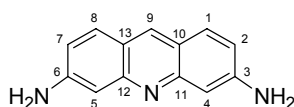


1 EXPERIMENTAL CAPÍTOL 1

1.1 Síntesi de derivats acridínics

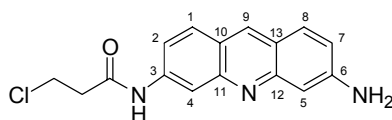
1.1.1 Obtenció de la proflavina A1



Es pesen 10 g (38.75 mmol) d'hemisulfat de proflavina i es dissolen en la mínima quantitat possible d'aigua (~ 450 mL) sota agitació magnètica a 80°C, obtenint-se una dissolució de color vermell fosc. Llavors es deixa refredar la dissolució fins a temperatura ambient. Mantenint el baló en un bany d'aigua i sota agitació magnètica, s'afegeix NH₃ (33%) gota a gota fins arribar a pH 11. S'observa l'aparició d'un precipitat groc. La mescla resultant es filtra i el sòlid s'asseca a l'estufa a 110°C durant 4 hores. El producte es purifica per recristal·lització en 350 mL d'EtOH donant lloc a un sòlid groc (7.02 g, 86.6%).

Caracterització: **Rf** (DCM/MeOH 70:30) = 0.1; **RMN de ¹H** (acetona-d₆, 200 MHz) δ: 8.34 (s, 1H, H-9), 7.66 (d, J=8.4 Hz, 2H, H-1,8), 7.00-6.92 (m, 4H, H-2,4,5,7), 5.33 (s, 4H, NH); **RMN de ¹³C** (acetona-d₆, 63 MHz) δ: 151.0 (C-11,12), 148.6 (C-3,6), 133.5 (C-9), 128.3 (C-1,8), 118.2 (C-10,14), 117.0 (C-2,7), 103.7 (C-4,5); **EM** (MALDI-TOF) *m/z*: 210.56 [M+H]⁺; **pf**: 246-248°C.

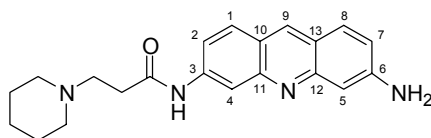
1.1.2 Síntesi de la 3-(3-cloropropionamido)-6-aminoacridina **A2**



Es pesen 150 mg (0.71 mmol) de proflavina **A1** i es dissolen en 20 mL d'acetona. Per ajudar a la dissolució completa se sonica la mescla durant 15 minuts. S'addicionen 1.5 equivalents (100 mL, 1.04 mmol) de clorur de l'àcid 3-cloropropiònic en quatre fraccions de 25 µL de clorur d'àcid en 0.5 mL d'acetona en intervals d'una hora. Les addicions es fan gota a gota observant-se l'aparició d'una turbulència taronja. La reacció es deixa 3 dies i es controla per CCF (DCM/MeOH 7:3). La mescla resultant es posa al congelador durant 3 hores i llavors es filtra en un embut Büchner obtenint-se 200 mg d'un sòlid vermell. El producte obtingut es purifica per cromatografia en columna sobre gel de sílice eluint amb DCM i quantitats creixents de MeOH (0-30%) obtenint-se 30 mg de producte desitjat (15%).

Caracterització: **Rf** (DCM/MeOH 70:30) = 0.46; **RMN de ¹H** (CD₃OD, 200 MHz) δ: 8.92 (s, 1H, H-9), 8.65 (s, 1H, H-4), 8.07 (d, J=8.8 Hz, H-1), 7.95 (d, J=9 Hz, 1H, H-8), 7.52 (dd, J=8.8 Hz, J=1.8 Hz, 1H, H-2), 7.20 (dd, J=9 Hz, J=1.8 Hz, 1H, H-7), 6.86 (s, 1H, H-5), 3.98 (t, J=6.2 Hz, 2H, COCH₂CH₂Cl), 3.03 (t, J=6.2 Hz, 2H, COCH₂CH₂Cl); **EM** (MALDI-TOF) *m/z*: 300.63 [M+H]⁺.

1.1.3 Síntesi de la 3-(3-piperidinopropionamido)-6-aminoacridina **A3**

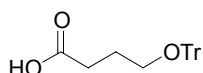


Es dissolen 50 mg (0.17 mmol) de 3-(3-cloropropionamido)-6-aminoacridina **A2** en 4 mL d'EtOH i s'addicionen 100 µL de piperidina (1 mmol). La dissolució es deixa refluxar durant 5 hores. S'evapora el dissolvent a sequedat i es renta bé el residu amb dietilèter. El producte es purifica per cromatografia en columna sobre gel de sílice eluint amb DCM i quantitats creixents de MeOH (0-30%). S'obtenen 42 mg de 3-(3-piperidinopropionamido)-6-aminoacridina **3** (70 %).

Caracterització: **Rf** (DCM/MeOH 70:30) = 0.25; **RMN de ¹H** (CD₃OD, 200MHz) δ: 8.55 (s, 1H, H-9), 8.32 (s, 1H, H-4), 7.85 (d, J=12Hz, 1H, H-1), 7.75 (d, J=12Hz, 1H, H-8), 7.49 (d, J=12Hz, 1H, H-2), 7.04 (d, J=12Hz, 1H, H-7), 6.95 (s, 1H, H-5), 2.84-2.72

(t, 2H, COCH₂CH₂N), 2.70-2.45 (m, 6H, COCH₂CH₂N, N(CH₂CH₂)₂CH₂), 1.8-1.4 (m, 6H, N(CH₂CH₂)₂CH₂), **EM** (ES (+) H₂O:ACN 1:1 1% àc. fòrmic) *m/z*: 349.4 [M+1]⁺, 175.3 [M+2]²⁺.

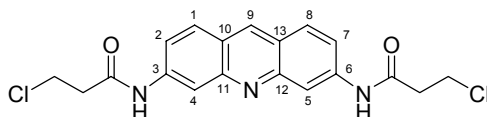
1.1.4 Síntesi de l'àcid 4-O-triril-hidroxi-butíric A4



Es pesen en un baló 820 mg (6.5 mmol) de la sal sòdica de l'àcid 4-hidroxi-butíric. Es purga amb argó i s'addicionen 50 mL de pir. anh.. Un cop dissolta la sal, s'afegeixen 2 g (1.4 eq.) de clorur de tritil i es deixa reaccionar tota la nit sota atmosfera inert a 50°C. Per aturar la reacció s'afegeixen 15 mL de MeOH mantenint l'agitació durant 15 minuts. Posteriorment s'evapora el dissolvent fins a sequedat (per ajudar a eliminar completament la piridina es fan coevaporacions amb toluè). S'obté un sòlid groguenc que es dissol en acetat d'etil i es fan extraccions amb H₂O (2x) i amb una solució saturada de NaCl (2x). La fase orgànica s'asseca sobre MgSO₄ anh. i el dissolvent s'evapora a sequedat obtenint-se un oli groc. El cru obtingut es purifica per cromatografia en columna en gel de sílice eluint amb una mescla DCM/TEA (99:1) i quantitats creixents de MeOH (0-4%). S'obtenen 2 g del producte desitjat (85%).

Caracterització: **Rf** (DCM/MeOH/TEA 97:2:1) = 0.475; **RMN de ¹H** (CDCl₃, 200 MHz) δ: 9.55 (s, 1H, COOH), 7.45-7.22 (m, 15H, Ar-H), 3.07 (t, J=6.4 Hz, 2H, CH₂OTr), 2.38 (t, J=7.2 Hz, CH₂COOH), 1.94 (m, 2H, CH₂CH₂OTr); **RMN de ¹³C** (CDCl₃, 63MHz) δ: 179.5 (COOH), 144.1 (C_{Ar}), 128.5 (C_{Ar}), 127.7 (C_{Ar}), 126.8 (C_{Ar}), 86.5 (OC(Ph)₃), 62.4 (CH₂OTr), 31.3 (HOOCCH₂), 25.2 (CH₂CH₂OTr).

1.1.5 Síntesi de la 3,6-bis(3-cloropropionamido)acridina A6

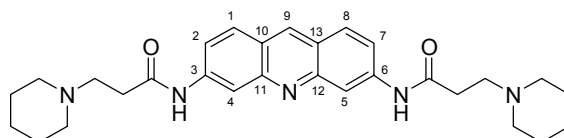


Es pesa 1 g (4.78 mmol) de proflavina **A1** i s'hi addicionen 20 mL de clorur de l'àcid 3-cloropropiònic. La suspensió resultant es porta a reflux seguint-se la reacció per CCF (DCM/MeOH 7:3). Al cap de 2 hores s'atura el reflux i es deixa refredar la solució fins a temperatura ambient. Es filtra la suspensió resultant amb un embut Büchner i es renta el sòlid amb dietilèter (2 x 30 mL). El producte es purifica per

recristal·lització amb DMF/EtOH (5:1) obtenint-se 1.7 g (90%) del derivat acridínic diacilat desitjat.

Caracterització: **Rf** (DCM/MeOH 70:30) = 0.76; **RMN de ¹H** (DMSO-d₆, 200 MHz) δ: 11.35 (s, 2H, N-H), 9.59 (s, 1H, H-9), 8.89 (s, 2H, H-4,5), 8.37 (d, J=9.2 Hz, 2H, H-1,8), 7.82 (d, J=9.2 Hz, 2H, H-2,7), 3.95 (t, J=6.4 Hz, 4H, COCH₂CH₂Cl), 3.05 (t, J=6.4 Hz, 4H, COCH₂CH₂Cl); **RMN de ¹³C** (DMSO-d₆, 63 MHz) δ: 170.6 (NHCOCH₂), 146.5 (C-9), 142.3 (C-11,12), 131.8 (C-1,3,6,8), 122.2 (C-10,13), 121.6 (C-5,4), 104.7 (C-2,7), 38.8-41.4 (COCH₂CH₂Cl), 38.8-41.4 (COCH₂CH₂Cl); **EM** (MALDI-TOF) *m/z*: 390.66 [M+1]⁺.

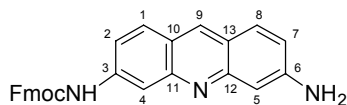
1.1.6 Síntesi de la 3,6-bis(3-piperidinopropionamido)acridina A7



Es pesen 75 mg del derivat acridínic **A6** i s'afegeixen 3 mL d'EtOH i una punta d'espàtula de KI (~25 mg). La suspensió resultant es porta a reflux. Un cop té lloc el reflux, s'addiciona poc a poc una solució de piperidina en EtOH (150 μL de piperidina en 0,5 mL d'EtOH). La reacció es controla per CCF (DCM/MeOH 7:3) i s'atura al cap de 2 hores. Primerament es refreda la suspensió fins a assolir la temperatura ambient i seguidament se submergeix aquesta en un bany de gel durant 30 min. Es filtra el precipitat en un Büchner i es renta el sòlid amb dietilèter (2 x 10 mL). El producte obtingut es purifica per recristal·lització en DMF/EtOH (4:1) obtenint-se 40 mg (43%) del derivat desitjat.

Caracterització: **Rf** (DCM/MeOH 70:30) = 0.05; **RMN de ¹H** (CDCl₃, 200 MHz) δ: 11.79 (s, 2H, CONH), 8.60 (s, 1H, H-9), 8.16 (s, 2H, H-4,5), 7.93 (m, 4H, H-1,2,7,8), 2.73 (t, 4H, COCH₂CH₂N), 2.61 (m, 12H, N(CH₂CH₂)₂CH₂, COCH₂CH₂N), 1.77 (m, 8H, N(CH₂CH₂)₂CH₂), 1.61 (m, 4H, N(CH₂CH₂)₂CH₂); **RMN de ¹³C** (DMSO-d₆, 63 MHz) δ: 171.3 (NHCOCH₂), 150.2 (C-9), 141.1 (C-11,12), 140.3 (C-3,6), 129.7 (C-1,8), 122.9 (C-10,13), 120.5 (C-5,4), 114.5 (C-2,7), 54.4 (CH₂N(CH₂CH₂)₂CH₂), 54.0 (N(CH₂CH₂)₂CH₂), 34.2 (COCH₂), 29.5 (N(CH₂CH₂)₂CH₂), 24.3 (N(CH₂CH₂)₂CH₂); **EM** (FAB(+)) *m/z*: 488.39 [M+H]⁺; **pf**: 249-250°C.

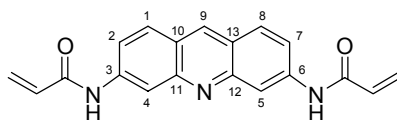
1.1.7 Síntesi de la 3-*N*-Fmoc-proflavina A11



Es dissolen 0.5 g d'hydroclorur de proflavina (2 mmol) en 7 mL d'acetona destil·lada. Un cop s'ha dissolt tot el sòlid, s'addicionen 790 mg (1.5 eq.) de clorur d'Fmoc en tres fraccions diferents en intervals de 30 minuts. Es deixa reaccionar a temperatura ambient i sota atmosfera d'argó durant 2 dies. Passat aquest temps, s'evapora el dissolvent a sequedat i el cru obtingut es purifica per cromatografia en fase sòlida en gel de sílice. Eluint amb DCM i quantitats creixents de MeOH (0-10%) s'obtenen 300 mg del producte desitjat (35%).

Caracterització: **Rf** (DCM/MeOH 70:30) = 0.; **RMN de ^1H** (CD_3OD , 200 MHz) δ : 8.91 (s, 1H, H-9), 8.39 (s, 1H, H-4), 8.02 (d, $J=8.8$ Hz, 1H, H-1), 7.93 (d, $J=8.8$ Hz, 1H, H-8), 7.9-7.3 (m, 9H, Ar(Fmoc)-H, H-2), 7.15 (d, $J=8.8$ Hz, H-7), 6.81 (s, 1H, H-5), 4.61 (d, $J=6.6$ Hz, COOCH_2CH), 4.3 (t, $J=6.6$ Hz, COOCH_2CH).

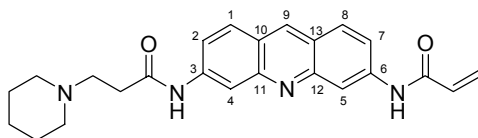
1.1.8 Síntesi de la 3,6-bis(acriloilamido)acridina A16



Es cobreixen 2.5 g (10 mmol) d'hydroclorur de proflavina amb clorur d'acriloil (70 mL) i es porta la suspensió a reflux durant 4 hores. Es filtra la suspensió resultant amb un embut Büchner i el sòlid es renta amb Et_2O (4 x 25 mL). El cru obtingut es purifica per cromatografia en columna en gel de sílice usant com a eluent acetona amb quantitats creixents de TEA (0-5%) i quantitats creixents de MeOH (0-30%). S'obtenen 2.3 g (80%) del producte esperat.

Caracterització: **Rf** (Acetona/TEA 98:2) = 0.66; **RMN de ^1H** (DMSO-d_6 , 200 MHz) δ : 11.62 (s, 2H, NH), 9.50 (s, 1H, H-9), 8.88 (s, 2H, H-4,5), 8.28 (d, $J=9.2$ Hz, 2H, H-1,8), 7.90 (d, $J=9.2$ Hz, 2H, H-2,7), 6.70 (dd, $J_{\text{trans}}=17$ Hz, $J_{\text{cis}}=10$ Hz, 2H, $\text{COCH}_A=\text{CH}_B\text{H}_C$), 6.38 (dd, $J_{\text{trans}}=17$ Hz, $J_{\text{gem}}=1$ Hz, 2H, $\text{COCH}_A=\text{CH}_B\text{H}_C$), 5.90 (dd, $J_{\text{cis}}=10$ Hz, $J_{\text{gem}}=1$ Hz, 2H, $\text{COCH}_A=\text{CH}_B\text{H}_C$); **RMN de ^{13}C** (DMSO-d_6 , 63 MHz) δ : 160.8 (NHCOCH), 146.6 (C-9), 137.6 (C-11,12), 132.4 (C-3,6), 128.7 (COCHCH_2), 126.3 (COCHCH_2), 124.8 (C-1,8), 119.7 (C-10,13), 117.3 (C-2,7), 111.6 (C-4,5); **EM** (MALDI-TOF: m/z : 318.72 $[\text{M}+1]^+$).

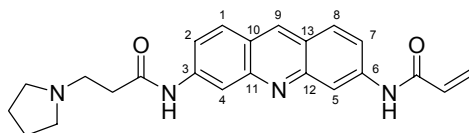
1.1.9 Síntesi de la 3-(3-piperidinopropionamido)-6-acriloil-amidoacridina A17



Es dissolen 1.6 g (5 mmol) de 3,6-bis(acriloilamido)acridina **A16** en 400 mL d'EtOH. Paral·lelament es dissolen 180 μ L de piperidina (0.5 eq) en 10 mL d'EtOH. Seguidament s'addiciona gota a gota i sota agitació constant la solució de piperidina a la del derivat d'acridina i es deixa reaccionar tota la nit. S'evapora l'EtOH a sequedat i s'obté un sòlid que es purifica per cromatografia en columna en gel de sílice usant com a eluent acetona i quantitats creixents de TEA (0-5%) i MeOH (0-10%). S'obtenen 560 mg (55.1%) del producte desitjat.

Caracterització: **Rf** (DCM/MeOH 70:30) = 0.23; **RMN de ^1H** (acetona- d_6 , 200 MHz) δ : 11.20 (s, 1H, NH), 9.88 (s, 1H, NH), 8.76 (s, 1H, H-9), 8.67 (1H, H-4), 8.54 (s, 1H, H-5), 8.01 (d, J=9 Hz, 2H, H-1,8), 7.78 (d, J=9 Hz, 1H, H-2), 7.65 (d, J=9 Hz, 1H, H-7), 6.47 (m, 2H, $\text{CH}_A=\text{CH}_B\text{H}_C$), 5.77 (dd, $J_{\text{cis}}=9$ Hz, $J_{\text{gem}}=1.8$ Hz, $\text{CH}_A=\text{CH}_B\text{H}_C$), 2.8-2.4 (m, 6H, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{CH}_2$), 2.2-1.9 (m, 2H, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 1.8-1.4 (m, 6H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{CH}_2$); **RMN de ^{13}C** (DMSO- d_6 , 63 MHz) δ : 169.7 (NHCOCHCH $_2$), 164.4 (NHCOCH $_2$), 149.9 (C-11), 141.6 (C-9), 141.3 (C-12), 136.1 (C-1,8), 132.2 (C-3), 129.8 (C-6), 129.7 (COCHCH $_2$), 128.2 (C-10), 123.1 (COCHCH $_2$), 123.0 (C-13), 122.9 (C-4), 120.7 (C-5), 114.7 (C-2), 113.8 (C-7), 63.7 ($\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{CH}_2$), 29.6 ($\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 24.3 ($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{CH}_2$), 19.8 ($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{CH}_2$); **EM** (MALDI-TOF) m/z : 403.72 [$\text{M}+1$] $^+$.

1.1.10 Síntesi de la 3-(3-pirrolidinopropionamido)-6-acriloil-amidoacridina A18

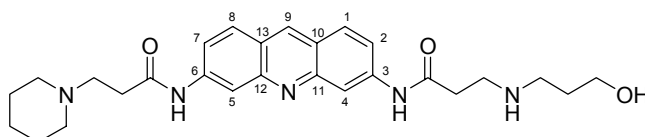


Es dissolen 2.5 g (11.5 mmol) de 3,6-bis(acriloilamido)acridina **A16** en 600 mL d'EtOH. Paral·lelament es dissolen 576 μ L de pirrolidina (0.6 eq) en 25 mL d'EtOH. Seguidament s'addiciona gota a gota i sota agitació constant la solució de pirrolidina a la del derivat d'acridina i es deixa reaccionar tota la nit. S'evapora l'EtOH a sequedat i s'obté un sòlid que es purifica per cromatografia en columna en gel de sílice usant com

a eluent acetona i quantitats creixents de TEA (0-5%) i MeOH (0-15%). S'obtenen 1.2 mg (40%) del producte desitjat.

Caracterització: **RMN de ^1H** (CD_3OD , 200 MHz) δ : 8.78 (s, 1H, H-9), 8.59 (1H, H-4), 8.54 (s, 1H, H-5), 8.03 (d, $J=9$ Hz, 2H, H-1,8), 7.90 (d, $J=9$ Hz, 1H, H-2), 7.73 (d, $J=9$ Hz, 1H, H-7), 7.65 (m, 2H, $\text{CH}_A=\text{CH}_B\text{H}_C$), 5.77 (dd, $J_{\text{cis}}=9$ Hz, $J_{\text{gem}}=1.8$ Hz, $\text{CH}_A=\text{CH}_B\text{H}_C$), 3.01 (t, 2H, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2.75 (m, 6H, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{CH}_2$), 1.9 (m, 6H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{CH}_2$); **EM** (MALDI-TOF) m/z : 390.13 $[\text{M}+1]^+$, **RMN de ^{13}C** (DMSO-d_6 , 63 MHz) δ : 164.8 (NHCOCHCH_2 , NHCOCH_2), 147.3 (C-9), 139.1 (C-11,12), 135.1 (C-3,6), 129.8 (COCHCH_2), 128.3 (COCHCH_2), 127.6 (C-1,8), 122.0 (C-10,13), 119.0 (C-2,7), 112.8 (C-4,5), 67.2 ($\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2$), 52.8 ($\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2$), 50.3 ($\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 22.2 ($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2$); **HPLC** t_R = 18.2 min. (C_8 ; 5-100% B en 30 min.; A: 0.045% TFA en H_2O , B: 0.036% TFA en ACN).

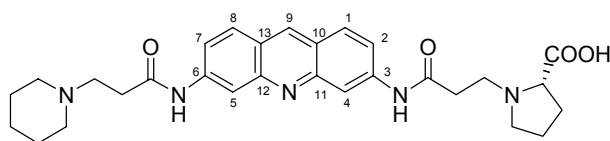
1.1.11 Síntesi de la 3-(3-(*N*-3-amino-1-propanol)-propionamido)-6-(3-piperidinopropionamido)acridina A19



Es dissolen 350 mg (0.87 mmol) de 3-(3-piperidinopropionamido)-6-(acriolilamido)acridina **A17** en 400 mL d'EtOH, s'hi addicionen 325 μL (5 eq.) de 3-amino-1-propanol i es deixa reaccionar tota la nit. S'evapora el dissolvent a sequedat per obtenir un oli. El producte es purifica per cromatografia en columna en gel de sílice eluint amb DCM i quantitats creixent de TEA (0-10%) i MeOH (0-30%). Per tal d'acabar de purificar el producte s'ha de fer una altra cromatografia en columna en gel de sílice usant les mateixes condicions. S'obtenen 60 mg (14%) del producte esperat.

Caracterització: **Rf** (DCM/MeOH/TEA 60:30:10) = 0.2; **RMN de ^1H** (CD_3OD , 300 MHz) δ : 8.88 (s, 1H, H-9), 8.61 (s, 1H, H-4), 8.58 (s, 1H, H-5), 8.10-8.06 (m, 2H, H-1,8), 7.75-7.70 (m, 2H, H-2,7), 3.83 (t, $J=3.8$ Hz, 2H CH_2OH), 3.1-2.9 (m, 4H, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 2.9-2.7 (m, 6H, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{CH}_2$), 2.1-1.9 (m, 4H, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 1.9-1.5 (m, 6H, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2\text{CH}_2$), 1.5-1.3 (t, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$); **RMN de ^{13}C** (CD_3OD , 63 MHz) δ : 172.5 (NHCOCH_2), 149.5 (C-9), 141.0 (C-11,12), 136.6 (C-3,6), 129.3 (C-1,8), 123.4 (C-10,13), 120.3 (C-5,4), 113.8 (C-2,7), 59.5 (CH_2OH), 53.6 ($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2$), 53.3 ($\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{NCH}_2$), 43.7 ($\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 31.8 ($\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 24.1 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 22.5 ($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2$); **EM** (MALDI-TOF) m/z : 478.61 $[\text{M}+1]^+$.

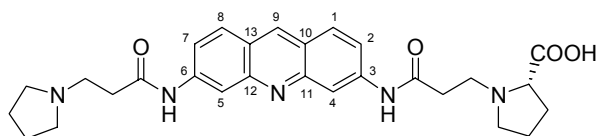
1.1.12 Síntesi de la 3-(3-N-(L-prolina)propionamido)-6-(3-piperidinopropionamido)acridina A20



Es pesen 100 mg (0.249 mmol) de 3-(3-piperidinopropionamido)-6-(acriloilamido)acridina **A17** i es dissolen en MeOH. Paral·lelament es dissolen també en MeOH 286 mg (10 eq.) de L-prolina. S'addiciona la segona solució sobre la primera i es deixa reaccionar a temperatura ambient sota agitació magnètica durant una nit. S'evapora el dissolvent a sequedat i el cru de reacció obtingut es purifica per cromatografia en fase sòlida eluint amb acetona i quantitats creixents primerament de TEA (0-5%) i llavors de MeOH (0-20%). S'obtenen 80 mg del producte desitjat (62%).

Caracterització: **Rf** (DCM/MeOH 70:30) = 0.1; **RMN de ¹H** (CD₃OD, 200 MHz) δ : 8.55 (s, 1H, H-9), 8.29 (s, 1H, H-4), 8.26 (s, 1H, H-5), 7.9-7.7 (m, 2H, H-1,8), 7.7-7.5 (m, 2H, H-2,7), 4.32 (t, J=4.4 Hz, 1H, NCHCOOH), 4.08-3.80 (m, 2H, CH₂NCH(COOH)CH₂), 3.3-2.8 (m, 10H, CH₂N); **RMN de ¹³C** (CD₃OD, 63 MHz) δ : 175.3 (COOH) 171.2 (NHCOCH₂), 170.1 (NHCOCH₂), 150.2 (C-9), 141.1 (C-11,12), 140.2 (C-3,6), 129.7 (C-1,8), 123.0 (C-10,13), 120.7 (C-5,4), 114.5 (C-2,7), 68.2 (NCHCOOH), 54.4 (COCH₂CH₂NCH₂), 54.0 (N(CH₂)₂), 50.6 (CH₂NHCOOH), 43.0 (CH₂N(CH₂)₂), 34.2 (COCH₂CH₂NHCOOH), 29.5 (COCH₂CH₂N(CH₂)₂), 25.6 (NCHCOOHCH₂), 24.0 (NCH₂CH₂CH₂CHCOOH), 23.9 (N(CH₂CH₂)₂); **EM** (MALDI-TOF): *m/z*: 519.15 [M+1]⁺; **HPLC** *t_R* = 9.2 min. (C₈; 5-35% B en 15 min.; A: 0.045% TFA en H₂O, B: 0.036% TFA en ACN).

1.1.13 Síntesi de la 3-(3-N-(L-prolina)-propionamido)-6-(3-pirrolidinopropionamido)acridina A21

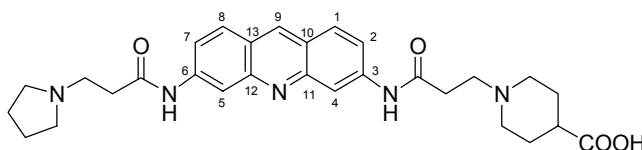


Es dissolen 310 mg (0.80 mmol) de 3-(3-pirrolidinopropionamido)-6-(acriloilamido)acridina **A18** en MeOH. Es pesen 184 mg (2 eq.) de prolina i s'addicionen a la dissolució anterior. Es deixa reaccionar a temperatura ambient 6 hores. S'evapora el dissolvent a sequedat i el cru de reacció obtingut es purifica per

MPLC utilitzant una columna de rebliment C₁₈ (0-35% B; A: 0.1%TFA en H₂O, B: 0.1%TFA en ACN). S'obtenen 323 mg del producte desitjat (80%).

Caracterització: **RMN de ¹H** (CD₃OD, 200 MHz) δ: 9.44 (s, 1H, H-9), 8.87 (m, 2H, H-4,5), 8.32 (d, J=3.8 Hz, 1H, H-1), 8.27 (d, J=3.8 Hz, 1H, H-8), 7.66-7.74 (m, 2H, H2-7), 4.33 (dd, J₁=9.4 Hz, J₂=6.2 Hz, 1H, NCHCOOH), 3.6-3.94 (m, 10H, CH₂N), 3.07-3.15 (m, 4H, COCH₂CH₂N), 2.48-2.67 (m, 2H, NCH₂CH₂CH₂CHCOOH), 2.00-2.30 (m, 6H, NCH₂CH₂); **RMN de ¹³C** (CD₃OD, 63 MHz) δ: 168.1 (COOH) 167.3 (NHCOCH₂), 167.0 (NHCOCH₂), 143.9 (C-9), 143.6 (C-11,12), 139.9 (C-3,6), 128.8 (C-1,8), 119.9 (C-10,13), 118.6 (C-5,4), 102.0 (C-2,7), 65.9 (NCHCOOH), 52.8 (COCH₂CH₂NCH₂), 52.0 (N(CH₂)₂), 48.3 (CH₂N(CH₂)₂), 47.8 (CH₂NHCOOH), 30.2 (COCH₂CH₂NHCOOH), 30.0 (COCH₂CH₂N(CH₂)₂), 26.0 (NCHCOOHCH₂), 20.5 (NCH₂CH₂CH₂CHCOOH), 20.4 (N(CH₂CH₂)₂); **EM** (MALDI-TOF): *m/z*: 504.59 [M+1]⁺; **HPLC** t_R = 8.0 min. (C₈; 5-35% B en 15 min.; A: 0.045% TFA en H₂O, B: 0.036% TFA en ACN).

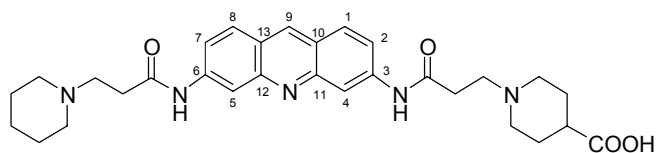
1.1.14 Síntesi de la 3-(3-*N*-(àcid isonipecòtic)propionamido)-6-(3-pirrolidinopropionamido)acridina A22



Es dissolen 200 mg (0.515 mmol) de 3-(3-pirrolidinopropionamido)-6-(acrilòilamido)acridina **A18** en MeOH. Es pesen 200 mg (3 eq.) d'àcid *iso*-nipecòtic i s'addicionen a la dissolució anterior. Es deixa reaccionar a temperatura ambient 2 hores. S'evapora el dissolvent a sequedat i el cru de reacció obtingut es purifica per MPLC utilitzant una columna de rebliment C₈ (5-50% B; A: 0.1%TFA en H₂O, B: 0.1%TFA en ACN). S'obtenen 250 mg del producte desitjat (94%).

Caracterització: **RMN de ¹H** (CD₃OD, 200 MHz) δ: 9.48 (s, 1H, H-9), 8.62 (s, 2H, H-4,5), 8.37 (d, J=9.3 Hz, 2H, H-1,8), 7.72 (dd, J₁=9.3 Hz, J₂=1.5 Hz, 2H, H-2,7), 3.75-3.85 (m, 8H, N(CH₂CH₂)₂), 3.3-3.4 (m, 4H, COCH₂CH₂N), 3.1-3.3 (m, 4H, COCH₂CH₂N), 2.9 (m, 1H, CHCOOH), 1.9-2.5 (m, 8H, N(CH₂CH₂)₂); **RMN de ¹³C** (D₂O, 63 MHz) δ: 176.5 (COOH) 169.6 (NHCOCH₂), 169.4 (NHCOCH₂), 144.3 (C-9), 144.2 (C-11,12), 139.0 (C-3,6), 130.0 (C-1,8), 120.2 (C-10,13), 119.9 (C-5,4), 102.9 (C-2,7), 53.8 (CHCOOH), 51.7 (N(CH₂CH₂)₂CHCOOH), 51.3 (N(CH₂CH₂)₂), 49.5 (CH₂N(CH₂CH₂)₂CHCOOH), 49.3 (CH₂N(CH₂CH₂)₂), 37.5 (COCH₂CH₂N), 24.8 (N(CH₂CH₂)₂CHCOOH), 22.0 (N(CH₂CH₂)₂); **EM** (MALDI-TOF): *m/z*: 518.17 [M+1]⁺; **HPLC** t_R = 9.1 min. (C₈; 5-35% B en 15 min.; A: 0.045% TFA en H₂O, B: 0.036% TFA en ACN).

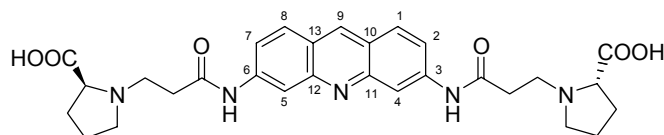
1.1.15 Síntesi de la 3-(3-*N*-(àcid isonipecòtic)propionamido)-6-(3-piperidinopropionamido)acridina **A23**



Es pesen 250 mg (0.62 mmol) de 3-(3-piperidinopropionamido)-6-(acriloilamido)acridina **A17** i es dissolen en MeOH. Es pesen 0.8 g (10 eq.) d'àcid isonipecòtic i s'addicionen a la solució anterior. La reacció es controla per EM (MALDI-TOF) i al cap de 3 hores s'evapora el dissolvent a sequedat i el cru de reacció obtingut es purifica per cromatografia en columna eluint amb DCM i quantitats creixents primerament de MeOH (0-30%) i llavors de TEA (0-5%). Per tal d'acabar de purificar el producte obtingut s'ha realitzat una altra cromatografia en columna molt curta eluint amb acetona i posteriorment quantitats creixents de TEA (0-5%). S'obtenen 170 mg del producte desitjat (52%).

Caracterització: **Rf** (DCM/MeOH 70:30) = 0.1; **RMN de ¹H** (CD₃OD, 200 MHz) δ: 8.56 (s, 1H, H-9), 8.32 (s, 1H, H-4), 8.24 (s, 1H, H-5), 7.9-7.7 (m, 2H, H-1,8), 7.7-7.5 (m, 2H, H-2,7), 3.75-3.85 (m, 8H, N(CH₂CH₂)₂), 3.3-3.4 (m, 4H, COCH₂CH₂N), 3.1-3.3 (m, 4H, COCH₂CH₂N), 2.9 (m, 1H, CHCOOH), 1.9-2.5 (m, 8H, N(CH₂CH₂)₂); **RMN de ¹³C** (CD₃OD, 63 MHz) δ: 171.7 (COOH), 165.3 (NHCOCH₂), 149.7 (C-9), 141.1 (C-11,12), 136.5 (C-3,6), 131.1 (C-1,8), 123.6 (C-10,13), 120.4 (C-5,4), 114.4 (C-2,7), 65.7 (NCHCOOH), 52.8 (COCH₂CH₂NCH₂), 48.3 (COCH₂CH₂N), 29.8 (COCH₂CH₂N), 27.5 (N(CH₂CH₂)₂CHCOOH), 20.6 (N(CH₂CH₂)₂CH₂); **EM** (MALDI-TOF): *m/z*: 533.30 [M+1]⁺; **HPLC** *t_R* = 9.8 min. (C₈; 5-35% B en 15 min.; A: 0.045% TFA en H₂O, B: 0.036% TFA en ACN).

1.1.16 Síntesi de la 3,6-bis(3-*N*-(L-prolina)propionamido)acridina **A24**

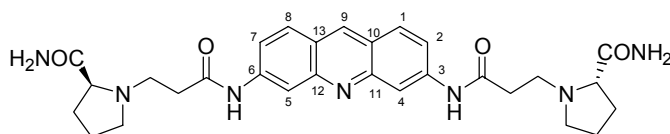


Es dissolen 250 mg (0.78 mmol) de 3,6-bis(acriloilamido)acridina **A16** en 200 mL d'EtOH. Paral·lelament es dissolen 907 mg (10 eq.) de L-prolina en el mínim MeOH possible. Seguidament s'addiciona la dissolució de L-prolina a la del derivat acridínic. La mescla resultant es deixa reaccionar durant 24h a temperatura ambient sota

agitació constant. S'evapora el dissolvent a sequedat i s'obté un sòlid que és soluble en aigua. El producte es purifica per HPLC preparatiu utilitzant una columna de rebliment C₄ (10-40% B en 1 hora; A: 10 mM NH₄OAc, B: ACN). S'obtenen 200 mg (46%) del producte desitjat.

Caracterització: **RMN de ¹H** (CD₃OD, 200 MHz) δ: 8.73 (s, 1H, H-9), 8.33 (s, 2H, H-4,5), 7.95 (d, J=9 Hz, 2H, H-1-8), 7.68 (dd, J₁=9 Hz, J₂=1.8 Hz, 2H, H-2,7), 4.10 (m, 2H, NCHCOOH), 3.95-4.01 (m, 2H, COCH₂CH₂NCH₂), 3.70 (t, J=6 Hz, 4H, COCH₂CH₂N), 3.27-3.34 (m, 2H, COCH₂CH₂NCH₂), 3.09 (t, J=6 Hz, 4H, COCH₂CH₂N), 2.00-2.60 (m, 8H, NCH₂CH₂CH₂CHCOOH); **RMN de ¹³C** (CD₃OD, 63 MHz) δ: 171.0 (COOH), 169.6 (NHCOCH₂), 150.0 (C-9), 140.9 (C-11,12), 135.8 (C-3,6), 129.7 (C-1,8), 123.0 (C-5,4), 120.7 (C-10,13), 114.6 (C-2,7), 69.0 (NCHCOOH), 54.8 (COCH₂CH₂NCH₂), 50.8 (COCH₂CH₂N), 33.4 (COCH₂CH₂N), 29.5 (NCH(COOH)CH₂), 23.9 (NCH₂CH₂CH₂CHCOOH); **EM** (MALDI-TOF): *m/z*: 549.76 [M+1]⁺; **HPLC** t_R = 11.9 min. (C₈; 10-35% B en 20 min.; A: 0.045% TFA en H₂O, B: 0.036% TFA en ACN).

1.1.17 Síntesi de la 3,6-bis(3-*N*-(L-prolinamida)propionamido)-acridina A25



Es dissolen 75 mg (0.24 mmol) de 3,6-bis(acriloilamido)acridina **A16** en 50 mL de MeOH. Pesen 135 mg (5eq.) de L-prolinamida i ho addiciono a la dissolució anterior. La mescla resultant es deixa reaccionar durant 5h a temperatura ambient sota agitació constant. S'evapora el dissolvent a sequedat i s'obté un sòlid que es purifica per MPLC preparatiu utilitzant una columna de rebliment C₈ (5-30% B; A: 0.1%TFA en aigua, B: 0.1%TFA en ACN). S'obtenen 115 mg (90%) del producte desitjat.

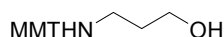
Caracterització: **RMN de ¹H** (CD₃OD, 200 MHz) δ: 9.42 (s, 1H, H-9), 8.76 (s, 2H, H-4,5), 8.26 (d, J=8.4 Hz, 2H, H-1,8), 7.70 (d, J=8.4 Hz, 2H, H-2,7), 4.38 (t, 2H, NCHCONH₂), 3.5-4.0 (m, 8H, COCH₂CH₂NCH₂), 3.09 (t, 4H, COCH₂CH₂N), 1.90-2.80 (m, 8H, NCH₂CH₂CH₂CHCONH₂); **RMN de ¹³C** (CD₃OD, 63 MHz) δ: 167.6 (CHCONH₂, NHCOCH₂), 143.9 (C-9), 143.7 (C-11,12), 140.0 (C-3,6), 128.8 (C-1,8), 119.9 (C-10,13), 118.8 (C-5,4), 102.1 (C-2,7), 65.7 (NCHCONH₂), 52.8 (COCH₂CH₂NCH₂), 48.3 (COCH₂CH₂N), 29.8 (COCH₂CH₂N), 27.5 (NCH(CONH₂)CH₂), 20.6 (NCH₂CH₂CH₂CHCONH₂); **HPLC** t_R = 8.36 min. (C₈; 5-35% B en 15 min.; A: 0.045% TFA en H₂O, B: 0.036% TFA en ACN).

1.2 Síntesi de conjugats acridina-oligonucleòtid

1.2.1 Obtenció dels 5'-amino-oligonucleòtids OL1-6

1.2.1.1 Síntesi de l'espaiador LN3

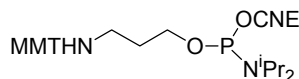
1.2.1.1.1 Síntesi del 3-*N*-MMT-3-amino-1-propanol



Es dissolen 7 mL (93 mmol) de 3-amino-1-propanol en piridina anh. sota atmosfera d'argó. Es pesen 2 g (0.1 eq.) de clorur d'MMT i s'addicionen a la dissolució anterior. La mescla es deixa reaccionar durant 3 dies. S'evapora la piridina a sequedat (per tal d'acabar d'eliminar-la es fan coevaporacions amb toluè) i es dissol l'oli obtingut en DCM prèviament neutralitzat amb alumina bàsica. Es fan extraccions amb àcid cítric 10% (2x) i amb una solució saturada de NaCl (2x). La fase orgànica s'asseca sobre MgSO₄ anh. i el dissolvent s'evapora a sequedat. El cru obtingut es purifica per cromatografia en columna en gel de sílice eluint primerament amb hexà i quantitats creixents de DCM (5-100%) mantenint sempre un 2% de TEA en la fase mòbil. S'obté 1.3 g (58%) del producte desitjat.

Caracterització: **R_f** (DCM/Hexà/TEA 79:19:2) = 0.4; **RMN de ¹H** (CDCl₃, 200 MHz) δ: 6.77-7.44 (m, 14H, Ar-H), 3.88 (t, J=5.2 Hz, 2H, H_a), 3.78 (s, 1H, OH), 2.40 (t, J=5.2 Hz, 2H, H_c), 1.7 (m, J=5.2 Hz, 2H, H_b); **HPLC** t_R = 12.8 min. (C₁₈; 50-100% B en 30 min.; A: 10 mM NH₄OAc en H₂O, B: ACN).

1.2.1.1.2 Síntesi de l'O-fosforamidit del 3-*N*-MMT-3-amino-1-propanol LN3



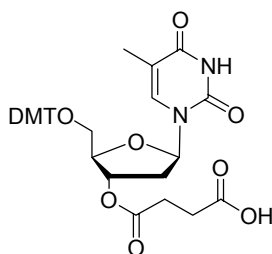
Es pesen 300 mg (0.86 mmol) de 3-*N*-MMT-3-amino-1-propanol **34** i es deixen 4 hores a un dessecador de buit que contingui pentòxid de fòsfor i hidròxid de potassi. Es fan dues coevaporacions amb ACN anh., s'addicionen 42 mg (0.7 eq.) de tretrazole en el mateix baló i es deixa 30 minuts més al dessecador. Posteriorment es dissolen els reactius en 7 mL d'ACN anh. i s'addicionen 800 μL (3 eq.) de bis-fosfina. Es deixa reaccionar tota la nit sota atmosfera d'argó. S'evapora el dissolvent a sequedat i es

dissol el cru obtingut en DCM prèviament neutralitzat amb alúmina bàsica. Es fan extraccions amb una solució saturada de bicarbonat de sodi (2x) i amb una de NaCl (2x). La fase orgànica s'asseca sobre MgSO₄ anh. i el dissolvent s'evapora a sequedat. S'obtenen 650 mg d'un oli impur.

Caracterització: **RMN de ³¹P** (CDCl₃, 120 MHz) δ: 144.981, 11.888 (impuresa); **HPLC** t_R = 28.6 min. (C₁₈; 50-100% B en 30 min.; A: 10 mM NH₄OAc en H₂O, B: ACN).

1.2.1.2 Obtenció de les nucleotidil resines DMT-T-succ-Ala-MBHA-PS i DMT-dA^{Bz}-succ-Ala-MBHA-PS

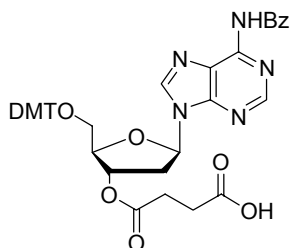
1.2.1.2.1 Síntesi del nucleosil derivat DMT-T-succ



Es pesen en un baló 1.1 g del 5'-DMT-nucleòsid, es coevapora amb ACN anh. dues vegades, es dissol en uns 15 mL de pir. anh. i s'hi addicionen 2.5 eq. d'anhidrid succínic i 0.6 eq. de DMAP. La reacció es deixa tot la nit en agitació a temperatura sota atmosfera d'argó. Es controla la reacció per CCF (DCM/MeOH 9:1). Un cop completada, s'evapora el dissolvent a sequedat i es dissol el cru en 100 mL de DCM. Es fan extraccions amb àcid cítric 10% (3x) i amb una solució saturada de NaCl (2x). La fase orgànica s'asseca sobre MgSO₄ anh. i el dissolvent s'evapora a sequedat. El cru obtingut es dissol en la mínima quantitat possible de DCM i es precipita sobre hexà fred en un tub de centrífuga. Se centrifuga el tub durant 10 min a 4°C i es decanta l'hexà. S'obtenen 1.186 g (99%) del producte desitjat.

Caracterització: **Rf** (DCM/MeOH 9:1) = 0.1; **RMN de ¹H** (CDCl₃, 200 MHz) δ: 9.8 (s, 1H, NH), 7.59 (s, 1H, H-6), 6.6-7.4 (m, 14H, Ar-H), 6.38 (t, 1H, H-1'), 5.45 (m, 1H, H-3'), 4.18 (m, 1H, H-4'), 3.77 (s, 6H, Ar-OCH₃), 3.44 (m, 2H, H-5'/5''), 2.2-2.8 (m, 6H, OCOCH₂CH₂COOH, H-2'/2''), 1.36 (s, 3H, Ar-CH₃).

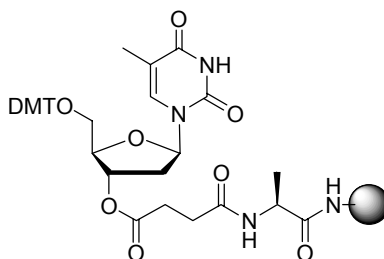
1.2.1.2.2 Síntesi del nucleosil derivat DMT-dA^{Bz}-succ



Es pesen en un baló 1.1 g del 5'-DMT-dA^{Bz}-OH (1.67 mmol), es coevapora amb ACN anh. dues vegades, es dissol en uns 15 mL de pir. anh. i s'hi addicionen 419 mg d'anhidrid succínic (2.5 eq.) i 125 mg de DMAP (0.6 eq.). La reacció es deixa tot la nit en agitació a temperatura sota atmosfera d'argó. Es controla la reacció per CCF (DCM/MeOH 9:1). En cas que no s'hagi completat s'addiciona més anhidrid succínic i DMAP i es deixa reaccionar fins que s'hagi convertit tot el nucleòsid de partida. Llavors s'evapora el dissolvent a sequedat i es dissol el cru en 100 mL de DCM. Es fan extraccions amb àcid cítric 10% (3x) i amb una solució saturada de NaCl (2x). La fase orgànica s'asseca sobre MgSO₄ anh. i el dissolvent s'evapora a sequedat. El cru obtingut es dissol en la mínima quantitat possible de DCM i es precipita sobre hexà fred en un tub de centrifuga. Se centrifuga el tub durant 10 min a 4°C i es decanta l'hexà. S'obtenen 1.186 g (98%) del producte desitjat.

Caracterització: **R_f** (DCM/MeOH 9:1) = 0.1; **RMN de ¹H** (CDCl₃, 200 MHz) δ: 8.68 (s, 1H, H-8), 8.15 (s, 1H, H-2), 6.98-7.4 (m, 14H, Ar-H), 6.40 (t, 1H, H-1'), 5.42 (m, 1H, H-3'), 4.22 (m, 1H, H-4'), 3.66 (s, 6H, Ar-OCH₃), 3.36 (m, 2H, H-5'/5''), 2.50-3.00 (m, 6H, OCOCH₂CH₂COOH, H-2'/2'').

1.2.1.2.3 Obtenció de la nucleotidil resina DMT-T-succ-Ala-MBHA-PS



Es pesa d'1 g de resina MBHA (f=0.70 mmol/g) en una xeringa proveïda d'un filtre de polipropilè i es du a terme el tractament previ (apartat E.2 de Materials i mètodes). Un cop acondicionada, es pesen en un vial 76 g d'Fmoc-Ala-OH (0.35 eq.) i 50 mg de DCC (0.35 eq.), els quals es dissolen en una mescla DCM/DMF. S'addiciona aquesta solució sobre la resina i es deixa reaccionar durant 1 hora. Es renta bé la resina amb DMF, DCM i MeOH i es diposita tota la nit al dessecador. Es pesa una

petita alíquota de la resina per tal de determinar-ne la nova funcionalització. Aquesta hauria de trobar-se al voltant de 20-25 mmol/g i en cas de ser força més baixa caldria repetir l'acoblament d'Fmoc-Ala-OH. En aquest cas, s'ha obtingut una funcionalització de 0.17 mmol/g, de manera que es procedeix amb el bloqueig dels llocs reactius. S'infla la resina amb DCM i es tracta amb 430 μL d'anhídrid acètic (10 eq.) en DMF durant 10 minuts. Seguidament s'addicionen sobre la mescla de reacció 768 μL de DIEA (10 eq.) i es deixa la reacció 10 minuts més. Passat aquest temps es renta bé la resina amb DMF, DCM i MeOH. Es realitza l'assaig de la ninhidrina per tal de comprovar que no queden grups amino lliures ancorats a la resina. El resultat és negatiu, de manera que es pot procedir amb la desprotecció dels residus d'Ala.

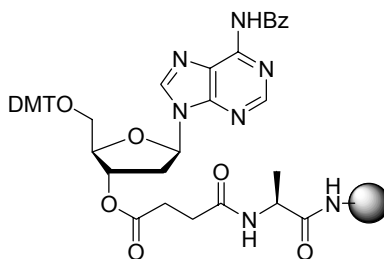
Es pesen 400 mg de la resina Fmoc-Ala-PS i es dipositen en una xeringa proveïda d'un filtre de polipropilè. Es duen a terme els següents tractaments per tal d'eliminar el grup Fmoc i obtenir els grups amines lliures:

<i>Etapa</i>	<i>Reactiu</i>	<i>Nº de tractaments</i>	<i>Temps (min.)</i>
1	DCM	4	1
2	DMF	4	1
3	Pip. 20% en DMF	3	3
4	DMF	1	1

Taula 1.1 – Tractaments realitzats a la resina per tal d'eliminar el grup Fmoc.

Finalment té lloc la incorporació del derivat succinilat de la DMT-T. Es pesen en un vial 131.5 mg de DMT-T-succ (3 eq.) i 42 mg de DCC (3 eq.) i es dissolen en una mescla DCM/DMF. S'addiciona aquesta dissolució sobre la resina i es deixa reaccionar durant 4 hores. Es renta bé la resina amb DMF, DCM i MeOH. Es realitza l'assaig de la ninhidrina per tal de comprovar que no queden grups amino lliures ancorats a la resina. El resultat és negatiu, de manera que ja pot tenir lloc la síntesi d'oligonucleòtids.

1.2.1.2.4 Obtenció de la nucleotidil resina DMT-dA^{Bz}-succ-Ala-MBHA-PS



Es pesa d'1.14 g de resina MBHA ($f=0.70$ mmol/g) en una xeringa proveïda d'un filtre de polipropilè i es du a terme el tractament previ (apartat E.2 de Materials i mètodes). Un cop acondicionada, es pesen en un vial 90 g d'Fmoc-Ala-OH (0.35 eq.) i 60 mg de DCC (0.35 eq.), els quals es dissolen en una mescla DCM/DMF. S'addiciona

aquesta solució sobre la resina i es deixa reaccionar durant 1 hora. Es renta bé la resina amb DMF, DCM i MeOH i es diposita tota la nit al dessecador. Es pesa una petita alíquota de la resina per tal de determinar-ne la nova funcionalització. Aquesta hauria de trobar-se al voltant de 20-25 mmol /g i en cas de ser força més baixa caldria repetir l'acoblament d'Fmoc-Ala-OH. En aquest cas, s'ha obtingut una funcionalització de 0.26 mmol/g, de manera que es procedeix amb el bloqueig dels llocs reactius. S'infla la resina amb DCM i es tracta amb 473 μ L d'anhídrid acètic (10 eq.) en DMF durant 10 minuts. Seguidament s'addicionen sobre la mescla de reacció 853 μ L de DIEA (10 eq.) i es deixa la reacció 10 minuts més. Passat aquest temps es renta bé la resina amb DMF, DCM i MeOH. Es realitza l'assaig de la ninhidrina per tal de comprovar que no queden grups amino lliures ancorats a la resina. El resultat és negatiu, de manera que es pot procedir amb la desprotecció dels residus d'Ala.

Es pesen 300 mg de la resina Fmoc-Ala-PS i es dipositen en una xeringa proveïda d'un filtre de polipropilè. Es duen a terme els següents tractaments per tal d'eliminar el grup Fmoc i obtenir els grups aminos lliures:

<i>Etapa</i>	<i>Reactiu</i>	<i>Nº de tractaments</i>	<i>Temps (min.)</i>
1	DCM	4	1
2	DMF	4	1
3	Pip. 20% en DMF	3	3
4	DMF	1	1

Taula 1.2 – Tractaments realitzats a la resina per tal d'eliminar el grup Fmoc.

Es pesen en un vial 177 mg de DMT-dA^{Bz}-succ (3 eq.) i 48 mg de DCC (3 eq.) i es dissolen en una mescla DCM/DMF. S'addiciona aquesta dissolució sobre la resina i es deixa reaccionar durant 4 hores. Es renta bé la resina amb DMF, DCM i MeOH. Es realitza l'assaig de la ninhidrina per tal de comprovar que no queden grups amino lliures ancorats a la resina. El resultat és negatiu, de manera que ja pot tenir lloc la síntesi d'oligonucleòtids.

1.2.1.3 Elongació de la cadena nucleotídica

S'ha treballat a escala de 5 μ mol, en reactors de tefló de 400 μ L de capacitat. Es preparen els reactius tal i com s'ha indicat anteriorment (apartat C.1 de Materials i mètodes) i es procedeix a l'elongació de la cadena al sintetitzador automàtic sobre les resines DMT-T-succ-Ala-MBHA-PS i DMT-dA^{Bz}-succ-Ala-MBHA-PS. El programa utilitzat ha estat el LD01 (veure apèndix), que consta esquemàticament de les següents etapes:

Etapa	Tractament	Dissolvents i reactius	Temps (s)
1	rentat	DCM	20
2	eliminació del DMT	3% TCA/DCM	120
3	rentats	DCM	200
4	neutralització	2% DIEA en DCM	30
5	rentats	ACN anh.	45
6	assecat	Argó	45
7	acoblament	fosforamidit (0.2M) en DCM + tetrazole (0.8M) en THF anh.	900
8	rentats	THF	30
9	acetilació	Ac ₂ O/NMI	120
10	rentats	DCM	60
11	oxidació	^t BuOOH (1M) en DCM	60
12	rentats	THF	60
		DMF	60
		DCM	60

Taula 1.3 – Etapes d'un cicle de síntesi en l'elongació de la cadena nucleotídica sobre suport de PS.

S'han sintetitzat les seqüències que es mostren a la taula, tenint lloc l'incorporació dels espaiadors de forma estàndard.

Nom	Seqüència	Linker	(M-H)⁻ obs.	(M-H)⁻ calc.
OL1[#]	⁵ CTAACCT ^{3'}	LN6	2505.81	2507.51
OL2	⁵ CTAACCT ^{3'}	LN3	2464.04	2465.46
OL3	⁵ CTAACCT ^{3'}	LN5	2493.98	2495.50
OL4[#]	⁵ CTAACCT ^{3'}	LN5+LO18	2840.44	2841.40
OL5	⁵ TCACTCAT ^{3'}	LN5	2509.52	2510.21
OL6	⁵ AACCCTAA ^{3'}	LN5	2528.23	2529.58

Taula 1.4 - 5'-Amino-oligonucleòtids sintetitzats. [#]Oligonucleòtids sintetitzats pel doctor Laurent Debéthune.

1.2.2 Obtenció dels conjugats acridina-oligonucleòtid C1-7

Es traspasa la resina on s'ha dut a terme a síntesi de l'oligonucleòtid del reactor de tefló a una xeringa de 5 mL de capacitat proveïda d'un filtre de polipropilè. Es tracta la resina amb una dissolució de TCA (3% en DCM) fins que ja no apareix coloració taronja. Es renta bé amb DCM i paral·lelament es dipositen en un vial el derivat acridínic (5 eq.), PFNB, (5 eq.), DIEA (25 eq.) i HOBt en quantitats catalítiques. Tota aquesta mescla es dissol amb 250 µL de LiCl 0.8 M en DMF/NMP i es deixa 15 minuts a temperatura ambient. Passat aquest temps s'addiciona aquesta dissolució sobre la resina i es deixa reaccionar 2.5 hores a temperatura ambient i sota agitació constant. Posteriorment es renta bé la resina amb DMF, DCM, MeOH i s'asseca al

buit. Es traspasa la tota la resina a un reactor de desancoratge i s'hi addiciona 2 mL d'una mescla NH₃/dioxà (1:1) i es deixa reaccionar a temperatura ambient durant 6 hores. Finalment es filtra la solució amb una xeringa proveïda d'un filtre de polipropilè recollint els filtrats en un baló. Es renten els grans de resina amb H₂O i MeOH, recollint els rentats en el mateix baló. S'evapora el dissolvent al buit fins que queda aproximadament 1 mL. Llavors el conjugat ja està a punt per ser analitzat per HPLC, EM (MALDI-TOF) o purificat per MPLC.

S'han obtingut els conjugats que es mostren a la taula:

Nom	Oligonucleòtid	Acridina	(M-H) ⁻ obs.	(M-H) ⁻ calc.	T _R [*] (min.)	OD ₂₆₀	Rdt.
C1 [#]	OL1	A20	3007.44	3006.77	13.7	48.5	10.8%
C2	OL2	A20	2964.64	2962.73	12.4	5.5	1.2%
C3 [#]	OL3	A21	2980.10	2980.71	12.1	63.1	14.0%
C4 [#]	OL3	A24	3023.77	3024.70	11.2	9.8	2.2%
C5	OL3	A22	2993.18	2994.74	11.4	41.4	9.2%
C6 [#]	OL4	A21	3319.97	3324.84	12.6	137.0	30.6%
C7	OL5	A21	2994.81	2996.56	12.5	7.3	1.6%
C8	OL6	A22	3027.48	3028.58	11.3	7.1	1.4%
C9	OL6	A21	3013.28	3014.58	11.9	9.0	1.8%

Taula 1.5 – Conjugats obtinguts. [#]Conjugats sintetitzats pel doctor Laurent Debéthune. *Gradient: 5-35% B en 15 min.; A: 10 mM NH₄OAc en H₂O, B: ACN/H₂O (1:1).

1.2.3 Càlcul del coeficient d'extinció molar de les acridines A21 i A22

Es preparen en quatre matrassos aforats de 25 mL dues dissolucions de cadascuna de les acridines (~12 mg) de concentració perfectament coneguda en tampó NH₄OAc 10 mM i s'ajusta el pH a 7. Posteriorment, s'enregistra l'absorbància a 260 nm i a 410 nm d'una dissolució de tampó NH₄OAc 10 mM, a la qual s'hi addicionen volums creixents (15 µL) de les dissolucions mare de les acridines A21 i A22.

A partir dels valors d'absorbància obtinguts per a cada longitud d'ona i dissolució de cadascuna de les dues acridines, es genera una gràfica on es representa l'absorbància respecte la concentració d'acridina. Aquesta gràfica és una recta on, segons la llei de Lambert-Beer, el pendent és el valor del coeficient d'extinció molar. Els valors d'extinció molar obtinguts per a cada acridina es mostren a la següent taula:

Acridina	ε ₂₆₀ (l·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹)	ε ₄₁₀ (l·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹)
A21	23404	4230
A22	19500	2409

Taula 1.6 – Valors d'ε₂₆₀ i ε₄₁₀ obtinguts per a les acridines A21 i A22.

2 EXPERIMENTAL CAPÍTOL 2

2.1 *Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)*

Tots els oligonucleòtids formadors de quàdruplex utilitzats, que contenen roig de metil i fluoresceïna, han estat adquirits a Oswel Research Products Ltd (Southampton, UK). El roig de metil i la fluoresceïna han estat incorporats en la cadena oligonucleotídica com a MeRed-dR i Fam-dR, respectivament. Les corbes de fusió s'han realitzat en un aparell Roche LightCycler utilitzant un volum de reacció total de 20 μ L. Aquest aparell és capaç de analitzar 32 mostres simultàniament. Per a cada reacció, la concentració final d'oligonucleòtid formador de quàdruplex ha estat de 0.25 μ M en el tampó apropiat (50 mM fosfat de potassi pH 7.37).

L'experiment típic de fusió consisteix primerament en una desnaturalització per escalfament de la mostra fins a 95°C, on es mantenen les mostres durant 5 minuts. Seguidament té lloc un refredament fins a arribar a 30°C, on es mantenen 5 minuts més. Finalment es repeteix tot el procediment, tenint així lloc una segona desnaturalització fins a arribar a 95°C, i 5 minuts després una segona renaturalització. Les velocitats, tant de refredament com d'esclafament, han estat majoritàriament de 0.1°C/segon (aquesta és la velocitat d'escalfament i refredament més lenta a la qual pot treballar l'aparell). L'enregistrament de la fluorescència emesa en les quatre transicions es du a terme de forma contínua al llarg dels experiments. El LightCycler conté una font d'excitació de 488 nm i tres canals d'enregistrament d'emissió de fluorescència a 520, 640 i 705 nm. En aquest estudi s'han enregistrat els canvis de fluorescència a 520 nm. En alguns casos s'han realitzat experiments amb velocitats menors gràcies a l'ús d'un programa especial. Aquest consisteix en fer que la temperatura augmenti o disminueixi en petits increments (1°C). Després de cada increment es manté la temperatura 1 minut per tal que s'assoleixi l'equilibri i es fa la mesura de fluorescència. Es repeteix aquest procediment fins a assolir les transicions desitjades.

Les temperatures de fusió (T_m) es calculen a partir de les primeres derivades de les corbes obtingudes en la primera renaturalització utilitzant el software de Roche LightCycler.

2.2 **Telomeric Repeat Amplification Protocol (TRAP)**

El assaigs de TRAP s'han realitzat emprant el TRAPeZe XL Telomerase Detection Kit, el qual s'ha adquirit a la casa comercial Chemicon International. Per tal de realitzar correctament els experiments tot el material de plàstic usat ha estat autoclavat. Igualment totes les dissolucions s'han preparat amb H₂O autoclavada i sempre ha estat necessari l'ús de guants.

2.2.1 **Extracció de la telomerasa**

Per tal de realitzar l'extracció de la telomerasa de les cèl·lules control se segueixen els següents passos:

- Se suspèn el *pellet* de l'extracte cel·lular que ve amb el kit (control positiu de telomerasa) en 200 µL de tampó de lisat CHAPS.
- S'incuba la suspensió en gel durant 30 minuts.
- Se centrifuga la mostra en una centrífuga per a eppendorfs a 12000 r.p.m. durant 20 minuts, a 4°C.
- S'aliquota el sobrenedant en 4 eppendorfs diferents (40 µL en cada eppendorf).
- Es guarden els eppendorfs al congelador entre -75 i -85°C.

Aquests extractes són estables durant almenys 1 any guardats entre -75 i -85°C i serveixen com a control positiu de telomerasa en cada un dels experiments, així com també per a veure la inhibició que produeixen els compostos avaluats (acridines i conjugats). Cal tenir cura de congelar ràpidament les alíquotes després de cada ús. Aquestes no es poden congelar-descongelar més de 10 vegades per tal d'evitar una pèrdua en l'activitat de l'enzim.

2.2.2 **Experiment TRAP**

2.2.2.1 **Preparació de mostres per a la generació de la recta de calibratge**

En primer lloc es duen a terme 4 dilucions consecutives 1:5 de la dissolució de **TSR8** que conté el kit. Aquesta solució té una concentració de 0.2 amol/µL, de manera que s'obtenen les diferents dissolucions que es mostren a la següent taula:

Nom	Conc. de TSR8 (amol/μL)	Dilució	Tampó CHAPS
A	0.2	-	-
B	0.04	5 μ L de dissolució A	20 μ L
C	0.008	5 μ L de dissolució B	20 μ L
D	0.0016	5 μ L de dissolució C	20 μ L

Taula 2.1 – Dissolucions de **TSR8** preparades per a dur a terme la recat de calibratge.

Un cop realitzades les dilucions necessàries, en 7 eppendorfs de 250 μ L de capacitat es dipositen els següents volums de cada dissolució:

Mostra	Nom	5X Mescla (μL)	Taq (μL)	Tel. (μL)	CHAPS (μL)	TSR8 (μL)	H₂O (μL)
1	Tel ctrl. +	10	0.4	2	-	-	37.6
2	Tel ctrl. -	10	0.4	-	2	-	37.6
3	TSR8 A	10	0.4	-	-	2 d'A	37.6
4	TSR8 B	10	0.4	-	-	2 de B	37.6
5	TSR8 C	10	0.4	-	-	2 de C	37.6
6	TSR8 D	10	0.4	-	-	2 de D	37.6
7	Taq ctrl. -	10	-	2	-	-	38

Taula 2.2 – Preparació de les mostres per a realitzar el calibratge.

La mostra 1 és el control positiu de la telomerasa, la 2 el negatiu, les 3-6 les que permetran generar la recta de calibratge i la 7 el control negatiu de Taq polimerasa.

2.2.2.2 Preparació de mostres per a analitzar capacitats d'inhibició de derivats acridínics

Les mostres es preparen en eppendorfs de 250 μ L de capacitat. En cada experiment hi ha d'haver un control positiu de telomerasa, un de negatiu, un control negatiu de Taq polimerasa i les mostres a estudiar. Per a cada acridina i conjugat avaluat es preparen tres dissolucions mare de concentracions al voltant de 5, 50 i 500 μ M respectivament. La composició global de cada mostra es pot resumir com:

- 10 μ L de 5X Mescla de reacció TRAPEze.
- 5 μ L d'extracte de telomerasa (o de tampó de lisat CHAPS en el control negatiu de telomerasa).
- 0.4 μ L de Taq polimerasa de concentració 5 U/ μ L (o d'H₂O en el control negatiu de Taq polimerasa).
- x μ L de dissolució mare d'acridina o conjugat (depenent de la concentració de la mostra i de la final que es vulgui assolir).
- (50 - 10 - 5 - 0.4 - x) μ L d'H₂O de puresa PCR.

En el control positiu de telomerasa, $x=0$, per tant la quantitat d' H_2O és 34.6 μL . En el control negatiu de la telomerasa, els 5 μL d'extracte, es canvien per tampó de lisat CHAPS i en el control negatiu de Taq, els 0.4 μL de dissolució d'enzim es canvien per H_2O . En aquests controls $x=0$ també.

En les mostres que contenen acridines o conjugats, x és el volum necessari d'una dissolució prèviament preparada del compost a assajar. Les molècules s'han avaluat a 4 concentracions diferents 1, 5, 20 i 50 μM . A la següent taula es mostra un exemple de com es preparen les diferents mostres:

Mostra	Nom	5X Mescla (μL)	Taq (μL)	Tel (μL)	CHAPS (μL)	Acr (μL)	H_2O (μL)
1	Tel ctrl +	10	0.4	2	-	-	37.6
2	Tel ctrl -	10	0.4	-	2	-	37.6
3	A7 (1 μM)	10	0.4	2	-	1	36.6
4	A7 (5 μM)	10	0.4	2	-	4.9	32.7
5	A7 (10 μM)	10	0.4	2	-	9.9	27.7
6	A7 (50 μM)	10	0.4	2	-	4.9	32.7
7	A18 (1 μM)	10	0.4	2	-	9.5	28.1
8	A18 (5 μM)	10	0.4	2	-	4.7	32.9
9	A18 (10 μM)	10	0.4	2	-	9.5	28.1
10	A18 (50 μM)	10	0.4	2	-	4.7	32.9
11	A21 (1 μM)	10	0.4	2	-	9.7	27.9
12	A21 (5 μM)	10	0.4	2	-	4.8	32.8
13	A21 (10 μM)	10	0.4	2	-	9.7	27.9
14	A21 (50 μM)	10	0.4	2	-	4.8	32.8
15	Taq ctrl -	10	-	2	-	-	38

Taula 2.3 – Composició de les mostres per tal de realitzar un assaig TRAP.

2.2.2.3 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Les reaccions d'amplificació s'han dut a terme en un termociclador MiniCycler™ PTC-150 de MJ Research. Es col·loquen els eppendorfs en el termociclador i s'incuben les mostres a 30°C durant 30 minuts per tal que tingui lloc l'addició de repeticions telomèriques per part de la telomerasa. Posteriorment té lloc la PCR per tal d'amplificar els productes presents en el medi. La PCR consta de 36 cicles cadascun dels quals consta dels següents 3 passos:

- 30 segons a 94°C.
- 30 segons a 59°C.
- 1 minut a 72°C.

Finalment, es mantenen les mostres a 72°C durant 3 minuts per posteriorment refredar-les a 55°C i deixar-les 25 minuts. El programa s'acaba amb una incubació a 4°C. Un cop a 4°C, es poden treure els eppendorfs del termociclador i es guarden dins la nevera fins a realitzar les mesures de fluorescència o l'electroforesi no desnaturalitzant en gel de poliacrilamida.

2.2.3 Anàlisi de l'experiment TRAP

2.2.3.1 Mesures de fluorescència

Les mesures de fluorescència s'han realitzat en un espectrofluorímetre AMINCO Bowman AB2. La cubeta emprada ha estat una cubeta especial per a mesures de fluorescència de quars, completament transparent, de 10 x 4 mm.

Primerament es preparen 100 mL del tampó de mesura que conté 10 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 2 mM MgCl₂ de pH 7.4, que es guarden a la nevera. Per tal de determinar la fluorescència emesa pels sistemes Amplifluor[®], es dissolen 20 µL de cada mescla de reacció en 600 µL del tampó de mesura. Es mesura la fluorescència de cada mostra introduint a l'espectrofluorímetre els següents paràmetres d'excitació/emissió:

- 495 nm/516 nm per a la fluoresceïna.
- 600 nm/620 nm per a la sulforodamina.

L'anàlisi dels resultats es du a terme calculant l'increment de fluorescència emesa per la fluoresceïna (ΔF) i per la sulforodamina (ΔR) de cada mostra. Aquests paràmetres es calculen restant el valor de la fluorescència emesa per la fluoresceïna obtingut pel control negatiu de telomerasa i per la sulforodamina obtingut en el control negatiu de Taq polimerasa respectivament. Llavors es calcula la proporció relativa d'increment net de fluorescència per a cada mostra ($\Delta F/\Delta R$). Aquest és el valor que s'utilitza per comparar les mostres entre sí.

2.2.3.2 Electroforesi no desnaturalitzant en gel de poliacrilamida

L'electroforesi no desnaturalitzant en gel de poliacrilamida s'ha realitzat en una cubeta d'electroforesi vertical de plaques de vidre de 18 x 24.5 cm i de pintes i espaiadors de diferent gruix proveïda d'un sistema de refrigeració. La font de voltatge ha estat LKB 2197 BROMMA. L'acrilamida, bisacrilamida, urea, TEMED i persulfat amònic s'han adquirit a Serva, el tampó TBE 10x (1.3 M Tris, 0.45 M àcid bòric i 25 mM EDTA) a BioRad i el bromur d'etidi a Sigma.

En primer lloc es preparen 500 mL de solució al 10% de poliacrilamida/bisacrilamida (19:1) en tampó TBE 0.5X que és la que servirà per

generar els gels. També es preparen 25 mL de dissolució marcadora que conté 0.25% de blau de bromofenol, 0.25% de cianoxilenol en 50% de glicerol/50 mM EDTA i una dissolució de bromur d'etidi 10 mg/mL. La primera solució servirà per tal de seguir l'evolució del gel, mentre que aquesta darrera servirà per tenyir-lo. Les tres dissolucions es guarden a la nevera. Finalment el tampó d'electroforesi es prepara diluint 20 vegades el tampó TBE 10x comercial.

2.2.3.2.1 Gel no desnaturalitzant

Per preparar el gel es preparen 40 mL de solució mare que contenen:

- 39.6 mL de la solució al 10% poliacrilamida en TBE 0.5X.
- 400 µL de persulfat d'amoni 10% en H₂O.
- 40 µL de TEMED.

Ràpidament s'aboca la mescla entre els vidres emprant espaiadors de 0.75 mm de gruix, es col·loca la pinta (del mateix gruix que els espaiadors) i es deixa polimeritzar durant 30 minuts. Un cop polimeritzat es retira la pinta i es renten bé els pous amb tampó d'electroforesi (TBE 0.5x) per tal d'eliminar les restes de gel que hi puguin haver quedat. Es du a terme el *pre-run* del gel a 750 V durant un mínim d'una hora i mitja usant el tampó d'electroforesi. Es dipositen a cada pou 25 µL de cada mostra i es corre durant una hora i mitja a 400 V, o fins que un dels marcadors cianoxilanol ha corregut uns 10-12 cm des del pou. Durant tot el procés el gel d'electroforesi es troba submergit en 7 L de tampó d'electroforesi (TBE 0.5x) el qual es troba refrigerat per un bany d'H₂O a una temperatura de 5°C.

2.2.3.2.2 Tinció del gel no desnaturalitzant

La tinció del gel es realitza amb una dilució 1:10000 de la solució de bromur d'etidi en aigua desionitzada (50 µL en 500 mL). Es col·loca el gel en una safata i es tenyeix durant 20-30 minuts. Es decanta la solució colorant i s'esbandeix el gel amb H₂O, amb la qual es deixa durant 20-30 minuts més per destenyir el fons del gel.

El revelat de gel s'ha dut a terme en un transil·luminador GeneGnome de la casa comercial Syngene.

2.2.3.2.3 Anàlisi quantitatiu del gel

L'anàlisi dels resultats s'ha dut a terme integrant la intensitat de les bandes aparegudes en el gel amb l'ajuda del software GeneSnap que conté instal·lat el mateix transil·luminador. S'integren, per una banda la intensitat de totes les bandes corresponents als producte elongats per la telomerasa i per l'altra la intensitat de la

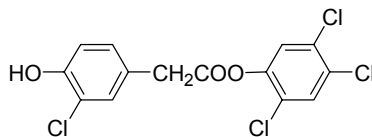
bada corresponent al control intern. El quocient entre ambdós valors és la proporció relativa d'increment net de producte elongat per la telomerasa per a cada mostra. Aquest valors són els que serveixen per comparar les mostres entre sí i en relació al control positiu.

3 CAPÍTOL 3

3.1 Síntesi dels oligonucleòtids cíclics

3.1.1 Protocol general de síntesi d'oligodesoxiribonucleòtids cíclics

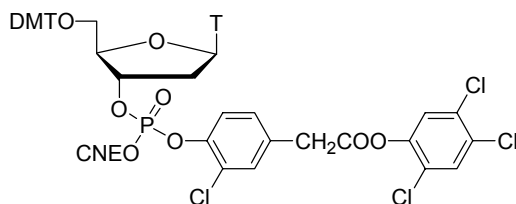
3.1.1.1 Obtenció del 3-cloro-4-hidroxifenilacetat de 2,4,5-tricloro-fenil



Es dissolen 780 mg de 2,4,5-triclorofenol (3 eq.) i 276 mg de DCC (1 eq.) en 20 mL de DCM. Seguidament, s'addiciona lentament una dissolució de 250 mg d'àcid 3-cloro-4-hidroxifenilacètic (1 eq.) en 50 mL d'AcOEt. S'agita tota la nit i, a continuació, es refreda el baló en un bany de gel i se separa la *N,N'*-diciclohexilurea precipitada. Es renta la fase orgànica amb NaHCO₃ sat. (3x) i s'assequen amb MgSO₄ anh. S'evapora el dissolvent a sequedat i l'oli de color taronja obtingut es purifica per cromatografia en columna sobre gel de sílice utilitzant com a eluent hexà i quantitats creixents de DCM. El producte s'obté per evaporació de les fraccions corresponents amb un rendiment de 66%.

Caracterització: **Rf** (Hexà/DCM 5:5) = 0.33; **RMN de ¹H** (CDCl₃, 200 MHz) δ: 7.53 (s, 1H, Ar-H), 7.35 (d, 1H, J=2.2 Hz, Ar-H), 7.25 (s, 1H, Ar-H), 7.18 (dd, 1H, J₁=8.4 Hz, J₂= 2.2 Hz, Ar-H), 7.01 (d, 1H, J=8.4 Hz, Ar-H), 5.55 (s, 1H, -OH), 3.82 (s, 2H, CH₂); **RMN de ¹³C** (CDCl₃, 63 MHz) δ: 167.3 (CO), 149.9 (C_{Ar}), 144.6 (C_{Ar}), 130.0 (C_{Ar}), 129.7 (C_{Ar}), 128.9 (C_{Ar}), 128.5 (C_{Ar}), 124.2 (C_{Ar}), 118.9 (C_{Ar}), 115.5 (C_{Ar}), 38.6 (CH₂); **EM** (IE) *m/z*: 366 [M+1]⁺.

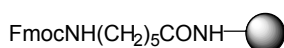
3.1.1.2 Obtenció del nucleotidil-espaiador bifuncional (fosfat de 3'-(5'-O-DMT-timidinil), 2-cloro-4-(2,4,5-triclorofenoxicarbonil metil)fenil i 2-cianoetil)



En un matràs de 10 mL ben sec (mantingut a l'estufa a 120 °C unes hores i a temperatures en un dessecador) es disposen 300 mg de 3'-(2-cianoetil)-*N,N'*-diisopropilfosforamidit de 5'-O-DMT-timidina (1.2 eq.) i 123 mg de 3-cloro-4-hidroxifenilacetat de 2,4,5-triclorofenil (1 eq.), que s'assequen al buit tota la nit (P_2O_5 + KOH, bomba d'oli). A continuació, es dissolen amb 1.6 mL de DCM anh. sota atmosfera inert, i s'addiciona tetrazole (28.2 mg, 1.2 eq.) dissolt en 1 mL d'ACN anh. Es deixa reaccionar sota atmosfera d'argó durant una hora. Tot seguit, s'afegeix un excés de $tBuOOH$ (en decà 5 M (800 μ L, 10 eq.). Passats 10 minuts, la reacció es dona per acabada. Es fan particions DCM/NaCl aq., s'asseca la fase orgànica amb Na_2SO_4 anh. i s'evapora a sequedat. El producte es precipita directament sobre hexà i s'empra posteriorment sense purificar, ja que les impureses presents no interfereixen en el posterior ancoratge del producte sobre la resina, i per contra, la seva purificació presenta molts problemes. el rendiment és del 95%.

Caracterització: **Rf** (DCM /MeOH 95:5) = 0.33; **RMN de ^{31}P** (CD_2Cl_2 , 120 MHz; referència externa de TMP) δ : -7.664, -7.704 (2 diastereòmers), 7.748 i 8.379 (impureses).

3.1.1.3 Ancoratge de l'àcid *N*-Fmoc-6-aminohexanòic sobre el suport polimèric

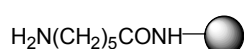


Es disposa la resina Tentagel pre-tractada (apartat E.3 de Materials i mètodes) en una xeringa de plàstic proveïda d'un filtre de polipropilè i s'infla amb DCM. Seguidament, s'addicionen l'àcid *N*-Fmoc-6-aminohexanòic (1 eq.) dissolt en DMF i DCM, l'*HOBt* (1 eq.) dissolt en DMF, i la *DCC* (1 eq.) dissolta en DCM, sempre en el mínim volum possible per tal que la resina quedi pastosa. Es deixa reaccionar a temperatura ambient i amb agitació durant 7 h. A continuació es renta bé la resina amb DCM, DMF i MeOH, i se separa una petita al·lquota de resina amb la que es determina la funcionalització (apartat D.2.1 de Materials i mètodes).

3.1.1.4 Acetilació dels grups amino lliures sobre la resina

S'infla la resina en DMF i es tracta amb Ac_2O (50 eq. respecte a les amines lliures sobre la resina). Es deixa reaccionar durant 30 minuts, es filtra i es renta la resina amb DMF, DCM i MeOH. S'asseca al buit i es realitza l'assaig qualitatiu de ninhidrina (apartat D.1 de Materials i mètodes). Si dóna positiu, es repeteix l'acetilació fins a obtenir l'assaig negatiu.

3.1.1.5 Desprotecció de l'àcid *N*-Fmoc-6-aminohexanòic ancorat sobre el suport polimèric

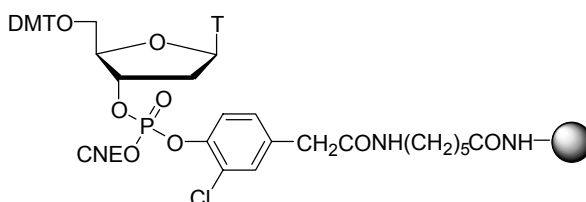


Per tal d'eliminar el grup Fmoc i obtenir els grups amines lliures cal fer els següents tractaments a la resina:

<i>Etapa</i>	<i>Reactiu</i>	<i>Nº de tractaments</i>	<i>Temps (min.)</i>
1	DCM	4	1
2	DMF	4	1
3	Pip. 20% en DMF	3	3
4	DMF	1	1

Taula 3.1 - Tractaments realitzats a la resina per tal d'eliminar el grup Fmoc.

3.1.1.6 Ancoratge del nucleotidil-espaiador bifuncional (fosfat de 3'-(5'-O-DMT-timidinil), 2-cloro-4-(2,4,5-triclorofenoxicarbonilmetil)fenil i 2-cianoetil) sobre el suport polimèric

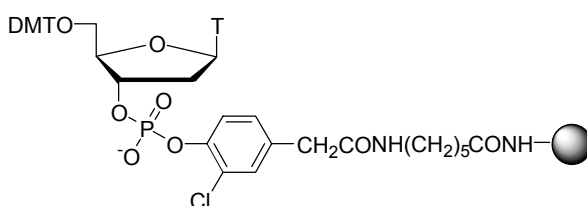


S'infla la resina amb DCM i s'hi afegeix el nucleotidil-espaiador (3 eq.) dissolt en DCM, l'HOBt (3 eq.) dissolt en DMF i la DCC (3 eq.) dissolta en DCM. Sempre es treballa amb les mínimes quantitats de dissolvent. Es deixa reaccionar a temperatura ambient durant unes 6 hores amb agitació. A continuació, es renta la resina amb DCM,

DMF, DCM i MeOH, i se separa una alíquota de resina amb la qual es determina la funcionalització (apartat D.2.2 de Materials i mètodes). Si la funcionalització és més o menys la desitjada, s'aceten els grups amino que no hagin reaccionat tal i com s'ha descrit anteriorment. Si la funcionalització és extremadament baixa, es torna a repetir el procés d'ancoratge. La resina s'asseca bé al buit i es guarda al congelador tapada amb un sèptum fins que s'hagi d'utilitzar.

Caracterització: **RMN de ^{31}P en fase gel** (CD_2Cl_2 , 120 MHz; referència interna de H_3PO_4 85%) δ : -2.64.

3.1.1.7 Desprotecció del grup fosfat de l'extrem 3'-terminal



Aquest tractament és aconsellable fer-lo just després d'haver ancorat el nucleotílid-espaiador, encara que la resina no s'hagi d'utilitzar fins més endavant. S'infla la resina amb DMF i es tracta amb TEA/piridina (1:1) (3x1 h). Posteriorment es renta bé la resina amb DMF, DCM i MeOH, i s'asseca bé al buit.

Caracterització: **RMN de ^{31}P en fase gel** (CD_2Cl_2 , 120 MHz; referència interna de H_3PO_4 85%) δ : -5.902

3.1.1.8 Elongació de la cadena nucleotídica

S'ha treballat a escales de 2 a 10 μmol , en reactors de tefló de 400 μL de capacitat en el cas de síntesis fins a 5 μmol , i de 1500 μL de capacitat per a síntesi d'escala superior. Es preparen els reactius tal i com s'ha indicat anteriorment (apartat C.1 de Materials i mètodes) i es procedeix a l'elongació de la cadena al sintetitzador automàtic. El programa utilitzat per a les síntesis a escala 5 μmol ha estat l'MSPEGPSN (veure annex) que consta esquemàticament de les següents etapes:

Etapa	Tractament	Dissolvents i reactius	Temps (s)
1	rentat	ACN	20
2	eliminació del DMT	3% TCA/DCM	120
3	rentats	ACN	200
		DMF	30
		ACN	20
		ACN anh.	45
4	assecat	Argó	45
5	acoblament	fosforamidit (0.1 M) en DCM	900
		+ tetrazole (0.5 M) en ACN	
6	rentats	ACN	30
7	acetilació	Ac ₂ O/NMI	120
8	oxidació	^t BuOOH (1 M) en DCM	60
9	rentats	DCM	60
		DMF	60
		ACN	2 x 30

Taula 3.2 - Etapes d' un cicle de síntesi en l'elongació de la cadena nucleotídica sobre suport de TentaGel.

Per a les síntesis a escala major, el programa utilitzat ha estat l'LSPEGPS (vegeu annex), el qual incrementa els temps de les etapes respecte l'anterior.

3.1.1.9 Etapa de ciclació

En aquesta etapa és important treballar en condicions molt anhidres, ja que el reactiu de ciclació MSNT és molt sensible a la humitat. Es guarden 3 vials de sintetitzador tota una nit a l'estufa a 100°C. Es pesen 40 mg (en el cas de síntesis d'escala 5 µmol) o 80 mg (en el cas de síntesis d'escala superior) d'MSNT en cada un dels 3 vials, i es guarden tota la nit al dessecador (P₂O₅ + KOH, bomba d'oli). La ciclació es du a terme en tres tractaments (2x4 h + 1x12 h). En cada un d'ells es tracta la resina amb una dissolució 0.15 M d'MSNT (20-25 eq.) en piridina anh. Aquestes dissolucions es preparen just abans de fer cada tractament i s'obtenen dissolent el MSNT pesat en 1 o 2 mL de piridina anh. (depenent de l'escala de síntesi). La reacció té lloc al sintetitzador automàtic, però el protocol es realitza manualment i consta de les següents etapes:

Etapa	Tractament	Dissolvent i reactiu	Nº de tractaments	Temps (s)
1	assecat	argó	1	90
2	rentat	piridina anh.	3	90
		ACN anh.	3	120
3	assecat	argó	1	120
4	ciclació	MSNT (0.15 M) en piridina anh.	(2x4 h + 1x12 h)	

Taula 3.3 - Etapes de que consta la ciclació.

Després de cada etapa de ciclació es torna a repetir tot el protocol. Finalment, un cop acabats els tres tractaments, e renta la resina molt bé amb ACN, s'asseca amb argó i es guarda al congelador fins que es duen a terme les reaccions posteriors.

3.1.1.10 Desprotecció dels grups fosfat internucleosídics

Es disposa la resina que prové de la ciclació en una xeringa proveïda d'un filtre de polipropilè. Es renta bé amb DCM i es tracta amb una mescla TEA/piridina (1:1) (3x1 h) sota agitació. Posteriorment es renta bé la resina amb DMF, DCM i MeOH. S'asseca bé amb la trompa de buit i es guarda la resina al congelador.

3.1.1.11 Desancoratge de l'oligonucleòtid

Es renta bé la resina amb dioxà:H₂O (1:1) i es duen a terme 3 tractaments (3x3 h) amb una dissolució 0.2 M d'oximat de TMG (50 eq.) en dioxà/H₂O (1:1). La dissolució d'oximat es prepara nova per a cada tractament. Els filtrats de cada tractament es recullen en un matràs, rentant-se bé la resina amb dioxà/H₂O (1:1) i H₂O. Un cop acabats els tres tractaments, s'evapora el dissolvent dels rentats a sequedat.

3.1.1.12 Desprotecció de les nucleobases

El residu oliós procedent de l'etapa de desancoratge es tracta en el mateix matràs amb 2 mL d'NH₃ conc. (33%) a 55°C tota una nit. Posteriorment s'evapora a sequedat.

3.1.1.13 Dessalatge del cru de síntesi

El cru de desancoratge, ja sense NH₃, es redissol en la mínim a quantitat d'H₂O i es carrega a una columna de vidre (50x2.5 cm) reblida amb Sephadex G-10 i equilibrada amb tampó TEAB 50 mM (apartat A.2.3 de Materials i mètodes), eluint a un flux aproximat de 2-3 mL/min. L'anàlisi per UV a 260 nm de les fraccions eluïdes ens mostra quines contenen oligonucleòtid. S'ajunten les fraccions i es liofilitzen. De vegades per saber quines fraccions ajuntar, és convenient fer una anàlisi per HPLC

analític de les fraccions que hem vist per UV que contenen oligonucleòtid. Un cop liofilitzat, es quantifica el cru de síntesi obtingut.

3.1.2 Obtenció dels oligonucleòtids cíclics

Els oligonucleòtids obtinguts es mostren a la següent taula:

Seqüències	Rdt. cru	Rdt. purificació	Rdt. global	Quantitat
d<pTTGGTTGG> (2 µM)	25%	10%	2.5%	10.0 OD
d<pTTGGTTGG> (10 µM)	17%	38.5%	6.5%	38.5 OD
d<pTTAGGGTTAGGG> (5 µM)	18%	13%	2.5%	14.0 OD
d<pTTAGGGTTAGGG> (10 µM)	25%	16%	4%	39.0 OD
d<pTTGGTTGGTTGGTTGG> (2 µM)	15%	6.5%	1%	3.0 OD

Taula 3.4 - Oligonucleòtids cíclics sintetitzats.

3.1.3 Electroforesi desnaturalitzant en gel de poliacrilamida

Les electroforesis no desnaturalitzants en gel de poliacrilamida s'han realitzat en un aparell Hoeffer SE410 (Pharmacia), que es compon d'una cubeta d'electroforesi vertical, de plaques de vidre de 18 x 24.5 cm i de pintes i espaiadors de diferent gruix. La font de voltatge és LKB 2197 BROMMA. L'acrilamida, bisacrilamida, urea, TEMED i persulfat amònic s'han adquirit a Serva, el tampó TBE 10x (1.3 M Tris, 0.45 M àcid bòric i 25 mM EDTA) a BioRad i la formamida i el reactiu "Stains all" a Sigma.

La dissolució d'acrilamida:bisacrilamida (38:2) al 20%, 8 M d'urea, es prepara barrejant 450 g d'urea, 190 g d'acrilamida, 10 g de bisacrilamida i 100 mL de TBE 10x. Aquesta mescla s'enrasa a 1 L amb H₂O MilliQ. La dissolució resultant s'agita vigorosament i es filtra a través d'un filtre de 0.45 µm de porus. La dissolució de persulfat amònic (PA) al 10% es prepara dissolent 1 g de sal en 10 mL d'H₂O. La solució dels marcadors conté 30 mM EDTA pH 8.8 M urea i una petita quantitat de cianoxilenol i de blau de bromofenol, que actuen com a marcadors de longitud. Finalment el tampó d'electroforesi es prepara diluint 10 vegades el tampó TBE 10x comercial.

3.1.3.1 Gel analític

Per preparar el gel es preparen 60 mL de solució mare que contenen:

- 59.5 mL de la solució al 10% poliacrilamida en TBE 0.5X.
- 400 µL de persulfat d'amoni 10% en H₂O.
- 13 µL de TEMED.

Ràpidament s'aboca la mescla entre els vidres emprant espaiadors de 0.75 mm de gruix, es col·loca la pinta (del mateix gruix que els espaiadors) i es deixa polimeritzar durant 30 minuts. Un cop polimeritzat es retira la pinta i es renten bé els pous amb tampó d'electroforesi (TBE 1x) per tal d'eliminar les restes de gel que hi puguin haver quedat. Es du a terme el *pre-run* del gel a 750 V durant un mínim d'una hora usant el tampó d'electroforesi. Les mostres es preparen diluint un mínim de 0.1 OD₂₆₀ d'oligonucleòtid en una dissolució H₂O/formamida (1:1), s'escalfen durant 2 minuts a 110°C i es mantenen en gel fins al moment de a càrrega. Es carreguen les mostres als pous emprant tips de punta llarga i es corre el gel a 750 V fins que els marcadors de longitud arriben a la distància que es considera adequada.

3.1.3.2 Tinció del gel analític

Per tenyir aquest tipus de gels s'empra el reactiu anomenat "Stains all", que tenyeix les molècules de DNA de color blau. Es col·loca el gel en una safata amb H₂O i es deixa durant uns 10 minuts per tal d'eliminar les restes d'urea i facilitar una tinció més homogènia. Es decanta l'aigua i s'afegeix la dissolució colorant (20 mg de tint en 30 mL de formamida i 170 mL d'H₂O). Es deixa el gel amb la dissolució colorant durant 30 minuts amb agitació esporàdica suau i protegit de la llum. Posteriorment es decanta el colorant i s'esbandeix bé el gel amb H₂O. Es posa la safata que conté el gel en H₂O sota una làmpada d'IR per tal de descolorir el fons d'aquest. Finalment, quan queden les bandes ben definides es procedeix a assecar el gel. Es disposa sobre un suport de paper porós i es cobreix amb una membrana de cel·lofan humitejada. S'asseca durant 1 hora a 80°C a l'assecador de gels.

3.1.3.3 Gel preparatiu

Se segueixen bàsicament els mateixos passos descrits pel gel analític però amb algunes diferències. Es preparen 120 mL de dissolució, i s'utilitzen espaiadors i pintes de 1 o 1.5 mm de gruix. El voltatge de la font en aquest cas és de 650 V i es carreguen mostres de fins a 2 o 3 OD₂₆₀ d'oligonucleòtid per pou. Els marcadors es carreguen als pous externs per evitar possibles contaminacions.

3.1.3.4 Aïllament del producte purificat

Un cop acabat de corre el gel, es treu d'entremig de les plaques de vidre i es diposita sobre una placa de gel de sílice de les utilitzades en les CCF recoberta de paper transparent. Es visualitza la placa sota la llum ultravioleta, i amb una fulla d'afaitar es tallen les bandes desitjades, que es dipositen dins un tub de centrífuga de 15 mL de capacitat. En el tub s'addicionen 2 mL de dissolució tampó AcONH₄ 2 M i s'esmicola el gel el màxim possible amb una vareta de vidre. S'agita vigorosament al vòrtex i es congela i es descongela 3 vegades. A continuació es deixa el tub tota la nit

en agitació. Finalment, el producte s'aïlla per dessalatge mitjançant una columna Sep Pak (Waters).

3.1.4 Caracterització per digestió enzimàtica

Els enzims utilitzats han estat:

- Fosfodiesterasa I de verí de serp (SVPD, EC 3.1.4.1) que degrada els oligonucleòtids començant per l'extrem 3'. En el procés de degradació genera nucleòsids 5' fosfat. S'ha emprat fosfodiesterasa de *Crotalus adamanteus* de Sigma (1.5 U/500 µL).
- Fosfatasa alcalina (AP, EC 3.1.3.1) que hidrolitza els nucleòsids 3' o 5' fosfat generant nucleòsids lliures. S'ha emprat fosfatasa alcalina de Boehringer Mannheim (1 U/µL).

Per dur a terme les digestions enzimàtiques totals dels oligonucleòtids sintetitzats es preparen 100 µL de mescla enzimàtica composta per 50 µL de tampó Tris-HCl pH8, 10 µL d'una solució de MgCl₂ 0.1 M, 1 µL de SVPD (0.003 U), 1.5 µL d'AP (1.5 U) i 38.5 µL d'H₂O. Es liofilitzen entre 0.05 i 0.1 OD₂₆₀ d'oligonucleòtid en un eppendorf i es tracten amb 50 µL de la mescla enzimàtica durant 6 hores a 37°C. Un cop passat aquest temps, la digestió s'analitza per HPLC de fase reversa amb una columna C₁₈ realitzant el següent gradient: 0-5 min. 10% B, 5-20 min. 10-30% B, 20-25 min. 30-10% B; A: 10 mM NH₄OAc en H₂O, B: H₂O/AN (1:1).

3.2 Experiments de fusió per UV

Les corbes de fusió i renaturalització s'han realitzat en un aparell Jasco V-550 proveït d'un Pelltier ETC-505T (Jasco) com a controlador de la temperatura. Les cubetes emprades han estat de quars amb un camí òptic de 1 mm. S'han enregistrat a 260 nm o a 295 nm amb una velocitat d'escalfament o refredament de la mostra de 0.5°C/min. Les temperatures de fusió (T_m) han estat calculades utilitzant el programa Origin a partir de les primeres derivades de les corbes obtingudes.

3.3 Experiments de DC

Els espectres de dicroïsmes circulars s'han enregistrat en un espectropolarímetre Jasco J-720, proveït d'un accessori de cubetes termostatitzable connectat a un bany d'aigua Neslab RP-100, i en un Jasco J-810, proveït d'un Pelltier ETC-505T (Jasco) com a controlador de la temperatura. Les cubetes emprades han estat varies, totes elles de quars amb camins òptics d'1 de 0.5 i de 0.1 cm. En l'aparell Jasco J-720 les cubetes emprades han estat circulars, mentre que en el J-810, han estat rectangulars.

Les corbes de fusió i renaturalització s'han realitzat només en el Jasco J-810. S'han enregistrat majoritàriament a 290 nm amb una velocitat d'escalfament o refredament de la mostra de 0.5°C/min. Les temperatures de fusió (T_m) han estat calculades a partir de les primeres derivades de les corbes obtingudes utilitzant el programa Origin.

3.4 Experiments d'RMN

3.4.1 Preparació de les mostres

Els oligonucleòtids, en forma de sal sòdica, s'han dissolt en 0.5 mL de D₂O, o una mescla D₂O/H₂O (9:1), obtenint-se dissolucions d'oligonucleòtid al voltant d'1 mM. Algun cop s'ha dissolt en un volum menor (~200-250 µL), llavors s'han emprat tubs SHIGEMI, els quals permeten treballar amb volums petits i bones condicions d'homogeneïtat de camp magnètic.

El pH de les mostres s'ha ajustat a 7 amb una dissolució concentrada de DCI.

3.4.2 Adquisició dels espectres

Els espectre de RMN de ¹H d'alt camp s'han enregistrat en un aparell Bruker DMX-600 MHz proveït d'una criosonda i en un aparell Bruker US2-800 MHz, de l'Institut de Química Física Rocasolano (CSIC, Madrid). Com a referència s'ha utilitzat l'àcid 3-trimetilsilil-(2,2,3,3,-D₄)propanòic (TSP), a la senyal del qual s'ha assignat el valor de 0.00 ppm.

Els espectres bidimensionals en D₂O s'han adquirit majoritàriament amb 2K en la dimensió t₂ i 400 increments de t₁, excepte en el cas dels experiments COSY, que s'han adquirit amb 4k en la dimensió t₂ i 512 punts en la t₁. S'ha utilitzat el mètode de pre-saturació per eliminar la senyal d'aigua residual i, en tots els casos, l'amplada espectral ha estat de 14 ppm. El nombre d'acumulacions ha variat en funció del tipus d'experiment i de la concentració d'oligonucleòtid. Tots els experiments s'han adquirit en mode sensible a la fase segons el mètode TPPI (*Time Proportional Phase Incrementation*). Els espectres TOCSY s'han enregistrat utilitzant la seqüència de bloqueig d'spin estàndard MLEV-17. La potència del camp magnètic per el bloqueig d'spin ha estat de 10 dB i s'han enregistrat espectres a diferents temps de mescla.

Els experiments monodimensionals en H₂O s'han enregistrat utilitzant la seqüència de polsos *jump-return*, que permet observar protons que intercanvien molt ràpidament amb el dissolvent. La amplada espectral en aquest cas ha estat de 20 ppm. Els experiments NOESY en H₂O, la supressió de la senyal de l'aigua s'ha realitzat incloent un mòdul WATERGATE en la seqüència de polsos abans de l'adquisició. També s'han enregistrat espectres a diferents temps de mescla.