand Amt-NeaC<sub>2</sub>, que contrasten amb els pics a 10.3, 9.6 i 9.9 ppm observats a Amt-Azq, els quals s'havien atribuït a una baixa selectivitat sobre un lloc d'unió preferent. Per tant, sembla ser que la incorporació d'una molècula de neamina a Amt-Azq, fa que el lligand esdevingui molt més selectiu. A més, el fet que ambdós pics presentin el mateix desplaçament químic tant en Amt-NeaC<sub>2</sub> com en Amt-NeaC<sub>2</sub>,Azq indicaria que la disposició dels dos braços en ambdós lligands no deu ser gaire diferent, tot i la presència de l'azaquinolona.

Un altre aspecte a tenir en compte és que malgrat que al complex RNA-lligand apareixen tres nous senyals entre 12 i 13 ppm, no és possible saber sense l'ajuda d'estudis estructurals més complexos si ha tingut lloc l'aparellament entre l'adenina A-2 i l'azaquinolona, tot i que al voltant de 12.7 ppm seria esperable el senyal imino fruit d'aquest aparellament.<sup>103c</sup>

En conclusió, els resultats extrets de les diverses valoracions monodimensionals entre la seqüència nativa de l'RNA i els lligands derivats de l'ametatrona, demostren la gran capacitat del fragment ametatrona per governar la interacció del lligand cap a un lloc d'unió preferent situat al voltant de les bases U0 i G-1. Com a excepció destaca el lligand Amt-NeaC<sub>2</sub>,NeaC<sub>2</sub>, on la presència dels dos aminoglicòsids li concedeix una menor selectivitat.



**Figura 152.** Regió imino de l'espectre monodimensional de  $^1\text{H}$ , enregistrat a  $5^\circ\text{C}$ , en absència i en presència de quantitats creixents d'Amt-Azq (a dalt), Amt-NeaC<sub>2</sub> (al centre) i Amt-Azq,NeaC<sub>2</sub> (a baix) sobre una solució d'RNA-wt 25-mer 0.1 mM, 0.1 mM i 0.07 mM, respectivament, en 10 mM tampó fosfat a pH 6.8 en D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O (1:9). Des de la part inferior s'indica la relació molar lligand/RNA.

## *Conclusions*





## CONCLUSIONS

- El desenvolupament de lligands de l'estructura secundària d'RNA implicada en el processat alternatiu de l'exó 10 del pre-mRNA codificant de la proteïna tau, s'ha abordat mitjançant la química combinatòria dinàmica (DCC) a través d'una estratègia basada en la unió de fragments. En primer lloc, s'han sintetitzat els monòmers convenientment funcionalitzats amb un grup tiol per dur a terme els experiments de DCC a través de reaccions d'intercanvi tiol-disulfur. En particular, s'han dissenyat i sintetitzat dues molècules heteroaromàtiques, denominades Janus A i Janus B, que presenten la capacitat per reconèixer els parells G-U no aparellats a través de la formació d'enllaços pont d'hidrogen complementaris a ambdues nucleobases. La derivatització a grup tiol d'aquests compostos, s'ha realitzat en fase sòlida a través de l'acoblament del seu grup carboxil a un tripèptid que incorpora un residu de cisteïna, d'una banda, i a la resina cisteamina 4-metoxitritil, de l'altra. Aquest fet ha permès obtenir els quatre monòmers objectiu (JApept, JBpept, JA i JB). Altrament, també s'han sintetitzat en solució dos derivats de l'agent intercalant ametantrona que incorporen un o dos grups tiol als braços de l'anell antraquinònic. També, s'han sintetitzat dos derivats de l'aminoglicòsid neamina, que difereixen en la longitud de l'espaiador que existeix entre el grup tiol i l'O5, que és de 2 i de 6 carbonis per NeaC<sub>2</sub> i NeaC<sub>6</sub>, respectivament. I, per últim, s'han sintetitzat en fase sòlida mitjançant la metodologia estàndard del fosfit trièster, els oligoribonucleòtids diana (wt, +3, +14 i +16) i la seqüència nativa (wt) modificada amb biotina a l'extrem 5'.
- A més dels compostos sintetitzats, per augmentar la diversitat de la biblioteca combinatòria dinàmica, també s'ha incorporat un tripèptid (TyrP) i dues molècules heteroaromàtiques (AcrOMe i Azq), anteriorment sintetitzades al nostre grup de recerca. Tots els experiments de DCC s'han dut a terme en una solució tampó adequada per al bescanvi dels enllaços disulfur i per a la correcta estructuració de l'RNA diana, i, en tots ells, s'ha emprat una mescla equimolar de monòmers tiol (100 µM) en un excés de 4 eq respecte el 5'-biotinil-RNA wt (25 µM). L'anàlisi dels resultats dels diferents experiments de DCC ha revelat que l'RNA selecciona, preferentment, aquells lligands que contenen l'agent intercalant ametantrona per sobre dels que incorporen el residu acridínic AcrOMe. D'entre els diferents heterodímers disulfur seleccionats, la combinació ametantrona-neamina (Amt-Nea) s'ha amplificat en major proporció respecte les altres, com ara Amt-Janus o Amt-Azq. En canvi, als experiments on el monòmer tiol derivat de l'ametantrona no ha participat, s'han amplificat preferentment els dímers Janus-Nea, tot i que en un percentatge molt més moderat respecte els lligands que incorporen el residu antraquinònic. De fet, és particularment rellevant que els lligands Amt-Nea i Janus-Nea amb NeaC<sub>2</sub> s'hagin amplificat en major extensió que els que incorporen NeaC<sub>6</sub>, fet que posa de manifest la importància de la longitud de l'espaiador que uneix ambdós fragments. A més,

malgrat que en tots els experiments no sembla haver una preferència entre els fragments heteroaromàtics Janus A o Janus B, els lligands amb els fragments Janus derivatitzats amb el tripèptid (JApept i JBpept) han estat seleccionats preferentment respecte els que no el contenen (JA i JB).

- Un cop identificats i seleccionats els nou millors lligands (Amt-NeaC<sub>2</sub>, Amt-NeaC<sub>6</sub>, Amt-Azq, Amt-JApept, Amt-JBpept, JApept-NeaC<sub>2</sub>, JApept-NeaC<sub>6</sub>, JBpept-NeaC<sub>2</sub> i JBpept-NeaC<sub>6</sub>), s'ha dut a terme la seva síntesi, en solució i a gran escala, a partir de l'activació del grup tiol d'un dels monòmers amb el reactiu 2,2'-ditiobis(5-nitropiridina), per fer-lo reaccionar, posteriorment, amb l'altre monòmer tiol. A través d'aquesta mateixa metodologia, també s'ha sintetitzat un segon grup de lligands, anomenats de segona generació, basats en la guanidinilació dels grups amino de l'aminoglicòsid (Amt-NeaC<sub>2</sub>G<sub>4</sub>, Amt-NeaC<sub>6</sub>G<sub>4</sub>, JApept-NeaC<sub>2</sub>G<sub>4</sub>, JApept-NeaC<sub>6</sub>G<sub>4</sub>, JBpept-NeaC<sub>2</sub>G<sub>4</sub> i JBpept-NeaC<sub>6</sub>G<sub>4</sub>) i en la doble funcionalització del fragment ametantrona (Amt-NeaC<sub>2</sub>,NeaC<sub>2</sub> i Amt-NeaC<sub>2</sub>,Azq).

- La determinació de l'afinitat dels lligands que contenen el fragment ametantrona s'ha dut a terme a través de valoracions de fluorescència amb una solució 25 nM de l'oligoribonucleòtid marcat amb fluoresceïna a l'extrem 5'. Primerament, s'ha comprovat que tots els lligands seleccionats als experiments de DCC tenen afinitats de l'ordre nM ( $EC_{50} = 70.6 - 318.2$  nM), i que els compostos Amt-Nea són molt més afins que els basats en la combinació de l'agent intercalant amb Janus o Azq. A més, s'ha comprovat que Amt-NeaC<sub>2</sub> és lleugerament més afí que Amt-NeaC<sub>6</sub>. Així doncs, la bona correlació entre les amplificacions obtingudes als experiments de DCC i les afinitats determinades per espectroscòpia de fluorescència, posa de manifest el potencial d'aquesta metodologia per identificar nous lligands molt afins a les estructures secundàries presents a l'RNA.

En el cas dels lligands de segona generació, s'ha observat una tendència diferent segons la modificació química, o el tipus de compost. En primer lloc, tot i que la guanidinilació del fragment neamina hauria de suposar, a priori, un augment de l'afinitat respecte el seu antecessor sense guanidinilar, aquesta tendència no s'ha reproduït en els dos lligands Amt-Nea, ja que la guanidinilació del lligand amb l'espaiador més curt ha conduït a un compost més afí (Amt-NeaC<sub>2</sub>G<sub>4</sub>), mentre que el que conté l'espaiador més llarg (Amt-NeaC<sub>6</sub>G<sub>4</sub>) ha resultat ser menys afí que el seu precursor no guanidinilat. Pels lligands amb l'anell antraquinònic doblement funcionalitzat, les incorporacions dels fragments Azq (Amt-NeaC<sub>2</sub>,Azq) i NeaC<sub>2</sub> (Amt-NeaC<sub>2</sub>,NeaC<sub>2</sub>) al segon braç d'Amt-NeaC<sub>2</sub> ha suposat, en ambdós casos, una lleugera pèrdua de l'afinitat amb l'RNA diana.

- Cal destacar que amb els lligands Janus-Nea no s'han pogut realitzar els assaigs d'afinitat en les mateixes condicions emprades pels lligands derivats de l'ametantrona, a causa dels canvis en la fluorescència de la fluoresceïna durant la valoració. Com a via alternativa, s'han realitzat les valoracions amb la seqüència mutada +3, on l'adenina del *loop* s'ha substituït per la base

fluorescent 2-aminopurina. Tot i això, únicament s'han pogut obtenir els valors d' $EC_{50}$  dels compostos que contenen el fragment JBpept, també de l'ordre nM ( $EC_{50} = 213.4$  i  $296.7$  nM). A més, cal remarcar que, d'una banda, els lligands Janus-Nea que contenen l'espaiador més curt són lleugerament més afins, i, per l'altra, que la guanidinilació dels grups amino de la neamina ha tingut un efecte positiu en l'afinitat.

- L'especificitat cap a la diana d'RNA wt s'ha determinat únicament amb els lligands derivats de l'ametrantrona a través de valoracions de fluorescència, en presència d'una mescla comercial de diferents tRNAs. L'anàlisi dels valors d' $EC_{50}$  ha posat de manifest que, en línies generals, els lligands més afins són els menys específics. Concretament, s'ha comprovat que els compostos Amt-Nea són menys específics que Amt-Azq o Amt-Janus. Tot i això, és interessant destacar el fet que el lligand Amt-NeaC<sub>2</sub> sigui lleugerament més específic que Amt-NeaC<sub>6</sub>. També, és important remarcar l'efecte divers en l'especificitat que han tingut les modificacions en els lligands de segona generació. Per exemple, l'efecte positiu de la guanidinilació del lligand Amt-Nea amb l'espaiador de major longitud o la millora d'aquesta propietat pel lligand Amt-NeaC<sub>2</sub>, com a conseqüència de la funcionalització del segon braç de l'anell antraquinònic (Amt-NeaC<sub>2</sub>,Azq i Amt-NeaC<sub>2</sub>,NeaC<sub>2</sub>).
- Els estudis de desnaturalització tèrmica per UV han demostrat que tots els lligands derivats de l'ametrantrona han estabilitzat enormement les seqüències nativa i mutades de l'RNA, superant, fins i tot, l'efecte de l'ametrantrona sola. Cal destacar també, el paper dels lligands Amt-Nea, ja que, en general, han restablert l'estabilitat termodinàmica de les seqüències mutades a un nivell semblant o, fins i tot, superior al de la seqüència nativa: Amt-NeaC<sub>2</sub> a +3 ( $\Delta T_m = +12.9^\circ\text{C}$ ), +14 ( $\Delta T_m = +10.4^\circ\text{C}$ ) i +16 ( $\Delta T_m = +9.8^\circ\text{C}$ ), o Amt-NeaC<sub>6</sub> a +14 ( $\Delta T_m = +7.2^\circ\text{C}$ ). També s'ha pogut corroborar la bona correlació entre l'afinitat, la capacitat estabilitzadora i les amplificacions observades als experiments de DCC, no només entre els diferents tipus de lligands, sinó també entre Amt-NeaC<sub>2</sub> i Amt-NeaC<sub>6</sub>, on el lligand amb l'espaiador més curt, a més de ser el més amplificat i el més afí, també és el que més estabilitza les seqüències nativa i mutades.

En el cas dels lligands de segona generació guanidinilats, és sorprenent que a totes les seqüències oligoribonucleotídiques l'efecte estabilitzant del lligand amb l'espaiador més curt (Amt-NeaC<sub>2</sub>G<sub>4</sub>) sigui molt més gran que el del lligand amb l'espaiador més llarg (Amt-NeaC<sub>6</sub>G<sub>4</sub>). En canvi, la capacitat estabilitzadora dels lligands doblement funcionalitzats ha variat en funció de si al segon braç de l'anell antraquinònic s'ha incorporat una neamina (Amt-NeaC<sub>2</sub>,NeaC<sub>2</sub>), on s'han incrementat notablement els valors de  $T_m$  de la seqüència nativa ( $\Delta T_m = +13.0^\circ\text{C}$ ) i de les mutades ( $\Delta T_m = +11.2 - 15.6^\circ\text{C}$ ), o una molècula d'azaquinolona (Amt-Azq,NeaC<sub>2</sub>), que ha induït una estabilització més petita ( $\Delta T_m = +4.7 - 7.6^\circ\text{C}$ ).

La dependència de la temperatura de fusió amb el pH i la força iònica del medi ha revelat que les interaccions electrostàtiques tenen un paper destacat en els

l·ligands derivats de l' ametantrona, sobretot en el cas dels l·ligands Amt-Nea, on la seva capacitat estabilitzadora està fortament influenciada pel caràcter electrostàtic de l' aminoglicòsid.

- Els assaigs de desnaturalització tèrmica amb els l·ligands Janus-Nea, realitzats en les mateixes condicions que els l·ligands derivats de l' ametantrona (100 mM NaCl), han revelat que aquests compostos no estabilitzen significativament ni la seqüència nativa ni les mutades. En canvi, la guanidinilació de l' aminoglicòsid ha permès millorar la seva capacitat estabilitzant i, en la majoria dels casos, incrementar al voltant de 2°C els valors de  $T_m$  dels oligoribonucleòtids. En disminuir la concentració de ions  $Na^+$  fins a la meitat, s'ha observat un augment considerable de la capacitat estabilitzadora dels l·ligands Janus-Nea sobre la diana mutada +3 ( $\Delta T_m = +5 - 6^\circ C$ ), on l'efecte més important s'ha produït amb els l·ligands que contenen l'espaiador curt. En aquestes mateixes condicions, l'increment dels valors de  $T_m$  dels l·ligands guanidinilats ha estat de l'ordre de 6.7 - 9.9°C.
- Els estudis realitzats per espectroscòpia d'UV-Vis i de fluorescència han revelat que, en general, tots els l·ligands derivats de l' ametantrona tenen un mode d'interacció amb l'RNA comú, que implicaria la intercalació de l'anell antraquinònic o, com a mínim, el seu apilament amb les nucleobases. Posteriorment, els canvis observats per RMN en el desplaçament químic dels protons imino U0 i G-1 de l'RNA, han confirmat la unió a la zona del *bulge* de l'estructura *stem-loop*, tot i que l'aparició de nous senyals fora de la zona dels protons imino de l'espectre (10.3 - 9.4 ppm) suggereix que els l·ligands derivats de l' ametantrona no tenen exactament el mateix mode d'interacció que el descrit prèviament per la mitoxantrona. També s'ha confirmat, a partir de l'observació simultània dels senyals de l'RNA lliure i del complex, la gran afinitat de tots els l·ligands derivats de l' ametantrona amb l'oligoribonucleòtid. Cal destacar els derivats Amt-Nea<sub>C2,6</sub>/Nea<sub>C2,6</sub>G<sub>4</sub> i Amt-Nea<sub>C2</sub>,Azq, on les dades d'RMN suggereixen un únic lloc d'unió, on el fragment antraquinònic s'intercalaria a la regió del *bulge* i la neamina/guanidinoneamina interaccionaria amb la part superior del dúplex. Ara bé, el comportament diferenciat del l·ligand Amt-Nea<sub>C2</sub>,Nea<sub>C2</sub> s'ha atribuït al fet que podria interaccionar en dues zones diferenciades de l'RNA.

## *Bibliografia*



**BIBLIOGRAFIA**

1. Varani, L.; Spillantini, M. G.; Goedert, M.; Varani, G. "Structural basis for recognition of the RNA major groove in the tau exon 10 splicing regulatory element by aminoglycoside antibiotics". *Nucleic Acids Res.*, **2000**, 28, 710-719.
2. Zheng, S.; Chen, Y.; Donahue, C. P.; Wolfe, M. S.; Varani, G. "Structural basis for stabilization of the tau pre-mRNA splicing regulatory element by novantrone (mitoxantrone)". *Chem. Biol.*, **2009**, 16, 557-566.
3. a) López-Senín, P.; Gómez-Pinto, I.; Grandas, A.; Marchán, V. "Identification of ligands for the Tau Exon 10 splicing regulatory element RNA by using dynamic combinatorial chemistry". *Chem. Eur. J.*, **2011**, 17, 1946-1953; b) López-Senín, P.; Artigas, G.; Marchán, V. "Exploring the effect of aminoglycoside guanidinylation on ligands for Tau splicing regulatory element RNA". *Org. Biomol. Chem.*, **2012**, 10, 9243-9254; c) López-Senín, Paula. Tesi Doctoral. "Desarrollo de ligandos estabilizantes de les estructura de RNA implicada en el procesado alternativo del exón 10 de la proteína tau mediante química combinatoria dinámica", Universitat de Barcelona, Barcelona, **2010**.
4. Varani, L.; Hasegawa, M.; Spillantini, M. G.; Smith, M. J.; Murrell, J. R.; Ghuetti, B.; Klug, A.; Goedert, M.; Varani, G. "Structure of tau exon 10 splicing regulatory element RNA and destabilization by mutations of frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1999**, 96, 8229-8234.
5. Weiss, M. A.; Narayana, N. "RNA recognition by arginine-rich peptide motifs". *Biopolymers*, **1998**, 48, 167-180.
6. Hertel, K. J.; Graveley, B. R. "RS domains contact the pre-mRNA throughout spliceosome assembly". *Trends Biochem. Sci.*, **2005**, 30, 115-118.
7. Nakatani, K.; Horie, S.; Goto, Y.; Kobori, A.; Hagihara, S. "Evaluation of mismatch-binding ligands as inhibitors for Rev-RRE interaction". *Bioorg. Med. Chem.*, **2006**, 14, 5384-5388.
8. Nakatani, K. "Recognition of mismatched base pairs in DNA". *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **2009**, 82, 1055-1069.
9. Liu, Y.; Peacey, E.; Dickson, J.; Donahue, C. P.; Zheng, S.; Varani, G.; Wolfe, M. S. "Mitoxantrone analogues as ligands for a stem-loop structure of Tau pre-mRNA". *J. Med. Chem.*, **2009**, 52, 6532-6526.
10. Stelzer, A.C.; Frank, A. T.; Kratz, J. D.; Swanson, M. D.; González-Hernández, M. J.; Lee, J.; Andricioaei, I.; Markovitz, D. M.; Al-Hashimi, H. M. "Discovery of selective bioactive small molecules by targeting an RNA dynamic ensemble". *Nat. Chem. Biol.*, **2011**, 7, 553-559.
11. Kapuscinski, J.; Darzynkiewicz, Z. "Relationship between the pharmacological activity of antitumor drugs ametantrone and mitoxantrone (Novantrone) and their ability to condense nucleic acids". *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1986**, 83, 6302-6306.
12. a) Goodell, J. R.; Ougolkov, A. V.; Hiasa, H.; Kaur, H.; Rimmel, R.; Billadeau, D. D.; Ferguson, D. M. "Acridine-based agents with topoisomerase II activity inhibit pancreatic cancer cell proliferation and induce apoptosis". *J. Med. Chem.*, **2008**, 51, 179-182; b) Guetzoyan, L.; Yu, X-M.; Ramiandrasoa, F.; Pethe, S.; Rogier, C.;



Pradines, B.; Cresteil, T.; Perrée-Fauvet, M.; Mahy, J-M. "Antimalarial acridines: synthesis, in vitro activity against *P. falciparum* and interaction with hemozoin". *Bioorg. Med. Chem.*, **2009**, 17, 8032-8039.

13. a) Yan, Z.; Baranger, A. M. "Binding of an aminoacridine derivative to a GAAA RNA tetraloop". *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2004**, 14, 5889-5893; b) Yan, Z.; Sikri, S.; Beveridge, D. L.; Baranger, A. M. "Identification of an aminoacridine derivative that binds to RNA tetraloops". *J. Med. Chem.*, **2007**, 50, 4096-4104.

14. a) Arambula, J. F.; Ramisetty, S. R.; Baranger, A. M.; Zimmerman, S. C. "A simple ligand that selectively targets CUG trinucleotide repeats and inhibits MBNL protein binding", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2009**, 106, 16068-16073; b) Wong, C-H.; Fu, Y.; Ramisetty, S. R.; Baranger, A. M.; Zimmerman, S. C. "Selective inhibition of MBNL1-CCUG interaction by small molecules toward potential therapeutic agents for myotonic dystrophy type 2 (DM2)". *Nucleic Acids Res.*, **2011**, 39, 8881-8890.

15. Luedtke, N. W.; Liu, Q.; Tor, Y. "RNA-Ligand interactions: affinity and specificity of aminoglycoside dimers and acridine conjugates to the HIV-1 Rev Response Element". *Biochemistry*, **2003**, 42, 11391-11403.

16. Arya, D. P.; Willis, B. "Aminoglycoside (neomycin) preference is for A-form nucleic acids, not just RNA: results from a competition dialysis study". *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 10148-10149.

17. a) Park, W. K. C.; Auer, M.; Jaksche, H.; Wong, C-H. "Rapid combinatorial synthesis of aminoglycoside antibiotic mimetics: use of a polyethylene glycol-linked amine and a neamine-derived aldehyde in multiple component condensation as a strategy for the discovery of new inhibitors of the HIV RNA Rev Responsive Element". *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 10150-10155; b) Greenberg, W. C.; Priestley, E. S.; Sears, P. S.; Alper, P. B.; Rosenbohm, C.; Hendrix, M.; Hung, S-C.; Wong, C-H. "Design and synthesis of new aminoglycoside antibiotics containing neamine as an optimal core structure: correlation of antibiotic activity with in vitro inhibition of translation". *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 6527-6541; c) Udumula, V.; Chittapragada, M.; Marble, J. B.; Dayton, D. L.; Ham, Y. W. "Conjugate of neamine and 2-deoxystreptamine mimic connected by an amide bond". *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2011**, 21, 4713-4715.

18. Riguet, E.; Désiré, J.; Bailly, C.; Décout, J-L. "A route for preparing new neamine derivatives targeting HIV-1 TAR RNA". *Tetrahedron*, **2004**, 60, 8053-8064.

19. Alzina, Soledad. Màster Experimental en Química Orgànica. "Síntesi de derivats de neamina i acridina funcionalitzats amb grups tiol/disulfur com a possibles lligands de RNA", Universitat de Barcelona, Barcelona, **2009**.

20. Muñoz, Jose Luís. Màster Experimental en Química Orgànica. "Síntesis de moléculas derivatizadas con grupos tiol/disulfuro como posibles ligandos de RNA", Universitat de Barcelona, Barcelona, **2008**.

21. Ye, C.; Gao, H.; Boatz, J. A.; Drake, G. W.; Twamley, B.; Shreeve, J. M. "Polyazidopyrimidines: high-energy compounds". *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, 45, 7262-7265.

22. Fenniri, H.; Deng, B-L.; Ribbe, A. E.; Hallenga, K.; Jacob, J.; Thiyagarajan, P. "Entropically driven self-assembly of multichannel rosette nanotubes". *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2002**, 99, 6487-6492.

23. Davies, D. T. *Aromatic Heterocyclic Chemistry*, Oxford University Press, New York, 1992.
24. a) Tumkevičius, S.; Dailide, M.; Kaminskas, A. "Synthesis of 2,4-diaminothiopyrrolo[2,3-*d*]pyrimidine-6-carboxylic acid derivatives". *J. Heterocycl. Chem.*, **2006**, 43, 1629-1633.
25. Johnson, R. S.; Yamazaki, T.; Kovalenko, A.; Fenniri, H. "Molecular basis for water-promoted supramolecular chirality inversion in helical rosette nanotubes". *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 5735-5743.
26. a) Von Angerer, S. "Product class 12: pyrimidines". *Science of synthesis*, **2004**, 16, 379-572; b) Yamashita, A.; Norton, E. B.; Mansour, T. S. "Improved procedures for preparation of racemic capreonycidine". *Synth. Commun.*, **2004**, 34, 795-803; c) Ryabova, O. B.; Makarov, V. A.; Alekseeva, L. M.; Shashkov, A. S.; Chernyshev, V. V.; Granik, V. G. "Transformations of ortho-methoxyaryl(heteroaryl)carboxamides into quinazolin-4-one and pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-4-one". *Russ. Chem. Bull.*, **2005**, 54, 1907-1914; d) Torii, T.; Onishi, T.; Izawa, K.; Maruyama, T.; Demizu, Y.; Neyts, J.; De Clercq, E. "Synthesis of 6-arylthio analogs of 2'3'-dideoxy-3'-fluoroguanosine and their effect against hepatitis B virus replication". *Nucleosides, Nucleotides, Nucleic Acids*, **2006**, 655-665; e) Godefroi, E. F. "5-pyrimidinecarboxylic acid and some of its derivatives". *J. Org. Chem.*, **1962**, 27, 2264-2266; f) Bobbio, C.; Schlosser, M. "Selective functionalization of 2-fluoropyridine, 2,3-difluoropyridine, and 2,5-difluoropyridine at each vacant position". *J. Org. Chem.*, **2005**, 70, 3039-3045.
27. a) Paquette, L. A. *Encyclopedia of reagents for organic synthesis*, John Wiley & Sons Chichester, **1995**, pp 2900-2905; b) Kim, Y. Y.; Ryu, J-H.; Cheon, Y. J.; Lim, H. J.; Jeon, R. "Design and synthesis of urea and thiourea derivatives and their inhibitory activities on lipopolysaccharide-induced NO production". *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2007**, 17, 3317-3321; c) Rudolf, K.; Eberlein, W.; Engel, W.; Pieper, H.; Enzeroth, M.; Hallermayer, G.; Doods, H. "Development of human calcitonin gene-related peptide (CGRP) receptor antagonists. Potent and selective small molecule CGRP antagonists. 1-[[4-(3,4-dihydro-2(1H)-oxoquinazolin-3-yl)-1-piperidinyl]carbonyl]-D-tyrosyl]-L-lysyl]-4-(4-pyridinyl)piperazine: the first CGRP antagonist for clinical trials in acute migraine". *J. Med. Chem.*, **2005**, 48, 5921-5931; c) Houlihan, W. J.; Cooke, G.; Denzer, M.; Nicoletti, J. "1-alkyl-4-aryl-3,4-dihydro-2(1H)-quinazolinones and thiones. Synthesis and <sup>1</sup>H-NMR spectra". *J. Heterocycl. Chem.*, **1982**, 19, 1453-1456.
28. a) Paquette, L. A.; *Encyclopedia of reagents for organic synthesis*, Ed., John Wiley & Sons, Chichester, **1995**, pp 1213-1219; b) McLaughlin, M.; Palucki, M.; Davies, I. W. "Efficient access to cyclic ureas via Pd-catalyzed cyclization". *Org. Lett.*, **2006**, 8, 3311-3314; c) Reddy, A. V. N.; Kamal, A.; Sattur, P. B. "An efficient synthesis of 3,4-dihydro-4-imino-2(1H)-quinazolinones". *Synth. Commun.*, **1988**, 18, 525-530; d) Xu, X. J.; Zong, Y. X. "Microwave-assisted traceless synthesis of benzimidazolones". *Tetrahedron Lett.*, **2007**, 48, 129-132; e) Milanese, A. WO 96/21649, **1996**; f) McLaughlin, M.; Palucki, M.; Mercantonio, K. WO 2007/120590, **2007**.
29. a) Moody, C. J.; Hunt, P. A.; Smith, C. "Iodocyclisation of *N*-allyl ureas; a route to imidazolin-2-ones". *Arkivoc*, **2000**, 1, 698-706; b) Thurmond, R. L.; Beavers, M. P.; Hui, C.; Meduna, S. P.; Gustin, D. L.; Sun, S.; Almond, H. J.; Karlsson, L.; Edwards, J. P. "Non-peptidic, non-covalent inhibitors of the cysteine protease cathepsin S". *J. Med. Chem.*, **2004**, 47, 4799-4801; c) Okumura, Y.; Ando, A.; William, S. R. "Efficient and

- practical synthesis of both enantiomers of 3-phenylcyclopentanol derivatives”. *Tetrahedron*, **2002**, 58, 8729-8736.
- 30.** a) Vijaykar, P. S.; Gaitonde, A. WO 2007/080430, **2007**; b) Eckert, H.; Forster, B. “Triphosgene, a crystalline phosgene substitute”. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1987**, 26, 894-895; c) Szczepankiewicz, B. G.; Heathcock, C. H. “The abnormal fischer indole synthesis”. *Tetrahedron*, **1997**, 53, 8853-8870; d) Armstrong, A.; Edmonds, I. D.; Swarbrick, M. E. “Electrophilic amination of enolates with oxaziridines: effects of oxaziridine structure and reaction conditions”. *Tetrahedron*, **2005**, 61, 8423-8442; e) Okubo, T.; Yoshikawa, R.; Chaki, S.; Okuyama, S.; Nakazato, A. “Desgin, synthesis and structure-affinity relationships of aryloxyanilide derivatives as novel peripheral benzodiazepine receptor ligands”. *Bioorg. Med. Chem.*, **2004**, 12, 423-438.
- 31.** a) Paquette, L. A. *Encyclopedia of reagents for organic synthesis*, John Wiley & Sons: Chichester, **1995**, pp 4107-4110; b) Nowick, J. S.; Insaf, S. “The propensities of amino acids to form parallel  $\beta$ -sheets”. *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 10903-10908; c) Anwar, U.; Fielding, M. R.; Grigg, R.; Sridharan, V.; Urch, C. “Palladium catalysed tandem cyclisation-anion capture processes”. *J. Organomet. Chem.*, **2006**, 691, 1476-1487; d) Fielding, M. R.; Grigg, R.; Urch, C. J. “Novel synthesis of oxindoles from carbamoyl chlorides via palladium catalysed cyclisation-anion capture”. *Chem. Commun.*, **2000**, 2239-2240.
- 32.** a) Godde, F.; Toulme, J.-J.; Moureau, S. “Benzoquinazoline derivatives as substitutes for thymine in nucleic acid complexes. Use of fluorescence emission of benzo[g]quinazoline-2,4-(1H,3H)-dione in probing duplex and triplex formation”. *Biochemistry*, **1998**, 37, 13765-13775; b) Werner, D.; Lubbert, M.; U.S. Patent 2005282814, **2005**.
- 33.** Gorbatenko, V. I. “Chemistry of chlorocarbonyl isocyanate”. *Tetrahedron*, **1993**, 49, 3227-3257.
- 34.** a) Remers, W.; Iyengar, B. U.S. Patent 6476236, **2002**; b) Hennequin, L. F. A. WO 03/064413, **2003**.
- 35.** Pothukanuri, S.; Pianowski, Z.; Winssinger, N. “Expanding the scope and orthogonality of PNA synthesis”. *Eur. J. Org. Chem.*, **2008**, 3141-3148.
- 36.** Prystas, M.; Sorm, F. “Nucleic acids components and their analogues. LXXXV. Synthesis of 5-cyanouracil, 5-nitrouracil, and 5-aminouracil 1-glycosyl derivatives”. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **1966**, 31, 3990-4001.
- 37.** a) Janssen, P. G. A.; Vandenbergh, J.; Van Dongen, J. L.; Meijer, E. W.; Schenning, A. P.H.J. “ssDNA templated self-assembly of chromophores”. *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 6078-6079; b) Janczak, J.; Kubiak, R. “Transformation of one of two CN groups of o-dicyanobenzene in the presence of cyanoguanidine. Crystal and gas-phase structure of 2-(2'-cyanophenyl)-4,6-diamino-1,3,5-triazine”. *J. Mol. Struct.*, **2005**, 749, 60-69; c) Asadi, A.; Patrick, B. O.; Perrin, D. M. “Janus-AT bases: synthesis, self-assembly, and solid state structures”. *J. Org. Chem.*, **2007**, 72, 466-475; d) George, S. J.; Tomovic, Z.; Smulders, M. M. J.; De Greef, T. F.; Leclere, P. E. L. G.; Meijer, E. W.; Schenning, A. P. H. J. “Helicity induction and amplification in an oligo (p-phenylenevinylene) assembly through hydrogen-bonded chiral acids”. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, 46, 8206-8211; e) Laliberté, D.; Maris, T.; Wuest, J. D. “Molecular tectonics. Porous hydrogen-bonded networks built from derivatives of pentaerythrityl tetraphenyl ether”. *J. Org. Chem.*, **2004**, 69, 1776-1787; f) Telfer, S. G.; Wuest, J. D. “Metallotectons:

- using enantiopure tris(dipyrrinato)cobalt (III) complexes to build chiral molecular materials". *Chem. Commun.*, **2007**, 30, 3166-3168; g) Keiichi, A.; Yuichi, S.; Ko, Y.; Koichi, Y.; Koichi, N.; Akira, F.; Satoshi, K. "Triple hydrogen bonds in crystal engineering of metal-assembled complexes". *Chem. Eur. J.*, **2005**, 11, 6616-6628.
- 38.** a) Christensen, L.; Hansen, H. F.; Koch, T.; Nielsen, P. E. "Inhibition of PNA triplex formation by *N*<sup>4</sup>-benzoylated cytosine". *Nucleic Acids Res.*, **1998**, 26, 2735-2739; b) Schwergold, C.; Depecker, G.; Di Giorgio, C.; Patino, N.; Jossinet, F.; Ehresmann, B.; Terreux, R.; Cabrol-Bass, D.; Condom, R. "Cyclic PNA hexamer-based compound: modelling, synthesis and inhibition of the HIV-1 RNA dimerization process". *Tetrahedron*, **2002**, 58, 5675-5687; c) Debaene, F.; Winssinger, N. "Azido-peptide nucleic acid. An alternative strategy for solid-phase peptide nucleic acid (PNA) synthesis". *Org. Lett.*, **2003**, 5, 4445-4447.
- 39.** Lloyd-Williams, P.; Albericio, F.; Giralt, E. *Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins*, capítol 2, *Solid-phase peptide synthesis*, CRC Press: New York, 1997, 19-93.
- 40.** a) Stefanska, B.; Dzieduszycka, M.; Martelli, S.; Borowski, E. "Synthesis of unsymmetrically substituted 1,4-Bis[(aminoalkyl)amino]anthracene-9,10-diones as potential antileukemic agents". *J. Med. Chem.*, **1989**, 32, 1724-1728; b) Krapcho, A. P.; Getahun, Z.; Avery, K. L.; Vargas, K. J.; Hacker, M. P. "Synthesis and antitumor evaluations of symmetrically and unsymmetrically substituted 1,4-Bis[(aminoalkyl)amino]anthracene-9,10-diones and 1,4-Bis[(aminoalkyl)amino]anthracene-5,8-dihydroxyanthracene-9,10-diones". *J. Med. Chem.*, **1991**, 34, 2373-2380; c) Gianoncelli, A.; Basili, S.; Scalabrin, M.; Sosic, A.; Moro, S.; Zagotto, G.; Palumbo, M.; Gresh, N.; Gatto, B. "Rational design, synthesis, and DNA binding properties of novel sequence-selective peptidyl congeners of ametantrone". *ChemMedChem*, **2010**, 5, 1080-1091.
- 41.** Dallavalle, S.; Giannini, G.; Alloatti, D.; Casati, A.; Marastoni, E.; Musso, L.; Merlini, L.; Morini, G.; Penco, S.; Pisano, C.; Tinelli, S.; De Cesare, M.; Beretta, G. L.; Zunino, F. "Polyamine analogues of camptothecin". *J. Med. Chem.*, **2006**, 49, 5177-5186.
- 42.** a) Volante, R. P. "A new, highly efficient method for the conversion of alcohols to thioesters and thiols". *Tetrahedron Lett.*, **1981**, 22, 3119-3122; b) Koen, M.; Lubbert, M. "Medium chain fatty acids applicable as antimicrobial agents". WO 2001097799, **2001**; c) Berbeci, L. S.; Wang, W.; Kaifer, A. E. "Drastically decreased reactivity of thiols and disulfides complexed by cucurbit(6)uril". *Org. Lett.*, **2008**, 10, 3721-3724; d) Clavaud, C.; Heckenroth, M.; Stricane, C.; Ménez, A.; Dugave, C. "Cyclic and acyclic oxorhenium (V)-peptide conjugates as new ligands of the human cyclophilin hCyp-18". *Bioconjugate Chem.*, **2006**, 17, 807-814.
- 43.** Childs-Disney, J. L.; Wu, M.; Puschechnikov, A.; Aminova, O.; Disney, M. D. "A small molecule microarray platform to select RNA internal loop-ligand interactions". *ACS Chem. Biol.*, **2007**, 2, 745-754.
- 44.** Zheng, T-C.; Burkart, M.; Richardson, D. E. "A general and mild synthesis of thioesters and thiols from halides". *Tetrahedron Lett.*, **1999**, 40, 603-606.
- 45.** Durai, C. R.; Harding, M. M. "Targeting nucleic acids using dynamic combinatorial chemistry". *Aust. J. Chem.*, **2011**, 64, 671-680.

46. a) Whitney, A. M.; Ladame, S.; Balasubramanian, S. "Templated ligand assembly by using G-quadruplex DNA and dynamic covalent chemistry". *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, 43, 1143-1146; b) Ladame, S.; Whitney, A. M.; Balasubramanian, S. "Targeting nucleic acid secondary structures with polyamides using an optimized dynamic combinatorial approach". *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, 44, 5736-5739; c) Bugaut, A.; Jantos, K.; Wietor, J-L.; Rodriguez, R.; Sanders, J. K. M.; Balasubramanian, S. "Exploring the differential recognition of DNA G-quadruplex targets by small molecules using dynamic combinatorial chemistry". *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, 47, 2677-2680.
47. a) Katz, B. A. "Binding of biotin to streptavidin stabilizes intersubunit salt bridges between Asp61 and His87 at low pH". *J. Mol. Biol.*, **1997**, 274, 776-800; b) Taninaka, A.; Takeuchi, O.; Shigekawa, H. "Reconsideration of dynamic force spectroscopy analysis of streptavidin-biotin interactions". *Int. J. Mol. Sci.*, **2010**, 11, 2134-2151.
48. Corbett, P. T.; Leclaire, J.; Vial, L.; West, K. R.; Wietor, J-L.; Sanders, J. K. M.; Otto, S. "Dynamic combinatorial chemistry". *Chem. Rev.*, **2006**, 106, 3652-3711.
49. West, K. R.; Bake, K. D.; Otto, S. "Dynamic combinatorial libraries of disulfide cages in water". *Org. Lett.*, **2005**, 7, 2615-2618.
50. Otto, S.; Furlan, R. L. E.; Sanders, J. K. M. "Dynamic combinatorial libraries of macrocyclic disulfides in water". *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 12063-12064.
51. Krishnan-Ghosh, Y.; Balasubramanian, S.; "Dynamic covalent chemistry on self-templating peptides: formation of a disulfide-linked  $\beta$ -hairpin mimic". *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, 42, 2171-2173.
52. Milanesi, L.; Hunter, C. A.; Sedelnikova, S. E.; Waltho, J. P. "Amplification of bifunctional ligands for calmodulin from a dynamic combinatorial library". *Chem. Eur. J.*, **2006**, 12, 1081-1087.
53. Fernandes, P. A.; Ramos, M. J. "Theoretical insights into the mechanism for thiol/disulfide exchange". *Chem. Eur. J.*, **2004**, 10, 257-266.
54. Corbett, P. T.; Sanders, J. K.; Otto, S. "Competition between receptors in dynamic combinatorial libraries: amplification of the fittest?". *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 9390-9392.
55. Ludlow, F. R.; Otto, S. "The impact of the size of dynamic combinatorial libraries on the detectability of molecular recognition induced amplification". *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132, 5984-5986.
56. a) Rabanal, F.; DeGrado, W. F.; Dutton, P. L. "Use of 2,2'-dithiobis(5-nitropyridine) for the heterodimerization of cysteine containing peptides. Introduction of the 5-nitro-2-pyridinesulfonyl group". *Tetrahedron Lett.*, **1996**, 37, 1347-1350; b) Chen, L.; Wright, L. R.; Chen, C-H.; Oliver, S. F.; Wender, P. A.; Mochly-Rosen, D. "Molecular transporters for peptides: delivery of a cardioprotective  $\epsilon$ PKC agonist peptide into cells and intact ischemic heart using a transport system, R<sub>7</sub>". *Chem. Biol.*, **2001**, 8, 1123-1129; c) Galande, A. K.; Weissleder, R.; Tung, C-H. "An effective method of on-resin disulfide bond formation in peptides". *J. Comb. Chem.*, **2005**, 7, 174-177.
57. a) Perreault, D. M.; Cabell, L. A.; Anslyn, E. V. "Using guanidinium groups for the recognition of RNA and as catalysts for the hydrolysis of RNA". *Bioorg. Med. Chem.*, **1997**, 5, 1209-1220; b) Blondeau, P.; Segura, M.; Pérez-Fernández, R.; de Mendoza, J.

- “Molecular recognition of oxoanions based on guanidinium receptors”. *Chem. Soc. Rev.*, **2007**, 36, 198-210.
- 58.** a) Luedtke, N. W.; Baker, T. J.; Goodman, M.; Tor, Y. “Guanidinoglycosides: A novel family of RNA ligands”. *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 12035-12036; b) Staple, D. W.; Venditti, V.; Niccolai, N.; Ellson-Schwab, L.; Tor, Y.; Butcher, S. E. “Guanidinoneomycin B recognition on an HIV-1 RNA helix”. *ChemBioChem*, **2008**, 9, 93-102; c) Luedtke, N. W.; Carmichael, P.; Tor, Y. “Cellular uptake of aminoglycosides, guanidinoglycosides, and poly-arginine”. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 12374-12375.
- 59.** Baker, T. J.; Luedtke, N. W.; Tor, Y.; Goodman, M. “Synthesis and anti-HIV activity of guanidinoglycosides”. *J. Org. Chem.*, **2000**, 65, 9054-9058.
- 60.** a) Hergenrother, P. J.; Thomas, J. R. “Targeting RNA with small molecules”. *Chem. Rev.*, **2008**, 108, 1171-1224.; b) Blakeley, B. D.; DePorter, S. M.; Mohan, U.; Burai, R.; Tolbert, B. S.; McNaughton, B. R. “Methods for identifying and characterizing interactions involving RNA”. *Tetrahedron*, **2012**, 68, 8837-8855.
- 61.** a) Jecklin, M. C.; Schauer, S.; Dumelin, C. E.; Zenobi, R. “Label-free determination of protein-ligand binding constants using mass spectrometry and validation using surface plasmon resonance and isothermal titration calorimetry”. *J. Mol. Recognit.*, **2009**, 22, 319-329; b) Vuignier, K.; Schappler, J.; Veuthey, J-L.; Carrupt, P-A.; Martel, S. “Drug-protein binding: a critical review of analytical tools”. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2010**, 398, 53-66.
- 62.** a) Feig, A. L. “Applications of isothermal titration calorimetry in RNA biochemistry and biophysics”. *Biopolymers*, **2007**, 87, 293-301; b) Salim, N. N.; Feig, A. L. “Isothermal titration calorimetry of RNA”. *Methods*, **2009**, 47, 198-205.
- 63.** a) Gilbert, S. D.; Stoddard, C. D.; Wise, S. J.; Batey, R. T. “Thermodynamic and kinetic characterization of ligand binding to the purine riboswitch aptamer domain”. *J. Mol. Biol.*, **2006**, 359, 754-768; b) Pilch, D. S.; Kaul, M.; Barbieri, C. M.; Kerrigan, J. E. “Thermodynamics of aminoglycoside-rRNA recognition”. *Biopolymers*, **2003**, 70, 58-79.
- 64.** Xavier, K. A.; Eder, P. S.; Giordano, T. “RNA as a drug target: methods for biophysical characterization and screening”. *Trends Biotechnol.*, **2000**, 18, 349-356.
- 65.** a) Wong, C-H.; Liang, F-S. “Surface plasmon resonance study of RNA-aminoglycoside interactions”. *Methods Enzymol.*, **2003**, 362, 340-353; b) Hendrix, M.; Priestley, E. S.; Joyce, G. F.; Wong, C-H. “Direct observation of aminoglycoside-RNA interactions by surface plasmon resonance”. *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 3641-3648; c) Verhelst, S. H. L.; Michiels, P. J. A.; Van der Marel, G. A.; Van Boeckel, C. A. A.; Van Boom, J. H. “Surface plasmon resonance evaluation of various aminoglycoside-RNA hairpin interactions reveals low degree of selectivity”. *ChemBioChem*, **2004**, 5, 937-942.
- 66.** a) Zhang, S.; Van Pelt, C. K.; Wilson, D. B. “Quantitative determination of noncovalent binding interactions using automated nanoelectrospray mass spectrometry”. *Anal. Chem.*, **2003**, 75, 3010-3018; b) Rosu, F.; De Pauw, E.; Gabelica, V. “Electrospray mass spectrometry to study drug-nucleic acids interactions”. *Biochimie*, **2008**, 90, 1074-1087; c) Erba, E. B.; Zenobi, R. “Mass spectrometric studies of dissociation constants of noncovalent complexes”. *Annu. Rep. Prog. Chem.*, **2011**, 107, 199-228.

67. a) Hofstadler, S. A.; Griffey, R. H. "Analysis of noncovalent complexes of DNA and RNA by mass spectrometry". *Chem. Rev.*, **2001**, 101, 377-390; b) Sannes-Lowery, K. A.; Hu, P.; Mack, D. P.; Mei, H-Y.; Loo, J. A. "HIV-1 tat peptide binding to TAR RNA by electrospray ionization mass spectrometry". *Anal. Chem.*, **1997**, 69, 5130-5135; c) Griffey, R. H.; Sannes-Lowery, K. A.; Drader, J. J.; Mohan, V.; Swayze, E. E.; Hofstadler, S. A. "Characterization of low-affinity complexes between RNA and small molecules using electrospray ionization mass spectrometry". *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 9933-9938.
68. a) Yu, L.; Oost, T. K.; Schkeryantz, J. M.; Yang, J.; Janowick, D.; Fesik, S. W. "Discovery of aminoglycoside mimetics by NMR-based screening of *Escherichia coli* a-site RNA". *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 4444-4450; b) Fielding, L. "NMR methods for the determination of protein-ligand dissociation constants". *Prog. Nucleic Magn. Reson. Spectrosc.*, **2007**, 51, 219-242; c) Zhang, X.; Sanger, A.; Hemmig, R.; Jahnke, W. "Ranking of high-affinity ligands by NMR spectroscopy". *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, 48, 6691-6694; d) Markin, C. J.; Spyropoulos, L. "Increased precision for analysis of protein-ligand dissociation constants determined from chemical shift titrations". *J. Biomol. NMR*, **2012**, 53, 125-138.
69. a) Yan, Z.; Ramisetty, S. R.; Bolton, P. H.; Baranger, A. M. "Selective recognition of RNA helices containing dangling ends by a quinoline derivative". *ChemBioChem*, **2007**, 8, 1658-1661; b) Lombès, T.; Moumné, R.; Larue, V.; Prost, E.; Catala, M.; Lecourt, T.; Dardel, F.; Micouin, L.; Tisné, C. "Investigation of RNA-ligand interactions by <sup>19</sup>F NMR spectroscopy using fluorinated probes". *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, 51, 9530-9534.
70. Hellman, L. M.; Fried, M. G. "Electrophoresis mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acids interactions". *Nat. Protoc.*, **2007**, 2, 1849-1861.
71. a) Kirk, S. R.; Luedtke, N. W.; Tor, Y. "Neomycin-acridine conjugate: a potent inhibitor of Rev-Rre binding". *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 980-981; b) Xiao, G.; Kumar, A.; Kumar, X. L.; Rigl, T.; Bajic, M.; Davis, T. M.; Boykin, D. W.; Wilson, W. D. "Inhibition of the HIV-1 Rev-RRE complex formation by unfused aromatic cations". *Bioorg. Med. Chem.*, **2001**, 9, 1097-1113.
72. Warui, D. M.; Baranger, A. M. "Identification of specific small molecule ligands for stem loop 3 ribonucleic acid of the packaging signal  $\Psi$  of human immunodeficiency virus-1". *J. Med. Chem.*, **2009**, 52, 5462-5473.
73. a) Tok, J. B. -H.; Dunn, L. J.; Des Jean, R. C. "Binding of dimeric aminoglycosides to the HIV-1 Rev Responsive Element (REE) RNA construct". *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2001**, 11, 1127-1131; b) Cho, J.; Rando, R. R. "Specific binding of hoechst 33258 to site 1 thymidylate synthase mRNA". *Nucleic Acids Res.*, **2000**, 28, 2158-2163; c) Luedtke, N. W.; Liu, Q.; Tor, Y. "RNA-ligand interactions: affinity and specificity of aminoglycoside dimers and acridine conjugates to the HIV-1 Rev Response Element". *Biochemistry*, **2003**, 42, 11391-11403.
74. a) Llano-Sotelo, B.; Chow, C. S. "RNA-aminoglycoside antibiotic interactions: fluorescence detection of binding and conformational change". *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1999**, 9, 213-216; b) Thomas, J. R.; Liu, X.; Hergenrother, P. J. "Biochemical and thermodynamic characterization of compounds that bind to RNA hairpin loops: toward an understanding of selectivity". *Biochemistry*, **2006**, 45, 10928-10938.

75. a) Lakowicz, J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy*, capítol 1; *Introduction to fluorescence*, Kluwer Academia/Plenum Publisher, New York, 2000, pp 1-20; b) Gore, M. G. *Spectrophotometry & Spectrofluorimetry*, capítol 2; Szabo, A. G.; *Fluorescence principles and measurement*, Oxford Univeristy Press., New York, 2000, pp 33-36; c) Cooper, A. *Biophysical Chemistry*, capítol 2; *Spectroscopy*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2004, pp 21-70.
76. Walter, N. G.; Burke, J. M. "Fluorescent assays to study structure, dynamics, and function of RNA and RNA-ligand complexes". *Methods Enzymol.*, **2000**, 317, 409-440.
77. Sinkeldam, R. W.; Greco, N. J.; Tor, Y. "Fluorescent analogs of biomolecular building blocks: design, properties, and applications". *Chem. Rev.*, **2010**, 110, 2579-2619.
78. a) Thomas, J. R.; Liu, X.; Hergenrother, P. J. "Biochemical and thermodynamic characterization of compounds that bind to RNA hairpin loops: towards an understanding of selectivity". *Biochemistry*, **2006**, 45, 10928-10938; b) Hermann, T. "Rational ligand design for RNA: the role of static structure and conformational flexibility in target recognition". *Biochimie*, **2002**, 84, 869-875.
79. a) Kaul, M.; Barbieri, C. M.; Pilch, D. S. "Fluorescence-based approach for detecting and characterizing antibiotic-induced conformational changes in ribosomal RNA: comparing aminoglycoside binding to prokaryotic and eukaryotic ribosomal RNA sequences". *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 3447-3453; b) Shandrick, S.; Zhao, Q.; Han, Q.; Ayida, B. K.; Takahashi, M.; Winters, G. C.; Simonsen, K. B.; Vourloumis, D.; Hermann, T. "Monitoring molecular recognition of the ribosomal decoding site". *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, 43, 3177-3182.
80. a) Blount, K. F.; Zhao, F.; Hermann, T.; Tor, Y. "Conformational constraint as a means for understanding RNA-aminoglycoside specificity". *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 9818-9829; b) Blount, K. F.; Tor, Y. "A tale of two targets: differential RNA selectivity of nucleobase-aminoglycoside conjugates". *ChemBioChem*, **2006**, 7, 1612-1621.
81. Stampfl, S.; Lempradl, A.; Koehler, G.; Schroeder, R. "Monovalent ion dependence of neomycin B binding to an RNA aptamer characterized by spectroscopic methods". *ChemBioChem*, **2007**, 8, 1137-1145.
82. Anderson, P. C.; Mecozzi, S. "Minimum sequence requirements for the binding of paramomycin to the rRNA decoding site A". *Biopolymers*, **2007**, 86, 95-111.
83. Tam, V. K.; Kwong, D.; Tor, Y. "Fluorescent HIV-1 dimerization initiation site: design, properties, and use for ligand discovery". *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 3257-3266.
84. Thomas, J. R.; Liu, X.; Hergenrother, P. J. "Size-specific ligands for RNA hairpin loops". *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 12434-12435.
85. Llano-Sotelo, B.; Azucena, E. F.; Kotra, L. P.; Mobashery, S.; Chow, C. S. "Aminoglycosides modified by resistance enzymes display diminished binding to the bacterial ribosomal aminoacyl-tRNA site". *Nucleic Acids Res.*, **2002**, 9, 455-463.
86. a) DeNap, J. C. B.; Thomas, J. R.; Musk, D. J.; Hergenrother, P. J. "Combating drug-resistant bacteria: small molecule mimics of plasmid incompatibility as antiplasmid compounds". *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 15402-15404; b) Thomas, J. R.; DeNap, J. C. B.; Wong, M. L.; Hergenrother, P. J. "The relationship between



aminoglycosides RNA binding proclivity and their antiplasmid effect on an IncB plasmid". *Biochemistry*, **2005**, 44, 6800-6808.

**87.** Ramisetty, S. R.; Baranger, A. M. "Cooperative binding of a quinoline derivative to an RNA stem loop containing a dangling end". *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2010**, 20, 3134-3137.

**88.** Warui, D. M.; Baranger, A. M. "Identification of small molecule inhibitors of the HIV-1 nucleocapsid-stem-loop 3 RNA complex". *J. Med. Chem.*, **2012**, 55, 4132-4141.

**89.** a) Blount, K. F.; Tor, Y. "Using pyrene-labeled HIV-1 TAR to measure RNA-small molecule binding". *Nucleic Acids Res.*, **2003**, 31, 5490-5500; b) Disney, M. D.; Labuda, L. P.; Paul, D. J.; Poplawski, S. G.; Pushechnikov, A.; Tran, T.; Velagapudi, S. P.; Wu, M.; Childs-Disney, J. L. "Two-dimensional combinatorial screening identifies specific aminoglycoside-RNA internal loop partners". *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 11185-11194.

**90.** Eftink, M. "Fluorescence methods for studying equilibrium macromolecule-ligand interaction". *Methods Enzymol.*, **1997**, 278, 221-256.

**91.** Gareiss, P. C.; Sobczak, K.; McNaughton, B. R.; Palde, P. B.; Thornton, C. A.; Miller, B. L. "Dynamic combinatorial selection of molecules capable of inhibiting the (CUG) repeat RNA-MBNL1 interaction in vitro: discovery of lead compounds targeting myotonic dystrophy (DM1)". *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 16254-16261.

**92.** Tor, Y. "Targeting RNA with small molecules". *ChemBioChem*, **2003**, 4, 998-1007.

**93.** Blackburn, G. M.; Gait, M. J. *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*, capítol 10., *Techniques applied to Nucleic Acids*, Oxford University Press, New York, 1996, pp 445-497.

**94.** Mergny, J-L.; Lacroix, L. "Analysis of thermal melting curves". *Oligonucleotides*, **2003**, 13, 515-537.

**95.** Bugaut, A.; Toulmé, J-J.; Rayner, B. "Use of dynamic combinatorial chemistry for the identification of covalently appended residues that stabilize oligonucleotide complexes". *Angew. Chem.*, **2004**, 116, 3206-3209.

**96.** a) Kaul, M.; Pilch, D. S. "Thermodynamics of aminoglycoside-rRNA recognition: the binding of neomycin-class aminoglycosides to the A site of 16S rRNA". *Biochemistry*, **2002**, 41, 7695-7706; b) Michael, K.; Wang, H.; Tor, Y. "Enhanced RNA binding of dimerized aminoglycosides". *Bioorg. Med. Chem.*, **1999**, 7, 1361-1371; c) Jin, E.; Katritch, V.; Olson, W. K.; Kharatisvili, M.; Abagyan, R.; Pilch, D. S. "Aminoglycoside binding in the major groove of duplex RNA: the thermodynamic and electrostatic forces that govern recognition". *J. Mol. Biol.*, **2000**, 298, 95-110.

**97.** Draper, D. E.; Grilley, D.; Soto, A. M. "Ions and RNA folding". *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **2005**, 34, 221-243.

**98.** Wilkins, P. C.; Wilkins, R. G. *Inorganic Chemistry in Biology*, Oxford University Press, New York, 1997.

**99.** Colombo, R.; Carotti, A.; Catto, M.; Racchi, M.; Lanni, C.; Verga, L.; Caccialanza, G.; De Lorenzi, E. "CE can identify small molecules that selectively target soluble oligomers of amyloid  $\beta$  protein and display antifibrillogenic activity". *Electrophoresis*, **2009**, 30, 1418-1429.

**100.** Andac, C. A.; Stringfellow, T. C.; Hornemann, U.; Noyanalpan, N. "NMR and amber analysis of the neamine pharmacophore for the design of novel aminoglycoside antibiotics". *Bioorg. Chem.*, **2011**, 39, 28-41.

- 101.** a) Kaiser, M.; Sainlos, M.; Lehn, J-M.; Bombard, S.; Teulade-Fichou, M-P. "Aminoglycoside-quinacridine conjugates: towards recognition of the P6.1 element of telomerase RNA". *ChemBioChem*, **2006**, 7, 321-329; b) Sánchez-Carrasco, S.; Delcros, J. G.; Moya-García, A. A.; Sánchez-Jiménez, F.; Ramírez, F. J. "Study by optical spectroscopy and molecular dynamics of the interaction of acridine-spermine conjugate with DNA". *Biophys. Chem.*, **2008**, 133, 54-65; c) Piantanida, I.; Masic, L.; Rusak, G. "Structure-spectrophotometric selectivity relationship in interactions of quercetin related flavonoids with double stranded and single stranded RNA". *J. Mol. Struct.*, **2009**, 924-926, 138-143.
- 102.** a) Li, N.; Ma, Y.; Yang, C.; Guo, L.; Yang, X. "Interaction of anticancer drug mitoxantrone with DNA analyzed by electrochemical and spectroscopic methods". *Biophys. Chem.*, **2005**, 116, 199-205.
- 103.** a) Feigon, J.; Denny, W. A.; Leupin, W.; Kearns, D. R. "Interactions of antitumor drugs with natural DNA: <sup>1</sup>H NMR Study of binding mode and kinetics". *J. Med. Chem.*, **1984**, 27, 450-465; b) Han, X.; Gao, X. "Sequence specific recognition of ligand-DNA complexes studied by NMR". *Curr. Med. Chem.*, **2001**, 8, 551-581; c) Nakatani, K.; Hagihara, S.; Goto, Y.; Kobori, A.; Hagihara, M.; Hayashi, G.; Kyo, M.; Nomura, M.; Mishima, M.; Kojima, C. "Small-molecule ligand induces nucleotide flipping in (CAG)<sub>n</sub> trinucleotide repeats". *Nat. Chem. Biol.*, **2005**, 1, 39-43.
- 104.** a) Faber, C.; Sticht, H.; Schweimer, K.; Rösch, P. "Structural rearrangements of HIV-1 Tat-responsive RNA upon binding of Neomycin B". *J. Mol. Biol.*, **2000**, 275, 20660-20666; b) DeJong, E. S.; Chang, C.; Gilson, M. K.; Marino, J. P. "Proflavine acts as a Rev inhibitor by targeting the high-affinity Rev binding site of the Rev responsive Element of HIV-1". *Biochemistry*, **2003**, 42, 8035-8046; c) Spillane, C. B.; Smith, J. A.; Buck, D. P.; Collins, J. G.; Keene, F. R.; "Dinuclear ruthenium (II) complexes as potential probes for RNA bulge sites". *Dalton trans.*, **2007**, 5290-5296; d) Ferner, J.; Suhartono, M.; Breitung, S.; Jonker, H. R. A.; Hennig, M.; Wöhnert, J.; Göbel, M.; Schwalbe, H. "Structures of HIV TAR RNA-ligand complexes reveal higher binding stoichiometries". *ChemBioChem*, **2009**, 10, 1490-1494; e) Duchardt-Ferner, Weigand, J. E.; Ohlenschläger, O.; Schmidtke, S. R.; Suess, B.; Wöhnert, J. "Highly modular structure and ligand binding by conformational capture in a minimalistic riboswitch". *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, 49, 6216-6219.
- 105.** Roberts, G. C. *NMR in Macromolecules*, capítol 8., Wijmenga, S. S.; Mooren, M. M. W.; Hilbers, C. W. *NMR of nucleic acids; from spectrum to structure*, Oxford: IRL Press, 1993, pp 217-283.
- 106.** Latham, M. P.; Zimmermann, G. R.; Pardi, A. "NMR chemical exchange as a probe for ligand-binding kinetics in a theophylline-binding RNA aptamer". *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131, 5052-5053.



## *Part Experimental*



## Materials i Mètodes

### 1 Dissolvents, reactius i solucions amortidores de pH

#### 1.1 Dissolvents i reactius generals

Els dissolvents habituals han estat emprats directament, a excepció dels que es citen a continuació que han necessitat especificacions o tractaments especials:

**ACN:** de qualitat HPLC (>99.9 % puresa) de Panreac, VWR, SDS o Fisher Chemical.

**ACN anh:** per a la síntesi d'oligonucleòtids s'ha emprat directament ACN anh de Glen Research o d'Applied Biosystems de qualitat de síntesi de DNA, o guardat prèviament sobre pedres de CaH<sub>2</sub> i atmosfera d'argó.

**Aigua:** desionitzada de qualitat MilliQ (18.2 MΩ·cm<sup>-1</sup>) lliure d'RNases, obtinguda mitjançant amb un sistema MilliQ Synthesis A10 de Millipore.

**Amoníac:** dissolució comercial al 32% extrapura de Scharlau.

**DCM:** de Scharlau o SDS (*pure pour synthesis*). Les traces d'àcid s'eliminen eluint-lo a través d'una columna d'alúmina bàsica.

**DCM anh:** es destil·la sobre pedres de CaH<sub>2</sub> i s'utilitza directament o es guarda en una ampolla opaca a la llum sobre pedres de CaH<sub>2</sub> i atmosfera d'argó.

**Dioxà:** de Merck, qualitat d'anàlisi.

**DMF anh:** de SDS (*for peptide synthesis*), assecada sobre tamís molecular de 4Å i guardada en atmosfera d'argó. Abans de la seva utilització s'hi bombolleja N<sub>2</sub> durant unes hores per eliminar les impureses volàtil (amines).

**Etanol absolut:** de Panreac.

**Éter dietílic:** d'Aldrich (*spectrophotometric grade*) per a la precipitació d'RNA.

**Metanol:** qualitat HPLC, de Panreac, VWR o Fisher Chemical.

**Piridina anh:** de Panreac o Aldrich, s'asseca directament sobre pedres de CaH<sub>2</sub> i es guarda en atmosfera d'argó.

**TEA:** d'Aldrich (*ultra*, >99.5%, GC) per a la preparació de la solució tampó d'acetat de trietil amoni.

**TEA anh:** d'Aldrich, s'asseca directament sobre pedres de CaH<sub>2</sub> i es guarda en atmosfera d'argó.

**THF anh:** de Scharlau, s'eliminen les traces d'àcid eluint-lo a través d'una columna d'alúmina bàsica, i es destil·la, en atmosfera de N<sub>2</sub>, sobre sodi metàl·lic en presència de benzofenona.

Els reactius comercials han estat utilitzats directament, a excepció dels casos on ha calgut emprar condicions anhidres, que han estat prèviament assecats al buit en un dessecador amb P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. A continuació, s'especifiquen els reactius que han necessitat un tractament especial:

**DIEA o DIPEA anh:** de Merck o Aldrich (*reagent plus*, 99%), assecada directament sobre pedres de  $\text{CaH}_2$  i es guarda en atmosfera d'argó.

## 1.2 Dissolucions tampó o amortidores de pH

### Solució d'acetat de trietilamoni (TEAA) 2 M pH 7

Per preparar 500 ml d'aquesta solució tampó, s'addicionen, en agitació magnètica constant, 140 ml (1 mol) de trietilamina i 58 ml (1 mol) d'àcid acètic glacial en un erlenmeyer amb 200 ml d'aigua. L'agitació es manté durant 1 hora, s'ajusta el pH a 7 amb unes gotes de TEA o AcOH i s'enrasa fins a 500 ml amb aigua de qualitat MilliQ en un matràs aforat. Per utilitzar aquesta solució com a eluent d'HPLC s'ha de filtrar prèviament a través de filtres de 45  $\mu\text{m}$  de mida de porus, i diluir-la amb aigua de qualitat MilliQ fins a una concentració de 0.05 M.

### Solució de bicarbonat d'amoni 0.1 M pH 7.6

En un matràs aforat, es dissolen 7.9 g de bicarbonat d'amoni en 1 l d'aigua de qualitat MilliQ.

### Solució de fosfat sòdic 100 mM pH 6.8

Per preparar 100 ml de solució  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$  100 mM pH 6.8, es mesclen 24.5 ml d'una solució aquosa 0.2 M de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (35.6 g/l de la sal dihidratada) amb 25.5 ml d'una solució aquosa 0.2 M de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (31.2 g/l de la sal dihidratada) i s'enrasa fins a 100 ml amb aigua de qualitat MilliQ en un matràs aforat, i es comprova el pH resultant.

### Solució de Tris-HCl 2 M pH 8

Per preparar 50 ml d'aquesta solució tampó, es dissolen 12.1 g de Tris base en 40 ml d'aigua de qualitat MilliQ, s'agita vigorosament, s'ajusta el pH fins a 8 amb una solució d'HCl concentrat i s'enrasa fins a 50 ml en un matràs aforat.

### Solució de Tris-HCl 0.5 M pH 7.7

Per preparar 50 ml d'aquesta solució tampó, es pesen 2.86 g d'hidroclorur de tris(hidroximetil)aminometà (Tris àcid) i 829.8 mg de 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol (Tris bàsic), es dissolen en aigua de qualitat MilliQ i s'enrasa fins a 50 ml en un matràs aforat.

### Solució de Tris-HCl 0.5 M pH 5.7

Per preparar 50 ml d'aquesta solució tampó, es pesen 3.03 g de 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol (Tris bàsic), es dissolen en aigua de qualitat MilliQ, s'ajusta el pH amb una dissolució d'HCl concentrat i s'enrasa fins a 50 ml en un matràs aforat.

## 2 Instrumentació i tècniques generals

### 2.1 Tècniques espectroscòpiques

#### 2.1.1 Ressonància magnètica nuclear (RMN)

Els espectres de ressonància magnètica nuclear de  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  de molècules petites s'han enregistrat en aparells Varian Inova-300 MHz, Varian Unity-300 MHz, Varian Mercury-400 MHz i Varian VNMRS500 MHz de la Unitat d'RMN dels Serveis Científic-Tècnics (SCT) de la UB. Els espectres dels lligands i les valoracions monodimensionals dels complexos RNA-ligand s'han enregistrat també a la Unitat d'RMN dels SCT de la UB, en un aparell Bruker Avance III 600 MHz equipat amb una criosonda de triple ressonància TCI per a C-H/N-2H. Per aquest últim aparell s'han emprat tubs especials de fons pla amb un èmbol que permet concentrar la mostra a la zona d'irradiació (SHIGEMI Co, LTD, Japan), i tubs especials per RMN d'alt camp de 3 mm x 2.4 mm (NORELL, USA).

Els desplaçaments químics ( $\delta$ ) s'expressen en ppm respecte a la referència interna de tetrametilsilà als espectres de  $^1\text{H}$  ( $\delta$ : 0 ppm), el senyal del cloroform deuterat als espectres de  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ : 77.0 ppm) i el senyal residual del dissolvent per als dissolvents  $\text{CD}_3\text{OD}$  i  $d_6\text{-DMSO}$ . En els casos que s'han emprat  $\text{D}_2\text{O}$  o  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (9:1) s'ha emprat com a referència ( $\delta$ : 0 ppm) el 2,2-dimetil-2-silapentà-5-sulfonat (DSS).

#### 2.1.2 Espectroscòpia d'UV-Vis

Els espectres d'UV-Vis s'han realitzat en espectrofotòmetres Jasco V-550 UV-Vis i UNIKON XS UV-Vis. Les corbes de fusió per UV s'han enregistrat al Jasco V-550 UV-Vis amb controlador de temperatura Peltier Jasco ETC-505T. Les cubetes utilitzades han estat de quars Hellma de 10 mm de pas de llum i de volum 500  $\mu\text{l}$  i 1 ml.

#### 2.1.3 Espectroscòpia de fluorescència

Els espectres de fluorescència s'han adquirit a un fluorímetre modular QuantaMaster PTI (*Photon Technology International*) equipat amb una làmpada de xenó de 150 W, un tub fotomultiplicador R928, un *Shutter* automàtic al monocromador d'excitació, reixetes motoritzades i un suport amb capacitat per 4 cubetes amb agitador i controlador de temperatura Turret 400 (Quantum).

Les cubetes utilitzades han estat de quars, de 10 mm de pas de llum, de volum 1.5 ml i amb un nucli magnètic. El seu manteniment s'ha dut a terme netejant-les seqüencialment amb una solució de Hellmanex III (Hellma) al 5 % (v/v) i una solució d'àcid nítric al 5 % (v/v).

#### 2.1.4 Espectroscòpia d'infraroig (IR)

Els espectres d'infraroig s'han realitzat a un espectrofotòmetre Nicolet 6700FT-IR, emprant com a matrius una pastilla de KBr o de NaCl.



## 2.2 Espectrometria de masses

### 2.2.1 Espectrometria de masses MALDI-TOF

Els espectres de masses per MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight*) s'han enregistrat en aparells PerSeptive Biosystems Voyager-DE<sup>TM</sup>RP i 4800 Plus ABSciex del Servei d'espectrometria de masses dels SCT de la UB. Les matrius emprades han estat diverses:

- DHB (àcid 2,5-dihidroxibenzoic): 10 mg/ml en ACN/H<sub>2</sub>O 1:1 (v/v) (0.1 % TFA).
- THAP (2,4,6-trihidroxiacetofenona): 10 mg/ml en ACN/H<sub>2</sub>O 1:1 (v/v).
- CA (citrat d'amoni): 50 mg/ml en H<sub>2</sub>O.

Generalment, les mostres de molècules orgàniques s'han preparat mesclant 1 µl de matriu DHB amb 1 µl de la solució de mostra. En el cas dels oligonucleòtids, s'ha mesclat 1 µl de THAP, 1 µl de CA i 1 µl de l'oligonucleòtid en solució. En ambdós casos s'ha dipositat a la placa entre 0.5-1 µl de la mescla resultant i s'ha assecat a l'aire.

Els paràmetres d'anàlisi emprats depenen tant de la naturalesa de la mostra, com de la seva massa esperada. Normalment s'ha emprat el mode "reflector" positiu per les molècules orgàniques, i el mode lineal i negatiu pels oligonucleòtids.

### 2.2.2 Espectrometria de masses *Electrospray* (ESI-MS)

Els espectres de masses per *electrospray* (ESI) s'han obtingut en un espectròmetre Micromass ZQ de Waters amb sonda *electrospray*, equipat amb un detector de simple quadrupol acoblat a un HPLC Waters 2695 amb detector de fotodíode Waters 2996 PDA, del departament de Química Orgànica de la UB.

En general, les mostres s'han dissolt en aigua qualitat MilliQ, MeOH o DCM (qualitat HPLC), i s'han injectat directament a través d'un injector Reodyne, o bé mitjançant un vial. En tots els casos s'ha treballat en polaritat positiva, en mètode Scan mode Centroid i amb un scan time entre 0.1 i 1. Els voltatges de treball han estat de 20 V (con), 3 KV (electrocapil·lar), 5 V (extractor) i 0.5 V (RF lens). Les temperatures de la font i de desolvatació han estat de 100 i 250 °C, respectivament.

## 2.3 Tècniques cromatogràfiques

### 2.3.1 Cromatografia de capa prima (TLC)

L'anàlisi per TLC (*thin-layer chromatography*) s'ha dut a terme sobre plaques de gel de sílice suportades per làmines d'alumini (60F, 0.2 mm, Merck). El revelat s'ha realitzat de dues maneres:

- visualització directe amb una làmpada d'ultraviolat a 254 nm.
- revelador de sucres: detecció dels enllaços glicosídics presents als sucres. Se submergeix la capa prima en una solució de revelador (1 g de difenilamina en 100 ml d'AcOH glacial, 180 ml d'EtOH absolut i 3 ml d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), i s'escalfa fins a 110°C. La

presència de compostos amb enllaços glicosídics es manifesta a través de l'aparició de taques de color rosat.

### 2.3.2 Cromatografia per columna

La purificació per cromatografia en columna s'ha realitzat sobre gel de sílice (Chromatogel 60 Å CC, 230-400 mesh). Els eluents i els gradients emprats s'especifiquen en cada cas.

### 2.3.3 Cromatografia de líquids d'alta pressió (HPLC)

L'anàlisi i purificació per cromatografia de líquids d'alta pressió en fase invertida s'han dut a terme en diferents aparells:

- Sistema Shimadzu equipat amb dues bombes LC-20AD, un injector automàtic SIL-20A HT, un desgasador DGU-20A5 i un detector UV-Vis SPD-20A.
- Sistema Waters (Separations Module 2695 i PDA detector 2996).
- Sistema Waters semipreparatiu format per un detector de longitud d'ona dual Waters 2487, un injector automàtic Water 717 plus, un desgasador (Waters in line degasser AF), i un mòdul Waters 600 controller.

En condicions analítiques, s'ha treballat a un flux constant de 1 ml/min amb sistemes d'elució basats en gradients lineals de dos dissolvents. En el cas de les molècules orgàniques i derivats peptídics s'ha utilitzat mescles d'eluents A: 0.045% TFA en H<sub>2</sub>O i B: 0.036% TFA en ACN. Per a l'anàlisi dels oligoribonucleòtids s'ha emprat A: 0.05 M TEAA en H<sub>2</sub>O i B: 0.05 M TEAA en H<sub>2</sub>O/ACN 1:1, o A: 0.1 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> en H<sub>2</sub>O i B: 0.1 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> en H<sub>2</sub>O/ACN 1:1.

Les columnes cromatogràfiques de fase invertida utilitzades es mostren a continuació:

- Kromasil 100-10 C<sub>18</sub> 250 x 4 mm (tamany partícula 10 µm).
- Jupiter C<sub>18</sub> proteo 90 Å 250 x 4.6 mm (tamany partícula 4 µm).
- GraceSmart RP C<sub>18</sub> 250 x 4.6 mm (tamany de partícula 5 µm).
- Nucleosil 120 C<sub>18</sub> 250 x 4 mm (tamany de partícula 5 µm).

Per a la purificació a escala semipreparativa, s'ha treballat a flux entre 3 i 5 ml/min. En el cas de les molècules orgàniques i dels derivats peptídics s'ha utilitzat mescles d'eluents A: 0.1% TFA en H<sub>2</sub>O i B: 0.1% TFA en ACN, i una columna Jupiter proteo C<sub>18</sub> 90 Å 250 x 10 mm (tamany de partícula 10 µm). En canvi, pels oligoribonucleòtids s'han emprat A: 0.1 M TEAA en H<sub>2</sub>O i B: 0.1 M TEAA en H<sub>2</sub>O/ACN 1:1, o A: 0.1 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> en H<sub>2</sub>O i B: 0.1 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> en H<sub>2</sub>O/ACN 1:1, i una columna Jupiter C<sub>18</sub> 300 Å 250 x 10 mm (tamany de partícula 10 µm).

En tots els casos, els eluents han estat prèviament desgasats durant 15 min en un bany d'ultrasons. La longitud d'ona i els gradients utilitzats s'han escollit en funció de la naturalesa de les molècules analitzades.

### 2.3.4 Cromatografia de líquids de mitjana pressió (MPLC)

La purificació mitjançant cromatografia de mitjana pressió s'ha realitzat en un sistema format per un detector UV-Vis Uvicord SII de Pharmacia Biotech, un col·lector de fraccions automàtic 7000 de LKB, un enregistrator REC 101 de Pharmacia Biotech, i una bomba de pistó Milton Roy. S'ha emprat una columna de fase invertida C<sub>18</sub> (Vydac, 20x2 cm, 15-20 µm de diàmetre de partícula i 300 Å de tamany de porus).

Com a fase mòbil, s'han emprat mescles d'eluent A: 0.05% TFA en H<sub>2</sub>O i B: 0.05% TFA en ACN, desgasades prèviament a un bany d'ultrasons. La columna cromatogràfica s'ha equilibrat prèviament amb 300 ml de la solució inicial i, a continuació, se li ha aplicat el gradient amb l'ajuda d'un gradientòmetre. La detecció s'ha realitzat a una longitud d'ona fixa. Tant la detecció, com el gradient emprat, han depès de les característiques de cada molècula.

### 2.3.5 Cromatografia de líquids d'alta pressió acoblada a espectrometria de masses (HPLC-MS)

L'anàlisi per HPLC-MS s'ha dut a terme a un aparell Micromass ZQ de Waters acoblat a un sistema HPLC Waters 2695 amb un detector de fotodiodes Waters 2996 PDA. En general, s'ha emprat un flux entre 0.2 i 0.25 ml/min i mescles d'eluent A: 0.1% HCOOH en H<sub>2</sub>O i B: 0.1% HCOOH en ACN, tot i que en alguns casos, per millorar la resolució, s'ha afegit 0.01% TFA a A i B. Les columnes cromatogràfiques de fase invertida utilitzades s'especifiquen a continuació:

- GraceSmart RP C<sub>18</sub> 150 x 2.1 mm (tamany de partícula 5 µm).
- GraceSmart RP C<sub>18</sub> 150 x 2.1 mm (tamany de partícula 3 µm).
- Kinetex C<sub>18</sub> 100 Å 100 x 4.6 mm (tamany de partícula 2.6 µm).

## 2.4 Altres Tècniques

Les mesures de pH s'han dut a terme amb un pH-metre Crison micropH Basic 20; les centrifugacions, en centrífugadores termostatitzades Beckman GS-15R i Eppendorf 5430R; i la liofilització de solucions aquoses, en aparells Virtis Freezemobile 12EL i 25EL o Labconco model Freezone 6. En alguns casos per evaporar les dissolucions aquoses s'ha emprat un concentrador modular MiVac constituït per un concentrador (Quattro Pump) i un controlador de pressió. Per a l'esterilització del material s'ha usat una autoclau Autotester ST DRY PVII de P-Selecta.

## 3 Síntesi en fase sòlida

### 3.1 Síntesi de derivats peptídics

#### 3.1.1 Instrumentació i reactius generals

La síntesi en fase sòlida dels pèptids s'ha dut a terme manualment amb una xeringa de polipropilè, de volum variable en funció de la quantitat de resina, sobre la qual s'hi ha adaptat un filtre de polietilè porós. Dins de la xeringa, que actua com a reactor, s'ha introduït la resina corresponent sobre la qual s'ha anat addicionant la quantitat

necessària de reactius i de dissolvents amb la finalitat d'aconseguir la seva total solvatació. L'agitació de les mescles es realitza amb una vareta de tefló i els excessos de reactius, dissolvent i subproductes s'eliminen per filtració al buit.

Les resines comercials (Novabiochem) emprades com a suport sòlid s'especifiquen a continuació:

- Resina Rink Amida *p*-MBHA ( $f \sim 0.74$  mmol/g, 100-200 mesh). L'espaiador Rink Amida, a través d'un residu de norleucina, està unit a la resina base de *p*-metilbenzidrilamina (MBHA),  $\alpha$ -amino- $\alpha$ -*p*-xililpoliestirè reticulat amb un 1% de divinilbenzè. L'ús d'aquesta resina permet l'obtenció d'un pèptid amb l'extrem C-terminal derivatitzat en forma de carboxamida primària.

- Resina Cisteamina 4-metoxitritil ( $f \sim 1.10$  mmol/g, 200-400 mesh). Aquesta resina, molt làbil en condicions àcides, permet obtenir la molècula funcionalitzada amb el grup tiol lliure després del desancoratge en medi àcid.

Tots els aminoàcids comercials (Novabiochem i Bachem) utilitzats tenen l'extrem N-terminal protegit amb el grup 9-fluorenilmetoxicarbonil (Fmoc), làbil a bases. Les cadenes laterals estan convenientment protegides pels grups protectors tritil i Pbf [N<sup>G</sup>-(2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonil)], làbils a àcids:

- Fmoc-Cys(Trt)-OH.

- Fmoc-Arg(Pbf)-OH.

- Fmoc-Asn(Trt)-OH.

Els agents acoblants emprats s'especifiquen a continuació:

- HATU (hexafluorofosfat de *O*-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluroni:

Applied Biosystems.

- HOAt (1-hidroxí-7-aza-benzotriazole): Iris Biotech GmbH.

- DIPC (*N,N'*-diisopropilcarbodiimida): Aldrich.

### 3.1.2 Estratègies de treball

Per a la síntesi dels diferents derivats peptídics s'ha emprat l'estratègia Fmoc/<sup>t</sup>Bu, en la qual s'utilitzen Fmoc-aa-OH amb les cadenes laterals convenientment protegides. A continuació, s'exposa el procediment general seguit (**Taula 19**).

En primer lloc, sobre la xeringa amb el seu filtre de polietilè es pesa la quantitat de resina necessària, prèviament calculada a partir del grau de funcionalització. A continuació, se la sotmet a rentats amb DMF, DCM i MeOH (etapa 1), que es fan seguint un criteri de polaritat creixent per facilitar l'inflament adequat de la resina. En el cas de la resina cisteamina 4-metoxitritil, els rentats s'han dut a terme amb DCM neutralitzat a través d'una columna d'alúmina bàsica.

Per a la incorporació del primer aminoàcid, el següent pas consisteix en l'eliminació del grup Fmoc de l'espaiador Rink amida mitjançant dos tractaments amb una solució al 20% de piperidina en DMF (etapa 2). En el cas de l'elongació del pèptid o de l'acoblament de la molècula orgànica, també s'elimina, mitjançant el mateix tractament,

el grup protector Fmoc de l'extrem *N*-terminal de l'últim aminoàcid acoblat. Per la resina cisteamina 4-metoxitritil no és necessari aquest tractament, ja que es passa directament a l'etapa 4, on s'acobra directament la molècula orgànica (etapa 4B).

A continuació, es repeteixen els rentats de la resina (etapa 3) i es procedeix a realitzar l'acoblament de l'aminoàcid mitjançant 4 eq de Fmoc-aa-OH, amb quantitats equimolars d'HOAt i DIPC dissolts en la mínima quantitat de DMF anh (etapa 4A). A l'acoblament de la molècula orgànica, s'ha dissolt l'HATU i la molècula en la mínima quantitat de DMF anh, sobre els quals s'ha addicionat la DIEA. En aquest punt és molt important dur a terme una preactivació de 2 min abans de l'addició de la mescla resultant sobre la resina (etapa 4B).

Transcorregut el temps d'acoblament, es duu a terme l'eliminació del dissolvent i dels subproductes per filtració, es renta la resina (etapa 5), i s'avalua l'acoblament mitjançant el test de ninhidrina (etapa 6). Un test de ninhidrina negatiu, implica que l'acoblament ha estat quantitatiu i, per tant, es pot continuar amb l'elongació de la cadena realitzant de nou el mateix cicle sintètic. Ara bé, quan el resultat del test és positiu, es pot tornar a repetir l'acoblament, o bé, es poden bloquejar els grups amino lliures de la resina mitjançant un tractament amb 10 eq de Ac<sub>2</sub>O i 10 eq de DIEA en DMF anh durant 10 min. Transcorregut aquest temps, es fan els rentats i es repeteix el test de ninhidrina. Quan s'aconsegueix un resultat negatiu, cal determinar el nou grau de funcionalització de la resina abans de continuar la síntesi.

	<b>Etapa</b>	<b>Reactiu</b>	<b>Núm tractaments</b>	<b>t (min)</b>
1	Rentat	DMF, DCM, MeOH	3, 3, 3	0.5
2	Desprotecció	20 % Piperidina / DMF	1, 1	10
3	Rentat	DMF, DCM, MeOH	3, 3, 3	0.5
4A	Acoblament	Fmoc-aa-OH (4 eq) HOAt (4 eq) DIPC (4 eq) DMF anh	1	120-180
4B	Acoblament	molècula (1 eq) HATU (1 eq) DIEA (2.5 eq) DMF anh	1	180
5	Rentat	DMF, DCM, MeOH	3, 3, 3	0.5
6	Control	Test ninhidrina	1	3

**Taula 19.** Procediment general per la síntesi en fase sòlida mitjançant una estratègia Fmoc/<sup>t</sup>Bu.

Un cop finalitzada la síntesi, cal alliberar el pèptid del suport sòlid a través del trencament de l'enllaç entre la resina o l'espaiador i l'extrem *C*-terminal de la seqüència. Al mateix temps, s'eliminen els grups protectors permanents de les cadenes laterals dels aminoàcids, i els grups Boc presents a la molècula orgànica, mitjançant un tractament amb la solució TFA/TIS/H<sub>2</sub>O 95:2.5:2.5 (v/v/v) durant 1h.

### 3.1.3 Assaigs i determinació de la funcionalització de resines

#### 3.1.3.1 Test de ninhidrina

El test de la ninhidrina és un assaig que permet detectar la presència d'amines primàries lliures de forma ràpida i qualitativa. El procediment consisteix en agafar una petita alíquota de resina, rentada i seca, i col·locar-la en un tub de vidre. A continuació, se li addicionen 3 gotes de reactiu A i 1 gota de reactiu B i s'escalfa durant 3 min a 120°C. L'aparició d'una coloració blau-violeta indicarà la presència d'amines lliures, mentre que una de groga significarà un resultat negatiu, de manera que és possible afirmar que l'acoblament ha estat quantitatiu.

Els reactius necessaris per a l'assaig s'especifiquen a continuació:

- Reactiu A: es prepara a partir de dues solucions. La solució primera consisteix en dissoldre 40 g de fenol en 10 ml d'EtOH absolut. Per la segona solució es dissolen 2 ml de KCN 10 mM aquós en 100 ml de piridina acabada de destil·lar sobre ninhidrina. Ambdues solucions s'agiten per separat amb 4 g de resina Amberlite MB-3 (Merck) durant 45 min, es filtren i es barregen.
- Reactiu B: es prepara una solució de 2.5 g de ninhidrina en 50 ml d'EtOH absolut. La solució obtinguda es conserva en un recipient tancat i protegit de la llum.

#### 3.1.3.2 Determinació del grau de substitució d'una Fmoc-peptidil-resina

Per determinar el grau de substitució d'una peptidil-resina, on l'extrem *N*-terminal està protegit amb el grup Fmoc, es pesa una quantitat exacta de resina (~ 5 mg) i se la sotmet a dos tractaments amb 1 ml de solució al 20% de piperidina en DMF durant 10 min. Els filtrats d'ambdós tractaments i els rentats posteriors amb DCM es recullen en un matràs aforat de volum adequat i s'enrasa amb DCM. A continuació, es determina el valor de l'absorbància a 300 nm, ja que a aquesta longitud d'ona es coneix el coeficient d'extinció ( $\epsilon$ ) de l'adducte *N*-(9-fluorenilmetil)piperidina format durant la desprotecció ( $\epsilon_{300} = 7800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). El grau de funcionalització s'obté a partir de l'expressió següent:

$$f (\text{mmol/g}) = \frac{A_{300} \cdot V \cdot 1000}{7800 \cdot l \cdot m}$$

on  $A_{300}$  és l'absorbància a 300 nm,  $V$  és el volum (ml) del matràs aforat,  $l$  és el camí òptic de la cubeta, i  $m$  (mg) és la quantitat de resina.

## 3.2 Síntesi d'oligoribonucleòtids en fase sòlida<sup>1</sup>

### 3.2.1 Instrumentació i reactius generals

La síntesi dels oligonucleòtids s'ha dut a terme al sintetitzador automàtic Applied Biosystems DNA ABI 3400, seguint la metodologia del fosfit triéster, que utilitza derivats nucleosídics fosforamidit convenientment protegits.

Com a suport sòlid, s'ha utilitzat CPG (*Controlled Pore Glass*), àmpliament utilitzat en la síntesi estàndard d'oligonucleòtids, que consisteix en boles de vidre de tamany de

porus controlat funcionalitzades amb el primer nucleòsid (DMT-*N*-succinil-Icaa-CPG) (Link Technologies).

Els oligoribonucleòtids han estat sintetitzats amb el grup 2'-*O*-*tert*-butildimetilsilil (TBDMS) com a protector dels hidroxils de la posició 2' de l'anell ribosa. Les amines exocíclics de les nucleobases es troben protegides amb grups làbils a bases: fenoxiacetil (Pac) per l'adenina, acetil (Ac) per la citosina, i 4-isopropilfenoxiacetil (<sup>i</sup>PrPac) per la guanina. Per augmentar l'estabilitat de l'RNA a les exoribonucleases, s'ha optat per modificar els nucleòsids dels extrems de la cadena amb 2'-OMe ribonucleòtids.

Els 2'-*O*-TBDMS o 2'-*O*-Me, 3'-(2-cianoetil)-*N,N*-diisopropil-fosforamidits de 5'-*O*-(4,4'-dimetoxitritil)-ribonucleòsids (DMT-A<sup>Pac</sup>, DMT-C<sup>Ac</sup>, DMT-G<sup>iPrPac</sup>, DMT-U), i el [1-*N*-(4,4'-dimetoxitritil)-biotinil-6-aminohexil]-[(2-cianoetil)-(*N,N*-diisopropil)]-fosforamidit han estat adquirits a Link Technologies.

Els reactius habituals per a la síntesi d'oligoribonucleòtids han estat adquirits a les cases comercials Glen Research o Link Technologies:

- Agent Activant: 5-benziltio-1*H*-tetrazole (BTT).
- Solucions de *capping* o bloqueig: anhídrid acètic/piridina/THF 1:1:8 (Cap Mix A) i 16% 1-metilimidazole en THF (Cap Mix B).
- Solució destrilitant: 3% TCA en DCM.
- Solució oxidant: 0.02 M I<sub>2</sub> en THF/H<sub>2</sub>O/piridina 7:2:1.

La metilamina, el NEt<sub>3</sub>-3HF i l'éter d'isopropil trimetilsilil són de la casa comercial Aldrich.

Atès que la síntesi d'oligonucleòtids és molt sensible a l'humitat cal tenir en compte diverses precaucions perquè funcioni adequadament. Tot el material de vidre o metàl·lic que s'utilitzi ha d'assecar-se prèviament a l'estufa a 110 °C i temperar-se al buit a un dessecador amb P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> i KOH. Tots els dissolvent emprats als acoblaments han de ser anhidres.

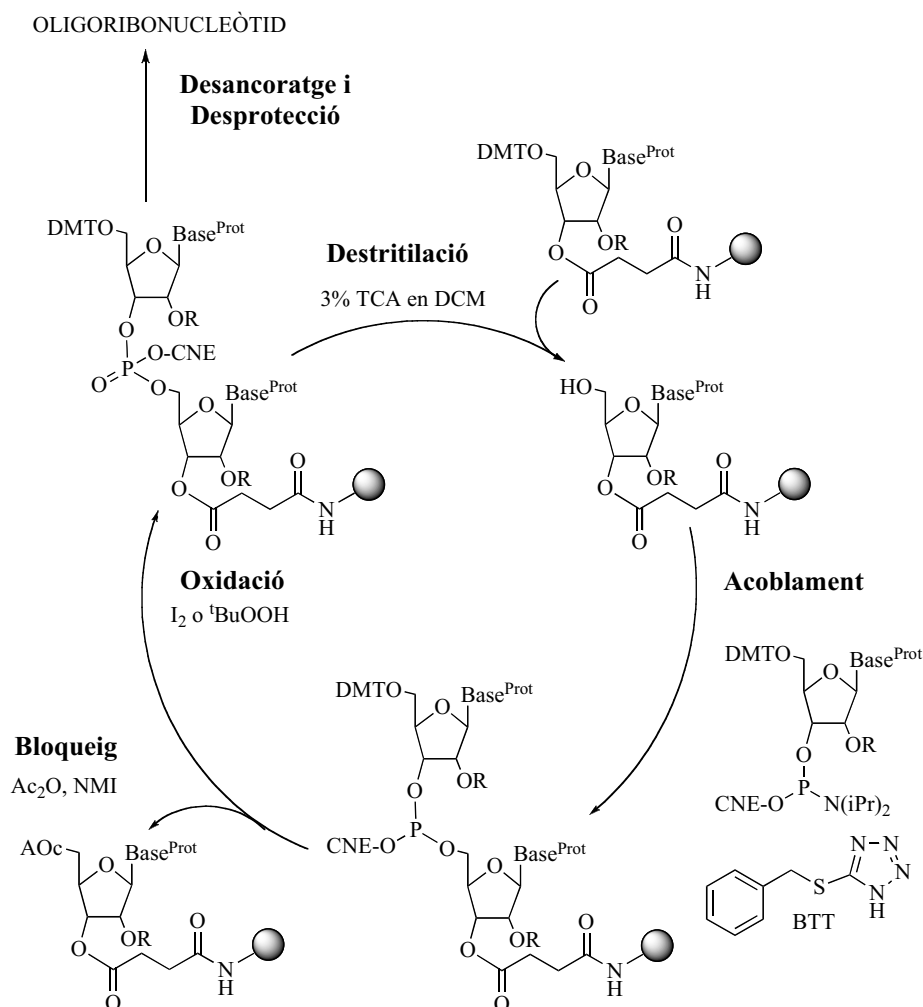
### 3.2.2 Elongació de la cadena oligoribonucleotídica

La síntesi de la cadena oligoribonucleotídica s'ha dut a terme automàticament seguint la metodologia estàndard del fosfit trièster o del fosforamidit. En aquesta metodologia, contràriament a com té lloc a la cèl·lula, el creixement de la cadena transcorre des de l'extrem 3' al 5'. El nucleòsid s'incorpora en forma de fosforamidit, una espècie de P(III), que s'activa ràpidament en presència d'un catalitzador àcid, com el tetrazole o altres derivats (BTT), i reacciona amb l'hidroxil 5' del nucleòsid ancorat al suport sòlid (boles de vidre CPG), donant lloc a un fosfit trièster. Atès que l'enllaç fosfit trièster és relativament làbil, és necessari oxidar-lo a fosfat trièster al final de cada cicle de síntesi. Durant tot el cicle sintètic, els grups amino exocíclics de les nucleobases, els grups fosfat i els hidroxils de la posició 2' dels ribonucleòsids han d'estar convenientment protegits per evitar reaccions secundàries.

En tots els casos s'ha treballat a l'escala d'1 μmol amb diferents cicles, on es variaven tant els excessos de reactiu utilitzats com els temps d'acoblament.

A continuació, s'exposa un esquema on es detallen les diferents etapes de la síntesi estàndard d'oligonucleòtids seguint aquesta metodologia (**Figura 153**):

- Eliminació en condicions àcides suaus del grup protector 4,4'-dimetoxitritil de l'hidroxil de la posició 5' del nucleòsid ancorat al suport polimèric, mitjançant una solució al 3% de TCA en DCM (**Destritilació**).
- Acoblament del nucleòsid en forma de derivat fosforamidit amb l'ajuda de l'agent activant BTT (**Acoblament**).
- Acetilació dels grups hidroxils lliures que no han reaccionat durant l'etapa d'acoblament (**Capping o bloqueig**). És important realitzar aquesta etapa abans de l'oxidació per tal d'evitar que els possibles adductes formats per condensació del fosforamidit amb les formes enòliques de les nucleobases, que en oxidar-se serien estables, ocasionin la modificació de l'oligonucleòtid.
- Oxidació del grup fosfit trièster, P(III), a fosfat trièster, P(V), amb  $I_2$  en  $H_2O$  i piridina, o bé amb hidroperòxid de *tert*-butil (**Oxidació**).



**Figura 153.** Esquema del cicle de síntesi en fase sòlida d'oligonucleòtids mitjançant la metodologia estàndard del fosfit trièster.



El sintetitzador automàtic utilitzat, disposa d'un conductímetre que realitza una quantificació aproximada dels cations DMT alliberats en cadascuna de les etapes de desprotecció de la síntesi, i permet obtenir un rendiment promig dels acoblaments dels fosforamidits i, per tant, una avaluació de l'eficàcia de la síntesi. Generalment, en aquestes condicions el rendiment promig per acoblament oscil·la al voltant del 95-97%.

### 3.2.3 Desancoratge, desprotecció i purificació

A diferència de la síntesi del DNA, a l'RNA cal tenir en compte una sèrie de factors força rellevants:

- La presència d'un grup hidroxil a la posició 2' de la ribosa condiciona l'ús d'un grup protector addicional durant la síntesi oligoribonucleotídica. En aquest cas, el grup protector més habitual és el *tert*-butildimetilsilil (TBDMS), àmpliament utilitzat per la seva labilitat als fluorurs, fet que el fa ser completament ortogonal a la resta de grups protectors. Tot i això, la presència d'aquest grup voluminós ocasiona que els temps d'acoblament siguin més llargs, sent necessari l'ús d'un agent activant més potent, com el BTT, i que els rendiments siguin lleugerament inferiors (95-97%) respecte la síntesi de DNA (> 98%).

- En medi bàsic, l'RNA és menys estable que el DNA, ja que la desprotonació de l'hidroxil de la posició 2' pot ocasionar l'atac nucleòfil sobre el fosfat de l'enllaç fosfodiéster i donar lloc a la migració del grup fosfat de la posició 3' a 2', amb la conseqüent elongació no desitjada de 2' a 5', o bé amb la degradació de la cadena a causa de la formació d'un cicle intermedi entre el fosfat i els hidroxils 2' i 3'. Per tant, en síntesi d'oligoribonucleòtids, generalment les nucleobases solen protegir-se amb grups més làbils a les bases respecte el seus anàlegs desoxi, ja que d'aquesta manera els temps de desprotecció són més curts. Per aquest motiu s'han emprat les nucleobases protegides A<sup>Pac</sup>, C<sup>Ac</sup> i G<sup>iPrPac</sup>, ja que la seva desprotecció es pot dur a terme en condicions bàsiques més suaus enlloc d'aplicar el tractament amb NH<sub>3</sub> concentrat, habitual en síntesi de DNA.

- Els oligoribonucleòtids són susceptibles a degradar-se en presència de ribonucleases i, per tant, és absolutament necessari respectar unes condicions de treball on els reactius i el material estiguin lliures de RNases. És per això que, d'una banda, s'ha adquirit comercialment (VWR) el material de plàstic fungible (tubs de centrífuga, eppendorfs i tips) lliure de ribonucleases, i de l'altra, la resta de material (provetes, vasos de precipitat, ampolles d'eluent, embuts, etc) ha estat esterilitzat a una autoclau mitjançant tres cicles de buit seguits d'un procés d'assecatge de 20 min. També és indispensable l'ús de H<sub>2</sub>O Milliq (MΩ·cm<sup>-1</sup>) lliure d'RNases.

#### 3.2.3.1 Procediment estàndard

Després de l'assemblatge de l'oligoribonucleòtid, el següent pas consisteix en l'eliminació de tots els grups protectors i en el desancoratge de la resina, tal com s'exposa a continuació:

- En primer lloc, es desancora l'oligoribonucleòtid de la resina amb un tractament bàsic que permet al mateix temps eliminar els grups protectors exocíclics de les nucleobases i

el  $\beta$ -cianoetil dels fosfats. Es tracta l'oligoribonucleotidil-resina amb una mescla 1:1 (v/v) d'amoníac aquós concentrat i una solució 8 M de metilamina en EtOH a 65°C durant 30 min (2 ml mescla/ $\mu$ mol resina). Transcorregut aquest temps, se separa el líquid sobrenedant que conté l'oligoribonucleòtid dissolt, es renta la resina amb una mescla EtOH/H<sub>2</sub>O 1:1 (v/v), i s'elimina a pressió reduïda el dissolvent, amb l'ajuda de coevaporacions amb EtOH absolut.

- La segona etapa (desililació) consisteix en l'eliminació dels grups TBDMS mitjançant el tractament a 65°C durant 2.5 h de l'oligoribonucleòtid amb una mescla (600  $\mu$ l/ $\mu$ mol) de NEt<sub>3</sub>-3HF/DMSO 1:1 (v/v), si l'estratègia és DMT-OFF (oligoribonucleòtids sense el grup DMT a la posició 5' de la ribosa), o bé amb una mescla NMP/NEt<sub>3</sub>/NEt<sub>3</sub>-3HF 6:3:4 (v/v/v) pels oligoribonucleòtids amb DMT (estratègia DMT-ON). Transcorregut aquest temps, a temperatura ambient, s'afegeixen 2 volums d'isopropil trimetilsilil éter i s'agita la mescla resultant durant 10 min. S'observa la precipitació de l'RNA. Seguidament, s'addicionen 5 volums d'éter etílic, es torna a agitar i es centrifuga la mescla resultant a 2200 rpm a 5°C durant 5 min, per tal de separar el líquid sobrenedant. Finalment, el precipitat (oligonucleòtid) s'asseca amb argó.

- Un cop desprotegit l'RNA, l'últim pas a realitzar és la purificació per HPLC. En el cas d'haver seguit l'estratègia DMT-ON, cal dur a terme una primera purificació aprofitant el caràcter lipòfil que li concedeix el DMT a l'oligoribonucleòtid, que fa que el producte desitjat quedi més retingut a la columna cromatogràfica i, per tant, sigui possible separar-lo d'altres seqüències més curtes que no tenen DMT, que s'han anat formant durant el cicle de síntesi. En el cas de la derivatització de l'oligoribonucleòtid wt amb biotina a l'extrem 5', l'estratègia de desprotecció seguida ha estat DMT-OFF, ja que la biotina té un caràcter suficientment hidrofòbic per aconseguir una bona separació per HPLC de la seqüència desitjada, amb la qual cosa no cal mantenir el DMT.

La purificació s'ha dut a terme per HPLC en fase invertida, les condicions de la qual han depès tant de la presència del DMT com del seu ús final. És a dir, generalment s'han purificat les diferents seqüències oligoribonucleotídiques emprant com a eluents una solució tampó d'acetat de trietilamoni (TEAA) a pH 7.0. Concretament, s'han realitzat gradients de 20 a 100 % de B en 30 min o de 5 a 60 % de B en 30 min (A: 0.1 M TEAA en H<sub>2</sub>O i B: 0.1 M TEAA en H<sub>2</sub>O/ACN 1:1) per les estratègies DMT-ON i DMT-OFF, respectivament. En canvi, per a la purificació de l'RNA destinat a dur a terme els estudis de ressonància magnètica nuclear ha calgut emprar una solució tampó de bicarbonat d'amoní a pH 7.6 (A: 0.1 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> en H<sub>2</sub>O i B: 0.1 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> en H<sub>2</sub>O/ACN 1:1).

Les fraccions corresponents al producte pur són analitzades per HPLC analític i per espectrometria de masses MALDI-TOF, i liofilitzades conjuntament.

- En el cas dels DMT-5'-oligoribonucleòtids, un cop purificats per HPLC, és necessària l'eliminació del grup dimetoxitritil (destritilació) mitjançant un tractament amb una solució aquosa d'AcOH al 3 % (600  $\mu$ l/ $\mu$ mol) a temperatura durant 45 min, amb el pH controlat al voltant de 3.5. Transcorregut aquest temps, es neutralitza addicionant NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> sòlid fins que l'alliberament de CO<sub>2</sub> deixa de produir-se (pH 7-8). A continuació, si s'escau, es torna a purificar l'oligonucleòtid per HPLC (de 5 a 60 % de B en 30 min).

### 3.2.4 Quantificació dels oligoribonucleòtids

La quantificació dels oligoribonucleòtids s'ha realitzat mitjançant la mesura de l'absorbància a 260 nm, longitud d'ona a la qual presenten un màxim d'absorció. La quantitat d'oligonucleòtid, en general, s'indica en mesures d'absorbància: OD<sub>260</sub>.

Una OD<sub>260</sub> (densitat òptica a 260 nm) es defineix com la quantitat d'oligonucleòtid que, continguda en una cubeta d'1 cm de pas de llum i d'un volum d'1 ml, té un valor d'absorbància de la unitat. Per tant, el nombre OD<sub>260</sub> es calcula com:

$$OD_{260} = A_{260} \cdot V \text{ (ml)}$$

Segons la llei de Lambert-Beer, si la cubeta és d'1 ml i té el pas de llum d'1 cm, la definició d'OD<sub>260</sub> és equivalent a l'absorbància, i es pot determinar a partir de la següent relació:

$$OD_{260} = A_{260} = \epsilon_{260} \cdot n$$

on  $\epsilon$  ( $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ ) és el coeficient d'extinció molar de l'oligoribonucleòtid, i "n" el nombre de mols.

El coeficient d'extinció molar ( $\epsilon$ ) de l'oligonucleòtid es pot calcular a partir del mètode del veí pròxim (*nearest-neighbour method*), que té en compte l'entorn de cadascun dels nucleòsids dins de la cadena (**Taula 20**).<sup>2</sup> Per exemple, el coeficient d'extinció molar a 25°C i a pH neutre de la cadena d'RNA<sup>5'</sup>GGCAGUGA, es pot determinar de la següent manera:

$$\begin{aligned} \epsilon_{GGCAGUGA} = & \epsilon_{GpG} + \epsilon_{GpC} + \epsilon_{CpA} + \epsilon_{ApG} + \epsilon_{GpU} + \epsilon_{UpG} + \epsilon_{GpA} \\ & - \epsilon_{pG} - \epsilon_{pC} - \epsilon_{pA} - \epsilon_{pG} - \epsilon_{pU} - \epsilon_{pG} \end{aligned}$$

Base	$\epsilon$ ( $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ )	Base	$\epsilon$ ( $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ )
pA	15400	CpG	17800
pC	7200	CpU	16200
pG	11500	GpA	25200
pU	9900	GpC	17400
ApA	27400	GpG	21600
ApC	21000	GpU	21200
ApG	25000	UpA	24600
ApU	24000	UpC	17200
CpA	21000	UpG	20000
CpC	14200	UpU	19600

**Taula 20.** Coeficients d'extinció molar per ribonucleòtids mesurats a pH 7, 25°C, 260 nm ( $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ ).<sup>2</sup>

Per altra banda, també existeixen diversos calculadors que preveuen tant l'espectre UV d'un oligonucleòtid lineal o en forma de dúplex, com el seu coeficient d'extinció molar.<sup>3</sup> Concretament, els coeficients d'extinció molar corresponents als diferents

oligoribonucleòtids emprats en aquest treball han estat determinats d'aquesta manera, i s'exposen a continuació (**Taula 21**):

oligoribonucleòtid	$\epsilon$ ( $M^{-1}\cdot cm^{-1}$ )
wt	273700
+3	276600
+14	277600
+16	276200
wt-biotina	273700
wt-fluoresceïna	287400
wt (25-mer)	243200

**Taula 21.** Valors dels coeficients d'extinció molar a 260 nm i a 25°C dels diferents oligoribonucleòtids utilitzats en aquesta tesi doctoral.

## 4 Experiments de química combinatòria dinàmica (DCC)

En el desenvolupament d'un experiment de química combinatòria dinàmica (DCC) es poden diferenciar tres grans etapes: la quantificació dels monòmers tiol, l'evolució dels experiments en absència i en presència de l'RNA, i l'anàlisi final per HPLC-MS.

### 4.1 Quantificació dels monòmers tiol

La quantificació dels monòmers tiol s'ha dut a terme mitjançant el **test d'Ellman**,<sup>4</sup> un mètode que permet la determinació de la concentració tant de pèptids, a través dels grups sulfhidrils (-SH), com de qualsevol molècula orgànica que contingui un grup tiol. Es basa en una reacció d'intercanvi de disulfur entre l'àcid 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoic) i la molècula a quantificar, que condueix a la formació de l'àcid 5-mercapto-2-nitrobenzoic, responsable de la coloració groga que pren la dissolució. Aquest compost presenta un màxim d'absorció conegut a 412 nm, amb la qual cosa és possible determinar la concentració del tiol a quantificar.

Els reactius necessaris es citen a continuació:

- El reactiu d'Ellman consisteix en una solució aquosa 2 mM d'àcid 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoic) (DTNB) i 50 mM d'acetat de sodi.
- Una solució tampó Tris-HCl 2 M a pH 8.

El procediment consisteix en mesclar 50  $\mu$ l d'una solució 2 mM del reactiu d'Ellman, 100  $\mu$ l de la solució tampó Tris-HCl i 850  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O en una cubeta de quars d'1 ml de capacitat i d'1 cm de pas de llum, i es mesura l'absorbància a 412 nm. El valor d'aquesta mesura es pren com a referència i, per tant, es resta a les mesures posteriors. El mateix procediment anterior es repeteix afegint el volum adequat de la solució del tiol a quantificar (10  $\mu$ l, 20  $\mu$ l, 30  $\mu$ l...), que es resta dels 850  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O, de manera que el volum total de la cubeta sigui sempre constant. Per exemple, si el volum de la mostra és de 20  $\mu$ l, el volum de H<sub>2</sub>O serà de 830  $\mu$ l. Un cop addicionats tots els components, la mescla s'homogeneïtza i es manté a temperatura ambient durant 2 min abans de fer la mesura d'absorbància a 412 nm.

Per poder aplicar aquest mètode en la quantificació dels tiols és imprescindible que les molècules orgàniques no presentin absorbència a 412 nm.

La concentració del monòmer tiol s'ha determinat a partir de la llei de Lamber-Beer:

$$A_{412} = \epsilon_{412} \cdot l \cdot c \quad (\epsilon_{412} = 13600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$$

És important remarcar que, tot i que els monòmers tiol es dissolen habitualment en 0.1 % TFA en H<sub>2</sub>O per garantir la seva solubilitat i minimitzar la dimerització, el pH bàsic de la mostra final no s'ha vist afectat.

Un cop quantificats tots els monòmers, es prepara la biblioteca de compostos addicionant, en un eppendorf, 24 nmol de cadascun dels tiols que hi participen, i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda. Aquesta mescla es prepara per duplicat, ja que els experiments es duen a terme en presència i en absència d'RNA.

## 4.2 Evolució dels experiments

### 4.2.1 Experiments en absència d'RNA

Per tal de poder determinar els percentatges de les amplificacions dels compostos més afins amb l'RNA, així com la seva evolució en cada fracció de temps analitzada, sempre s'ha dut a terme, paral·lelament, el mateix experiment sense RNA, anomenat blanc.

En un dels eppendorfs que conté la mescla de monòmers tiol, s'addicionen 240 µl de solució tampó (50 mM Tris-HCl pH 7.7, 100 mM NaCl i 0.1 mM Na<sub>2</sub>EDTA), s'homogeneïtza i es deixa evolucionar a l'aire i a temperatura ambient sense agitació. Transcorregut el temps desitjat, s'extreu una alíquota, 1/3 part del volum (80 µl), a la qual s'hi afegeix un excés d'una solució 0.1 % TFA en H<sub>2</sub>O (100 µl), amb l'objectiu d'aturar el bescanvi disulfur (pH ~ 2-3). A continuació, s'evapora fins a sequetat i s'analitza per HPLC-MS.

### 4.2.2 Experiments en presència d'RNA

En primer lloc, perquè l'experiment es desenvolupi adequadament, cal estructurar la diana d'RNA (*annealing*) mitjançant un procés de desnaturalització-renaturalització, en el qual s'escalfa una solució de 6 nmol d'RNA biotinitat en 240 µl de solució tampó (50 mM Tris-HCl pH 7.7, 100 mM NaCl i 0.1 mM Na<sub>2</sub>EDTA) a 90°C durant 5 min, i es deixa refredar lentament fins a temperatura ambient.

A continuació, s'addiciona la solució del biotinit-RNA (6 nmol) estructurat sobre l'eppendorf que conté la mescla de monòmers tiol (24 nmol, 4 eq), es mescla vigorosament i es deixa evolucionar a l'aire sense agitació a temperatura ambient. Transcorregut el temps desitjat, s'extreu una alíquota, 1/3 part del volum (80 µl), per tal d'aturar el bescanvi tiol-disulfur, i s'addicionen petites quantitats d'una solució 0.1 % TFA en H<sub>2</sub>O fins a arribar a un pH entre 5 i 6. És molt important no rebaixar en excés el pH final de la solució alíquota, per tal que l'RNA no es desestructuri i s'alliberin els lligands que hi interaccionen.

Un cop finalitzat l'experiment, per aïllar els lligands units a l'RNA biotinitat, es duu a terme un tractament amb una suspensió comercial de boles magnètiques

d'estreptavidina (Biomag Streptavidin, 5 mg/ml, Qiagen). La gran afinitat entre la biotina i l'estreptavidina combinada amb l'acció de l'iman, permet extreure el líquid sobrenedant, i amb ell els compostos que no han interaccionat amb l'RNA. Un aspecte molt important a tenir en compte és la realització d'un rentat previ de les boles magnètiques amb una solució tampó lleugerament àcida (50 mM Tris-HCl pH 5.8, 100 mM NaCl i 0.1 mM Na<sub>2</sub>EDTA), per tal d'evitar la contaminació de les alíquotes. Per tant, s'agafen 500 µl de la suspensió comercial de boles magnètiques, i amb l'ajuda de l'iman se separa la solució comercial sobrenedant i se li addicionen 500 µl de la solució tampó de rentat a sobre les boles magnètiques retingudes. Després d'agitar-se, es repeteix el mateix procediment fins a un total de 3 vegades. A continuació, sobre les boles magnètiques rentades, s'addiciona el contingut de cadascuna de les alíquotes de l'experiment, i després d'incubar-se a temperatura ambient durant 20 min, per acció de l'iman s'extreu la solució sobrenedant que conté els compostos no units a l'RNA. Per assegurar que la solució final no contingui cap dels compostos que no han interaccionat, es repeteix aquest procediment fins a tres vegades amb rentats de 200 µl de la solució tampó àcida.

I per últim, per tal de poder identificar els compostos que han interaccionat amb l'RNA, a més de dur a terme el processat de l'experiment, el següent pas consisteix en alliberar-los. Així doncs, es realitza la desnaturalització del biotiniil-RNA mitjançant un tractament amb un excés d'una dissolució 0.1 % TFA en H<sub>2</sub>O (200 µl) a 90°C durant 10 min. En aquest cas, l'acció de l'iman serveix per separar l'RNA desnaturalitzat de la solució sobrenedant que conté els compostos d'interès. Es repeteix el mateix tractament fins a un total de 3 vegades. La solució resultant s'evapora fins a sequetat i s'analitza per HPLC-MS.

### 4.3 Anàlisi per HPLC-MS

Un cop definides les condicions d'anàlisi per cadascuna de les alíquotes de l'experiment (la columna, els eluents o el sistema de gradients), la identificació i la quantificació dels compostos formats a la biblioteca combinatòria dinàmica s'ha dut a terme mitjançant la comparació dels cromatogrames d'ions i d'ultraviolat. Concretament, a partir de la integració de l'àrea de cada pic a 260 nm, que s'ha normalitzat amb el coeficient d'extinció molar (ε) a aquesta longitud d'ona de cadascun dels compostos, s'ha pogut determinar tant la concentració relativa del compost a la biblioteca com l'amplificació per efecte de l'RNA:

- El percentatge de cada compost s'ha calculat dividint el valor de l'àrea normalitzada del seu pic corresponent amb la suma de l'àrea normalitzada de tots els pics:

$$\% \text{ lligand} = \frac{\frac{\text{àrea del pic}}{\epsilon_{260} \text{ lligand}}}{\sum \left( \frac{\text{àrea del pic}}{\epsilon_{260} \text{ lligand}} \right)} \cdot 100$$

- El percentatge d'amplificació d'un lligand es determina a partir del percentatge del lligand en presència i en absència d'RNA:

$$\% \text{ amplificació} = \frac{\% \text{ lligand amb RNA} - \% \text{ lligand sense RNA}}{\% \text{ lligand sense RNA}}$$

A partir d'aquests dos paràmetres es construeixen els histogrames que mostren els canvis en la composició de la biblioteca combinatòria dinàmica (DCL) amb el temps (% lligands), i els que mostren el percentatge d'amplificació de cadascun dels lligands per efecte de l'RNA.

#### 4.3.1 Determinació dels coeficients d'extinció molar a 260 nm ( $\epsilon_{260}$ )

Atès que cap dels nous compostos sintetitzats en aquesta tesi doctoral ha presentat absorbància a 412 nm, la determinació dels coeficients d'extinció molar a 260 nm s'ha pogut dur a terme fàcilment a partir de la quantificació dels monòmers tiol amb el test d'Ellman.

Un cop coneguda la concentració de la solució del compost tiol, s'ha mesurat l'absorbància a 260 nm i s'ha aplicat la relació de Lambert-Beer per obtenir fàcilment el valor del coeficient d'extinció molar a 260 nm ( $\epsilon_{260}$ ) per cadascun dels monòmers.

A continuació, s'exposen els coeficients d'extinció molar a 260 nm dels monòmers tiol emprats als experiments de DCC (**Taula 22**):

monòmers	$\epsilon_{260}$ ( $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ )
Amt-SH	39253
AcrOMe-SH*	13334
Azq-SH*	2930
JA-SH	12337
JApept-SH	12337
JB-SH	17627
JBpept-SH	17627
NeaC <sub>2</sub> -SH	-
NeaC <sub>6</sub> -SH	-
TyrP*	596

**Taula 22.** Valors dels coeficients d'extinció molar a 260 nm dels diferents monòmers tiol utilitzats (determinats en 0.1 % TFA en H<sub>2</sub>O). Als compostos marcats (\*), el valor de  $\epsilon_{260}$  ha estat determinat anteriorment al nostre grup d'investigació.<sup>5</sup> Els lligands que contenen dos o tres fragments, el coeficient d'extinció molar s'ha calculat a partir de la suma dels corresponents valors dels monòmers de partida.

## 5 Estudi de la interacció entre l'RNA i els lligands

### 5.1 Determinació de l'afinitat i l'especificitat dels lligands per espectroscòpia de fluorescència

Els assaigs d'afinitat i d'especificitat s'han dut a terme per espectroscòpia de fluorescència amb les dianes d'RNA derivatitzades amb els corresponents grups fluoròfors. En els casos on s'ha utilitzat fluoresceïna (FL), la derivatització s'ha realitzat a l'extrem 5' de la cadena oligoribonucleotídica de la seqüència nativa, mentre que per la mutada +3, s'ha substituït l'adenina de la zona del *bulge* o del *loop* per la nucleobase fluorescent 2-aminopurina (2-AP). Cal comentar que la síntesi d'ambdós oligoribonucleòtids a estat realitzada anteriorment al nostre grup d'investigació.<sup>5</sup>

En tots els assaigs, la cubeta es manté termostatitzada a 25°C i en agitació constant, exceptuant al moment de la mesura, que s'atura l'agitació per tal que no es vegi afectada.

#### 5.1.1 Determinació de l'afinitat dels lligands

##### 5.1.1.1 Valoracions amb RNA wt-Fluoresceïna

Les valoracions es duen a terme excitant la mostra a 490 nm i enregistrant l'emissió entre 505 i 540 nm, amb una obertura de les reixetes d'excitació i d'emissió de 4.8 i 8 nm, respectivament. Per cada experiment s'utilitza una solució mare de lligand 0.5 mM, a partir de la qual es preparen diverses alíquotes, i 25 pmol d'RNA-fluoresceïna, dissolt en 1 ml d'una solució tampó (10 mM de fosfat de sodi a pH 6.8, 100 mM de NaCl i 0.1 mM de Na<sub>2</sub>EDTA), prèviament estructurat mitjançant un procés de desnaturalització-renaturalització (escalfant a 90°C durant 2 min i refredant a 0°C durant 20 min).

Un cop obtinguda la línia de base (blanc), que correspon a l'espectre d'emissió de la solució tampó sense RNA o lligand, s'enregistren els espectres d'emissió de la solució d'RNA-fluoresceïna després de cada addició, de menor a major concentració, de les alíquotes d'1 µl de la solució de lligand. Després de cada addició, és important deixar incubar la mostra uns 5 min abans de fer la mesura, per tal que el sistema arribi a l'equilibri. També és important que el volum final no sobrepassi el 10-15% del volum inicial de la cubeta. La valoració finalitza quan s'arriba a la saturació de l'emissió de fluorescència a 517 nm. Cal comentar que la quantitat d'equivalents necessaris depèn de l'afinitat del lligand amb l'RNA. Per tal de corregir la presència de fluorescència del lligand, es repeteix la valoració en absència d'RNA i es resta dels valors obtinguts en presència d'RNA.

##### 5.1.1.2 Valoracions amb +3 RNA-2-Aminopurina

Les valoracions amb la seqüència mutada +3 modificada amb 2-aminopurina es realitzen de forma anàloga als assaigs amb fluoresceïna. Els experiments es duen a terme excitant la mostra a 290 nm i enregistrant l'emissió de 340 a 410 nm, amb una obertura de les reixetes d'emissió i d'excitació de 10 nm. Per cadascun dels experiments s'empra una solució mare de lligand 1 mM, i 50 pmol d'RNA, dissolts en 600 µl d'una solució tampó 10 mM de fosfat de sodi a pH 6.8, 50 mM de NaCl i 0.1 mM de



Na<sub>2</sub>EDTA. La valoració finalitza quan s'arriba a la saturació de l'emissió de fluorescència a 365 nm.

### 5.1.1.3 Processat i determinació dels valors d'EC<sub>50</sub>

El processat de les valoracions consisteix, primerament, en aplicar una correcció de l'efecte de la dilució a la intensitat de fluorescència de cada punt:

$$F' = F * V/V_0$$

on F és la intensitat de fluorescència enregistrada per l'aparell (observada), F' és la fluorescència un cop aplicat el factor de dilució, V el nou volum de la cubeta després de l'addició, i V<sub>0</sub> el volum inicial. Un cop aplicat el factor de dilució, F' es normalitza a partir dels valors de la fluorescència observada inicial (F'<sub>i</sub>) i final (F'<sub>f</sub>), tal com s'especifica a continuació:

$$F'_{\text{normalitzada}} = \frac{(F' - F'_i)}{(F'_f - F'_i)}$$

A continuació, es representen a l'eix de les ordenades els valors de la fluorescència normalitzada (F'<sub>normalitzada</sub>) i, a les abscisses, el logaritme de la concentració del lligand (log C<sub>ligand</sub>) en cada punt de la valoració. A partir de la regressió no lineal d'una corba dosi-resposta sigmoïdal realitzada pel programari GraphPad Prism 4 ("GraphPad Software", San Diego, CA), s'obté el valor d'afinitat (EC<sub>50</sub>). Generalment, totes les valoracions s'han repetit almenys dues vegades, i l'error en els valors d'EC<sub>50</sub> calculats es pot considerar igual o inferior al 25 %.

### 5.1.2 Determinació de l'especificitat dels lligands

Per dur a terme els assaigs de competició, s'ha emprat una mescla comercial de tRNA (*Escherichia coli*. Type XXI, Strain W. Sigma-Aldrich), quantificada amb la consideració que a 260 nm té un coeficient d'extinció molar promig de 9640 cm<sup>-1</sup>·M<sup>-1</sup> per base, sent el tamany promig de 90 nucleobases.<sup>5,6</sup> Generalment, s'han addicionat 4.8 µl (10 eq) d'una solució aquosa d'aquest competidor biològic (tRNA<sup>mix</sup>) sobre la solució 25 nM d'RNA-fluoresceïna, prèviament estructurada. La determinació del valor d'EC<sub>50</sub> en presència del tRNA<sup>mix</sup> es duu a terme de forma anàloga als assaigs d'afinitat (apartat 5.1.1.1). Cal comentar que, en aquest cas, l'experiment blanc es realitza en presència de 10 eq de tRNA<sup>mix</sup>.

Un cop obtingut el valor d'afinitat en presència del competidor, es determina el grau d'especificitat a partir de la següent fórmula:

$$\text{Relació d'especificitat} = \frac{\text{EC}_{50} \text{ en presència del competidor tRNA}^{\text{mix}}}{\text{EC}_{50} \text{ en absència del competidor tRNA}^{\text{mix}}}$$

Per tant, tenint en compte aquesta relació d'afinitats, el grau màxim d'especificitat d'un lligand amb una diana concreta és la unitat.<sup>6</sup>

## 5.2 Assaigs de desnaturalització tèrmica per espectroscòpia d'UV

Els assaigs d'estabilitat s'han dut a terme en cubetes de quars d'1 cm de pas de llum, en un espectrofotòmetre Jasco-550 equipat amb un controlador de temperatura Peltier ETC-505T. Les corbes de fusió s'enregistren refredant la mostra de 90°C a 30°C per estudiar el procés de renaturalització, i s'escalfen de nou de 30°C a 90°C per realitzar la desnaturalització. En general, s'han obtingut corbes superposables. En tots els casos s'aplica un gradient constant de 0.5°C/min, i es mesura l'absorbància a 260 nm en funció de la temperatura.

A tots els experiments, s'ha emprat 1 nmol d'RNA i 1 nmol de lligand, i s'han dissolt a una concentració final d'1 µM en 10 mM de fosfat de sodi a pH 6.8, 100 mM de NaCl i 0.1 mM de Na<sub>2</sub>EDTA.

El processat de les corbes de fusió s'ha realitzat amb el programari OriginLab (Origin Pro 7.5), ajustant els punts de la corba a un model sigmoïdal, que permet extreure el valor de la temperatura de fusió ( $T_m$ ) a partir del màxim de la primera derivada.<sup>7</sup>

Generalment, tots els experiments s'han repetit per triplicat, fet que ha permès assumir un error als valors de  $T_m \pm 0.2^\circ\text{C}$ .

## 5.3 Estudis estructurals dels complexos RNA-lligand

### 5.3.1 Estudis per espectroscòpia d'UV-Visible

Les valoracions per espectroscòpia d'UV-visible es duen a terme a temperatura ambient en una cubeta de quars d'1 cm de pas de llum, dins de la qual s'addicionen 500 µl de la solució de lligand en 10 mM de fosfat de sodi a pH 6.8, 100 mM de NaCl i 0.1 mM de Na<sub>2</sub>EDTA. El valor de la concentració s'escull en funció del coeficient d'extinció molar dels lligands, de manera que el valor d'absorbància se situï entre 0.1 i 0.2. Un cop enregistrat l'espectre del lligand, s'enregistren successivament els corresponents espectres d'absorció després de l'addició de l'oligoribonucleòtid (0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1 i 2 eq). Les alíquotes s'extreuen d'una solució mare 0.26 mM d'RNA en 10 mM de fosfat de sodi a pH 6.8, 100 mM de NaCl i 0.1 mM de Na<sub>2</sub>EDTA, comuna per totes les valoracions, i que ha estat prèviament estructurada mitjançant un procediment de desnaturalització-renaturalització (apartat 4.2.2).

Primer de tot, cal registrar un blanc únicament amb solució tampó, per obtenir la línia de base, i restar-li a cada mesura. També és important que el volum final de la cubeta no sobrepassi el 10-15% del volum inicial, a més de deixar passar 10 min entre l'addició i la mesura d'absorbància, per tal d'assegurar que es formi el complex.<sup>7</sup> Per exemple, per Amt-NeaC<sub>2</sub> la valoració s'ha dut a terme amb una solució 8.4 µM, de manera que el volum final de la cubeta després de l'addició de totes les alíquotes d'RNA ha estat de 63 µl (13% del volum total), i els valors de l'absorbància s'han situat al voltant de 0.12.

### 5.3.2 Estudis per espectroscòpia de fluorescència

Les valoracions per espectroscòpia de fluorescència es duen a terme de forma anàloga a les realitzades per UV-Visible (apartat 5.3.1), tot i que en aquest cas, la major sensibilitat de la tècnica ha permès emprar concentracions de lligand i d'RNA més

petites. En cadascun dels experiments s'han emprat 500 µl de solució de lligand 2 µM, sobre la qual s'han addicionat les alíquotes d'RNA wt extretes d'una dissolució mare 100 µM, prèviament estructurada (apartat 4.2.2). En tots els casos s'ha mantingut un medi 10 mM de fosfat de sodi a pH 6.8, 100 mM de NaCl i 0.1 mM de Na<sub>2</sub>EDTA, i el volum final no ha sobrepassat el 10-15 % del volum inicial de la cubeta. Per exemple, a la valoració d'Amt-NeaC<sub>2</sub>, s'ha addicionat un total de 39 µl de solució mare d'RNA wt, amb la qual cosa s'ha incrementat en un 8 % el volum inicial.

Per a l'elecció dels paràmetres experimentals, en primer lloc, s'enregistra l'espectre d'emissió del lligand amb una longitud d'ona d'excitació propera a un dels màxims d'absorció, agafant com a intervals d'emissió un rang de λ pròxim al màxim. A continuació, es tria l'obertura de les reixetes dels monocromadors d'excitació i d'emissió, suficient per obtenir una bona sensibilitat de senyal i evitar que els espectres d'excitació i emissió se solapin. En el cas dels lligands derivats de l'ametrantrona, com que presenten dos màxims d'absorció a 579 i 626 nm, s'ha optat per excitar la mostra a 574 nm i enregistrar l'emissió de 600 a 850 nm, amb una obertura de 6 i 10 nm per les reixetes d'excitació i d'emissió, respectivament.

### 5.3.3 Estudis per RMN

Els espectres de RMN de <sup>1</sup>H de l'RNA i dels complexos formats en presència de quantitats creixents de lligand, s'han enregistrat a un espectròmetre d'alt camp (600 MHz) equipat amb una criosonda (apartat 2.1.1) i a baixa temperatura (5°C).

#### 5.3.3.1 Preparació de les mostres

En primer lloc, cal definir la quantitat de mostra d'RNA necessària per obtenir una correcta relació senyal/soroll de fons que permeti una bona resolució espectral. En el nostre cas, atesa l'experiència prèvia al nostre grup d'investigació,<sup>5</sup> juntament amb la bona sensibilitat de l'aparell (sensibilitat de <sup>1</sup>H ≥ 6000:1, 0.1% etilbenzè en CDCl<sub>3</sub>), es va optar per emprar a cada valoració 600 µl d'una solució 100 µM d'RNA en 10 mM de fosfat de sodi a pH 6.8 en aigua lleugera (H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O, 9:1).

Un cop establerta la concentració adequada de treball, es prepara una solució d'RNA en H<sub>2</sub>O, es quantifica a 25°C (apartat 3.1.4), s'extreu la quantitat d'oligoribonucleòtid necessària, i es liofilitza. A continuació, es redissol en 600 µl d'una solució 10 mM de fosfat de sodi a pH 6.8, i es torna a liofilitzar. Seguidament, es torna a redissoldre en 600 µl de la mescla H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O, 9:1, i s'addicionen 2 µl d'una solució 33.3 µM de DSS (referència interna). Finalment, es procedeix a l'estructuració de l'RNA mitjançant un procés de desnaturalització-renaturalització (escalfant a 90°C durant 2 min i refredant a 0°C durant 20 min), i la solució s'introdueix a dins del tub de RMN.

Paral·lelament, es prepara la solució de lligand a una concentració que, d'una banda, no impliqui un canvi significatiu de la concentració d'RNA dissolt al tub i, de l'altra, que tingui en compte l'addició de fins a un total de 3 eq, on cada alíquota representarà 0.5 eq. Per exemple, a les valoracions amb els lligands derivats de l'ametrantrona, s'han dissolt 180 nmol de cada lligand en 30 µl de H<sub>2</sub>O, de manera que cada alíquota de 0.5 eq de lligand ha implicat l'addició de 5 µl d'aquesta solució 6 mM. Per tant, en el cas

d'addicionar fins a 3 eq de lligand, l'increment de volum del tub només representaria un 5 %.

El procediment seguit per dur a terme les valoracions ha consistit en extreure la solució d'RNA del tub de RMN amb l'ajuda d'una pipeta pasteur per abocar-la a un eppendorf en el qual s'addicionarà el lligand. Amb la mateixa pipeta s'agita la mescla resultant fins a homogeneïtzar-la, i es retorna seguidament al mateix tub de RMN per tornar a adquirir l'espectre.

### 5.3.3.2 Adquisició dels espectres

El primer pas abans de començar a adquirir els espectres és establir la seqüència de polsos adequada que permeti eliminar correctament el senyal de l'aigua. En el nostre cas, els espectres monodimensionals s'han adquirit amb 256 scans, mitjançant el mètode de supressió d'aigua amb una seqüència *excitation sculpting* (zgesgp). Cal remarcar que, un cop feta l'addició del lligand, s'ha mantingut el tub dins de l'aparell uns 10 min abans de l'adquisició del següent espectre perquè assolís la temperatura de treball (5°C). Tots els espectres d'aquesta tesi han estat adquirits per la Dra. Margarida Gairí de la Unitat d'RMN d'alt camp de la Universitat de Barcelona.

## 6 Bibliografia

1. a) Wincot, F. E. *Strategies for Oligoribonucleotide Synthesis According to the Phosphoramidite Method*, Unit 3.5., a Glick, G. D.; Jones, R. A. *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, JohnWiley & Sons, 2000; b) Bellon, L. *Oligoribonucleotides with 2'-O-(tert-Butyldimethylsilyl) Groups*, Unit 3.6., a Glick, G. D.; Jones, R. A. *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, JohnWiley & Sons, 2000; c) Sproat, B. S. *RNA synthesis using 2'-O-(Tert-Butyldimethylsilyl) Protection*, Unit 2., a Herdewijn, P. *Methods in Molecular Biology. Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications*, Humana Press, Totowa, N.J., 2005, vol. 288, pp. 17-31.
2. Valors recopilats per Richard Owczarzy: <http://www.owczarzy.net/extinct.htm>
3. a) [www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer](http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer).  
b) [www.ambion.com/techlib/misc/oligo\\_calculator](http://www.ambion.com/techlib/misc/oligo_calculator).
4. a) Ellman, G. L. "Tissue sulfhydryl groups". *Arch. Biochem. Biophys.*, **1959**, 82, 70-77; b) Turner, J. J.; Williams, D.; Owen, D.; Gait, M. J. *Disulfide Conjugation of Peptides to Oligonucleotides and Their Analogs*, Unit 4.28., a *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, JohnWiley & Sons, 2006.
5. López-Senín, P. Tesi Doctoral. "Desarrollo de ligandos estabilizantes de la estructura de RNA implicada en el procesado alternativo del exón 10 de la proteína tau mediante química combinatoria dinámica", Universitat de Barcelona, Barcelona, **2010**.
6. Luedtke, N. W.; Liu, Q.; Tor, Y. "RNA-Ligand interactions: affinity and specificity of aminoglycoside dimers and acridine conjugates to the HIV-1 Rev Response Element". *Biochemistry*, **2003**, 42, 11391-11403.
7. Mergny, J-L.; Lacroix. L. "Analysis of thermal melting curves". *Oligonucleotides*, **2003**, 13, 515-537.
8. Sánchez-Carrasco, S.; Delcros, J. G.; Moya-García, A. A.; Sánchez-Jiménez, F.; Ramírez, F. J. "Study by optical spectroscopy and molecular dynamics of the interaction of acridine-spermine conjugate with DNA". *Biophys. Chem.*, **2008**, 133, 54-65.



## 1 Síntesi dels monòmers tiol

### 1.1 Síntesi de compostos heteroaromàtics amb capacitat de reconeixement del parell de bases G-U: molècules tipus Janus.

#### 1.1.1 Síntesi en solució dels monòmers Janus funcionalitzats amb un grup carboxil

##### 1.1.1.1 Síntesi del monòmer Janus A

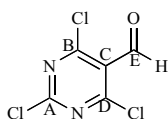
##### 2,4,6-Tricloropirimidin-5-carbaldehid (**2**)

S'addicionen lentament, a temperatura ambient i en agitació constant, 30 g (0.234 mol) d'àcid barbitúric (**1**) sobre una dissolució de 140 ml de POCl<sub>3</sub> (1.51 mol, 6.45 eq) i 25 ml de DMF (0.234 mol, 1 eq). Ràpidament, s'observa un canvi de color de transparent a groc. A continuació, la mescla resultant, en agitació constant, s'escalfa a reflux durant unes 12-15 hores, aproximadament. És molt important mantenir el sistema obert a causa de l'alliberament de gasos àcids durant el procés, i, al mateix temps, aïllat de la humitat mitjançant un tub de clorur de calci.

Transcorregut el temps de reacció, s'elimina al rotavapor el màxim possible d'excés d'oxiclorur de fòsfor, i la mescla resultant s'aboca molt lentament sobre una barreja d'aigua i gel en agitació. El precipitat marró obtingut es recull per filtració al buit, i es purifica per cromatografia en columna emprant, com a eluent, mescles de polaritat creixent d'hexà i AcOEt (SiO<sub>2</sub>, 0-50%). S'obtenen 21 g del producte desitjat **2** (rdt: 42%) en forma de sòlid marronós.

##### Caracterització:

<sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 10.42 (1H, s).



<sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 184.79 (C<sub>E</sub>), 164.24 (C<sub>A</sub>), 161.78 (C<sub>B</sub>, C<sub>D</sub>), 123.19 (C<sub>C</sub>).

R<sub>f</sub> (10% AcOEt/Hexà): 0.43.

Punt de Fusió: 166-169°C.

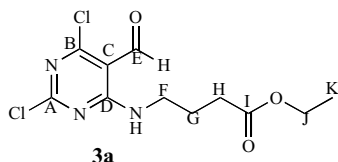
##### 4-(2-Amino-6-cloro-5-formilpirimidin-4-ilamino)butanoat d'etil (**3a**)

En un baló, es dissolen 10 g (47.3 mmol) del producte **2** en 200 ml de DCM. La solució resultant es refreda a -78°C en un bany d'acetona i neu carbònica. En un altre baló, es dissolen 7.92 g (47.3 mmol, 1 eq) d'hidroclorur de 4-aminobutirat d'etil, 16.1 ml (94.6 mmol, 2.0 eq) de DIEA en 100 ml de DCM i es refreda també a -78°C. Un cop tenim els dos sistemes a -78°C, s'addiciona el contingut del segon matràs sobre el que conté el producte de partida. La mescla de reacció adquireix un color groc-pàl·lid. En aquest punt, es deixa reaccionar durant 6 hores, mantenint la baixa temperatura i l'agitació constant.

Passat aquest temps, la mescla de reacció es transfereix a un embut de decantació i es fan rentats amb aigua (2 x 50 ml) i una solució saturada de NaCl (50 ml). La fase orgànica resultant s'asseca amb MgSO<sub>4</sub> anhidre i s'evapora el dissolvent al rotavapor

fins a sequetat, per obtenir un sòlid marró-taronja. El producte desitjat (**3a**) s'aïlla mitjançant cromatografia en columna emprant, com a eluent, mesclades d'hexà i AcOEt de polaritat creixent (SiO<sub>2</sub>, 2.5-20%), i s'obtenen 8.53 g (rdt: 60%) d'un sòlid cristal·lí blanc-grogós. A més de **3a**, també s'aïlla el compost **3b**. Ambdós productes tenen la mateixa massa i l'espectre de RMN pràcticament idèntic. La diferenciació dels dos regioisòmers s'ha dut a terme mitjançant un experiment de ressonància magnètica nuclear NOESY monodimensional.

#### Caracterització:



**<sup>1</sup>H-RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 10.31 (1H, H<sub>E</sub>), 9.36 (NH, t ample, *J* = 6.03 Hz), 4.15 (2H, H<sub>J</sub>, q, *J* = 7.14 Hz), 3.67 (2H, H<sub>F</sub>, dt, *J* = 6.94 Hz), 2.40 (2H, H<sub>H</sub>, t, *J* = 7.24 Hz), 1.99 (2H, H<sub>G</sub>, qt, *J* = 7.24 Hz), 1.27 (3H, H<sub>K</sub>, t, *J* = 7.14 Hz).

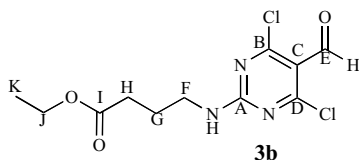
**<sup>13</sup>C-RMN** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 190.74 (C<sub>E</sub>), 172.77 (C<sub>I</sub>), 166.32 (C<sub>D</sub>), 163.04 (C<sub>A</sub>), 162.14 (C<sub>B</sub>), 106.90 (C<sub>C</sub>), 60.90 (C<sub>J</sub>), 40.82 (C<sub>F</sub>), 31.61 (C<sub>H</sub>), 24.55 (C<sub>G</sub>), 14.42 (C<sub>K</sub>).

**EM** (ESI, mode positiu): *m/z* 306.3 [M+H]<sup>+</sup>, 328.3 [M+Na]<sup>+</sup> (massa teòrica esperada, M: 305.2).

**R<sub>f</sub>** (20% AcOEt/Hexà): 0.37.

**Punt de Fusió:** 91-93°C.

**<sup>1</sup>H-RMN** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 10.31 (1H, H<sub>E</sub>), 6.28 (NH, t ample, *J* = 6.03 Hz), 4.15 (2H, H<sub>J</sub>, q, *J* = 7.14 Hz), 3.67 (2H, H<sub>F</sub>, dt, *J* = 6.94 Hz), 2.40 (2H, H<sub>H</sub>, t, *J* = 7.24 Hz), 1.99 (2H, H<sub>G</sub>, qt, *J* = 7.24 Hz), 1.27 (3H, H<sub>K</sub>, t, *J* = 7.14 Hz).



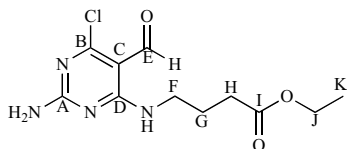
**<sup>13</sup>C-RMN** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 185.11 (C<sub>E</sub>), 173.21 (C<sub>I</sub>), 165.25 (C<sub>D</sub>), 163.92 (C<sub>A</sub>), 160.59 (C<sub>B</sub>), 114.06 (C<sub>C</sub>), 60.58 (C<sub>J</sub>), 41.14 (C<sub>F</sub>), 31.26 (C<sub>H</sub>), 24.03 (C<sub>G</sub>), 13.99 (C<sub>K</sub>).

**EM** (ESI, mode positiu): *m/z* 306.3 [M+H]<sup>+</sup>, 328.3 [M+Na]<sup>+</sup> (massa teòrica esperada, M: 305.2).

**R<sub>f</sub>** (20% AcOEt/Hexà): 0.24.

#### 4-(2-Amino-6-cloro-5-formilpirimidin-4-ilamino)butanoat d'etil (4)

Es dissolen en un baló 8.33 g (27.3 mmol) de **3a** en 250 ml d'EtOH absolut. A continuació, a temperatura ambient i en agitació constant, s'addicionen 55 ml (819 mmol, 10 eq) d'una mescla 3:7 (v/v) de NH<sub>4</sub>OH al 32 % (p/p) i EtOH absolut, i es deixa reaccionar. Després d'unes 5 hores de reacció, s'elimina al rotavapor el dissolvent de la mescla resultant, que té una aparença col·loidal blanca. Seguidament, el sòlid blanc-grogós es redissol en AcOEt. La fase orgànica resultant es renta amb aigua (2 x 50 ml) i una solució saturada de NaCl (50 ml), s'asseca amb MgSO<sub>4</sub> anhidre, es filtra i s'evapora fins a sequetat. S'obtenen 7.84 g d'un sòlid blanc-grogós com a producte final desitjat **4** amb un rendiment quantitatiu.

Caracterització:

**<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, *CDCl*<sub>3</sub>) δ ppm: 10.07 (1H, H<sub>E</sub>, s), 9.28 (NH, t ample, *J* = 6.03 Hz), 5.63 (2H, NH<sub>2</sub>, s ample), 4.14 (2H, H<sub>J</sub>, q, *J* = 7.14 Hz), 3.55 (2H, H<sub>F</sub>, dt, *J* = 6.94 Hz), 2.38 (2H, H<sub>H</sub>, t, *J* = 7.24 Hz), 1.95 (2H, H<sub>G</sub>, qt, *J* = 7.24 Hz), 1.26 (3H, H<sub>K</sub>, t, *J* = 7.14 Hz).

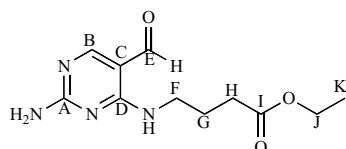
**<sup>13</sup>C RMN** (100 MHz, *CDCl*<sub>3</sub>) δ ppm: 189.80 (C<sub>E</sub>), 172.91 (C<sub>I</sub>), 166.62 (C<sub>A</sub>), 162.64 (C<sub>D</sub>), 162.07 (C<sub>B</sub>), 102.57 (C<sub>C</sub>), 60.52 (C<sub>J</sub>), 39.81 (C<sub>F</sub>), 31.58 (C<sub>H</sub>), 24.57 (C<sub>G</sub>), 14.21 (C<sub>K</sub>).

**EM** (ESI, mode positiu): *m/z* 287.4 [M+H]<sup>+</sup>, 309.4 [M+Na]<sup>+</sup> (massa teòrica esperada, M: 285.7).

**R<sub>f</sub>** (50% AcOEt/Hexà): 0.57.

**4-(2-Amino-5-formilpirimidin-4-ilamino)butanoat d'etil (5)**

En un baló, es dissolen 7.80 g (27.21 mmol) de **4** en 250 ml d'EtOH absolut, i s'addicionen 4.35 g (108.8 mmol, 4 eq) de NaOAc. Ràpidament té lloc la formació d'una suspensió blanca. Seguidament, s'afegeixen 521 mg (0.49 mmol, 0.018 eq) de Pd-C al 10%. És important purgar el baló amb argó abans de l'addició del catalitzador. A la suspensió negra obtinguda, prèviament desgasada a través d'una agulla punxada al sèptum sobre la qual se li fa el buit, se la sotmet a atmosfera d'hidrogen durant tota una nit a temperatura ambient i en agitació constant. En el decurs de la reacció, ha calgut afegir fins a un total de 0.09 eq (1mmol) addicionals de Pd-C al 10% i 2 eq (54.42 mmol) de NaOAc. Transcorregudes 21 hores, la mescla de reacció resultant es filtra a través de celite, prèviament rentada amb EtOH absolut, i es fan rentats amb EtOH absolut (50 ml) i MeOH (4 x 50 ml). El filtrat de color blanc-grogós, s'evapora al rotavapor i s'obté un sòlid blanc-grogós que es purifica per cromatografia en columna emprant, com a eluent, mesclades de polaritat creixent d'hexà, AcOEt i MeOH (SiO<sub>2</sub>, AcOEt/hexà (1:1)-100% AcOEt-2% MeOH/AcOEt). S'obtenen 3.87 g (rdt: 56%) del producte desitjat **5**.

Caracterització:

**<sup>1</sup>H RMN** (400 MHz, *CDCl*<sub>3</sub>) δ ppm: 9.50 (1H, H<sub>E</sub>, s), 8.61 (NH, t ample, *J* = 6.03 Hz), 8.19 (1H, H<sub>B</sub>, s), 5.58 (2H, NH<sub>2</sub>, s ample), 4.14 (2H, H<sub>J</sub>, q, *J* = 7.14 Hz), 3.54 (2H, H<sub>F</sub>, dt, *J* = 6.94 Hz), 2.39 (2H, H<sub>H</sub>, t, *J* = 7.24 Hz), 1.96 (2H, H<sub>G</sub>, qt, *J* = 7.24 Hz), 1.26 (3H, H<sub>K</sub>, t, *J* = 7.14 Hz).

**<sup>13</sup>C RMN** (100 MHz, *CDCl*<sub>3</sub>) δ ppm: 188.99 (C<sub>E</sub>), 172.88 (C<sub>I</sub>), 165.86 (C<sub>A</sub>), 163.54 (C<sub>D</sub>), 161.50 (C<sub>B</sub>), 106.98 (C<sub>C</sub>), 60.39 (C<sub>J</sub>), 39.10 (C<sub>F</sub>), 31.53 (C<sub>H</sub>), 24.57 (C<sub>G</sub>), 14.11 (C<sub>K</sub>).

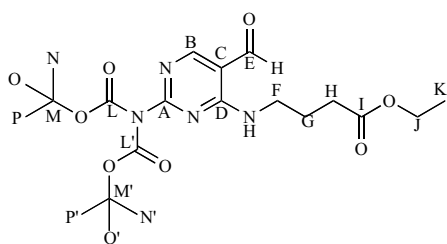
**EM** (ESI, mode positiu): *m/z* 275.5 [M+Na]<sup>+</sup> (massa teòrica esperada, M: 252.3).

**R<sub>f</sub>** (AcOEt): 0.28.



**4-(2-Bis(*tert*-butoxicarbonil)amino-5-formilpirimidin-4-ilamino)butanoat d'etil (6)**

En atmosfera d'argó, es dissolen 3.87 g (15.34 mmol) de **5** en 100 ml DCM anhidre. A la solució resultant se li addicionen seqüencialment 10.2 ml (67.5 mmol, 4.4 eq) de TEA anhidra, 187 mg (1.53 mmol, 0.1 eq) de DMAP i 7.4 g (33.75 mmol, 2.2 eq) de Boc<sub>2</sub>O. En addicionar la DMAP, ràpidament s'observa el canvi de color cap a un groc intens que després d'afegir el Boc<sub>2</sub>O, amb el temps canvia a carmesí. La mescla resultant es deixa reaccionar durant tota una nit en atmosfera d'argó i a temperatura ambient en agitació constant. A continuació, s'evapora el dissolvent a pressió reduïda per obtenir un oli negre-marronós, que es redissol en AcOEt. La fase orgànica resultant es renta successivament amb àcid cítric al 10% (50 ml), NaHCO<sub>3</sub> al 10% (125 ml) i una solució de NaCl saturada (50 ml). Un cop assecada amb MgSO<sub>4</sub> anhidre, es filtra i s'evapora fins a sequetat, per tornar a obtenir un oli negre-marronós, que es purifica mitjançant cromatografia en columna, emprant, com a eluent, mescles de polaritat creixent d'AcOEt en hexà (SiO<sub>2</sub>, 0-50%). S'obtenen 4.1 g (rdt: 29.3%) de **6**, un sòlid groc-blanquinós.

Caracterització:

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 9.77 (1H, H<sub>E</sub>, s), 8.65 (1H, H<sub>B</sub>, s), 8.52 (NH, t ample, *J* = 6.03 Hz), 4.14 (2H, H<sub>J</sub>, d, *J* = 7.14 Hz), 3.58 (2H, H<sub>F</sub>, dt, *J* = 6.94 Hz), 2.37 (2H, H<sub>H</sub>, t, *J* = 7.24 Hz), 1.97 (2H, H<sub>G</sub>, qt, *J* = 7.24 Hz), 1.53 (18H, H<sub>N</sub>, H<sub>N'</sub>, H<sub>O</sub>, H<sub>O'</sub>, H<sub>P</sub>, H<sub>P'</sub>, s), 1.26 (3H, H<sub>K</sub>, t, *J* = 7.14 Hz).

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 190.86 (C<sub>E</sub>), 172.96 (C<sub>I</sub>), 165.40 (C<sub>A</sub>), 161.36 (C<sub>D</sub>), 160.35 (C<sub>B</sub>), 150.45 (C<sub>L</sub>, C<sub>L'</sub>), 110.39 (C<sub>C</sub>), 83.93 (C<sub>M</sub>, C<sub>M'</sub>), 60.75 (C<sub>J</sub>), 40.00 (C<sub>F</sub>), 31.72 (C<sub>H</sub>), 28.01 (C<sub>N</sub>, C<sub>N'</sub>, C<sub>O</sub>, C<sub>O'</sub>, C<sub>P</sub>, C<sub>P'</sub>), 24.69 (C<sub>G</sub>), 14.41 (C<sub>K</sub>).

EM (ESI, mode positiu): *m/z* 453.7 [M+H]<sup>+</sup> (massa teòrica esperada, M: 452.5).

R<sub>f</sub> (AcOEt): 0.84.

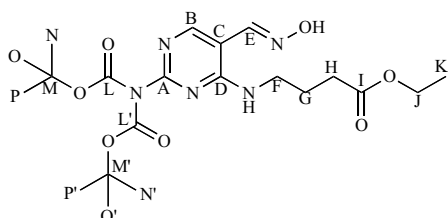
Punt de fusió: 163-173°C.

**4-(2-Bis(*tert*-butoxicarbonil)amino-5-oximpirimidin-ilamino)butanoat d'etil (7)**

Es dissolen 4.22 g (9.33 mmol) de **6** en 100 ml de piridina per obtenir una mescla de color groc. Seguidament, a temperatura ambient, en atmosfera d'argó i en agitació constant, s'addicionen 1.3 g (18.7 mmol, 2 eq) d'hidroxilamina i es deixa reaccionar. Transcorregudes 6 hores, s'elimina la piridina al rotavapor a través de coevaporacions amb toluè, i el sòlid groc pàl·lid obtingut es redissol amb AcOEt. La solució resultant es renta amb aigua (50 ml) i una solució saturada de NaCl (50 ml). La fase orgànica s'asseca amb MgSO<sub>4</sub> anhidre, es filtra i s'evapora fins a sequetat per obtenir 3.85 g (rdt: 88%) d'un sòlid groc pàl·lid, que correspon al producte desitjat **7**.

Caracterització:

$^1\text{H RMN}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 8.17 (1H,  $\text{H}_E$ , s), 8.16 (1H,  $\text{H}_B$ , s), 7.97 (NH, t ample,  $J = 6.03$  Hz), 4.16 (2H,  $\text{H}_J$ , q,  $J = 7.14$  Hz), 3.62 (2H,  $\text{H}_F$ , dt,  $J = 6.94$  Hz), 2.40 (2H,  $\text{H}_H$ , t,  $J = 7.24$  Hz), 2.00 (2H,  $\text{H}_G$ , qt,  $J = 7.24$  Hz), 1.51 (18H,  $\text{H}_N$ ,  $\text{H}_{N'}$ ,  $\text{H}_O$ ,  $\text{H}_{O'}$ ,  $\text{H}_P$ ,  $\text{H}_{P'}$ , s), 1.28 (3H,  $\text{H}_K$ , t,  $J = 7.14$  Hz).



$^{13}\text{C RMN}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 173.41 ( $\text{C}_I$ ), 160.24 ( $\text{C}_B$ ), 157.76 ( $\text{C}_A$ ), 157.32 ( $\text{C}_D$ ), 150.99 ( $\text{C}_L$ ,  $\text{C}_{L'}$ ), 147.98 ( $\text{C}_E$ ), 107.27 ( $\text{C}_C$ ), 83.31 ( $\text{C}_M$ ,  $\text{C}_{M'}$ ), 60.71 ( $\text{C}_J$ ), 40.24 ( $\text{C}_F$ ), 31.94 ( $\text{C}_H$ ), 28.07 ( $\text{C}_N$ ,  $\text{C}_{N'}$ ,  $\text{C}_O$ ,  $\text{C}_{O'}$ ,  $\text{C}_P$ ,  $\text{C}_{P'}$ ), 24.87 ( $\text{C}_G$ ), 14.41 ( $\text{C}_K$ ).

**IR** (KBr): 3337.8, 1798.5, 1729.6, 1616.1, 1587.1  $\text{cm}^{-1}$ .

**EM** (MALDI-TOF, mode positiu):  $m/z$  468.7  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 489.8  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 505.7  $[\text{M}+\text{K}]^+$  (massa teòrica esperada, M: 467.5).

**$R_f$**  (AcOEt): 0.84.

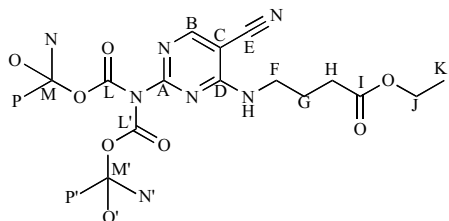
**4-(2-(Bis(*tert*-butoxicarbonil)amino)-5-cianopirimidin-4ilamino)butanoat d'etil (8)**

En atmosfera d'argó, es dissolen 3.85 g (8.24 mmol) de **7** en 100 ml THF anhidre per obtenir una solució de color groc. Seguidament, s'afegeixen 3.7 ml (24.72 mmol, 3 eq) de TEA anhidra i es refreda a 0°C mitjançant un bany d'aigua i gel. A baixa temperatura, s'addicionen 1.7 ml (12.36 mmol, 1.5 eq) de TFAA. En aquest punt cal destacar que durant l'addició s'observa l'aparició de fums blancs i un canvi de color cap a marró taronja.

Després de l'addició, es tempera el bany i es manté la mescla de reacció en agitació constant durant 2 hores. Transcorregut aquest temps, es torna a refredar a 0°C i s'addiciona aigua freda per destruir l'excés de TEAA. Seguidament, s'elimina el THF al rotavapor, es redissol el cru resultant en AcOEt (50 ml) i es fan rentats amb àcid cítric al 10% (25 ml), amb  $\text{NaHCO}_3$  al 10% (25 ml) i amb una solució saturada de NaCl (25 ml). La fase orgànica resultant s'asseca amb  $\text{MgSO}_4$  anhidre, es filtra i s'evapora fins a sequetat. El sòlid groc-taronja obtingut es purifica per cromatografia en columna, emprant, com a eluent, mesclades de polaritat creixent d'AcOEt en hexà ( $\text{SiO}_2$ , 0-25%), i s'obtenen 2.94 g (rdt: 79%) d'un sòlid groc blanquinós, que correspon al producte desitjat **8**.

Caracterització:

$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 8.42 (1H,  $\text{H}_\text{B}$ , s), 5.98 (NH, t ample,  $J = 6.03$  Hz), 4.16 (2H,  $\text{H}_\text{J}$ , q,  $J = 7.14$  Hz), 3.57 (2H,  $\text{H}_\text{F}$ , dt,  $J = 6.94$  Hz), 2.40 (2H,  $\text{H}_\text{H}$ , t,  $J = 7.24$  Hz), 1.97 (2H,  $\text{H}_\text{G}$ , qt,  $J = 7.24$  Hz), 1.51 (18H,  $\text{H}_\text{N}$ ,  $\text{H}_\text{N}'$ ,  $\text{H}_\text{O}$ ,  $\text{H}_\text{O}'$ ,  $\text{H}_\text{P}$ ,  $\text{H}_\text{P}'$ , s), 1.27 (3H,  $\text{H}_\text{K}$ , t,  $J = 7.14$  Hz).



$^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm: 173.37 ( $\text{C}_\text{I}$ ), 162.41 ( $\text{C}_\text{B}$ ), 161.20 ( $\text{C}_\text{A}$ ), 159.63 ( $\text{C}_\text{D}$ ), 150.29 ( $\text{C}_\text{L}$ ,  $\text{C}_\text{L}'$ ), 114.94 ( $\text{C}_\text{E}$ ), 88.55 ( $\text{C}_\text{M}$ ,  $\text{C}_\text{M}'$ ), 84.07 ( $\text{C}_\text{C}$ ), 61.00 ( $\text{C}_\text{J}$ ), 41.04 ( $\text{C}_\text{F}$ ), 31.82 ( $\text{C}_\text{H}$ ), 28.00 ( $\text{C}_\text{N}$ ,  $\text{C}_\text{N}'$ ,  $\text{C}_\text{O}$ ,  $\text{C}_\text{O}'$ ,  $\text{C}_\text{P}$ ,  $\text{C}_\text{P}'$ ), 24.20 ( $\text{C}_\text{G}$ ), 14.41 ( $\text{C}_\text{K}$ ).

IR (KBr): 3322.8, 2222.7, 1787.9, 1734.5, 1598, 1580.7  $\text{cm}^{-1}$ .

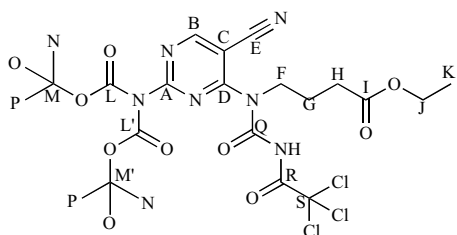
EM (MALDI-TOF, mode positiu):  $m/z$  472.8 [ $\text{M}+\text{Na}$ ] $^+$ , 489.8 [ $\text{M}+\text{K}$ ] $^+$  (massa teòrica esperada, M: 449.5).

$\text{R}_\text{f}$  (25% d'AcOEt/Hexà): 0.44.

Punt de fusió: 189-193°C.

#### 4-(2-(Bis(*tert*-butoxicarbonil)amino)-(1-(5-cianopirimidin-4-il)-3-(2,2,2-tricloroetanoil)ureido)butanoat d'etil (9)

En condicions anhidres i en atmosfera d'argó, es dissol 1 g (0.636 mmol) de **8** en la mínima quantitat de DCM anhidre. Seguidament, un cop la mescla de reacció està a 0°C, s'addicionen 2.64 ml d'una dissolució, prèviament refredada a 0°C, d'isocianat de triclorocarbonil (6.36 mmol, 10 eq) en DCM anhidre en un volum total de 15 ml de dissolvent. La mescla resultant de color groc pàl·lid es deixa evolucionar fins a temperatura ambient unes 5 hores aproximadament, mantenint l'agitació constant. A continuació, s'afegeixen 25 ml d'aigua freda (a 0°C), es decanta la fase orgànica i es renta amb aigua (3 x 15 ml). La fase orgànica resultant s'asseca amb  $\text{MgSO}_4$  anhidre, es filtra, s'evapora fins a sequetat i el sòlid groc obtingut es purifica per cromatografia en columna, emprant, com a eluent, mesclures de polaritat creixent d'AcOEt en hexà ( $\text{SiO}_2$ , 0-50%). S'obtenen 1.92 g (rdt quantitatiu) d'un sòlid resinós groc, que correspon al producte desitjat **9**.

Caracterització:

$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 9.55 (1H,  $\text{H}_\text{B}$ , s), 6.94 (1H, NH, s ample), 4.33 (2H,  $\text{H}_\text{F}$ , t,  $J = 6.94$  Hz), 4.12 (2H,  $\text{H}_\text{J}$ , q,  $J = 7.14$  Hz), 2.43 (2H,  $\text{H}_\text{H}$ , t,  $J = 7.24$  Hz), 2.10 (2H,  $\text{H}_\text{G}$ , qt,  $J = 7.24$  Hz), 1.58 (18H,  $\text{H}_\text{N}$ ,  $\text{H}_\text{N}'$ ,  $\text{H}_\text{O}$ ,  $\text{H}_\text{O}'$ ,  $\text{H}_\text{P}$ ,  $\text{H}_\text{P}'$ , s), 1.26 (3H,  $\text{H}_\text{K}$ , t,  $J = 7.14$  Hz).

$^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 173.94 ( $\text{C}_D$ ), 172.77 ( $\text{C}_I$ ), 164.03 ( $\text{C}_A$ ), 160.85 ( $\text{C}_B$ ), 158.33 ( $\text{C}_Q$ ), 149.74 ( $\text{C}_L$ ,  $\text{C}_L'$ ), 147.59 ( $\text{C}_R$ ), 104.66 ( $\text{C}_C$ ), 92.01 ( $\text{C}_S$ ), 85.13 ( $\text{C}_M$ ,  $\text{C}_M'$ ), 84.07 ( $\text{C}_E$ ), 60.87 ( $\text{C}_J$ ), 42.15 ( $\text{C}_F$ ), 31.66 ( $\text{C}_H$ ), 27.94 ( $\text{C}_N$ ,  $\text{C}_N'$ ,  $\text{C}_O$ ,  $\text{C}_O'$ ,  $\text{C}_P$ ,  $\text{C}_P'$ ), 23.01 ( $\text{C}_G$ ), 14.39 ( $\text{C}_K$ ).

EM (ESI, mode positiu):  $m/z$  637.7  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 659.6  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 675.6  $[\text{M}+\text{K}]^+$  (massa teòrica esperada, M: 636.1).

$R_f$  (AcOEt): 0.93.

Punt de fusió: 134-137°C.

#### 4-(4-Amino-7-(bis(*tert*-butoxicarbonil)amino)-2-oxopirimido[4,5-*d*]pirimidin-1(2*H*)-il)butanoat d'etil (10)

Es dissolen 1.42 g (2.23 mmol) de **9** en 50 ml d'una dissolució 7 N de  $\text{NH}_3$  en MeOH. La solució resultant es refreda (0 a  $-10^\circ\text{C}$ ) mitjançant un bany de NaCl i gel, i es deixa reaccionar en atmosfera d'argó, a temperatura i en agitació constant. Transcorregudes 2 hores, s'elimina el dissolvent al rotavapor i s'obté un sòlid blanc-grogós, que es redissol en DCM. La fase orgànica resultant, es renta amb aigua (3 x 25 ml), s'asseca amb  $\text{MgSO}_4$  anhidre, es filtra i s'evapora fins a sequetat. S'obtenen 878 mg (rdt: 80.1%) d'un sòlid resinós blanc-grogós corresponent al producte **10** desitjat.

#### Caracterització:

$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 9.28 (1H,  $\text{H}_B$ , s), 4.27 (2H,  $\text{H}_F$ , t,  $J = 6.94$  Hz), 4.10 (2H,  $\text{H}_J$ , q,  $J = 7.14$  Hz), 2.38 (2H,  $\text{H}_H$ , t,  $J = 7.24$  Hz), 2.05 (2H,  $\text{H}_G$ , qt,  $J = 7.24$  Hz), 1.53 (18H,  $\text{H}_N$ ,  $\text{H}_N'$ ,  $\text{H}_O$ ,  $\text{H}_O'$ ,  $\text{H}_P$ ,  $\text{H}_P'$ , s), 1.22 (2H,  $\text{H}_K$ , t,  $J = 7.14$  Hz).

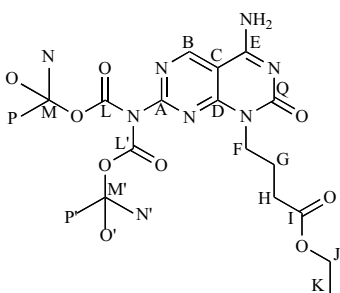
$^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 173.37 ( $\text{C}_I$ ), 161.51 ( $\text{C}_A$ ), 160.52 ( $\text{C}_D$ ), 158.81 ( $\text{C}_E$ ), 156.85 ( $\text{C}_B$ ), 155.97 ( $\text{C}_Q$ ), 150.31 ( $\text{C}_L$ ,  $\text{C}_L'$ ), 101.19 ( $\text{C}_C$ ), 84.60 ( $\text{C}_M$ ,  $\text{C}_M'$ ), 60.69 ( $\text{C}_J$ ), 41.46 ( $\text{C}_F$ ), 31.84 ( $\text{C}_H$ ), 29.90 ( $\text{C}_N$ ,  $\text{C}_N'$ ,  $\text{C}_O$ ,  $\text{C}_O'$ ,  $\text{C}_P$ ,  $\text{C}_P'$ ), 22.90 ( $\text{C}_G$ ), 14.39 ( $\text{C}_K$ ).

IR (NaCl): 3400, 1738.8, 1652.6, 1635.5, 1602.3, 1558.9, 1540  $\text{cm}^{-1}$ .

EM (CI en  $\text{NH}_3$ ):  $m/z$  293.6  $[\text{M}-2\text{Boc}+\text{H}]^+$  (81.5%), 393.7  $[\text{M}-\text{Boc}+\text{H}]^+$  (100%), 493.8  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (56.4%) (massa teòrica esperada, M: 492.5).

EM (ESI, mode positiu):  $m/z$  493.7  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 515.7  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

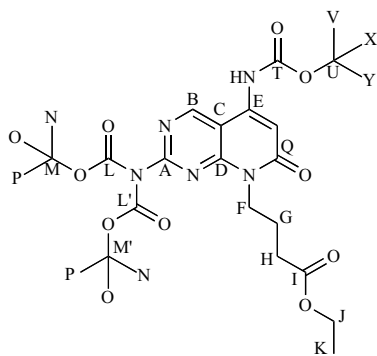
$R_f$  (15% MeOH/AcOEt): 0.68.



#### 4-(7-(Bis(*tert*-butoxicarbonil)amino)-4-(*tert*-butoxicarbonilamino)-2-oxopirimido [4,5-*d*]pirimidin-1(2*H*)-il)butanoat d'etil (11)

En atmosfera d'argó, es dissolen 878 mg (2.23 mmol) de **10** en 30 ml de DCM anhidre. A continuació, s'addicionen 1.62 ml (13.38 mmol, 6 eq) de TEA anhidre, 218 mg (2.23 mmol, 1 eq) de DMAP i 1.17 g (6.69 mmol, 3 eq) de Boc<sub>2</sub>O. En aquest punt, la solució es torna de color groc intens. Transcorregudes 24 hores de reacció en agitació constant i a temperatura ambient, s'observa que el color ha canviat a marró. Seguidament, s'aboca la mescla de reacció a un embut de decantació, i s'extreu la fase orgànica, que es renta successivament amb aigua (2 x 25 ml), amb una solució d'àcid cítric al 10% (25 ml), amb NaHCO<sub>3</sub> al 10% (25 ml) i amb una solució saturada de NaCl (25 ml). La fase orgànica resultant s'asseca amb MgSO<sub>4</sub> anhidre, es filtra i s'evapora fins a sequetat per obtenir 1.11 g del producte **11** (rdt: 90%), un sòlid marró.

#### Caracterització:



<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 9.41 (1H, H<sub>B</sub>, s), 4.24 (2H, H<sub>F</sub>, t, *J* = 6.94 Hz), 4.08 (2H, H<sub>J</sub>, q, *J* = 7.14 Hz), 2.37 (2H, H<sub>H</sub>, t, *J* = 7.24 Hz), 2.04 (2H, H<sub>G</sub>, qt, *J* = 7.24 Hz), 1.54 (9H, H<sub>V</sub>, H<sub>X</sub>, H<sub>Y</sub>, s), 1.50 (18H, H<sub>N</sub>, H<sub>N'</sub>, H<sub>O</sub>, H<sub>O'</sub>, H<sub>P</sub>, H<sub>P'</sub>, s), 1.21 (3H, H<sub>K</sub>, t, *J* = 7.14 Hz).

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 172.69 (C<sub>I</sub>), 161.31 (C<sub>A</sub>), 159.37 (C<sub>D</sub>), 158.02 (C<sub>E</sub>), 156.85 (C<sub>B</sub>), 155.65 (C<sub>Q</sub>), 149.98 (C<sub>L</sub>, C<sub>L'</sub>), 148.29 (C<sub>T</sub>), 105.68 (C<sub>C</sub>), 86.63 (C<sub>U</sub>), 84.96 (C<sub>M</sub>, C<sub>M'</sub>), 60.74 (C<sub>J</sub>), 41.57 (C<sub>F</sub>), 31.67 (C<sub>H</sub>), 28.10 (C<sub>N</sub>, C<sub>N'</sub>, C<sub>O</sub>, C<sub>O'</sub>, C<sub>P</sub>, C<sub>P'</sub>), 27.96 (C<sub>V</sub>, C<sub>X</sub>, C<sub>Y</sub>), 23.16 (C<sub>G</sub>), 14.40 (C<sub>K</sub>).

EM (ESI, mode positiu): *m/z* 593.7 [M+H]<sup>+</sup> (massa teòrica esperada, M: 592.3).

EM (MALDI-TOF, mode positiu): *m/z* 615.0 [M+Na]<sup>+</sup>, 631.9 [M+K]<sup>+</sup> (massa teòrica esperada, M: 592.3).

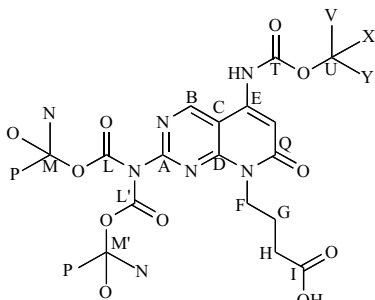
R<sub>f</sub> (50% AcOEt/Hexà): 0.78.

#### Àcid 4-(7-(bis(*tert*-butoxicarbonil)amino)-4-(*tert*-butoxicarbonilamino)-2-oxopirimido[4,5-*d*]pirimidin-1(2*H*)-il)butanoic (12)

Sobre una dissolució de 550 mg (0.325 mmol) d'**11** en 30 ml d'una mescla H<sub>2</sub>O/ACN 3:1 (v/v) s'afegeix una solució de 400 mg de LiOH (3.25 mmol, 10 eq) en 1 ml H<sub>2</sub>O. La mescla resultant es deixa evolucionar a temperatura ambient durant 1 hora i en agitació constant. A continuació, s'elimina l'ACN al rotavapor i la solució aquosa obtinguda s'acidifica fins a pH 3-4 amb una solució aquosa d'àcid cítric al 10%. Ràpidament, s'observa l'aparició d'un precipitat blanc. Seguidament, s'addiciona la mínima quantitat d'AcOEt, per tal de redissoldre el precipitat, i es fan extraccions amb AcOEt (2 x 10 ml). La fase orgànica resultant s'asseca amb MgSO<sub>4</sub> anhidre, es filtra i s'evapora fins a sequetat per obtenir un sòlid groc-pàl·lid, que es purifica mitjançant cromatografia en columna, emprant una mescla d'eluent de polaritat creixent d'hexà, AcOEt i MeOH

(SiO<sub>2</sub>, AcOEt/hexà (1:1)-100%AcOEt; AcOEt 100%-15%MeOH/AcOEt). Finalment s'obtenen 130 mg (rdt: 27.3%) d'un sòlid groc-pàl·lid que correspon al producte **12**.

### Caracterització:



<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 12.10 (1H, OH, s ample), 9.43 (1H, H<sub>B</sub>, s), 4.28 (2H, H<sub>F</sub>, t, *J* = 6.94 Hz), 2.44 (2H, H<sub>H</sub>, t, *J* = 7.24 Hz), 2.07 (2H, H<sub>G</sub>, qt, *J* = 7.24 Hz), 1.57 (9H, H<sub>V</sub>, H<sub>X</sub>, H<sub>Y</sub>, s), 1.51 (18H, H<sub>N</sub>, H<sub>N'</sub>, H<sub>O</sub>, H<sub>O'</sub>, H<sub>P</sub>, H<sub>P'</sub>, s).

<sup>13</sup>C RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 176.86 (C<sub>D</sub>), 162.71 (C<sub>A</sub>), 161.30 (C<sub>D</sub>), 159.43 (C<sub>E</sub>), 158.08 (C<sub>B</sub>), 155.56 (C<sub>Q</sub>), 150.03 (C<sub>L</sub>, C<sub>L'</sub>), 148.22 (C<sub>T</sub>), 105.72 (C<sub>C</sub>), 84.69 (C<sub>U</sub>), 82.16 (C<sub>M</sub>, C<sub>M'</sub>), 41.40 (C<sub>F</sub>), 31.13 (C<sub>H</sub>), 28.19 (C<sub>V</sub>, C<sub>X</sub>, C<sub>Y</sub>), 27.96 (C<sub>N</sub>, C<sub>N'</sub>, C<sub>O</sub>, C<sub>O'</sub>, C<sub>P</sub>, C<sub>P'</sub>), 22.97 (C<sub>G</sub>).

IR (KBr): 3362.5, 1764.3, 1751.3, 1728.6, 1661.5, 1602.3 cm<sup>-1</sup>.

EM (MALDI-TOF, mode positiu): *m/z* 565.9 [M+H]<sup>+</sup>, 587.6 [M+Na]<sup>+</sup>, 603.6 [M+K]<sup>+</sup> (massa teòrica esperada, M: 564.6).

EM (ESI, mode positiu): *m/z* 565.7 [M+H]<sup>+</sup>, 587.7 [M+K]<sup>+</sup> (massa teòrica esperada, M: 564.6).

R<sub>f</sub> (AcOEt): 0.80.

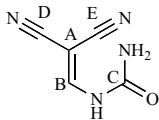
Punt de fusió: 190-194°C.

## 1.1.1.2 Síntesi del monòmer Janus B

### Ureidometilenmalonitril (13)

En un baló, es pesen 5 g (75.7 mmol) de malononitril, 4.55 g (75.7 mmol, 1 eq) d'urea i 25.2 ml (151 mmol, 2 eq) d'ortoformiat d'etil. La mescla resultant, inicialment marró, s'escalfa a reflux (130°C). Al cap de 10 min, quan comença a bullir, es forma un precipitat marró clar. En aquest punt, se separa la mescla de reacció de la manta calefactora i es deixa en agitació i a temperatura ambient durant 10 min. Transcorregut aquest temps, quan s'observa la desaparició del precipitat, es torna a escalfar durant uns 20 min a 120 °C. A continuació, s'atura el reflux i es deixa el baló temperar-se durant 10 min i, posteriorment, es refreda en un bany de gel, també durant 10 min. El precipitat format es recull per filtració al buit sobre una placa filtrant (número 3) i es renta amb acetona, EtOH absolut calent i éter etílic. Després d'assecar-se al buit, s'obté un sòlid marronós (7.3 g, rdt: 71%), que correspon al producte **13** desitjat.

### Caracterització:

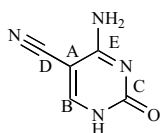


<sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO) δ (ppm): 10.65 (1H, NH, s ample), 8.28 (1H, H<sub>B</sub>, s), 7.49 (1H, NH, s ample), 6.62 (1H, NH, s ample).

<sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO) δ (ppm): 156.23 (C<sub>B</sub>), 151.92 (C<sub>C</sub>), 115.25 (C<sub>D</sub>), 113.48 (C<sub>E</sub>), 57.27 (C<sub>A</sub>).

**5-Cianocitosina (14)**

En un baló, s'addicionen molt lentament 7.1 g (52.2 mmol) de **13** sobre 40 ml d'una solució 1.5 M de MeONa en MeOH, prèviament preparada a partir d'1.35 g de Na (58.95 mmol, 1.13 eq) i 40 ml de MeOH, i la suspensió marró resultant es deixa evolucionar a temperatura ambient i en agitació constant. Transcorregudes 16 hores, el sòlid format es filtra al buit amb una placa filtrant (número 3) i es renta amb EtOH calent, de manera que la sal sòdica del producte queda recollida a la placa en forma de sòlid negre-marronós. El sòlid es redissol en 200 ml de H<sub>2</sub>O i es deixa en carbó actiu a temperatura ambient i en agitació constant durant dues hores. Seguidament, el cru es filtra a través d'un filtre de plecs, i la solució blanca-groguenca resultant s'acidifica amb àcid acètic glacial fins a pH lleugerament àcid. El precipitat blanc obtingut es filtra al buit i es renta amb aigua freda per obtenir un sòlid blanc (2.93 g, rdt: 41.3%), que correspon a **14**.

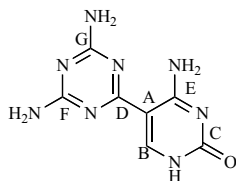
Caracterització:

<sup>1</sup>H-RMN (400MHz, DMSO) δ (ppm): 11.54 (1H, NH, s ample), 8.31 (1H, H<sub>B</sub>, s), 7.80 (1H, NH, s ample), 7.37 (1H, NH, s ample).

<sup>13</sup>C-RMN (100MHz, DMSO) δ (ppm): 163.89 (C<sub>E</sub>), 155.07 (C<sub>C</sub>), 153.97 (C<sub>B</sub>), 115.69 (C<sub>D</sub>), 78.34 (C<sub>A</sub>).

**5-(4,6-Diamino-1,3,5-triazin-2-il)citosina (15)**

En condicions anhidres, es dissolen 5 g (36.8 mmol) de **14** en 100 ml d'etilenglicol per obtenir una suspensió blanca. En un altre baló, es dissolen 4.1 g de KOH (73.5 mmol, 2 eq) i 6.18 g de dicianidamida (73.5 mmol, 2 eq) en 100 ml d'etilenglicol. La solució resultant s'addiciona lentament, gota a gota i en agitació constant, a través d'una cànula sobre la suspensió del producte de partida. A mesura que transcorre l'addició, s'observa que a mesura que s'homogeneïtza la suspensió inicial, es forma una coloració vermella-marronosa. La solució resultant s'escalfa a reflux a 150°C durant 40 h, i se segueix per HPLC-MS (0 a 100% B en 18 min). A continuació, la mescla de reacció es refreda i s'evapora fins a sequetat mitjançant coevaporacions amb toluè. El sòlid marronós resultant, es renta amb H<sub>2</sub>O, éter i EtOH per obtenir finalment 4.53 g (rdt: 54 %) d'un sòlid blanc-marronós, que correspon al producte desitjat **15**.

Caracterització:

<sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO) δ (ppm): 11.2 (1H, NH, s ample), 9.5 (1H, NH, s ample), 8.5 (1H, H<sub>B</sub>, s), 8.0 (1H, NH, s ample), 6.8 (4H, NH, s ample).

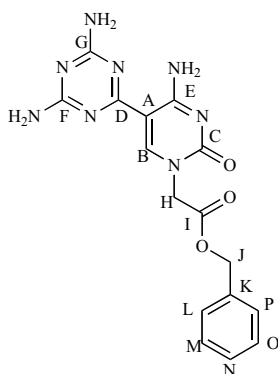
<sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO) δ (ppm): 167.8 (C<sub>D</sub>), 165.9 (C<sub>F</sub>, C<sub>G</sub>), 164.2 (C<sub>E</sub>), 156.04 (C<sub>C</sub>), 148.61 (C<sub>B</sub>), 99.22 (C<sub>A</sub>).

EM (ESI-alta resolució, mode positiu): *m/z* 221.0893 [M+H]<sup>+</sup>, *m/z* 243.0713 [M+Na]<sup>+</sup> (massa teòrica esperada, M: 220.0821).

HPLC-MS (0 a 100% B en 18 min): *t<sub>R</sub>* = 3.5 min.

**2-(5-(4,6-Diamino-1,3,5-triazin-2-il)citosin-1(2H)-il)etanoat de benzil (16)**

En condicions anhidres i en atmosfera d'argó, es dissolen 820 mg (3.73 mmol) de **15** i 1.25 g (11.18 mmol, 3 eq) de <sup>t</sup>BuOK en 80 ml de DMF, i la suspensió marró resultant s'escalfa a reflux (160°C) durant 1-2 h. S'observa una homogeneïtzació total. Un cop s'ha temperat la mescla de reacció, s'addicionen lentament, gota a gota, 2.4 ml de bromoacetat de benzil (14.9 mmol, 4 eq) i es deixa reaccionar a temperatura ambient i en agitació constant durant 3 dies. A causa de la presència del producte de partida sense reaccionar, ha calgut addicionar de més 2 eq de bromoacetat de benzil i 1 eq de <sup>t</sup>BuOK, i escalfar la mescla de reacció a 90°C durant 2 h. L'anàlisi del cru de reacció per HPLC-MS (0 a 100% B en 18 min) mostra la presència del producte desitjat, tot i que en un percentatge molt baix (14%). En aquest punt, s'evapora fins a sequetat i s'obté un sòlid marronós, que s'empra directament a la següent reacció.

Caracterització:

**EM** (ESI, mode positiu):  $m/z$  369.1  $[M+H]^+$ , 737.11 (massa teòrica esperada, M: 368.14).

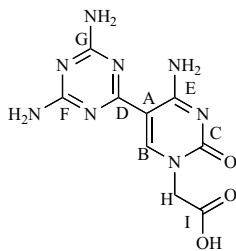
**HPLC-MS** (0 a 100% B en 18 min):  $t_R = 10.8$  min.

**Àcid 2-(5-(4,6-diamino-1,3,5-triazin-2-il)citosin-1(2H)-il)etanoic (17)**

El cru del producte **16** es dissol en 100 ml d'una solució aquosa 1 M de LiOH, i la mescla resultant de color marró es deixa reaccionar tota una nit. Transcorregut aquest temps, s'acidifica amb HCl al 10% (v/v) fins a pH = 2 i, a continuació, s'evapora fins a sequetat. L'anàlisi del sòlid marronós resultant per HPLC-MS (0 a 100% B en 18 min) mostra la presència del producte desitjat (11 %) al cru de reacció. La purificació es duu a terme per MPLC amb una columna de fase invertida C<sub>18</sub> i un gradient de 0-30% de B (A: 0.1% HCOOH/H<sub>2</sub>O i B: 70% (0.1% HCOOH/H<sub>2</sub>O + 30% (0.1% HCOOH/ACN)), emprant 1 l de cada dissolvent i detectant a 254 nm. Un cop ajuntades i liofilitzades les fraccions més pures, s'obtenen 5 mg del producte final desitjat amb una puresa del 49%. Després de la purificació d'una petita part per HPLC, mitjançant una columna semipreparativa (veure Materials i Mètodes) i un gradient de 0 a 50% de B (A: 0.1% TFA/H<sub>2</sub>O i B: 0.1% TFA/ACN), s'obté un sòlid blanc (**17**, 90% de puresa).



**Caracterització:**



<sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, DMSO) ) δ (ppm): 8.80 (s, 1H, H<sub>B</sub>), 7.00 (4H, NH, s ample), 4.7 (s, 2H, H<sub>H</sub>).

HPLC (0 a 50% B en 30 min): t<sub>R</sub> = 12.2 min.

HPLC-MS (0 a 100% B en 18 min): t<sub>R</sub> = 6.7 min.

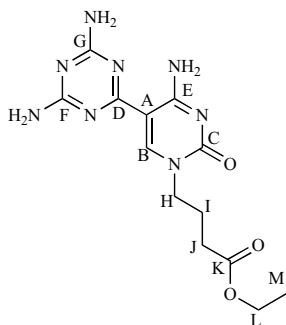
EM (ESI, mode positiu): m/z 278.94 [M+H]<sup>+</sup> (massa teòrica esperada, M: 278.09).

EM (ESI-alta resolució, mode positiu): m/z 279.0952 [M+H]<sup>+</sup> (massa teòrica esperada, M: 278.0876).

**4-(5-(4,6-Diamino-1,3,5-triazin-2-il)itosin-1(2H)-il)butanoat d'etil (18)**

En condicions anhidres i en atmosfera d'argó, es dissolen 630 mg (2.86 mmol) de **15** en 80 ml de DMF per obtenir una suspensió marró. Seguidament, s'addicionen 114.4 mg de NaH (2.86 mmol, 1 eq, 60% en oli mineral) i s'escalfa a 50°C durant 2 h en agitació constant. A continuació, un cop s'ha temperat la mescla de reacció, s'addicionen molt lentament 450 µl (3.15 mmol, 1.1 eq) de bromobutirat d'etil i es deixa reaccionar a temperatura ambient i en agitació constant. Transcorregudes 15 h, s'observa per HPLC-MS (0 a 100% B en 18 min) la formació del producte desitjat. Tot i que la conversió no és quantitativa, la mescla de reacció s'evapora fins a sequetat i el sòlid obtingut es redissol en 200 ml d'una mescla al 30% MeOH/H<sub>2</sub>O a 70°C. Mentre que el precipitat resultant correspon al producte de partida **15**, les aigües mares contenen majoritàriament el producte desitjat **18** (80%), el producte **15**, l'éster metílic, fruit de la transesterificació amb el MeOH emprat, i el corresponent àcid carboxílic **19**.

**Caracterització:**



HPLC-MS (0 a 100% B en 18 min): t<sub>R</sub> = 3.5 min (34%)

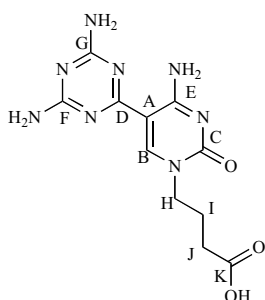
EM (ESI, mode positiu): m/z 335.04 [M+H]<sup>+</sup> (massa teòrica esperada, M: 334.15).

**Àcid 4-(5-(4,6-Diamino-1,3,5-triazin-2-il)itosin-1(2H)-il)butanoic (19)**

En un baló, es dissol en 100 ml d'una solució 1 M de LiOH el cru anterior, obtingut a la síntesi de **18**, i la solució marró resultant es deixa reaccionar tota una nit. Transcorregut aquest temps, s'acidifica amb HCl al 10% (v/v) fins a pH = 2 i, a continuació, s'evapora fins a sequetat. L'anàlisi del cru per HPLC-MS (0 a 100% B en 18 min) mostra la presència del producte desitjat (64%). La purificació del producte es duu a terme per MPLC a través d'una columna de fase invertida C<sub>18</sub> i un gradient de 0-50% de B (A:

0.1% HCOOH/H<sub>2</sub>O i B: 50% (0.1% HCOOH/H<sub>2</sub>O + 50% (0.1% HCOOH/ACN)), emprant 1 l de cada dissolvent i detectant a 254 nm. Un cop ajuntades les fraccions més pures, després de la corresponent liofilització, s'obtenen 143 mg (rdt: 20%) d'un sòlid groc-marronós (**19**, 80% de puresa). Després de la purificació d'una petita part mitjançant HPLC amb una columna semipreparativa C<sub>18</sub> (veure apartat Materials i Mètodes) i un gradient de 0 a 50% B (A: 0.1% TFA/H<sub>2</sub>O i B: 0.1% TFA/ACN), s'obté un sòlid blanc amb un 97% de puresa que correspon a **19**.

### Caracterització:



<sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, DMSO) δ (ppm): 12.21 (1H, OH, s ample), 10.70 (1H, NH, s ample), 9.10 (1H, NH, s ample), 8.79 (1H, H<sub>B</sub>, s), 7.06 (4H, NH, s ample), 3.91 (2H, H<sub>H</sub>, t, *J* = 7.1 Hz), 2.32 (2H, H<sub>J</sub>, t, *J* = 7.1 Hz), 1.88 (2H, H<sub>I</sub>, t, *J* = 7.1 Hz).

<sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, DMSO) δ (ppm): 173.86 (C<sub>K</sub>), 167.71 (C<sub>D</sub>), 166.00 (C<sub>F</sub>, C<sub>G</sub>), 163.94 (C<sub>E</sub>), 154.40 (C<sub>B</sub>), 149.59 (C<sub>C</sub>), 100.30 (C<sub>A</sub>), 49.01 (C<sub>H</sub>), 30.71 (C<sub>J</sub>), 24.44 (C<sub>I</sub>).

HPLC (0 a 50% B en 30 min): t<sub>R</sub> = 14.6 min.

HPLC-MS (0 a 100% B en 18 min): t<sub>R</sub> = 7.2 min.

EM (ESI, mode positiu): *m/z* 306.82 [M+H]<sup>+</sup>, *m/z* 328.8 [M+Na]<sup>+</sup> (massa teòrica esperada, M: 306.12).

EM (ESI-alta resolució, mode positiu): *m/z* 307.1261 [M+H]<sup>+</sup> (massa teòrica esperada, M: 306.1189).

## 1.1.2 Síntesi dels monòmers Janus funcionalitzats amb un grup tiol

Tal com s'exposa a Materials i Mètodes (apartat 3.1), com a reactor s'utilitza un sistema format per una xeringa de polipropilè sobre la qual s'adapta un filtre porós de polietilè. L'agitació es realitza manualment amb una vareta de tefló i l'eliminació de dissolvents, excessos de reactius i subproductes no ancorats a la resina, per filtració al buit.

### 1.1.2.1 Síntesi de la Fmoc-Asn(Trt)-Arg(Pbf)-Cys(Trt)-resina (20)

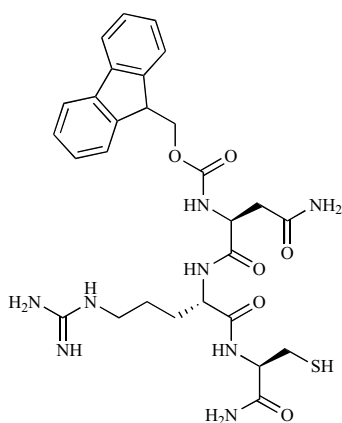
Es pesen 302 mg de resina *Rink Amida*-MBHA (*f* ~ 0.74 mmol/g) en una xeringa que disposa del filtre de polietilè adequat, es fan els rentats corresponents amb DMF, DCM i MeOH, i s'elimina el grup Fmoc de l'extrem *N*-terminal (20% piperidina/DMF). A continuació, s'addicionen 524 mg de Fmoc-Cys(Trt)-OH (0.895 mmol, 4 eq), 122 mg d'HOAt (0.895 mmol, 4 eq) i 138 µl de DIPC (0.894 mmol, 4 eq), dissolts en la mínima quantitat de DMF anh, i es deixa reaccionar a temperatura ambient i en agitació constant durant 2-3 h. Transcorregut aquest temps, després dels rentats corresponents i amb un resultat negatiu al test de ninhidrina,\* s'acobla el següent aminoàcid sobre una alíquota de 200 mg de l'aminoacil-resina mitjançant 376 mg de Fmoc-Arg(Pbf)-OH (0.580 mmol, 4 eq), 79 mg d'HOAt (0.580 mmol, 4 eq) i 90 µl de DIPC (0.580 mmol, 4 eq),

\* Veure l'apartat 3.1.3.1 de Materials i Mètodes.

dissolts en la mínima quantitat de DMF anh i es deixa reaccionar a temperatura ambient i en agitació constant. Al cap de 3 h de reacció, s'obté un acoblament quantitatiu. Pel darrer acoblament s'utilitzen 346.2 mg Fmoc-Asn(Trt)-OH (0.580 mmol, 4 eq), 79 mg d'HOAt (0.580 mmol, 4eq) i 90 µl de DIPC (0.580 mmol, 4 eq), dissolts en la mínima quantitat de DMF anh. A partir de la tripeptidil-resina obtinguda (**20**), se sintetitzen els productes **21** i **22**.

Per comprovar que la síntesi ha evolucionat correctament, se separa una alíquota de 10 mg de resina i es tracta amb 1 ml d'una solució de TFA/TIS/H<sub>2</sub>O 95:2.5:2.5 (v/v/v) durant 1 h en agitació constant. Transcorregut aquest temps, se separa el cru peptídic de la resina per filtració al buit, i es recull sobre Et<sub>2</sub>O fred, juntament amb els posteriors rentats amb TFA (2 x 1 ml), per precipitar el pèptid. Després de la corresponent centrifugació i decantació, el precipitat es renta amb Et<sub>2</sub>O (3 x 5 ml) i s'analitza per espectrometria de masses i HPLC en fase invertida.\* L'anàlisi del cru per HPLC revela la presència d'un pic majoritari que correspon al tripèptid **20** desitjat protegit a l'extrem N-terminal amb el grup Fmoc.

#### Caracterització:



**HPLC** (30 a 100% B en 30 min):  $t_R = 5.2$  min.

**EM** (MALDI-TOF, mode positiu):  $m/z$  613.8  $[M+H]^+$  (massa teòrica esperada, M: 612.7).

#### 1.1.2.2 Síntesi dels monòmers tiol Janus A

##### 4-(4,7-Diamino-2-oxopirimido[4,5-d]pirimidin-1(2H)-il)-N-(2-mercaptoetil)butanamida (**23**)

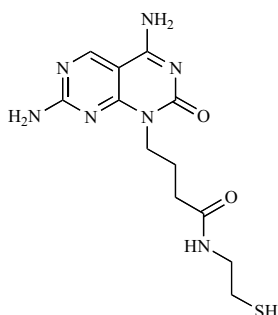
La derivatització de **12** amb el grup etantiol es realitza amb la resina comercial cisteamina 4-metoxitril ( $f \sim 1.1$  mmol/g) en un ambient lliure d'àcids a causa de la seva forta labilitat als àcids. Per tant, cal emprar dissolvents neutralitzats amb alumina bàsica.

En una xeringa equipada amb un filtre de polietilè, es pesen 25 mg de resina i es fan els corresponents rentats amb DMF, DCM, passat per alumina, i MeOH, tal com es descriu anteriorment a la síntesi de **20**. Per altra banda, en un vial es dissolen, en la mínima

\* S'ha emprat una columna analítica Jupiter proteo C<sub>18</sub> 4 µm 250 x 4.6 mm i un gradient de 30-100% de B en 30 min (A: 0.045% TFA/H<sub>2</sub>O B: 0.036% ACN/H<sub>2</sub>O, detecció a 220 i 280 nm).

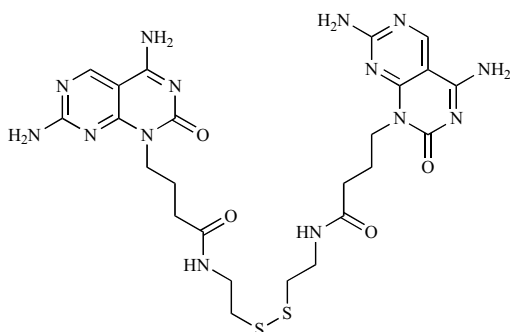
quantitat de DMF anh, 17.1 mg (0.03 mmol) de **12** i 10.6 mg (0.028 mmol, 1 eq) d'HATU i, a continuació, se li addicionen 11.7  $\mu$ l (0.069 mmol, 2.5 eq) de DIEA i es deixa reaccionar 2 min. S'observa l'aparició d'una coloració groga intensa. La mescla de reacció resultant s'addiciona sobre la resina, prèviament assecada al buit, i es deixa reaccionar a temperatura ambient durant 3 h en agitació constant. Transcorregut aquest temps, després dels corresponents rentats i d'un resultat negatiu al test de ninhidrina, es procedeix al desancoratge i a la desprotecció del producte mitjançant un tractament amb 1 ml d'una barreja de TFA/TIS/H<sub>2</sub>O 95:2.5:2.5 (v/v/v) durant 30 min a temperatura ambient i en agitació constant. Seguidament, se separa el cru de reacció de la resina per filtració al buit, es renta amb TFA (2 x 1 ml) i els filtrats recollits s'evaporen fins a sequetat. L'anàlisi del cru per HPLC en fase invertida,\* mostra la presència del producte **23** (51%) i la del seu dímer (35%), que també s'aïlla i es caracteritza. La purificació es realitza per MPLC amb una columna de fase invertida de sílica C<sub>18</sub> i un gradient de 0-40% de B (A: 0.05% TFA/H<sub>2</sub>O i B: 60% (0.05% TFA/H<sub>2</sub>O) + 40% (0.05% TFA/ACN)) i 600 ml de cada dissolvent, fent la detecció a 254 nm. El producte pur es guarda al congelador en atmosfera d'argó.

### Caracterització:



**HPLC** (0 a 50% B en 30 min):  $t_R = 18.6$  min.

**EM** (MALDI-TOF, mode positiu):  $m/z$  324.0  $[M+H]^+$ , 346.0  $[M+Na]^+$ , 362.0  $[M+K]^+$  (massa teòrica esperada, M: 323.4).



**HPLC** (0 a 50% B en 30 min):  $t_R = 25.3$  min.

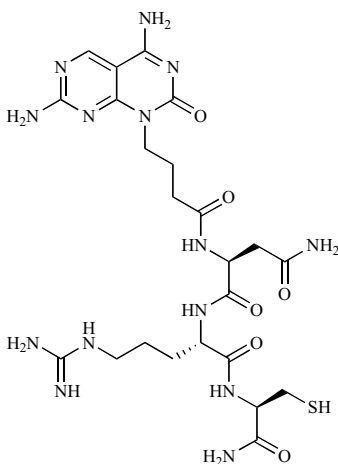
**EM** (MALDI-TOF, mode positiu):  $m/z$  645.2  $[M+H]^+$ , 667.2  $[M+Na]^+$  (massa teòrica esperada, M: 644.7).

\* S'ha emprat una columna analítica Kromasil C<sub>18</sub> 10  $\mu$ m 250 x 4 mm i un gradient de 0-50% de B en 30 min (A: 0.045% TFA/H<sub>2</sub>O B: 0.036% ACN/H<sub>2</sub>O, detecció a 220 i 260 nm).

#### 4-(4,7-Diamino-2-oxopirimido[4,5-*d*]pirimidin-1(2*H*)-il)-*N*-[Asn-Arg-Cys-NH<sub>2</sub>]butanamida (**21**)

L'obtenció de **21** es duu a terme amb 60 mg de la peptidil-resina **20** ( $f \sim 0.74$  mmol/g), a partir de 33 mg de **12** (0.059 mmol, 1.3 eq), 20.3 mg d'HATU (0.053 mmol, 1.2 eq) i 19  $\mu$ l de DIEA (0.111 mmol, 2.5 eq), dissolts en la mínima quantitat de DMF anh. Després de 4 h de reacció a temperatura ambient i en agitació constant, s'obté un acoblament quantitatiu. A continuació, es realitza la desprotecció i el desancoratge mitjançant la reacció amb 1 ml de TFA/TIS/H<sub>2</sub>O 95:2.5:2.5 (v/v/v) durant 1 h. L'anàlisi del cru per espectrometria de masses i HPLC en fase invertida,\* revela l'obtenció d'un pic majoritari (73%) que correspon al producte desitjat **21**. El producte es guarda al congelador en atmosfera d'argó. Una petita part del cru es purifica per HPLC analític\* per dur a terme experiments de química combinatòria dinàmica.

#### Caracterització:



**HPLC** (0 a 35% B en 30 min):  $t_R = 13.1$  min.

**EM** (MALDI-TOF, mode positiu):  $m/z$  637.9 [M+H]<sup>+</sup>, 659.9 [M+Na]<sup>+</sup>, 675.9 [M+K]<sup>+</sup> (massa teòrica esperada, M: 636.3).

#### 1.1.2.3 Síntesi dels monòmers tiol Janus B

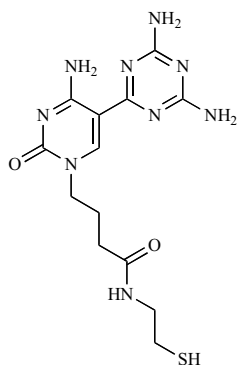
#### 4-(5-(4,6-Diamino-1,3,5-triazin-2-il)citosin-1(2*H*)-il)-*N*-(2-mercaptoetil)butanamida (**24**)

La derivatització de **19** amb el grup etantiol es realitza de forma anàloga al procediment experimental emprat per **23**. En aquest cas, s'acoblen 22 mg de **19** (82%, 0.061 mmol, 1.1 eq) sobre 50 mg de la resina comercial cisteamina 4-metoxitriil ( $f \sim 1.1$  mmol/g) mitjançant 25.1 mg d'HATU (0.066 mmol, 1.2 eq) i 23.4  $\mu$ l de DIEA (0.138 mmol, 2.5 eq), dissolts en la mínima quantitat de DMF anh. Després de 2 h de reacció a temperatura ambient i en agitació constant, s'obté un acoblament quantitatiu. A continuació, el tractament de la resina amb 1 ml d'una barreja TFA/TIS/H<sub>2</sub>O 95:2.5:2.5 (v/v/v) durant 30 min a temperatura ambient i en agitació constant, permet desancorar el

\* S'ha emprat una columna analítica Jupiter 4  $\mu$ m proteo C<sub>18</sub> 90 Å 250 x 4.6 mm i un gradient de 0-35% de B en 30 min (A: 0.045% TFA/H<sub>2</sub>O B: 0.036% TFA/ACN, detecció a 220 i 260 nm).

producte **24**, que precipita en recollir-se els filtrats sobre Et<sub>2</sub>O fred. Després de la centrifugació i dels rentats amb Et<sub>2</sub>O fred (3 x 5 ml), l'anàlisi del cru corresponent per HPLC-MS en fase invertida\* revela l'obtenció del producte desitjat amb una puresa del 74 %. Es purifica només una petita part del cru per HPLC en fase invertida,\*\* per dur a terme els experiments de química combinatòria dinàmica.

#### Caracterització:



**HPLC** (0 a 50% B en 30 min):  $t_R = 16.5$  min.

**HPLC-MS** (0 a 50% B en 18 min):  $t_R = 8.9$  min

**EM** (MALDI-TOF, mode positiu):  $m/z$  366.1  $[M+H]^+$ , 388.1  $[M+Na]^+$  (massa teòrica esperada, M: 365.14).

**EM** (ESI, mode positiu):  $m/z$  365.88  $[M+H]^+$  (massa teòrica esperada, M: 365.14).

#### **4-(5-(4,6-Diamino-1,3,5-triazin-2-il)cytosin-1(2H)-il)-N-[Asn-Arg-CysNH<sub>2</sub>]butanamida (**22**)**

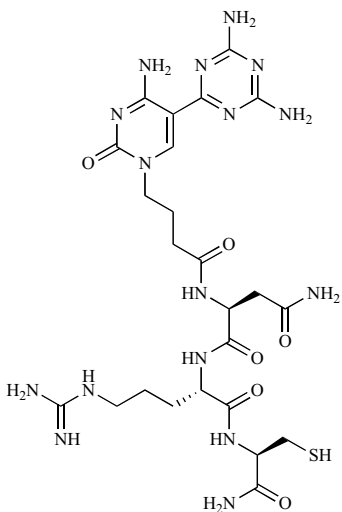
La síntesi de **22** es realitza a partir del procediment descrit per a l'obtenció de **21**, mitjançant 34 mg de la peptidil-resina **20** ( $f \sim 0.74$  mmol/g), 10 mg de **19** (82%, 0.032 mmol, 1.3 eq), 11.5 mg d'HATU (0.030 mmol, 1.2 eq) i 11  $\mu$ l de DIEA (0.629 mmol, 2.5 eq), dissolts en la mínima quantitat de DMF anh. Després de 4 h de reacció a temperatura ambient i en agitació constant, s'obté un acoblament quantitatiu.

El tractament de desprotecció i desancoratge de la resina es realitza amb 1 ml del cóctel TFA/TIS/H<sub>2</sub>O 95:2.5:2.5 (v/v/v) durant 1 h, igual que en el cas de **21**. L'anàlisi del cru per espectrometria de masses i HPLC en fase invertida\*\* revela l'obtenció d'un producte majoritari (54%), que correspon al producte desitjat **22**. El producte es guarda al congelador en atmosfera d'argó. Per dur a terme els experiments de DCC, es purifica una petita part del cru per HPLC analític.\*\*

\* S'ha emprat una columna GraceSmart RP C<sub>18</sub> 5  $\mu$ m 90 Å 150 x 2.1 mm i un gradient de 0-50 % de B en 18 min (A: 0.1% HCOOH/H<sub>2</sub>O B: 0.1% HCOOH/ACN, detecció a 220 i 260 nm).

\*\* S'ha emprat una columna analítica Jupiter 4  $\mu$  proteo C<sub>18</sub> 90 Å 250 x 4.6 mm i un gradient de 0-50% de B en 30 min (A: 0.045% TFA/H<sub>2</sub>O B: 0.036% TFA/ACN, detecció a 220 i 260 nm).

Caracterització:



**HPLC** (0 a 35% B en 30 min):  $t_R = 14.1$  min.

**EM** (MALDI-TOF, mode positiu):  $m/z$  679.9  $[M+H]^+$ , 701.9  $[M+Na]^+$  (massa teòrica esperada, M: 678.3).

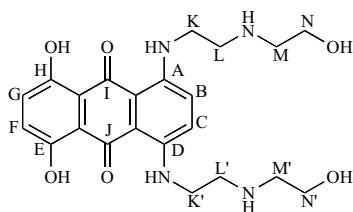
**1.2 Síntesi de derivats de l'Ametantrona**

**1,4-Bis((2-((2-hidroxietil)amino)etil)amino)antraquinona (Ametantrona) (26)**

Es dissolen 850 mg de 1,4-difluoroantraquinona (3.48 mmol) i 3.5 ml de *N*-(2-hidroxietil)-etilendiamina (34.8 mmol, 10 eq) en 15 ml de piridina, i es deixa en agitació constant, en atmosfera d'argó i a temperatura ambient durant 65 h, aproximadament. Durant el transcurs de la reacció, s'observa el canvi de color de groc daurat a blau-lilós. Transcorregut aquest temps, s'atura la reacció i s'evapora fins a sequetat. El sòlid obtingut es redissol en 50 ml de H<sub>2</sub>O i es renta amb éter etílic (2 x 50 ml). La fase aquosa resultant s'extreu amb 20% MeOH/CHCl<sub>3</sub> (5 x 50 ml) i s'obté una fase orgànica de color blau, que s'asseca amb MgSO<sub>4</sub> anhidre. Després de l'evaporació fins a sequetat, s'aïlla el producte desitjat **26** (1.3 g).

Una part del cru (200 mg) es purifica per MPLC amb una columna de fase invertida de sílica C<sub>18</sub> i un gradient de 0-70% de B: (A: 0.1% TFA/H<sub>2</sub>O i B: 30% (0.1%TFA/H<sub>2</sub>O)+ 70% (0.1%TFA/ACN), emprant 600 ml de cada dissolvent per obtenir el producte **26** pur.

Caracterització:



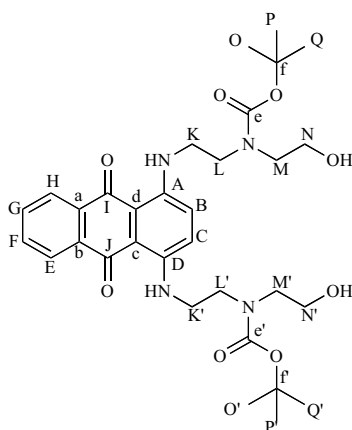
**<sup>1</sup>H-RMN** (500 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  (ppm): 8.04 (2H, H<sub>G</sub>, H<sub>F</sub>, dd,  $J = 6.0$  Hz,  $J = 2.9$  Hz), 7.81 (2H, H<sub>E</sub>, H<sub>H</sub>, ddd,  $J = 6.0$  Hz,  $J = 3.4$  Hz,  $J = 0.8$  Hz), 7.04 (2H, H<sub>B</sub>, H<sub>C</sub>, s), 3.93 (4H, H<sub>N</sub>, H<sub>N'</sub>, m), 3.79 (4H, H<sub>K</sub>, H<sub>K'</sub>, t,  $J = 6.0$  Hz), 3.43 (4H, H<sub>L</sub>, H<sub>L'</sub>, t,  $J = 6.0$  Hz), 3.34 (2H, H<sub>M</sub>, H<sub>M'</sub>, m).

**EM** (MALDI-TOF, mode positiu):  $m/z$  413.5  $[M+H]^+$ , 435.6  $[M+Na]^+$ , 451.5  $[M+K]^+$  (massa teòrica esperada, M: 412.2).

**R<sub>f</sub>** (70% CHCl<sub>3</sub>/MeOH): 0.41.

**1,4-Bis((2-((2-hidroxietil)-*N*-Boc-amino)etil)amino)antraquinona (27)**

A una mescla de 1.2 g del cru de **26** i 150 mg de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.41 mmol, 0.5 eq), dissolts en 75 ml de dioxà/H<sub>2</sub>O (2:1), se li addiciona una solució de 1.47 g (6.75 mmol, 2.4 eq) de Boc<sub>2</sub>O, dissolt en 25 ml dioxà/H<sub>2</sub>O (2:1), i es deixa reaccionar tota la nit a temperatura ambient i en atmosfera d'argó. A continuació, un cop evaporat el dissolvent al rotavapor, es redissol el cru obtingut en 75 ml d'AcOEt i es fan extraccions amb H<sub>2</sub>O (3 x 75 ml). La fase orgànica resultant s'asseca amb MgSO<sub>4</sub> anhidre, es filtra i s'evapora fins a sequetat per obtenir un sòlid blau, que es purifica per cromatografia en columna, emprant, com a eluent, mescles de polaritat creixent d'hexà, AcOEt i MeOH (SiO<sub>2</sub>, 0-100% AcOEt; 0-2.5% MeOH/AcOEt). S'aïllen 830 mg de **27** pur amb un rendiment del 48%, corresponent al conjunt de les dues etapes.

**Caracterització:**

**<sup>1</sup>H-RMN** (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm): 8.28 (2H, H<sub>G</sub>, H<sub>F</sub>, m), 7.72 (2H, H<sub>E</sub>, H<sub>H</sub>, m), 7.56 (1H, H<sub>B</sub>/H<sub>C</sub>, s), 7.46 (1H, H<sub>B</sub>/H<sub>C</sub>, m), 3.68 (8H, H<sub>N</sub>, H<sub>N'</sub>, H<sub>K</sub>, H<sub>K'</sub>, m), 3.60 (4H, H<sub>L</sub>, H<sub>L'</sub>, m), 3.37 (4H, H<sub>M</sub>, H<sub>M'</sub>, m), 1.45 (9H, H<sub>O</sub>/H<sub>O'</sub>, H<sub>P</sub>/H<sub>P'</sub>, H<sub>Q</sub>/H<sub>Q'</sub>, s), 1.36 (9H, H<sub>O</sub>/H<sub>O'</sub>, H<sub>P</sub>/H<sub>P'</sub>, H<sub>Q</sub>/H<sub>Q'</sub>, s).

**<sup>13</sup>C-RMN** (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm): 183 (C<sub>I</sub>, C<sub>J</sub>), 157.43 (C<sub>e</sub>, C<sub>e'</sub>), 147.70 (C<sub>a</sub>, C<sub>b</sub>), 135.69 (C<sub>A</sub>, C<sub>D</sub>), 133.19 (C<sub>E</sub>, C<sub>H</sub>), 133.18 (C<sub>G</sub>/C<sub>F</sub>), 127.03 (C<sub>G</sub>/C<sub>F</sub>), 125.05 (C<sub>B</sub>, C<sub>C</sub>), 110.84 (C<sub>c</sub>, C<sub>d</sub>), 81.96 (C<sub>f</sub>, C<sub>f'</sub>), 61.39 (C<sub>N</sub>, C<sub>N'</sub>), 51.43 (C<sub>L</sub>, C<sub>L'</sub>), 49.35 (C<sub>K</sub>, C<sub>K'</sub>), 41.71 (C<sub>M</sub>, C<sub>M'</sub>), 28.73 (C<sub>O</sub>, C<sub>O'</sub>, C<sub>P</sub>, C<sub>P'</sub>, C<sub>Q</sub>, C<sub>Q'</sub>).

**EM** (MALDI-TOF, mode positiu): *m/z* 613.7 [M+H]<sup>+</sup>, 635.7 [M+Na]<sup>+</sup>, 651.9 [M+K]<sup>+</sup> (massa teòrica esperada, M: 612.3).

**R<sub>f</sub>** (1% MeOH/AcOEt): 0.23.

**1-((2-((2-Hidroxietil)-*N*-Boc-amino)etil)amino)-4-((2-((2-(tioacetil)etil)-*N*-Boc-amino)etil)amino)antraquinona (**28**) i 1,4-bis(2-((2-(tioacetil)etil)-*N*-Boc-amino)etil)amino)antraquinona (**29**)**

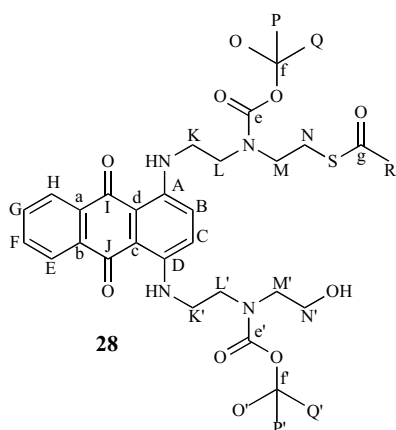
En estrictes condicions anhidres i en atmosfera d'argó, es dissolen 171 mg de PPh<sub>3</sub> (0.653 mmol, 2 eq) en 2 ml THF anh, s'addicionen 129 µl de DIAD (0.653 mmol, 2 eq), es refreda a 0°C i es deixa reaccionar a aquesta temperatura entre 1 i 2 h, aproximadament. S'observa l'aparició d'un precipitat blanc. Aquest temps de reacció és molt important, ja que en aquest punt es forma l'intermedi fosfoni actiu.

Transcorregut aquest temps, mantenint la baixa temperatura, s'addicionen molt lentament, gota a gota, 6 ml d'una solució de 200 mg de **27** (0.327 mmol) en THF anh i es deixa reaccionar durant uns 10 min. Seguidament, s'afegeixen lentament 48.3 µl d'àcid tioacètic (0.653 mmol, 2 eq) i es deixa evolucionar fins a temperatura ambient durant tota una nit. A continuació, la mescla de reacció s'evapora fins a sequetat i el sòlid obtingut es redissol en 50 ml d'AcOEt i es renta amb H<sub>2</sub>O (3 x 50 ml). La fase orgànica resultant s'asseca sobre MgSO<sub>4</sub> anhidre, es filtra i s'evapora fins a sequetat. El sòlid blau obtingut es purifica per cromatografia en columna emprant, com a eluent,



mesclades de polaritat creixent d'AcOEt en hexà i de MeOH (SiO<sub>2</sub>, 0-100% AcOEt; 0-5% MeOH/AcOEt) per aïllar-se el producte desitjat **28**, i el subproducte **29** que correspon al producte ditioacetilat. Tot i la purificació per columna, ha calgut eliminar les restes de l'òxid de PPh<sub>3</sub> mitjançant una segona purificació per MPLC amb una columna de fase invertida de sílica C<sub>18</sub> i un gradient de 0-70% de B: (A: 0.1% TFA/H<sub>2</sub>O i B: 30% (0.1% TFA/H<sub>2</sub>O) + 70% (0.1% TFA/ACN), i 600 ml de cada dissolvent. S'obtenen 78 mg de **28** pur (rdt: 36%) i 160 mg de **29**.

### Caracterització:



**<sup>1</sup>H-RMN** (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm): 8.28 (2H, H<sub>G</sub>, H<sub>F</sub>, m), 7.72 (2H, H<sub>E</sub>, H<sub>H</sub>, m), 7.54 (1H, H<sub>B</sub>/H<sub>C</sub>, m), 7.47 (1H, H<sub>B</sub>/H<sub>C</sub>, m), 3.67 (10H, H<sub>K</sub>, H<sub>K'</sub>, H<sub>M</sub>, H<sub>M'</sub>, H<sub>N</sub>, m), 3.39 (4H, H<sub>L</sub>, H<sub>L'</sub>, m), 3.03 (m, 2H, H<sub>N</sub>), 2.29 (3H, H<sub>R</sub>, s), 1.46 (9H, H<sub>O</sub>/H<sub>O'</sub>, H<sub>P</sub>/H<sub>P'</sub>, H<sub>Q</sub>/H<sub>Q</sub>, s), 1.35 (9H, H<sub>O</sub>/H<sub>O'</sub>, H<sub>P</sub>/H<sub>P'</sub>, H<sub>Q</sub>/H<sub>Q</sub>, s).

**<sup>13</sup>C-RMN** (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm): 197.10 (C<sub>g</sub>), 183.25 (C<sub>I</sub>, C<sub>J</sub>), 157.44 (C<sub>e</sub>, C<sub>e'</sub>), 147.66 (C<sub>a</sub>, C<sub>b</sub>), 135.73 (C<sub>A</sub>, C<sub>D</sub>), 133.24 (C<sub>H</sub>, C<sub>E</sub>), 127.06 (C<sub>G</sub>, C<sub>F</sub>), 125.03 (C<sub>B</sub>, C<sub>C</sub>), 110.93 (C<sub>c</sub>, C<sub>d</sub>), 81.71 (C<sub>f</sub>, C<sub>f'</sub>), 61.39 (C<sub>N'</sub>, C<sub>K</sub>/C<sub>K'</sub>), 51.83 (C<sub>L</sub>/C<sub>L'</sub>, C<sub>K</sub>/C<sub>K'</sub>), 47.98 (C<sub>L</sub>/C<sub>L'</sub>), 41.53 (C<sub>M</sub>, C<sub>M'</sub>), 30.71 (C<sub>R</sub>), 29.13 (C<sub>O</sub>, C<sub>O'</sub>, C<sub>P</sub>, C<sub>P'</sub>, C<sub>Q</sub>, C<sub>Q</sub>), 27.16 (C<sub>N</sub>).

**EM** (MALDI-TOF, mode positiu): *m/z* 671.7 [M+H]<sup>+</sup>, 693.7 [M+Na]<sup>+</sup>, 709.7 [M+K]<sup>+</sup> (massa teòrica esperada, M: 670.3).

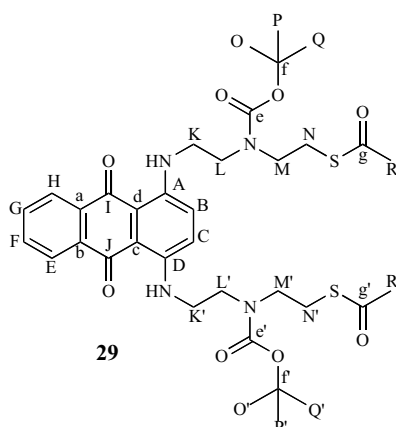
**R<sub>f</sub>** (AcOEt): 0.68.

**<sup>1</sup>H-RMN** (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm): 8.16 (2H, H<sub>G</sub>, H<sub>F</sub>, s), 7.65 (2H, H<sub>E</sub>, H<sub>H</sub>, s), 7.21 (1H, H<sub>B</sub>/H<sub>C</sub>, m), 7.12 (1H, H<sub>B</sub>/H<sub>C</sub>, m), 3.5 (8H, H<sub>K</sub>, H<sub>K'</sub>, H<sub>M</sub>, H<sub>M'</sub>, m), 3.38 (4H, H<sub>L</sub>/H<sub>L'</sub>, H<sub>N</sub>/H<sub>N'</sub>, t, *J*=7.1 Hz), 3.03 (4H, H<sub>L</sub>/H<sub>L'</sub>, H<sub>N</sub>/H<sub>N'</sub>, t, *J*=7.1 Hz), 2.31 (6H, H<sub>R</sub>, H<sub>R'</sub>, s), 1.48 (9H, H<sub>O</sub>/H<sub>O'</sub>, H<sub>P</sub>/H<sub>P'</sub>, H<sub>Q</sub>/H<sub>Q</sub>, s), 1.38 (9H, H<sub>O</sub>/H<sub>O'</sub>, H<sub>P</sub>/H<sub>P'</sub>, H<sub>Q</sub>/H<sub>Q</sub>, s).

**<sup>13</sup>C-RMN** (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm): 197.36 (C<sub>g</sub>, C<sub>g'</sub>), 183.06 (C<sub>I</sub>, C<sub>J</sub>), 157.07 (C<sub>e</sub>, C<sub>e'</sub>), 147.33 (C<sub>a</sub>, C<sub>b</sub>), 135.65 (C<sub>A</sub>, C<sub>D</sub>), 133.12 (C<sub>H</sub>, C<sub>E</sub>), 127.04 (C<sub>G</sub>, C<sub>F</sub>), 124.70 (C<sub>B</sub>, C<sub>C</sub>), 110.92 (C<sub>c</sub>, C<sub>d</sub>), 81.70 (C<sub>f</sub>, C<sub>f'</sub>), 48.04 (C<sub>L</sub>, C<sub>L'</sub>, C<sub>K</sub>, C<sub>K'</sub>), 41.66 (C<sub>M</sub>, C<sub>M'</sub>), 30.67 (C<sub>R</sub>, C<sub>R'</sub>), 28.76 (C<sub>O</sub>, C<sub>O'</sub>, C<sub>P</sub>, C<sub>P'</sub>, C<sub>Q</sub>, C<sub>Q</sub>), 28.05 (C<sub>N</sub>, C<sub>N'</sub>).

**EM** (MALDI-TOF, mode positiu): *m/z* 727.7 [M+H]<sup>+</sup>, 751.7 [M+Na]<sup>+</sup>, 767.7 [M+K]<sup>+</sup> (massa teòrica esperada, M: 728.3).

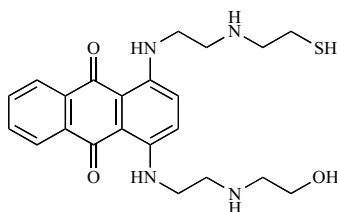
**R<sub>f</sub>** (AcOEt): 0.97.



### 1-((2-((2-Hidroxietil)amino)etil)amino)-4-((2-((2-mercaptoetil)amino)etil)amino)antraquinona (30)

S'addicionen 240  $\mu\text{l}$  (0.239 mmol, 4 eq) d'una solució 1 M de MeONa en MeOH sobre una solució de 40 mg (0.060 mmol) de **28** en 500  $\mu\text{l}$  de MeOH qualitat HPLC, i es deixa reaccionar 1-2 h. A continuació, s'evapora fins a sequetat, s'addicionen 10 ml d'un cóctel format per un 95% TFA/2.5 % TIS/ 2.5 %  $\text{H}_2\text{O}$ , i es deixa reaccionar durant 30 min. El seguiment de la desprotecció a través d'espectrometria de masses mostra que el producte desitjat pràcticament ha dimeritzat completament, amb la qual cosa, un cop liofilitzat el cru, es redissol en 10 ml  $\text{H}_2\text{O}$  milliQ, s'addicionen 173 mg (1.124 mmol, 24 eq) de ditiotreitol i es deixa reaccionar a 37 °C en atmosfera d'argó i en agitació constant durant 24 h. Transcorregut aquest temps, s'elimina l'excés de ditiotreitol amb extraccions amb AcOEt (6 x 10 ml) i es liofilitza la fase aquosa resultant. L'anàlisi per HPLC i espectrometria de masses mostra la presència del producte **30** en un 49%, que es purifica per MPLC mitjançant una columna de fase invertida de sílica  $\text{C}_{18}$  i un gradient de 0-70 % de B: (A: 0.1% TFA/ $\text{H}_2\text{O}$  i B: 30 % (0.1% TFA/ $\text{H}_2\text{O}$ ) + 70% (0.1% TFA/ACN), emprant 600 ml de cada dissolvent. S'obtenen 4.6 mg (rdt: 18%) d'un sòlid blau que correspon al producte desitjat **30**.

#### Caracterització:



**EM** (MALDI-TOF, mode positiu):  $m/z$  429.4  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 451.4  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 467.3  $[\text{M}+\text{K}]^+$  (massa teòrica esperada, M: 428.2).

**EM** (ESI, mode positiu):  $m/z$  429.03  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 451.08  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (massa teòrica esperada, M: 428.2).

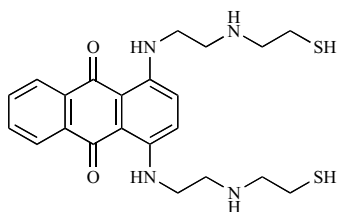
**HPLC** (0 a 70% B en 30 min),  $t_R$ : 17.9 min.

### 1,4- Bis((2-((2-mercaptoetil)amino)etil)amino)antraquinona (31)

Sobre una dissolució de 7.7 mg (0.011 mmol) de **29** en 1 ml de MeOH, qualitat HPLC, s'addicionen 85  $\mu\text{l}$  (0.085 mmol, 8 eq) d'una solució 1 M de MeONa en MeOH, i es deixa reaccionar en atmosfera d'argó. Al cap d'1 h, la mescla de reacció s'evapora fins a sequetat, mantenint l'atmosfera d'argó i, seguidament, s'addicionen 10 ml de la barreja 95% TFA/2.5% TIS/ 2.5%  $\text{H}_2\text{O}$  i es deixa reaccionar durant 30 min. Transcorregut aquest temps, la mescla de reacció s'evapora fins a sequetat. L'anàlisi del cru per HPLC i espectrometria de masses MALDI-TOF revela la presència del producte desitjat **31** (41%, 220 nm). Es purifica una petita part d'aquest cru per HPLC en fase invertida.\*

\* S'ha emprat una columna analítica, Jupiter 4  $\mu\text{m}$  proteo  $\text{C}_{18}$  90 Å 250 x 4.6 mm i un gradient de 0-70% de B en 30 min (A: 0.045% TFA/ $\text{H}_2\text{O}$  B: 0.036% TFA/ACN, detecció a 220 i 260 nm).

Caracterització:



**EM** (MALDI-TOF, mode positiu):  $m/z$  445.2  $[M+H]^+$ , 467.2  $[M+Na]^+$  (massa teòrica esperada, M: 444.6).

**HPLC** (0 a 70% B en 30 min),  $t_R$ : 19.7 min.

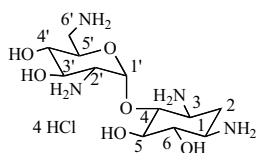
### 1.3 Síntesi de derivats de la neamina

#### 1.3.1 Obtenció de la neamina a partir de la Neomicina B

##### **Hidrocloreur de 4-O-{2',6'-diamino-2',6'-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopiranosil}-2-desoxistreptamina (32)**

Es dissolen 25 g (27.5 mmol) de sulfat de neomicina B en 500 ml de MeOH qualitat HPLC. La suspensió blanca resultant s'escalfa a reflux, s'hi addicionen lentament 50 ml d'una solució HCl conc (35% v/v) i es deixa reaccionar durant tota la nit en agitació constant. Transcorregut aquest temps, s'observa la formació d'un precipitat blanc, l'hidrocloreur de neamina, en una solució marronosa que conté l'hidrocloreur de neobiosamina. El precipitat es filtra en calent a través d'una placa filtrant (núm 3), i es renta amb MeOH (qualitat HPLC). Per altra banda, es redueix el volum de les aigües mares aproximadament fins a la meitat, per tal d'induir la precipitació de la resta d'hidrocloreur de neamina. Aquest procediment es realitza un parell de vegades per evitar l'arrossegament de part de la neobiosamina en solució. S'obtenen 10.6 g (rdt: 82%) d'un sòlid blanc molt fi.

Caracterització:



**$^1H$ -RMN** (400 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  (ppm): 5.96 (1H,  $H_{1'}$ , d,  $J=3.84$  Hz), 4.08-3.98 (3H,  $H_{5'}$ ,  $H_4$ ,  $H_{3'}$ , m), 3.78-3.70 (1H,  $H_{5'}$ , m), 3.66-3.47 (6H,  $H_{1'}$ ,  $H_3$ ,  $H_6$ ,  $H_2'$ ,  $H_{4'}$ ,  $H_{6'}$ , m), 3.42-3.29 (1H, 1H,  $H_{6'}$ , m), 2.58-2.51 (1H,  $H_{2,eq}$ , m), 2.01-1.89 (1H,  $H_{2,ax}$ , m).

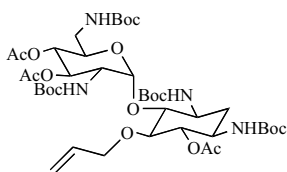
#### 1.3.2 Síntesi de la NeaminaC<sub>2</sub>-tiol

##### **5-O-(Al·lil)-4-O-{2',6'-didesoxi-3',4'-bis-O-(acetil)-2',6'-bis(*tert*-butoxicarbonil amino)- $\alpha$ -D-glucopiranosil}-6-O-(acetil)-*N,N'*-bis(*tert*-butoxicarbonilamino)-2-desoxistreptamina (34)**

En un baló, es pesen 2 g (2.36 mmol) de 4-O-{2',6'-didesoxi-3',4'-bis-O-(acetil)-2',6'-bis(*tert*-butoxicarbonilamino)- $\alpha$ -D-glucopiranosil}-6-O-(acetil)-*N,N'*-bis(*tert*-butoxicarbonilamino)-2-desoxistreptamina (**33**) i 1.04 g (2.83 mmol, 1.2 eq) de TBAI i es deixa en un dessecador al buit amb  $P_2O_5$ , KOH i parafina durant 1 h. Transcorregut aquest temps, en atmosfera d'argó, s'obre el buit i s'addicionen 15 ml de DMSO anh, 408  $\mu$ l (4.71 mmol, 2 eq) de bromur d'al·lil i es deixa en agitació durant uns 5 min aproximadament. A continuació, s'addicionen 3.06 ml (3.06 mmol, 1.3 eq) d'una

dissolució de bis-trimetilsilil-amidur de liti 1 M en THF i es deixa reaccionar a temperatura ambient, en agitació constant i en atmosfera d'argó durant 1-2 h. Passat aquest temps, amb l'addició de 100 ml de DCM s'atura la reacció, s'extreu la fase orgànica amb una solució saturada de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (3 x 100 ml), s'asseca amb  $\text{MgSO}_4$  anhidre, es filtra i s'evapora fins a sequetat. La purificació del cru, un sòlid de color groc pàl·lid, es duu a terme per cromatografia en columna emprant, com a eluent, mescles de polaritat creixent de DCM i AcOEt ( $\text{SiO}_2$ , 0-25%) per obtenir 1.11 g (rdt: 53%) d'un sòlid blanc, que correspon al producte **34**.

#### Caracterització:



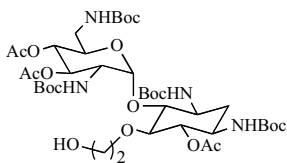
**EM** (MALDI-TOF, mode positiu):  $m/z$  912.2  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ,  $m/z$  928.2  $[\text{M}+\text{K}]^+$  (massa teòrica esperada, M: 888.9).

**R<sub>f</sub>** (DCM/AcOEt 1:2): 0.74 (revelador de sucres).

#### **5-O-(2-Hidroxiètil)-4-O-{2',6'-didesoxi-3',4'-bis-O-(acetil)-2',6'-bis(*tert*-butoxi carbonilamino)- $\alpha$ -D-glucopiranosil}-6-O-(acetil)-N,N'-bis(*tert*-butoxicarbonil amino)-2-desoxistreptamina (35)**

Es redreda a  $-78^\circ\text{C}$ , mitjançant un bany d'acetona i  $\text{N}_2$  líquid, una solució d'1.1 g (1.3 mmol) de **34** en 30 ml DCM anh. A continuació, la mescla de reacció es bombolleja amb  $\text{O}_3$  i es deixa reaccionar en agitació constant fins que el color de la solució es manté permanentment blau. Al cap d'1 h, s'elimina l'excés d' $\text{O}_3$ , purgant el baló amb  $\text{N}_2$  durant 10 min. Seguidament, es refreda a  $0^\circ\text{C}$ , s'addicionen 20 ml de MeOH qualitat HPLC i 647 mg de  $\text{NaBH}_4$  (17.1 mmol, 13.2 eq), i es deixa reaccionar 3 h en agitació i a temperatura constant. Transcorregut aquest temps, s'elimina l'excés de borohidruir de sodi mitjançant l'addició de 30 ml d'àcid cítric al 10%, s'afegeixen 50 ml de DCM i es decanta la fase orgànica, que es renta amb  $\text{H}_2\text{O}$  (3 x 100 ml), s'asseca amb  $\text{MgSO}_4$  anhidre, es filtra i s'evapora fins a sequetat. S'obtenen 1.01 g d'un sòlid blanc-grogós corresponent a **35**, que s'utilitzarà directament a la següent etapa.

#### Caracterització:



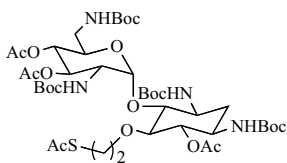
**EM** (MALDI-TOF, mode positiu):  $m/z$  916.3  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ,  $m/z$  932.2  $[\text{M}+\text{K}]^+$  (massa teòrica esperada, M: 892.9).

**R<sub>f</sub>** (DCM/AcOEt 1:1): 0.81 (revelador de sucres).

**5-O-(2-(Tioacetil)etil)-4-O-{2',6'-didesoxi-3',4'-bis-O-(acetil)-2',6'-bis(*tert*-butoxi carbonilamino)- $\alpha$ -D-glucopiranosil}-6-O-(acetil)-*N,N'*-bis(*tert*-butoxicarbonil amino)-2-desoxistreptamina (36)**

En condicions anhidres i en atmosfera d'argó, es dissol el cru de **35** en 20 ml d'una mescla DCM/piridina anhidres 1:1, i es refreda a 0 °C. A continuació, s'addiciona lentament, gota a gota, una solució de 647 mg (3.39 mmol, 3 eq) de TsCl en 5 ml de piridina anhidra i es deixa evolucionar fins a temperatura ambient en agitació constant i en atmosfera d'argó durant 48 h. Transcorregut aquest temps, s'addicionen 50 ml de H<sub>2</sub>O i 25 ml de DCM, se separen les fases, i la fase orgànica es renta amb H<sub>2</sub>O (2 x 50 ml) i amb una solució saturada de NaHCO<sub>3</sub> (2 x 50 ml), s'asseca amb MgSO<sub>4</sub> anhidre, es filtra i s'evapora fins a sequetat. A continuació, el cru, un sòlid de color groc, es redissol en 20 ml de DMF anh, s'addicionen 775 mg (6.79 mmol, 6 eq) de KSAc i es deixa reaccionar a 70°C en atmosfera d'argó i en agitació constant. Al cap de 20 h, es tempera la reacció i s'addicionen 50 ml de H<sub>2</sub>O i 50 ml d'AcOEt. Es decanta la fase orgànica, es renta amb 50 ml d'una solució saturada de NaHCO<sub>3</sub> i d'una de NaCl, s'asseca amb MgSO<sub>4</sub> anhidre, es filtra i s'evapora fins a sequetat. El sòlid marró resultant es purifica per cromatografia en columna emprant, com a eluent, mescles de polaritat creixent de DCM i AcOEt (SiO<sub>2</sub>, 0-30%). S'obtenen 355 mg (rdt global des de **34**: 29%) d'un sòlid marró-taronja, que correspon al producte **36**.

Caracterització:



**EM** (MALDI-TOF, mode positiu):  $m/z$  973.9  $[M+Na]^+$ ,  $m/z$  989.8  $[M+K]^+$  (massa teòrica esperada, M: 951.9).

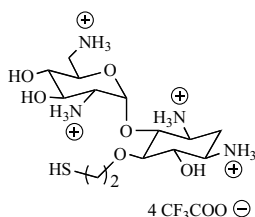
**R<sub>f</sub>** (DCM/AcOEt 1:1): 0.83 (revelador de sucres).

**Trifluoroacetat de 5-O-(2-mercaptoetil)-4-O-{2',6'-diamino-2',6'-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopiranosil}-2-desoxistreptamina (37)**

En un baló, es dissolen 100 mg de **36** en 1 ml de MeOH qualitat HPLC i s'addicionen 421  $\mu$ l (0.421 mmol, 4 eq) d'una solució 1 M de MeONa en MeOH i es deixa reaccionar a temperatura ambient, en atmosfera d'argó i en agitació constant durant 1 h. Transcorregut aquest temps, s'evapora fins a sequetat, i el cru resultant es tracta amb 2 ml d'una mescla de TFA/TIS/DCM (50:2.5:47.5) durant 30 min a temperatura ambient i en atmosfera d'argó. Seguidament, la mescla de reacció s'evapora fins a sequetat i el residu es redissol en 10 ml de 0.1% TFA/H<sub>2</sub>O. La solució aquosa resultant es renta amb Et<sub>2</sub>O (3 x 10 ml) i DCM (3 x 10 ml) i es liofilitza. Atès que l'anàlisi per espectrometria de masses revela la dimerització del producte, es duu a terme la reducció de l'enllaç disulfur. Es redissol el cru en 10 ml H<sub>2</sub>O milliq, s'addiciona 1 g (6.3 mmol, 24 eq) de ditiotreitòl i es deixa reaccionar en agitació constant a 37°C i en atmosfera d'argó durant 24 h. Trasncorregut aquest temps, s'elimina l'excés de ditiotreitòl amb extraccions amb AcOEt (6 x 10 ml) i es liofilitza la fase aquosa obtinguda. El producte liofilitzat es purifica per MPLC amb una columna de fase invertida de sílica C<sub>18</sub> i un gradient isocràtic de 0.1% HCOOH/H<sub>2</sub>O. Les fraccions corresponents al producte pur per

espectrometria de masses s'ajunten i es liofilitzen. S'obtenen 37.8 mg (rdt: 94%) d'un sòlid blanc corresponent a la sal de **37**, que es guarda al congelador en atmosfera d'argó.

#### Caracterització:



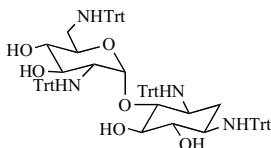
**EM** (ESI, mode positiu):  $m/z$  383.12  $[M+H]^+$ ,  $m/z$  405.11  $[M+Na]^+$   
(massa teòrica esperada per la molècula neutre M: 382.19).

### 1.3.3 Síntesi de la NeaminaC<sub>6</sub>-tiol

#### 4-*O*-{2',6'-Didesoxi-2',6'-bis(tritilamino)- $\alpha$ -D-glucopiranosil}-*N,N'*-bis(tritilamino)-2-desoxistreptamina (**38**)

Es pesen per separat, 14.1 g de **32** (43.6 mmol) i 64.6 g (231.2 mmol, 5.3 eq) de clorur de tritil, i es deixen durant 4 hores al buit en un dessecador amb P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, KOH i parafina. Cal mantenir condicions anhidres i atmosfera d'argó. A continuació, a **32** se li addicionen 220 ml de DMF i 60 ml de NEt<sub>3</sub> (436.2 mmol, 10 eq) anhidres. Es forma una suspensió blanca. Per altra banda, es dissol el clorur de tritil en 250 ml de DMF i 60 ml de NEt<sub>3</sub> (436.2 mmol, 10 eq) anhidra. La solució groga formada s'addiciona lentament, a través d'una cànula, sobre la suspensió de **32**, i es deixa reaccionar a temperatura ambient, en atmosfera d'argó i en agitació constant durant tota la nit. Transcorregut aquest temps, la mescla de reacció, que ha adquirit un color ataronjat, s'evapora fins a sequetat. Seguidament, s'addicionen 500 ml d'AcOEt i 5 ml NEt<sub>3</sub>, i la fase orgànica obtinguda s'extreu amb H<sub>2</sub>O (4 x 200 ml), s'asseca amb MgSO<sub>4</sub> anhidre, es filtra i s'evapora fins a sequetat. S'obté un oli de color granat que es purifica per cromatografia en columna emprant, com a eluent, amb un 2% de NEt<sub>3</sub>, mesclades de polaritat creixent d'hexà, DCM passat per alumina, i MeOH, (SiO<sub>2</sub>, 0-100% DCM; DCM 100%-10% MeOH). S'obtenen 23.03 g (rdt: 41%) d'un sòlid blanc, que correspon al producte desitjat **38**.

#### Caracterització:

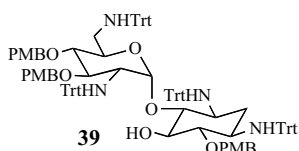


**R<sub>f</sub>** (2% MeOH/DCM): 0.62.

**4-*O*-{2',6'-Didesoxi-3',4'-bis-*O*-(4-metoxibenzil)-2',6'-bis(tritilamino)- $\alpha$ -D-glucopiranosil}-6-*O*-(4-metoxibenzil)-*N,N'*-bis(tritilamino)-2-desoxistreptamina (39)**

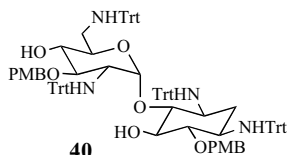
En atmosfera d'argó, es dissolen 2 g de **38** en 50 ml d'una mescla anhidra de THF i DMF 1:10 (v/v). Un cop dissolt, s'afegeixen 146 mg de NaH (3.65 mmol, 2.5 eq, 60% en oli mineral), 540 mg de TBAI (1.46 mmol, 1 eq) i 506  $\mu$ l de clorur de *p*-metoxibenzil (3.65 mmol, 2.5 eq), i la mescla de reacció es deixa evolucionar en atmosfera d'argó, a temperatura ambient i en agitació constant durant tota una nit. Transcorregut aquest temps, s'addicionen 100 ml de DCM passat per alúmina i 75 ml d'una solució de NH<sub>4</sub>Cl saturada. La fase orgànica resultant es decanta i es renta amb H<sub>2</sub>O (3 x 100 ml), s'asseca amb MgSO<sub>4</sub> anhidre, es filtra i s'evapora fins a sequetat. El sòlid groc obtingut es purifica per cromatografia en columna emprant, com a fase sòlida, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> i, com a eluent, mescles de polaritat creixent d'hexà i DCM passat per alúmina (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 30-100% DCM). S'obtenen 280 mg (rdt: 12%) del producte triprotegit desitjat (**39**) i 830 mg (rdt: 37%) del producte diprotegit (**40**).

Caracterització:



**EM** (ESI, mode positiu):  $m/z$  1652.62 [M+H]<sup>+</sup> (massa teòrica esperada, M: 1652.1).

**R<sub>f</sub>** (DCM/0.5% MeOH): 0.67.

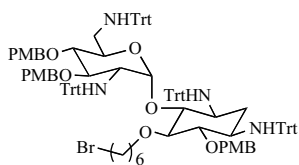


**EM** (ESI, mode positiu):  $m/z$  1532.58 [M+H]<sup>+</sup> (massa teòrica esperada, M: 1531.9).

**R<sub>f</sub>** (DCM/0.5% MeOH): 0.44.

**5-*O*-(6-Bromohehil)-4-*O*-{2',6'-didesoxi-3',4'-bis-*O*-(4-metoxibenzil)-2',6'-bis(tritilamino)- $\alpha$ -D-glucopiranosil}-6-*O*-(4-metoxibenzil)-*N,N'*-bis(tritilamino)-2-desoxistreptamina (41)**

En atmosfera d'argó, es pesen en un baló 457 mg de **39** (0.277 mmol) i 110 mg de NaH (2.77 mmol, 10 eq, 60% en oli mineral), i s'addicionen 8 ml de DMF anh i 422  $\mu$ l de 1,6-dibromohexà (2.77 mmol, 10 eq). La mescla de reacció s'escalfa a 60°C i es deixa reaccionar tota la nit en agitació constant i en atmosfera d'argó. Transcorregut aquest temps, es tempera i s'elimina el dissolvent a pressió reduïda. A continuació, es redissol el cru de reacció amb 80 ml de DCM passat per alúmina, s'addicionen 120 ml d'una solució NH<sub>4</sub>Cl saturada i es decanta la fase orgànica, que es renta amb H<sub>2</sub>O (2 x 80 ml), s'asseca amb MgSO<sub>4</sub> anhidre, es filtra i s'evapora fins a sequetat. El sòlid groc resultant es purifica per cromatografia en columna emprant, com a eluent, mescles de polaritat creixent d'hexà i DCM passat per alúmina, mantenint constant un 1% de NEt<sub>3</sub>, (SiO<sub>2</sub>, 0-30% DCM). S'obtenen 388 mg (rdt: 77%) d'un sòlid blanc, que correspon al producte desitjat **41**.

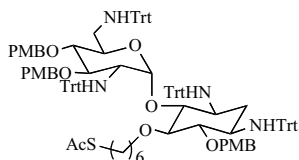
Caracterització:

**EM** (ESI, mode positiu):  $m/z$  1816.9  $[M+H]^+$ ,  $m/z$  1837.8  $[M+Na]^+$   
(massa teòrica esperada, M: 1815.1).

**R<sub>f</sub>** (1% NEt<sub>3</sub> en DCM/Hexà 2:1): 0.44.

**5-O-(6-(Tioacetil)hexil)-4-O-{2',6'-didesoxi-3',4'-bis-O-(4-metoxibenzil)-2',6'-bis(tritilamino)- $\alpha$ -D-glucopiranosil}-6-O-(4-metoxibenzil)-N,N'-bis(tritilamino)-2-desoxistreptamina (42)**

En condicions anhidres i en atmosfera d'argó, es dissolen en 388 mg de **41** (0.214 mmol) i 147 mg de tioacetat de potassi (1.28 mmol, 6 eq) en 10 ml de DMF anh, i es deixa reaccionar a temperatura ambient i en agitació constant durant tota una nit. Passat aquest temps, la mescla de reacció, que adquireix una coloració marronosa, es dilueix en 50 ml de DCM passat per alumina i es decanta la fase orgànica amb 50 ml de H<sub>2</sub>O. La fase aquosa resultant es renta amb DCM (2 x 20 ml), i es combinen totes les diferents fases orgàniques en una sola, que s'asseca amb MgSO<sub>4</sub> anhidre, es filtra i s'evapora fins a sequetat. El sòlid groc obtingut es purifica per cromatografia en columna, (SiO<sub>2</sub>, 1% de NEt<sub>3</sub> en DCM). S'obtenen 244 mg (rdt: 63%) d'un sòlid blanc, que correspon al producte **42** desitjat.

Caracterització:

**EM** (ESI, mode positiu):  $m/z$  1810.9  $[M+H]^+$ ,  $m/z$  1833.7  $[M+Na]^+$  (massa teòrica esperada, M: 1810.3).

**R<sub>f</sub>** (1% NEt<sub>3</sub> en DCM): 0.48.

**Trifluoroacetat de 5-O-{(6-mercaptohexil)-4-O-(2',6'-diamino-2',6'-didesoxi- $\alpha$ -D-glucopiranosil)}-2-desoxistreptamina (43)**

**Procediment A.** Es dissolen 100 mg (0.055 mmol) de **42** en 10 ml d'una mescla TFA/anisol 1:1 (v/v), s'observa la formació d'un color vermell molt intens, i es deixa en agitació constant a temperatura ambient durant tota una nit. Transcorregut aquest temps, s'addicionen 20 ml de MeOH de qualitat HPLC, desapareix la coloració vermella, i s'evapora fins a sequetat. L'oli marronós resultant es redissol amb 50 ml de DCM i amb 50 ml de H<sub>2</sub>O milliq. Es decanta la fase aquosa, es renta amb DCM (2 x 50 ml) i, finalment, es liofilitza.

El residu liofilitzat es redissol amb 15 ml de H<sub>2</sub>O milliq, s'addicionen 20 ml d'una solució 0.4 M de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> a pH 7.9 i es deixa en agitació constant i en atmosfera d'argó a 37°C. Al cap de 2 dies, la mescla de reacció es torna a liofilitzar, i el sòlid resultant es redissol amb 10 ml H<sub>2</sub>O milliq. Seguidament, s'addicionen 205 mg (1.33 mmol, 24 eq) de ditiotreitòl i es deixa reaccionar en atmosfera d'argó a 37 °C durant 24 h en agitació constant. Transcorregut aquest temps, s'elimina l'excés de ditiotreitòl amb extraccions d'AcOEt (6 x 10 ml) i es torna a liofilitzar la fase aquosa. El cru resultant es

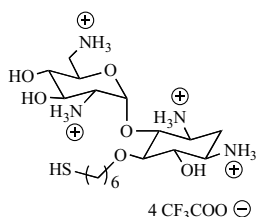


purifica per MPLC amb una columna de fase invertida de sílica C<sub>18</sub> i un gradient isocràtic de 0.1% HCOOH/H<sub>2</sub>O. Les fraccions corresponents al producte pur s'ajunten i es liofilitzen per obtenir 12.5 mg (rdt: 52%) d'un sòlid blanc que correspon a la sal de **43**, que es guarda al congelador en atmosfera d'argó.

**Procediment B.** Es dissolen 30 mg (0.017 mmol) de **42** en 8 ml d'una mescla TFA/anisol 1:1 (v/v), i es deixa en agitació durant 24 h en atmosfera d'argó i a temperatura ambient. Transcorregut aquest temps, s'evapora el dissolvent fins a sequetat i el cru resultant es redissol amb 25 ml d'AcOEt i de H<sub>2</sub>O. Es decanta la fase aquosa, es renta amb AcOEt (3 x 25 ml) i es liofilitza.

El cru liofilitzat es redissol amb 2 ml de MeOH de qualitat HPLC, s'addicionen 180 µl (0.183 mmol, 5 eq) d'una solució 1 M de MeONa en MeOH i es deixa reaccionar en atmosfera d'argó i a temperatura ambient. Transcorregudes 2 hores, s'evapora el dissolvent fins a sequetat i el cru s'analitza per espectrometria de masses. Atès que s'obté un cru força net que correspon majoritàriament al monòmer del producte desitjat, es quantifica mitjançant el test d'Ellmann (apartat 4.1 de Materials i Mètodes) per obtenir 8.2 mg de **43** (rdt: 52%).

#### Caracterització:



**EM** (ESI-alta resolució, mode positiu):  $m/z$  439.2610 [M+H]<sup>+</sup>  
(massa teòrica esperada, M: 438.2512).

## 2 Síntesi d'RNA

### 2.1 Síntesi dels oligoribonucleòtids wt, +3, +14 i +16

La descripció de la metodologia experimental utilitzada s'exposa a Materials i Mètodes (apartat 3.2). A la **Taula 23** s'indiquen les seqüències dels RNAs sintetitzats.

<b>wt</b>	5' rG*C*GGCAGUGUGAGUACCUUCACACGUCC*C*
<b>+3</b>	5' rG*C*GGCAGUGUAAGUACCUUCACACGUCC*C*
<b>+14</b>	5' rG*C*GGCAGUGUGAGUACCUUCAUACGUCC*C*
<b>+16</b>	5' rG*C*GGCAGUGUGAGUACCUUCACAUGUCC*C*

**Taula 23.** Seqüències dels oligoribonucleòtids 29 mer wt, +3, +14 i +16 sintetitzats. (els nucleòtids marcats amb \* tenen l'OH de la posició 2' substituït pel grup OMe).

En tots els casos s'ha seguit una estratègia Tritel-ON (apartat 3.2.3.1 Materials i Mètodes) per a la purificació dels RNAs després de les etapes de desprotecció i desancoratge. A la **Taula 24** s'indiquen els valors de  $t_R$  dels DMT-RNAs purificats.

<b>Tritel-ON RNA</b>	<b><math>t_R</math> (min)</b>
wt	27.1
+3	27.8
+14	27.9
+16	28.2

**Taula 24.** Temps de retenció ( $t_R$ ) dels DMT-ON oligoribonucleòtids 29 mer wt, +3, +14 i +16 obtinguts. Els valors de  $t_R$  corresponen a l'anàlisi per HPLC semipreparatiu en fase invertida (Jupiter 10  $\mu$ m C<sub>18</sub> 300 Å 250 x 10 mm), 20-80% B en 30 min (A: 0.1M TEEA/H<sub>2</sub>O i B: 0.1M TEAA/H<sub>2</sub>O/ACN 1:1).

Un cop eliminat el grup DMT, es realitza una segona purificació per HPLC semipreparatiu en fase invertida (Jupiter 10  $\mu$ m C<sub>18</sub> 300 Å 250 x 10 mm), 5-60% B en 30 min (A: 0.1M TEEA/H<sub>2</sub>O i B: 0.1M TEAA/H<sub>2</sub>O/ACN 1:1), els resultats de la qual s'exposen a la **Taula 25**:

<b>RNA</b>	<b><math>t_R</math> (min)</b>	<b><math>m/z</math> [M-H]<sup>-</sup></b>	<b>M teòrica calculada</b>	<b>rdt</b>
wt	13.9	9288.5	9290.6	14%
+3	13.5	9273.2	9274.6	14%
+14	13.6	9289.2	9291.6	2%
+16	14.0	9288.2	9291.6	4%

**Taula 25.** Caracterització dels oligoribonucleòtids 29 mer wt, +3, +14 i +16 purs. Els valors de  $t_R$  corresponen a l'anàlisi per HPLC analític en fase invertida (Kromasil 100-10C<sub>18</sub> 250 x 4.0 mm), 5-60% B en 30 min (A: 0.05M TEEA/H<sub>2</sub>O i B: 0.05M TEAA/H<sub>2</sub>O/ACN, 1:1).

## 2.2 Síntesi de l'oligoribonucleòtid wt biotinitat

La síntesi de l'oligoribonucleòtid wt biotinitat es realitza a partir de la derivatització de l'hidroxil de la posició 5' de la ribosa de l'últim nucleòtid de la seqüència nativa mitjançant l'acoblament, en condicions anhidres i amb tetrazole com agent activant, del derivat fosforamidit de biotina comercial.

En un vial, prèviament assecat al buit i en atmosfera d'argó, es dissolen 41.7 mg (50  $\mu\text{mol}$ , 50 eq) de [1-*N*-(4,4'-dimetoxitritil)-biotinil-6-aminoetoxietil]-2-[cianoetil-(*N,N*-diisopropil)]-fosforamidit en 200  $\mu\text{l}$  (200  $\mu\text{mol}$ , 200 eq) d'una solució 0.45 M de tetrazole en ACN anh. A continuació, s'introdueix la mescla de reacció resultant sobre la columna que conté 1  $\mu\text{mol}$  d'oligoribonucleotidil-resina amb el grup hidroxil 5' prèviament desprotegit, mitjançant tractament de 2% de TCA en DCM anh, i es deixa reaccionar durant 3 min, procurant que la resina en tot moment quedi en contacte amb la solució. Seguidament, per filtració al buit, s'elimina l'excés de reactius i es fan rentats amb ACN qualitat HPLC. Un cop acoblat el fosforamidit, el següent pas consisteix en l'oxidació de l'enllaç fosfit triéster a fosfat triéster mitjançant l'addició de 400  $\mu\text{l}$  d'una solució oxidant comercial (0.02 M de  $\text{I}_2$  en THF/piridina/ $\text{H}_2\text{O}$ ). Després de 3 min de reacció, es filtra al buit i es fan rentats amb ACN qualitat HPLC. Finalment, s'elimina el grup tritil de la funció amino de la biotina amb el tractament de 400  $\mu\text{l}$  d'una solució de TCA al 3% en DCM. Passats 3 min de reacció, s'elimina per filtració al buit la solució de desprotecció, i es renta l'oligoribonucleotidil-resina amb ACN qualitat HPLC, es recullen en un baló les solucions dels rentats i s'evaporen fins a sequetat.

L'eficàcia de l'acoblament de la biotina sobre la cadena oligonucleotídica es determina a partir dels cations 4,4'-dimetoxitritil, alliberats a l'etapa de desprotecció. En un matràs aforat de 50 ml es redissol el cru amb una mescla  $\text{HClO}_4/\text{EtOH}$  3:2 (v/v). Atès que els cations 4,4'-dimetoxitritil presenten un màxim d'absorció a 498 nm ( $\epsilon_{498 \text{ nm}}=71700 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), a partir de l'absorbància de la solució a aquesta longitud d'ona s'ha pogut determinar que el rendiment de l'acoblament ha estat del 25%.

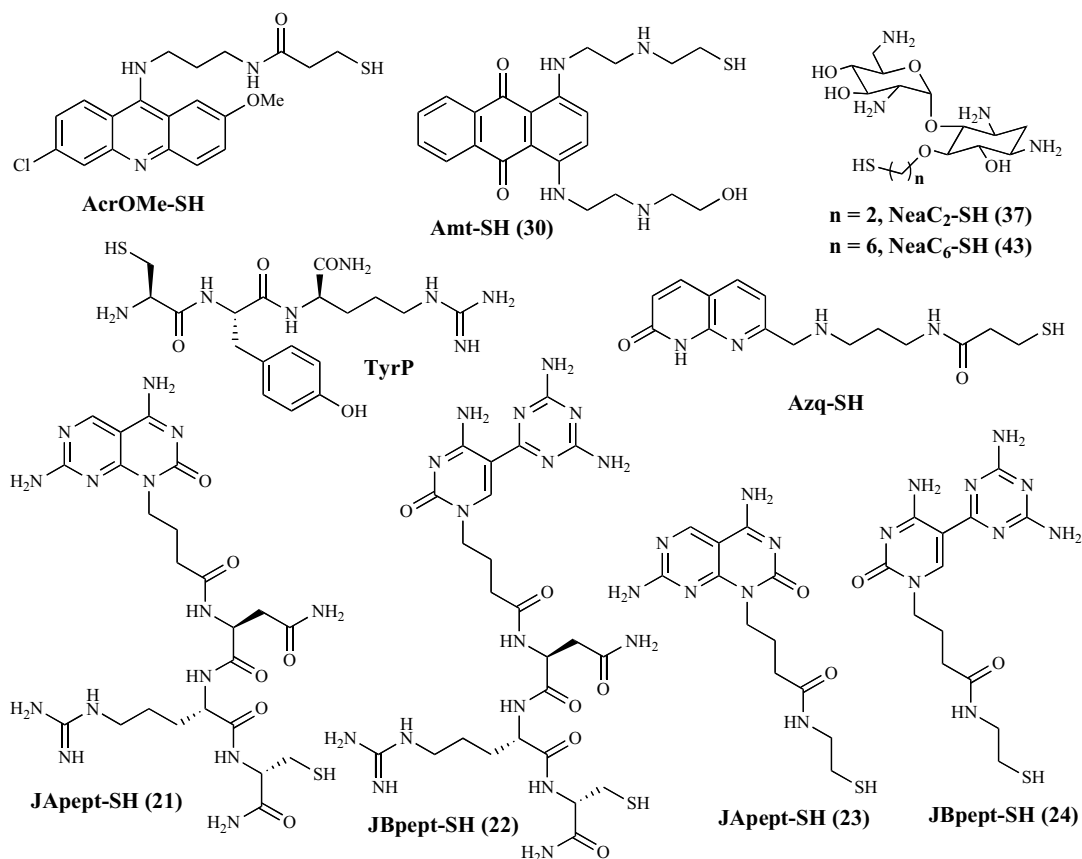
Un cop obtingut el biotinil-oligoribonucleotidil-resina desitjat, es desancora la resina, s'eliminen tots els grups protectors i es purifica per HPLC en fase invertida amb una columna analítica Nucleosil 120  $\text{C}_{18}$  5  $\mu\text{m}$  250 x 4 mm, emprant un gradient de 5-60% de B en 30 min (A: 0.1 M TEAA/ $\text{H}_2\text{O}$  i B:  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$  1:1).

rdt	$t_R$ (min)	$m/z$ [M-H] <sup>-</sup>	M teòrica calculada
10.9%	17.2	9684.5	9686.0
5' biotina-rG*C*GGCAGUGUGAGUACCUUCACACGUCC*C*			

**Taula 26.** Caracterització de la seqüència del 5'-biotinil-oligonucleòtid 29 mer wt (els nucleòtids marcats amb \* tenen l'OH de la posició 2' substituït pel grup OMe).

### 3 Experiments de química combinatòria dinàmica (DCC)

La metodologia emprada per a la realització dels experiments de química combinatòria dinàmica es descriu a l'apartat 4 de Materials i Mètodes. Als següents apartats, s'exposen els resultats dels diferents experiments realitzats. A la **Figura 154** es mostren les estructures de tots els monòmers tiol utilitzats.



**Figura 154.** Monòmers tiol utilitzats en els experiments de química combinatòria dinàmica.

#### 3.1 Experiment de DCC en presència de dos compostos intercalants: competició Ametantrona vs Acridina

En aquest experiment s'han emprat els monòmers tiol Amt (**30**), AcrOMe, TyrP, NeaC<sub>2</sub> (**37**), NeaC<sub>6</sub> (**43**) i Azq.

L'anàlisi de les diferents alíquotes (6 h, 24 h i 48 h) s'ha realitzat per HPLC-MS en fase invertida (Kinetex 2.6 μm C<sub>18</sub> 100 Å 100 x 4.6 mm), utilitzant el mateix gradient esglaonat (0-12% B en 5 min, 12-23% B en 10 min, 23-35% B en 10 min i 35-80% B en 10 min) amb dos tipus diferents d'eluent. En primer lloc, s'ha utilitzat àcid fòrmic com additiu (A: 0.1% HCOOH/H<sub>2</sub>O i B: 0.1% HCOOH/ACN) i, en segon lloc, s'ha afegit també TFA (A: 0.01% TFA + 0.1% HCOOH/H<sub>2</sub>O i B: 0.01% TFA + 0.1% HCOOH/ACN). En ambdós casos, s'ha treballat a un flux constant de 0.2 ml/min, fent la detecció a 260 nm.

A continuació, es recullen les dades de caracterització, obtingudes per espectrometria de masses, de tots els compostos identificats en aquest experiment (**Taula 27**):

compostos identificats	EM (ESI) $m/z$ [M+H] <sup>+</sup>	M teòrica calculada	t <sub>R</sub> (min)
AcrOMe-AcrOMe	805.08	804.21	41.6
AcrOMe-Azq	722.08	721.23	36.1
AcrOMe-Amt	830.22	829.29	33.6
AcrOMe-TyrP	421.27*	840.30	30.4
AcrOMe-NeaC <sub>6</sub>	840.17	839.35	29.2
Amt-Azq	747.20	746.30	28.2
Amt-Amt	855.26	854.36	26.7
AcrOMe-NeaC <sub>2</sub>	784.02	783.29	25.2
Amt-TyrP	866.20	865.37	24.8
Amt-NeaC <sub>6</sub>	865.25	864.42	23.4
Azq-Azq	639.10	638.25	21.6
Azq-TyrP	758.21	757.32	20.4
Amt-NeaC <sub>2</sub>	809.27	808.36	20.2
Azq-NeaC <sub>6</sub>	757.16	756.37	19.2
Azq-NeaC <sub>2</sub>	700.98	700.30	7.1

**Taula 27.** Resum de les dades de caracterització per espectrometria de masses dels compostos identificats a l'experiment de DCC. Els t<sub>R</sub> indicats corresponen a l'anàlisi realitzat amb la mescla d'eluent A: 0.1% HCOOH/H<sub>2</sub>O i B: 0.1% HCOOH/ACN. \* Correspon a [M+2H]<sup>2+</sup>.

### 3.2 Experiment de DCC amb els monòmers Janus i Neamina

En aquest experiment s'han emprat els monòmers tiol JApept (**21**), JBpept (**22**), JA (**23**), JB (**24**), NeaC<sub>2</sub> (**37**) i NeaC<sub>6</sub> (**43**).

L'anàlisi de les diferents alíquotes (6 h, 24 h i 48 h) s'ha realitzat per HPLC-MS en fase invertida (Kinetex 2.6 μm C<sub>18</sub> 100 Å 100 x 4.6 mm), utilitzant el mateix gradient esglaonat (0-12% B en 20 min, 12-15% B en 20 min, 15-18% B en 15 min i 18-23% B en 10 min i 23-100% B en 5 min) amb dos tipus diferents d'eluent. En primer lloc, s'ha utilitzat àcid fòrmic com additiu (A: 0.1% HCOOH/H<sub>2</sub>O i B: 0.1% HCOOH/ACN) i, en segon lloc, s'ha afegit també TFA (A: 0.01% TFA + 0.1% HCOOH/H<sub>2</sub>O i B: 0.01% TFA + 0.1% HCOOH/ACN). En ambdós casos, s'ha treballat a un flux constant de 0.2 ml/min, fent la detecció a 260 nm.

A continuació, es recullen les dades de caracterització, obtingudes per espectrometria de masses, de tots els compostos identificats en aquest experiment (**Taula 28**):

compostos identificats	EM (ESI) $m/z$ [M+H] <sup>+</sup>	M teòrica calculada	t <sub>R</sub> (min)
JB-JB	729.22	728.26	36.1
JB-JA	687.06	686.24	35.2
JA-JA	645.03	644.22	34.3
JB-JBpept	1042.25	1041.41	31.5
JB-SH	365.97	365.14	30.9
JA-JBpept + JApept-JB	1000.24	999.39	30.5
JA-JApept	958.21	957.37	29.5
JA-SH	323.96	323.12	29.0
JBpept-JBpept	678.34*	1354.56	27.9
JApept-JBpept	657.41*	1312.54	27.0
JB-NeaC <sub>6</sub>	802.19	801.37	26.6
JApept-JApept	636.30*	1270.52	25.8
JBpept-SH	679.11	678.28	25.8
JA-NeaC <sub>6</sub>	760.27	759.35	25.0
JApept-SH	637.10	636.27	23.9
JBpept-NeaC <sub>6</sub>	558.39*	1114.52	23.3
JApept-NeaC <sub>6</sub>	537.34*	1072.50	21.8
JB-NeaC <sub>2</sub>	746.26	745.31	19.1
JBpept-NeaC <sub>2</sub>	1059.27	1058.46	17.9
JA-NeaC <sub>2</sub>	704.43	703.29	12.9
JApept-NeaC <sub>2</sub>	1017.22	1016.44	9.7

**Taula 28.** Resum de les dades de caracterització per espectrometria de masses dels compostos identificats a l'experiment de DCC. Els t<sub>R</sub> indicats corresponen a l'anàlisi realitzat amb la mescla d'eluent A: 0.01% + 0.1% HCOOH/H<sub>2</sub>O i B: 0.01% + 0.1% HCOOH/ACN. \* Correspon a [M+2H]<sup>2+</sup>.

### 3.3 Experiment de DCC amb els monòmers Janus, Ametantrona i Azaquinolona

En aquest experiment s'han emprat els monòmers tiol heteroaromàtics Amt (**30**), Azq, JApept (**21**), JBpept (**22**), JA (**23**), i JB (**24**).

L'anàlisi de les diferents alíquotes (6 h, 24 h i 48 h) s'ha realitzat per HPLC-MS en fase invertida (Kinetex 2.6 μm C<sub>18</sub> 100 Å 100 x 4.6 mm), utilitzant el mateix gradient esglaonat (0-12% B en 15 min, 12-18% B en 25 min, 18-23% B en 10 min i 23-100% B en 5 min) amb dos tipus diferents d'eluent. En primer lloc, s'ha utilitzat àcid fòrmic com additiu (A: 0.1% HCOOH/H<sub>2</sub>O i B: 0.1% HCOOH/ACN) i, en segon lloc, s'ha afegit TFA (A: 0.01% TFA + 0.1% HCOOH/H<sub>2</sub>O i B: 0.01% TFA + 0.1% HCOOH/ACN). En ambdós casos, s'ha treballat a un flux constant de 0.2 ml/min, fent la detecció a 260 nm.

A continuació, a la **Taula 29** s'indiquen les dades de caracterització, obtingudes per espectrometria de masses, de tots els compostos identificats en aquest experiment:

compostos identificats	EM (ESI) $m/z$ [M+H] <sup>+</sup>	M teòrica calculada	t <sub>R</sub> (min)
Amt-Azq	747.19	746.30	40.3
Amt-Amt	855.23	854.36	39.1
Amt-JA	750.17	749.29	38.3
Amt-JB	792.21	791.31	37.2
JB-JB	729.13	728.26	32.9
JB-JA	687.11	686.24	31.4
JA-JA	645.08	644.22	30.0
JB-Azq	684.13	683.25	30.0
JA-Azq	642.10	641.23	28.9
Azq-Azq	639.08	638.25	28.4
Amt-JApept	1063.33	1062.44	27.9
Amt-JBpept	1105.34	1104.46	26.9
JB-JBpept	1042.29	1041.41	25.6
JA-JBpept + JApept-JB	1000.27	999.39	24.7
JA-JApept	958.25	957.37	24.0
Azq-JBpept	997.31	996.40	24.0
Azq-JApept	955.32	954.38	23.2
JBpept-JBpept	678.37*	1354.56	22.8
JApept-JBpept	657.39*	1312.54	22.0
JApept-JApept	636.37*	1270.52	21.2

**Taula 29.** Resum de les dades de caracterització per espectrometria de masses dels compostos identificats a l'experiment de DCC. Els t<sub>R</sub> indicats corresponen a l'anàlisi realitzat amb la mescla d'eluent A: 0.01% + 0.1% HCOOH/H<sub>2</sub>O i B: 0.01% + 0.1% HCOOH/ACN. \* Correspon a [M+2H]<sup>2+</sup>.

### 3.4 Experiment de DCC amb els monòmers Janus, Ametantrona i Neamina

En aquest experiment s'han emprat els monòmers tiol Amt (**30**), NeaC<sub>2</sub> (**37**), NeaC<sub>6</sub> (**43**), JApept (**21**), JBpept (**22**), JA (**23**), i JB (**24**).

L'anàlisi de les diferents alíquotes (6 h, 24 h i 48 h) s'ha realitzat per HPLC-MS en fase invertida (Kinetex 2.6 μm C<sub>18</sub> 100 Å 100 x 4.6 mm), utilitzant el mateix gradient esglaonat (0-12% B en 20 min, 12-15% B en 20 min, 15-18% B en 15 min, 18-23% B en 10 min i 23-100% B en 5 min), amb dos tipus diferents d'eluent. En primer lloc, s'ha utilitzat àcid fòrmic com additiu (A: 0.1% HCOOH/H<sub>2</sub>O i B: 0.1% HCOOH/ACN) i, en segon lloc, s'ha afegit TFA (A: 0.01% TFA + 0.1% HCOOH/H<sub>2</sub>O i B: 0.01% TFA + 0.1% HCOOH/ACN). En ambdós casos, s'ha treballat a un flux constant de 0.2 ml/min, fent la detecció a 260 nm.

A continuació, a la **Taula 30** es mostren les dades de la caracterització, obtingudes per espectrometria de masses, de tots els compostos identificats en aquest experiment:

compostos identificats	EM (ESI) $m/z$ [M+H] <sup>+</sup>	M teòrica calculada	t <sub>R</sub> (min)
Amt-Amt	855.19	854.36	47.2
Amt-JA	750.13	749.29	45.3
Amt-JB	792.17	791.31	43.8
JB-JB	729.11	728.26	38.1
Amt-NeaC <sub>6</sub>	865.19	864.42	36.5
JA-JB	687.07	686.24	36.2
JA-JA	645.08	644.22	34.8
Amt-JApept	1063.30	1062.44	32.4
Amt-JBpept	1105.20	1104.46	31.2
JB-JBpept	1042.31	1041.41	29.8
Amt-NeaC <sub>2</sub>	809.23	808.36	28.8
JA-JBpept + JApept-JB	1000.28	999.39	28.8
JB-NeaC <sub>6</sub>	802.20	801.37	28.0
JA-JApept	958.23	957.37	27.8
JA-NeaC <sub>6</sub>	760.29	759.35	26.7
JBpept-JBpept	678.33*	1354.56	26.3
JApept-JBpept	657.34*	1312.54	25.2
JApept-JApept	636.31*	1270.52	24.2
JBpept-NeaC <sub>6</sub>	1115.25	1114.52	23.6
JApept-NeaC <sub>6</sub>	1073.74	1072.50	22.2
JB-NeaC <sub>2</sub>	746.06	745.31	18.8
JBpept-NeaC <sub>2</sub>	1059.10	1058.46	16.7
JA-NeaC <sub>2</sub>	704.08	703.29	15.9
JApept-NeaC <sub>2</sub>	1017.22	1016.44	12.9

**Taula 30.** Resum de les dades de caracterització per espectrometria de masses dels compostos identificats a l'experiment de DCC. Els t<sub>R</sub> indicats corresponen a l'anàlisi realitzat amb la mescla d'eluent A: 0.01% + 0.1% HCOOH/H<sub>2</sub>O i B: 0.01% + 0.1% HCOOH/ACN. \* Correspon a [M+2H]<sup>2+</sup>.



## 4 Síntesi de lligands d'RNA

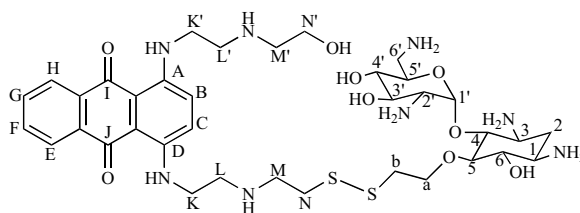
### 4.1 Síntesi dels lligands seleccionats mitjançant DCC

#### 4.1.1 Síntesi de lligands Ametantrona-Neamina

##### Amt-NeaC<sub>2</sub> (44)

En atmosfera d'argó, es fan reaccionar 1.7 μmol de NeaC<sub>2</sub>-SH (**37**) i 6.7 mg (21.6 μmol, 12.5 eq) de 2,2'-ditiobis(5-nitropiridina) en un volum total de 3 ml d'una mescla 0.1% TFA/H<sub>2</sub>O/THF 1:2 (v/v) durant 18 hores. A continuació, s'evapora el THF al rotavapor i es fan rentats amb Et<sub>2</sub>O (5 x 5 ml), per tal d'extreure l'excés de 2,2'-ditiobis(5-nitropiridina). Seguidament, mantenint l'atmosfera d'argó, la solució aquosa resultant s'addiciona sobre una solució de 3 ml del monòmer derivat de l'ametantrona (**30**) en 0.1% TFA/H<sub>2</sub>O, i es deixa reaccionar a temperatura ambient i en agitació constant. Transcorregudes 20 hores de reacció, l'anàlisi per HPLC en fase invertida\* mostra la presència en el cru del pic corresponent al producte desitjat (30%), que es purifica per HPLC semipreparatiu\*\* per obtenir el producte desitjat **44** amb un rendiment del 56%.

##### Caracterització:



<sup>1</sup>H-RMN (600 MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm): 8.25 (2H, H<sub>G</sub>, H<sub>F</sub>, m), 7.81 (2H, H<sub>E</sub>, H<sub>H</sub>, m), 7.49 (2H, H<sub>B</sub>, H<sub>C</sub>, s), 5.46 (1H, H<sub>1'</sub>, m), 4.02 (1H, H<sub>a</sub>, m), 3.86 (5H, H<sub>N'</sub>, H<sub>5'</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>a'</sub>, m), 3.80 (4H, H<sub>K</sub>, H<sub>K'</sub>, m), 3.72 (1H, H<sub>3'</sub>, m), 3.51 (2H, H<sub>6'</sub>, m), 3.38 (6H, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>M'</sub>, H<sub>M</sub>, m), 3.33 (1H, H<sub>4'</sub>, m), 3.21 (4H, H<sub>L</sub>, H<sub>L'</sub>, m), 3.09 (2H, H<sub>1</sub>, H<sub>3</sub>, m), 3.02 (1H, H<sub>2'</sub>, m), 3.00 (2H, H<sub>N</sub>, m), 2.82 (2H, H<sub>b</sub>, m), 2.15 (1H, H<sub>2,eq</sub>, m), 1.48 (1H, H<sub>2,ax</sub>, m).

HPLC (0 a 35% B en 30 min): t<sub>R</sub> = 21.6 min.

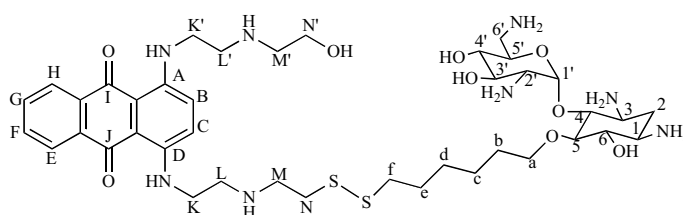
EM (ESI-alta resolució, mode positiu): m/z 809.3671 [M+H]<sup>+</sup>, m/z 831.3497 [M+Na]<sup>+</sup> (massa teòrica esperada, M: 808.3612).

\* S'ha emprat una columna analítica, Jupiter 4 μm proteo C<sub>18</sub> 90 Å 250 x 4.6 mm i un gradient de 0-35% de B en 30 min (A: 0.045% TFA/H<sub>2</sub>O B: 0.036% TFA/ACN, detecció a 220 i 260 nm).

\*\* S'ha emprat una columna semipreparativa, Jupiter 10 μm proteo C<sub>18</sub> 90 Å 250 x 10 mm, un gradient de 0-35% de B en 30 min (A: 0.1% TFA/H<sub>2</sub>O, B: 0.1% TFA/ACN, detecció 220 i 260 nm) i un flux constant de 3 ml/min.

**Amt-NeaC<sub>6</sub> (45)**

Es fan reaccionar durant 20 h, aproximadament, 3  $\mu\text{mol}$  de monòmer NeaC<sub>6</sub>-SH (**43**) amb 11.6 mg (37.5  $\mu\text{mol}$ , 12.5 eq) de 2,2'-ditiobis(5-nitropiridina) en un volum total de 3 ml d'una mescla 0.1% TFA/H<sub>2</sub>O/THF 1:2 (v/v). Un cop activat el grup tiol, després de les extraccions corresponents per eliminar l'excés de 2,2'-ditiobis(5-nitropiridina), la barreja de reacció s'addiciona sobre una solució d'1.7  $\mu\text{mol}$  del monòmer derivat de l'ametrantrona (**30**) en 3 ml de 0.1% TFA/H<sub>2</sub>O, i es deixa reaccionar tota la nit en atmosfera d'argó i en agitació constant. En les mateixes condicions emprades per **44**, s'analitza el cru de reacció, on es detecta el producte desitjat en un 31%, i es purifica per obtenir el producte desitjat **45** amb un rendiment del 33%.

Caracterització

<sup>1</sup>H-RMN (600 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  (ppm): 8.32 (2H, H<sub>G</sub>, H<sub>F</sub>, m), 7.87 (2H, H<sub>E</sub>, H<sub>H</sub>, m), 7.57 (2H, H<sub>B</sub>, H<sub>C</sub>, m), 5.42 (1H, H<sub>1</sub>, d,  $J = 3.7$  Hz), 3.95 (3H, H<sub>5</sub>, H<sub>N</sub>, m), 3.85 (4H, H<sub>K</sub>, H<sub>K'</sub>, m), 3.78 (1H, H<sub>a</sub>, m), 3.66 (1H, H<sub>3</sub>), 3.59 (1H, H<sub>a'</sub>, m), 3.50 (1H, H<sub>6</sub>), 3.45 (3H, H<sub>M</sub>, H<sub>4</sub>), 3.39 (4H, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>4'</sub>, m), 3.24 (4H, H<sub>L</sub>, H<sub>L'</sub>, m), 3.18 (2H, H<sub>M'</sub>, m), 2.99 (2H, H<sub>1</sub>, H<sub>3</sub>, m), 2.87 (3H, H<sub>2</sub>, H<sub>N</sub>, m), 2.50 (2H, H<sub>f</sub>, t,  $J = 7.1$  Hz), 2.16 (1H, H<sub>2,eq</sub>, m), 1.43 (5H, H<sub>b</sub>, H<sub>e</sub>, H<sub>2,ax</sub>, m), 1.10 (4H, H<sub>c</sub>, H<sub>d</sub>).

HPLC (0 a 35% B en 30 min):  $t_R = 23.8$  min.

EM (ESI-alta resolució, mode positiu):  $m/z$  865.4324 [M+H]<sup>+</sup> (massa teòrica esperada, M: 864.4238).

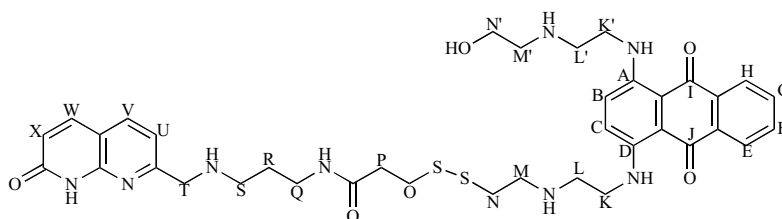
**4.1.2 Síntesi del lligand Ametantrona-Azaquinolona****Amt-Azq (46)**

En atmosfera d'argó, es dissolen en un vial 2.4 mg (7.5  $\mu\text{mol}$ , 5 eq) de 2,2'-ditiobis(5-nitropiridina) en 2 ml d'una mescla 1:1 (v/v) d'AcONH<sub>4</sub> 1 M a pH 3.5 i THF. Seguidament, s'addicionen 1.5  $\mu\text{mol}$  del monòmer tiol azaquinolona, dissolt en 2 ml de la mateixa mescla 1:1 (v/v) d'AcONH<sub>4</sub> 1 M a pH 3.5 i THF. S'observa ràpidament la formació d'una coloració groga. Transcorregudes 5 h, s'evapora el THF fins a sequetat i es fan rentats amb Et<sub>2</sub>O (5 x 5 ml) per extreure l'excés de reactiu 2,2'-ditiobis(5-nitropiridina). La fase aquosa resultant, que conté el tiol activat, es liofilitza.

A la següent etapa, en atmosfera d'argó, es fan reaccionar durant 2-3 hores, 3  $\mu\text{mol}$  del monòmer derivat de l'ametrantrona (**30**), prèviament dissolt en 2 ml de 0.1 % TFA/H<sub>2</sub>O, amb el tiol activat anterior, redissolt en 3 ml d'AcONH<sub>4</sub> 1 M a pH 3.8. En analitzar el cru de reacció per HPLC en les mateixes condicions que **44**, però amb un gradient de 0-50% de B en 30 min, es detecta la presència del producte desitjat amb un percentatge del 54%. La purificació del cru de síntesi resultant es realitza per HPLC semipreparatiu

en fase invertida en la mateixa columna que **44**, amb un gradient de 0-40% de B en 30 min (un flux constant de 3 ml/min), i una mescla d'eluent amb àcid fòrmic com additiu (A: 0.1% HCOOH/H<sub>2</sub>O B: 0.1% HCOOH/ACN). Després de la purificació, s'obté **46** amb un rendiment del 48%.

#### Caracterització:



<sup>1</sup>H-RMN (600 MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm): 7.98 (1H, H<sub>F</sub>/H<sub>G</sub>, m), 7.94 (1H, H<sub>G</sub>/H<sub>F</sub>, m), 7.75 (2H, H<sub>E</sub>, H<sub>H</sub>, m), 7.56 (2H, H<sub>W</sub>, H<sub>V</sub>, m), 7.22 (2H, H<sub>B</sub>, H<sub>C</sub>), 6.79 (1H, H<sub>U</sub>, d, *J*=8.0 Hz), 6.38 (1H, H<sub>X</sub>, d, *J*=9.5 Hz), 3.86 (4H, H<sub>N'</sub>, H<sub>T</sub>, m), 3.76 (2H, H<sub>K</sub>/H<sub>K'</sub>, m), 3.64 (2H, H<sub>K</sub>/H<sub>K'</sub>, m), 3.31 (4H, H<sub>L</sub>/H<sub>L'</sub>, H<sub>O</sub>, m), 3.19 (4H, H<sub>L</sub>/H<sub>L'</sub>, H<sub>M</sub>, m), 3.12 (2H, H<sub>M'</sub>, m), 3.00 (4H, H<sub>O</sub>, H<sub>N</sub>, m), 2.93 (2H, H<sub>S</sub>, m), 2.68 (2H, H<sub>P</sub>, m), 1.86 (2H, H<sub>R</sub>, m).

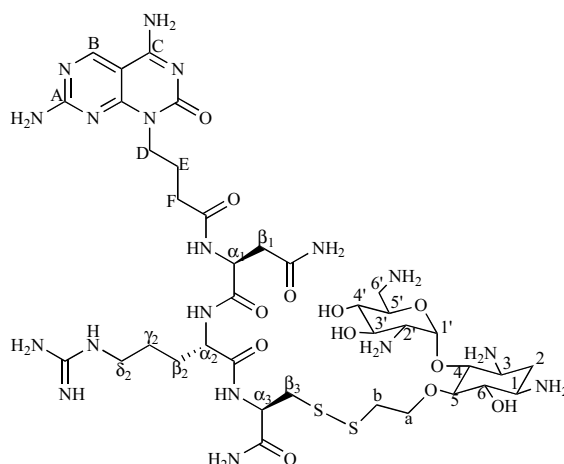
HPLC (0 a 50% B en 30 min): t<sub>R</sub> = 21.2 min.

EM (ESI-alta resolució, mode positiu): *m/z* 747.3119 [M+H]<sup>+</sup>, *m/z* 769.2945 [M+Na]<sup>+</sup> (massa teòrica esperada, M: 746.3033).

### 4.1.3 Síntesi de lligands Janus-Neamina

#### JApept-NeaC<sub>2</sub> (**47**)

En un vial, es dissolen 18.6 mg (60 μmol, 10 eq) de 2,2'-ditiobis(5-nitropiridina) en 2 ml d'una mescla 1:1 (v/v) d'AcONH<sub>4</sub> 1 M a pH 3.5 i THF. Seguidament, s'addicionen 6 μmol del monòmer JApept-SH **21** dissolts en 2 ml de la mateixa barreja de dissolvent, i es deixa reaccionar tota la nit en atmosfera d'argó i en agitació constant. Transcorregut el temps de reacció, s'elimina el THF al rotavapor i es fan rentats amb Et<sub>2</sub>O (5 x 5 ml) per extreure l'excés de 2,2'-ditiobis(5-nitropiridina). La fase aquosa resultant es liofilitza i, a continuació, es fa reaccionar el tiol activat amb 6 μmol (1 eq) del monòmer NeaC<sub>2</sub>-SH (**37**), dissolt en 4 ml d'AcONH<sub>4</sub> 1 M a pH 3.5, durant 8 h. En les mateixes condicions emprades per **44**, s'analitza el cru per HPLC, on es detecta la presència del producte desitjat (32%), que es purifica per HPLC semipreparatiu, per obtenir el producte **47** desitjat amb un rendiment del 11%.

Caracterització:

$^1\text{H-RMN}$  (600 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  (ppm): 8.77 (1H,  $H_B$ , s), 5.81 (1H,  $H_{1'}$ , d,  $J = 3.8$  Hz), 4.61 (1H,  $H_{\alpha 3}$ , m), 4.56 (1H,  $H_{\alpha 1}$ , t,  $J = 7.0$  Hz), 4.29 (1H,  $H_{\alpha 2}$ , m), 4.18 (1H,  $H_a$ , m), 4.07 (2H,  $H_D$ , m), 3.92 (2H,  $H_{5'}$ ,  $H_{a'}$ , m), 3.68 (1H,  $H_6$ , m), 3.49 (2H,  $H_{6'}$ , m), 3.41 (3H,  $H_4$ ,  $H_{4'}$ ,  $H_{3'}$ , m), 3.29 (2H,  $H_2$ ,  $H_5$ , m), 3.17 (1H,  $H_{\beta 3'}$ , m), 3.06 (2H,  $H_{\delta 2}$ , m), 2.91 (3H,  $H_b$ ,  $H_{\beta 3}$ , m), 2.77 (1H,  $H_{\beta 1}$ , m), 2.67 (1H,  $H_{\beta 1'}$ , m), 2.38 (2H,  $H_1$ ,  $H_3$ , m), 2.33 (2H,  $H_F$ , m), 1.91 (2H,  $H_E$ , m), 1.88 (1H,  $H_{\beta 2}$ , m), 1.73 (2H,  $H_{\beta 2'}$ ,  $H_{2,eq}$ , m), 1.55 (3H,  $H_{\gamma 2}$ ,  $H_{2,ax}$ , m).

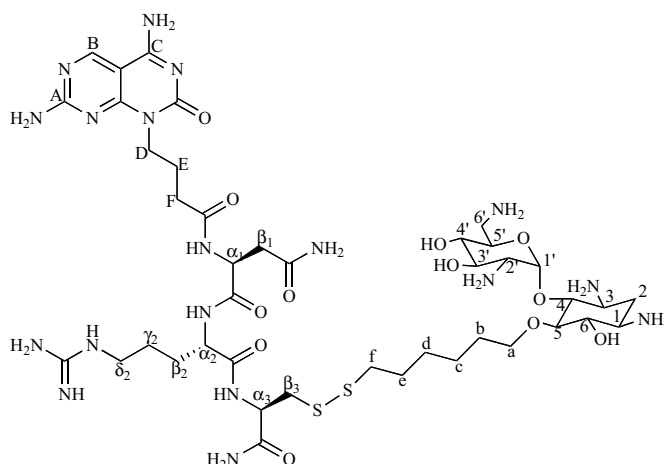
**HPLC** (0 a 35 % B en 30 min):  $t_R = 13.3$  min.

**EM** (ESI-alta resolució, mode positiu):  $m/z$  1017.4431  $[M+H]^+$  (massa teòrica esperada, M: 1016.4393).

**JApept-NeaC<sub>6</sub> (48)**

En atmosfera d'argó, es dissolen 2  $\mu\text{mol}$  del monòmer tiol NeaC<sub>6</sub>-SH (**43**) en 1 ml de 0.1% TFA/H<sub>2</sub>O i s'addicionen sobre una solució de 7.8 mg (25  $\mu\text{mol}$ , 12.5 eq) de 2,2'-ditiobis(5-nitropiridina) en 2 ml de THF, de manera que la mescla de reacció sigui H<sub>2</sub>O/THF 1:2 (v/v). Es deixa reaccionar durant tota una nit. Ràpidament s'observa l'aparició d'una coloració groga a causa de l'activació del grup tiol. Transcorregut el temps de reacció, s'evapora el THF i s'elimina l'excés de reactiu 2,2'-ditiobis(5-nitropiridina) mitjançant extraccions amb AcOEt (6 x 2 ml, o fins que la fase orgànica sigui incolora). La fase aquosa resultant, que conté el producte tiol activat, es liofilitza. Seguidament, es redissol el cru obtingut amb 1 ml de 0.1% TFA/H<sub>2</sub>O i s'addiciona, en atmosfera d'argó, sobre una solució de 1.5  $\mu\text{mol}$  (0.75 eq) del monòmer JApept-SH (**21**) en 0.1% TFA/H<sub>2</sub>O per obtenir un volum total de 2 ml. La mescla de reacció resultant es deixa reaccionar durant tota una nit a temperatura ambient i en agitació constant. L'anàlisi del cru resultant per HPLC-MS revela la presència del producte desitjat (19%), que es purifica d'igual manera que **44**, però amb un gradient de 0-35% de B en 35 min. Un cop ajuntades i liofilitzades les fraccions pures, s'obté **48** amb un rendiment del 33%.

Caracterització:



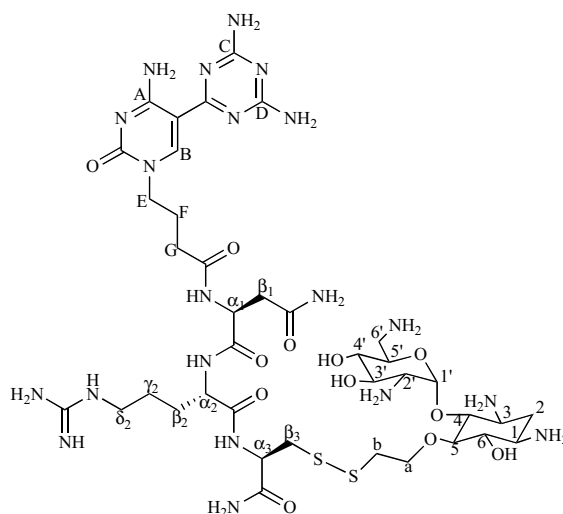
<sup>1</sup>H-RMN (600 MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm): 8.82 (1H, H<sub>B</sub>, s), 5.45 (1H, H<sub>1'</sub>, m), 4.63-4.61 (2H, H<sub>α1</sub>, H<sub>α3</sub>, m), 4.35 (1H, H<sub>α2</sub>, m), 4.17 (2H, H<sub>D</sub>, m), 3.99 (1H, H<sub>5'</sub>, m), 3.91 (1H, H<sub>a</sub>, m), 3.76 (1H, H<sub>a</sub>, m), 3.65 (1H, H<sub>6</sub>, m), 3.49 (2H, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, m), 3.40 (3H, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>, m), 3.19 (5H, H<sub>6'</sub>, H<sub>δ2</sub>, H<sub>β3</sub>, m), 2.94 (1H, H<sub>β3</sub>, m), 2.83 (1H, H<sub>β1</sub>, m), 2.78 (1H, H<sub>β1'</sub>, m), 2.67 (2H, H<sub>f</sub>, m), 2.40 (2H, H<sub>f</sub>, m), 2.16 (2H, H<sub>1</sub>, H<sub>3</sub>, m), 1.99 (2H, H<sub>E</sub>, m), 1.92 (1H, H<sub>β2'</sub>, m), 1.81 (1H, H<sub>β2</sub>, m), 1.61 (7H, H<sub>2,eq</sub>, H<sub>γ2</sub>, H<sub>b</sub>, H<sub>e</sub>, m), 1.33 (5H, H<sub>2,ax</sub>, H<sub>c</sub>, H<sub>d</sub>, m).

**HPLC** (0 a 35% B en 35 min): t<sub>R</sub> = 17.8 min.

**EM** (ESI-alta resolució, mode positiu): m/z 1073.5088 [M+H]<sup>+</sup> (massa teòrica esperada, M: 1072.5019).

**JBpept-NeaC<sub>2</sub> (49)**

La síntesi del compost **49** es duu a terme seguint el mateix procediment experimental emprat per **48**. Es parteix d'1 μmol de monòmer NeaC<sub>2</sub>-SH (**37**), s'activa el grup tiol i, a continuació, es fa reaccionar a temperatura ambient durant tota una nit i en atmosfera d'argó amb 1 μmol de monòmer JBpept-SH (**22**) dissolt en un volum total de 3 ml de 0.1% TFA/H<sub>2</sub>O. El producte desitjat (36%) es purifica per HPLC semipreparatiu en fase invertida en les mateixes condicions emprades per **47**, per obtenir **49** amb un rendiment del 53%.

Caracterització:

**<sup>1</sup>H-RMN** (600 MHz, *D*<sub>2</sub>O) δ (ppm): 8.70 (1H, H<sub>B</sub>, s), 5.70 (1H, H<sub>1'</sub>, m), 4.66 (1H, H<sub>α3</sub>, m), 4.60 (1H, H<sub>α1</sub>, t, *J* = 6.9 Hz), 4.34 (1H, H<sub>α2</sub>, m), 4.18 (1H, H<sub>a</sub>, m), 3.99 (2H, H<sub>5'</sub>, H<sub>a'</sub>, m), 3.94 (2H, H<sub>E</sub>, m), 3.65 (2H, H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub>, m), 3.46 (3H, H<sub>5</sub>, H<sub>3'</sub>, H<sub>4'</sub>, m), 3.25 (4H, H<sub>2'</sub>, H<sub>6'</sub>, H<sub>β3</sub>, m), 3.17 (2H, H<sub>δ2</sub>, t, *J* = 7.3 Hz), 2.99 (3H, H<sub>b</sub>, H<sub>β3'</sub>, m), 2.81 (1H, H<sub>β1'</sub>, m), 2.73 (1H, H<sub>β1</sub>, m), 2.41 (2H, H<sub>G</sub>, t, *J* = 7.2 Hz), 2.25 (2H, H<sub>1</sub>, H<sub>3</sub>, m), 2.07 (2H, H<sub>F</sub>, m), 1.91 (1H, H<sub>β2'</sub>, m), 1.79 (2H, H<sub>2,eq</sub>, H<sub>β2</sub>, m), 1.60 (3H, H<sub>2,ax</sub>, H<sub>γ2</sub>, m).

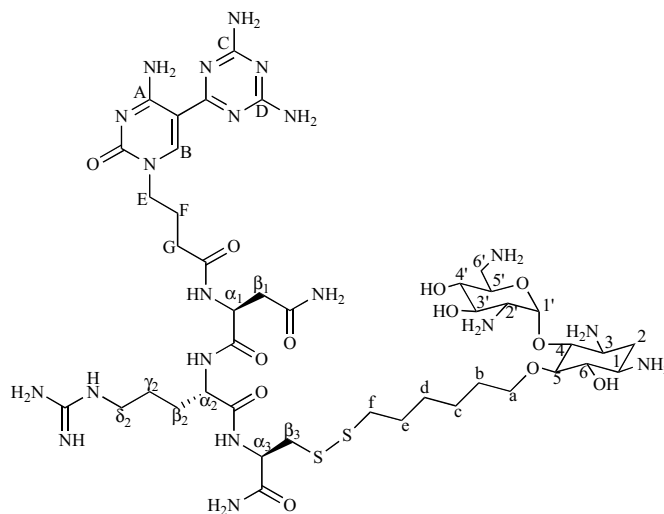
**HPLC** (0 a 35% B en 30 min): *t*<sub>R</sub> = 14.8 min.

**EM** (ESI-alta resolució, mode positiu): *m/z* 1059.4675 [M+H]<sup>+</sup> (massa teòrica esperada, M: 1058.4610).

**JBpept-NeaC<sub>6</sub> (50)**

A partir del mateix procediment experimental emprat per **48**, se sintetitza el producte **50** mitjançant l'activació del grup tiol de 2 μmol de monòmer NeaC<sub>6</sub>-SH (**43**), i la posterior reacció amb 2 μmol de monòmer JBpept-SH (**22**), durant tota una nit en atmosfera d'argó i en agitació constant.

La purificació del producte en el cru (21%) es realitza per HPLC semipreparatiu en les mateixes condicions emprades per **48**, per obtenir **50** amb un rendiment del 21%.

Caracterització:

$^1\text{H-RMN}$  (600 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  (ppm): 8.72 (1H,  $H_B$ , s), 5.67 (1H,  $H_{1'}$ , m), 4.61 (1H,  $H_{\alpha_3}$ , m), 4.58 (1H,  $H_{\alpha_1}$ , t,  $J = 6.9$  Hz), 4.34 (1H,  $H_{\alpha_2}$ , m), 3.96 (1H,  $H_a$ , m), 3.88 (3H,  $H_E$ ,  $H_{5'}$ , m), 3.75 (1H,  $H_a$ , m), 3.63 (2H,  $H_4$ ,  $H_6$ , m), 3.60 (1H,  $H_{3'}$ , m), 3.45 (3H,  $H_2$ ,  $H_4$ ,  $H_5$ , m), 3.25 (2H,  $H_6$ , m), 3.19 (3H,  $H_{\delta_2}$ ,  $H_{\beta_3}$ , m), 2.94 (1H,  $H_{\beta_3'}$ , m), 2.80 (1H,  $H_{\beta_1'}$ , m), 2.76 (1H,  $H_{\beta_1}$ , m), 2.67 (2H,  $H_f$ , m), 2.40 (2H,  $H_G$ , t,  $J = 7.4$  Hz), 2.27 (2H,  $H_1$ ,  $H_3$ , m), 2.06 (2H,  $H_F$ , m), 1.89 (1H,  $H_{\beta_2'}$ , m), 1.80 (1H,  $H_{\beta_2}$ , m), 1.60 (7H,  $H_b$ ,  $H_e$ ,  $H_{2,eq}$ ,  $H_{\gamma_2}$ , m), 1.32 (5H,  $H_{2,ax}$ ,  $H_c$ ,  $H_d$ , m).

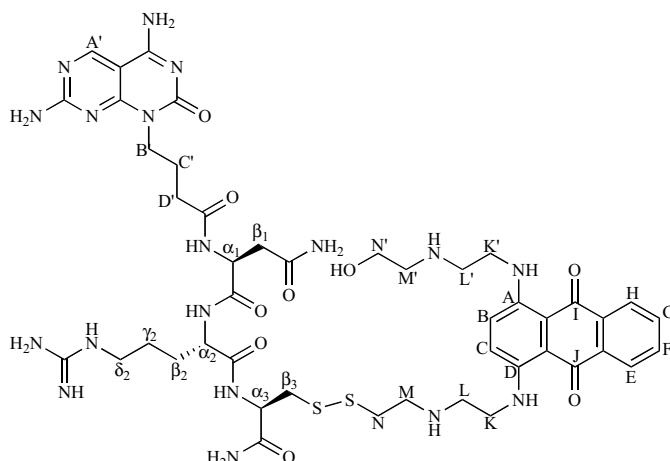
**HPLC** (0 a 35% B en 35 min):  $t_R = 18.5$  min.

**EM** (ESI-alta resolució, mode positiu):  $m/z$  1115.5302  $[M+H]^+$  (massa teòrica esperada, M: 1114.5236).

#### 4.1.4 Síntesi de lligands Ametantrona-Janus

##### Amt-JApept (51)

A la síntesi de **51**, s'activa la funció tiol del monòmer derivat de l'ametantrona (**30**) seguint el procediment experimental emprat per **48**. En atmosfera d'argó, es fan reaccionar durant tota una nit 4  $\mu\text{mol}$  de **30** amb 15.5 mg (50  $\mu\text{mol}$ , 12.5 eq) de 2,2'-ditiobis(5-nitropiridina) en un volum total de 18 ml d'una mescla 0.1% TFA en  $H_2O/THF$  1:2 (v/v). A continuació, després de les corresponents extraccions per eliminar l'excés de 2,2'-ditiobis(5-nitropiridina), s'addiciona la barreja de reacció sobre una solució de 2  $\mu\text{mol}$  de monòmer JApept-SH (**21**), en 10 ml de 0.1% TFA/ $H_2O$ , i es deixa reaccionar durant 2-3 hores, aproximadament. En analitzar el cru de reacció per HPLC en les mateixes condicions que **44**, es detecta la presència del producte desitjat amb un 27%. El cru es purifica per HPLC semipreparatiu en fase reversa utilitzant la mateixa columna emprada per **44**, però amb un gradient de 0-40% de B en 30 min i un flux constant de 5 ml/min. Finalment, s'obté **51** amb un rendiment del 26%.

Caracterització:

$^1\text{H-RMN}$  (600 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  (ppm): 7.91 (1H,  $H_{A'}$ , s), 7.78 (1H,  $H_G/H_F$ , m), 7.72 (1H,  $H_G/H_F$ , m), 7.62 (2H,  $H_H$ ,  $H_{C'}$ , m), 7.08 (2H,  $H_B$ ,  $H_C$ , s), 4.37 (2H,  $H_{\alpha_3}$ ,  $H_{\alpha_1}$ , m), 4.20 (1H,  $H_{\alpha_2}$ , m), 3.86 (2H,  $H_{N'}$ , m), 3.74 (4H,  $H_K$ ,  $H_{K'}$ , m), 3.35 (8H,  $H_L$ ,  $H_{L'}$ ,  $H_M$ ,  $H_{B'}$ , m), 3.27 (2H,  $H_{M'}$ ), 3.02 (1H,  $H_{\beta_3}$ , m), 2.96 (1H,  $H_{\delta_2}$ , m), 2.88 (1H,  $H_{\delta_2'}$ , m), 2.75 (1H,  $H_{\beta_3'}$ , m), 2.64 (2H,  $H_{\beta_1}$ , m), 2.12 (2H,  $H_{D'}$ , m), 1.73 (2H,  $H_{\beta_2}$ , m), 1.57 (4H,  $H_{C'}$ ,  $H_N$ , m), 1.40 (2H,  $H_{\gamma_2}$ , m).

**HPLC** (0 a 35% B en 30 min):  $t_R = 17.7$  min.

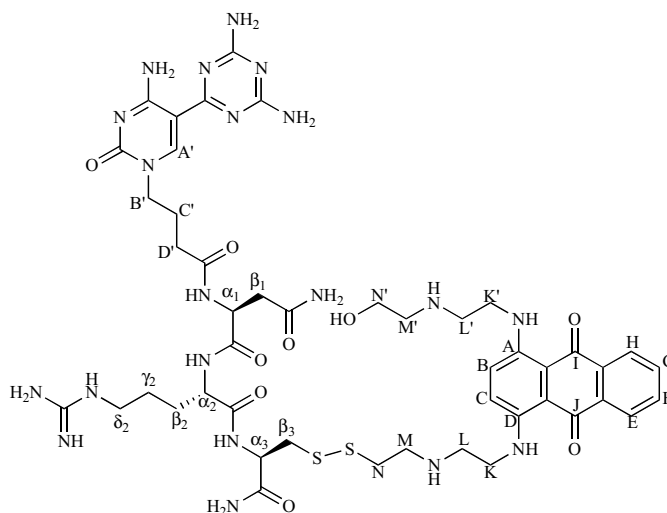
**EM** (ESI-alta resolució, mode positiu):  $m/z$  1063.4448  $[M+H]^+$  (massa teòrica esperada, M: 1062.4389).

**Amt-JBpept (52)**

Per a la síntesi de **52** s'ha seguit el procediment experimental emprat en la preparació de **51**. S'activa la funció tiol de 2  $\mu\text{mol}$  del monòmer derivat de l'ametatrona (**30**) que, posteriorment, es fa reaccionar durant tota una nit amb 1  $\mu\text{mol}$  del monòmer JBpept-SH (**22**) per obtenir el producte desitjat amb un percentatge del 60% en el cru, que es purifica per HPLC semipreparatiu en fase invertida en les mateixes condicions que les realitzades per **51**. S'obté **52** amb un rendiment del 55%.



Caracterització:



<sup>1</sup>H-RMN (600 MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm): 8.26 (1H, H<sub>A'</sub>, s), 8.16 (1H, H<sub>G</sub>/H<sub>F</sub>, m), 8.10 (1H, H<sub>G</sub>/H<sub>F</sub>, m), 7.79 (2H, H<sub>H</sub>, H<sub>E</sub>, m), 7.44 (2H, H<sub>B</sub>, H<sub>C</sub>, m), 4.34 (1H, m), 4.28 (1H, m), 3.94 (4H, m), 3.80 (2H, m), 3.72 (2H, m), 3.40 (4H, m), 3.24 (2H, m), 3.17 (2H, m), 3.05 (2H, m), 2.91 (1H, m), 2.84 (2H, m), 2.71 (2H), 2.63 (2H, m), 2.54 (2H, m), 2.04 (2H, m), 1.76 (2H, m), 1.56 (2H, m).

HPLC (0 a 35% B en 30 min): t<sub>R</sub> = 17.3 min (analític).

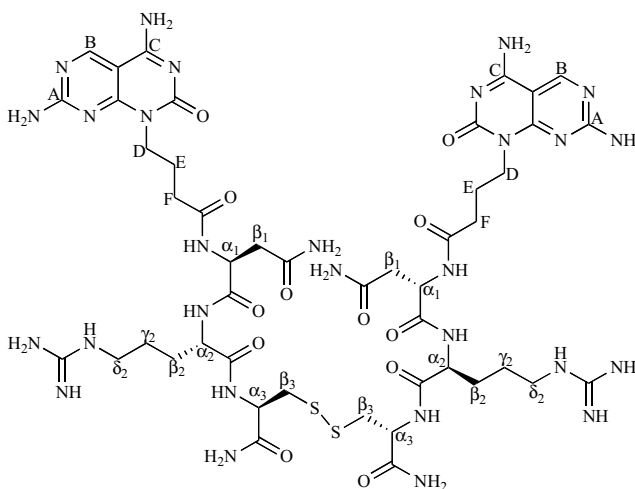
EM (ESI-alta resolució, mode positiu): m/z 1105.4632 [M+H]<sup>+</sup> (massa teòrica esperada, M: 1104.4607).

**4.1.5 Síntesi de lligands Janus-Janus**

**JApept-JApept (53)**

El producte **53** s'ha aïllat com a subproducte de la síntesi dels compostos **47** i **48**.

Caracterització:



$^1\text{H-RMN}$  (600 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  (ppm): 8.68 (2H,  $H_B$ , s), 4.63 (4H,  $H_{\alpha 1}$ ,  $H_{\alpha 3}$ , m), 4.38 (2H,  $H_{\alpha 2}$ , m), 4.03 (4H,  $H_D$ , m), 3.24 (2H,  $H_{\beta 3}$ , m), 3.15 (4H,  $H_{\delta 2}$ , m), 2.93 (2H,  $H_{\beta 3'}$ , m), 2.84 (2H,  $H_{\beta 1}$ , m), 2.75 (2H,  $H_{\beta 1'}$ , m), 2.37 (4H,  $H_F$ , t,  $J = 7.3$  Hz), 1.90 (6H,  $H_E$ ,  $H_{\beta 2'}$ , m), 1.79 (2H,  $H_{\beta 2}$ , m), 1.60 (4H,  $H_{\gamma 2}$ , m).

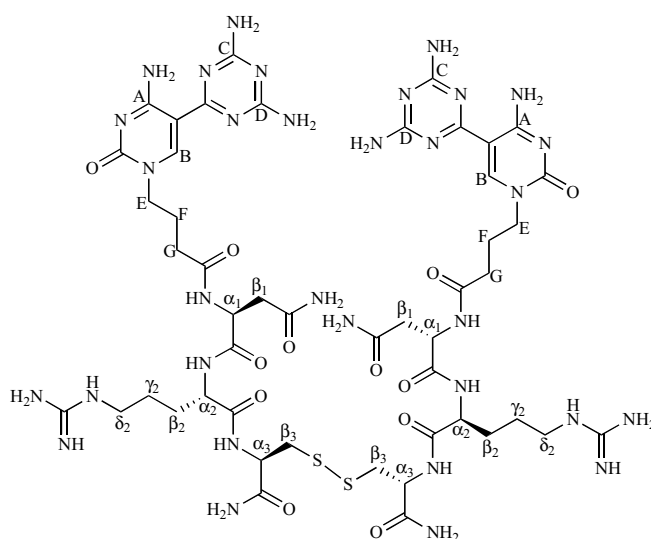
**HPLC** (0 a 35% B en 35 min):  $t_R = 17.6$  min.

**EM** (ESI-alta resolució, mode positiu):  $m/z$  1271.5248  $[M+H]^+$  (massa teòrica esperada, M: 1270.5169).

### JBpept-JBpept (54)

El producte **54** s'ha aïllat com a subproducte de la síntesi dels compostos **49** i **50**.

#### Caracterització:



$^1\text{H-RMN}$  (600 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  (ppm): 8.57 (2H,  $H_B$ , s), 4.60 (4H,  $H_{\alpha 1}$ ,  $H_{\alpha 3}$ , m), 4.34 (2H,  $H_{\alpha 2}$ , m), 3.88 (4H,  $H_E$ , t,  $J=7.0$  Hz), 3.14 (4H,  $H_{\delta 2}$ , m), 2.89 (4H,  $H_{\beta 3}$ , m), 2.80 (2H,  $H_{\beta 1}$ , m), 2.72 (2H,  $H_{\beta 1'}$ , m), 2.40 (4H,  $H_G$ , t,  $J = 7.5$  Hz), 2.04 (4H,  $H_F$ , m), 1.86 (2H,  $H_{\beta 2'}$ , m), 1.76 (2H,  $H_{\beta 2}$ , m), 1.59 (4H,  $H_{\gamma 2}$ , m).

**HPLC** (0 a 35% B en 35 min):  $t_R = 17.6$  min.

**EM** (ESI-alta resolució, mode positiu):  $m/z$  1355.5671  $[M+H]^+$  (massa teòrica esperada, M: 1354.5605).

## 4.2. Síntesi de lligands de segona generació

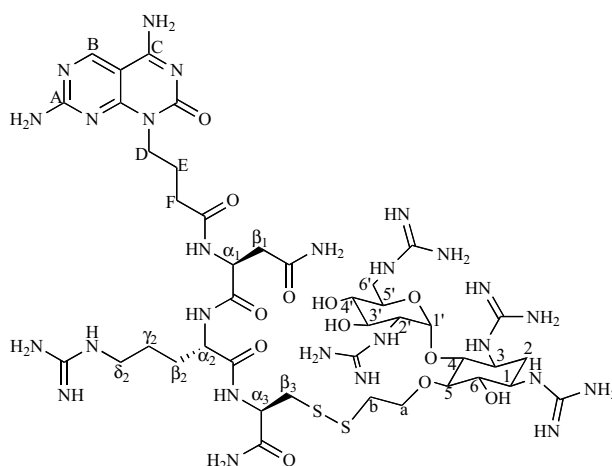
### 4.2.1 Síntesi de lligands guanidinilats

#### JApept-NeaC<sub>2</sub>G<sub>4</sub> (55)

En atmsfera d'argó, es dissolen 300 nmol de JApept-NeaC<sub>2</sub> (**47**) i 4.7 mg (12  $\mu\text{mol}$ , 40 eq) de 1,3-di-Boc-2-(trifluorometilsulfonil)guanidina en 500  $\mu\text{l}$  d'una mescla MeOH/ $\text{CHCl}_3$  5:3 (v/v). Seguidament, s'addicionen 10  $\mu\text{l}$  (72  $\mu\text{mol}$ , 240 eq) de  $\text{NEt}_3$  i

es deixa reaccionar durant 4 dies a temperatura ambient i en agitació constant. Transcorregut el temps de reacció, s'evapora el dissolvent fins a sequetat, es redissol el cru en 5 ml de DCM i es fan rentats amb una solució aquosa d'àcid cítric (10%) (3 x 1 ml). A continuació, se separa la fase orgànica, es torna a rentar amb una solució saturada de NaCl (3 x 1 ml), s'asseca amb MgSO<sub>4</sub> anhidre i s'evapora fins a sequetat. El cru resultant es redissol en 500 µl d'una mescla TFA/DCM (1:1) que conté 2.5% TIS, i es deixa reaccionar a temperatura ambient. Passades 2 h, la mescla de reacció s'evapora al rotavapor, el cru es redissol en H<sub>2</sub>O MilliQ i es liofilitza. L'anàlisi del cru de reacció i la purificació del producte tetraguanidinilat (**55**) es realitzen per HPLC en fase invertida,\* on es detecta la presència de tres pics majoritaris. Els dos primers, amb t<sub>R</sub> de 17.3 i 17.5 min, corresponen als productes triguanidinilats i el tercer, t<sub>R</sub> de 17.8 min (54%), al tetraguanidinilat desitjat (**55**). Un cop purificat s'obté **55** amb un rendiment del 27%.

### Caracterització:



<sup>1</sup>H-RMN (600 MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm): 8.81 (1H, H<sub>B</sub>, s), 5.66 (1H, H<sub>1</sub>, d, *J* = 4.0 Hz), 4.65 (1H, H<sub>α3</sub>, m), 4.62 (1H, H<sub>α1</sub>, t, *J* = 7.0 Hz), 4.35 (1H, H<sub>α2</sub>, m), 4.21 (1H, H<sub>a</sub>, m), 4.12 (2H, H<sub>D</sub>, m), 3.81 (1H, H<sub>a'</sub>, m), 3.73 (2H, H<sub>5'</sub>, H<sub>6</sub>, m), 3.63 (1H, H<sub>2'</sub>, m), 3.56 (4H, H<sub>3'</sub>, H<sub>4'</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, m), 3.47 (2H, H<sub>6'</sub>, m), 3.23 (1H, H<sub>β3'</sub>, m), 3.14 (2H, H<sub>δ2</sub>, m), 2.92 (3H, H<sub>b</sub>, H<sub>β3</sub>, m), 2.81 (1H, H<sub>β1</sub>, m), 2.75 (1H, H<sub>β1'</sub>, m), 2.40 (2H, H<sub>F</sub>, m), 2.23 (2H, H<sub>1</sub>, H<sub>3</sub>, m), 1.98 (2H, H<sub>E</sub>, m), 1.90 (1H, H<sub>β2</sub>, m), 1.79 (2H, H<sub>β2'</sub>, H<sub>2,eq</sub>, m), 1.62 (3H, H<sub>γ2</sub>, H<sub>2,ax</sub>, m).

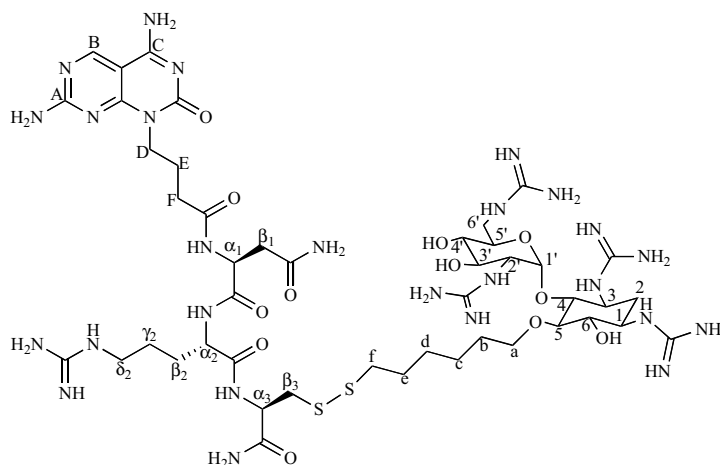
HPLC (0 a 25% B en 35 min): t<sub>R</sub> = 17.8 min.

EM (ESI-alta resolució, mode positiu): *m/z* 593.2696 [M+2H]<sup>2+</sup>, *m/z* 395.8489 [M+3H]<sup>3+</sup>, *m/z* 297.1388 [M+4H]<sup>4+</sup>, (massa teòrica esperada, M: 1184.5264).

\* L'anàlisi i la purificació es duen a terme per HPLC en condicions analítiques amb una columna Jupiter 4 µm proteo C<sub>18</sub> 90 Å 250 x 4.6 mm i un gradient de 0-25% de B en 35 min (A: 0.045% TFA/H<sub>2</sub>O B: 0.036% TFA/ACN, detecció a 220 i 260 nm).

**JApept-NeaC<sub>6</sub>G<sub>4</sub> (56)**

La guanidinilació dels grups amino de la neamina de JApept-NeaC<sub>6</sub> (**48**) es duu a terme a partir de 300 nmol de producte de partida seguint el procediment experimental descrit a la síntesi de **55**, juntament amb les seves condicions d'anàlisi i de purificació per HPLC en fase invertida. Al cru de reacció es detecta la presència de tres pics majoritaris. Els dos primers, amb  $t_R$  de 22.9 i 23.0 min, corresponen a productes triguanidinilats i el tercer, amb  $t_R$  de 23.4 min (64 %), al tetraguanidinilat. Després de la purificació, s'obté **56** amb un rendiment del 24%.

Caracterització:

<sup>1</sup>H-RMN (600 MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm): 8.81 (1H, H<sub>B</sub>, s), 5.59 (1H, H<sub>1'</sub>, d,  $J = 4.0$  Hz), 4.61 (2H, H<sub>α1</sub>, H<sub>α3</sub>, m), 4.35 (1H, H<sub>α2</sub>, m), 4.13 (2H, H<sub>D</sub>, m), 3.98 (1H, H<sub>a</sub>, m), 3.72-3.45 (10H, H<sub>a'</sub>, H<sub>2'</sub>, H<sub>3'</sub>, H<sub>4'</sub>, H<sub>5'</sub>, H<sub>6'</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>, m), 3.20 (1H, H<sub>β3</sub>, m), 3.16 (2H, H<sub>δ2</sub>, m), 2.92 (1H, H<sub>β3'</sub>, m), 2.81 (1H, H<sub>β1</sub>, m), 2.76 (1H, H<sub>β1'</sub>, m), 2.66 (2H, H<sub>F</sub>, m), 2.41 (2H, H<sub>F</sub>, m), 2.25 (2H, H<sub>1</sub>, H<sub>3</sub>, m), 1.98 (2H, H<sub>E</sub>, m), 1.90 (1H, H<sub>β2'</sub>, m), 1.81 (1H, H<sub>β2</sub>, m), 1.59 (5H, H<sub>2,eq</sub>, H<sub>γ2</sub>, H<sub>e</sub>, m), 1.50 (2H, H<sub>b</sub>, m), 1.36-1.23 (5H, H<sub>2,ax</sub>, H<sub>c</sub>, H<sub>d</sub>, m).

HPLC (0 a 25% B en 35 min):  $t_R = 23.4$  min.

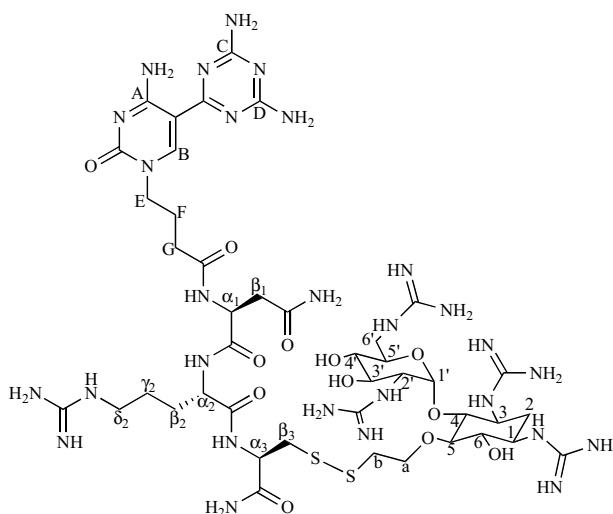
EM (ESI-alta resolució, mode positiu):  $m/z$  621.3023 [M+2H]<sup>2+</sup>,  $m/z$  414.5366 [M+3H]<sup>3+</sup>,  $m/z$  311.1542 [M+4H]<sup>4+</sup> (massa teòrica esperada, M: 1240.5890).

**JBpept-NeaC<sub>2</sub>G<sub>4</sub> (57)**

El compost guanidinilat **57** es prepara a partir de 360 nmol de JBpept-NeaC<sub>2</sub> (**49**) seguint el procediment experimental descrit per a la síntesi de **55**, juntament amb les seves condicions d'anàlisi i de purificació per HPLC en fase invertida.

En el cru de reacció es detecta la presència de tres pics majoritaris. Els dos primers, amb  $t_R$  de 18.8 i 19.0 min, corresponen als productes triguanidinilats. El tercer pic (75%), amb un  $t_R$  de 19.2 min, correspon al derivat tetraguanidinilat **57**, que després de la purificació el seu rendiment és del 23%.

Caracterització:



<sup>1</sup>H-RMN (600 MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm): 8.71 (1H, H<sub>B</sub>, s), 5.65 (1H, H<sub>1'</sub>, d, *J* = 4.0 Hz), 4.65 (1H, H<sub>α3</sub>, m), 4.60 (1H, H<sub>α1</sub>, t, *J* = 7.0 Hz), 4.34 (1H, H<sub>α2</sub>, m), 4.21 (1H, H<sub>a</sub>, m), 3.93 (2H, H<sub>E</sub>, m), 3.82 (1H, H<sub>a'</sub>, m), 3.71 (3H, H<sub>2'</sub>, H<sub>5'</sub>, H<sub>6'</sub>, m), 3.55 (4H, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>3'</sub>, H<sub>4'</sub>, m), 3.48 (2H, H<sub>6'</sub>, m), 3.25 (1H, H<sub>β3</sub>, m), 3.17 (2H, H<sub>δ2</sub>, m), 2.96 (3H, H<sub>b</sub>, H<sub>β3'</sub>, m), 2.81 (1H, H<sub>β1'</sub>, m), 2.72 (1H, H<sub>β1</sub>, m), 2.41 (2H, H<sub>G</sub>, t, *J* = 7.2 Hz), 2.24 (2H, H<sub>1</sub>, H<sub>3</sub>, m), 2.07 (2H, H<sub>F</sub>, m), 1.90 (1H, H<sub>β2'</sub>, m), 1.79 (2H, H<sub>2,eq</sub>, H<sub>β2</sub>, m), 1.62 (3H, H<sub>2,ax</sub>, H<sub>γ2</sub>, m).

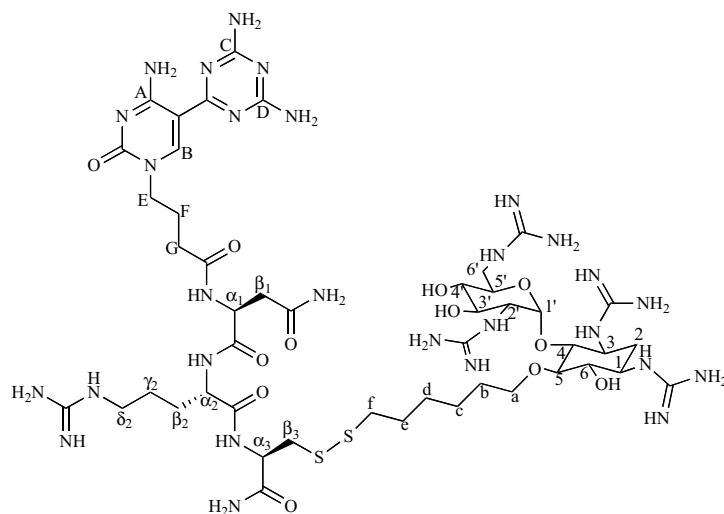
HPLC (0 a 25% B en 35 min): t<sub>R</sub> = 19.2 min.

EM (ESI-alta resolució, mode positiu): *m/z* 614.2806 [M+2H]<sup>2+</sup>, *m/z* 409.8561 [M+3H]<sup>3+</sup>, *m/z* 307.6442 [M+4H]<sup>4+</sup> (massa teòrica esperada, M: 1226.5482).

**JBpept-NeaC<sub>6</sub>G<sub>4</sub> (58)**

La guanidinilació de JBpept-NeaC<sub>6</sub> (**50**) es duu a terme a partir de 300 nmol seguint el procediment experimental descrit per **55**, juntament amb les seves condicions d'anàlisi i de purificació per HPLC en fase invertida.

Al cru de reacció es detecta la presència de tres pics majoritaris. Els dos primers, amb t<sub>R</sub> de 20.10 i 20.20 min, corresponen als derivats triguanidinilats. El tercer pic (83%), amb un t<sub>R</sub> de 20.5 min, correspon al derivat tetraguanidinilat **58**, que després de la purificació el seu rendiment és del 16%.

Caracterització:

**<sup>1</sup>H-RMN** (600 MHz, *D*<sub>2</sub>O)  $\delta$  (ppm): 8.73 (1H, H<sub>B</sub>, s), 5.59 (1H, H<sub>1'</sub>, d, *J* = 4.0 Hz), 4.61 (1H, H <sub>$\alpha$ 3</sub>, m), 4.58 (1H, H <sub>$\alpha$ 1</sub>, t, *J* = 6.9 Hz), 4.34 (1H, H <sub>$\alpha$ 2</sub>, m), 3.98 (1H, H<sub>a</sub>, m), 3.91 (2H, H<sub>E</sub>, m), 3.70-3.45 (10H, H<sub>a'</sub>, H<sub>2'</sub>, H<sub>3'</sub>, H<sub>4'</sub>, H<sub>5'</sub>, H<sub>6'</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>, m), 3.18 (3H, H <sub>$\delta$ 2</sub>, H <sub>$\beta$ 3</sub>, m), 2.94 (1H, H <sub>$\beta$ 3'</sub>, m), 2.80 (1H, H <sub>$\beta$ 1'</sub>, m), 2.74 (1H, H <sub>$\beta$ 1</sub>, m), 2.66 (2H, H<sub>f</sub>, m), 2.42 (2H, H<sub>G</sub>, t, *J* = 7.3 Hz), 2.25 (2H, H<sub>1</sub>, H<sub>3</sub>, m), 2.07 (2H, H<sub>F</sub>, m), 1.90 (1H, H <sub>$\beta$ 2'</sub>, m), 1.82 (1H, H <sub>$\beta$ 2</sub>, m), 1.59 (5H, H<sub>e</sub>, H<sub>2,eq</sub>, H<sub>2</sub>, m), 1.49 (2H, H<sub>b</sub>, m), 1.32-1.25 (5H, H<sub>2,ax</sub>, H<sub>c</sub>, H<sub>d</sub>, m).

**HPLC** (0 a 25% B en 35 min): *t*<sub>R</sub> = 24.1 min.

**EM** (ESI-alta resolució, mode positiu): *m/z* 642.3114 [M+2H]<sup>2+</sup>, *m/z* 428.5420 [M+3H]<sup>3+</sup>, *m/z* 321.6584 [M+4H]<sup>4+</sup> (massa teòrica esperada, M: 1282.6108).

**Amt-NeaC<sub>2</sub>G<sub>4</sub> (61)**

La síntesi de **61** es duu a terme en diferents etapes. En primer lloc, seguint el procediment experimental emprat per **48**, per activar la funció tiol del monòmer NeaC<sub>2</sub>-SH (**37**) es dissolen 11.6 mg (37.5  $\mu$ mol, 12.5 eq) de 2,2'-ditiobis(5-nitropiridina) en 2 ml de THF i, en atmosfera d'argó, s'addicionen 3  $\mu$ mol de **37**, prèviament dissolts en 1 ml de 0.1% TFA/H<sub>2</sub>O, de manera que la mescla reacció sigui H<sub>2</sub>O/THF 1:2 (v/v). Després d'una nit a temperatura ambient i en agitació constant, s'evapora el THF al rotavapor, s'elimina l'excés de reactiu 2,2'-ditiobis(5-nitropiridina) mitjançant extraccions amb AcOEt (6 x 2 ml, o fins que la fase orgànica sigui incolora), i la fase aquosa resultant es liofilitza.

En segon lloc, s'elimina el grup tioacetat del derivat ametantrona **28**, però mantenint els grups protectors Boc, i, en atmosfera d'argó, es fan reaccionar 2.4 mg (3.6  $\mu$ mol) de **28**, dissolts en un volum d'1 ml de MeOH de qualitat HPLC, amb 29  $\mu$ l (24  $\mu$ mol, 8 eq) d'una solució 1 M de MeONa en MeOH. Es deixa evolucionar a temperatura ambient i en agitació constant durant 5 min i, seguidament, s'evapora el dissolvent fins a sequetat. Mantenint l'atmosfera d'argó, a continuació, es redissol el cru resultant amb 3 ml d'una mescla 0.1% TFA/H<sub>2</sub>O/ACN 2:1 (v/v).

El següent pas de la síntesi consisteix en l'addició, en atmosfera d'argó, del monòmer neamina NeaC<sub>2</sub>-SH, amb la funció tiol activada sobre el monòmer derivat de l'ametatrona acabat de desprotegir, per obtenir una mescla amb un volum total de 12 ml de 0.1% TFA/H<sub>2</sub>O/ACN 8:2 (v/v), que es deixa reaccionar a temperatura ambient i en agitació constant durant tota una nit.

L'anàlisi del cru per HPLC en fase invertida (0-80% B en 30 min), mostra la presència de dos pics majoritaris de t<sub>R</sub> 20.8 i 36.0 (rentat amb 100% ACN) min, corresponents al producte desitjat Amt(Boc)<sub>2</sub>-NeaC<sub>2</sub> **59** (20%) i a l'homodímer derivat de l'ametatrona (63%), respectivament. El producte es purifica per HPLC semipreparatiu,\* per obtenir 400 nmol del derivat ametatrona-neamina protegit amb els grups Boc (rdt: 11%).

A l'última etapa de la síntesi, es duu a terme la guanidinitilació dels grups amino de la neamina mitjançant el mateix procediment experimental emprat per **55**. Es dissolen, en atmosfera d'argó, els 400 nmol d'intermedi ametatrona-neamina i 12.5 mg (32 µmol, 80 eq) de 1,3-di-Boc-2-(trifluorometilsulfonyl)guanidina en 2 ml d'una mescla MeOH/CHCl<sub>3</sub> 5:3 (v/v). A continuació, s'addicionen 27 µl (192 µmol, 480 eq) de Et<sub>3</sub>N i es deixa evolucionar a temperatura ambient i en agitació constant. Després de 14 dies de reacció i de l'addició extra d'un total de 360 eq de reactiu guanidinitilant i 1680 eq de Et<sub>3</sub>N, la mescla de reacció s'evapora fins a sequetat realitzant coevaporacions amb ACN. Seguidament, el cru de reacció es redissol en 5 ml de DCM i es fan rentats amb una solució aquosa d'àcid cítric (10%) (3 x 1 ml). La fase orgànica resultant es torna a rentar amb una solució saturada de NaCl (3 x 1 ml), s'asseca amb MgSO<sub>4</sub> anhidre i es rotavapora fins a sequetat.

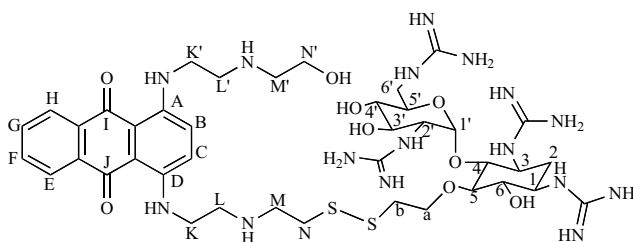
Per últim, s'eliminen tots els grups Boc mitjançant un tractament amb 2 ml d'un cóctel de desprotecció TFA/DCM (1:1) que conté 2.5% de TIS. Al cap de 2 hores a temperatura ambient, s'evapora fins a sequetat, es redissol amb H<sub>2</sub>O MilliQ i es liofililitza.

L'anàlisi del cru final i la purificació del producte tetraguanidinitilat (**61**) es duen a terme per HPLC en fase invertida,\*\* on es detecta la presència de dos pics majoritaris amb t<sub>R</sub> 24.2 (39%) i 24.4 (61%) min, que corresponen als productes amb tres i quatre grups guanidini, respectivament. El producte **61** s'obté amb un rendiment del 64%.

---

\* Purificació per HPLC semipreparatiu en fase invertida amb una columna semipreparativa Jupiter 10 µm proteo C<sub>18</sub> 90 Å 250 x 10 mm, un gradient de 0-80% de B en 30 min (A: 0.1% TFA/H<sub>2</sub>O, B: 0.1% TFA/ACN, detecció 220 i 260 nm) i un flux de 3 ml/min.

\*\* Purificació per HPLC en fase invertida amb una columna Jupiter 4 µm proteo C<sub>18</sub> 90 Å 250 x 4.6 mm i un gradient de 0-30% B en 35 min (A: 0.045% TFA/H<sub>2</sub>O i B: 0.036% TFA/ACN, detecció 220 i 260 nm).

Caracterització:

$^1\text{H-RMN}$  (600 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  (ppm): 8.16 (2H,  $H_G, H_F$ , m), 7.71 (2H,  $H_E, H_H$ , m), 7.49 (2H,  $H_B, H_C$ , m), 5.42 (1H,  $H_{1'}$ , d,  $J = 3.4$  Hz), 3.92 (1H,  $H_a$ , m), 3.77 (2H,  $H_{N'}$ , t,  $J = 6.4$  Hz), 3.68 (4H,  $H_K, H_{K'}$ , t,  $J = 5.3$  Hz), 3.65 (1H,  $H_{5'}$ , m), 3.61 (1H,  $H_{a'}$ , m), 3.54 (2H,  $H_M$ , m), 3.46-3.37 (5H,  $H_2', H_4', H_4, H_5, H_6$ ), 3.33-3.28 (5H,  $H_1, H_3, H_{3'}, H_N$ ), 3.24 (2H,  $H_{M'}$ , m), 3.06 (4H,  $H_L, H_{L'}$ , m), 2.98 (2H,  $H_{6'}$ , m), 2.61 (2H,  $H_b$ , m), 2.06 (1H,  $H_{2,eq}$ , m), 1.47 (1H,  $H_{2,ax}$ , m).

**HPLC** (0 a 30% B en 30 min):  $t_R = 24.4$  min.

**EM** (ESI-alta resolució, mode positiu):  $m/z$  977.4553  $[M+H]^+$ ,  $m/z$  489.2313  $[M+2H]^{2+}$ ,  $m/z$  326.4905  $[M+3H]^{3+}$  (massa teòrica esperada, M: 976.4484).

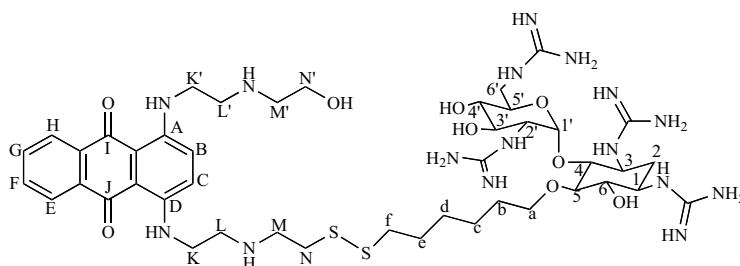
**Amt-NeaC<sub>6</sub>G<sub>4</sub> (62)**

El compost **62** se sintetitza de forma anàloga al compost **61**. En primer lloc, s'activa la funció tiol de 2.1  $\mu\text{mol}$  de monòmer NeaC<sub>6</sub>-SH (**43**), seguint el mateix procediment realitzat per **51**. A continuació, es fa reaccionar amb 2.3 mg (3.4  $\mu\text{mol}$ , 1.6 eq) de monòmer derivat de l'ametrantrona (**28**), sense el grup tiol desprotegit, tal com s'ha descrit a la síntesi de **45**. Després de 4 dies de reacció, s'obté el corresponent conjugat ametrantrona-neamina protegit, Amt(Boc)<sub>2</sub>-NeaC<sub>6</sub> (**60**), on l'anàlisi del cru per HPLC en fase invertida (0-80% B en 30 min), mostra la presència del producte desitjat a un  $t_R$  de 22.1 min (29%). La purificació d'aquest intermedi es realitza per HPLC seguint el mateix procediment emprat per **57**, per obtenir 350 nmol (rdt: 17%).

A l'etapa de guanidinilació, es fan reaccionar els 350 nmol d'Amt(Boc)<sub>2</sub>-NeaC<sub>6</sub> (**60**) amb 11 mg (28  $\mu\text{mol}$ , 80 eq) de 1,3-di-Boc-2-(trifluorometilsulfonyl)guanidina, dissolts en 2 ml d'una mescla MeOH/CHCl<sub>3</sub> 5:3 (v/v), juntament amb la corresponent addició de 23  $\mu\text{l}$  (168  $\mu\text{mol}$ , 480 eq) de NEt<sub>3</sub>. Després de 14 dies de reacció i de l'addició extra d'un total de 360 eq de reactiu guanidinilant i 1680 eq de NEt<sub>3</sub>, s'atura la reacció, i s'eliminen els grups protectors Boc.

L'anàlisi del cru final per HPLC en fase invertida mostra la presència de dos pics majoritaris amb  $t_R$  24.4 (16%) i 24.5 (24%) min, que corresponen als productes tri i tetraguanidinilat, respectivament. El producte **62** es purifica d'igual manera que s'ha purificat **61**, per obtenir-lo amb un rendiment del 50%.



Caracterització:

$^1\text{H-RMN}$  (600 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  (ppm): 8.31 (2H,  $H_G, H_F$ , m), 7.86 (2H,  $H_E, H_H$ , m), 7.59 (2H,  $H_B, H_C$ , m), 5.54 (1H,  $H_I$ , d,  $J = 3.8$  Hz), 3.92 (2H,  $H_{N'}$ , t,  $J = 7.2$  Hz), 3.86 (2H,  $H_a, H_{5'}$ , m), 3.84 (4H,  $H_K, H_{K'}$ , t,  $J = 5.3$  Hz), 3.69-3.60 (5H,  $H_M, H_{2'}, H_4, H_6$ , m), 3.60-3.46 (9H,  $H_N, H_1, H_3, H_5, H_{3'}, H_4', H_{6'}$ , m), 3.43 (3H,  $H_{a'}, H_{M'}$ , m), 3.21 (4H,  $H_L, H_{L'}$ , m), 2.46 (2H,  $H_f$ , m), 2.24 (1H,  $H_{2,eq}$ , m), 1.65 (1H,  $H_{2,ax}$ , m), 1.34 (4H,  $H_b, H_e$ , m), 1.02 (4H,  $H_c, H_d$ ).

**HPLC** (0 a 30% B en 30 min):  $t_R = 24.4$  min.

**EM** (ESI-alta resolució, mode positiu):  $m/z$  517.2617  $[M+2H]^{2+}$ ,  $m/z$  345.1773  $[M+3H]^{3+}$ ,  $m/z$  259.1347  $[M+4H]^{4+}$  (massa teòrica esperada, M: 1032.5110).

**4.2.2 Síntesi de lligands derivats de l'ametatrona doblement funcionalitzats****Amt-NeaC<sub>2</sub>, NeaC<sub>2</sub> (64)**

En primer lloc, cal activar la funció tiol del monòmer neamina, tal com s'ha dut a terme al procediment experimental de **48**. Es fan reaccionar durant tota una nit, en atmosfera d'argó i a temperatura ambient, 7  $\mu\text{mol}$  de NeaC<sub>2</sub>-SH (**37**) amb 27.2 mg (87.5  $\mu\text{mol}$ , 12.5 eq) de 2,2'-ditiobis(5-nitropiridina) en 8 ml de 0.1% TFA en H<sub>2</sub>O/THF 1:2 (v/v). Transcorregut aquest temps, s'evapora el THF, s'elimina l'excés de reactiu activant i es liofilitza la fase aquosa. El cru es purifica per HPLC en fase invertida,\* per obtenir el derivat desitjat a un  $t_R$  de 14.1 min.

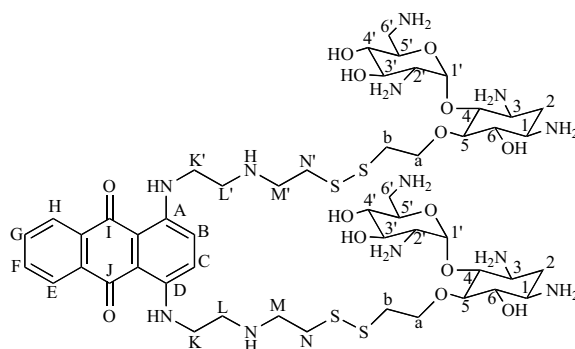
En segon lloc, a partir del procediment experimental emprat per **61**, s'eliminen, en atmosfera d'argó, els grups tioacetat del monòmer derivat de l'ametatrona **29**, però mantenint els grups protectors Boc. Es fan reaccionar durant 5 min, en atmosfera d'argó, 1.4 mg (1.9  $\mu\text{mol}$ ) de **29**, dissolts en un 1 ml de MeOH de qualitat HPLC, amb 192  $\mu\text{l}$  (19  $\mu\text{mol}$ , 10 eq) d'una solució 0.1 M de MeONa en MeOH. Ràpidament, a continuació, s'evapora el dissolvent fins a sequetat i, mantenint l'atmosfera d'argó, es redissol el cru amb 8 ml d'una mescla 0.1% TFA en H<sub>2</sub>O/ACN 2:1 (v/v) per dur a terme la següent etapa. En aquest punt, s'addiciona **29** desprotegit a la solució de monòmer neamina activada per obtenir una mescla de reacció amb un volum de 10 ml de 0.1% TFA en H<sub>2</sub>O/ACN 8:2 (v/v), que es deixa evolucionar a temperatura ambient i en agitació constant. Després de 5 dies de reacció, el cru corresponent a l'intermedi

\* Purificació per HPLC semipreparatiu en fase invertida amb una columna semipreparativa Jupiter 10  $\mu\text{m}$  proteo, C<sub>18</sub> 90 Å 250 x 10 mm, un gradient de 0-80% de B en 30 min (A: 0.1% TFA/H<sub>2</sub>O, B: 0.1% TFA/ACN, detecció 220 i 260 nm), i un flux de 3 ml/min.

protegit Amt(Boc)<sub>2</sub>-NeaC<sub>2</sub>,NeaC<sub>2</sub> (**63**) (30% en el cru) es purifica per HPLC en fase invertida\* (t<sub>R</sub> 18.0 min).

Per últim, s'eliminen els grups Boc del fragment ametantrona del lligand mitjançant el tractament amb 1 ml de cóctel TFA/TIS/H<sub>2</sub>O (95%/2.5%/2.5%) durant 1 hora a temperatura ambient i en agitació constant. Transcorregut aquest temps, s'evapora fins a sequetat i es purifica per HPLC,\*\* per obtenir **64** amb un rendiment global del 6%.

### Caracterització:



<sup>1</sup>H-RMN (600 MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm): 8.17 (2H, H<sub>G</sub>, H<sub>F</sub>, m), 7.72 (2H, H<sub>E</sub>, H<sub>H</sub>, m), 7.41 (2H, H<sub>B</sub>, H<sub>C</sub>, m), 5.49 (2H, H<sub>1'</sub>, m), 4.00 (2H, H<sub>a</sub>, m), 3.81 (6H, H<sub>5'</sub>, H<sub>6'</sub>, H<sub>a'</sub>, m), 3.79 (4H, H<sub>k</sub>, H<sub>k'</sub>, t, *J* = 6.0 Hz), 3.65 (2H, H<sub>3'</sub>), 3.46 (4H, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, m), 3.41 (2H, H<sub>4'</sub>, m), 3.31 (8H, H<sub>L</sub>, H<sub>L'</sub>, H<sub>M</sub>, H<sub>M'</sub>), 3.25 (4H, H<sub>6'</sub>, m), 3.08 (4H, H<sub>1</sub>, H<sub>3</sub>, m), 2.96 (2H, H<sub>2'</sub>, m), 2.88 (4H, H<sub>N</sub>, H<sub>N'</sub>, t, *J* = 6.79 Hz), 2.79 (4H, H<sub>b</sub>, t, *J* = 6.3 Hz), 2.09 (2H, H<sub>2,eq</sub>, m), 1.38 (2H, H<sub>2,ax</sub>, m).

HPLC (0 a 30% B en 30 min): t<sub>R</sub> = 22.7 min.

EM (ESI-alta resolució, mode positiu): *m/z* 1205.5241 [M+H]<sup>+</sup>, *m/z* 1227.5016 [M+Na]<sup>+</sup>, *m/z* 603.2642 [M+2H]<sup>2+</sup>, *m/z* 402.5122 [M+3H]<sup>3+</sup> (massa teòrica esperada, M: 1204.5113).

### Amt-NeaC<sub>2</sub>,Azq (**66**)

La síntesi de **66** es realitza de forma anàloga a la de **64**. A la primera etapa de la síntesi se segueix el procediment experimental que es descriu per **48**. S'activa la funció tiol de 1.5 μmol de NeaC<sub>2</sub>-SH (**37**) i de 3 μmol del monòmer d'azaquinolona mitjançant la reacció amb 5.8 mg (18.8 μmol, 12.5 eq) i 11.6 mg (37.5 μmol, 12.5 eq) de 2,2'-ditiobis(5-nitropiridina) en un volum d'1.5 ml i de 2 ml de 0.1% TFA en H<sub>2</sub>O/THF 1:2 (v/v), respectivament. Ambdós crus de reacció es purifiquen per HPLC semipreparatiu, tal com es purifica **64**, per obtenir ambdós derivats activats de neamina (t<sub>R</sub> 14.1 min) i d'azaquinolona (t<sub>R</sub> 17.9 min).

\* Purificació per HPLC en fase invertida amb una columna Jupiter 4 μm proteo C<sub>18</sub> 90 Å 250 x 4.6 mm i un gradient de 0-80% B en 30 min (A: 0.045% TFA/H<sub>2</sub>O i B: 0.036% TFA/ACN, detecció a 220 i 260 nm).

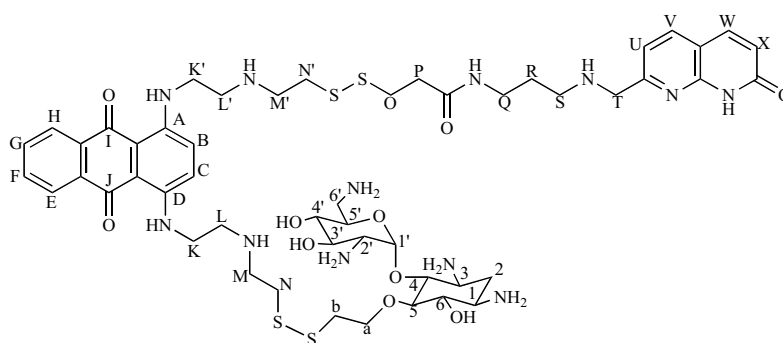
\*\* Purificació per HPLC en fase invertida amb una columna Jupiter 4 μm proteo C<sub>18</sub> 90 Å 250 x 4.6 mm i un gradient de 0-30% B en 30 min (A: 0.045% TFA/H<sub>2</sub>O i B: 0.036% TFA/ACN, detecció a 220 i 260 nm).

En segon lloc, també seguint el procediment experimental de **64**, es desprotegeixen els grups tiol del monòmer derivat de l'ametrantrona (**29**) mitjançant el tractament d'1 mg (1.4  $\mu\text{mol}$ ) de **29**, dissolt en 1 ml de MeOH de qualitat HPLC, amb 275  $\mu\text{l}$  (27.5  $\mu\text{mol}$ , 10 eq) d'una solució 0.1 M de MeONa en MeOH durant 5 min. Un cop desprotegit, s'addiciona el derivat ditiol **29** sobre una solució que conté, en un volum total de 12 ml de 0.1% TFA en  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$  8:2 (v/v), els monòmers neamina i azaquinolona activats, i es deixa evolucionar a temperatura ambient i en atmosfera d'argó.

Transcorreguts 6 dies de reacció, l'anàlisi del cru per HPLC en fase invertida mostra la presència del compost desitjat amb un  $t_R$  de 20.5 min (18%), juntament amb el monòmer azaquinolona de partida (18.5 min, 51%), Amt(Boc)<sub>2</sub>-NeaC<sub>2</sub>,NeaC<sub>2</sub> (**63**) (18.0 min, 3%) i el derivat de l'ametrantrona amb dues molècules d'azaquinolona (24.7 min, 12%). La purificació de l'intermedi desitjat protegit, Amt(Boc)<sub>2</sub>-NeaC<sub>2</sub>,Azq (**65**), es realitza d'igual manera que **63**.

Per últim, la desprotecció es duu a terme a través del mateix procediment utilitzat per **64**, tractant l'intermedi Amt(Boc)<sub>2</sub>-NeaC<sub>2</sub>,Azq (**65**) amb 1 ml de cóctel TFA/TIS/ $\text{H}_2\text{O}$  (95%, 2.5%, 2.5%) durant 1 hora a temperatura ambient. El producte final **66** s'obté amb un rendiment global del 8% després de la seva purificació per HPLC.

#### Caracterització:



<sup>1</sup>H-RMN (600 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  (ppm): 7.95 (2H, H<sub>G</sub>, H<sub>F</sub>, m), 7.65 (2H, H<sub>E</sub>, H<sub>H</sub>, m), 7.57 (1H, H<sub>V</sub>, d,  $J = 7.9$  Hz), 7.53 (1H, H<sub>W</sub>, d,  $J = 9.5$  Hz), 7.33 (2H, H<sub>B</sub>, H<sub>C</sub>, m), 6.80 (1H, H<sub>U</sub>, d,  $J = 7.7$  Hz), 6.30 (1H, H<sub>X</sub>, d,  $J = 9.4$  Hz), 5.35 (1H, H<sub>1'</sub>, m), 4.01 (2H, H<sub>T</sub>, s), 3.88-3.72 (7H, H<sub>a</sub>, H<sub>K</sub>, H<sub>K'</sub>, H<sub>5'</sub>, m), 3.43-3.10 (16H, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>2'</sub>, H<sub>3'</sub>, H<sub>4'</sub>, H<sub>Q</sub>, H<sub>M'</sub>, H<sub>M</sub>, H<sub>L</sub>, H<sub>L'</sub>, m), 3.08-2.97 (4H, H<sub>1</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>6'</sub>, m), 2.95 (2H, H<sub>S</sub>, t,  $J = 7.9$  Hz), 2.90 (2H, H<sub>N</sub>/H<sub>N'</sub>, t,  $J = 6.3$  Hz), 2.85 (2H, H<sub>N</sub>/H<sub>N'</sub>, t,  $J = 6.3$  Hz), 2.81 (2H, H<sub>O</sub>, t,  $J = 6.4$  Hz), 2.72 (2H, H<sub>b</sub>, m), 2.52 (2H, H<sub>P</sub>, t,  $J = 6.4$  Hz), 2.02 (1H, H<sub>2,eq</sub>, m), 1.79 (2H, H<sub>R</sub>, m), 1.38 (1H, H<sub>2,ax</sub>, m).

HPLC (5 a 35% B en 35 min):  $t_R = 22.8$  min.

EM (ESI-alta resolució, mode positiu):  $m/z$  1143.4599  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $m/z$  1165.4400  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ,  $m/z$  572.2334  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ ,  $m/z$  381.8250  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$  (massa teòrica esperada, M: 1142.4534).

*Abreviatures, Acrònims i Símbols*



## ABREVIATURES, ACRÒNIMS I SÍMBOLS

### Dissolvents i altres reactius

<b>ACN</b>	acetonitril
<b>Boc<sub>2</sub>O</b>	anhídrid de Boc
<b>CA</b>	citrat d'amoni
<b>CCI</b>	isocianat de clorocarbonil
<b>CSI</b>	isocianat de clorosulfonil
<b>DAT</b>	diaminotriazina
<b>DIAD</b>	azodicarboxilat de diisopropil
<b>DCM</b>	diclorometà
<b>DHB</b>	àcid 2,5-dihidroxibenzoic
<b>DIEA/DIPEA</b>	<i>N,N</i> -diisopropiletilamina
<b>DMAP</b>	4-dimetilaminopiridina
<b>DMF</b>	<i>N,N</i> -dimetilformamida
<b>DMSO</b>	dimetilsulfòxid
<b>DSS</b>	2,2-dimetil-2-silapentà-5-sulfonat
<b>DTNP</b>	àcid 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoic)
<b>DTT</b>	ditiotreitòl
<b>EDTA</b>	àcid etilendiaminotetraacètic
<b>NMP</b>	<i>N</i> -metilpirrolidina
<b>TCA</b>	àcid tricloroacètic
<b>TEA</b>	triètilamina
<b>TEAA</b>	acetat de triètilamoni
<b>THAP</b>	2,4,6-trihidroxiaacetofenona
<b>THF</b>	tetrahidrofurà
<b>TFA</b>	àcid trifluoroacètic
<b>TFAA</b>	anhídrid trifluoroacètic
<b>TIS</b>	triisopropilsilà
<b>TMS</b>	trimetilsilà
<b>TMSNCO</b>	isocianat de trimetilsilil
<b>Tris àcid</b>	hidroclorur de tris(hidroximetil)aminometà
<b>Tris bàsic</b>	2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol

### Resines, grups protectors i agents activants

<b>Ac</b>	acetil
<b>Boc</b>	<i>tert</i> -butiloxicarbonil
<b>BTT</b>	5-benziltio-1 <i>H</i> -tetrazole

<b>CPG</b>	suport de boles de vidre de porus controlat ( <i>Controlled Pore Glass</i> )
<b>CNE</b>	2-cianoetil
<b>DIPC</b>	<i>N,N'</i> -diisopropilcarbodiimida
<b>DMT</b>	4,4'-dimetoxitritil
<b>Fmoc</b>	9-fluorenilmetoxicarbonil
<b>HATU</b>	hexafluorofosfat de <i>O</i> -(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluroni
<b>HOAt</b>	1-hidroxi-7-aza-benzotriazole
<b>MBHA</b>	<i>p</i> -metilbenzidrilamina
<b>NMI</b>	<i>N</i> -metilimidazole
<b><sup>i</sup>PrPac</b>	4-isopropilfenoxiacetil
<b>Pac</b>	fenoxiacetil
<b>Pbf</b>	[ <i>N</i> <sup>G</sup> -(2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonil)]
<b>PMB</b>	<i>p</i> -metoxibenzil
<b>TBDMS</b>	<i>tert</i> -butildimetilsilil
<b>Trt</b>	tritol

#### Unitats i mesures

<b>A/Abs</b>	absorbància
<b>anh</b>	anhidre
<b>atm</b>	atmosfera
<b>δ</b>	desplaçament químic (expressat en ppm)
<b>d</b>	doblet
<b>dd</b>	doblet de dobles
<b>dt</b>	doblet de triplets
<b>ε<sub>260</sub></b>	coeficient d'extinció molar a 260 nm
<b>eq</b>	equivalents
<b>f</b>	funcionalització (grau de substitució de la resina)
<b>J</b>	constant d'acoblament (expressada en Hz)
<b>m</b>	multiplet
<b>M</b>	molar
<b>μM</b>	micromolar
<b>mM</b>	milimolar
<b><i>m/z</i></b>	relació massa/càrrega
<b>N</b>	normal
<b>nM</b>	nanomolar
<b>OD<sub>260</sub></b>	densitat òptica a 260 nm
<b>ppm</b>	parts per milió
<b>q</b>	quadruplet
<b>qt</b>	quintuplet

<b>rdt</b>	rendiment
<b>R<sub>f</sub></b>	factor de retenció
<b>s</b>	singlet
<b>t</b>	triplet
<b>T amb</b>	temperatura ambient
<b>T<sub>m</sub></b>	temperatura de fusió
<b>UV-Vis</b>	ultravioleta-visible

### Tècniques instrumentals

<b>CI</b>	ionització química ( <i>chemical ionization</i> )
<b>COSY</b>	<i>CORrelated SpectroscopY</i>
<b>EM</b>	espectrometria de masses
<b>EMSA</b>	assaig de retard de mobilitat electrosforètica
<b>ESI</b>	espectrometria de masses per ionització <i>electrospray</i>
<b>HPLC</b>	cromatografia líquida d'alta pressió ( <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
<b>HPLC-MS</b>	HPLC acoblada a espectrometria de masses ( <i>High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i> )
<b>HSQC</b>	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
<b>IR</b>	espectroscòpia d'infraroig
<b>ITC</b>	<i>Isothermal Calorimetry</i>
<b>MALDI-TOF</b>	espectrometria de masses de desorció iònica provocada per làser i assistida per matriu amb analitzador de temps de vol ( <i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight</i> )
<b>MPLC</b>	cromatografia de líquids de mitjana pressió ( <i>Medium Pressure Liquid Chromatography</i> )
<b>NOESY</b>	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
<b>RMN</b>	ressonància magnètica nuclear
<b>SPR</b>	ressonància de plasmó superficial
<b>TLC</b>	cromatografia de capa prima ( <i>Thin-Layer Chromatography</i> )
<b>TOCSY</b>	<i>TOTAL Correlation SpectroscopY</i>

### Altres

<b>A</b>	adenina
<b>Aa</b>	aminoàcid
<b>AcrOMe</b>	6-cloro-2-metoxi-9-aminoacridina
<b>AdRP</b>	retinitis pigmentosa autosomal dominant
<b>Ala</b>	alanina
<b>Amt</b>	ametantona



<b>2-AP</b>	2-aminopurina
<b>Asn</b>	asparagina
<b>ASOs</b>	oligonucleòtids antisentit
<b>Ar</b>	argó
<b>Arg</b>	arginina
<b>Azq</b>	azaquinolona
<b>C</b>	citosina
<b>Cys</b>	cisteïna
<b>DCC</b>	química combinatòria dinàmica ( <i>Dynamic Combinatorial Chemistry</i> )
<b>DCL</b>	biblioteca combinatòria dinàmica ( <i>Dynamic Combinatorial Library</i> )
<b>DMD</b>	distròfia muscular de Duchenne
<b>DNA</b>	àcid desoxiribonucleic
<b>2-DOS</b>	2-desoxiestreptamina
<b>FL</b>	fluoresceïna
<b>FMN</b>	mononucleòtids de flavina
<b>FTDP-17</b>	<i>Frontotemporal Dementia and Parkinsonism linked to chromosome 17</i>
<b>G</b>	guanina
<b>HIV/VIH</b>	virus de la immunodeficiència humana ( <i>Human Immunodeficiency Virus</i> )
<b>HVC</b>	virus de l'hepatitis C
<b>IRES</b>	<i>internal ribosome entry site</i>
<b>MAPT</b>	<i>microtubule-associated protein tau</i>
<b>Mtx</b>	mitoxantrona
<b>Nea</b>	neamina
<b>NeaG<sub>4</sub></b>	neamina guanidilada
<b>PDB</b>	<i>Protein Data Bank</i>
<b>PNA</b>	<i>Peptide Nucleic Acid</i>
<b>RB-DCC</b>	<i>resin-bound DCC</i>
<b>r.e</b>	relació d'especificitat
<b>RNA</b>	àcid ribonucleic
<b>RNAi</b>	RNA d'interferència
<b>mRNA</b>	àcid ribonucleic missatger
<b>miRNA</b>	microRNA
<b>ncRNA</b>	RNA no codificants ( <i>non-coding RNA</i> )
<b>siRNA</b>	<i>small interfering RNAs</i>
<b>rRNA</b>	àcid ribonucleic ribosomal
<b>tRNA</b>	àcid ribonucleic de transferència
<b>RNasa</b>	ribonucleasa
<b>RNP</b>	ribonucleoproteïna
<b>RRE</b>	<i>Rev-response element</i>

<b>SMA</b>	atròfia muscular espinal
<b>SMN2</b>	<i>survival motor neuron</i>
<b>T</b>	timina
<b>TAR</b>	<i>trans-activating response element</i>
<b>Tat</b>	<i>HIV trans-activator of transcription</i>
<b>TPP</b>	pirofosfat de tiamina
<b>Trp</b>	triptòfan
<b>U</b>	uracil
<b>UsnRNP</b>	<i>U-rich small nuclear ribonucleoproteins</i>
<b>5'-UTRs</b>	<i>5' untranslated regions</i>
<b>W-C</b>	Watson-Crick
<b>wt</b>	<i>wild-type</i> (referit a la seqüència nativa)





