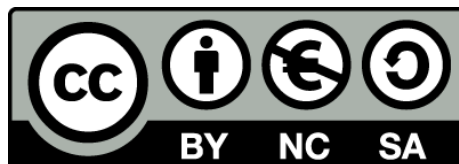


Preparació d'oligonucleòtids conformacionalment restringits amb repeticions de trinucleòtids

Roger Tresanchez Carrera



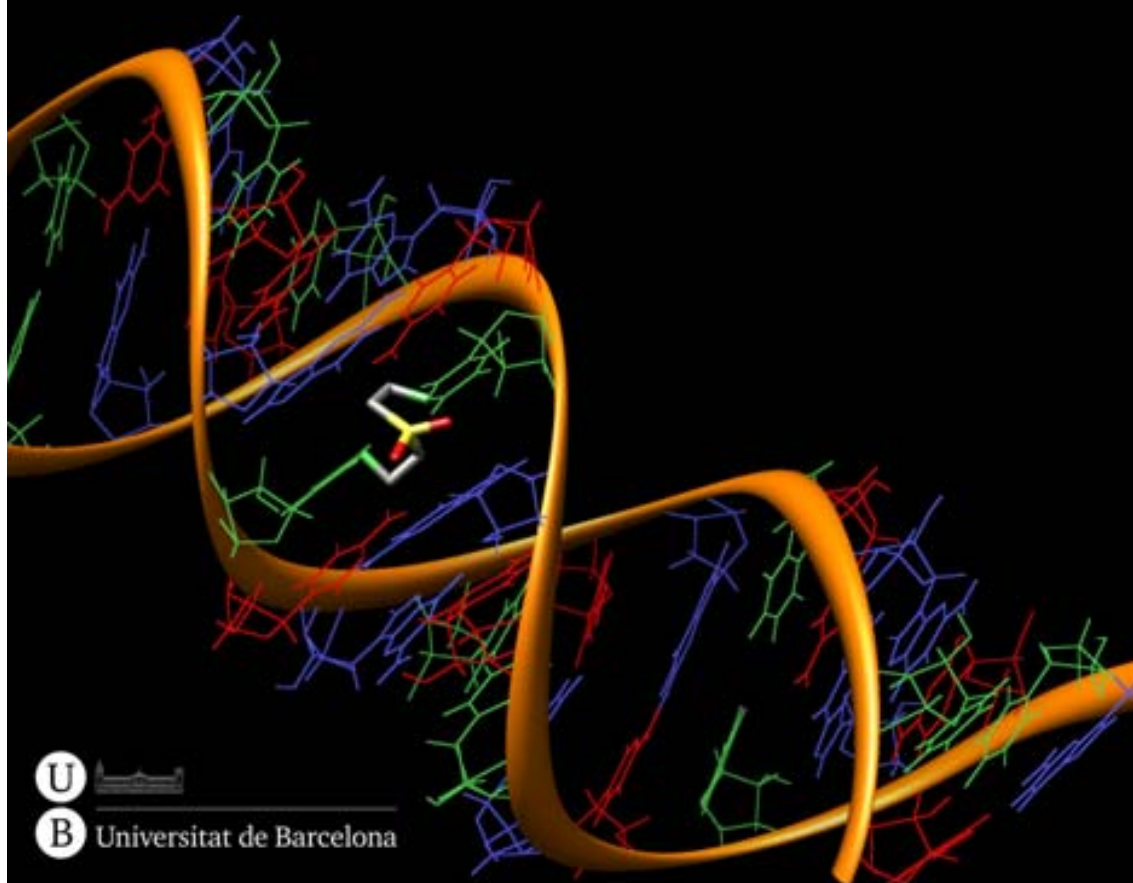
Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – CompartirIgual 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – CompartirIgual 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0. Spain License.**

Preparació d'oligonucleòtids conformacionalment restringits amb repeticions de trinucleòtids

Roger Tresanchez Carrera



Programa de Doctorat de Química Orgànica

**PREPARACIÓ D'OLIGONUCLEÒTIDS
CONFORMACIONALMENT RESTRINGITS
AMB REPETICIONS DE TRINUCLEÒTIDS**

Roger Tresanchez Carrera

Dirigida i revisada per

Dr. Enrique Pedroso Muller
Universitat de Barcelona

Departament de Química Orgànica
Facultat de Química
Universitat de Barcelona

“No puc prometre títols, però puc dir que persistirem fins al final.”

Josep Guardiola i Sala, presentació com a entrenador del Barça (16-VIII-2008)

“Quousque tandem abutere, Catilina, patientia nostra?”

Marcus Tullius Cicero, Oratio in Catilinam Prima in Senatu Habita

A tu, allà on siguis

E a te, che sei sempre di fianco a me

ÍNDEX |

Índex

Abreviatures

Introducció

Les malalties associades a l'expansió de repeticions de triplets	1
La distròfia miotònica	4
Importància de l'estructura en l'expansió de les repeticions de triplets i en la patologia de les TRED	9
Oligonucleòtids cíclics	13
Oligonucleòtids entrecreuats	15
Objectius	17

Bloc 1: Obtenció d'oligonucleòtids cíclics

Capítol 1: Síntesi d'oligonucleòtids cíclics mitjançant ciclació en fase sòlida

1.1 Introducció i objectius	23
1.2 Obtenció d'oligodesoxiribonucleòtids cíclics mitjançant ciclació en fase sòlida	28
1.2.1 Síntesi de d<p(CAG) ₅ > 12	28
1.2.1.1 Obtenció de la nucleotidil-resina 9	28
1.2.1.2 Elongació de la cadena oligonucleotídica	29
1.2.1.3 Ciclació del precursor lineal ancorat a la resina i obtenció del d<p(CAG) ₅ > 12	31
1.3 Obtenció d'oligoribonucleòtids cíclics mitjançant ciclació en fase sòlida	32
1.3.1 Oligonucleòtids model de repeticions (CUG) _n	33
1.3.1.1 Obtenció de la resina amb l'espaiador E 17	34
1.3.1.2 Intent d'obtenció del tridecàmer r<pEG(CUG) ₃ CE> 14	36
1.3.1.3 Tetranucleòtids cíclics	37
1.3.1.4 Obtenció del tetradecàmer r<p(EGCUGCE) ₂ > 15	41

Capítol 2: Síntesi d'oligonucleòtids cíclics mitjançant ciclació assistida per motlle

2.1 Introducció i objectius	45
2.1.1 La problemàtica de la ciclació de seqüències repetitives	48
2.2 Ciclació d'oligoribonucleòtids no protegits	50
2.2.1 Intent de ciclació d'oligoribonucleòtids sense utilitzar motlle extern	50
2.2.1.1 Intent d'obtenció del r<p(CUG) ₁₄ >	52
2.2.2 Ciclació d'oligoribonucleòtids mitjançant motlle extern	56
2.2.2.1 Preparació del motlle d(GCA) ₆ 23	57
2.2.2.2 Obtenció del 42mer model i assaigs de ciclació	58
2.2.2.3 Nova síntesi del 42mer model i obtenció del producte cíclic	60
2.3 Ciclació d'oligoribonucleòtids parcialment protegits	64
2.3.1 El grup dmf com a protector de la guanosina	64
2.3.1.1 Obtenció de l'octadecàmer r(G ^{dmf} CU) ₆ 29	65
2.3.1.2 Estudi d'estabilitat de G ^{dmf}	67
2.3.2 A la recerca d'un nou esquema de protecció	68
2.3.2.1 Obtenció de G ^{All-Alloc} 30 i avaluació de la seva estabilitat química	71
2.3.2.2 Obtenció de G ^{Alloc} 36 i G ^{All} 37 i avaluació de la seva estabilitat química	75
2.3.3 Obtenció del fosforamidit de G ^{All}	77
2.3.4 Obtenció d'oligonucleòtids que incorporen G ^{All-Ac}	83
2.3.4.1 14mer rG(CUG ^{All}) ₃ CUGC 53	84
2.3.4.1.1 Estudi d'eliminació del grup al·lil del nucleòsid DMT-G ^{All} 57	86
2.3.4.1.2 Estudi de desprotecció del tetradecàmer	87
2.3.4.2 Síntesi del 6mer rUG ^{All} CUG ^{All} C 58 i estudi de desancoratge i desprotecció	89
2.3.4.3 Síntesi del 42mer r(UGC) ₃ (UG ^{All} C) ₈ (UGC) ₃ 52	90
2.3.5 Obtenció del 42mer cíclic per ciclació assistida per motlle amb protecció parcial del precursor lineal	91

Bloc 2: Obtenció d'Oligonucleòtids Entrecreuat

Capítol 1: Introducció i objectius

1.1 Estratègies de síntesi d'oligonucleòtids entrecreuat	101
1.2 Entrecreuament de nucleòsids	107

Capítol 2: Síntesi d'oligodesoxiribonucleòtids entrecreuats

2.1 Introducció i objectius	113
2.2 Entrecreuament de timidines.....	113
2.2.1 Obtenció de DMT-T entrecreuada 60	113
2.2.2 Estudi de l'estabilitat de la unió dietilsulfona enfront bases nucleòfiles.....	116
2.2.3 Obtenció del derivat bisamidit de DMT-T entrecreuada 66	117
2.3 Síntesi d'oligonucleòtids entrecreuats amb la unió dietilsulfona	118
2.3.1 Obtenció del dúplex d(GCTCGTCGAGC) entrecreuat 67	118
2.3.1.1 Síntesi, purificació i caracterització.....	119
2.3.2 Obtenció del dúplex d(GCTGCTGCTGC) entrecreuat 70	122
2.3.2.1 Síntesi, purificació i caracterització.....	122
2.3.3 Oligonucleòtids entrecreuats per una unió escalonada	123
2.4 Estudi de les propietats dels oligonucleòtids entrecreuats	124
2.4.1 Reversibilitat de l'entrecreuament.....	124
2.4.2 Estudi de l'estabilitat tèrmica dels dúplexs entrecreuats	128
2.4.2.1 Estabilitat del dúplex d(GCTCGTCGAGC) entrecreuat 67	129
2.4.2.2 Estabilitat del dúplex d(GCTGCTGCTGC) entrecreuat 70	132
2.4.3 Estudi de la conformació dels dúplexs entrecreuats	135
2.4.3.1 Conformació del dúplex d(GCTCGTCGAGC) entrecreuat 67	136
2.4.3.2 Conformació del dúplex d(GCTGCTGCTGC) entrecreuat 70	137
2.5 Exploració d'alternatives per l'obtenció de dúplexs entrecreuats	138
2.5.1 Intent d'entrecreuament d'oligonucleòtids en solució	138
2.5.2 Intent d'entrecreuament d'oligonucleòtids en fase sòlida	140

Capítol 3: Dels oligonucleòtids entrecreuats als oligonucleòtids cíclics

3.1 Introducció i objectius	145
3.2 Intent d'obtenció del 36mer d<p(CTG) ₁₂ >	148
3.2.1 Síntesi del 18mer entrecreuat 80	149
3.2.2 Assaigs de ciclació del 18mer entrecreuat 80	149
3.3 Primer intent d'obtenció del 42mer d<p(CTG) ₁₄ >	151
3.3.1 Síntesi del 21mer entrecreuat 83	152
3.3.2 Assaigs de ciclació del 21mer entrecreuat 83	153

3.4 Segon intent d'obtenció del 42mer d<p(CTG) ₁₄ >	158
3.4.1 Síntesi del 21mer entrecreuat 92	159
3.4.2 Assaigs de ciclació del 21mer entrecreuat 92	159

Capítol 4: Síntesi d'oligoribonucleòtids entrecreuats

4.1 Introducció i objectius	165
4.2 Entrecreuament d'uridines	165
4.2.1 Obtenció de la DMT-U ^{TOM} 96	166
4.2.2 Entrecreuament de la uridina 96 i síntesi del bisamidit 93	167
4.3 Intent de síntesi d'oligoribonucleòtids entrecreuats	170
4.3.1 Antecedents	170
4.3.2 Intents d'obtenció de l'oligoribonucleòtid r(GCUGCUGCUGC)	170
4.4 Discussió final i perspectives dels entrecreuaments amb unió dietilsulfona	174
Conclusions	179

Part Experimental

Capítol 1: Materials i mètodes

1.1 Instrumentació general	185
1.2 Reactius, dissolvents i dissolucions tampó	186
1.2.1. Reactius i dissolvents	186
1.2.2. Solucions tampó	188
1.3 Cromatografia	189
1.3.1 Cromatografia en capa fina	189
1.3.2 Cromatografia en columna	189
1.3.3 Cromatografia líquida d'alta resolució	189
1.3.4 Cromatografia líquida de mitjana resolució	189
1.3.5 Sep-Pack C ₁₈	190
1.3.6 Cromatografia d'exclusió molecular	190
1.4 Diàlisi	191
1.5 Electroforesi en gel de poliacrilamida (PAGE)	191
1.5.1 Gel analític	192
1.5.1.1 Tinció del gel	193
1.5.2 Gel preparatiu	193

1.5.2.1 Elució mitjançant extracció	193
1.5.2.2. Elució mitjançant electroelució.....	194
1.6 Determinació qualitativa i quantitativa de la funcionalització de les resines.....	195
1.6.1 Assaig qualitatiu de ninhidrina	195
1.6.2 Determinació de la funcionalització de les Fmoc-resines.....	195
1.6.3 Determinació de la funcionalització de les DMT-resines.....	196
1.7 Síntesi d'oligonucleòtids.....	197
1.8 Quantificació d'oligonucleòtids.....	198
1.9 Estudi per espectroscòpia UV-Vis i per dicroisme circular	200
1.10 Caracterització per espectrometria de masses.....	201
1.10.1 Espectrometria de masses MALDI-TOF	201
1.10.2 Espectrometria de masses d'electrosprai i d'ionització química.....	202
1.11 Composició en nucleòsids dels oligonucleòtids.....	202

Capítol 2: Síntesi d'oligonucleòtids cíclics mitjançant ciclació en fase sòlida

2.1 Oligodesoxiribonucleòtids cíclics	205
2.1.1 Síntesi de la nucleotidil-resina 9	205
2.1.1.1 Obtenció de la resina 6	205
2.1.1.2 Obtenció de l'ester actiu 3	206
2.1.1.2.1 Síntesi del (3-cloro-4-hidroxifenil)acetat de 2,4,5-triclorofenil 1	206
2.1.1.2.2 Preparació de l'ester actiu 3	207
2.1.1.3 Ancoratge de l'ester actiu 3 a la resina 7	208
2.1.2 Síntesi de d<p(CAG) ₅ > 12	209
2.1.2.1 Elongació de la cadena nucleotídica	209
2.1.2.2 Ciclació del precursor lineal ancorat a resina	210
2.1.2.3 Desprotecció dels grups fosfat internucleosídics i desancoratge de l'oligonucleòtid cíclic.....	210
2.1.2.4 Eliminació dels protectors de les bases, dessalat i purificació	211
2.2 Oligoribonucleòtids cíclics.....	211
2.2.1 Síntesi de la resina 17	211
2.2.1.1 Obtenció de l'ester actiu 16	211
2.2.1.2 Ancoratge de l'ester actiu 16 a la resina 7	212

2.2.2 Protocol d'obtenció d'oligoribonucleòtids cíclics	213
2.2.2.1 Elongació de la cadena nucleotídica	213
2.2.2.2 Cyclació del precursor lineal ancorat a resina	214
2.2.2.3 Desprotecció dels grups fosfat internucleosídics i desancoratge de l'oligonucleòtid cíclic	214
2.2.2.4 Eliminació dels protectors de les bases i dessalat	215
2.2.2.5 Eliminació dels protectors de l'hidroxil 2'	215
2.2.3 Intent d'obtenció del tridecàmer r<p(EG(CUG) ₃ CE> 14	216
2.2.4 Tetranucleòtids cíclics	216
2.2.4.1 Obtenció de d<p(TE) ₂ > 18	216
2.2.4.2 Obtenció de r<p(UE) ₂ > 19	217
2.2.5 Obtenció del tetradecàmer r<p(EGCUGCE) ₂ > 15	218

Capítol 3: Síntesi d'oligonucleòtids cíclics mitjançant ciclació assistida per motlle

3.1 Protocol d'obtenció d'oligoribonucleòtids	219
3.1.1 Elongació de la cadena nucleotídica	219
3.1.2 Desancoratge i desprotecció de l'oligonucleòtid	220
3.1.3 Eliminació dels protectors de l'hidroxil 2'	220
3.1.4 Purificació	221
3.2 Cyclació d'oligoribonucleòtids no protegits	222
3.2.1 Intent de ciclació d'oligoribonucleòtids sense utilitzar motlle extern	222
3.2.1.1 Intent d'obtenció del r<p(CUG) ₁₄ >	222
3.2.2 Cyclació d'oligonucleòtids mitjançant motlle extern	223
3.2.2.1 Preparació del motlle d(GCA) ₆ 23	223
3.2.2.2 Obtenció del 42mer model i assaigs de ciclació	224
3.2.2.3 Nova síntesi del 42mer model i obtenció del producte cíclic	225
3.3 Cyclació d'oligoribonucleòtids parcialment protegits	228
3.3.1 El grup dmf com a protector de la guanosina	228
3.3.1.1 Obtenció de l'octadecàmer r(G ^{dmf} CU) ₆ i anàlisi de la seva estabilitat	228
3.3.1.2 Síntesi de G ^{dmf} i anàlisi de la seva estabilitat	228
3.3.2 A la recerca d'un nou esquema de protecció	230
3.3.2.1 Obtenció de G ^{All-Alloc} 30	230

3.3.2.1.1	Obtenció de 2',3',5'-O-triacetilguanosina 31	230
3.3.2.1.2	Obtenció de O ⁶ -al·lil-2',3',5'-O-triacetilguanosina 32	231
3.3.2.1.3	Obtenció de O ⁶ -al·lil-N ² ,N ² -bisal·lioxycarbonil -2',3',5'-O-triacetilguanosina 33	231
3.3.2.1.4	Obtenció de la O ⁶ -al·lil-N ² -al·lioxycarbonil-guanosina 30	232
3.3.2.2	Anàlisi d'estabilitat de G ^{All-Alloc} 30	233
3.3.2.3	Obtenció de G ^{Alloc} 36 i G ^{All} 37 i avaluació de la seva estabilitat.....	233
3.3.2.3.1	Obtenció de la N ² -al·liloxycarbonil-guanosina 36	233
3.3.2.3.2	Obtenció de la O ⁶ -al·lil-guanosina 37	234
3.3.2.3.3	Avaluació de l'estabilitat de les guanosines 36 i 37	235
3.3.3	Obtenció del fosforamidit de G ^{All}	235
3.3.3.1	Obtenció de 2',3',5'-O-N ² -tetraacetilguanosina 42	235
3.3.3.2	Síntesi de O ⁶ -al·lil-2',3',5'-O-N ² -tetraacetilguanosina 41	236
3.3.3.2	Síntesi de O ⁶ -al·lil-N ² -acetilguanosina 46	238
3.3.3.3	Síntesi de 5'-O-dimetoxitritil-O ⁶ -al·lil-N ² -acetilguanosina 40	238
3.3.3.4	Síntesi de 5'-O-dimetoxitritil-O ⁶ -al·lil-2'-O-[(triisopropilsiloxi)metil] -N ² -acetilguanosina 39	239
3.3.3.4.1	Síntesi de clorur de TOM (TOM-Cl) 49	239
3.3.3.4.2	Protecció en 2' de 5'-O-dimetoxitritil-O ⁶ -al·lil-N ² -acetilguanosina.....	241
3.3.3.5	Síntesi de 5'-O-dimetoxitritil-O ⁶ -al·lil-2'-O-[(triisopropilsiloxi)metil] -N ² -acetilguanosina-3'-cianoetil-N-diisopropil-fosforamidit 38	242
3.3.4	Obtenció d'oligonucleòtids que incorporen G ^{All}	243
3.3.4.1	14mer rG(CUG ^{All}) ₃ CUGC 53	243
3.3.4.1.1	Síntesi, purificació i caracterització del tetradecàmer 53	243
3.3.4.1.2	Estudi de desprotecció del nucleòsid DMT-G ^{All}	244
3.3.4.1.3	Estudi de desprotecció del 14mer 55	245
3.3.4.1.4	Desprotecció del 14mer 53	245
3.3.4.2	Síntesi del 6mer rUG ^{All} CUG ^{All} C 58 i estudi de desancoratge i desprotecció.....	246
3.3.4.3	Síntesi del 42mer r(UGC) ₃ (UG ^{All} C) ₈ (UGC) ₃ 52	247
3.3.5	Obtenció del 42mer cíclic per ciclació assistida per motlle amb protecció parcial del precursor lineal.....	247
3.3.5.1	Assaig de fosforilació i ciclació del 42mer 52	247
3.3.5.2	Fosforilació i ciclació del 42mer 52 a major escala.....	248
3.3.5.3	Desprotecció del 42mer cíclic 59	249

4 Síntesi d'oligodesoxiribonucleòtids entrecreuats

4.1 Entrecreuament de timidines.....	251
4.1.1 Obtenció del dinucleòsid de DMT-T entrecreuada 60	251
4.1.2 Estudi de l'estabilitat de la unió dietilsulfona enfront bases nucleòfiles.....	252
4.1.3 Obtenció del derivat bisamidit de la DMT-T entrecreuada 66	252
4.2 Obtenció d'oligonucleòtids entrecreuats amb la unió dietilsulfona	253
4.2.1 Protocol general d'obtenció d'oligonucleòtids entrecreuats amb la unió dietilsulfona	253
4.2.2 Obtenció del dúplex d(GCTCGTCGAGC) entrecreuat 67	255
4.2.3 Obtenció del dúplex d(GCTGCTGCTGC) entrecreuat 70	255
4.3 Estudi de les propietats dels oligonucleòtids entrecreuats	256
4.3.1 Reversibilitat de l'entrecreuament.....	256
4.3.2 Estudi de l'estabilitat tèrmica dels dúplexs entrecreuats	257
4.3.2.1 Estabilitat tèrmica del dúplex d(GCTCGTCGAGC) entrecreuat 67	257
4.3.2.1.1 Obtenció dels 11mers lineals d(GCTCGTCGAGC) 72 i d(GCTCGACGAGC) 75	257
4.3.2.1.2 Corbes de desnaturalització tèrmica	258
4.3.2.2 Estabilitat tèrmica del dúplex d(GCTGCTGCTGC) entrecreuat 70	258
4.3.2.2.1 Obtenció de l'11mer lineal d(GCTGCTGCTGC)	258
4.3.2.2.2 Corbes de desnaturalització tèrmica	259
4.3.3 Estudi de la conformació dels dúplexs entrecreuats	259
4.4 Exploració d'alternatives per l'obtenció de dúplexs entrecreuats	259
4.4.1 Intent d'entrecreuament d'oligonucleòtids en solució	259
4.4.2 Intent d'entrecreuament d'oligonucleòtids en fase sòlida	260
4.4.2.1 Síntesi de l'oligonucleòtid ancorat a resina	260
4.4.2.2 Assaigs d'entrecreuament de resines.....	260

5 Dels oligonucleòtids entrecreuats als oligonucleòtids cíclics

5.1 Protocol de fosforilació i ciclació d'oligonucleòtids entrecreuats	263
5.1.1 Fosforilació d'oligonucleòtids entrecreuats	263
5.1.2 Ciclació d'oligonucleòtids entrecreuats.....	263
5.2 Intent d'obtenció del 36mer cíclic 82	264
5.2.1 Síntesi del 18mer entrecreuat 80	264

5.2.2 Assaigs de ciclació del 18mer entrecreuat 80	264
5.2.2.1 Fosforilació i ciclació del dúplex entrecreuat 80 a petita escala	264
5.2.2.2 Fosforilació i ciclació del dúplex entrecreuat 80 a gran escala	265
5.3 Primer intent d'obtenció del 42mer cíclic 85	265
5.3.1 Síntesi del 21mer entrecreuat 83	265
5.3.2 Assaigs de ciclació del 21mer entrecreuat 83	265
5.3.2.1 Fosforilació i ciclació del dúplex entrecreuat 83 a petita escala	265
5.3.2.2 Fosforilació i ciclació del dúplex entrecreuat 83 a gran escala	266
5.3.2.3 Eliminació de la unió dietilsulfona dels oligonucleòtids 86 i 87	266
5.3.2.4 Digestió amb fosfatasa alcalina de l'oligonucleòtid 86	266
5.4 Segon intent d'obtenció del 42mer cíclic 85	267
5.4.1 Síntesi del 21mer entrecreuat 92	267
5.4.2 Assaigs de ciclació del 21mer entrecreuat 92	267
5.4.2.1 Fosforilació del dúplex entrecreuat 92	267
5.4.2.2 Assaigs de ciclació del dúplex entrecreuat 92 fosforilat	267

6 Síntesi d'oligoribonucleòtids entrecreuat

6.1 Entrecreuament d'uridines	269
6.1.1 Obtenció de la DMT-U ^{TOM} 96	269
6.1.1.1 Síntesi de 5'-O-dimetoxitritil-uridina 95	269
6.1.1.2 Síntesi de 5'-O-dimetoxitritil-2'-O-[(triisopropilsiloxi)metil]-uridina 96	270
6.1.2 Entrecreuament de la uridina 96 i síntesi del bisamidit 93	271
6.1.2.1 Entrecreuament de la uridina 95	271
6.1.2.2 Obtenció del dinucleòsid 94	272
6.1.2.3 Obtenció del bisamidit 93	272
6.2 Intent de síntesi d'oligoribonucleòtids entrecreuat	273
6.2.1 Protocol d'obtenció d'oligoribonucleòtids entrecreuat amb la unió dietilsulfona	273
6.2.2 Intent d'obtenció del dúplex entrecreuat r(GCUCGUCGAGC)	274
6.2.3 Intent d'obtenció del dúplex entrecreuat r(GCUGCUGCUGC).....	275

Bibliografia	279
---------------------------	-----

Abreviatures, Acrònims i Símbols

Ac	acetil
ACN	acetonitril
Ac ₂ O	anhídrid acètic
AcOEt	acetat d'etil
AcOH	àcid acètic
AcONH ₄	acetat d'amoni
AMA	NH ₃ /CH ₃ NH ₂ 1:1
anh.	anhidre
AP	fosfatasa alcalina
Ar	aromàtics
ATP	trifosfat d'adenosina
BTT	5-benziltio-1H-tetrazole
CA	citrat d'amoni
calc.	calculada
CCF	cromatografia en capa fina
CI	ionització química
CNE	2-cianoetil
CPG	suport de boles de vidre de porus controlat
Cq	carboni quaternari
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-è
DCM	diclorometà
DEAD	dietilazadicarboxilat
DIAD	diisopropilazadicarboxilat
DIPC	<i>N,N'</i> -diisopropilcarbodiimida
DIPEA	<i>N,N'</i> -diisopropiletilamina
DMAP	4-(dimetilamino)piridina
dmf	dimetilformamidin
DMF	<i>N,N'</i> -dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfòxid
DMT	4,4'-dimetoxitritil
DNA	àcid 2'-desoxiribonucleic
Dtc	dietilditiocarbamat de sodi
EDC	<i>N</i> -(3-dimetilaminopropil)- <i>N'</i> -etilcarbodiimida
EDTA	àcid etilendiamintetraacètic
eq.	equivalent
ESI	espectrometria de masses per ionització electrosprai
Et ₂ O	èter dietílic
EtOH	etanol
EtSH	etantiol
exp	experimental
Fmoc	9-fluorenilmetoxycarbonil
Fpmp	1-(2-fluorofenil)-4-metoxipiperidin-4-il
HMPA	hexametilfosforamida
HOBt	1-hidroxibenzotriazole
HPA	àcid 3-hidroxipicolínic
HPLC	cromatografia líquida d'alta resolució
HRMS	espectrometria de masses d'alta resolució
¹ PrOH	isopropanol
¹ PrPac	Isopropilfenoxiacetil

MALDI-TOF	espectrometria de masses de desorció iònica provocada per làser i assistida per matriu amb analitzador de temps de vol
MeOH	metanol
MES	àcid 2-(<i>N</i> -morfolino)etansulfònic
MPLC	cromatografia líquida de mitja resolució
min	minut
MS	espectrometria de masses
MSNT	1-mesitilensulfonil-3-nitro-1,2,4-triazole
M_w	massa molecular
m/z	relació massa/càrrega
<i>n</i> BuNH ₂	<i>n</i> -butilamina
<i>n</i> Bu ₂ SnCl ₂	clorur de <i>n</i> -butilestany(IV)
NMI	<i>N</i> -metilimidazole
NMP	<i>N</i> -metil-2-pirrolidona
NMR	ressonància magnètica nuclear
OD ₂₆₀	densitat òptica a 260 nm
Pac	fenoxiacetil
Pac ₂ O	anhídrid fenoxiacètic
PAGE	electroforesi en gel de poliacrilamida
PEG	polietilenglicol
pip	piperidina
PIPES	àcid piperazil- <i>N,N'</i> -bis(2-etansulfònic)
P_f	punt de fusió
PBu ₃	tributilfosfina
PPh ₃	trifenilfosfina
py	piridina
R_f	factor de retenció
RNA	àcid ribonucleic
SVPD	fosfodiesterasa de verí de serp
Stains-All	4,5,4',5'-dibenzo-3,3'-dietil-9-metiltiocarbocianant
t.a.	temperatura ambient
TBAF	fluorur de tetrabutilamoni
TBAOH	hidròxid de tetrabutilamoni
TBE	tampó de Tris-borat-EDTA
TBDMS	tertbutildimetilsilil
^t BuOOH	hidroperòxid de tertbutil
TCA	àcid tricloroacètic
TCEP	tris(carboxietil)fosfina
TEA	triethylamina
TEAA	acetat de triethylamoni
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametiletildiamina
Tet	tetrazole
THAP	2,4,6-trihidroxiacetona
THF	tetrahidrofurà
TIPS	triisopropilsilil
TOM	triisopropilsilioximetil
t_R	temps de retenció
Tris	tris(hidroxi)metilaminometà
UV-Vis	espectroscòpia d'ultravioleta-visible

INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS |

Les malalties associades a l'expansió de repeticions de triplets

Els microsatèl·lits són seqüències polimòrfiques repetitives de DNA formades per entre dos i sis parells de bases. Es sap poc sobre la funció d'aquests microsatèl·lits que es troben distribuïts al llarg del genoma de forma no uniforme¹ essent, però, abundants tant en el genoma procariòtic² com eucariòtic.³ En el cas concret del genoma humà poden arribar a constituir-ne aproximadament un 3%.⁴ Dins dels diferents microsatèl·lits existents els més abundants en les cèl·lules eucariotes són les repeticions de tres nucleòtids,² conegudes genèricament com a repeticions de triplets. Aquestes seqüències repetitives poden patir expansió o delació durant diferents processos cel·lulars com la replicació, la reparació o la recombinació genètica, alterant-se així la longitud d'aquests trams amb repeticions.⁵

L'expansió d'aquestes seqüències que contenen repeticions de triplets pot esdevenir patògena i causar les anomenades malalties associades a l'expansió de repeticions de triplets (TRED).⁶ Actualment es coneixen més de 20 malalties genètiques que pertanyen a aquest grup, tractant-se generalment de malalties neurològiques, neurodegeneratives o neuromusculars (*TAULA 1*).⁷ Les TRED són causades normalment per expansions d'un triplet CNG, tot i que en ocasions poden ser-ho per altres triplets o bé per seqüències més llargues com és ara tetra, penta o dodecanucleòtids.⁸ Habitualment el nombre de repeticions d'aquestes seqüències en una persona sana sol oscil·lar entre les 5 i les 30-40, apareixent símptomes de les malalties a partir de les 50-60 repeticions. Un cop passada aquesta barrera, el gen es torna inestable i és propens a sofrir expansions tant a nivell de cèl·lules somàtiques com en generacions successives.⁹ Aquest increment en el nombre de repeticions en generacions successives, així com l'augment de la severitat dels símptomes i la disminució de l'edat en la que es manifesta la malaltia, es coneix com a anticipació i ja va ser detectat en la distròfia miotònica a principis del segle XX.¹⁰

Malaltia	Unitat Repetitiva (Gen)	Localització Repetició	Repetició Normal	Repetició Tòxica	Principals Síntomes
<i>Malalties poliglutaníniques</i>					
HD	CAG (HTT)	Regió Codificant	6-34	36-121	Corea, distonia, dèficits cognitius, problemes psiquiàtrics
SCA1	CAG (ATXN1)	Regió Codificant	6-44	39-82	Atàxia, disàrtria, espasticitat, oftalmoplegia
SCA2	CAG (ATXN2)	Regió Codificant	15-24	32-200	Atàxia, hiporreflexia, polineuropatia
SCA3	CAG (ATXN3)	Regió Codificant	13-36	61-84	Atàxia, distonia, espasticitat
SCA6	CAG (CACNA1A)	Regió Codificant	4-19	10-33	Atàxia, disàrtria, tremolors, nistagme
SCA7	CAG (ATXN7)	Regió Codificant	4-35	37-306	Atàxia, disàrtria, ceguera, distròfia de cons i bastons
SCA17	CAG (TBP)	Regió Codificant	25-42	47-63	Atàxia, corea, distonia, demència, convulsions
SBMA	CAG (AR)	Regió Codificant	9-36	38-62	Debilitat muscular, fertilitat reduïda, ginecomàstia
DRPLA	CAG (ATN1)	Regió Codificant	7-34	49-88	Atàxia, convulsions, demència, coreoatetosis
<i>Mecanisme de pèrdua de funció</i>					
FRAXA	CCG (FMR1)	5' UTR	6-60	>200	Retard mental, autisme, macroorquidisme, dismorfia facial
FRAXE	CCG (FMR2)	5' UTR	4-39	200-900	Retard mental, hiperactivitat
FRDA	GAA (FXN)	Intró	6-32	200-1700	Atàxia sensorial, cardiomiopatia, diabetis
<i>Mecanisme de guany de funció a través de l'RNA</i>					
DM1	CTG (DMPK)	3' UTR	5-37	50-10000	Miotonia, defectes conductes cardíacs, cataractes, alteracions sistema nerviós, distròfia muscular
DM2	CCTG (ZNF9)	Intró	10-26	75-11000	Com DM1, no forma congènita
FXTAS	CGG (FMR1)	5' UTR	6-60	60-200	Atàxia, tremolors, parkinsonisme, demència
<i>Mecanisme desconegut</i>					
SCA8	CTG (ATXN8)	RNA no traduït	16-34	>74	Atàxia, disàrtria, espasticitat, nistagme
SCA10	ATTCT (ATXN10)	Intró	10-20	500-4500	Atàxia, disàrtria, convulsions, disfàgia
SCA12	CAG (PPP2R2B)	5' UTR	7-45	55-78	Atàxia, espasticitat, tremolors, demència
HDL2	CTG (JPH3)	3' UTR	7-28	66-78	Corea, distonia, deteriorament cognitiu

Taula 1. Taula resum de les diferents malalties d'expansió de repeticions de triplets. Abreviatures: AR, receptor d'andrògens; ATN1, atrofina 1; ATXN, ataxina; CACNA1A, canal de calci depenent de voltatge de tipus P/Q, subunitat α -1A; DM, distròfia miotònica; DMPK, proteïna quinasa de la distròfia miotònica; DRPLA, atrofia dentatorrubral-palidoluisiana; FMR1, retard mental fràgil X 1; FMR2, retard mental fràgil X 2; FRAXA, síndrome de la X fràgil; FRAXE, síndrome de la XE fràgil; FRDA, atàxia de Friedreich; FXN, frataxina; FXTAS, atàxia i tremor associades a la X fràgil; HD, malaltia de Huntington; HDL2, malaltia similar a Huntington tipus 2; HTT, huntingtina; JPH3, junctofilina 3; PPP2R2B, proteïna fosfatasa 2, reguladora de la subunitat B, isoforma β ; UTR, regió no traduïda; SBMA, atrofia muscular progressiva espinobulbar; SCA, atàxia espinocerebral; TBP, proteïna d'unió a la caixa TATA; ZNF9, dit de zinc 9.

Segons on es localitzi l'expansió de la repetició de triplets podem diferenciar dues famílies de malalties: aquelles caracteritzades per l'expansió del triplet CAG en regions exòniques o codificants (també anomenades malalties poliglutamíniques), i aquelles en les quals l'expansió del triplet té lloc en regions del genoma no codificants.

En les malalties poliglutamíniques, que inclouen la malaltia de Huntington, l'atrofia muscular progressiva espinobulbar (o malaltia de Kennedy), l'atrofia dentatorrubral-palidoluisiana (o síndrome de Haw River) i la gran majoria d'atàxies espinocerebrals, l'expansió del triplet CAG codifica seqüències poliglutamíniques aberrants.¹¹ En un primer moment es va creure que aquestes seqüències podien organitzar-se en forma d'unes "cremalleres polars" i originar agregats altament estructurats, els quals podien formar inclusions intracel·lulars, nuclears o citoplasmàtics que segregessin diverses proteïnes o bé factors de transcripció.¹² Actualment es creu que les cues poliglutamíniques poden ser desancorades de la resta de la proteïna, generant fragments tòxics. Aquests poden ser tòxics *per se* o bé formar oligòmers que al seu torn generin inclusions intracel·lulars i que generin toxicitat a través d'alteracions en la transcripció o el metabolisme o bé en els camins de resposta al *stress* cel·lular.¹³ Tampoc es descarta que les cues poliglutamíniques provoquin un canvi en la conformació de la proteïna, el que podria desencadenar interaccions anòmales amb la resta de proteïnes cel·lulars.¹⁴

Les TRED causades per l'expansió de triplets en regions no codificants del genoma són provocades per l'expansió d'un triplet (CTG, CAG, CCG, CGG o GAA) o bé d'un microsatèl·lit més llarg (CCTG, C₄GC₄GCG, ATTCT) (*TAULA 1*).⁹ Dins aquest grup podem trobar malalties com l'atàxia de Friedreich, els síndromes de la X i la XE fràgils, l'atàxia i tremor associades a la X fràgil, les atàxies espinocerebrals 8, 10 i 12, el tipus 2 de la malaltia similar a Huntington i les distròfies miotòniques de tipus 1 i 2. Algunes d'aquestes malalties, com els síndromes de la X i la XE fràgils o l'atàxia de Friedreich, són causades per un mecanisme de pèrdua de funció de la proteïna que codifica el gen on es troba l'expansió. Aquesta pèrdua és deguda a una reducció del nivell de transcripció, ja sigui a causa de la metilació aberrant d'una regió del gen^{12,15} o bé pel segrest de factors de transcripció;¹⁶ tots dos efectes són causats per les expansions de triplets. Altres malalties, com l'atàxia i tremor associades a la X fràgil o els dos tipus de distròfia miotònica, són causades per un mecanisme de guany de funció del propi RNA. Per la resta de malalties, en canvi, encara no és clar el mecanisme de patogènesis.

La distròfia miotònica

La distròfia miotònica, descrita per primer cop l'any 1909,¹⁷ és la forma de distròfia muscular més comuna entre la població adulta, amb una incidència d'1 de cada 8500 individus.¹⁸ Aquesta afectació pot veure's augmentada fins a 60 vegades en poblacions concretes¹⁹ o, en canvi, veure's disminuïda en altres com en la oceànica, la sudasiàtica o la subsahariana, on la seva presència és gairebé inexistent.²⁰

La distròfia miotònica és una malaltia dominant autosòmica multisistèmica. La simptomatologia és molt diversa, caracteritzada per una relaxació lenta dels músculs després de la contracció voluntària (miotonia), distròfia muscular, cataractes, ptosi, hiperinsulèmia, hiperglucèmia, hipogammaglobulinèmia, dolor abdominal, disfàgia, fallada testicular i calvicie frontal en homes, defectes en els conductes cardíacs que poden resultar en arítmies o fins i tot mort sobtada, i varies alteracions del sistema nerviós central, que poden incloure somnolència, trastorn de la personalitat, dèficit de memòria, desordre del comportament i dificultat en l'aprenentatge de les funcions cognitives.^{18,21} La presència de tots o part d'aquests símptomes, així com la seva severitat, varia entre els diferents pacients, fins i tot dins d'una mateixa família.

Es coneix un segon tipus de distròfia miotònica,²² anomenada distròfia miotònica proximal o, més correctament, distròfia miotònica de tipus 2 (DM2)²³ que es diferencia de l'anterior (anomenada distròfia miotònica de tipus 1 o DM1) en l'absència de la forma congènita de la malaltia, en el grup de músculs afectat de forma majoritària (proximals en el cas de la DM2 i distals en el cas de la DM1), en una menor severitat de la distròfia muscular i en una menor afectació del sistema nerviós central, així com en una edat d'inici de la malaltia major.^{21a} Aquest segon tipus de distròfia miotònica té un grau d'incidència similar al de la de tipus 1 i sembla provenir d'una mutació originada al nord d'Europa fa entre 200 i 540 generacions i, des d'allí, distribuïda per la resta del món.²⁴ La DM1, en canvi, sembla que es va originar en mutacions durant les migracions de sortida d'Àfrica de les poblacions ancestrals d'humans moderns.²⁵

A principis dels anys 90 es va poder determinar que la distròfia miotònica de tipus 1 era causada per l'expansió del triplet CTG en l'extrem 3' de la regió no traduïda (però sí, en canvi, transcrita) del gen de la proteïna quinasa de la distròfia miotònica (DMPK), el qual es localitza en el cromosoma 19q13.3.²⁶ En efecte, mentre un individu no afectat per la distròfia miotònica de tipus 1 presenta entre 5 i 38 repeticions del triplet CTG en

aquesta regió del gen, un individu amb un nombre superior a 50 comença a mostrar símptomes de la malaltia, els quals es tornen més severes en augmentar el nombre de repeticions del triplet (podent arribar fins a les 10000). D'aquesta manera s'observa una correlació entre el nombre de repeticions del triplet CTG i la severitat dels símptomes de la distròfia miotònica,^{26c} així com en l'edat d'inici de l'afectació (anticipació).²⁷

En el cas de la distròfia miotònica de tipus 2, en canvi, es va haver d'esperar gairebé 10 anys més per tal de conèixer-ne la causa. L'origen de la malaltia no es troba en el cromosoma 19q, sinó en el 3q21,²⁸ on l'intró 1 del gen que codifica la proteïna del dit de zinc 9 (ZNF9) pateix una expansió del tetranucleòtid CCTG.²⁹ Aquesta esdevé patògena per sobre de les 75 repeticions, podent arribar en alguns individus fins a les 11000. Com en el cas de la distròfia miotònica de tipus 1, existeix també anticipació.³⁰

Al llarg del anys han sorgit diverses teories sobre com l'expansió del triplet CTG causava les diferents manifestacions clíniques de la distròfia miotònica.³¹ Primerament es va pensar que les expansions del triplet CTG alteraven la síntesi i el processat del mRNA que codifica la DMPK, el que feia que la proteïna perdés la seva funció (haploinsuficiència de la DMPK).³² Els models en ratolins, però, només van poder reproduir de forma molt lleugera la simptomatologia, pel que l'haploinsuficiència de la DMPK³³ (o de la ZNF9 en el cas de la DM2³⁴), tot i que pugui originar una part del fenotip de la malaltia, no n'és la causa principal.^{33,34,35}

Paral·lelament a la teoria de l'haploinsuficiència de la DMPK va sorgir la hipòtesi que les expansions de les repeticions de CTG i CCTG alteressin l'estructura local de la cromatina, impedit d'aquesta manera l'expressió correcta del gens veïns, com el SIX5. En aquest sentit es va determinar que els pacients de distròfia miotònica presentaven nivells reduïts del factor de transcripció que codifica aquest gen.³⁶ Els models en ratolins, un altre cop, no van poder reproduir els símptomes de la malaltia més enllà de les cataractes,³⁷ el que indica que aquesta reducció en l'expressió podria contribuir en la simptomatologia però no explicar-la globalment.³⁸ Calia, per tant, trobar una teoria concloent.

Una de les principals característiques observables en tots dos tipus de distròfia miotònica és la formació d'inclusions en el nucli per part del transcrit d'RNA que conté les expansions dels triplets.³⁹ Aquestes repeticions CUG s'estructuren en forma de forqueta (*hairpin*) en els quals els parells G-C es troben interromputs per parells U-U,⁴⁰

no sent exportades fora del nucli cel·lular sinó acumulant-s'hi. Una nova teoria era que aquestes estructures poguessin ser capaces de segrestar proteïnes, impedit-les-hi de dur a terme la seva funció.⁴¹ Així succeeix amb la MBNL1 (*muscleblind-like 1*), una proteïna que interactua de forma específica amb les repeticions CUG⁴¹ i CCUG.⁴² Degut a la semblança entre l'estructura secundària d'aquestes seqüències i la del lloc d'unió de la proteïna,⁴³ la MBNL1 queda confinada dins les inclusions del nucli cel·lular,⁴⁴ reduint-se així la seva concentració efectiva lliure en el nucli cel·lular. A més a més, l'índex de segrest de la MBNL1 és directament proporcional a la llargada de la repetició de triplets.⁴¹ Models amb ratolins van demostrar que aquesta proteïna es troba implicada en la regulació del processat (*splicing*) alternatiu.⁴⁵

En les cèl·lules eucariotes els gens es troben dividits en múltiples exons separats per introns. Durant el *splicing*, l'eliminació dels introns del pre-mRNA genera el mRNA madur. El *splicing* alternatiu és un procés pel qual més d'un mRNA pot ser generat a partir d'un mateix pre-mRNA a través de la inclusió o exclusió dels diferents exons o introns.⁴⁶ Més del 90% del gens humans són, de fet, processats d'aquesta manera.⁴⁷ Aquest *splicing* alternatiu requereix l'acció de diferents proteïnes que actuïn com a factors reguladors, pel que una mala regulació del procés causada per nivells anormals d'aquest factors pot tenir conseqüències catastròfiques per l'organisme. En el cas de la distròfia miotònica, existeix una regulació deficient en més d'una dotzena de processos de *splicing* alternatiu,⁶ alguns dels quals relacionats directament amb els símptomes de la malaltia, com la resistència a la insulina⁴⁸ o els defectes en els conductes cardíacs.⁴⁹

Existeix una altra proteïna reguladora del *splicing* implicada en la distròfia miotònica, la CUGBP1 (*CUG binding protein 1*). Aquesta proteïna s'uneix a oligonucleòtids (CUG)₈ *in vitro*,⁵⁰ però en canvi, a diferència de la MBNL1, no és segrestada pel transcrit d'RNA.^{44a} Aquest transcrit el que fa és activar la proteïna quinasa C (PKC, en les seves sigles en anglès), la qual hiperfosforila la CUGBP1, estabilitzant-se dins del nucli cel·lular i augmentant així la seva concentració efectiva en el nucli cel·lular (*FIGURA 1*).⁵¹

La funció reguladora de la MBNL1 i la CUGBP1 és antagònica: mentre la MBNL1 promou la transició del patró de *splicing* fetal al patró adult, la CUGBP1 contribueix en mantenir aquest patró fetal.⁵² Per tant, la reducció dels nivells de MBNL1 en el nucli cel·lular, juntament amb l'augment dels de CUGBP1, provoca un manteniment dels

patrons de *splicing* fetal. Aquestes isoformes fetals es mostren incapaces de dur a terme les funcions de les isoformes adultes causant, d'aquesta manera, gran part de la simptomatologia de la distròfia miotònica.⁵³

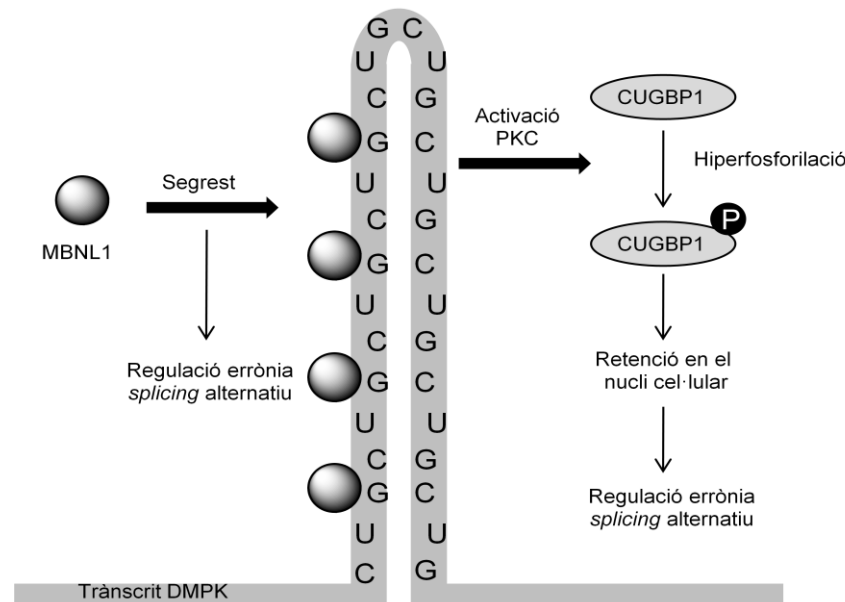


Figura 1. La MBNL1 és segrestada per l'estructura tipus *hairpin* que adopta el trànscrip d'RNA, quedant retinguda en les incusions del nucli cel·lular. Per la seva banda, les repeticions CUG activen la fosforilació de la CUGBP1 a través de la PKC, el que estableix la proteïna en el nucli cel·lular. Tots dos efectes combinats provoquen una regulació errònia del *splicing* alternatiu.

S'han proposat altres mecanismes que poden contribuir al fenotip de la distròfia miotònica, més enllà dels tres esmentats.^{53,54} En primer lloc, el trànscrip d'RNA pot unir-se a factors de transcripció i segrestar-los, conduint a una menor transcripció d'alguns gens, com en el cas del gen del canal de clor 1, relacionat amb la miotonia.⁵⁵ En segon lloc, la regulació d'alguns miRNA (microRNA) del teixit cardíac està controlada pels nivells de MBNL1. Una regulació incorrecta d'aquests miRNA pot alterar l'expressió de diferents gens i contribuir a les disfuncions cardíques dels malalts.⁵⁶ En tercer lloc, els *hairpins* en que s'estructuren els trànscrips de les repeticions de triplets són atacats per la ribonucleasa Dicer, generant siRNA (petits RNA d'interferència) de 20-22 nucleòtids amb repeticions CUG. Aquests siRNA poden interaccionar amb diferents mRNA, possiblement interferint en la seva expressió i contribuint a la patogènesi de la malaltia.⁵⁷

En resum, el trànscrip d'RNA que conté l'expansió de CUG o CCUG s'estructura en forma de *hairpin* en el nucli cel·lular, segrestant la MBNL1 i activant la

hiperfosforilació de la CUGBP1, que s'acumulen en el nucli cel·lular. Els nivells incorrectes d'aquestes dues proteïnes provoquen que el patró de *splicing* fetal no deixi pas al patró adult, generant d'aquesta manera isoformes de proteïnes no correctes que causen gran part dels símptomes de la malaltia. En un nivell menor, també poden contribuir a la simptomatologia l'haploinsuficiència de la DMPK, el silenciament de gens veïns per part de les expansions de CTG o CCTG, el segrest de factors de transcripció per part del transcrits de CUG, la incorrecta regulació dels miRNA causada pel segrest de la MBNL1 o la generació de siRNA amb repeticions CUG a partir del transcrit.

Aquests avenços en el coneixement de les bases moleculars de la malaltia han portat al desenvolupament de diferents estratègies terapèutiques per tal de revertir els símptomes de la DM1.⁵⁸ Aquestes estratègies es poden agrupar bàsicament en dos blocs: aquelles dirigides a degradar o modificar el transcrit que conté les repeticions CUG i aquelles encaminades a inhibir la interacció entre l'RNA patogènic i la MBNL1.

Dins del grup d'estratègies orientades a degradar o modificar el transcrit d'RNA s'han dut a terme diverses aproximacions. D'una banda s'han utilitzat oligonucleòtids 2'-O-metil complementaris a les repeticions CUG per tal de reduir la formació d'inclusions en el nucli cel·lular.⁵⁹ D'altra banda s'han utilitzat ribozimes per substituir la regió 3' mutada de la DMPK per una regió 3' diferent⁶⁰ o bé per reduir via degradació el nombre de repeticions.⁶¹ Finalment, s'han usat siRNA⁶² i oligonucleòtids antisentit (bloquejats o 2'-O-metoxietil)⁶³ per tal de reduir els nivells del transcrit de la DMPK en el nucli cel·lular.

Dins del grup d'estratègies adreçades a impedir la interacció entre el transcrit d'RNA patogènic i la MBNL1, s'han usat diferents tipus de molècules: oligonucleòtids morfolino per a teràpia antisentit,⁶⁴ hexapèptids que contenen D-aminoàcids,⁶⁵ conjugats peptoids-aminoglicòsid,⁶⁶ conjugats acridina-triaminotriazina⁶⁷ o molècules petites com la pentamidina.⁶⁸ Tot aquest compostos han demostrat una gran afinitat per les repeticions CUG, la capacitat de desplaçar la MBNL1 i, en alguns casos, la normalització del patró de *splicing* en cultius cel·lulars,⁶⁷ models amb *Drosophila*⁶⁵ o amb ratolins,⁶⁴ essent actius, fins i tot, després d'administració oral.⁶⁵

Importància de l'estructura en l'expansió de les repeticions de triplets i en la patologia de les TRED

Com s'ha explicat en l'apartat anterior, l'estructuració del transcrit d'RNA que conté expansions de les repeticions CUG en forma de *hairpin* té una importància crucial en el desenvolupament de la distròfia miotònica. Això fa que l'estudi estructural de les repeticions CTG i del seu transcrit CUG, així com de les altres seqüències de repeticions de triplets, adquireixi un gran interès.

L'anàlisi de les diferents expansions de repeticions de triplets ha revelat que, lluny d'estructurar-se com la canònica doble hèlix del B-DNA, aquestes seqüències de DNA adquireixen diferents estructures.⁶⁹ A banda de les estructures tipus *hairpin*, observades en el cas de la DM1,⁷⁰ la DM2⁷¹ i d'altres malalties de repeticions de triplets,⁷² també s'ha detectat la formació d'estructures tipus quàdruplex (síndrome de la X fràgil),⁷³ DNA enganxós o *sticky DNA* (atàxia de Friedreich)⁷⁴ o DNA desenrotllat (atàxia espinocerebral 10) (FIGURA 2).⁷⁵ L'estructura tipus *hairpin* no només és adoptada per les expansions de les repeticions a nivell de DNA, sinó també pels seus transcrit d'RNA.^{40,76} Aquestes estructures també s'han observat *in vivo*.⁷⁷

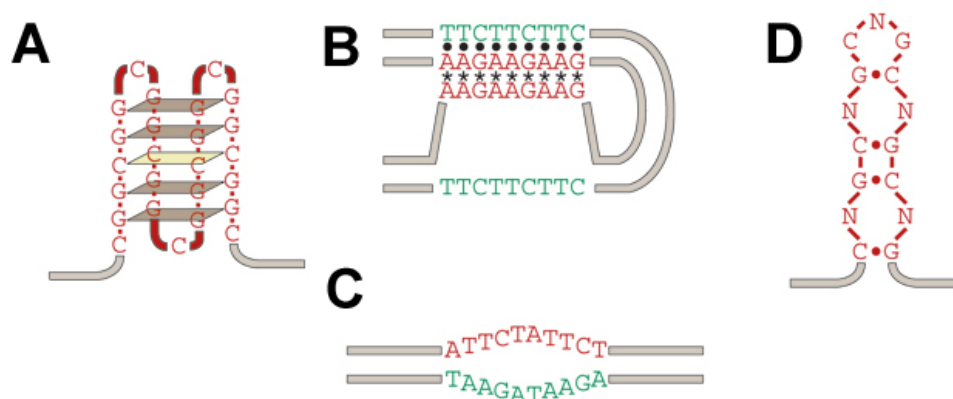


FIGURA 2^{5b} Estructures que adopten les seqüències amb repeticions de triplets en el DNA. **A.** Quàdruplex de guanina format per repeticions $(CGG)_n$. Els romboides marrons representen quàdruplexs i el groc *i-motifs*. **B.** *Sticky DNA* format per les repeticions $(GAA)_n \cdot (TTC)_n$, on els punts representen interaccions tipus Watson-Crick i el asteriscs interaccions tipus Hoogsteen. **C.** DNA desenrotllat format per les repeticions $(ATTCT)_n \cdot (AGAAT)_n$. **D.** *Hairpin* imperfecte amb *mismatches* format per diverses repeticions $(CNG)_n$.

El cas de la distròfia miotònica és el que s'ha estudiat de forma més exhaustiva. Les seqüències amb repeticions de triplets CTG formen estructures tipus *hairpin* on els aparellaments imperfectes (*mismatches*) T·T estan separats entre ells per dos parells G-C. L'anàlisi dels dúplexs (CTG)·(CAG) ha mostrat la formació de regions rrelliscades cap a fora dels dúplex (*slipped-out*) en totes dues cadenes, estructurant-se les repeticions CTG com a *hairpin* i quedant les CAG, en canvi, només parcialment estructurades.⁷⁸ Això és degut a que els *hairpins* CTG són més estables que el corresponents CAG, segurament a causa de la formació de ponts d'hidrogen entre les timines en el parell T·T.⁷⁹ La formació d'aquestes estructures en la cadena que creix durant la replicació, juntament amb aquesta major estabilitat dels *hairpins* formats per les repeticions CTG respecte a la de les repeticions CAG, és una de les causes de l'expansió de les repeticions CTG en la distròfia miotònica.^{5,69} Una anàlisi més detallada de la seqüència formada per repeticions CTG indica que la seva estructura es correspondria més aviat a un *bis-hairpin* que a un *hairpin*, és a dir, un *hairpin* el qual contingues un segon *loop* o bucle al llarg de la tija (*stem*) (FIGURA 3.A).⁸⁰ A l'augmentar el nombre de repeticions aquest *loop* secundari podria deixar pas a un nou *hairpin*, i així successivament, originant-se d'aquesta manera estructures ramificades.⁸⁰

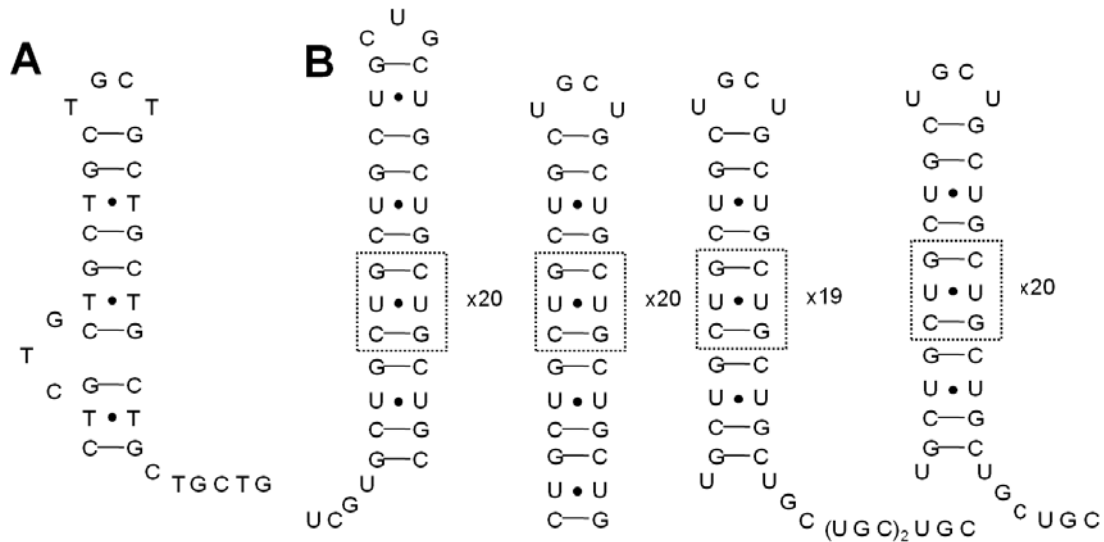


Figura 3 Estructures adoptades per les repeticions CTG i CUG. Els guions representen interaccions tipus Watson-Crick, mentre que els punts representen interaccions més dèbils (d'un o cap pont d'hidrogen) entre uridines o timidines. **A.** Estructura tipus *bis-hairpin* adoptada per la seqüència (CTG)₁₅.⁸⁰ **B.** Exemples de les diferents estructures adoptades per la seqüència (CUG)₄₉.^{76a}

L'estudi de diverses seqüències $(CUG)_n$ en solució va determinar que aquestes s'estructuren en forma de *hairpins* on els parells U·U es troben separats per dos parells C·G, amb un *loop* de 4 nucleòtids o, en ocasions, de 3.^{76a} Aquests *hairpins* no presenten una estructura única, ja que degut a la repetitivitat de la seqüència poden lliscar sobre ells mateixos i donar lloc a diversos *hairpins* que coexisteixen al mateix temps, diferenciant-se entre ells pel nombre de bases desparellades en els extrems 5' i, principalment, 3' terminal (FIGURA 3.B). En el cas de la distròfia miotònica de tipus 2, l'anàlisi de les seqüències $(CCUG)_n$ va mostrar que aquestes també s'estructuraven en forma de *hairpins* que podien lliscar sobre ells mateixos, on dos parells C·U es troben separats per dos parells C·G, amb un *loop* de 6, 8 o 10 nucleòtids.⁴⁰

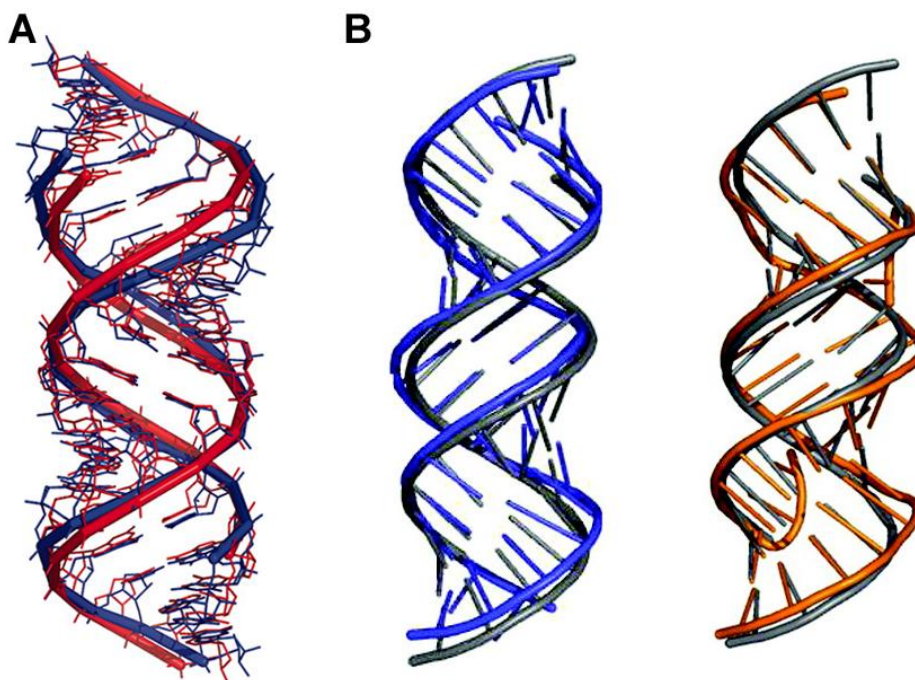


FIGURA 4 Semblança entre les estructures determinades per difracció de raigs X que contenen repeticions de triplets i la forma A de l'RNA. **A.** Superposició de $r(CUG)_6$ (blau) i la forma A canònica de l'RNA (vermell).^{81a} Entre els diferents parells U·U s'estableix un pont d'hidrogen.^{81b} **B.** Superposició de les dues formes cristal·lines de $r[UUGGGC(CUG)_3GUCC]_2$ i la forma A de l'RNA (gris). En l'estructura de color blau, els parells U·U de les repeticions CUG terminals formen un pont d'hidrogen, mentre que en la repetició central no se n'observa cap. En l'estructura de color taronja, en canvi, els parells U·U de les repeticions CUG terminals formen dos ponts d'hidrogen, mentre que el parell de la repetició central segueix sense mostrar-ne cap.⁸⁴

L'estudi per difracció de raigs X del dúplex de la seqüència $(CUG)_6$ indica que la seva estructura és molt similar a la forma A de l'RNA, formant una doble hèlix antiparal·lela on els parells C·G estableixen interaccions tipus Watson-Crick i els

parells U·U es troben lleugerament inclinats, observant-se només un possible pont d'hidrogen entre ells.⁸¹ (FIGURA 4.A) Aquestes interaccions G-C⁸² i U·U⁸³ també s'han observat per RMN. Estudis més recents per difracció de raigs X del dúplex model r[UUGGGC(CUG)₃GUCC]₂, en canvi, mostren que, segons el mode de cristal·lització de la seqüència, el parells U·U poden estar units per 0, 1 o 2 ponts d'hidrogen,⁸⁴ el que podria indicar que els parells U·U podrien adoptar múltiples conformacions *in vivo* (FIGURA 4.B).

En resum, les estructures de les repeticions CTG i CUG tenen una gran importància en l'aparició i el desenvolupament de la distròfia miotònica de tipus 1. L'estructura tipus *hairpin* de les repeticions CTG és clau en l'expansió del triplet tant durant la replicació com en la reparació o la recombinació genètica.⁵ Aquesta mateixa estructura en les repeticions CUG és la que provoca la formació d'inclusions en el nucli cel·lular i el segrest de la MBNL1.^{39,41} D'altra banda, tot i els nombrosos estudis realitzats, encara existeixen dubtes sobre alguns aspectes de l'estructura tipus *hairpin* que adopten les repeticions CUG. Tot plegat fa que sigui interessant disposar de nous models d'oligonucleòtids que continguin aquestes repeticions.

La facilitat que tenen les cadenes per lliscar l'una sobre l'altra en aquestes seqüències repetitives, obtenint-se un equilibri conformacional entre diferents estructures tipus *hairpins* amb *stems* diferents i seqüències desaparellades en els extrems 5' o 3' més o menys llargues, pot complicar de forma important l'estudi estructural en solució de les seqüències. Un mètode que s'ha usat per tal d'estabilitzar els *hairpins* amb repeticions CUG és afegir al extrem uns quants parells G-C per tal de desplaçar l'equilibri conformacional cap a la formació d'un únic *hairpin*.⁴⁰ Tot i això aquesta estructura majoritària està en competència amb altres estructures, com pot ser la formació del dúplex intermolecular. Per tant, seria important disposar de nous models estructurals estabilitzats, on hi hagués una sola estructura, per tal de facilitar-ne l'estudi.

Una primera manera d'estabilitzar l'estructura *hairpin*, introduint a més una mínima modificació en el sistema, seria unir covalentment els extrems 5' i 3' terminals mitjançant un enllaç fosfat-diester, generant així un oligonucleòtid cíclic en forma de doble *hairpin* o *dumbbell*. L'oligonucleòtid cíclic així generat presentaria una restricció conformacional que evitaria la formació d'estructures alternatives com podrien ser dúplexs intermoleculars o *hairpins* amb diferents mides de *stem*.

Una segona manera d'estabilitzar l'estructura del dúplex d'RNA seria a través de l'entrecruament de les dues cadenes. Això es podria aconseguir unint aquestes cadenes de forma covalent mitjançant un pont covalent entre dues bases (*crosslink*). L'oligonucleòtid generat d'aquesta manera presentaria la restricció conformacional buscada, evitant d'aquesta manera la formació d'altres estructures no desitjades.

Oligonucleòtids cíclics

La presència dels oligonucleòtids cíclics a la natura es troba àmpliament documentada. D'una banda, es sap que la majoria del material genètic dels organismes inferiors, tant en virus com en bacteris, es troba organitzat d'aquesta manera.⁸⁵ D'altra banda, es coneixen importants funcions regulatòries de diversos processos bioquímics per part de mono i diribonucleòtids cíclics.⁸⁶ Tot i això, l'ampli estudi a que s'han sotmès els oligonucleòtids cíclics ha sigut degut a que aquests presenten una sèrie de propietats que els fan molt interessants.

La utilització dels oligonucleòtids com a fàrmacs en el tractament de diverses malalties constitueix una alternativa terapèutica a les actualment existents,^{62-64,87} ja sigui mitjançant la teràpia antigen, antisentit o bé la utilització d'aptàmers.⁸⁸ Una de les principals limitacions a l'hora d'aplicar aquestes teràpies, però, és la baixa estabilitat dels oligonucleòtids en medis biològics,⁸⁹ per això s'han introduït diverses modificacions per tal d'augmentar-ne l'estabilitat.⁹⁰ En aquest sentit, els oligonucleòtids cíclics representen una alternativa interessant ja que, a més d'una major resistència a les nucleases,⁹¹ presenten també una millor absorció cel·lular, afinitat i selectivitat per la seva diana degut a la preorganització del cercle.^{91b,92}

Una segona característica interessant dels oligonucleòtids cíclics és el fet que aquests són substrats efectius de les polimerases,⁹³ les quals són capaces de realitzar múltiples còpies del cercle, unides una rere l'altra, en el que es coneix com a mecanisme de cercle rodant. Aquest mecanisme s'ha usat exitosament tant per obtenir quantitats amplificades de DNA i RNA multimèrics⁹⁴ com per l'amplificació de senyals provinents de la detecció de mutacions o d'antigen.⁹⁵

En darrer lloc, els oligonucleòtids cíclics s'han usat àmpliament per dur a terme estudis estructurals, atès que la restricció intrínseca de la seva flexibilitat respecte als seus homòlegs lineals els converteix en bons models. Aquesta restricció comporta una augment de l'estabilitat de l'estructura,⁹⁶ al mateix temps que impedeix la formació d'estructures alternatives, facilitant-ne d'aquesta manera l'estudi tant en estat sòlid com en solució.

Els oligonucleòtids cíclics s'han usat per portar a cap estudis termodinàmics i d'influència de la seqüència en les propietats del dúplex, així com per comparar-la amb els seus anàlegs lineals.⁹⁷ Aquests estudis s'han realitzat emprant oligonucleòtids cíclics en forma de doble *hairpin* o *dumbbell*, els quals presenten estructura interna de dúplex en la regió central i dos regions amb *loops* que contenen les bases desaparellades. Aquestes estructures també s'han usat per estudiar altres motius estructurals, com poden ser les estructures de tipus cruciforme formades per seqüències de repeticions invertides,⁹⁸ la formació d'estructures generades per la interacció entre un oligonucleòtid circular i una segona cadena, com poden ser les triples hèlices^{92b,99} (tant amb el motiu paral·lel com antiparal·lel), o bé el motiu *bi-loop*, format entre dos oligonucleòtids cíclics.¹⁰⁰ En aquest darrer motiu els dos oligonucleòtids interaccionen donant lloc a una estructura tipus quàdruplex, la qual podria tenir alguna rellevància *in vivo*.

Aquest interès terapèutic, biològic i estructural ha estimulat el desenvolupament de diverses metodologies sintètiques a fi de preparar oligonucleòtids cíclics, ja sigui contenint unions naturals o no. Actualment els diferents procediments existents es poden classificar en tres estratègies: ciclació en solució, ciclació en fase sòlida i ciclació en solució assistida per motlle.

La ciclació en solució té lloc en condicions d'alta dilució¹⁰¹ entre els grups fosfat i hidroxil dels extrems mentre la resta de l'oligonucleòtid es troba protegit. Una metodologia anàloga s'utilitza en el cas de la ciclació en fase sòlida¹⁰², excepte que en aquest cas l'oligonucleòtid es troba encara ancorat a una resina. En canvi, en la ciclació assistida per motlle el precursor lineal, aquest cop totalment desprotegit, es preorganitza en solució, ja sigui amb l'ajuda d'un motlle intern o extern. Aquest motlle aproxima els extrems a unir per tal que aquests puguin reaccionar amb major facilitat.^{96b,103} Aquests mètodes de ciclació seran explicats amb més detall en el Bloc 1.

Oligonucleòtids entrecreuats

L'entrecreuament de cadenes de DNA pot aparèixer en les cèl·lules com a resultat de l'exposició a agents mutagènics que es troben presents en l'ambient,¹⁰⁴ així com a productes generats pel propi metabolisme.¹⁰⁵ Existeixen indicis que aquests entrecreuaments podrien contribuir a l'origen de malalties tan diferents com l'Alzheimer,¹⁰⁶ el Parkinson¹⁰⁷ o l'arteriosclerosi,¹⁰⁸ així com amb fenòmens d'envelliment cel·lular.¹⁰⁹

La unió covalent de les cadenes a través de les seves bases és una de les lesions més nocives diferents que pot patir el DNA, atès que aquesta impedeix el desenrotllament del DNA, imprescindible en diferents processos cel·lulars.¹¹⁰ La reparació d'aquest entrecreuament és generalment lenta i costosa, podent provocar la mort de la cèl·lula per apoptosi.¹¹¹ La impossibilitat de dur a terme la replicació i la transcripció, a més, provoca l'aturada de la divisió cel·lular, cosa que ha fet que s'hagin dedicat molts esforços a la recerca de substàncies químiques amb capacitat d'entrecreuar cadenes de DNA pel seu ús potencial com a agents quimioterapèutics (*FIGURA 5*).

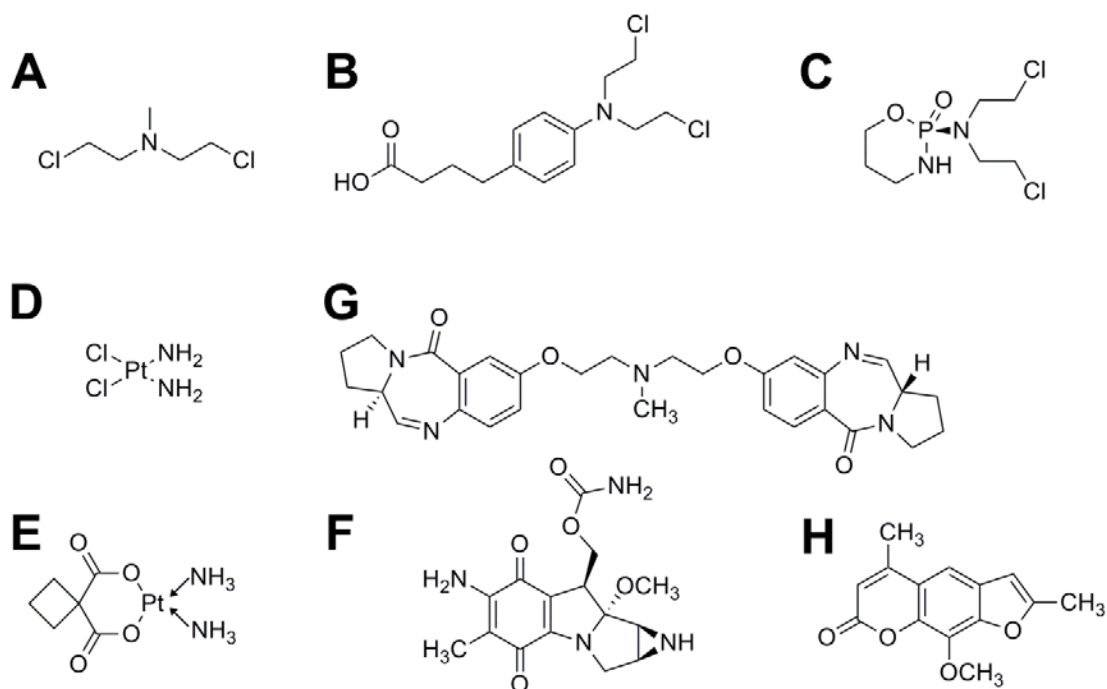


Figura 5 Diferents agents amb capacitat d'entrecreuar cadenes investigats per les seves aplicacions terapèutiques. **A.** Clometina. **B.** Clorambucil. **C.** Ciclofosfamida. **D.** Cisplatí. **E.** Carboplatí. **F.** Mitomicina. **G.** Derivat de la pirrolobenzodiazepina. **H.** Trimetilpsoralè.

El primer agent utilitzat en aquest sentit va ser, irònicament, una arma química: el gas mostassa o iperita (sulfur de bis-2-cloretil), el qual va començar a ser usat de forma terapèutica a l'any 1946,¹¹² gràcies a les observacions dutes a terme en les víctimes de l'explosió d'un vaixell carregat de gas mostassa a les acaballes de la Segona Guerra Mundial.¹¹³ Des de llavors s'han desenvolupat tot un seguit de mostasses anàlogues però menys tòxiques per tal de ser utilitzades en la lluita contra el càncer, com poden ser la clorometina, el clorambucil o la ciclofosfamida,¹¹⁴ usades actualment en quimioteràpia.

Paral·lelament a les mostasses nitrogenades, al llarg dels anys s'han desenvolupat altres agents químics capaços d'entrecruar cadenes i que actualment tenen ús terapèutic, com és ara diferents compostos de platí com el cisplatí[†] o el carboplatí,¹¹⁵ antibiòtics com la mitomicina C¹¹⁶ i derivats de les pirrolobenzodiazepines,¹¹⁷ o bé les teràpies que empren psoralens i irradiació amb llum UVA,¹¹⁸ els quals són útils també en el tractament de la psoriasis.¹¹⁹

Les aplicacions terapèutiques, però, no són les úniques que s'han trobat als entrecreuaments de cadenes de DNA (o d'RNA). Més enllà de la seva utilització per tal d'augmentar l'eficiència de les teràpies antígen i antisentit¹²⁰ o per crear hidrogels (xarxes formades per dúplex de DNA entrecruats inflades en dissolucions aquoses),¹²¹ el fet que els entrecreuaments només puguin tenir lloc quan les cadenes (amb els seus nucleòtids) es troben pròximes en l'espai ha estimulat que s'hagin emprat per aportar informació útil en el procés d'elucidació estructural.

Ja als anys 60 es va aprofitar la capacitat del formaldehid per entrecruar cadenes per tal de determinar l'estructura secundària del tRNA.¹²² Més recentment també s'ha usat la unió de cadenes per tal de determinar l'estructura terciària de l'RNA ribosomal, principalment per entrecruament fotoquímic¹²³ i sovint ajudant-se amb psoralens¹²⁴ o bé amb la substitució d'algunes uridines per 4-tiouridines.¹²⁵ Metodologies similars s'han usat per estudiar l'estructura de la cromatina,¹²⁶ així com les interaccions entre diferents RNA,¹²⁷ mentre la formació de ponts disulfur entre les riboses de dues cadenes s'ha emprat per avaluar l'estructura terciària dels ribozims.¹²⁸ Finalment, s'han aprofitat les possibilitats dels entrecreuaments químics i fotoquímics per tal d'analitzar els punts de contacte en les interaccions proteïna-àcid nucleic.¹²⁹

[†] En el cas del cisplatí, els entrecreuaments entre diferents cadenes, tot i existir, no són la font principal de la seva citotoxicitat, sinó que ho són els creuaments d'una cadena amb ella mateixa.

Aquest gran interès en l'entrecreuament d'oligonucleòtids en diferents camps ha motivat que s'hagin desenvolupat tot un seguit de procediments per tal de poder preparar-los. Les diverses metodologies existents es poden classificar en tres grans estratègies: entrecreuament d'oligonucleòtids no modificats, entrecreuament d'àcids nucleics modificats i síntesi en fase sòlida d'oligonucleòtids entrecreuats.

L'entrecreuament d'àcids nucleics no modificats es duu a terme per tractament d'un dúplex natural amb un agent capaç d'entrecreuar les cadenes entre elles,¹³⁰ mentre que en el cas dels oligonucleòtids modificats es preparen primer les cadenes convenientment funcionalitzades i, posteriorment, s'uneixen entre ells, ja sigui de forma directa¹³¹ o amb la intervenció d'un tercer agent.¹³² Pel que fa a la síntesi en fase sòlida d'oligonucleòtids entrecreuats, aquesta es duu a terme a través de la unió de dues cadenes en creixement mitjançant l'ús d'un dinucleòsid entrecreuat¹³³. Aquestes metodologies seran explicades amb més detall en el Bloc 2.

Objectius

Tal com s'ha explicat anteriorment en aquesta introducció, l'obtenció d'estructures d'RNA conformacionalment restringides que continguin repeticions del triplet CUG es planteja com una bona opció per tal de poder estudiar amb major facilitat i detall les característiques d'aquestes estructures tipus *hairpin* crucials en el desenvolupament de la distròfia miotònica. En aquesta línia, els objectius que ens vam proposar en iniciar aquesta tesi doctoral van ser els següents:

- Obtenir oligonucleòtids cíclics d'RNA que continguessin repeticions CUG com a models d'estructures conformacionalment restringides.
- Obtenir oligoribonucleòtids amb cadenes entrecreuades que continguessin repeticions CUG com a models d'estructures conformacionalment restringides.

Els resultats obtinguts en la síntesi d'oligonucleòtids cíclics que contenen repeticions CUG, tant mitjançant la metodologia de ciclació en fase sòlida com la de ciclació assistida per motlle es descriuen en el Bloc 1 de la memòria. Per la seva banda, la metodologia desenvolupada per a l'obtenció d'oligonucleòtids de DNA amb cadenes entrecreuades que contenen repeticions CTG, així com el trasllat d'aquesta estratègia a l'RNA, s'exposen en el Bloc 2 de la memòria.

BLOC 1:
OBTENCIÓ D'OLIGONUCLEÒTIDS
CÍCLICS

CAPÍTOL 1:

**SÍNTESI D'OLIGONUCLEÒTIDS CÍCLICS
MITJANÇANT CICLACIÓ EN FASE SÒLIDA**

1 Síntesi d'oligonucleòtids cíclics mitjançant ciclació en fase sòlida

1.1 Introducció i objectius

Al llarg dels anys s'han desenvolupat diverses metodologies per tal d'obtenir oligonucleòtids cíclics. Una de les primeres aproximacions usades va consistir en la ciclació en solució diluïda. En aquesta metodologia l'oligonucleòtid es troba totalment protegit, excepte en els extrems pels que ha de reaccionar, i en condicions d'alta dilució, per tal d'afavorir la reacció intramolecular. Per tal de dur a terme la ciclació s'utilitzen diferents agents de condensació com poden ser l'1-mesitilensulfonil-3-nitro-1,2,4-triazole (MSNT)^{101b} o bé el fosfat de bis-(1-benzotriazolil) i 2-clorofenil (diOBt).^{101a} Amb aquesta metodologia s'ha descrit l'obtenció d'oligonucleòtids cíclics d'entre 2 i 8 residus.^{101a,b}

Les reaccions dutes a terme en fase sòlida ofereixen diverses avantatges davant aquelles que tenen lloc en solució, com poden ser la possibilitat d'usar grans excessos de reactiu per tal d'optimitzar els rendiments o bé la major facilitat a l'hora purificar els productes obtinguts. Aquests avantatges, juntament amb el fet que la distància entre els centres reactius en les reaccions en fase sòlida permeten assimilar-les amb les reaccions en condicions de solució diluïda, va comportar que la següent millora introduïda en l'obtenció d'oligonucleòtids cíclics fos la seva síntesi en fase sòlida. Santacrocce i col·laboradors van ser els primers en descriure aquesta aproximació, al principi usant el mètode del fosfat triester^{102a,134} i, posteriorment, el del fosfit triester.^{102b,135} Aquest esquema es basa en ancorar l'oligonucleòtid al suport polimèric a través dels grup amino exocíclic de la citosina, elongant posteriorment la cadena nucleotídica i duent-ne a terme finalment la ciclació. La major limitació d'aquest mètode rau en la necessitat que la seqüència contingui una citosina, així com en la impossibilitat de desancorar de forma selectiva les seqüències ciclades respecte de les lineals.

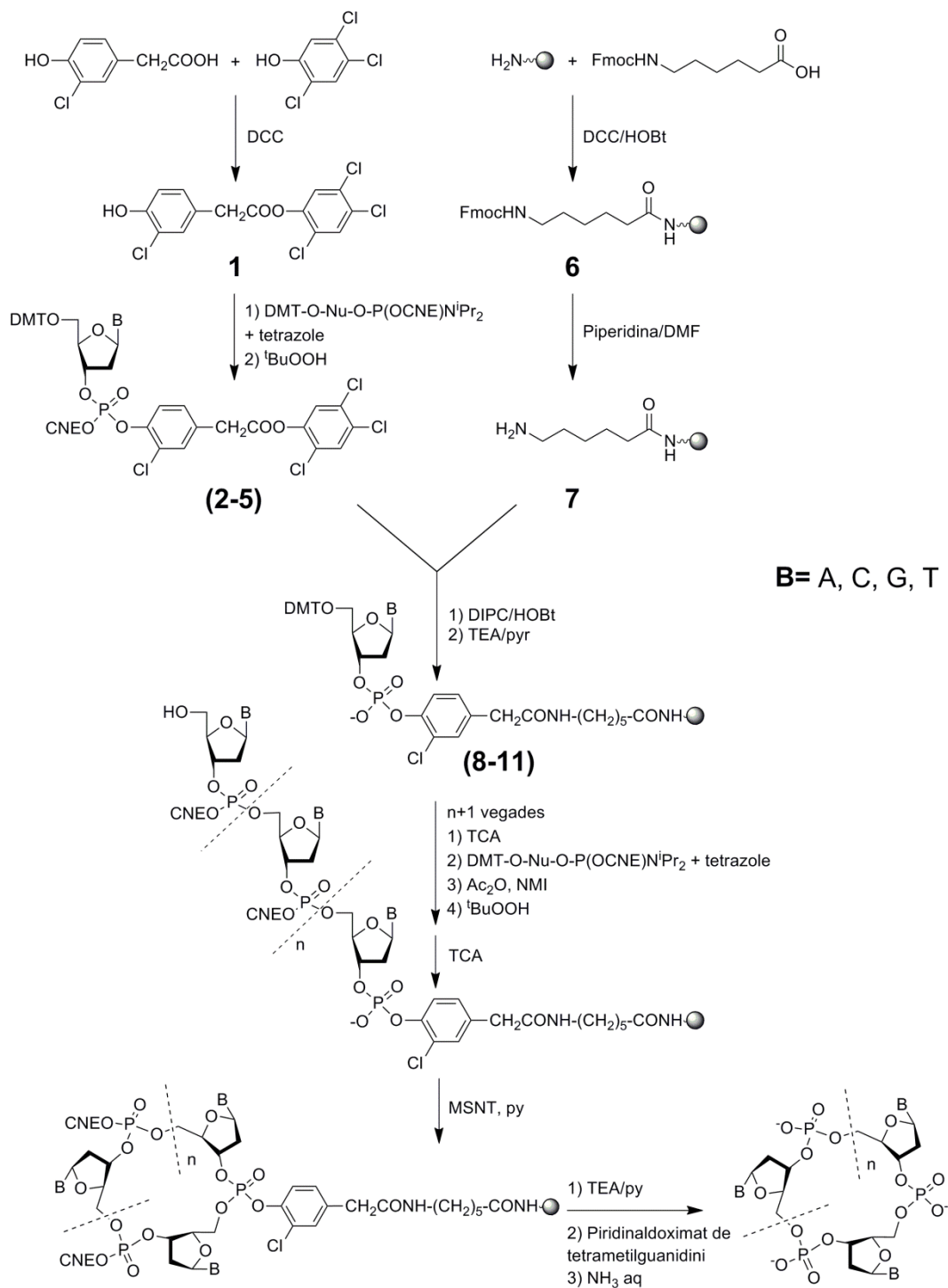


Figura 1.1 Esquema de síntesi d'oligonucleòtids cíclics desenvolupat en el nostre grup.

En el nostre grup d'investigació s'ha desenvolupat una metodologia de ciclació d'oligonucleòtids en fase sòlida que permet superar ambdós inconvenients i obtenir oligonucleòtids cíclics d'entre 2 i 30 residus amb rendiments moderats i amb elevada puresa.^{102c,136} En aquest mètode, l'ancoratge a la resina té lloc a través de l'extrem 3'

terminal de l'oligonucleòtid mitjançant un espaiador bifuncional, eliminant d'aquesta manera les restriccions de seqüència. D'altra banda, presenta l'avantatge de poder desancorar de forma selectiva els oligonucleòtids cíclics davant dels lineals, el que proporciona crús de major qualitat.

L'esquema de síntesi es representa en la *FIGURA 1.1*. En primer lloc, s'ancora a través de l'àcid 3-cloro-4-hidroxifenilacètic el primer nucleòtid de la seqüència al suport polimèric, al qual s'ha incorporat prèviament l'àcid 6-aminohexanoic com a espaiador, i es duu a terme la desprotecció del grup fosfat. Sobre aquest nucleòtid té lloc l'elongació de la cadena nucleotídica en el sintetitzador automàtic mitjançant el mètode del fosfit triester,¹³⁷ utilitzant derivats fosforamidit comercials dels nucleòsids i treballant amb esquemes de protecció estàndard. En aquest punt té lloc la reacció de ciclació entre els extrems 3' i 5' terminals usant MSNT com a agent condensant, en condicions d'alta dilució en el mateix sintetitzador automàtic.

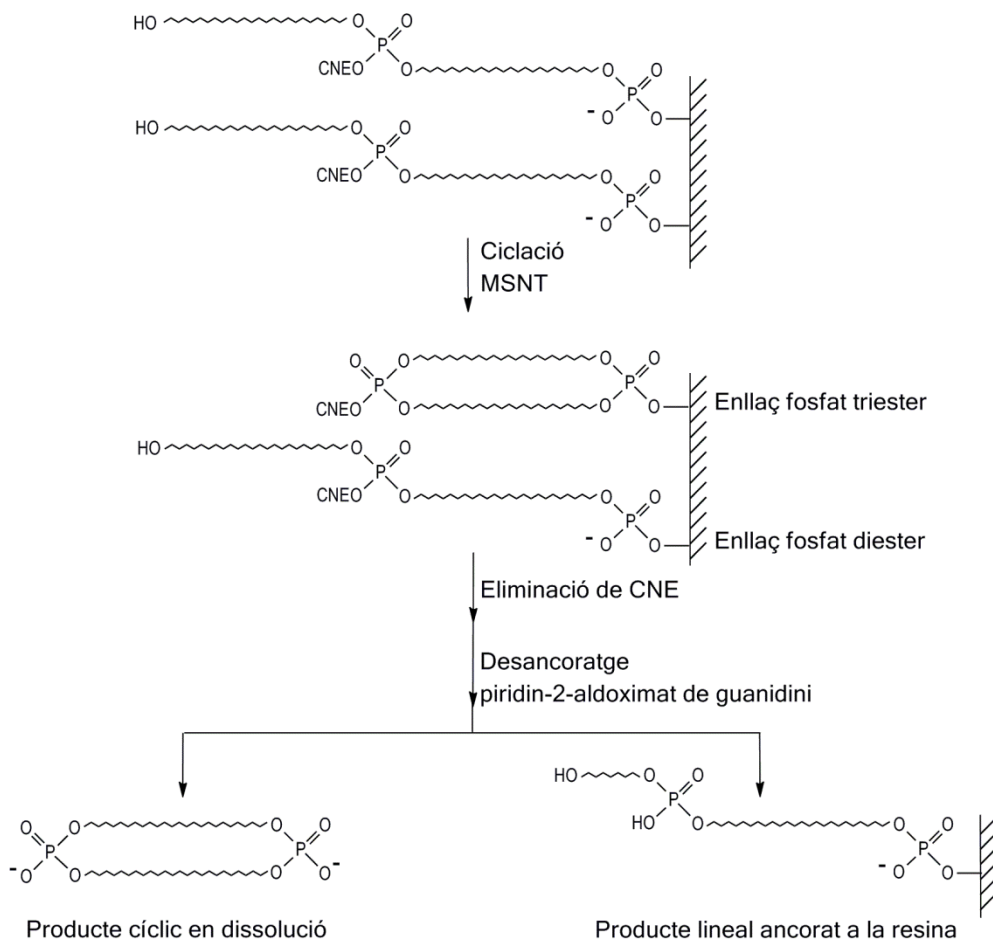


Figura 1.2. Esquema on es representa el desancoratge selectiu dels productes cíclics.

Un cop ha tingut lloc la ciclació s'eliminen els grups protectors dels fosfats com a pas previ al desancoratge. Aquest es duu a terme utilitzant el 2-piridin-2-aldoximat de tetrametilguanidini, un reactiu que trenca de forma selectiva els enllaços fosfat triester davant dels diester,¹³⁸ de tal forma que les seqüències que no han ciclat o els productes secundaris de condensació entre diferents cadenes no es desancoren atès que es troben unides al suport polimèric a través d'un enllaç fosfat diester. Els productes de ciclació, en canvi, sí que s'escindeixen ja que es troben units a la resina mitjançant un enllaç fosfat triester (*FIGURA 1.2*).

El següent pas era traslladar la metodologia a l'RNA, pel que va ser necessari avaluar quin grup protector de l'hidroxil 2' podia ser l'adequat, el qual havia de ser ortogonal a la resta de grups protectors usats en la síntesi de l'oligonucleòtid. El grup TBDMS, el més utilitzat en la síntesi de l'RNA, va ser rebutjat degut a que la seva estabilitat davant l'oximat no és molt alta.¹³⁹ El grup protector elegit per a dur a terme els primers assaigs va ser l'1-(2-fluorofenil)-4-metoxipiperidin-4-il (Fpmp) (*FIGURA 1.3.A*) però els resultats no van ser satisfactoris ni tan sols en el cas de la preparació de dinucleòtids cíclics.¹⁴⁰ El baix rendiment obtingut podia ser degut a l'impediment estèric causat pel grup Fpmp. La substitució en el nucleòtid ancorat a resina del grup Fpmp per un metil (*FIGURA 1.3.B*), el qual presenta un menor impediment estèric, va permetre obtenir dinucleòtids cíclics amb bons rendiments i hexàmers cíclics amb rendiments baixos. Per tal de millorar els rendiments o bé sintetitzar oligonucleòtids més llargs va ser necessari substituir el nucleòtid ancorat a resina per timidina (*FIGURA 1.3.C*).¹⁴⁰

Una millora d'aquesta metodologia de preparació d'RNA circular per ciclació en fase sòlida va ser duta a terme per Micura.¹⁴¹ En ella el grup protector elegit per a l'hidroxil 2' va ser el triisopropilsilioximetil (TOM) (*FIGURA 1.3.D*), desenvolupat per Pitsch i col·laboradors,¹⁴² el qual es tracta d'un èter de silil que presenta un menor impediment estèric respecte al TBDMS. Usant aquest esquema de protecció, Micura va sintetitzar una sèrie d'oligonucleòtids cíclics, anant des de dímers fins a 21mers. Els rendiments obtinguts van oscil·lar entre el 3 i el 15% per a oligonucleòtids menors a octàmers però inferiors al 2% en el cas de les seqüències majors.

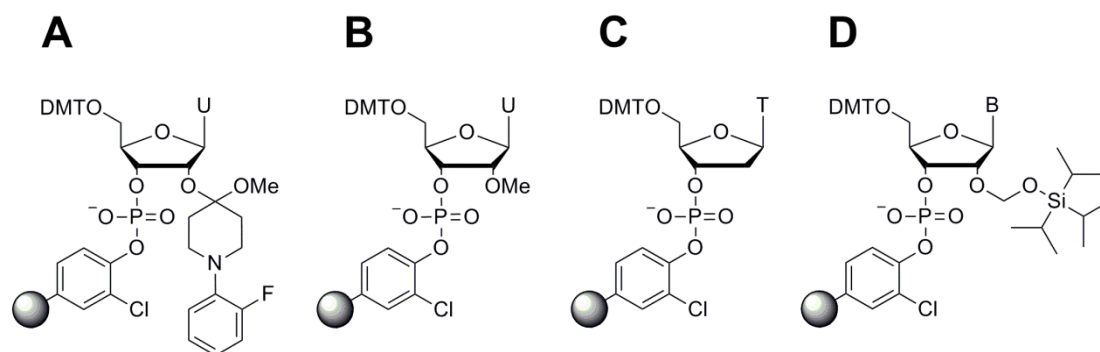


Figura 1.3. Diferents nucleotidil-resines usades en la síntesi d'RNA cíclic mitjançant la ciclació en fase sòlida. **A.** Uridina amb l'hidroxil 2' protegit amb el grup Fmp. **B.** Uridina amb l'hidroxil 2' en forma de O-metil. **C.** 2'-desoxitimidina. **D.** Nucleòtids amb l'hidroxil 2' protegit amb el grup TOM.

El nostre objectiu era obtenir oligonucleòtids cíclics que continguessin seqüències repetitives CUG per tal de poder-ne estudiar l'estructura i, si s'escaigués, la seva interacció amb altres molècules. Per tal de dur a terme aquest estudi les seqüències havien de tenir una llargada no inferior a quatre repeticions (dues en el *stem* del *dumbbell* i una en cada *loop*) per tal de poder estructurar-se correctament, constant per tant de dotze residus. En el cas de la metodologia desenvolupada per Micura els rendiments obtinguts en el cas dels dodecàmers cíclics havien sigut del 2%,¹⁴² rendiment que consideràvem massa baix pels objectius que ens plantejàvem.

Tal com s'havia comprovat en els primers estudis sobre la ciclació d'RNA en fase sòlida en el nostre grup,¹⁴⁰ l'impediment estèric en el nucleòtid ancorat a resina és un factor determinant en l'efectivitat de la reacció. Per tant, per tal d'incrementar els rendiments obtinguts per Micura amb els dodecàmers o en oligonucleòtids més llargs calia reduir aquest impediment estèric encara més. En aquest sentit ens vam plantejar substituir el nucleòtid ancorat a resina per un espaiador de tres carbonis (espaiador E), el qual es pot considerar un anàleg abàsic d'un nucleòtid. Aquest espaiador presentaria un impediment estèric molt menor que un nucleòtid i, a més, dotaria d'una major flexibilitat la cadena, el que en conjunt hauria de contribuir a facilitar la reacció de ciclació. En aquest Capítol es presenten els resultats obtinguts com a resultat d'aplicar aquesta metodologia.

1.2 Obtenció d'oligodesoxiribonucleòtids cíclics mitjançant ciclació en fase sòlida

Com a primera presa de contacte amb la metodologia de ciclació en fase sòlida ens vam plantejar l'obtenció d'un oligonucleòtid cíclic de DNA. Com ja s'ha explicat anteriorment en la Introducció, els oligonucleòtids cíclics són substrats efectius per a les RNA polimerases, a partir dels quals es poden obtenir múltiples còpies de la cadena mitjançant el mecanisme de transcripció de cercle rodant.^{93b,c,143} En el cas que es volgués obtenir un RNA multimèric que contingues repeticions de la seqüència (CUG), la qual, com ja hem dit anteriorment, és rellevant en la patologia de la distròfia miotònica,¹⁴⁴ caldria obtenir un oligonucleòtid cíclic format per repeticions (CAG). En aquest sentit l'oligonucleòtid elegit va ser el 15mer $d\langle p(CAG)_5 \rangle$ (**12**), el qual permetria obtenir, si es considerés oportú, la seqüència (CUG)_n mitjançant la transcripció per cercle rodant.

1.2.1 Síntesi de $d\langle p(CAG)_5 \rangle$ **12**

La síntesi de l'oligonucleòtid cíclic **12** es va dur a terme a una escala de 3 μmol seguint la metodologia desenvolupada en el nostre grup.^{102c} El nucleòtid elegit per tal d'ancorar la cadena a la resina va ser la 2'-desoxicitidina, ja que al tractar-se d'un nucleòtid pirimidínic és menys voluminós que la desoxiadenosina o la desoxiguanosina, el que *a priori* hauria d'afavorir la ciclació de l'oligonucleòtid.

1.2.1.1 Obtenció de la nucleotidil-resina **9**

La preparació de la nucleotidil-resina **9** es va dur a terme acoblant el nucleotidil-linker de la *N*-benzoïl-desoxicitidina en forma d'ester actiu (**3**) al suport polimèric (resina TentaGel-NH₂, copolímer de poliestiré-poliètilenglicol) derivatitzat amb un espaiador aminocaproic (**7**) (*FIGURA 1.1*). Un cop obtinguda la resina, es va certificar la seva puresa per ³¹P-RMN en fase gel i es va determinar, per quantificació espectrofotomètrica dels cations DMT⁺ alliberats en la desprotecció àcida d'una petita alíquota de resina, que la seva funcionalització era de 69 μmol/g. Posteriorment es va procedir a eliminar el grup protector del fosfat en 3', el qual es va mantenir desprotegit

al llarg de tota la síntesi per tal que pogués finalment intervenir en la reacció de ciclació, obtenint d'aquesta manera la resina **9**.

1.2.1.2 Elongació de la cadena oligonucleotídica

L'elongació de la cadena nucleotídica va tenir lloc mitjançant el mètode del fosfit triester en el sintetitzador automàtic a una escala de 3 μmol , emprant derivats fosforamidits comercials de DMT-desoxiribonucleòsids i un cicle de síntesi estàndard lleugerament modificat a fi d'allargar els temps de reacció. En la síntesi automàtica d'oligonucleòtids, cada cicle d'incorporació d'un nou nucleòtid a la cadena en creixement conté les etapes següents (*FIGURA 1.4*):

- **Destritilació:** Eliminació del protector 4,4'-dimetoxitritil del grup hidroxil primari de l'extrem 5'-terminal, per tractament amb TCA 3% en DCM.
- **Acoblament:** Incorporació del següent nucleòtid per reacció del fosforamidit del nucleòsid amb el grup hidroxil lliure de l'extrem 5'-terminal, en presència de tetrazole (o BTT, en el cas de la síntesi d'RNA) com a catalitzador àcid.
- **Bloqueig:** *Capping* dels grups hidroxil lliures que no han reaccionat durant l'etapa d'acoblament usant anhídrid acètic (Ac_2O) o fenoxiacètic (Pac_2O).
- **Oxidació:** Conversió de l'enllaç fosfit triester a fosfat triester usant $\text{I}_2/\text{H}_2\text{O}$ o $^t\text{BuOOH}$.

Un cop finalitzada la síntesi té lloc el desancoratge de l'oligonucleòtid del suport polimèric, així com l'eliminació dels diferents grups protectors usats, amb NH_3 aquós.

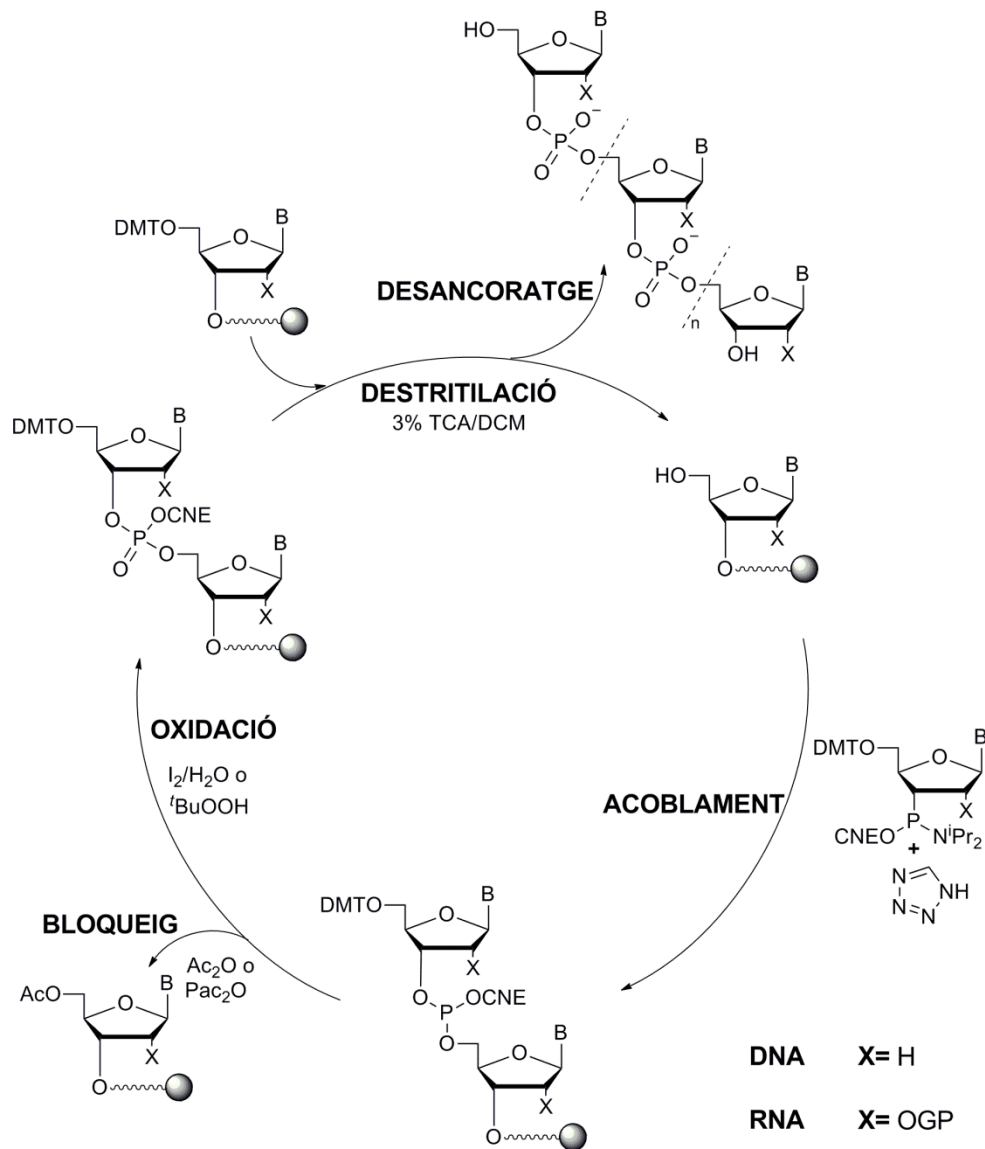


Figura 1.4. Diferents etapes de les que consta cada cicle de síntesi en fase sòlida. B representa qualsevol base, B representa qualsevol base i GP un grup protector que bloqueja l'hidroxil 2' en el cas de la síntesi d'RNA.

Tots els oligonucleòtids sintetitzats en aquesta tesi doctoral, tant de DNA com d'RNA, s'han sintetitzat seguint aquesta metodologia. Les úniques variacions que s'han introduït en la síntesi d'oligoribonucleòtids respecte als desoxiribo han sigut l'ús d'altres agents acoblants o bé l'allargament dels temps de reacció, modificacions que seran convenientment indicades en la part experimental.

1.2.1.3 Ciclació del precursor lineal ancorat a la resina i obtenció del d<p(CAG)₅> **12**

En l'etapa clau de la ciclació el reactiu emprat per unir els extrems 5' i 3' terminals va ser l'MSNT. Aquest reactiu és molt sensible a la humitat, i per això va ser necessari extreure les precaucions a l'hora de treballar per assegurar-nos que les condicions fossin totalment anhidres. La reacció de ciclació, el mecanisme de la qual es mostra en la *FIGURA 1.5*, es va dur a terme mitjançant la realització de tres tractaments amb MSNT en piridina anhidra (4h+4h+12h).

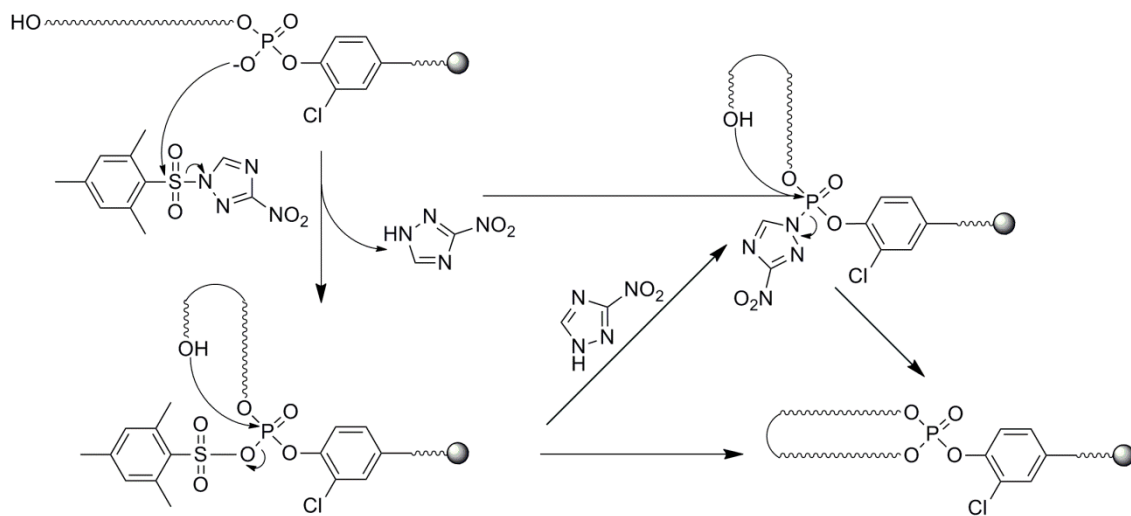


Figura 1.5. Mecanisme de ciclació d'oligonucleòtids sobre resina amb MSNT.

Un cop duta a terme la reacció de ciclació es van eliminar els grups cianoetil protectors dels fosfats internucleosídics, de tal manera que quedessin com a fosfat diester. D'aquesta manera l'únic fosfat triester que resta en l'oligonucleòtid cíclic és el que l'uneix a la resina. Aquest enllaç es va trencar subsegüentment de forma selectiva mitjançant un atac nucleòfil sobre el fosfat per part del *syn*-piridin-2-aldoximat de tetrametilguanidini, el que va permetre alliberar l'oligonucleòtid cíclic al medi (*FIGURA 1.6*). Posteriorment, es van eliminar la resta de grups protectors de les nucleobases mitjançant un tractament amb amoníac aquós. Finalment, després d'una purificació mitjançant electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), es van obtenir 17 OD₂₆₀ de producte cíclic **12** pur, el que equival a un rendiment del 3.6%. Aquest rendiment va ser inferior al descrit anteriorment per cicles de mida similar (del 7% en el cas d'un hexadecàmer^{136a}), el que podria ser degut a l'ús d'una resina més impedita estèricament, ja que la desoxicitidina es troba protegida mentre que la timidina usada en

el cas de l'hexadecàmer no presenta cap tipus de protecció. Tant o més important per explicar el menor rendiment és el fet que la purificació no es va dur a terme per HPLC en fase inversa sinó mitjançant PAGE, la qual és una tècnica de purificació que presenta una recuperació força inferior al HPLC (entre un 10 i un 20%, davant del 50-70% en el cas de l'HPLC).

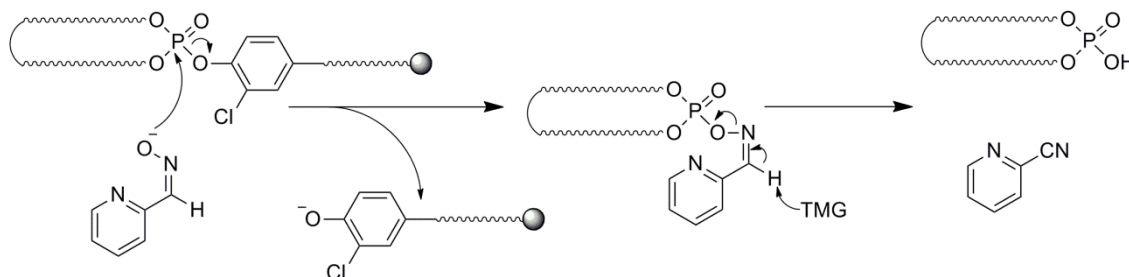


Figura 1.6. Mecanisme de desancoratge dels oligonucleòtids cíclics de la resina.

1.3 Obtenció d'oligoribonucleòtids cíclics mitjançant ciclació en fase sòlida

Un cop vam haver comprovat que érem capaços d'obtenir oligodesoxiribonucleòtids cíclics amb un rendiment similar al descrit prèviament, vam traslladar la metodologia a l'RNA. Tal com s'ha explicat anteriorment en la introducció del capítol, ens vam plantejar substituir el residu ancorat a la resina per un espaiador abàsic per tal de reduir l'impediment estèric, així com per a dotar d'una major flexibilitat a l'estructura i, així, facilitar-ne la ciclació. En aquest sentit vam elegir usar un espaiador de 3 àtoms de carboni ja que el seu derivat fosforamidit és comercial i, a més, aquest espaiador propil manté l'esquelet del nucleòtids naturals (*FIGURA 1.7*).

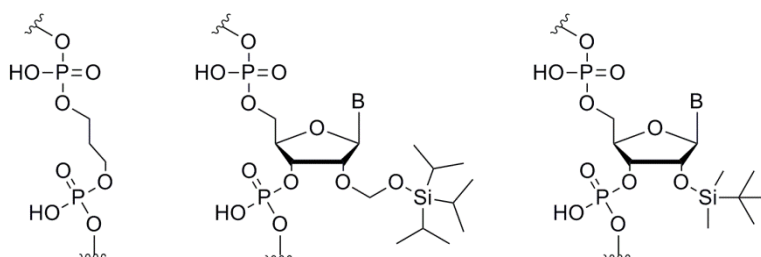


Figura 1.7. Comparació de l'impediment estèric i la distància entre els fosfats de dos nucleòtids consecutius quan es troben separats per l'espaiador E (esquerra) i pels ribonucleòtids protegits en l'hidroxil 2' amb TOM (centre) i TBDMS (dreta)

1.3.1 Oligonucleòtids model de repeticions (CUG)_n

A l'hora d'eleger la llargada òptima dels oligonucleòtids model que continguessin repeticions del triplet (CUG) va ser necessari valorar diversos paràmetres. D'una banda, i tal com s'ha comentat en la introducció del capítol, per tal que l'estructuració de les repeticions CUG sigui correcta i poder així estudiar les estructures tipus *hairpin* que formen, l'oligonucleòtid ha de presentar un nombre mínim de quatre repeticions, dues en l'*stem* i dues més en els *loops*, formant el dodecàmer **13a** mostrat en la FIGURA 1.8.A. D'altra banda, com major és l'oligonucleòtid que s'intenta ciclar major és el cost entròpic que s'ha de pagar per tal de poder dur a terme aquesta reacció i, per tant, més difícil és que tingui lloc. Per tant, per tal de poder tenir els major rendiments de ciclació interessava que l'oligonucleòtid fos el més petit possible.

Valorant conjuntament tots dos requeriments ens trobàvem que oligonucleòtids cíclics de llargades pròximes al dodecàmer descrit anteriorment resultarien en un bon compromís. La substitució de la uridina d'un dels *loops* per l'espaiador E, el qual usàriem per ancorar l'oligonucleòtid a la resina i sobre el qual duríem a terme la ciclació, ens conduiria a l'oligonucleòtid **13b** mostrat en la FIGURA 1.8.B, on E representa l'espaiador que ancoraríem a la resina. Partint d'aquest model, ens vam plantejar dur a terme la síntesi d'un tridecàmer i un tetradecàmer que creïem que eren models més adequats. En el cas del tridecàmer **14** (FIGURA 1.8.C), s'incorporava un espaiador E en l'extrem 5' terminal del precursor lineal, de tal manera que la reacció de ciclació tindria lloc entre dos espaiadors E, minimitzant d'aquesta manera l'impediment estèric que podria perjudicar la ciclació. En el cas del tetradecàmer **15** (FIGURA 1.8.D), més enllà de les millores ja introduïdes en el tridecàmer **14**, efectuaríem la substitució de la uridina de l'altre *loop* per dos espaiadors E. D'aquesta manera incrementaríem la flexibilitat de l'estructura al mateix temps que augmentaríem la mida del *loop*, esperant de facilitar-ne la seva ciclació.

Per tant, ens vam fixar com a objectius l'obtenció del tridecàmer $r\langle pEG(CUG)_3CE \rangle$ **14** i del tetradecàmer $r\langle p(EGCUGCE)_2 \rangle$ **15** cíclics. Tots dos els obtindríem per ciclació en fase sòlida del precursor lineal sintetitzat sobre la resina que hauríem preparat incorporant l'espaiador E.

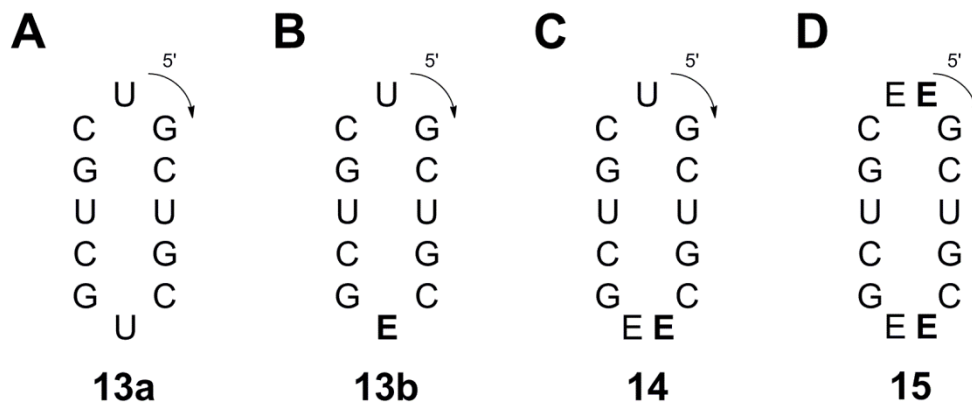


Figura 1.8. Estructura de diversos models d'oligonucleòtids cíclics que contenen repeticions CUG. **A.** Dodecàmer **13a** que conté dues repeticions en l'*stem* i una en cada *loop*. **B.** Dodecàmer resultant de substituir la uridina d'un dels *loops* del dodecàmer **13a** per l'espaiador E. **C.** Tridecàmer resultant de substituir una uridina d'un dels *loops* del dodecàmer **13a** per dos espaiadors E. **D.** Tetradeccàmer resultant de substituir cada uridina dels *loop* del dodecàmer **13a** per dos espaiadors E. La E en negreta marca el punt d'ancoratge de l'oligonucleòtid a la resina.

En primer lloc vam dur a terme l'obtenció del tridecàmer **14**. Per l'elongació de la cadena oligonucleotídica vam emprar derivats fosforamidits dels diferents nucleòtids, en els quals l'hidroxil 2' es trobava protegit amb el grup TBDMS en la primera aproximació. Tot i conèixer la seva labilitat davant l'oximat¹³⁹, vam voler comprovar si aquesta era realment un impediment a l'hora de dur a terme la síntesi, ja que presentava alguns avantatges davant el grup TOM pel fet de tractar-se dels protectors estàndard en la síntesi d'RNA, el que implica un menor cost i una major disponibilitat dels fosforamidits.

1.3.1.1 Obtenció de la resina amb l'espaiador E 17

El primer pas en la síntesi (FIGURA 1.9) va consistir en la incorporació de l'àcid *N*-Fmoc-6-aminocaproic a la resina TentaGel-NH₂ en presència de quantitats equimolars de DIPC i HOBt. El grau de funcionalització de la resina **6** va oscil·lar entre els 150 i els 200 μmol/g.

La segona etapa va consistir en la preparació de l'ester actiu de l'espaiador E. Per obtenir-lo es va fer reaccionar un petit excés del derivat comercial del fosforamidit de l'espaiador E amb l'ester de clorofenil **1**, preparat per nosaltres al laboratori, en presència de tetrazole. Un cop es va haver oxidat l'enllaç fosfit a fosfat triester gràcies a un tractament amb ^tBuOOH, i davant la impossibilitat de purificar l'ester actiu **16** per

cromatografia en gel de sílice degut a la seva elevada reactivitat, es va procedir a fer-ho mitjançant MPLC en fase inversa.

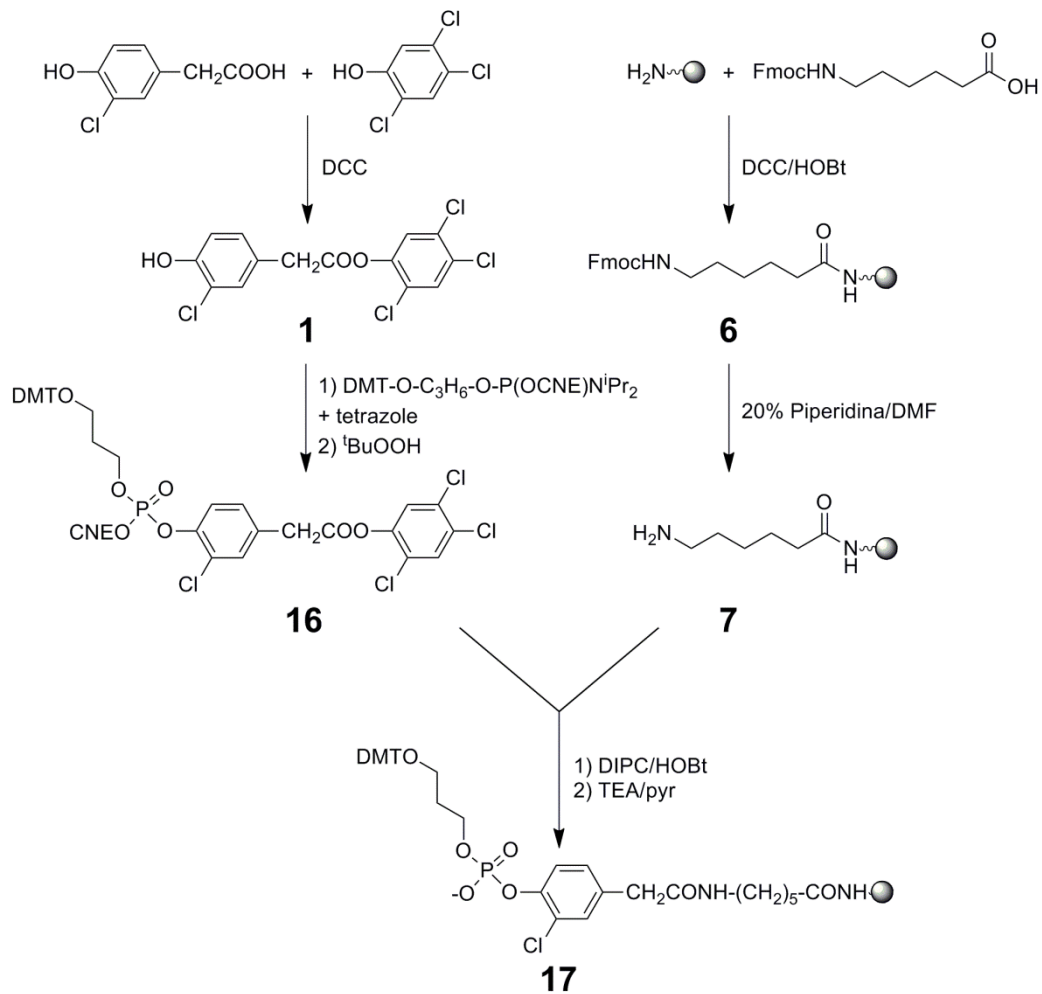


Figura 1.9. Esquema d'obtenció de la resina amb l'espaiador E.

En tercer lloc es va fer reaccionar l'ester actiu **16** amb la resina **7** usant com a agents acoblants DIPC i HOBt (FIGURA 1.9). La resina resultant es va acetilar per tal de bloquejar els possibles grups amino reactius que haguessin quedat lliures i es va comprovar mitjançant ³¹P-RMN en fase gel la correcta incorporació de l'espaiador E a la resina. Finalment, es va eliminar el grup protector del fosfat i es va calcular el grau de funcionalització de la resina **17**, el qual va oscil·lar entre els 105 i els 120 μmol/g.

1.3.1.2 Intent d'obtenció del tridecàmer r<pEG(CUG)₃CE> **14**

L'elongació de la cadena nucleotídica, la ciclació i el desancoratge del tridecàmer **15** es va dur a terme de forma automàtica sobre la resina **17**, emprant els derivats fosforamidats dels nucleòsids i de l'espaiador E. Es va usar un cicle de síntesi estàndard lleugerament modificat per tal d'allargar els temps de reacció i l'escala de síntesi va ser de 1.78 µmol. Els diferents fosforamidats es van dissoldre en DCM anhidre enlloc de en ACN anhidre, com és habitual en la síntesi estàndard d'oligonucleòtids, atès que la resina TentaGel s'unfla molt millor amb DCM que amb ACN.

L'etapa clau de la síntesi consisteix en la ciclació del precursor lineal emprant MSNT en piridina anhidra. Per tal de dur-la a terme es van realitzar dos tractaments de 4 hores i un de 16 hores, ja que al tractar-se d'un reactiu sensible a la humitat es recomanable renovar-lo amb certa freqüència. Les condicions de ciclació no es van voler forçar més per tal d'intentar minimitzar reaccions secundàries descrites en la literatura, com poden ser la sulfonació de l'hidroxil 5' lliure¹⁴⁵ o bé la modificació d'algunes nucleobases.¹⁴⁶

Un cop duta a terme la ciclació es va procedir a l'eliminació dels grups CNE que protegien la resta de fosfats de la cadena per tal de poder desancorar de forma selectiva l'oligonucleòtid cíclic de la resina. Aquest desancoratge es va dur a terme mitjançant dos tractaments de 4 h i un de 16 h amb *syn*-piridin-2-aldoximat de tetrametilguanidini. Un cop desancorat, l'oligonucleòtid va ser sotmès primerament a un tractament amb NH₃ aquós per tal d'eliminar els grups acetil usats per protegir les diferents nucleobases. Posteriorment es va dur a terme la desprotecció dels hidroxils 2' amb DMSO/TEA·3HF (1:1) seguint els protocols descrits. Cal tenir en compte que un cop s'ha eliminat aquest grup protector tot el material i reactius que s'usin han de ser lliures de ribonucleases.

L'anàlisi del cru de dessalat mitjançant EM-MALDI-TOF, però, no va revelar la presència del producte **14** ($[M-H]^+$ _{calc}=3795). En el seu lloc es va observar un senyal amb m/z=3981. Tot i que en el nostre cas no l'havíem detectat mai abans, aquesta diferència de massa (186 Da) respecte al producte cíclic s'havia observat anteriorment en el nostre grup d'investigació. La Miriam Frieden, durant la realització de la seva tesi doctoral,^{140b} va identificar aquest problema i va dur a terme un anàlisi exhaustiu per tal de determinar-ne la seva causa. Arran d'aquest estudi va poder concloure que

l'increment de massa es corresponia a l'espaiador clorofenil a través del qual s'ancorava la cadena oligonucleotídica al suport polimèric, el qual quedava unit a l'oligonucleòtid escindit de la resina. Això era degut a que el desancoratge del producte cíclic no tenia lloc degut al trencament de l'enllaç triester sinó per l'enllaç amida que uneix l'oligonucleòtid lineal i l'espaiador clorofenil amb l'aminocaproic de la resina (FIGURA 1.10). Aquesta ruptura d'enllaços amida per part de l'oximat ja havia sigut detectat anteriorment.¹⁴⁷ Segons els estudis de la Dra. Frieden aquest trencament és només apreciable en el cas que la reacció de ciclació no hagi tingut lloc de forma acceptable.

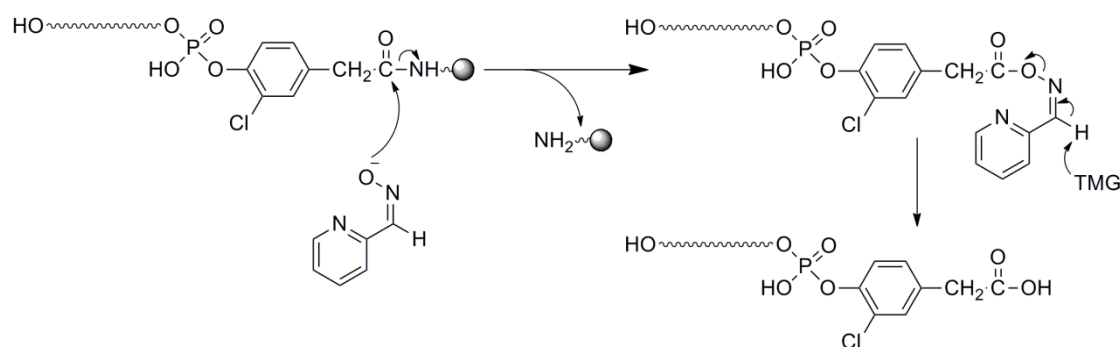


Figura 1.10. Reacció desancoratge de l'oligonucleòtid lineal de la resina degut al trencament de l'enllaç amida per acció de l'oximat.

Analitzant el resultat, semblava clar que no s'havia obtingut producte cíclic. Això podia ser degut al fet que els protectors TBDMS fossin massa voluminosos, dificultant molt la ciclació, o bé que la nova resina **17** no permetés obtenir oligonucleòtids cíclics. Calia, per tant, aclarir aquestes dues qüestions.

1.3.1.3 Tetranucleòtids cíclics

Abans de continuar amb la síntesi dels models amb repeticions (CUG) era necessari esvair els dubtes que se'ns havien plantejat respecte a la utilitat tant de la nova resina **17** com de la protecció de l'hidroxil 2' com a èter de TBDMS en la síntesi d'oligonucleòtids cíclics en fase sòlida. En aquest sentit vam decidir preparar dos tetràmers cíclics, un de DNA i un d'RNA, per tal de comprovar la validesa del mètode. L'estructura dels tetràmers $d\langle p(TE)_2 \rangle$ **18** i $r\langle p(UE)_2 \rangle$ **19**, on T es correspon a la timidina, U a la uridina i E a l'espaiador, es mostra en la FIGURA 1.11. En ells s'afegeix un segon residu d'E, per tal de dotar d'un major grau de flexibilitat al precursor lineal i així facilitar-ne la ciclació. En el cas del tetràmer **19** vam resoldre, a més, dur a terme la

síntesi emprant dos grups protectors diferents de l'hidroxil 2' de la uridina, el grup TOM i el TBDMS, per poder així comparar la seva influència en el rendiment final de la síntesi.

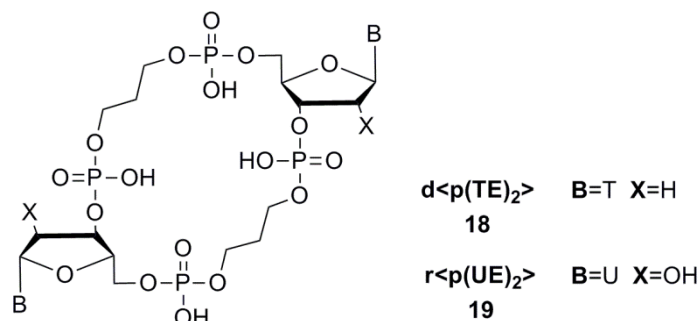


Figura 1.11. Estructura dels tetràmers $d\langle p(TE)_2 \rangle$ i $r\langle p(UE)_2 \rangle$.

Obtenció de $d\langle p(TE)_2 \rangle$ **18**

Vam decidir abordar en primer lloc la síntesi del tetràmer **18**, el qual *a priori* era més fàcil d'obtenir que el tetràmer **19**, el que ens permetria valorar la utilitat de la resina **17** per a l'obtenció d'oligonucleòtids cíclics.

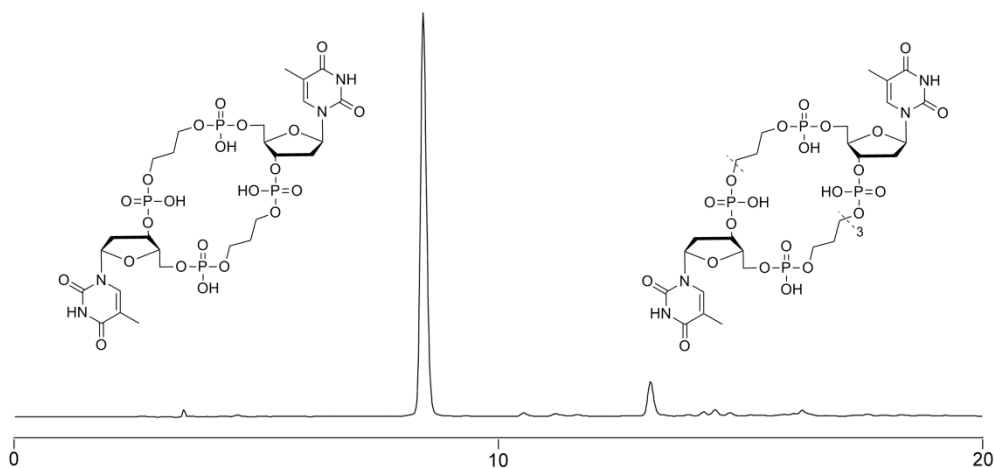


Figura 1.12. Anàlisi per HPLC en fase inversa del cru de dessalat corresponent a la síntesi de l'oligonucleòtid cíclic **18**. L'escala es representa en minuts.

L'elongació de la cadena nucleotídica, la ciclació i el desancoratge del tetràmer **18** es va dur a terme a una escala de síntesi de 0.66 μmol seguint el protocol descrit en l'apartat 1.3.1.2. Un cop desancorat no va ser necessari realitzar cap altre tractament de desprotecció, ja que l'únic nucleòtid present en la seqüència era timidina, la qual no conté ni hidroxil 2' ni cap amino exocíclic en la nucleobase que fos necessari protegir.

El cru de desancoratge va ser posteriorment dessalat mitjançant filtració molecular a través de Sephadex G-10 i analitzat per HPLC en fase inversa (FIGURA 1.12).

L'anàlisi per HPLC va mostrar que, tot i tractar-se d'un cru d'alta qualitat, s'observaven dos pics en el cromatograma enlloc d'un únic pic majoritari esperat (FIGURA 1.12). Aquest pic van ser degudament purificats per HPLC i analitzats per EM-MALDI-TOF, que va revelar que el pic majoritari es corresponia al tetràmer buscat mentre que el pic minoritari es corresponia a l'octàmer cíclic **20** resultant de la doble reacció entre dos precursors lineals. En la FIGURA 1.13 es discuteix amb més detall la formació d'aquest octàmer **20** inesperat. Els rendiments estimats de tots dos productes van ser del 18 % per el tetràmer **18** i de l'1% en el cas de l'octàmer **20**. Aquests resultats indiquen clarament que la resina **17** sintetitzada per primer cop en el transcurs d'aquesta tesi doctoral és útil per poder obtenir oligonucleòtids cíclics.

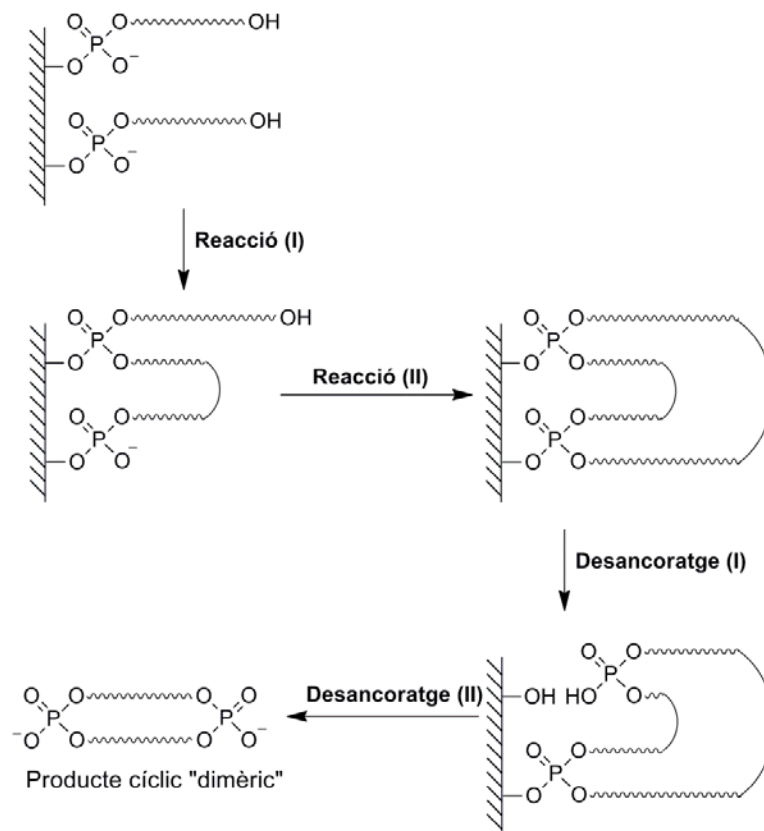


Figura 1.13. Formació del octàmer cíclic $d\langle p(TE)_4 \rangle$ **20**. Durant la ciclació de l'oligonucleòtid tenen lloc dos reaccions. En primer lloc (**reacció I**), l'hidroxil 5' d'una de les cadenes reacciona amb el fosfat activat d'una segona. En segon lloc (**reacció II**), l'hidroxil 5' d'aquesta segona cadena reacciona amb el fosfat activat de la primera, formant un octàmer cíclic unit al suport polimèric per dos enllaços fosfat triester. L'etapa de desancoratge té lloc també en dues fases, desancorant-se de la resina, primerament, un dels fosfats (**desancoratge I**) i, posteriorment, alliberant-se l'octàmer al medi per mitjà del trencament de l'altre fosfat triester (**desancoratge II**).

Obtenció de r<p(UE)₂> **19**

Un cop verificat que la resina **17** era útil en la síntesi d'oligodesoxiribonucleòtids cíclics era el torn de comprovar la seva efectivitat en l'obtenció de cicles d'RNA, així com d'avaluar la influència de la protecció de l'hidroxil 2' amb el grup TBDMS enfront la protecció amb el grup TOM usada per Micura.¹⁴¹ Per tal de realitzar aquesta valoració vam decidir dur a terme la síntesi del tetràmer **19** usant totes dues estratègies de protecció.

Tant l'elongació de la cadena nucleotídica com la ciclació i el desancoratge dels oligonucleòtids va tenir lloc de forma anàloga a la descrita en l'apartat anterior, substituint tant sols el derivat fosforamidit de la DMT-timidina pels de la DMT-uridina amb l'hidroxil 2' protegit amb TOM o amb TBDMS. Un cop el cru de desancoratge havia sigut dessalat, però, va caldre afegir una nova etapa de desprotecció de l'hidroxil 2'. La metodologia utilitzada per dur portar a cap aquesta desprotecció va ser la descrita en la literatura tan en el cas del TBDMS¹⁴⁸ com en el del TOM.¹⁴⁹ Un cop convenientment dessalats, tots dos crus van ser analitzats i purificats per HPLC.

L'anàlisi per HPLC en fase inversa va mostrar que tots dos crus eren d'alta qualitat. La caracterització per EM-MALDI-TOF va revelar que en els dos casos el producte es corresponia amb el tetràmer cíclic buscat. Els rendiments del cru van ser del 5.5% en el cas de l'ús del TOM com a protector de l'hidroxil 2' i del 3.5% en el cas de l'ús del TBDMS.

A llum dels resultats obtinguts en la síntesi dels diversos tetràmers cíclics es van poder extreure diverses conclusions. En primer lloc, la nova resina **17** sintetitzada és en efecte útil per tal de poder obtenir oligonucleòtids cíclics, tant si es tracta de DNA com d'RNA. En el cas del tetràmer **18** els rendiments són inferiors als descrits per oligonucleòtids cíclics de mida similar (d'un 29 i un 27% en la síntesi d'un trimer i un hexàmer, respectivament, davant el 18% obtingut en la preparació del nostre tetràmer). En segon lloc, la comparació dels rendiments obtinguts en la síntesi del tetràmer **19** emprant les dues estratègies de protecció deixa clar que el grup protector TOM és netament superior al TBDMS pel que fa a la ciclació en fase sòlida. En tercer lloc, els rendiments obtinguts en la síntesi del tetràmer **19** usant la nova resina **17** i protecció de l'hidroxil 2' amb el grup TOM van ser comparables als descrits anteriorment (5.5% en el cas del nostre tetràmer respecte al 5% del r<ACGU> descrit¹⁴¹). En darrer lloc,

podíem concloure que el fracàs en l'intent d'obtenció del tridecàmer $r\langle pEG(CUG)_3CE \rangle$ **14** segurament havia sigut causat per, com a mínim parcialment, una elecció errònia en l'estratègia de protecció de l'hidroxil 2' dels nucleòtids.

Vam decidir, per tant, abordar la síntesi dels models cíclics amb repeticions CUG però usant el grup protector TOM en lloc del TBDMS en l'hidroxil 2'. Tenint en compte que *a priori* el tetradecàmer $r\langle p(EGCUGCE)_2 \rangle$ **15** (FIGURA 1.8.D) era un model millor que el tridecàmer $r\langle pEG(CUG)_3CE \rangle$ **14** (FIGURA 1.8.C), vam procedir a sintetitzar el tetradecàmer **15** directament, sense tornar a intentar l'obtenció del tridecàmer **15**.

1.3.1.4 Obtenció del tetradecàmer $r\langle p(EGCUGCE)_2 \rangle$ **15**

El protocol usat en l'obtenció del tetradecàmer $r\langle p(EGCUGCE)_2 \rangle$ **15** a una escala de 10 μmol va ser anàleg al descrit en l'apartat 1.3.1.2, modificant únicament el mètode d'eliminació dels protectors TOM de l'hidroxil 2'. Un cop completament desprotegit i convenientment dessalat es va procedir a analitzar el cru mitjançant EM-MALDI-TOF. L'espectre va mostrar un senyal molt ample centrat a $m/z=3758$, força pròxima a la massa del producte desitjat ($[M-H^+]^-_{\text{calc}}=3763$). El cru va ser també quantificat per UV, determinant que teníem 10 OD₂₆₀, el que correspondria a un rendiment del 2.4% abans de dur a terme la purificació.

Per tal de mirar de purificar-lo, el cru va ser analitzat per HPLC en fase inversa usant diversos gradients d'elució. En cap dels gradients provats va poder observar-se un pic majoritari que pogués correspondre's al producte cíclic format sinó al contrari, observant-se un perfil cromatogràfic força complex (FIGURA 1.14). Es van col·lectar diverses fraccions per tal d'intentar determinar on es podia trobar el producte desitjat, però l'anàlisi mitjançant EM-MALDI-TOF de les diferents fraccions va mostrar en totes elles senyals similars als observats en el cru de desancoratge, el que impossibilitava la localització del producte cíclic i, per tant, la seva purificació per HPLC en fase inversa. L'anàlisi el cru mitjançant PAGE va mostrar diverses bandes amb intensitats similars, el que era coherent amb els resultats de l'anàlisi per HPLC però que desafortunadament feia inviable la purificació del tetradecàmer mitjançant aquesta tècnica.

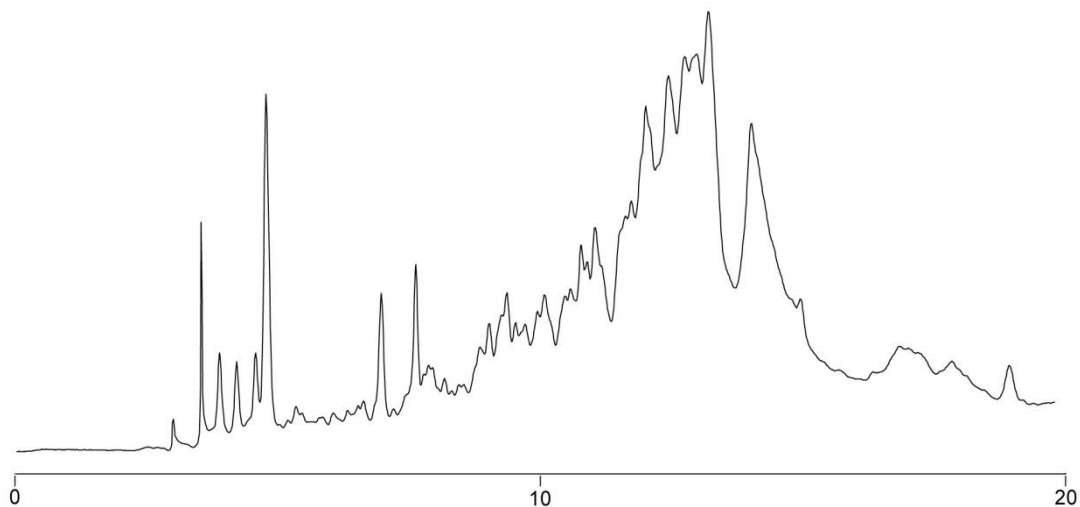


Figura 1.14. Anàlisi per HPLC en fase inversa del cru corresponent a la síntesi del tetradecàmer **15**. L'escala es representa en minuts.

En aquest punt vam decidir abandonar la síntesi d'aquest model. D'una banda havíem observat un senyal per EM-MALDI-TOF que es podia correspondre a l'oligonucleòtid cíclic desitjat. D'altra banda, però, el rendiment de producte desancorat era molt baix. A més a més, la complexitat del cru de desancoratge en feia inviable la purificació per HPLC o per PAGE. Per la seva banda, la seqüència ja havia sigut dissenyada com la més curta que pogués estructurar-se en forma de dúplex i amb el menor impediment estèric possible i tant les condicions de ciclació com les de desancoratge es trobaven optimitzades. Tenint en compte les poques millores que podíem aportar al mètode vam decidir intentar obtenir un model cíclic mitjançant una altra aproximació que ens semblava més prometedora.

CAPÍTOL 2:

**SÍNTESI D'OLIGONUCLEÒTIDS CÍCLICS
MITJANÇANT CICLACIÓ ASSISTIDA PER
MOTLLE**

2 Síntesi d'oligonucleòtids cíclics mitjançant ciclació assistida per motlle

2.1 Introducció i objectius

Els esquemes sintètics descrits en l'apartat 1.1 d'aquest Bloc s'han revelat útils per tal de preparar oligonucleòtids cíclics de grandària mitjana i petita, però s'han mostrat insuficients a l'hora d'obtenir cicles més grans, ja que a mesura que augmenta la llargada de la cadena oligonucleotídica més alt és el cost entròpic que s'ha de pagar per a que es puguin trobar els extrems a unir. Per tal de superar aquest impediment s'han desenvolupat metodologies sintètiques basades en l'ús d'un motlle que té com a funció preorganitzar la cadena del precursor lineal no protegit, de tal manera que els extrems entre els que s'ha de dur a terme la unió es trobin pròxims en l'espai. Aquesta metodologia, que també permet unir dos fragments lineals entre si,¹⁵⁰ rep el nom de condensació assistida per motlle (*template assisted ligation*) o, en el cas que l'oligonucleòtid resultant de la lligació sigui cíclic, ciclació assistida per motlle.

Per tal de dur a terme la condensació s'han usat mètodes químics, que empen agents acoblants com la carbodiimida soluble EDC (*N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida),^{96b,150c,151} el BrCN¹⁵² o l'*N*-cianoimidazole,^{152a,153} o bé mètodes enzimàtics, en els que s'usen DNA lligases.^{96a,154} En el cas dels mètodes químics la ciclació de l'oligonucleòtid pot tenir lloc tant si està fosforilat en 5' com en 3', mentre que en el cas de la lligació enzimàtica es requereixen oligonucleòtids 5'-fosfat. Segons la naturalesa de l'estructura usada per poder aproximar els extrems de la seqüència a unir podem diferenciar entre l'ús d'un motlle extern, quan és una altra cadena la que s'hibrida amb l'oligonucleòtid que es pretén ciclar, o bé d'un motlle intern, quan s'aprofita la pròpia autoestructuració del precursor lineal. Una de les restriccions que presenta aquesta metodologia, però, és la necessitat d'una llargada mínima de l'oligonucleòtid a ciclar (més de 20 nucleòtids), ja que és necessària una bona hibridació entre el precursor lineal i la seqüència del motlle.

Pel que fa a la ciclació assistida per motlle extern, s'han usat bàsicament dues aproximacions: la formació d'un dúplex entre el precursor lineal i el motlle i la formació d'una estructura tríplex entre tots dos. Shabarova i col·laboradors van dur a terme un seguit de ciclacions químiques¹⁵⁵ en les quals els extrems a unir s'apropaven en l'espai gràcies a la formació d'un dúplex entre aquests i el motlle extern (FIGURA 2.1.A). Per la seva banda, Kool i col·laboradors van descriure la ciclació química d'oligonucleòtids gràcies a la formació d'una triple hèlix tant entre un motlle purínic i un precursor lineal polipirimidínic (motiu paral·lel^{92a,99a,156}) com entre un motlle pirimidínic i un precursor pulipurínic (motiu antiparal·lel^{99c,151b,157}) (FIGURA 2.1.B).

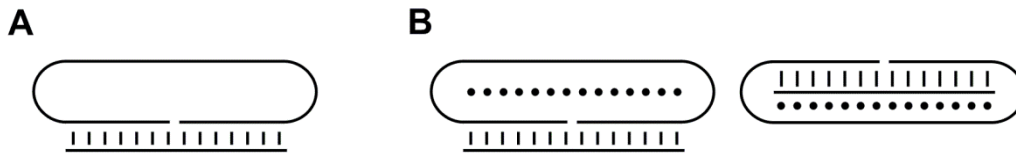


Figura 2.1. Diferents estratègies de ciclació assistida per motlle extern. **A.** Dúplex. **B.** Tríplex paral·lel (dreta) i antiparal·lel (esquerra). Les ratlles (|) representen enllaços tipus Watson-Crick mentre els punts (·) representen enllaços tipus Hoogsteen.

D'altra banda, la utilització d'un motlle intern es basa en l'intent de treure avantatge de la pròpia autoestructuració de la seqüència lineal, de tal manera que aquesta deixi convenientment encarats els extrems a unir. L'estructuració en forma de *dumbbell* ha sigut la més usada, ja fos a partir d'un únic precursor lineal, el que es coneix com a *nicked dumbbell*^{92a,96b,158} (FIGURA 2.2.A), o bé a partir de dos fragments lineals convenientment estructurats, els quals posseeixen extrems cohesius (*sticky ends*) que s'ajusten perfectament com les peces d'un trencaclosques^{154a} (FIGURA 2.2.B). Aquesta estratègia de ciclació assistida per motlle intern ha sigut també utilitzada amb èxit per a poder obtenir estructures tipus *dumbbell* que continguessin llaços no nucleotídics.¹⁵⁹ Aproximacions similars s'han emprat aprofitant la formació d'altres tipus d'estructures, com poden ser els quàdruplex de guanina^{103c,160} (FIGURA 2.2.C) o l'*i-motif*^{103b,161} (FIGURA 2.2.D), tant en el cas d'un únic precursor lineal que s'autoestructura^{160,161} com en el de dos fragments que s'estructuren convenientment.^{103b,c} Aquestes estructures han permès superar les restriccions de llargada inherents a la ciclació assistida per motlle i obtenir fins a nonàmbers cíclics.¹⁶¹

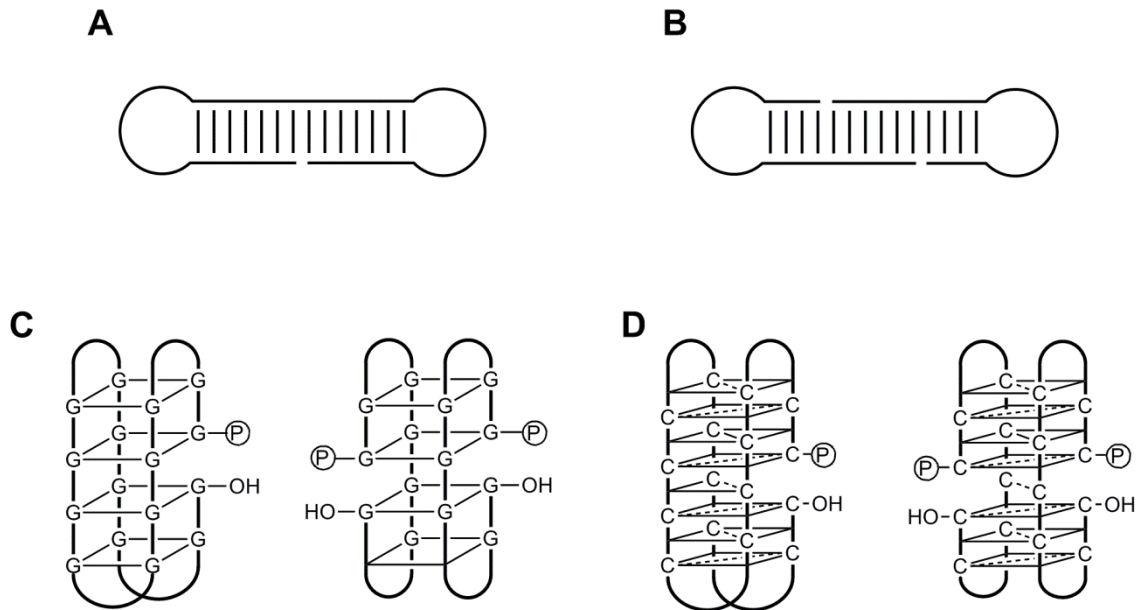


Figura 2.2. Diferents estratègies de ciclació assistida per motlle intern. **A.** *Nicked dumbbell*. **B.** Dúplex bimolecular amb extrems cohesius (*sticky ends*). **C.** G-quàdruplex uni (esquerra) i bimolecular (dreta). **D.** *i-motif* uni (esquerra) i bimolecular (dreta).

Més enllà de l'obtenció d'oligonucleòtids cíclics, la metodologia de ciclació assistida per motlle ha sigut usada amb èxit en la preparació d'estructures més complexes, com poden ser la unió de dos plasmids a través d'un oligonucleòtid cíclic,¹⁶² la síntesi d'estructures ramificades¹⁶³ o bé l'entrellaçament de dos cicles de cadena senzilla.¹⁶⁴ D'altra banda, l'estratègia de lligació assistida per motlle també s'ha usat per obtenir oligonucleòtids lineals i cíclics lligats mitjançant unions no naturals, com pot ser el fosforotioat diester,¹⁶⁵ el fosforoselenoat diester,¹⁶⁶ el pirofosfat,¹⁶⁷ el fosforoamidat,¹⁶⁸ el pont disulfur¹⁶⁹ o bé un triazole.¹⁷⁰

Per la seva banda, la preparació d'RNA cíclic usant la ciclació assistida per motlle ha estat objecte d'un menor nombre d'estudis respecte al treball realitzat amb DNA. Les estratègies usades, però, no han diferit de les emprades en el cas del DNA i, en aquest sentit, s'ha descrit l'obtenció d'oligoribonucleòtids cíclics usant l'autoestructuració del precursor lineal¹⁷¹ o la formació de dúplex¹⁷² i tríplex¹⁷³ intermoleculars, duent a terme la unió de forma química o enzimàtica, ja fos mitjançant l'enzim T4 DNA ligasa¹⁷⁴ o bé la T4 RNA ligasa,^{171,172} en la qual els extrems a unir s'han de trobar pròxims en l'espai però no hibridats.

2.1.1 La problemàtica de la ciclació de seqüències repetitives

La ciclació assistida per motlle, però, presenta dificultats a l'hora d'obtenir oligonucleòtids cíclics que continguin seqüències repetitives, com poden ser aquelles relacionades amb les TRED^{6,8a} o amb la seqüència telomèrica.¹⁷⁵ En aquests casos el motlle no només és complementari als extrems entre els quals s'ha de dur a terme la lligació, sinó que també ho és a la resta de la seqüència, pel que aquest motlle pot hibridar-se en qualsevol punt del precursor lineal i no necessàriament amb els extrems a unir (FIGURA 2.3).

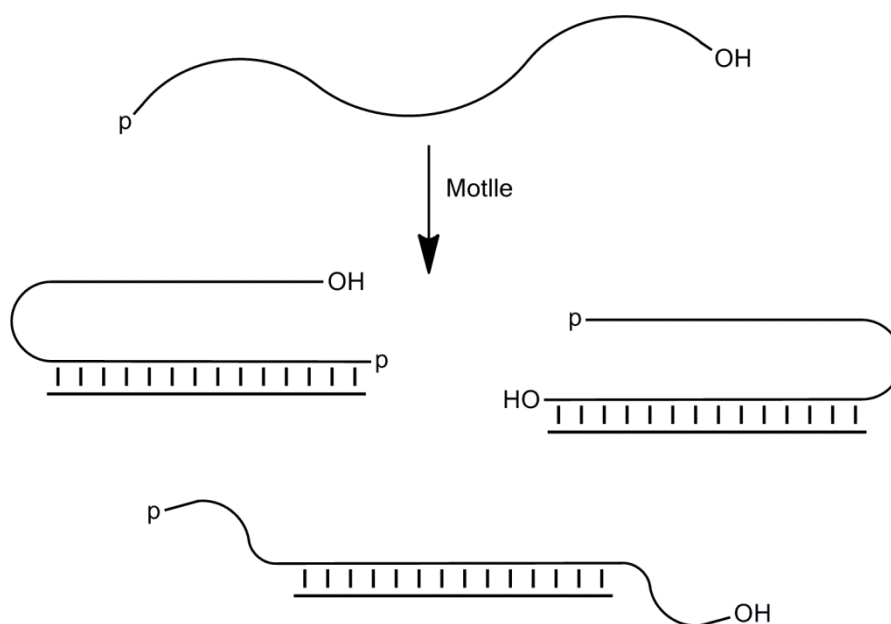


Figura 2.3. Esquema on s'exemplifiquen diferents zones on es pot hibridar el motlle en el cas que el precursor lineal contingui seqüències repetitives.

Per tal de superar aquesta limitació, Kool i col·laboradors van desenvolupar una metodologia basada en la protecció parcial de l'oligonucleòtid a ciclar¹⁷⁶. Aquesta estratègia es fonamenta en l'ús d'un grup protector permanent en les bases del centre del precursor lineal que n'impedeixi la hibridació amb el motlle i que faciliti, per tant, que la hibridació tingui lloc entre el motlle i els extrems a unir, apropant-los d'aquesta manera i permetent que es produeixi la lligació (FIGURA 2.4). El grup protector permanent cal elegir-lo de forma que sigui ortogonal a l'estratègia de protecció emprada, de manera que durant el desancoratge i desprotecció del precursor lineal aquest mantingui la protecció parcial, la qual s'elimina un cop s'ha obtingut l'oligonucleòtid cíclic.

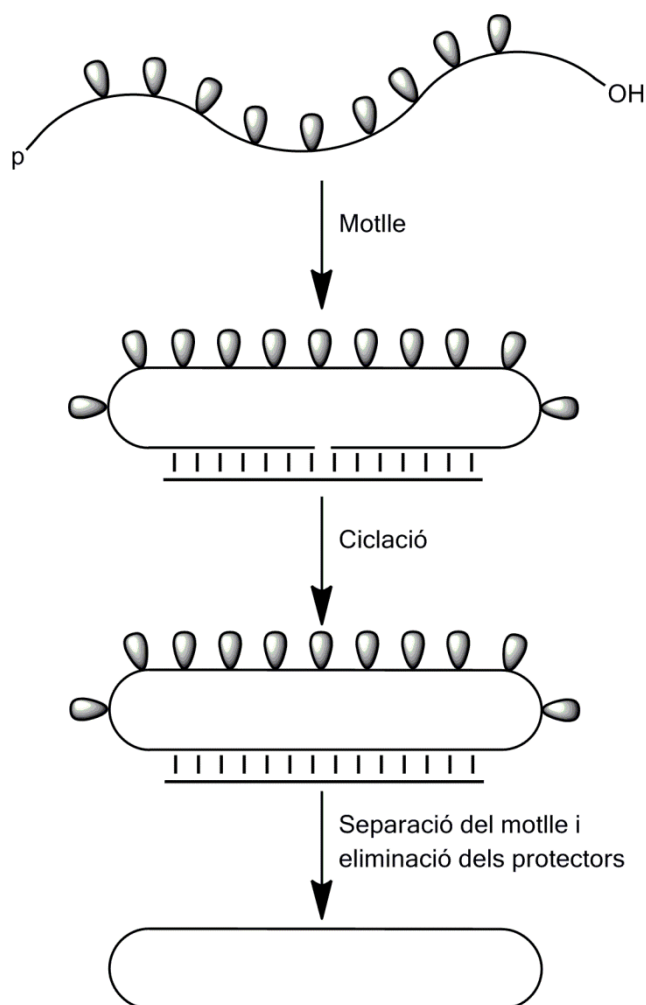


Figura 2.4. Esquema on s'il·lustra l'estratègia de ciclació assistida per motlle amb protecció parcial del precursor lineal. El motlle, al no poder hibridar-se en el centre del precursor lineal degut a la presència de grups protectors que li ho impedeixen (representats en la figura com a gotes grises), es veu forçat a fer-ho amb els extrems del mateix, aproximant-los suficientment per tal que pugui tenir lloc la reacció de ciclació. Un cop aquesta ha tingut lloc, l'eliminació dels grups protectors permanents permet obtenir l'oligonucleòtid cíclic desitjat.

Usant aquesta metodologia, Kool i col·laboradors van ser capaços de preparar oligonucleòtids cíclics que contenen repeticions tant de la seqüència telomèrica $d(\text{GGGTTA})_n$ ^{176c} com de la seva complementària $d(\text{CCCAAT})_n$,^{176a,b} protegint les dG del centre del precursor lineal amb el grup dimetilformamidini (dmf)¹⁷⁷ i les dA amb el grup dimetilacetamidini (Dma),¹⁷⁷ respectivament.

Fins on nosaltres sabem, no hi han exemples descrits en la bibliografia de la utilització de la ciclació assistida per motlle amb ús de protecció parcial en la síntesi d'oligonucleòtids cíclics d'RNA. Tot i això, aquesta estratègia s'adaptava perfectament a les necessitats que teníem, ja que el nostre objectiu era obtenir oligoribonucleòtids

cíclics que continguessin repeticions de la seqüència (CUG). Utilitzant un grup protector adequat en el centre del precursor lineal podríem dirigir la hibridació del motlle de tal manera que tingués lloc en els extrems del mateix, aproximant-los en l'espai per tal de facilitar la reacció de ciclació i obtenint així oligonucleòtids cíclics amb repeticions del triplet (CUG). Els resultats d'aquesta aproximació, així com els obtinguts amb altres estratègies relacionades, s'exposen en aquest Capítol.

2.2 Ciclació d'oligoribonucleòtids no protegits

2.2.1 Intent de ciclació d'oligoribonucleòtids sense utilitzar motlle extern

Tal com s'ha exposat en la Introducció, els oligonucleòtids lineals que contenen repeticions CUG no presenten una única conformació, sinó que s'estructuren en forma d'una sèrie de *hairpins* imperfectes en equilibri entre ells, els quals es diferencien en el nombre de bases desaparellades en els extrems 3' i 5' terminals,^{76a} així com en la mida i la posició dels *loops* (FIGURA 3 INTRODUCCIÓ). En alguna d'aquestes estructures en equilibri els dos extrems podrien trobar-se prou propers per tal que pogués tenir lloc la lligació entre tots dos. D'aquesta manera es podria aprofitar la pròpia estructuració de l'oligonucleòtid lineal per tal de convertir-lo en un oligonucleòtid cíclic, de forma anàloga al que succeeix en la ciclació assistida per motlle intern. La principal diferència seria que en aquest cas no es duria a terme la ciclació d'una estructura única i definida sinó que s'intentaria lligar una hipotètica conformació que no sabem, de fet, si realment es forma. Usant aquesta metodologia podríem obtenir oligonucleòtids cíclics amb repeticions (CUG) sense necessitat d'usar protecció parcial ni un motlle extern.

A l'hora de seleccionar la llargada de l'oligonucleòtid amb que duríem a terme aquesta aproximació vam considerar diversos factors. Tal com està descrit que succeeix en els *hairpins* que contenen repeticions (CUG),^{76a} els *loops* de l'oligonucleòtid que preparéssim estarien formats per 4 nucleòtids (UGCU). A l'hora d'elegir el nombre de repeticions calia arribar a un compromís, ja que com major fos aquest nombre més acurat seria el model però, d'altra banda, les dificultats a l'hora de sintetitzar i analitzar el precursor lineal augmentarien. Valorant aquest elements l'oligonucleòtid objectiu elegit va ser el 42mer $r\langle p(\text{CUG})_{14} \rangle \mathbf{21}$ (FIGURA 2.5.A).

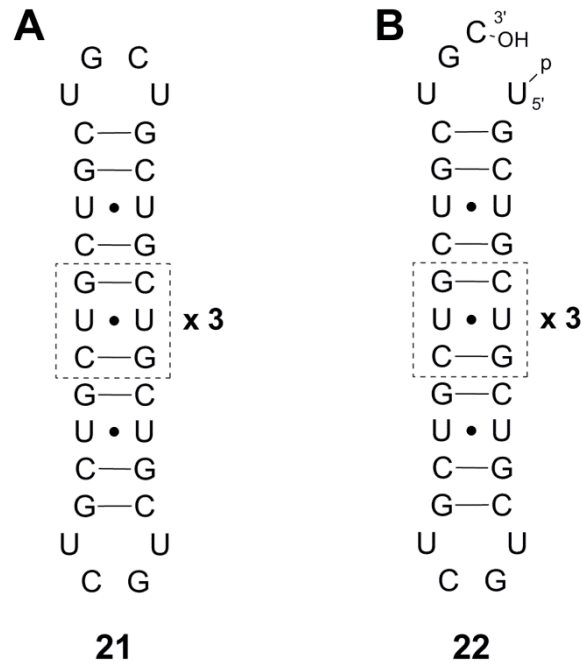


Figura 2.5. **A.** 42mer cíclic $r\langle p(\text{CUG})_{14} \rangle$ **21**. **B.** 42mer lineal $p(\text{UGC})_{14}$ **22**. Les ratlles representen enllaços tipus Watson-Crick, mentre que els punts indiquen *mismatches* U·U.

Com en el cas del DNA, en l'RNA la lligació dels dos extrems es pot dur a terme de forma química o enzimàtica. Els mètodes químics, però, poden originar reaccions secundàries¹⁷⁴ i, a més a més, impliquen el desavantatge de la possible formació de l'enllaç fosfodiester tant entre els hidroxils 3' i 5' (unió natural) com entre els 2' i 5'. Pel que fa als mètodes enzimàtics, existeixen dues ligases amb característiques força diferents: la T4 DNA ligasa¹⁷⁸ i la T4 RNA ligasa.¹⁷⁹ Tot i que totes dues ligases catalitzen la formació d'enllaços fosfodiester entre dos fragments d'RNA, la T4 DNA ligasa catalitza aquesta reacció únicament quan els fragments a unir es troben perfectament hibridats amb la seva seqüència complementària,¹⁸⁰ mentre que la T4 RNA ligasa la catalitza quan els extrems a unir de tots dos són monocatenaris¹⁸¹ (FIGURA 2.6). En el cas que ens ocupa, l'oligonucleòtid amb repeticions CUG completament desprotegit no es trobaria perfectament hibridat, sinó que els seus extrems es trobarien presumiblement en forma monocatenària. Per tant, per tal d'obtenir el 42mer cíclic $r\langle p(\text{CUG})_{14} \rangle$ **21** seguint aquesta aproximació era necessari l'ús de la T4 RNA ligasa. A l'hora de decidir entre quines bases tindria lloc la ciclació vam elegir que la uridina en l'extrem 5' terminal es lligués amb la citidina en l'extrem 3' terminal, ja que al tractar-se de bases pirimidíniques l'impediment estèric seria menor, el que hauria de donar lloc a millors rendiments de ciclació. En resum, el precursor lineal a

partir del que intentaríem obtenir el 42mer cíclic **21** seria el p(UGC)₁₄ **22** (FIGURA 2.5.B).

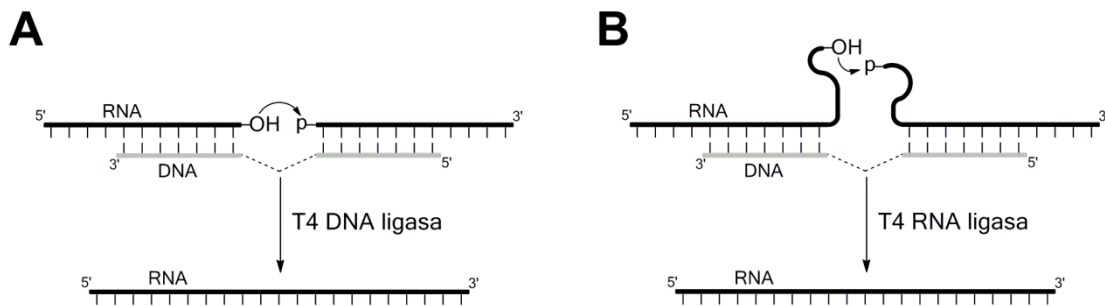


Figura 2.6. Diferències entre l'activitat de la T4 DNA ligasa i la T4 RNA ligasa en la condensació assistida per motlle de dos fragments d'RNA. **A.** En la lligació amb la T4 DNA ligasa el motlle de DNA s'ha d'hibridar perfectament amb els dos fragments a unir per tal que l'enzim pugui dur a terme la lligació. **B.** En la lligació amb la T4 RNA ligasa el motlle de DNA aproxima el dos fragment a unir però no hibridant-se amb els extrems, els quals han de quedar lliures ja que l'enzim només és capaç de dur a terme la condensació d'RNA monocatenari.

2.2.1.1 Intent d'obtenció del r<p(CUG)₁₄>

L'elongació de la cadena nucleotídica va tenir lloc al sintetitzador automàtic a escala 0.9 μmol i emprant un cicle de síntesi estàndard. Com a sintons es van usar derivats fosforamidits comercials de DMT-ribonucleòsids amb l'hidroxil 2' protegit amb el grup TBDMS i amb les bases protegides per els grups isopropilfenoxiacetil (ⁱPrPac) en el cas de la guanina i acetil (Ac) en el cas de la citosina. Aquesta estratègia de protecció, que es completa amb l'ús del grup fenoxiacetil (Pac) en el cas de l'adenina, es coneix com a ultra suau (*Ultra-Mild*¹⁸²) i ha anat guanyant terreny progressivament en la síntesi d'oligonucleòtids per dues raons. D'una banda, al tractar-se de grups protectors més làbils que els usats prèviament, es poden usar tractaments més curts per tal de desancorar i desprotegir l'oligonucleòtid sintetitzat. D'altra banda, possibilita la síntesi de seqüències que continguin bases o marcadors que no siguin estables als tractaments de desprotecció habituals atès que la seva eliminació implica l'ús de condicions més suaus. L'única modificació que cal introduir respecte la síntesi estàndard en l'ús d'aquesta estratègia de protecció rau en la necessitat d'usar Pac₂O en lloc d'Ac₂O com a agent de bloqueig per tal d'eliminar la possibilitat d'intercanvi del grup ⁱPrPac de la guanina pel grup Ac.¹⁸³ Sempre que no s'indiqui el contrari, els fosforamidits emprats per la síntesi d'RNA en aquesta tesi han sigut els que usen el grup

protector TBDMS per a bloquejar l'hidroxil 2' i estratègia *Ultra-Mild* per protegir les diferents bases.

Com ja s'ha comentat en la introducció d'aquest Capítol, les ligases (tant la T4 DNA com la T4 RNA) requereixen oligonucleòtids fosforilats en 5'. A l'hora de portar a cap la incorporació del fosfat en 5' es poden usar mètodes enzimàtics,¹⁸⁴ però en aquest cas ens vam inclinar per introduir-lo químicament. Per dur-la a terme es va usar el reactiu desenvolupat per Guzaev i col·laboradors,¹⁸⁵ conegut com a *Solid Chemical Phosphorylation Reagent II* o *solid CPR II* (FIGURA 2.7.A). Aquest reactiu, de la mateixa manera que el *CPR II*, desenvolupat pels mateixos autors anteriorment (FIGURA 2.7.B),¹⁸⁶ o el *CPR* de Horn i Urdea (FIGURA 2.7.C) en el que els dos anteriors estan basats,¹⁸⁷ és totalment compatible amb la química del fosforamidit i es pot usar en el sintetitzador automàtic sense introduir cap variació en el cicle de síntesi estàndard. Les principals diferències entre ells rau en el fet que tant el *CPR II* com el *solid CPR II* permeten mantenir el grup DMT en l'extrem 5' de l'oligonucleòtid, el que facilita la purificació, i que el *solid CPR II* és, com el seu nom indica, un reactiu sòlid, mentre que els altres dos es tracten d'olis de difícil manipulació. Aquesta major facilitat de manipulació va fer que ens decantéssim per l'ús del *solid CPR II*.

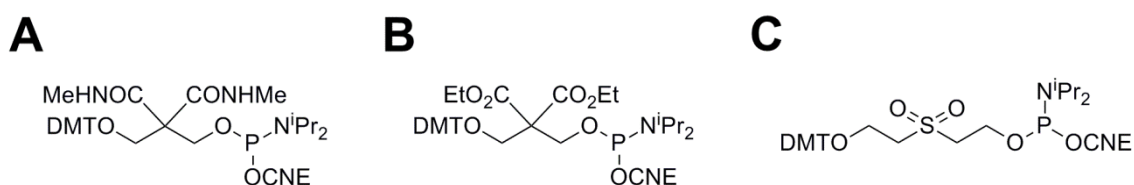


Figura 2.7. Estructura dels diferents reactius usats per dur a terme la fosforilació química d'un oligonucleòtid. **A.** *Solid Chemical Phosphorylation Reagent II* (solid CPR II). **B.** *Chemical Phosphorylation Reagent II* (CPR II). **C.** *Chemical Phosphorylation Reagent* (CPR).

Un cop finalitzada la síntesi de l'oligonucleòtid es va dur a terme el desancoratge del suport sòlid mitjançant un tractament amb una barreja de metilamina/amoníac (AMA) a 65°C durant 30 minuts i, posteriorment, es van eliminar els protectors de l'hidroxil 2' amb TEA·3HF seguint el protocol estàndard.¹⁴⁸ Cal recordar que un cop l'RNA es troba totalment desprotegit s'ha d'usar material autoclavat i lliure de ribonucleases per tal d'evitar-ne la degradació enzimàtica.

El cru de desancoratge va ser analitzat per EM-MALDI-TOF, confirmant-se que teníem el producte desitjat i, un cop dessalat per exclusió molecular, es va purificar per electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), obtenint-se 9 OD de producte pur, el que correspon a un rendiment del 3%. Aquest rendiment tant baix va ser degut a que just després del desancoratge de la resina gran part del producte es va perdre per problemes en la seva liofilització.

Un cop obtingut el precursor lineal **22** pur podíem procedir a dur a terme diversos assaigs de ciclació usant l'enzim T4 RNA ligasa (*Epicenter*). En la literatura existeixen diferents protocols descrits mitjançant els quals s'han preparat oligonucleòtids cíclics emprant aquest enzim,¹⁸⁸ tots ells usant un medi tamponat de Tris-HCl i MgCl₂. La principal variació existent entre aquests mètodes, més enllà de la concentració del precursor lineal o d'altres reactius, rau en la incorporació d'additius com poden ser el PEG 4000 o l'albumina de sèrum bovina (BSA), els quals faciliten la lligació enzimàtica degut a la reducció del volum efectiu de la mescla de reacció i el consegüent augment de la concentració efectiva de l'oligonucleòtid a ciclar.

Es va decidir assajar totes tres condicions experimentals trobades, introduint únicament petites variacions en la concentració del precursor lineal respecte als procediments descrits. El resum de les principals diferències entre els tres assaigs duts a terme es mostra en la *TAULA 2.1*.

	Assaig 1 ^{188a}	Assaig 2 ^{188b}	Assaig 3 ^{188c}
Volum (µL)	150	50	50
Precursor Lineal 22 (µM)	0.15	17	6
T4 RNA ligasa (U/µL)	0.5	0.7	4
Additiu	DMSO	PEG 4000	BSA
	10%	40mg/ml	25µg/ml

Taula 2.1. Resum de les principals diferències entre els diversos assaigs de ciclació realitzats amb la T4 RNA ligasa. La resta de components del medi de reacció va ser idèntica.

En tots els casos es va procedir a dur a terme l'estructuració de 0.3 OD₂₆₀ del precursor lineal (*annealing*) abans d'iniciar la reacció de ciclació, per tal d'intentar preorganitzar-lo esperant que els extrems a unir es trobessin el més pròxims possible. La reacció es va deixar avançar durant 16 hores a 37°C i, un cop aturada, es va analitzar per PAGE (*FIGURA 2.8*).

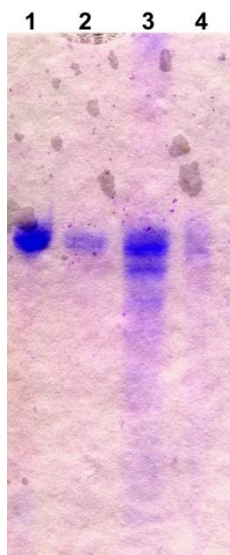


Figura 2.8. Anàlisi per PAGE dels diferents assaigs de ciclació emprant la T4 RNA ligasa. 1. Precursor lineal 2. Assaig 1.^{188a} 3. Assaig 2.^{188b} 4. Assaig 3.^{188c}

Com es pot observar en el PAGE, ni en l'assaig 1 ni en el 3 (carrils 2 i 4) no s'observa cap tipus de banda amb mobilitat electroforètica menor al precursor lineal, tal i com es correspondria en el cas de la formació d'un l'oligonucleòtid cíclic. En l'assaig 2 (carril 3), per la seva banda, sembla observar-se una mena d'ombra amb una mobilitat electroforètica lleugerament inferior respecte a l'oligonucleòtid de partida que podria correspondre's a la formació de producte cíclic. Vam decidir repetir aquest assaig de ciclació augmentant i disminuint la concentració del precursor lineal (a 6 i 25 μM) per veure si es confirmava la presència d'aquest producte, però en cap dels dos casos es va observar una nova banda en l'anàlisi per PAGE.

A la vista dels resultats observats, l'autoestructuració de p(UGC)_{14} no havia permès aproximar suficientment els extrems de l'oligonucleòtid de tal manera que pogués tenir lloc la reacció de lligació entre ells. L'intent d'obtenció d'oligonucleòtids cíclics amb repeticions (CUG) sense usar motlle extern havia resultat infructuós i, per tant, era hora de canviar d'aproximació.

2.2.2 Ciclació d'oligoribonucleòtids mitjançant motlle extern

Un cop descartada la síntesi d'oligonucleòtids cíclics amb repeticions (CUG) sense usar motlle extern vam procedir a intentar obtenir-los a partir d'una altra aproximació com és la ciclació assistida per motlle extern amb protecció parcial del precursor lineal, descrita en la introducció del Capítol. Aquesta, però, era una estratègia amb la que no teníem experiència prèvia en el nostre grup de treball. En aquets sentit volíem comprovar que la tendència a estructurar-se en forma de *hairpin* de la seqüència repetitiva (CUG) no era un impediment a l'hora d'aplicar aquesta estratègia, així com agafar experiència amb la preparació d'oligonucleòtids cíclics usant aquesta aproximació abans d'intentar obtenir l'oligonucleòtid cíclics amb repeticions (CUG).

Per tal de satisfer tots dos objectius ens vam plantejar també la síntesi d'un oligonucleòtid cíclic model que contingués repeticions (CUG) en els seus extrems però que estigués format per una seqüència totalment diferent en la resta de l'oligonucleòtid. D'aquesta manera el centre del precursor lineal, al no ser complementari amb el motlle, no s'hi podria hibridar, pel que aquest ho hauria de fer amb els extrems que contenen les repeticions (CUG), emulant així el que es pretén amb la protecció parcial del precursor lineal.

Vam decidir que l'oligonucleòtid amb repeticions (CUG) tindria una llargada de 14 repeticions (CUG), amb el punt de lligació situat entre un uridina i una citosina (*FIGURA 2.9.A*). Per tal de facilitar una bona hibridació entre tots dos extrems del precursor lineal i el motlle extern seria necessari d'un mínim de 8 nucleòtids a cada banda del lloc d'unió.¹⁸⁹ Per aquest motiu vam decidir que el motlle de DNA comptés amb 3 repeticions (GCA) a cada cantó del punt de lligació, el que correspondria a l'octadecàmer d(GCA)₆ **23** (*FIGURA 2.9.A*). Per la seva banda, el model que preparéssim hauria de tenir la mateixa llargada que l'oligonucleòtid cíclic amb repeticions (CUG) que preteníem sintetitzar. El precursor lineal d'aquest model, per tant, també es tractaria d'un 42mer, de seqüència p(UGC)₃CGUAACCUACGACGAACCUAGAUG(UGC)₃ **24**, on la part central del precursor lineal havia estat dissenyada per tal d'impedir tant la hibridació del motlle com la seva autoestructuració (*FIGURA 2.9.B*).

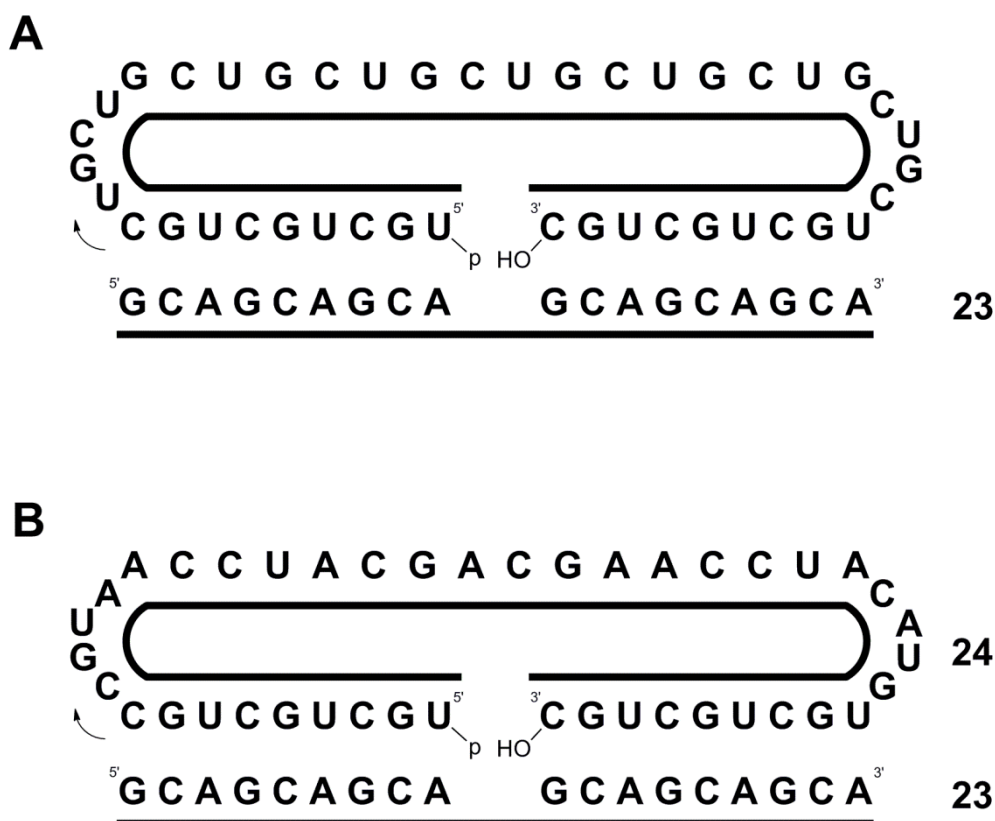


Figura 2.9. Representació dels diferents 42mers que es pretenen usar en la ciclació assistida per motlle extern, hibridades amb el $(GCA)_6$. **A.** 42mer $p(CUG)_{14}$ objectiu. En aquesta representació s'han obviat les bases que es protegirien de forma permanent. **B.** 42mer **24**, el qual s'usarà com a model per assajar la ciclació.

La síntesi tant del motlle **23** com del 42mer model **24**, així com els diferents assaigs de ciclació duts a terme, es mostren a continuació.

2.2.2.1 Preparació del motlle $d(GCA)_6$ **23**

L'elongació de la cadena nucleotídica va tenir lloc al sintetitzador automàtic emprant un cicle de síntesi estàndard i derivats fosforamidits comercials de DMT-desoxiribonucleòsids. La síntesi es va dur a terme a escala $3 \times 1 \mu\text{mol}$, mantenint el grup DMT en l'extrem 5' terminal per tal de facilitar-ne la purificació per cromatografia en fase inversa ja que, al tractar-se d'un grup força hidrofòbic, augmenta molt el temps de retenció de l'oligonucleòtid, separant-lo així de les seqüències truncades generades durant la síntesi. L'oligonucleòtid, un cop desancorat de la resina i desprotegit, va ser purificat per MPLC, obtenint-se 105 OD de producte pur, el que correspon a un rendiment del 20%.

2.2.2.2 Obtenció del 42mer model i assaigs de ciclació

La síntesi del 42mer p(UGC)₃CGUAACCUACGACGAACCUAGAUG(UGC)₃ es va dur a terme en el sintetitzador automàtic a escala 1 μmol emprant derivats fosforamidit comercials de DMT-ribonucleòsids i un cicle de síntesi estàndard. El fosfat en l'extrem 5' terminal es va introduir amb l'ajut del *solid CPR II* usat anteriorment. El desancoratge, desprotecció i purificació de l'oligonucleòtid va tenir lloc seguint el procediment descrit en l'apartat 2.2.1.1, obtenint-se en aquest cas 58 OD de producte pur, el que corresponia a un rendiment del 16%.

Assaigs de ciclació del 42mer 24

La T4 DNA ligasa ha sigut àmpliament usada per realitzar lligacions entre fragments tant de DNA¹⁵⁶ com d'RNA,¹⁹⁰ així com per dur a terme la ciclació d'ambdós àcids nucleics.^{156,174} La T4 DNA ligasa comparteix moltes de les característiques i dels requisits de la T4 RNA ligasa, com la necessitat d'un medi tamponat que contingui DTT per tal de mantenir les cisteïnes de l'enzim reduïdes, el fet de tractar-se d'un enzim dependent d'ATP o bé la influència que exerceix sobre la seva activitat la presència de cations mono i divalents en el medi de reacció.^{178,179,191} També és freqüent la incorporació d'additius com el PEG 4000 o la BSA en la mescla de lligació per tal d'augmentar la concentració efectiva tant del precursor lineal com del motlle i, així, afavorir la ciclació.

En primer lloc vam decidir provar les condicions de ciclació descrites per Helm i col·laboradors,^{190b} en les quals la concentració tant del precursor lineal com del motlle era de 10 μM i no implicaven l'ús de cap additiu. Un cop duta a terme la hibridació del precursor lineal amb una quantitat estequiomètrica del motlle s'hi va afegir la T4 DNA ligasa (Epicenter) fins a una concentració d'1 U/μL i es va deixar avançar la ciclació a 30°C, agafant-ne alíquotes a les 24 i 72 hores. D'altra banda, vam decidir incubar tant el precursor lineal **24** com el motlle **23** per separat amb l'enzim, per tal de tenir blancs dels assaigs de ciclació. Aquests blancs es van analitzar, juntament amb els assaigs de ciclació anterior, per PAGE (*FIGURA 2.10*).

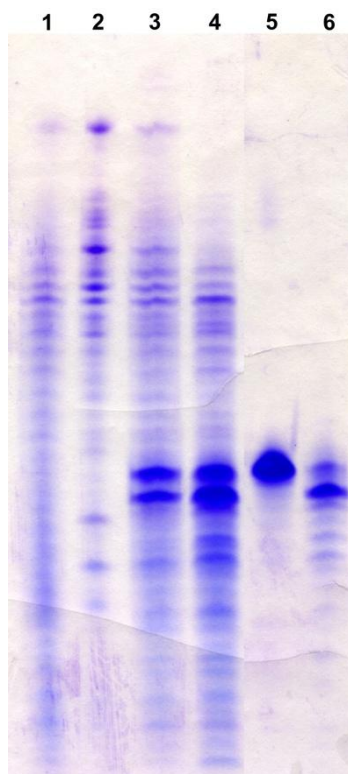


Figura 2.10. Anàlisi per PAGE dels diferents assaigs realitzats. **1.** Assaig d'estabilitat del precursor lineal **24** en presència de la T4 DNA ligasa durant 1 dia a 30°C. **2.** Precursor lineal **24**. **3.** Assaig de ciclació a 30°C durant 1 dia. **4.** Assaig de ciclació a 30°C durant 3 dies. **5.** Motlle **23**. **6.** Assaig d'estabilitat del motlle **23** en presència de T4 DNA ligasa durant 1 dia a 30°C.

De l'estudi del PAGE vam poder extreure diverses conclusions. En primer lloc, cal destacar la manca d'homogeneïtat del precursor lineal **24** preparat, tal i com s'observa en el carril *1*. Aquesta podria ser deguda a una certa degradació del propi oligonucleòtid o bé a una purificació incompleta del mateix. En segon lloc, comparant els carrils *1* i *2* sembla clar que incubar el precursor lineal amb l'enzim T4 DNA ligasa contribueix a la seva degradació, el que podria voler dir que l'enzim estigués contaminat amb ribonucleases. En tercer lloc, si ens fixem en els assaigs de ciclació d'1 i 3 dies (carrils *3* i *4*), en cap dels dos s'observa la presència de presumpte producte cíclic, la mobilitat electroforètica del qual hauria de ser menor a la del precursor lineal. Ans al contrari, en tots dos s'aprecia una degradació del precursor lineal, especialment en el cas del carril *4*, on aquest ha desaparegut completament. Aquestes dades reforçarien la teoria que l'enzim estigués causant a la degradació del l'RNA. En darrer lloc, l'anàlisi dels carrils *5* i *6* va revelar els resultats més sorprenents, atès que es feria evident que l'enzim no solament degradava l'oligoribonucleòtid **24**, el que era fins a cert punt comprensible

degut a la seva sensibilitat a les ribonucleases, sinó que també era capaç de fer-ho amb el motlle de DNA.

Duent a terme una cerca bibliogràfica vam constatar que, sorprenentment, la presència de ribonucleases en les lligases no era un fet insòlit.¹⁹² Arribats a aquest punt vam decidir contactar la casa comercial que ens havia fornint l'enzim (*Epicenter*), la qual ens va confirmar que el lot d'enzim que ens havia subministrat es trobava contaminat tant amb ribonucleases com amb desoxiribonucleases. Epicenter ens va proveirs d'un nou lot d'enzim amb el qual vam a portar a nous estudis d'estabilitat. El nou enzim fornint per Epicenter, però, també causava la degradació tant del precursor lineal **24** d'RNA com del motlle **23** de DNA. A la vista dels resultat, vam resoldre provar un enzim d'una font comercial diferent, decidint-nos per utilitzar la T4 DNA ligasa subministrada per Fermentas. Vam repetir amb aquest nou enzim els assaigs d'estabilitat duts a terme amb la T4 DNA ligasa facilitada per Epicenter, constatant que l'enzim subministrat per Fermentas no presentava cap tipus d'activitat ni com a ribonucleasa ni com a desoxiribonucleasa. Per tant, aquest enzim podia ser usat per dur a terme assaigs de ciclació del 42mer model sense por a que l'enzim el degradés. Desafortunadament, no disposàvem de més precursor lineal fosforilat **24**. Calia, doncs, preparar-lo de nou.

2.2.2.3 Nova síntesi del 42mer model i obtenció del producte cíclic

Fins a aquest moment havíem estat treballant amb oligonucleòtids on el grup fosfat s'havia incorporat químicament en l'extrem 5' durant la síntesi automàtica de la pròpia cadena. Tot i els avantatges de la fosforilació química descrits anteriorment aquesta presenta, però, alguns inconvenients. D'una banda, no es possible mantenir el grup DMT en l'extrem 5' terminal en el cas dels oligonucleòtids d'RNA per tal de facilitar-ne la purificació, ni tant sols emprant els reactius *CPR II* i *solid CPR II*, que sí ho permeten en el cas dels oligonucleòtids de DNA. Això implica que la purificació dels productes sigui més llarga i menys eficient que si el grup DMT es mantingués en l'extrem de la cadena. D'altra banda, i més important, existeixen evidències tant en el nostre laboratori¹⁹³ com en la bibliografia^{96b} que els oligonucleòtids fosforilats en 5' poden perdre aquest grup fosfat de forma espontània.

Per tal de poder esquivar aquests inconvenients, i aprofitant que havíem de tornar a començar la síntesi, ens vam plantejar una nova estratègia basada en la fosforilació enzimàtica del precursor lineal seguida de la seva ciclació. En primer lloc duríem a terme la síntesi del 42mer model sense fosforilar **25** (anàleg a **24** però sense el fosfat en 5') mantenint el grup DMT en l'extrem 5' per tal de facilitar-ne la purificació. En segon lloc procediríem a fosforilar el precursor lineal **25** per, acte seguit i en el mateix medi de reacció, portar a cap la ciclació del mateix. Aquest tipus de reaccions de fosforilació-ciclació *one pot* s'aprofiten del fet que l'enzim encarregat de que tingui lloc la fosforilació, la T4 PNK, i el que s'empra per tal de ciclar, la T4 DNA ligasa, requereixen de medis de reacció molt semblants.^{190b,c} D'aquesta manera, es redueix el màxim possible el temps que l'oligonucleòtid té el fosfat lliure en 5', minimitzant així el risc de pèrdua del mateix.

Síntesi i purificació del 42mer model 25

La síntesi del 42mer r(UGC)₃CGUAACCUACGACGAACCUAGAUG(UGC)₃ **25** es va dur a terme en el sintetitzador automàtic a escala 1 µmol usant derivats fosforamidits comercials de DMT-ribonucleòsids i emprant un cicle de síntesi estàndard. El desancoratge i desprotecció de l'oligonucleòtid va tenir lloc usant el procediment descrit en l'apartat 2.2.1.1, mentre que es va purificar per HPLC en fase inversa, obtenint-se 24 OD de producte pur, el que equival a un rendiment del 6%. Aquest rendiment, menor a l'habitual, va ser degut a la pèrdua de part del grup DMT durant el procés de purificació.

Fosforilació i ciclació del precursor lineal 25

Existeixen molts exemples en la bibliografia de l'ús de mètodes enzimàtics per tal d'incorporar un grup fosfat en l'extrem 5' dels àcids nucleics. De fet, la fosforilació enzimàtica s'empra rutinàriament en molts laboratoris per tal d'incorporar un fosfat marcat radioactivament amb ³²P als oligonucleòtids, de tal manera que quan s'analitzen per PAGE poden detectar-se per autoradiografia, una tècnica molt sensible. L'enzim usat per tal de dur a terme la reacció és la T4 polinucleòtid quinasa (T4 PNK), la qual s'encarrega de transferir el fosfat γ de l'ATP a l'extrem 5' de l'oligonucleòtid.^{184a}

Vam realitzar un assaig de fosforilació del 42mer model **25** seguint una de les moltes metodologies trobades en la bibliografia.¹⁹⁴ La fosforilació, realitzada en un medi tamponat que contenia tant DTT com ATP, es va deixar avançar durant 3 hores a 37°C. Un cop finalitzada la reacció, la mescla de fosforilació es va analitzar per PAGE, revelant-se una nova banda que es podia correspondre al producte de fosforilació. Cal destacar que per tal de poder observar una diferenciació entre totes dues bandes va ser necessària córrer el gel a un voltatge major i durant més temps del que és habitual, ja que en les condicions d'anàlisi estàndard, emprades en la resta de PAGE mostrats en aquest Capítol, aquesta diferència no s'observava.

Per tal de dur a terme la ciclació amb T4 DNA ligasa de l'oligonucleòtid **25** fosforilat (**24**) i obtenir el 42mer cíclic $r\langle p(\text{UGC})_3\text{CGUAACCUACGACGAACCUAGAUG}(\text{UGC})_3 \rangle$ **26** vam assajar, en primer lloc, diverses condicions de reacció basades en les emprades en la secció 2.2.2.2., introduint també alguns canvis, com podien ser l'addició de BSA o de PEG per tal d'intentar facilitar la reacció.

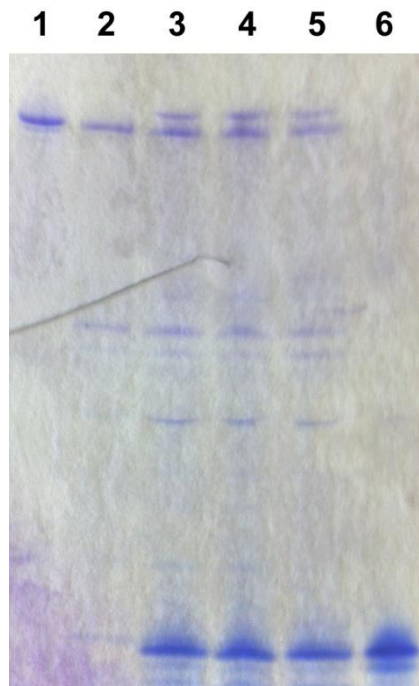


Figura 2.11. Anàlisi per PAGE dels diferents assaigs de ciclació amb T4 DNA ligasa. **1.** Precursor lineal **25** no fosforilat. **2.** Cru de fosforilació del precursor lineal **25**. **3.** Assaig de ciclació sense cap additiu. **4.** Assaig de ciclació amb PEG a l'1%. **5.** Assaig de ciclació amb BSA 50 µg/mL. **6.** Motlle **23**.

A l'hora de portar a cap aquests nous intents de ciclació calia, en primer lloc, procedir a fosforilar el precursor lineal **25**. Un cop finalitzada la reacció, duta a terme amb 0.15 OD₂₆₀ de l'oligonucleòtid, es va desnaturalitzar tèrmicament la quinasa i es va afegir el motlle **23** per a que tingués lloc la hibridació entre aquest i el precursor lineal fosforilat. Es van ajustar les concentracions dels diferents components del medi de ciclació i es van afegir la T4 DNA ligasa i, si s'esqueia, el PEG o la BSA, deixant avançar la reacció durant 8 hores a 30°C. Passat aquest temps les ciclacions, dutes a terme amb 0.07 OD del precursor lineal **25** fosforilat, es van aturar i analitzar per PAGE (*FIGURA 2.11*).

Examinant el PAGE es poden extreure diverses conclusions. D'un banda, no s'aprecia degradació ni del precursor lineal ni del motlle en els diferents assaigs de ciclació. De l'altra, en tots tres assaigs de ciclació s'observa l'aparició d'una nova banda amb una mobilitat electroforètica menor a la del precursor lineal, la qual podria correspondre's al producte cíclic **26**. Cal destacar que no s'observen diferències notables en els assaigs en que s'han introduït additius (carrils 4 i 5) i que el rendiment de ciclació, estimat a partir de la intensitat de les bandes, era al voltant del 50%. Aquests assaigs es van repetir augmentant la concentració de PEG fins al 10%, però no es va observar una millora significativa del rendiment de ciclació.

Tot i que l'aparició d'una nova banda en el PAGE amb una mobilitat electroforètica menor al precursor lineal podia ser indicativa de la formació del producte cíclic desitjat, volíem tenir-ne una prova més concloent. Es per això que vam decidir repetir la reacció a major escala, per tal d'intentar caracteritzar el producte obtingut per EM. Les reaccions de fosforilació i ciclació es van dur a terme a una escala de 6 OD del precursor lineal i, un cop finalitzades, es va purificar el cru de ciclació per PAGE preparatiu. Desafortunadament, degut a la poca diferència de mobilitat electroforètica existent entre el precursor lineal **25** i el nou producte format, i a la menor resolució de la visualització mitjançant UV respecte a l'habitual mitjançant Stains-All, no va ser possible aïllar correctament el nou producte format, el qual es trobava parcialment impurificat amb el precursor lineal fosforilat **24**. Tot i amb això, l'anàlisi per EM-ESI d'aquest producte impur va confirmar la presència de producte cíclic **26** ($M_{\text{calc}}=13460$; $M_{\text{exp}}=13459$), així com del precursor lineal fosforilat **24** ($M_{\text{calc}}=13478$; $M_{\text{exp}}=13478$).

A tall de resum, en aquest apartat ens havíem plantejat obtenir un 42mer cíclic mitjançant ciclació assistida per motlle extern, on els extrems a unir continguessin repeticions de la seqüència (CUG). El fet d'haver sigut capaços de preparar el 42mer cíclic **26** ens permetia encarar amb perspectives d'èxit l'obtenció de l'oligonucleòtid cíclic amb repeticions del triplet (CUG) per ciclació assistida per motlle.

2.3 Ciclació d'oligoribonucleòtids parcialment protegits

Tal com s'ha explicat en la introducció d'aquest Capítol, la metodologia de ciclació amb protecció parcial del precursor lineal juntament amb l'ús de motlle extern, desenvolupada per Kool i col·laboradors, va permetre'ls-hi preparar oligodesoxiribonucleòtids cíclics que contenien el motiu telomèric, altament repetitu.¹⁷⁶ Els grups protectors utilitzats van ser el dmf per tal de protegir la dG i el Dma per fer-ho amb la dA.

En el nostre cas calia dur a terme una cerca, en primer lloc, del grup protector adequat per tal de traslladar aquesta metodologia a l'obtenció d'RNA cíclic amb seqüències repetitives per tal de procedir, posteriorment, a la preparació del propi oligonucleòtid circular. La recerca d'aquest grup protector, així com la seva aplicació en l'obtenció de l'RNA cíclic, s'exposen en aquesta secció.

2.3.1 El grup dmf com a protector de la guanosina

A l'hora de decidir quin grup protector empraríem per tal de protegir parcialment el precursor lineal durant la ciclació vam començar per analitzar les amidines usades per Kool i col·laboradors en les seves aproximacions (*FIGURA 2.12*).

La protecció de la guanosina amb el grup dmf (*FIGURA 2.12.A*) presentava certs avantatges. D'una banda, tal i com van demostrar Kool i col·laboradors, la dmf era estable al tractament amb K_2CO_3 0.05 M en MeOH durant 8 hores a temperatura ambient, emprat per desancorar l'oligonucleòtid de la resina i eliminar la resta de grups protectors del mateix, complint així el requisit d'ortogonalitat necessari per tal de posar en pràctica aquesta metodologia. D'altra banda, el fosforamidit de la guanosina

protegida amb el grup dmf era comercial (tot i que recentment algunes companyies l'hagin descatalogat), evitant-nos d'aquesta manera la síntesi del mateix. Per tant, la dmf va ser el primer grup protector que ens vam plantejar usar com a protector parcial.

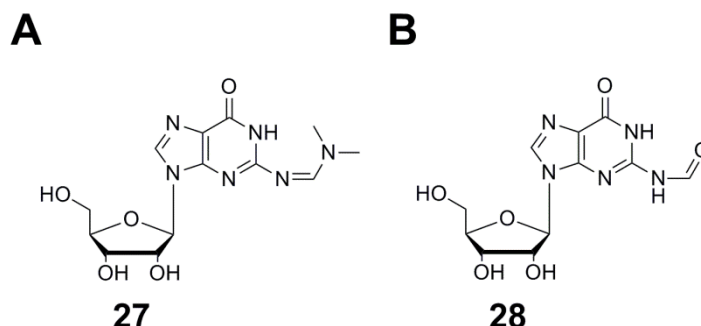


Figura 2.12. Estructura de les diferents bases protegides amb amidines o grups relacionats. **A.** Guanina protegida per la dmf. **B.** Guanina protegida com a formamida, intermedi en la hidròlisi de la dmf.¹⁹⁵

2.3.1.1 Obtenció de l'octadecàmer $r(G^{dmf}CU)_6$ **29**

Abans d'encarar la síntesi del precursor lineal que intentaríem ciclar vam voler comprovar que la dmf era realment ortogonal a la resta de grups protectors utilitzats. Per fer-ho vam sintetitzar l'octadecàmer $r(G^{dmf}CU)_6$ **29** (FIGURA 2.13) i vam comprovar la integritat de totes 6 amidines un cop s'haguessin eliminat la resta dels protectors de l'oligonucleòtid.

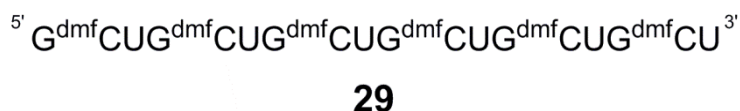


Figura 2.13. 18mer $r(G^{dmf}CU)_6$ **29**.

La síntesi va tenir lloc en el sintetitzador automàtic a escala 1 μ mol emprant derivats fosforamidats comercials dels DMT-ribonucleòsids i un cicle de síntesi estàndard. El desanoratge de l'oligonucleòtid i la desprotecció tant dels fosfats internucleosídics com dels protectors de les citidines es va realitzar amb un tractament amb K_2CO_3 0.05 M en MeOH durant 8 hores a temperatura ambient, mentre que l'eliminació del grup TBDMS es va dur a terme usant TEA·3HF.

El cru de desprotecció va ser analitzat per EM-MALDI-TOF revelant-se, per a la nostra sorpresa, que el pic majoritari ($m/z=5788$) no es corresponia a l'octadecàmer **29**, el qual tenia un $[M-H^+]^-_{\text{calc}}=6004$. El fet que la massa observada fos inferior a la esperada podia significar que hi havia hagut una pèrdua d'alguns grups dmf; de fet, el valor observat es corresponia força bé amb 5784, la $[M-H^+]^-_{\text{calc}}$ de l'octadecàmer $r(\text{GCU})_6$ on només 2 dels 6 grups dmf s'haguessin mantingut en la molècula (TAULA 2.2). Duent a terme una recerca bibliogràfica,¹⁹⁵ però, vam descobrir que la hidròlisi de la dmf sovint tenia lloc passant per diversos intermedis, entre ells un tipus formamida (FIGURA 2.12.B). Tenint en compte aquesta article vam observar que la massa de l'octadecàmer $r(\text{GCU})_6$ on dos dels grups dmf s'haguessin hidrolitzat completament, mentre els 4 restants es trobessin en forma d'aquesta formamida ($[M-H^+]^-_{\text{calc}}=5786$), coincidia també força bé amb el pic observat en l'espectre de masses (TAULA 2.2). Calia, per tant, aclarir què havia succeït.

Oligonucleòtid	$[M-H^+]^-_{\text{calc}}$
$r\text{G}^{\text{dmf}}_6\text{C}_6\text{U}_6$	6004
$r\text{G}^{\text{dmf}}_2\text{G}_4\text{C}_6\text{U}_6$	5784
$r\text{G}^{\text{for}}_4\text{G}_2\text{C}_6\text{U}_6$	5786

Taula 2.2. Taula resum dels diferents oligonucleòtids a que es pot correspondre el senyal $m/z=5788$. G^{dmf} representa la guanosina protegida amb el grup dmf (**27**), mentre G^{for} representa la guanosina protegida amb un grup formamida (**28**).

Per tal de comprovar-ho vam decidir digerir enzimàticament el cru de desprotecció per així intentar constatar la integritat de la G^{dmf} . Els resultats van ser analitzats qualitativament per HPLC i comparats amb patrons dels diferents nucleòsids (FIGURA 2.14). La guanosina protegida amb el grup dmf **27** (FIGURA 2.12.A) va ser sintetitzada seguint un procediment descrit.¹⁹⁶

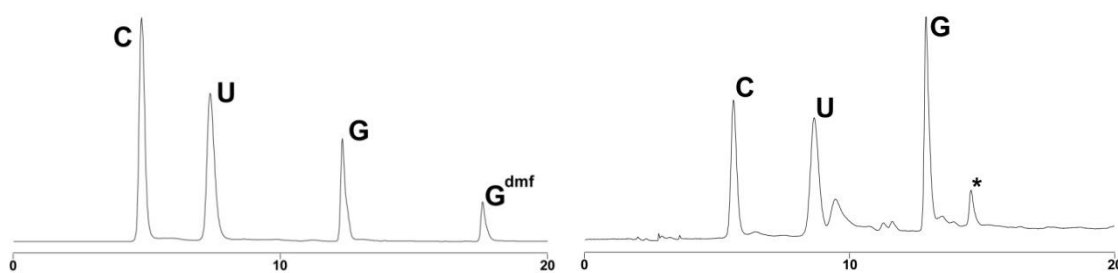


Figura 2.14. Comparació entre els cromatogrames resultants de la digestió enzimàtica de l'octadecàmer $r(\text{G}^{\text{dmf}}\text{CU})_6$ i els patrons dels nucleòsids. **Esquerra:** Patrons dels nucleòsids C, U, G i G^{dmf} . **Dreta:** Digestió enzimàtica de $r(\text{G}^{\text{dmf}}\text{CU})_6$ **29**.

Com es pot apreciar comparant ambdós cromatogrames, la digestió enzimàtica del octadecàmer **29** no mostrava la presència de G^{dmf} . En el seu lloc s'observaven, a més dels pics corresponents a la C i la U, un gran pic que es corresponia a la G i altres pics menors, el que indicava que la G^{dmf} s'havia degradat completament. La presència del derivat formamida **28**, que es correspon al pic assenyalat amb un asterisc en el cromatograma de la dreta, va ser confirmada per EM-ESI, essent plausible que els altres petits pics observats es corresponguessin a algun dels intermedis a través dels quals s'hidrolitza la G^{dmf} .

En aquest punt sabíem que el grup dmf de la guanosina era làbil a algun dels reactius usats durant la síntesi o la desprotecció de l'oligonucleòtid. Calia, per tant, determinar a quin d'ells i intentar trobar-hi una alternativa, ja que la pèrdua dels grups protectors permanents del precursor lineal impossibilitava dur a terme l'estratègia de ciclació assistida per motlle amb protecció parcial de l'oligonucleòtid.

2.3.1.2 Estudi d'estabilitat de G^{dmf}

La hidròlisi del grup dmf de la guanosina podia haver tingut lloc durant la síntesi de l'oligonucleòtid o bé en el desancoratge i desprotecció del mateix. Tenint en compte que la protecció de la guanosina amb dmf s'usa freqüentment en la síntesi en fase sòlida d'oligonucleòtids, era poc probable que la hidròlisi hagués succeït en aquest punt. Per tant, vam decidir avaluar la labilitat del nucleòsid de G^{dmf} **27** davant dels reactius usats en el desancoratge de l'oligonucleòtid i en l'eliminació dels seus protectors.

Els assaigs **1** i **2** corresponen a les condicions de desancoratge i desprotecció estàndard assajades en primer lloc. D'una banda, es va tractar una mostra del nucleòsid **27** amb K_2CO_3 0.05 M en MeOH a temperatura ambient durant 8 hores. D'altra, es va dissoldre amb DMSO una altra mostra del nucleòsid i s'hi va afegir TEA·3HF, deixant-ho reaccionar durant 2.5 hores a 65°C. Els crús de reacció van ser analitzats per HPLC en fase inversa revelant-se que, mentre el grup dmf es mantenia inalterat en el cas del tractament amb K_2CO_3 , el nucleòsid sofria una degradació superior al 30% si es feia reaccionar amb la mescla desililant de TEA·3HF (*TAULA 2.3*). Calia, doncs, trobar unes condicions alternatives d'eliminació del grup TBDMS que deixessin el grup protector de la guanosina intacte.

Es va fer una extensa recerca bibliogràfica per tal de trobar altres condicions descrites d'eliminació dels èters de silil usats com a protectors de l'hidroxil 2' en els oligonucleòtids.¹⁹⁷ Aquestes diferents mescles, que usaven el HF o el TBAF com a font de fluorurs, van ser assajades i els crús analitzats per HPLC en fase inversa, calculant-se la degradació de la G^{dmf} a partir de la integració relativa dels diferents pics del cromatograma. Els resultats es mostren en la TAULA 2.3 (assaigs 3 a 7).

Assaig	Reactiu	Temperatura	Temps	Degradació
1	K ₂ CO ₃ 0.05 M en MeOH	t.a.	8 h	0%
2	DMSO/TEA·3HF	65°C	2.5 h	32%
3 ^{197a}	TBAF 2 mM en py/H ₂ O (1.5:1)	t.a.	2 h	No analitzable
4 ^{197b}	DMSO/TEA·3HF	t.a.	6 h	Quantitativa
5 ^{197c}	TBAF 1 M en THF/AcOH 1 M	t.a.	6 h	22%
6 ^{197d}	DMSO/TBAF 1 M en THF	t.a.	6 h	Quantitativa
7 ^{197e}	HF 10%/TMED 20 % en ACN	t.a.	6 h	49%

Taula 2.3. Taula resum dels diferents assaigs d'estabilitat duts a terme amb el nucleòsid 27.

En el cas de la prova 3,^{197a} no va ser possible obtenir pics integrables en l'anàlisi per HPLC degut a que quedaven ocults per la piridina present en la mescla. Pel que fa als resultats obtinguts en els assaigs 4 a 7,^{197b-e} en tots ells es va observar la degradació de la formamidina, arribant en alguns casos a ser quantitativa.

Les dades obtingudes en els diferents assaigs van deixar clar que la dmf era un grup protector làbil a la presència d'ions fluorur en el medi. Això suposava un greu entrebanc, ja que el fluorur és necessari per tal de trencar l'enllaç Si-O, format entre l'hidroxil 2' dels oligonucleòtids i el grup protector TBDMS. Calia, per tant, variar l'estratègia de protecció.

2.3.2 A la recerca d'un nou esquema de protecció

La incompatibilitat entre la protecció permanent del precursor lineal amb la dimetilformamidina i l'ús de fluorurs per tal d'alliberar l'hidroxil 2' de l'oligonucleòtid feia necessària la modificació de l'estratègia de protecció. Això es podia dur a terme de dues maneres diferents: canviant el grup protector de l'hidroxil 2' de l'oligonucleòtid o bé elegint-n'hi un de nou per la guanosina.

Pel que fa a la protecció de l'hidroxil 2', en els darrers 30 anys s'ha portat a terme un extens treball per tal de desenvolupar nous grups protectors que substituïssin el TBDMS, el qual és molt voluminós i presenta rendiments d'acoblament relativament baixos. Aquest treball ha desembocat en el desenvolupament de desenes de nous grups protectors (alguns dels més destacats mostrats en la *FIGURA 2.15*) que s'han usat amb èxit en la síntesi d'oligoribonucleòtids en fase sòlida,¹⁹⁸ els quals poden classificar-se segons les condicions emprades per tal d'eliminar-los. En primer lloc ens trobem amb grups làbils al fluorur, com és el cas dels èters de silil TBDMS¹⁹⁹ o TOM^{142b} i d'altres estructuralment relacionats amb aquests, com és ara el CEE,²⁰⁰ el CEM²⁰¹ o el TEM,²⁰² làbils tots ells als fluorurs. En segon lloc hi ha els protectors fotolàbils Nbn²⁰³ i Nbom,²⁰⁴ sensibles a la llum UV, mentre que en tercer lloc trobem els grups que es desancoren per reducció d'un pont dissulfur, com és ara el DTM.²⁰⁵ Un quart grup el formen tot un seguit de grups protectors làbils a les bases com poden ser l'ALE,²⁰⁶ el CN,²⁰⁷ el TC²⁰⁸ o bé l'Npes.²⁰⁹ Per la seva banda, diferents acetals sensibles a l'àcid com l'ACE,²¹⁰ l'Mthp²¹¹ o l'MDMP²¹² constitueixen un cinquè grup. En darrer terme, trobem el 4-MABOM,²¹³ el qual pot ser desancorat en condicions lleugerament àcides (pH=4).

Dur a terme un canvi en l'estratègia de protecció de l'hidroxil 2' resultava problemàtic. D'una banda, les condicions d'eliminació de molts dels grups protectors presentats, com poden ser els medis bàsics nucleòfils o bé l'ús de fluorurs, no són ortogonals amb el grup dmf o bé no són compatibles amb les condicions estàndard de síntesi, com en el cas dels grups làbils a àcids. D'altra banda, cap dels derivats fosforamidit dels ribonucleòsids que incorporen els diversos protectors presentats són comercials, exceptuant els derivatitzats amb els grup TBDMS i TOM i, molt recentment, amb el grup TC, el que suposava un esforç de síntesi molt gran per tal de preparar-los. Era més lògic, per tant, mantenir un èter de silil en l'hidroxil 2' i buscar una alternativa a la protecció de la base.

En la síntesi estàndard d'RNA s'utilitzen 3 esquemes de protecció, ortogonals tots ells entre sí. D'una banda, l'hidroxil 5' de l'oligonucleòtid es troba protegit amb el grup protector temporal DMT, el qual és molt làbil als àcids. D'altra banda, tant els fosfats internucleosídics com les nucleobases es desprotegeixen en condicions bàsiques nucleofíliques. Finalment, l'hidroxil 2' de les riboses es bloqueja com a èter de silil, làbil als fluorurs. El grup protector que substituís a la dmf havia de ser ortogonal a tots

3 esquemes. En la bibliografia vam localitzar dos tipus de grups protectors que complien aquestes característiques: els protectors fotolàbils i els grups al·lílics.

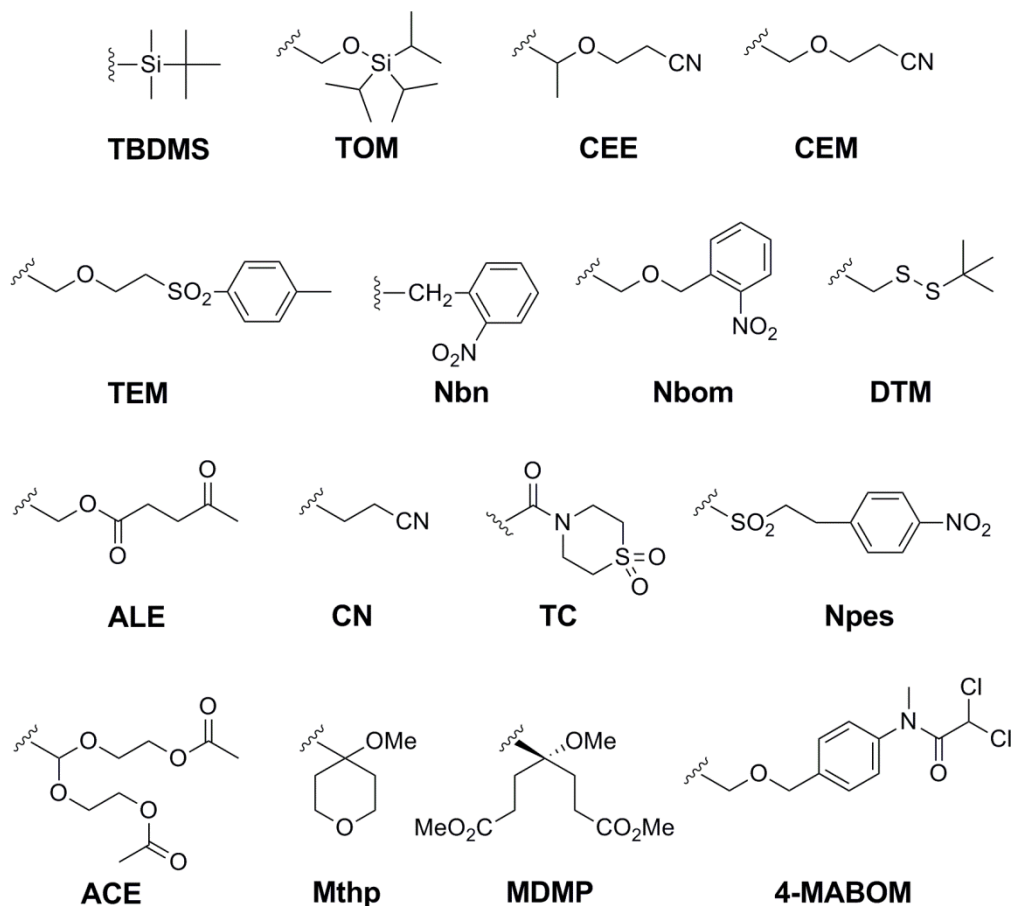


Figura 2.15. Diferents grups protectors de l'hidroxil 2' desenvolupats per a la síntesi d'oligoribonucleòtids. *ACE*, bis(acetoxietoxi)metil èter; *ALE*, acetal levulinil ester; *CEE*, 1-(2-cianoetoxi)etil ; *CEM*, 2-cianoetoximetil; *CN*, 2-cianoetil; *DTM*, ^tbutilditiometil; *4-MABOM*, 4-(N-dicloroacetil-N-metilamino)benziloxi-metil; *MDMP*, 3-metoxi-1,5-dicarbometoxipentan-3-il; *Mthp*, tetrahidro-4-metoxi-2H-piran-2-il; *Nbn*, 2-nitrobenzil; *Nbm*, [(2-nitrobenzil)oxi]metil; *Npes*, 2-(4-nitrofenil)etilsulfonil; *TBDMS*, ^tbutildimetilsilil; *TC*, (tiomorfolino)carboxioat; *TEM*, 2-(4-tolilsulfonil)etoxi metil; *TOM*, [(triisopropilsilil)oxi]metil.

En la bibliografia es troben descrits diferents protectors fotolàbils.²¹⁴ Tots ells són de tipus nitrobenziloxi, els quals s'eliminen al ser irradiats amb llum UV. Aquests tipus de protectors, però, presentaven algunes desavantatges. D'una banda, la seva estabilitat enfront reactius bàsics nucleòfils no estava prou avaluada. De l'altra, la irradiació amb llum UV per tal de dur a terme la desprotecció final de l'oligonucleòtid podia donar lloc a fotodímers, així com a la formació d'aductes.²¹⁴ Tenint en compte aquests motius es va decidir descartar aquesta estratègia de protecció.

Per la seva banda, la protecció al·líllica s'ha usat amb èxit per preparar oligonucleòtids tant de DNA²¹⁵ com d'RNA.²¹⁶ Aquesta estratègia emprà els grups al·lil i al·liloxicarbonil, els quals són molt làbils al tractament amb Pd⁰, com a protectors de les nucleobases. A més a més, en la bibliografia es troba descrita l'estabilitat de l'al·liloxicarbonil enfront el tractament tant amb fluorurs²¹⁷ com amb NH₃²¹⁸ pel que, tot sumat, l'estratègia al·líllica semblava la millor alternativa a la dmf. El nucleòsid que protegíem en aquest cas també seria la guanosina, tant en l'O⁶ amb el grup al·lil (All) com en l'amino exocíclic amb el grup al·liloxicarbonil (Alloc). La síntesi tant del fosforamidit (**29**) com del nucleòsid (G^{All-Alloc}, **30**) (FIGURA 2.16) es troben descrites²¹⁹.

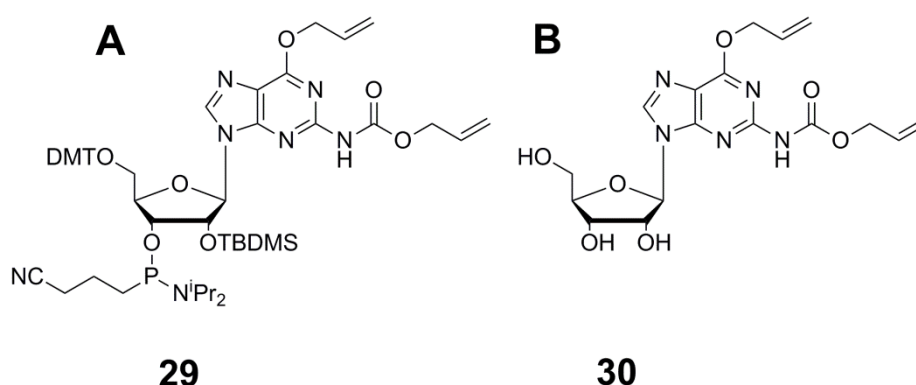


Figura 2.16. Guanosina protegida amb el grup All en l'O⁶ i amb el grup Alloc en l'amino exocíclic. **A.** Derivat fosforamidit. **B.** Nucleòsid.

2.3.2.1 Obtenció de la G^{All-Alloc} **30** i avaluació de la seva estabilitat química

En primer lloc vam voler avaluar la labilitat tant de l'All com de l'Alloc als diferents medis que usem durant el desancoratge i desprotecció dels oligonucleòtids, per molt que la seva estabilitat, com ja hem dit, es trobés documentada. Aquesta avaluació preteníem dur-la a terme emprant el nucleòsid **30**.

Per tal de poder realitzar aquest estudi vam preparar el nucleòsid protegit. Aquesta síntesi es va portar a cap seguint el protocol descrit per Hyodo i Hayakawa,²¹⁹ el qual es mostra en la FIGURA 2.17.

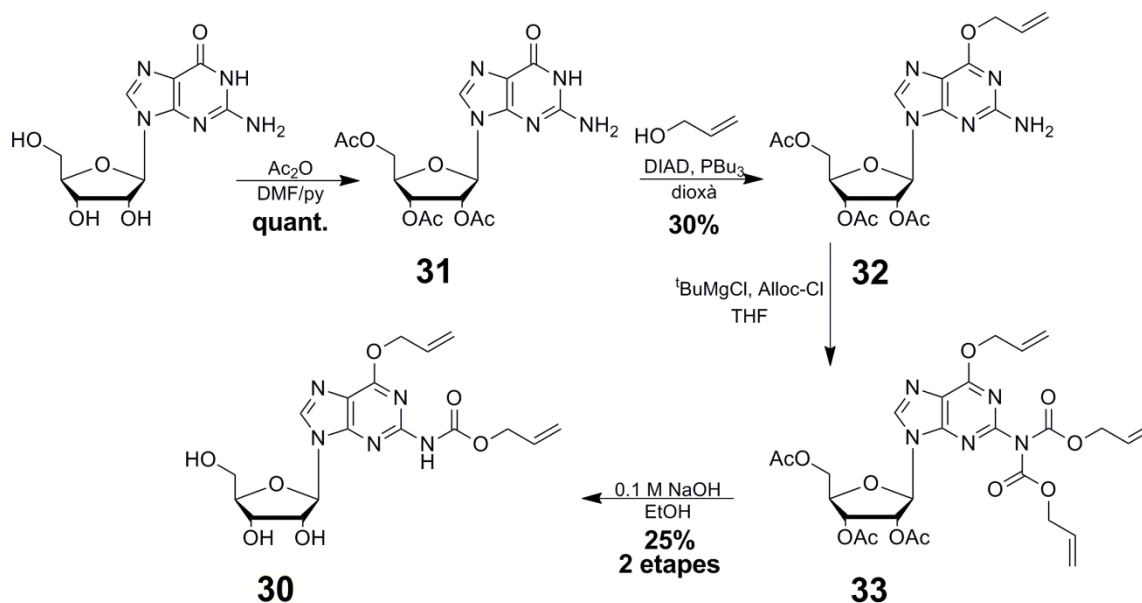


Figura 2.17. Esquema sintètic seguit en l'obtenció del derivat de la guanosina **30**.

La guanosina triacetilada **31** es va obtenir de forma quantitativa per acetilació de la guanosina comercial i posterior precipitació amb isopropanol. La protecció de l'O⁶ de la base amb alcohol al·lílic per mitjà d'una reacció de Mitsunobu utilitzant DEAD i PPh₃ va resultar en rendiments excessivament baixos (de l'ordre del 10%), degut principalment a la dificultat d'eliminació de l'òxid de PPh₃ del cru de reacció. La substitució d'aquesta fosfina per la PBU₃ i l'ús d'un azadicarboxilat menys tòxic com pot ser el DIAD va permetre preparar la guanosina protegida **32** amb un rendiment del 30%. Tot i tractar-se de rendiments encara massa baixos, i essent conscients que caldria optimitzar-los en el futur, vam dur a terme la següent etapa sintètica, consistent en la protecció de l'amina exocíclica de la guanosina amb cloroformiat d'al·lílic per obtenir la guanosina **33**. L'eliminació dels acetils que protegien els hidroxils de la ribosa i del segon protector del grup amino va tenir lloc per hidròlisi bàsica del nucleòsid **33**, obtenint així la guanosina **30** (rendiment de les dues etapes del 25%), del qual solament se'n va purificar una petita quantitat.

Un cop sintetitzada la guanosina **30** es va estudiar la seva estabilitat enfront les diferents bases nucleòfiles usades per a desancorar i desprotegir l'oligonucleòtid (NH₃, AMA i K₂CO₃ en MeOH), així com els reactius usats per desililar (TBAF i TEA·3HF). Es van sotmetre varies al·lotes del nucleòsid **30** a aquests diferents tractaments, analitzant els crus per HPLC-MS (TAULA 2.4).

Assaig	Reactiu	Temperatura	Temps	Degradació
1	NH ₃	t.a.	6 h	90%
2	MeNH ₂ /NH ₃ (AMA)	t.a.	20 min	57%
3	MeNH ₂ /NH ₃ (AMA)	55°C	10 min	69%
4	K ₂ CO ₃ 0.05 M en MeOH	t.a.	4 h	48%
5	DMSO/TEA·3HF	55°C	2.5 h	0%
6	TBAF 1 M en THF	t.a.	16 h	0%

Taula 2.4. Taula resum dels diferents assaigs d'estabilitat duts a terme amb la guanosina **30**.

Com es pot apreciar, les dues fonts de fluorurs provades no van causar cap tipus de modificació en la guanosina protegida **30**, que va romandre totalment inalterada, a diferència del que succeïa quan el grup protector utilitzat era la dmf (assaigs **5** i **6**). Desgraciadament, els resultats dels diversos tractaments realitzats amb bases nucleofíliques van ser força diferents, ja que en tots ells es va observar una degradació superior al 50%.

El fet d'haver dut a terme l'anàlisi per HPLC-MS va permetre caracteritzar els diferents productes de degradació formats en els assaigs **1-4**. En el cas de l'assaig **1** es formava un únic producte, el qual es corresponia a la substitució d'un dels grups al·liloxi del nucleòsid **30** per amoníac. Aquest nou nucleòsid podria correspondre's al derivat de l'aminopurina **34** (FIGURA 2.18.A), si el grup substituït era l'AlI, o a la guanosina amb l'amino exocíclic modificat com a urea **35** (FIGURA 2.18.B), si la substitució havia tingut lloc en el grup Alloc. Resultats anàlegs es van obtenir en el cas de l'assaig **4**, essent però el metanol la molècula que havia substituït un grup al·liloxi de la guanosina **30**. En el cas dels assaigs **2** i **3** els crús van ser més complexos ja que, si bé el producte majoritàriament format era el corresponent a la substitució d'un al·liloxi per metilamina, hi havia també productes secundaris com el resultat del seu desplaçament per amoníac o, fins i tot, el generat per una doble substitució dels al·liloxis per dues molècules de metilamina.

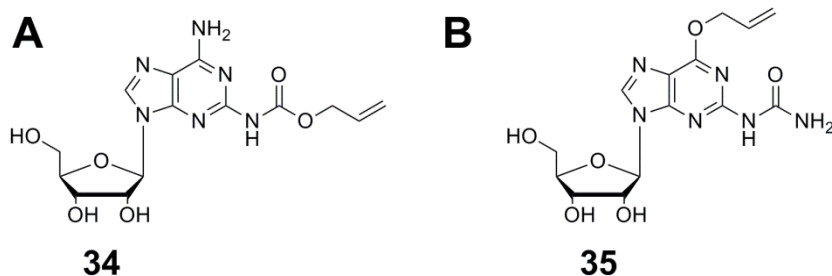


Figura 2.18. Possible productes formats en tractar el nucleòsid **30** amb NH₃. **A.** Derivat tipus aminopurina **34** format per la substitució de l'al·liloxi del grup All per NH₃. **B.** Derivat tipus urea **35** format per la substitució de l'al·liloxi del grup Alloc per NH₃.

Aquests decepcionants resultats, però, també havien revelat que, si bé un dels dos al·lils presents en la guanosina era fàcilment substituït per les bases nucleòfiles, l'altre semblava força estable. Desgraciadament, no sabíem si el grup al·liloxi làbil a aquestes condicions es corresponia al de l'All o bé al de l'Alloc. El fet que es trobés descrita l'estabilitat de l'Alloc enfront NH₃ a 50°C durant 12 h²¹⁸ (per bé que en aquest cas protegia una amina alifàtica i en el nostre es tracta d'una aromàtica) ens feia pensar que el làbil era el grup All. De tota manera, vam decidir sintetitzar dues noves guanosines protegides, una tant sols amb el grup Alloc (G^{Alloc}, **36**) i l'altra només amb l'All (G^{All}, **37**) (FIGURA 2.19), per tal de repetir els assaigs d'estabilitat i determinar així quin dels dos al·lils era el làbil.

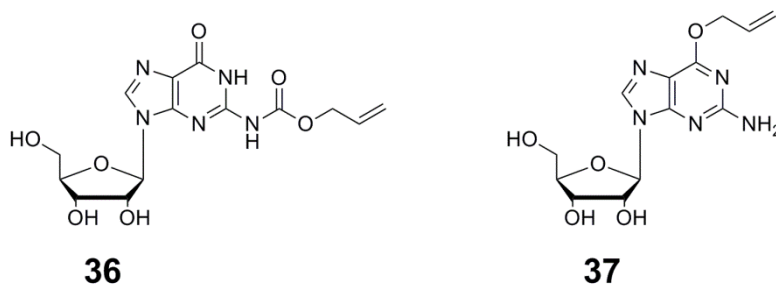


Figura 2.19. Guanosina *N*-Alloc (**36**) i guanosina *O*⁶-All (**37**) usades en els estudis de labilitat del grup al·lil.

2.3.2.2 Obtenció de G^{Alloc} 36 i G^{All} 37 i avaluació de la seva estabilitat química

La preparació de la guanosina 36 es va fer per reacció de la guanosina acetilada 31, prèviament obtinguda, amb cloroformat d'al·lil,^{215a} seguida de la seva hidròlisi bàsica (FIGURA 2.20.SUPERIOR). Per la seva banda, la guanosina 37 es va obtenir de forma quantitativa per hidròlisi bàsica del nucleòsid 32 (FIGURA 2.20.INFERIOR).

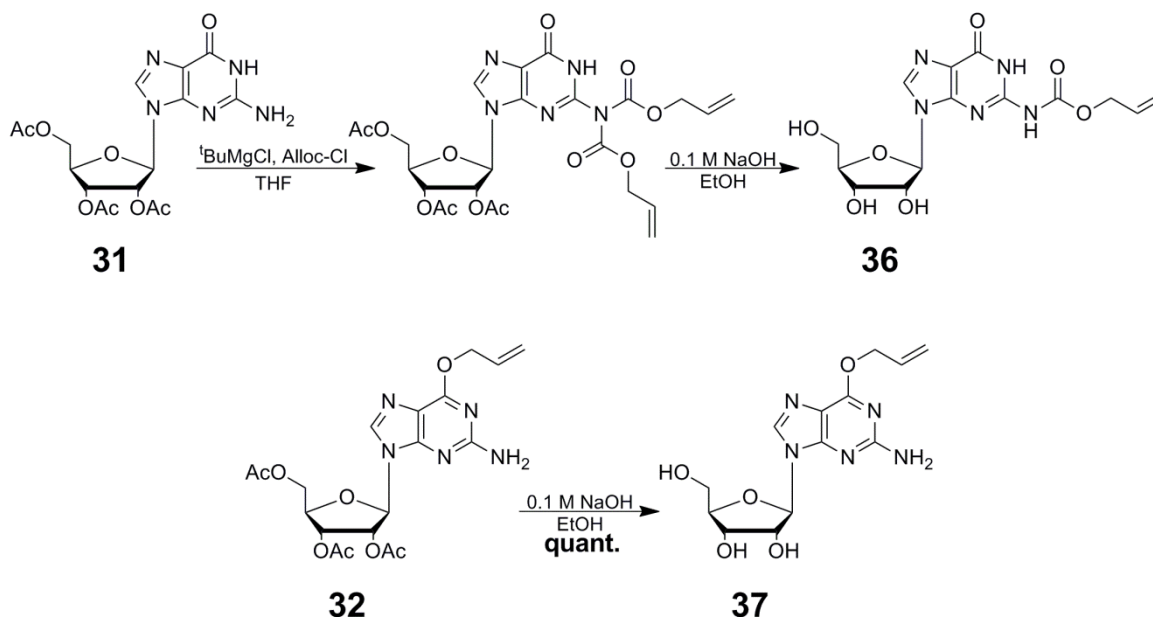


Figura 2.20. Superior: Esquema sintètic seguit per obtenir la N-Alloc guanosina protegida 36. **Inferior:** Esquema sintètic seguit per obtenir la guanosina O-All protegida 37.

Un cop sintetitzats tots dos nucleòsids es va avaluar la seva estabilitat enfront les bases nucleòfiles. Es van sotmetre varies al·lotes de les guanosines 36 i 37 a diferents tractaments amb NH_3 i amb AMA a diferents temps de reacció, analitzant els resultats per HPLC-MS (TAULA 2.5).

Assaig	Nucleòsid	Protector	Reactiu	Temperatura	Temps	Degradació
1	36	Alloc	NH_3	t.a.	1 h	12%
2	36	Alloc	NH_3	t.a.	6 h	56%
3	36	Alloc	NH_3	t.a.	24 h	96%
4	36	Alloc	AMA	55°C	10 min	11%
5	37	All	NH_3	t.a.	1 h	0%
6	37	All	NH_3	t.a.	6 h	0%
7	37	All	AMA	55°C	10 min	0%
8	37	All	AMA	55°C	1 h	8%

Taula 2.5. Taula resum dels diferents assaigs d'estabilitat duts a terme amb les guanosines 36 i 37.

Com es pot apreciar, el grup Alloc de **36** va demostrar ser força làbil al tractament tant amb NH_3 com amb AMA (assaigs **1-4**). Es pot observar que la guanosina **36** s'havia degradat en un 56% al cap de 6 hores i que aquesta degradació era gairebé quantitativa passades 24 hores. En el cas de la prova realitzada amb AMA la degradació arribava a l'11% després de tan sols 10 minuts de tractament (assaig **4**). Per contra, com es pot apreciar en els assaigs **5-7**, la guanosina protegida amb el grup All **37** es va mostrar totalment estable després de 6 hores en NH_3 a temperatura ambient, així com enfront del tractament amb AMA a 55°C durant 10 minuts. De fet, per tal de poder observar una lleu degradació del nucleòsid **37** va ser necessari augmentar el temps de reacció en AMA a 55°C fins als 60 min (assaig **8**).

A la llum dels resultats obtinguts en aquests assaigs, podíem concloure que l'al·lil del grup All és estable a les diferents bases nucleòfiles usades habitualment en el desancoratge i desprotecció dels oligonucleòtids, mentre que el grup Alloc no ho és. Per tant, el derivat format en tractar el nucleòsid **30** amb NH_3 era la *N*-carbamoïlguanosina representada **35** en la *FIGURA 2.18.B*, tot i que la formació d'aquest producte era inesperada. En la bibliografia es troba descrita una reacció similar a la observada per nosaltres,²²⁰ on s'empra la 2-fenoxicarbonildesoxiguanosina com a intermedi en l'obtenció del seu 2-carbamoïl derivat per mitjà del desplaçament del fenoxi, un bon grup sortint, per l'amoníac. En el nostre cas creïem que la reacció era anàloga, tot i que l'al·liloxi present en el grup Alloc sigui pitjor grup sortint que el fenoxi.

Amb tot plegat, el grup All semblava una bona alternativa al grup dmf per tal de dur a terme la protecció permanent de l'oligonucleòtid en la ciclació assistida per motlle amb protecció parcial del precursor lineal. Aquest grup és ortogonal a la resta de grups protectors usats en la síntesi d'oligonucleòtids i a les condicions de desancoratge i desprotecció del mateix. A més a més, el fet que aquest grup canviï el caràcter donador-acceptor de dues de les tres posicions de la guanosina per on té lloc l'aparellament amb la citosina (*FIGURA 2.21*), augmenta les possibilitats de que el protector impedisís la hibridació amb el motlle. Per aquests motius, vam decidir usar el grup All com a protector de la guanosina en l'estratègia de ciclació assistida per motlle amb protecció parcial del precursor lineal.

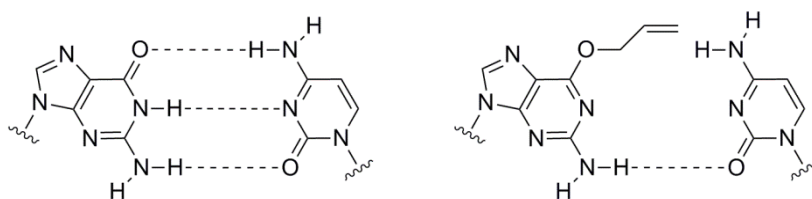


Figura 2.21. Modificació de la hibridació entre la guanosina i la citosina causada per la protecció de O^6 de la guanosina amb el grup All. A l'esquerra s'observen els tres ponts d'hidrogen (representats per línees puntejades) que s'estableixen normalment entre la guanosina i la citosina. A la dreta s'observa com dos d'aquests enllaços no poden formar-se per culpa del grup All.

2.3.3 Obtenció del fosforamidit de G^{All-Ac}

Per tal de poder usar el grup All de la guanosina com a protector permanent calia incorporar el nucleòsid protegit a la cadena oligonucleotídica. El derivat fosforamidit de la guanosina protegida amb l'All, desafortunadament, no és comercial, pel que calia dissenyar-lo i sintetitzar-lo.

Per dur a terme la síntesi de l'oligonucleòtid volíem emprar la metodologia estàndard, pel que el disseny del fosforamidit havia d'encaixar en aquesta aproximació. Això implicava l'ús del grup làbil a àcids DMT per tal de protegir l'hidroxil 5', així com la funció *N,N*-diisopropil-*O*-cianoetil-fosforamidit en l'hidroxil 3', a través del qual tindria lloc la incorporació del nucleòsid a la cadena en creixement. D'altra banda, l'hidroxil 2' devia trobar-se protegit amb un èter de silil, mentre que el grup protector de l'amino exocíclic havia de ser làbil a les bases nucleòfiles.

Pel que fa a la protecció de l'hidroxil 2', vam optar per no usar el grup TBDMS, ja que aquest pot migrar de l'hidroxil 2' al 3' durant la preparació del nucleòsid protegit. En el seu lloc vam preferir emprar el grup TOM, el qual no pot migrar i, a més, presenta un menor impediment estèric, el que fa que els rendiments d'acoblament dels fosforamidits protegits amb el grup TOM siguin habitualment majors que els obtinguts quan s'utilitza el TBDMS. Per la seva banda, vam optar per protegir l'amino exocíclic amb el grup acetil, que és el grup protector emprat en els fosforamidits comercial de la guanosina. Per tant, el fosforamidit de la G^{All} que preteníem sintetitzar és el que es mostra en la *FIGURA 2.22 (38)*.

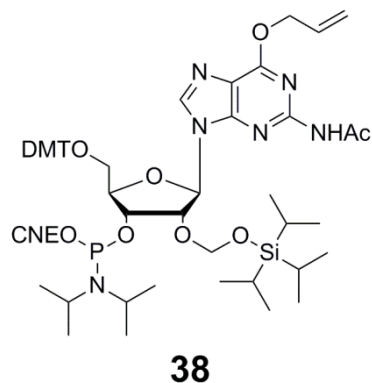


Figura 2.22. Fosforamidit **38** de la G^{All} dissenyat i sintetitzat en aquesta tesi.

L'anàlisi retrosintètic del fosforamidit **38** es mostra en la *FIGURA 2.23*. Aquest s'obté per fosfilitació del nucleòsid **39**, obtingut a partir de la introducció dels diferents grups protectors necessaris (Ac, All, DMT i TOM, incorporats en aquest ordre) sobre la guanosina comercial.

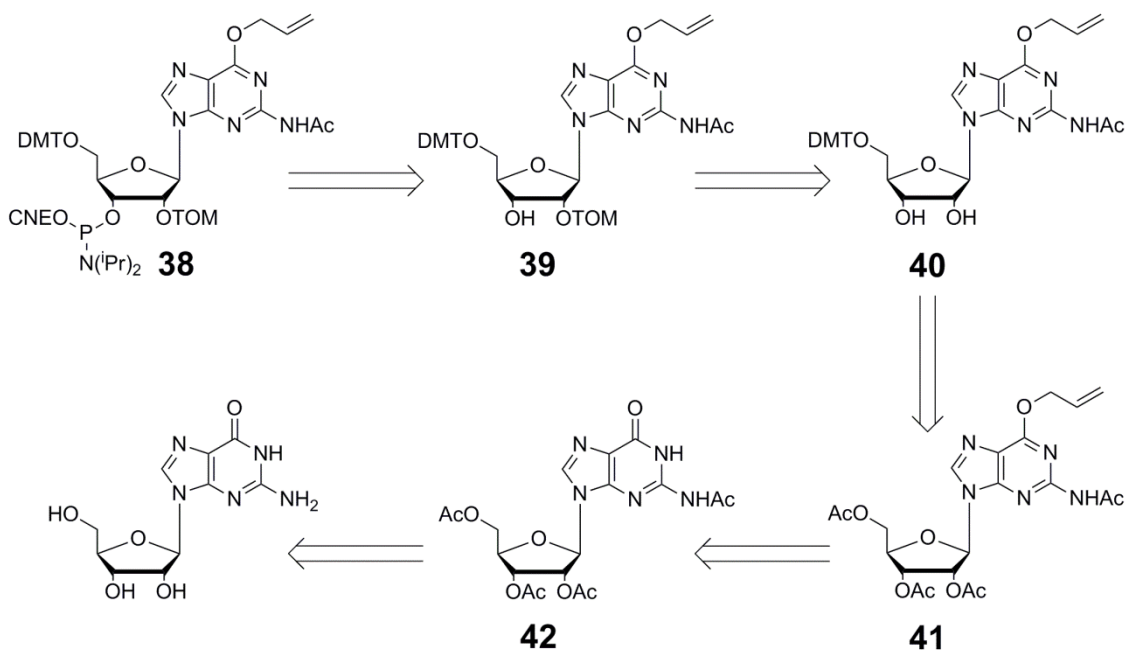


Figura 2.23. Anàlisi retrosintètic de la preparació del fosforamidit de G^{All} **38**.

Per tal de preparar el fosforamidit **38** ens vam basar tant en el procediment descrit per Hayakawa pel que respecta a la incorporació del grup All²¹⁹ com en el descrit per Pitsch per la introducció del protector TOM.^{142b,221}

En primer lloc vam procedir a obtenir la guanosina **42** per acetilació de la guanosina comercial (FIGURA 2.24). La reacció de tetracetilació, fàcilment escalable, es va dur a terme escalfant a reflux la suspensió de guanosina en Ac₂O, DMF i piridina, obtenint-se el producte amb un rendiment del 89%. Escalfar la mescla a reflux és necessari per tal de poder protegir la base nitrogenada, ja que l'ús de temperatures menors comporten l'obtenció de la guanosina triacetilada **31**, tal i com s'ha descrit en l'apartat 2.3.2.1.

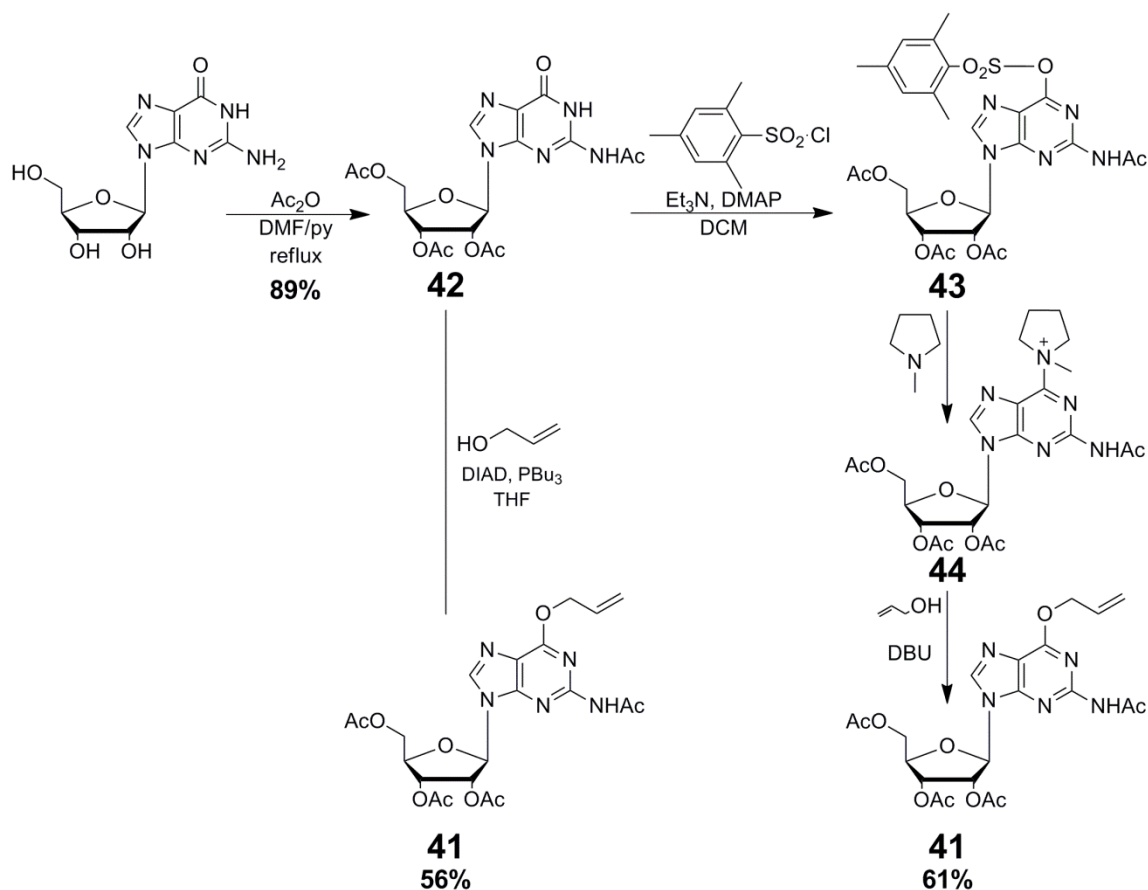


Figura 2.24. Esquema sintètic de l'obtenció de la guanosina tetraacetilada **42**, així com de la seva protecció amb el grup All, ja sigui via una reacció de Mitsunobu (esquerra) o per desplaçament d'un mesitilensulfonat (dreta).

En segon lloc calia incorporar el grup All a la posició 6 de la guanosina. Per tal de dur-ho a terme vam usar una reacció de Mitsunobu, seguint el protocol descrit per Hayakawa²¹⁹ i de forma anàloga a la síntesi de **32** en l'apartat 2.3.2.1, obtenint-se rendiments força baixos. L'optimització del dissolvent, temps de reacció, temperatura i equivalents dels reactius ens va permetre obtenir **41** amb un 56% de rendiment (FIGURA 2.24.ESQUERRA), el que consideràvem encara insuficient tot i que en la bibliografia es trobin descrits rendiments similars per la reacció de Mitsunobu sobre guanosines protegides.²²² El canvi d'ordre en l'addició dels reactius, formant en primer lloc la betaïna, que pot influir en el rendiment de la reacció²²³, no va comportar cap millora.

No sentint-nos satisfets amb els rendiments obtinguts en la incorporació de l'alcohol al·lílic mitjançant una reacció de Mitsunobu, vam buscar una metodologia alternativa basada en una activació *in situ* en dues etapes de la guanosina (FIGURA 2.24.DRETA).²²⁴ El mesitilensulfonil derivat de **43** va ser ràpidament i quantitativa desplaçat per la *N*-metilpirrolidina, donant lloc al metilpirrolidini derivat **44**. L'atac nucleòfil de l'alcohol al·lílic en presència de DBU sobre aquest compost ens va portar a obtenir, un cop purificat, la guanosina protegida **41** amb un rendiment del 61% (tot i que el producte no era totalment pur), lleugerament superior a l'obtingut mitjançant la reacció de Mitsunobu. Tot i això, vam haver d'abandonar aquest mètode, degut a la formació durant el procediment de la pirrolidino guanosina **45** que no podíem separar. La formació d'aquest producte podia tenir lloc segons el mecanisme mostrat en la FIGURA 2.25, pel qual l'alcòxid present en el medi pogués provocar la desmetilació del substrat. La *N*⁶-pirrolidina no carregada positivament ja no és un bon grup sortint i no és desplaçada per l'alcòxid al·lílic, permetent que el derivat **45** s'acumuli. Una desmetilació anàloga s'ha trobat descrita en la bibliografia en el cas de la reacció de iodurs de metilfenilpirrolidini amb metòxid sòdic.²²⁵

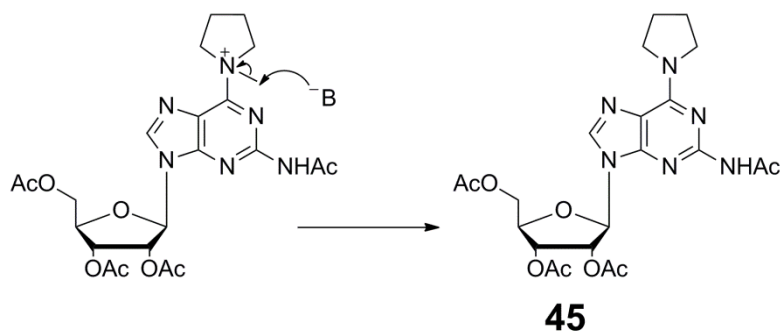


Figura 2.25. Possible mecanisme de desmetilació de la *N*-metilpirrolidini guanosina **45**.

El següent pas va consistir en l'eliminació selectiva dels acetils que protegien els hidroxils del sucre enfront del que protegia la base nitrogenada basant-nos en la major llibertat dels esters respecte de les amides. Per tal de dur a terme aquesta hidròlisi vam tractar el nucleòsid **41** amb NaOH 0.1 M en EtOH durant 30 minuts a temperatura ambient, tractament anàleg a l'usat per obtenir les guanosines **30** i **36** per hidròlisi dels seus precursors acetilats. Aquest tractament, però, va resultar ser massa agressiu, atès que conduïa també a l'eliminació total dels grups acetils en un 10% del nucleòsid. Disminuint el temps de reacció a tant sols 5 minuts vam poder reduir aquesta desprotecció indesitjada per sota de l'1%, obtenint així la guanosina **46** amb un rendiment del 92% (FIGURA 2.26). Pel que fa a la introducció del grup protector DMT, es va revelar clau tant l'ús de quantitats catalítiques de DMAP com la realització de diverses coevaporacions del nucleòsid **46** en piridina anhidra abans de dur a terme la reacció. Aquest procediment va permetre obtenir la guanosina **40** amb un rendiment del 82% (FIGURA 2.26).

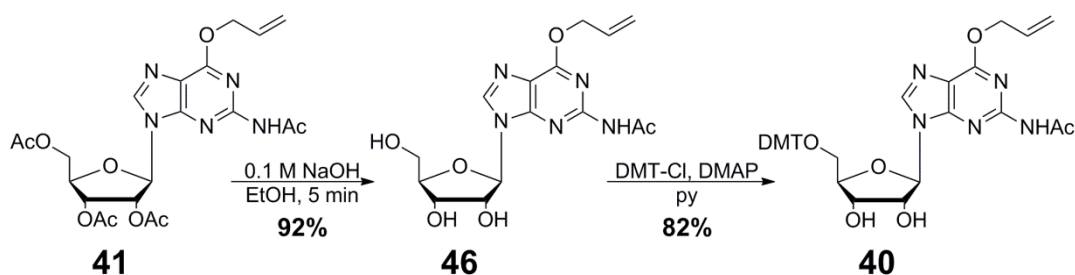


Figura 2.26. Esquema sintètic de la desprotecció selectiva de la guanosina **41**, així com de la seva posterior protecció amb el grup DMT.

En aquest punt havíem arribat a l'etapa clau en la síntesi del fosforamidit **38**: la protecció de l'hidroxil 2' amb el grup TOM. Per tal de dur a terme la reacció calia, en primer lloc, preparar el clorur de TOM **49**, el reactiu usat per introduir el grup protector. La sililació de l'etilmetanol **47** amb clorur de triisopropilsilil va generar l'intermedi **48** el qual, un cop tractat amb clorur de sulfuril, ens va permetre obtenir el clorur de TOM **49** amb un rendiment global del 49% (FIGURA 2.27.SUPERIOR).^{142b,226}

La protecció de l'hidroxil 2' de la guanosina **40** té lloc formant en primer lloc el derivat cíclic dibutilestannilidè **50** entre el $n\text{Bu}_2\text{SnCl}_2$ i el diol del sucre, activant-se les posicions 2' i 3' (FIGURA 2.27.INFERIOR). Aquest intermedi activat reacciona amb el clorur de TOM per tal de generar una barreja dels isòmers 2' i 3' protegits (**39** i **51**, respectivament), els quals es poden aïllar per cromatografia en gel de sílice.

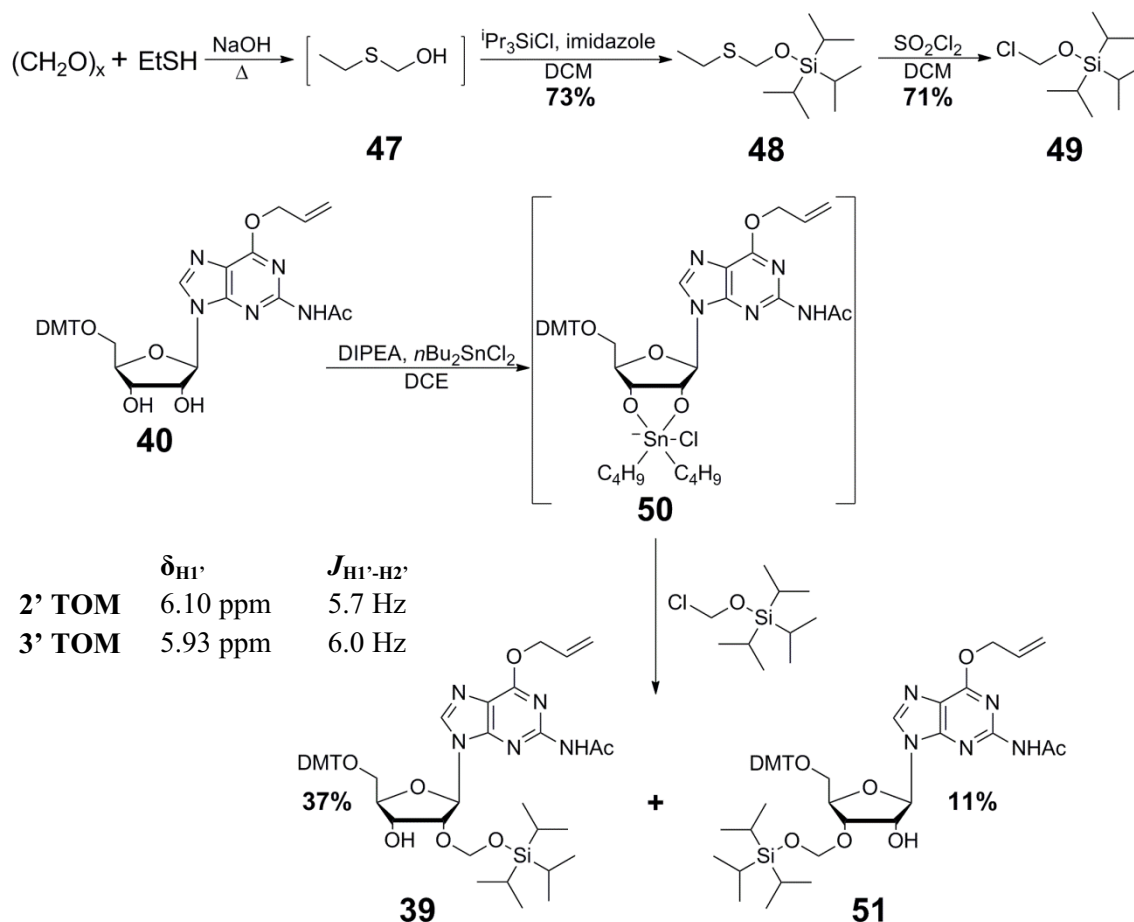


Figura 2.27. Superior: Esquema sintètic de l'obtenció del TOM-Cl **49**. **Inferior:** Esquema sintètic de la protecció de l'hidroxil 2' de la guanosina **40** amb el grup TOM a través de la formació d'un intermedi cíclic dibutilestannilidè.

Per tal de poder identificar de forma inequívoca tots dos isòmers ens vam basar en les regles de Reese,²²⁷ segons les quals en un parell d'isòmers 2' i 3' d'un nucleòsid alquilat, la ressonància de l'H1' de l'isòmer 2' té lloc a caps menors que la del 3', mentre que la $J_{1'2'}$ de l'isòmer 3' sol ser major que la de l'isòmer 2'. En el nostre cas, l'isòmer 2' (guanosina **39**) tenia un $\delta_{\text{H1}'}$ de 6.10 ppm i una $J_{1'2'}$ de 5.7 Hz, els quals eren majors i menors, respectivament, als presentats per l'isòmer 3' (guanosina **51**) que eren, al seu torn, 5.93 ppm i 6.0 Hz (FIGURA 2.27.INFERIOR). Per la seva banda, els rendiments obtinguts van ser d'un 37% en el cas de la guanosina **39** enfront d'un 11% de l'isòmer

3'. Tot i tractar-se de rendiments menors als obtinguts per Pitsch pel que fa a l'alquilació de nucleòsids no modificats,^{142b,221} són comparables als resultats descrits en la protecció de nucleòsids amb modificacions en les seves bases, els quals oscil·len entre el 20 i el 45%.²²⁸

Per acabar, calia tan sols convertir la guanosina totalment protegida **39** en el seu derivat fosforamidit **38**. Per dur a terme aquesta transformació vam elegir usar el 2-cianoetil-*N,N*-diisopropilclorofosforamidit (FIGURA 2.28). El rendiment de la reacció va ser del 75%.

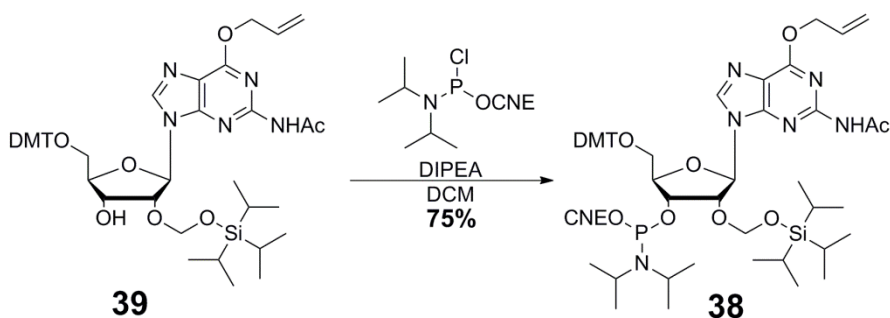


Figura 2.28. Esquema sintètic de l'obtenció del fosforamidit **38**.

Així doncs, la síntesi del fosforamidit **38** s'havia dut a terme en un total de 6 etapes sintètiques i amb un rendiment global del 10%.

2.3.4 Obtenció d'oligonucleòtids que incorporen *G^{All}*

Amb el fosforamidit **38** a les nostre mans podíem finalment procedir a posar en pràctica l'estratègia de ciclació assistida per motlle amb protecció parcial del l'oligonucleòtid a ciclar. Tal com s'ha descrit en la secció 2.2.2, l'oligonucleòtid que preteníem sintetitzar era un 42mer que contingués 14 repeticions del triplet CUG. Per tal que l'estratègia fos exitosa calia protegir totes les guanosines del precursor lineal que no es trobessin en els extrems a unir, pel que l'oligonucleòtid que es va decidir preparar va ser el 42mer r(UGC)₃(UG^{All}C)₈(UGC)₃ **52** (FIGURA 2.29). El grup fosfat en 5' necessari per a que tingui lloc la ciclació l'incorporaríem enzimàticament, com ja havíem fet en el cas descrit en l'apartat 2.2.2.3.

Abans de sintetitzar el precursor lineal, però, calia dur a terme dues comprovacions més. Em primer lloc, volíem sintetitzar un oligonucleòtid model que incorporés la guanosina protegida amb el grup All emprant **38**, per tal de comprovar que el fosforamidit s'incorporava sense problemes en un oligonucleòtid, així com per a confirmar l'estabilitat del grup All enfront els diversos tractaments duts a terme durant la desprotecció i el desancoratge de l'oligonucleòtid. En segon lloc, volíem emprar aquest mateix model per tal d'assajar les condicions d'eliminació del protector All de l'oligonucleòtid.

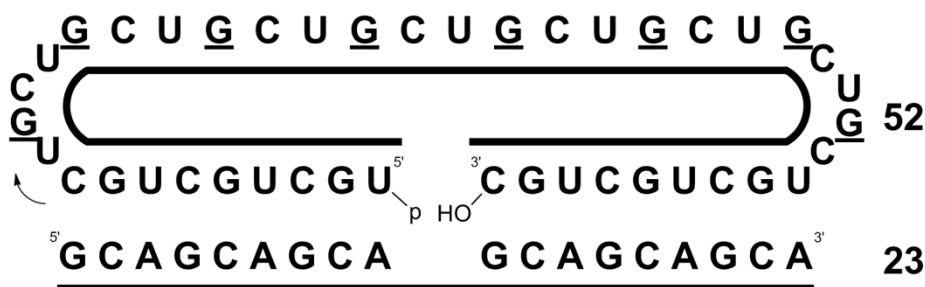


Figura 2.29. Representació del 42mer **52** (un cop fosforilat en 5') hibridat amb el motlle **23**. En la figura G representen les guanines protegides amb el grup All.

A l'hora d'elegir l'oligonucleòtid a sintetitzar vam creure que un tetradecàmer seria un bon model degut a que era suficientment curt per tal de poder analitzar-lo sense problemes per EM-MALDI-TOF i, a la vegada, era prou llarg per incorporar diverses unitats G^{All} i permetre'ns, així, tenir una idea més exacta del que podia succeir durant la síntesi del precursor lineal parcialment protegit **52**. La seqüència elegida va ser la rG(CUG)₄C, en la qual introduiríem tres residus G^{All} en el centre de la cadena, pel que l'oligonucleòtid model elegit es tractaria del rG(CUG^{All})₃CUGC **53**.

2.3.4.1 14mer rG(CUG^{All})₃CUGC **53**

La síntesi del 14mer rG(CUG^{All})₃CUGC **53** es va dur a terme en el sintetitzador automàtic a escala 1 μmol, usant un cicle de síntesi estàndard i emprant tant derivats fosforamidits comercials de DMT-ribonucleòsids com el fosforamidit **38** sintetitzat per nosaltres. Durant la síntesi es va mantenir el grup DMT en l'extrem 5' de l'oligonucleòtid per tal de facilitar-ne la purificació. Cal destacar que no es va detectar

cap diferència apreciable pel que fa al rendiment d'acoblament entre el nostre fosforamidit **38** i els fosforamidits comercials.

El desancoratge i desprotecció de l'oligonucleòtid es va dur a terme usant el procediment descrit en l'apartat 2.2.1.1. Convé recordar que mentre el fosforamidit **38** sintetitzat per nosaltres presenta l'hidroxil 2' protegit amb el grup TOM, els fosforamidits comercials usats empren el TBDMS com a protector. Això no havia de ser cap inconvenient, ja que el grup TOM és làbil a les condicions d'eliminació del grup TBDMS.

El cru de desancoratge es va purificar per HPLC semipreparatiu. Un cop eliminat el grup DMT de l'oligonucleòtid, però, l'anàlisi per HPLC en fase inversa va revelar la presència de quatre productes diferents, els quals es van purificar i caracteritzar per EM-MALDI-TOF. Per a la nostra sorpresa, l'eliminació del grup Ac que protegia l'amino exocíclic dels nucleòtids G^{All} no havia sigut quantitativa ja que, com es pot observar en la *TAULA 2.6*, els productes purificats es corresponien als diferents tetradecàmers amb 0, 1, 2 o 3 grups Ac (oligonucleòtids **53** a **56**). La conservació del grup Ac en les G^{All} va ser posteriorment confirmada mitjançant digestió enzimàtica de la seqüència **56** i comparació amb patrons de C, U, G i de la O⁶-al·lil guanosina **46**.

Oligonucleòtid	t _R (min)	[M-H ⁺] ⁻ _{calc}	[M-H ⁺] ⁻ _{exp}	Quantitat Obtinguda	Oligonucleòtid
53	15.1	4531.7	4531.4	1.2 OD	14mer amb 0 Ac
54	16.3	4573.7	4573.4	6 OD	14mer amb 1 Ac
55	17.2	4615.7	4615.5	8 OD	14mer amb 2 Ac
56	19.5	4657.7	4657.4	2.8 OD	14mer amb 3 Ac

Taula 2.6. Taula resum de la caracterització dels quatre productes purificats, així com la quantitat obtinguda de cadascun d'ells i l'assignació de l'oligonucleòtid a que es corresponen. Els temps de retenció (t_R) corresponen a una columna Kromasil C₁₈, amb un gradient del 20 al 30% de B en 30' (A: TEAA 0.05 M, B: ACN/H₂O 1:1).

Ens trobàvem, per tant, davant d'un fet inesperat: el grup Ac que protegia la G^{All}, el qual s'havia revelat molt làbil a nivell de nucleòsid i ens havia obligat a usar unes condicions força suaus durant la preparació de la guanosina **46**, una vegada incorporat en l'oligonucleòtid resultava suficientment estable com per resistir el tractament de 30 min amb AMA a 55°C. Cal recordar, a més, que el grup Ac és usat habitualment com a protector estàndard de l'amino exocíclic de la guanosina en fosforamidits comercials. Aquest problema l'abordarem més endavant.

De moment, tot i els entrebancs amb que ens havíem trobat, havíem aconseguit obtenir un oligonucleòtid model que incorporava la G^{All}, amb el qual podíem procedir a realitzar estudis de d'eliminació de l'All. Abans, però, els volíem dur a terme a nivell de nucleòsid per tal d'acotar unes condicions de desprotecció adequades.

2.3.4.1.1 Estudi d'eliminació del grup al·lil del nucleòsid DMT-G^{All} **57**

En primer lloc havíem d'elegir el nucleòsid amb el qual portaríem a cap aquests assaigs de desprotecció. Descartada la guanosina **37** per la seva pèssima solubilitat, vam creure que el seu anàleg tritilat (**57**) seria una bona alternativa. Aquest nucleòsid el vam obtenir fàcilment per hidròlisi bàsica de la guanosina **40** (FIGURA 2.30).

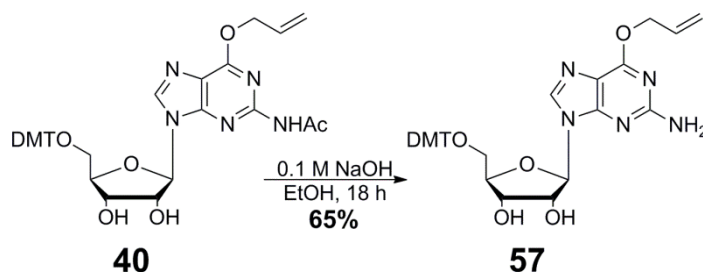


Figura 2.30. Obtenció de la guanosina **57**.

Ens vam fixar en les diferents condicions descrites per Noyori i col·laboradors²²⁹ per a l'eliminació amb catàlisi de Pd⁰ del grup Alloc de diferents nucleòsids. En el nostre cas vam decidir assajar primerament la desprotecció de la guanosina **57** emprant [Pd(PPh₃)₄] com a catalitzador i dos nucleòfils diferents per tal de capturar l'al·lil generat durant la reacció, la dimedona (5,5-dimetil-1,3-ciclohexadiona) i una barreja HCOOH/*n*BuNH₂ (1:1). Els dos crús de reacció es van analitzar per CCF, HPLC en fase inversa i EM-MALDI-TOF, revelant-se en tots tres mètodes que, mentre en el cas de l'assaig amb HCOOH/*n*BuNH₂ la desprotecció era quantitativa després de tan sols 10 minuts, quan el nucleòfil emprat era la dimedona la reacció encara no era completa després de 60 minuts. La reacció avé segons el mecanisme mostrat en la FIGURA 2.31, per analogia a la descrita per Chandrasekhar i col·laboradors.²³⁰ Era hora, per tant, de dur a terme els assaigs de desprotecció amb l'oligonucleòtid model que contenia G^{All}.

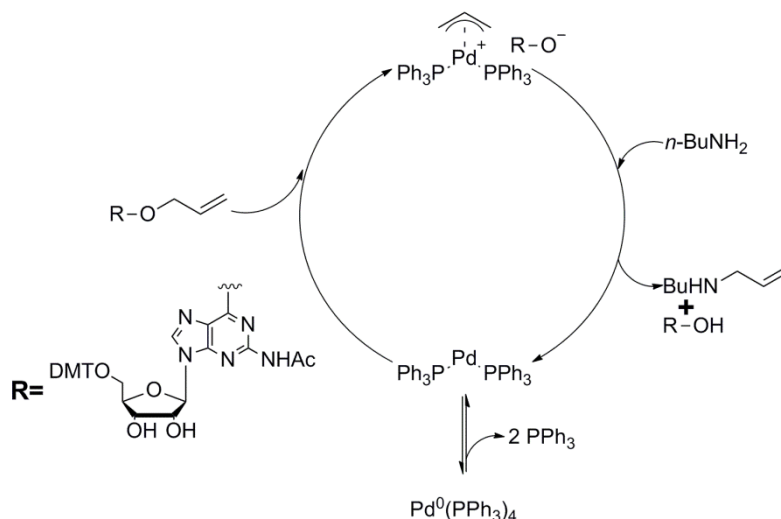


Figura 2.31. Mecanisme de desprotecció al·lílica catalitzada per Pd d'acord amb el descrit per Chandrasekhar i col·laboradors.²³⁰

2.3.4.1.2 Estudi de desprotecció del tetradecàmer

Un cop trobades unes condicions per la completa eliminació de l'All de la guanosina vam procedir a la desprotecció del tetradecàmer **53**. Tal com s'ha exposat anteriorment, disposàvem de quatre anàlegs d'aquest oligonucleòtid, segons la cadena conservés 0, 1, 2 o 3 grups Ac en ella. La seva presència o no en la seqüència no havia, *a priori*, d'influir en la reactivitat dels al·lils davant de les condicions d'eliminació. Això va fer que duguéssim a terme els assaig de deprotecció amb el 14mer amb 2 acetils **55**, ja que era el tetradecàmer del que en posseïem major quantitat.

A l'hora d'elegir les condicions de desprotecció, ens vam basar tant en la metodologia usada per Vasseur²³¹, en el que respecta a les quantitats dels diferents reactius usats, com en l'experiència obtinguda amb el nucleòsid **57**, a l'hora de seleccionar tant la font de Pd^0 com el nucleòfil usat per tal de capturar l'al·lil alliberat durant l'eliminació, arribant a les condicions descrites en l'assaig **1**. En el cas dels assaigs **2** i **3**, vam doblar la quantitat tant de PPh_3 com de Pd^0 augmentant, a més, la temperatura de reacció en el cas de l'assaig **3**. Finalment, en l'assaig **4** vam repetir les condicions de l'assaig **1** però augmentant la temperatura i canviant el dissolvent, ja que en la bibliografia vam trobar descrit que la presència d'aigua podia afavorir la reacció de desprotecció.²³² Les diferents condicions de reacció es mostren en la TAULA 2.7.

	Assaig 1	Assaig 2	Assaig 3	Assaig 4
RNA	25 μ M	25 μ M	25 μ M	25 μ M
PPh₃	25 eq/All	50 eq/All	50 eq/All	25 eq/All
[Pd(PPh₃)₄]	2.5 eq/All	5 eq/All	5 eq/All	2.5 eq/All
HCOOH/nBuNH₂	100 eq/All	100 eq/All	100 eq/All	100 eq/All
Dissolvent	THF	THF	THF	THF/H ₂ O (1:1)
Temperatura	t.a.	t.a.	65°C	65°C

Taula 2.7. Taula resum dels diferents assaigs d'eliminació del grup All duts a terme amb l'oligonucleòtid **55**.

Els crus de reacció es van analitzar per EM-MALDI-TOF, agafant diverses alíquotes al llarg del temps, revelant-se que, en els assaigs **1**, **2** i **3** la desprotecció no era complerta ni tan sols passades 19 hores. En canvi, en el cas de l'assaig **4** no s'observava la presència de cap producte que contingués All després d'1.5 h, el que semblava implica que era imprescindible la presència d'aigua en el medi per tal que la reacció es pogués completar.

Un cop optimitzades les condicions d'eliminació de l'All vam voler, finalment, assajar-les amb el 14mer sense acetils **53**. Vam sotmetre una alíquota de l'oligonucleòtid a les condicions de desprotecció descrites en l'assaig **4** durant dues hores. El cru resultant es va analitzar tant per EM-MALDI-TOF, el que va confirmar que l'eliminació dels All havia tingut lloc de forma correcta, com per HPLC en fase inversa, constatant que la desprotecció s'havia produït de forma quantitativa (**FIGURA 2.32**).

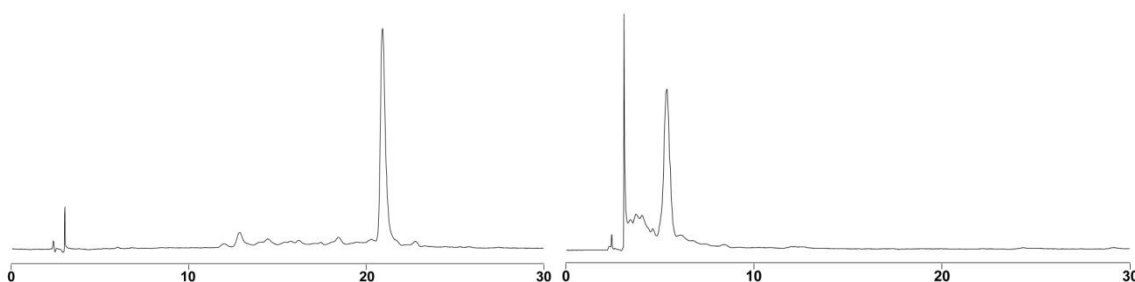


Figura 2.32. Anàlisi per HPLC en fase inversa de la desprotecció del 14mer **53**. **Esquerra.** Producte de partida **53** protegit amb All. **Dreta.** Producte d'eliminació dels All.

En conclusió, havíem aconseguit trobar unes condicions de reacció adequades per tal de dur a terme l'eliminació quantitativa dels grups All dels oligonucleòtids. Abans de passar a sintetitzar el precursor lineal que contingués G^{All}, però, calia resoldre un

últim entrebanc: l'eliminació incompleta del grup Ac de les guanosines durant el desanclaratge de l'oligonucleòtid.

2.3.4.2 Síntesi del 6mer rUG^{All}CUG^{All}C 58 i estudi de desanclaratge i desprotecció

Tal com s'ha exposat en la secció 2.3.4.1, les condicions de desprotecció i desanclaratge usades de forma estàndard en la preparació d'oligoribonucleòtids (AMA a 65°C durant 30 min) no havien sigut suficients per tal d'eliminar de forma quantitativa els Ac que protegien les guanosines de rG(CUG^{All})₃CUGC. Vam decidir sintetitzar un petit oligonucleòtid que incorporés la guanosina protegida amb All i Ac, en concret l'hexàmer rUG^{All}CUG^{All}C **58**, amb el qual portar a cap diferents assaigs de desprotecció.

La síntesi de l'oligonucleòtid **58** es va dur a terme en els sintetitzador automàtic a escala 1 µmol usant un cicle de síntesi estàndard. Un cop acabada, es va dividir la resina en diversos lots per tal de poder assajar diferents condicions de desprotecció.

En primer lloc, vam dur a terme un petit estudi cinètic del tractament de l'oligonucleòtid amb AMA a 65°C, analitzant el cru de desanclaratge cada 30 minuts per EM-MALDI-TOF. Valorant els resultats obtinguts era patent que després de 90 minuts encara s'observaven restes de productes acetilats mentre que a les dues hores de reacció aquests havien ja desaparegut. No obstant això, a partir d'aquestes dues hores començaven a formar-se subproductes indesitjats fruit de la substitució de l'*O*-All per la metilamina, incrementant-se'n la proporció a mesura que augmentava el temps de reacció. Vam considerar que un bon compromís entre l'eliminació quantitativa dels Ac i la mínima substitució possible dels *O*-All era emprar dues hores de reacció.

En segon lloc vam decidir assajar la desprotecció de l'oligonucleòtid usant el K₂CO₃ 0.05 M en MeOH. Vam usar aquesta mescla amb dues alíquotes de resina, tractant la primera durant 6 hores a temperatura ambient i la segona també durant 6 hores però a 65°C. L'anàlisi per EM-MALDI-TOF de tots dos crus de desanclaratge va revelar que quan la reacció havia tingut lloc a temperatura ambient l'eliminació dels acetils havia sigut molt minoritària, mentre que en el cas de l'assaig dut a terme a 65°C la desprotecció havia resultat quasi quantitativa, observant-se també, però, una

important substitució de l'*O*-All pel metanol. A la vista dels resultats obtinguts vam determinar que les millors condicions de desprotecció eren AMA a 65°C durant 2 hores, les quals usariem per escometre finalment la síntesi del precursor lineal parcialment protegit.

2.3.4.3 Síntesi del 42mer r(UGC)₃(UG^{All}C)₈(UGC)₃ **52**

La síntesi del 42mer **52** es va dur a terme en el sintetitzador automàtic a escala 1 µmol usant un cicle de síntesi estàndard, de forma anàloga a la descrita en la secció 2.3.4.1. El desancoratge i la desprotecció de l'oligonucleòtid es va dur a terme mitjançant el tractament de la resina amb AMA a 65°C durant dues hores. La desprotecció dels hidroxils 2' amb TEA·3HF va tenir lloc usant el procediment descrit en l'apartat 2.2.1.1.

El cru de desancoratge es va purificar per HPLC semipreparatiu. L'anàlisi per HPLC en fase inversa un cop eliminat el grup DMT de l'oligonucleòtid, però, va revelar la presència de diversos productes diferents, els quals es van purificar i caracteritzar per EM-ESI. La fracció amb un major t_R es va correspondre a l'oligonucleòtid **52** ($M_{calc}=13650$, $M_{exp}=13651$), mentre que la resta de fraccions (que composaven aproximadament el 90% del cru de desprotecció) es corresponien a altres seqüències en les que havia tingut lloc la substitució d'un o varis grups *O*-All per la metilamina. Per la seva banda, no es va observar la presència de cap producte acetilat, tal i com ens esperàvem. En futures síntesis, però, s'hauria d'ajustar el temps de desancoratge per tal de minimitzar els subproductes formats.

En aquest punt val la pena destacar la gran dificultat que comporta l'anàlisi d'oligonucleòtids de mida tan gran per EM. D'una banda, l'EM-MALDI-TOF no permet obtenir senyals amb una resolució suficient com per a poder diferenciar oligonucleòtids amb diferències de masses menors als 500 Da. L'EM-ESI, per la seva banda, si ho permet, tot i que l'obtenció dels senyals de m/z necessaris per dur a terme la deconvolució, i que permeten calcular la massa molecular de la molècula, és sovint difícil i ha sigut un seriós obstacle en l'anàlisi dels oligonucleòtids, ja fossin lineals o cíclics, en el final del present Capítol.

La quantificació de la fracció que contenia el 42mer $r(\text{UGC})_3(\text{UG}^{\text{All}}\text{C})_8(\text{UGC})_3$ **52** va revelar que teníem 5 OD₂₆₀ de producte. Tot i tractar-se de poca quantitat i suposar un important entrebanc, permetia dur a terme alguns assaigs de ciclació.

2.3.5 Obtenció del 42mer cíclic per ciclació assistida per motlle amb protecció parcial del precursor lineal

Finalment vam abordar l'objectiu d'obtenir un oligonucleòtid cíclic amb repeticions CUG mitjançant la metodologia de ciclació assistida per motlle amb protecció parcial del precursor lineal mitjançant el grup All present en la guanosina. L'oligonucleòtid circular $r\langle(\text{UGC})_3(\text{UG}^{\text{All}}\text{C})_8(\text{UGC})_3\rangle$ **59** s'obtidria de forma *one-pot* per fosforilació en 5' de la seqüència **52** seguida de ciclació de la mateixa, de forma anàloga a com s'ha descrit en la secció 2.2.2.3.

En primer lloc es va dur a terme un assaig de fosforilació i ciclació amb una petita quantitat de precursor lineal. Aquesta primera prova es va realitzar amb 0.2 OD₂₆₀ emprant les condicions optimitzades de ciclació de l'oligonucleòtid model descrites en la secció 2.2.2.3. L'única modificació introduïda va ser la supressió de l'ús de PEG, el qual semblava no aportar cap millora pel que fa al rendiment i podia, en canvi, dificultar molt l'anàlisi de la reacció per EM. El resum de les condicions de fosforilació i ciclació es mostra en la *TAULA 2.8*, mentre que l'anàlisi per PAGE del cru de ciclació es mostra en la *FIGURA 2.33*.

	Fosforilació	Ciclació
Precursor lineal 52 (μM)	15	10
Motlle (μM)	-	10
Tris·HCl pH 7.5 (mM)	70	50
DTT (mM)	5	5
ATP (mM)	0.063	1
T4 PNK (U/μL)	0.5	-
T4 DNALigase (U/μL)	-	1

Taula 2.8. Taula resum amb les condicions usades en la fosforilació i la ciclació del precursor lineal **52**.

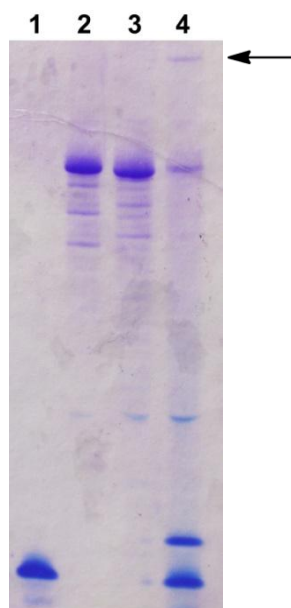


Figura 2.33. Anàlisi per PAGE de l'assaig de ciclació del 42mer **52**. **1.** Motlle **23**. **2.** Precursor lineal **52**. **3.** Precursor lineal **52** fosforilat. **4.** Assaig de ciclació a 30°C durant 16 hores del precursor lineal **52** fosforilat.

Com es pot observar en el PAGE de la *FIGURA 2.33*, l'assaig de ciclació del 42mer **52** va revelar una nova banda amb una mobilitat electroforètica força menor a la del precursor lineal fosforilat (assenyalada amb una fletxa en el PAGE), que es podia correspondre a l'oligonucleòtid cíclic **59**. Si comparem aquest PAGE amb el que havíem obtingut en els assaigs de ciclació del 42mer model **24** (*FIGURA 2.11*), podem observar que aquell presentava un banda amb una mobilitat electroforètica només lleugerament inferior a la del producte de partida.

Per tal d'intentar aclarir si la nova banda es corresponia efectivament a l'oligonucleòtid cíclic **59**, la reacció es va repetir amb major quantitat de precursor lineal (0.5 OD₂₆₀), vam dessalar el cru de lligació amb un cartutx NAP-5 i el vam analitzar per EM-ESI. En l'espectre de masses que vam obtenir vam observar diverses masses, entre elles la del precursor lineal **52** fosforilat ($M_{\text{calc}}=13730$, $M_{\text{exp}}=13731$) i la de l'oligonucleòtid cíclic **59** ($M_{\text{calc}}=13712$, $M_{\text{exp}}=13712$), així com unes masses pròximes a elles ($M_{\text{exp}}=14059$), les quals pel moment no podíem assignar (*TAULA 2.9*). Així doncs, havíem aconseguit obtenir un oligonucleòtid cíclic parcialment protegit amb repeticions CUG.

Oligonucleòtid	M _{calc} (uma)	M _{exp} (uma)
Precursor lineal 52 fosforilat	13730	13731
Oligonucleòtid cíclic 59	13712	13712
AppRNA derivat de 52	14060	14059
AppDNA derivat de 23	5983	5982

Taula 2.9. Taula resum de les masses dels diferents oligonucleòtids obtingudes en l'assaig de ciclació del 42mer **52** fosforilat.

Quedava només un últim pas: desprotegir el 42mer **59** per tal d'obtenir l'oligonucleòtid cíclic $r\langle p(\text{CUG})_{14} \rangle$ **21**. Per tal de portar a cap aquesta desprotecció, va ser necessari repetir la reacció de ciclació a major escala (2 OD₂₆₀) per així tenir producte suficient amb el que efectuar la reacció i el seu anàlisi. Un cop va haver tingut lloc la reacció de lligació, vam liofilitzar el cru resultant i en vam dur a terme la desal·lilació emprant les condicions optimitzades descrites en la secció 2.3.4.1.2. El cru de desprotecció el vam dessalar amb un cartutx NAP-5 i el vam analitzar per PAGE (FIGURA 2.34) i per EM-ESI.

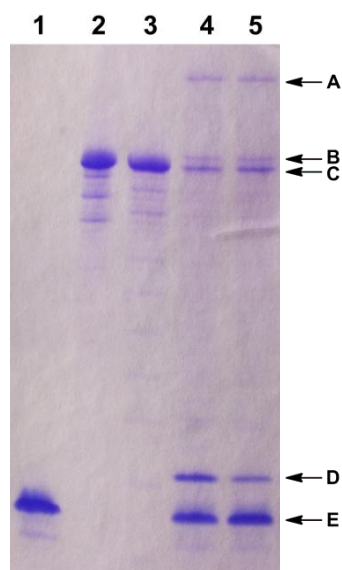


Figura 2.34. Anàlisi per PAGE de l'assaig de ciclació i posterior desprotecció del 42mer **52**. **1.** Motlle **23**. **2.** Precursor lineal **52**. **3.** Precursor lineal **52** fosforilat. **4.** Producte de ciclació del precursor lineal **52** fosforilat. **5.** Producte d'eliminació amb Pd⁰ dels grups al·lil de l'oligonucleòtid cíclic **59**.

Analitzant els resultats observats en el PAGE, cal ressaltar que es podia estimar, a partir de la intensitat relativa de les bandes, que el rendiment de la reacció de ciclació del 42mer **52** fosforilat (carril 4) havia sigut al voltant del 30-40% (banda *A*). Diversos factors poden explicar aquest rendiment de ciclació no excessivament elevat. D'una banda, existia la possibilitat que el precursor lineal i el motlle no s'estructuressin de la

forma desitjada. Un dels motius podia ser que el grup All present en les guanosines del precursor lineal no impedis totalment la hibridació del mateix amb el motlle. D'altra banda, els extrems a unir del precursor lineal estan formats per repeticions CUG, els quals podrien adoptar diferents estructures (*hairpins* amb *mismatches* U·U, per exemple) o bé no formar un dúplex perfecte amb el motlle. Això implicaria que els extrems a unir no es trobessin prou propers durant la reacció de ciclació, invalidant d'aquesta manera l'estratègia i provocant, per tant, un descens del rendiment.

Com es pot observar en la *FIGURA 2.34*, no s'observava cap variació pel que fa a la mobilitat electroforètica entre el producte cíclic **59** abans i després de la reacció de desprotecció (carrils 4 i 5). Això no va ser cap sorpresa, ja que les càrregues negatives són les mateixes i la variació de mida causada per la desprotecció de l'oligonucleòtid era segurament massa petita per influir en la seva mobilitat electroforètica.

D'altra banda, més enllà de les bandes corresponents al producte de ciclació (**A**) i al precursor lineal **52** fosforilat (**C**), en aquest PAGE s'observava força clarament unes bandes (**B**) en els carrils 4 i 5 amb una mobilitat electroforètica lleugerament inferior a la del precursor fosforilat. La banda **B** tan sols s'intuïa en el PAGE mostrat en la *FIGURA 2.33* i es podia correspondre amb la $M_{\text{exp}}=14059$ no assignada de l'espectre de masses del cru de ciclació (*TAULA 2.9*). Aquesta massa es correspon a l'addició formal d'AMP al precursor lineal **52** fosforilat, generant un oligonucleòtid 5' bloquejat del tipus AppRNA, que havia de tenir una mobilitat electroforètica lleugerament menor a la del precursor fosforilat i el qual és un producte secundari de la reacció de ciclació amb l'enzim T4 DNA ligasa.²³³ Anàlogament, la banda **D**, amb una mobilitat electroforètica menor a la del motlle **23** (**E**), es correspon al derivat AppDNA del mateix ($[M-H^++Na^+]_{\text{calc}}=5983$, $[M-H^++Na^+]_{\text{exp}}=5982$), generat de forma anàloga (*TAULA 2.9*). A aquesta conclusió hi vam arribar gràcies a un cas semblant en que ens vam trobar, el qual s'exposarà en el Capítol 3 del Bloc 2. La discussió corresponent a la formació d'aquests tipus de derivats la deixarem, per tant, per a aquell Capítol. Val la pena destacar, però, que la ineficiència de la ciclació podia ser la causa de l'acumulació del derivat AppRNA del 42mer **52** (**B**), estimada en un 10%. La modificació del punt d'unió del precursor lineal (entre G i C enlloc de entre C i U, per exemple) podria contribuir a facilitar la lligació i reduir l'acumulació del derivat AppRNA.²³⁴ Per la seva banda, la formació del derivat AppDNA del motlle **23** (**D**) indica que el motlle es trobava fosforilat en l'extrem 5' en el moment de dur a terme la reacció de ciclació amb

la T4 DNA ligasa. Aquest fet volia dir que s'havia incorporat en fosfat un l'extrem 5' del motlle **23** durant l'*annealing* previ a la lligació, el que implicava que el tractament de 15 minuts a 70°C usat per desnaturalitzar la T4 PNK no havia sigut suficient per a desactivar l'enzim.

Pel que fa a l'anàlisi per EM-ESI del cru de desprotecció no va ser possible observar cap massa pròxima a la dels oligonucleòtids **21**, **52** o **59**. Creient que potser el Pd podia dificultar la detecció per masses, vam repetir l'anàlisi afegint abans a l'oligonucleòtid dessalat una solució de dietilditiocarbamat de sodi (dtc), el qual té com a funció capturar el Pd del medi, i tornant-lo a dessalar amb un cartutx NAP-5. Desafortunadament, no vam obtenir resultats millors. Per desgràcia no teníem suficient oligonucleòtid cíclic **59** com per intentar purificar-lo ni suficient precursor lineal **52** per dur a terme noves ciclacions pel que, en aquest punt, vam decidir aturar-nos.

En aquest Capítol s'ha exposat la recerca portada a cap a fi de poder sintetitzar oligonucleòtids cíclics amb repeticions CUG mitjançant ciclació assistida per motlle.

D'una banda, s'ha sintetitzat un nou fosforamidit de la guanosina protegida com a *O*⁶-All, *N*²-Ac **38** en sis etapes i amb un rendiment global del 10%. Aquest derivat s'ha mostrat útil en la síntesi d'oligonucleòtids parcialment protegits, no mostrant diferències en el rendiment d'acoblament respecte als fosforamidits comercials. El grup All pot ser posteriorment eliminat dels oligonucleòtids de forma quantitativa amb Pd⁰ en una solució d'H₂O/THF. Cal destacar, però, que s'ha d'allargar el temps del tractament estàndard de desancoratge i desprotecció de l'oligonucleòtid de la resina amb AMA a 65°C per tal de poder eliminar de forma quantitativa el protector Ac de les guanosines mantenint-lo, no obstant, per sota de les dues hores per tal d'evitar la substitució dels grups al·liloxi per la metilamina.

D'altra banda, hem sigut capaços de preparar un 42mer cíclic que contenia repeticions CUG valent-nos de la protecció d'algunes de les seves guanosines amb el grup All per tal de facilitar-ne la lligació assistida per motlle amb l'enzim T4 DNA ligasa, obtenint un 30-40% de producte cíclic. Desafortunadament, no hem pogut confirmar la correcta desprotecció amb Pd⁰ d'aquest oligonucleòtid per manca de temps. Cal destacar així mateix la formació d'un 10% del derivat AppRNA del precursor lineal fosforilat, un subproducte de la reacció de ciclació amb la T4 DNA ligasa, el que posa

en relleu que la hibridació entre el precursor lineal i el motlle no és perfecta. Tot i això, la metodologia desenvolupada ha resultat efectiva i creiem que pot ser utilitzada per tal d'obtenir oligoribonucleòtids cíclics amb seqüències repetitives tant del triplet CUG com d'altres triplets (CAG, CGG...) o d'altres motius repetitius rellevants.

BLOC 2:

**OBTENCIÓ D'OLIGONUCLEÒTIDS
ENTRECREUATS**

CAPÍTOL 1:
INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS

1 Introducció i objectius

1.1 Estratègies de síntesi d'oligonucleòtids entrecreuats

Tal com s'ha exposat en la Introducció, una de les maneres d'estabilitzar una estructura dúplex d'RNA que contingués repeticions CUG seria mitjançant l'entrecreuament de totes dues cadenes a través d'una unió covalent. Idealment, aquesta unió hauria de reunir un seguit de condicions, com poden ser que incrementés l'estabilitat conformacional del dúplex, que no modifiqués l'estructura de la seqüència, que fos específica i reversible o que no modifiqués els hidroxils 3' o 5'.²³⁵

L'interès pels oligonucleòtids entrecreuats existent en diversos camps ha provocat que, al llarg dels anys, s'hagin desenvolupat diverses metodologies per preparar-los, agrupades en 3 estratègies: l'entrecreuament d'oligonucleòtids no modificats, l'entrecreuament d'àcids nucleics modificats i la síntesi en fase sòlida d'oligonucleòtids entrecreuats (*FIGURA 1.1*).^{110b,236}

Una de les primeres metodologies desenvolupades per sintetitzar oligonucleòtids entrecreuats va consistir en el tractament d'un dúplex de DNA amb un agent capaç d'unir les cadenes nucleotídiques. Aquest reactiu era capaç d'introduir una unió covalent entre totes dues cadenes generant d'aquesta manera l'oligonucleòtid entrecreuat desitjat (*FIGURA 1.1.A*). Al mateix temps es formaven altres productes secundaris com entrecreuaments intracadena o productes de monoaddició els quals, juntament amb les restes de dúplexs no reaccionats, eren separats de l'oligonucleòtid entrecreuat per mitjà d'una purificació per PAGE, gràcies a la menor mobilitat electroforètica que presenten els oligonucleòtids entrecreuats.²³⁷ Mitjançant aquesta metodologia es van poder unir covalentment diversos dúplex emprant diferents agents entrecreuant, com és ara la clormetina,²³⁸ la mitomicina C^{130a} o les nitrosamines.²³⁹ Aquesta metodologia d'entrecreuament directe també s'ha usat per l'elucidació estructural de dúplexs de DNA^{130b} o d'interaccions RNA-RNA.^{127b}

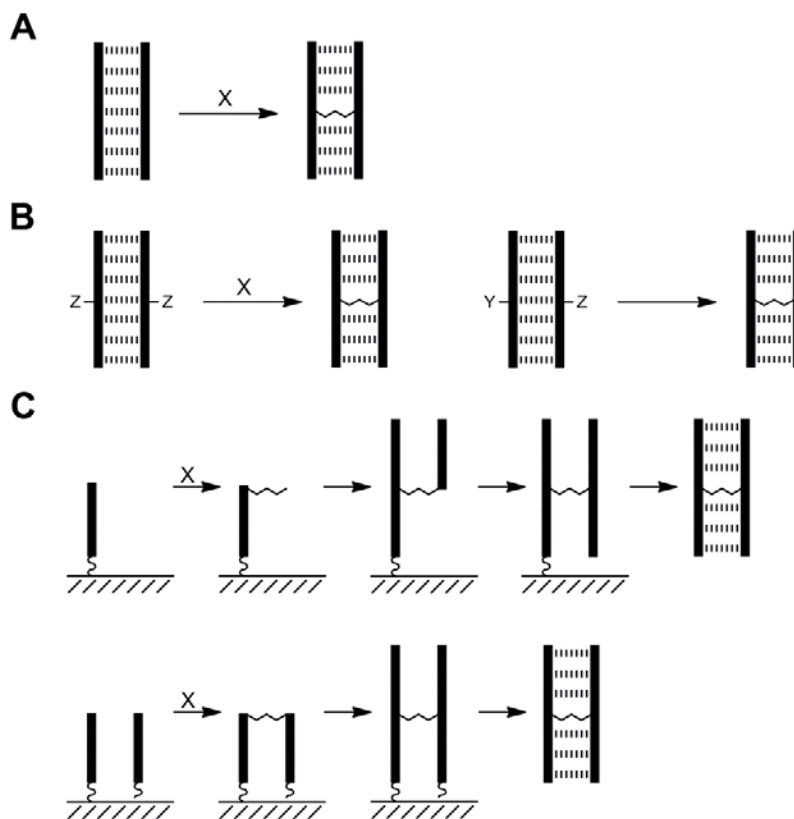


Figura 1.1. Resum de les diferents estratègies emprades per preparar oligonucleòtids entrecreuats. La X representa l'agent usant per introduir l'entrecreuament. **A.** Entrecreuament directe d'oligonucleòtids no modificats. **B.** Entrecreuament d'oligonucleòtids modificats amb la intervenció d'un tercer agent (esquerra) o sense (dreta). **C.** Síntesi d'oligonucleòtids entrecreuats en fase sòlida emprant un monoamidit (dalt) o un bisamidit (baix) per introduir la unió.

El principal problema de l'entrecreuament directe d'oligonucleòtids no modificats, deixant de banda els baixos rendiments, consisteix en la poca selectivitat de la pròpia reacció, el que provoca que sigui necessària una acurada purificació dels crús d'entrecreuament, sovint força complexos. Per tal de millorar la regioselectivitat de la unió s'han desenvolupat tot un seguit de metodologies que podem englobar dins de l'estratègia d'entrecreuament d'oligonucleòtids modificats. Aquesta segona aproximació es basa en la reacció específica entre dues posicions convenientment derivatitzades de dues cadenes diferents, ja sigui en la base nitrogenada,¹³¹ en el sucre²⁴⁰ o en el fosfat internucleosídic d'un oligonucleòtid²⁴¹.

Per tal de dur a terme aquesta estratègia, primerament té lloc la síntesi dels dos precursors lineals a entrecreuar, on cadascun es modifica convenientment en la posició en la que es desitja que es produeixi la unió. En segon lloc es procedeix a hibridar tots dos oligonucleòtids per després induir la reacció d'entrecreuament entre les posicions

convenientment derivatitzades. Aquesta unió pot tenir lloc per reacció directa d'una de les posicions amb la de l'altra cadena o bé emprant un tercer reactiu (*FIGURA 1.1.B*).

En el cas que la unió es dugui a terme directament, s'ha descrit l'entrecreuament mitjançant la formació d'un enllaç hidrazona entre una aldehyd i una amina,²⁴² per reacció entre una vinilpirimidina i una timidina,^{120c} mitjançant d'un enllaç carbinolamina^{105c} o bé a través d'una cicloadició 1,3 dipolar de tipus Huisgen entre tots dos oligonucleòtids.¹³¹ Per la seva banda, dins dels molts exemples descrits en la literatura de formació d'entrecreuament a través de la intervenció d'un tercer reactiu podem destacar la formació d'enllaços imina amb l'ajuda de metalls divalents,^{132c} l'ús de diamines per portar a terme substitucions nucleòfiles aromàtiques,²⁴³ la formació de ponts disulfur,²⁴¹ l'ús de bis-maleïmides per realitzar reaccions de Diels-Alder^{132a} o de bis-azides per poder dur a terme cicloadicions 1,3 dipolar de tipus Huisgen.^{132b,244}

Existeix una tercera estratègia consistent en la síntesi en fase sòlida dels oligonucleòtids entrecreuat. En aquesta aproximació l'entrecreuament s'introdueix durant la pròpia síntesi en fase sòlida, de tal manera que un cop finalitzada s'obté l'oligonucleòtid entrecreuat. Aquesta incorporació pot tenir lloc de dues maneres diferents: emprant o bé el fosforoamidit d'un dinucleòsid entrecreuat o bé el bisamidit d'un dinucleòsid que incorpori l'entrecreuament desitjat (*FIGURA 1.1.C*).^{133a}

El primer pas en qualsevol de les dues metodologies consisteix en l'entrecreuament dels dos DMT-nucleòsids entre els que es vol establir la unió, generant un DMT-dinucleòsid que serà l'usat per unir les dues cadenes de l'oligonucleòtid. És a partir d'aquest punt on apareixen les diferències entre ambdues metodologies: mentre en el cas del bisamidit ambdós hidroxils 3' dels nucleòsids es derivatitzen en forma de fosforamidit, en el del monoamidit tan sols es fosfilita un dels hidroxils, bloquejant l'altre amb un grup protector ortogonal (*FIGURA 1.2*).

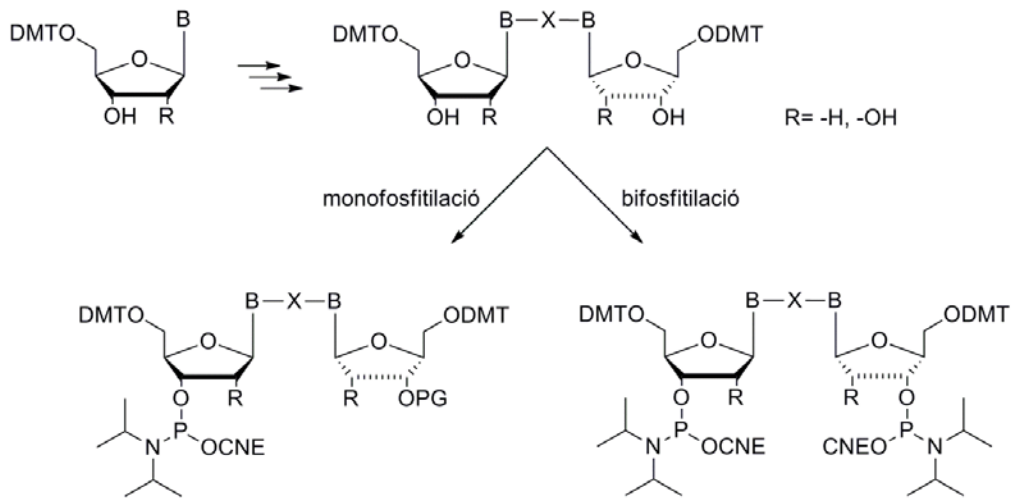


Figura 1.2. Obtenció dels derivats mono (esquerra) i bisamidit (dreta) usats en la síntesi en fase sòlida d'oligonucleòtids entrecreuats. Un cop preparat el dinucleòsid entrecreuat es duu a terme la seva mono o bifosfitilació per tal de preparar el derivat desitjat. **B** representa qualsevol nucleobase mentre que **PG** es refereix a un grup protector ortogonal al DMT.

En el cas de l'aproximació en la que s'empra un monoamidit, la síntesi de l'oligonucleòtid en fase sòlida té lloc en diferents etapes. Primerament es duu a terme l'elongació de la cadena nucleotídica emprant derivats 3' fosforamidit fins a arribar al punt en que es vol introduir l'entrecreuament, el qual s'incorpora usant el monoamidit preparat. L'eliminació dels protectors DMT i la continuació de la síntesi permeten obtenir un oligonucleòtid entrecreuat amb una de les cadenes completa, mentre que l'altra es troba interrompuda en l'extrem 3' terminal a l'altura de l'entrecreuament. La desprotecció de l'hidroxil 3', protegit ortogonalment durant tota la síntesi en fase sòlida, permet continuar l'elongació de la cadena emprant fosforamidits 5' fins a obtenir el dúplex entrecreuat desitjat (*FIGURA 1.3*).

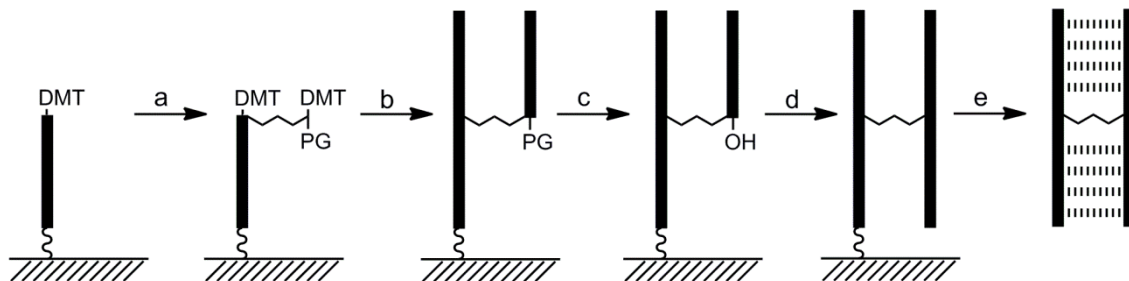


Figura 1.3. Esquema de síntesi d'oligonucleòtids entrecreuats en fase sòlida emprant un monoamidit per introduir la unió. **a.** Incorporació del monoamidit. **b.** Elongació de l'oligonucleòtid en sentit 5' usant fosforamidits 3'. **c.** Eliminació del grup protector de l'hidroxil 3'. **d.** Elongació de l'oligonucleòtid en sentit 3' usant fosforamidits 5'. **e.** Desancoratge de l'oligonucleòtid.

Aquesta metodologia ha sigut usada amb èxit per diversos grups per tal de preparar oligonucleòtids entrecreuats de seqüències de repeticions invertides (*inverted repeats*)^{133a,b} així com per preparar dúplexs no autocomplementaris entrecreuats modificant, però, un dels grups protectors de l'hidroxil 5' del dinucleòsid per un altre grup ortogonal a la resta de protectors i duent a terme la síntesi en 4 etapes en lloc de en tres.²⁴⁵ Segurament Wilds i col·laboradors han sigut els principals valedors d'aquesta metodologia, atès que emprant-la han estat capaços de preparar diferents oligonucleòtids entrecreuats a través de ponts alquílics de diferent longitud que uneixen timidines,²⁴⁶ desoxiguanosines²⁴⁷ o desoxicitidines,^{133a,248} ja es trobin les bases unides enfrontades²⁴⁶ o bé escalonades (*staggered*) en el dúplex resultant.^{246b,247,248b}

A diferència del que succeeix en l'aproximació en la que s'empra un monoamidit, en la metodologia que usa un bisamidit la síntesi en fase sòlida de l'oligonucleòtid té lloc de forma continua. En ella s'empren derivats fosforamidits 3' per dur a terme l'elongació de la cadena fins al punt en que es pretén introduir l'entrecreuament. La incorporació d'aquesta unió mitjançant el bisamidit preparat és l'etapa clau de la síntesi. Aquest reactiu, en primer lloc, s'ha d'acoblar correctament a una de les cadenes en creixement a través d'un dels seus grups fosforamidit per a que l'altre, seguidament, reaccioni amb una segona cadena pròxima en l'espai per tal d'unir-les entre elles. Un cop incorporada la unió es continua l'elongació fins a aconseguir la llargada de l'oligonucleòtid desitjada (*FIGURA 1.4.A*).

Tot i que els bisamidits s'havien usat àmpliament per la síntesi en fase sòlida de dendrímers i d'oligonucleòtids ramificats,²⁴⁹ Hopkins i col·laboradors van ser els primer en treure'n avantatge en la preparació de dúplexs entrecreuats.^{133a} Posteriorment Wilds i col·laboradors van emprar aquests reactius per preparar oligonucleòtids entrecreuats mitjançant unions alquíliques entre dues desoxiguanosines,²⁵⁰ dues timidines²⁵¹ o bé una timidina i una desoxiinosina.²⁵² Aquesta metodologia presenta avantatges respecte a l'anterior, com és ara que la preparació del bisamidit té lloc en menys etapes i amb un major rendiment que la del seu equivalent monoamidit, a més d'evitar l'ús de fosforamidits 5', més difícils de preparar que els seus equivalents 3' i fins a 5 cops més costosos. Tot i així, l'estratègia presenta també alguns inconvenients, com és ara una certa restricció de seqüència, atès que només permet preparar dúplexs autocomplementaris, i la inevitable formació del dúplex incomplet mostrat en la (*FIGURA 1.4.B*), format quan el bisamidit només ha reaccionat amb una de les cadenes

en creixement quedant, per tant, una de les cadenes sense un segment de l'extrem 3'. Aquest subproducte, però, és fàcilment eliminable durant la purificació del dúplex entrecreuat. Pel que fa als rendiments, amb totes dues metodologies s'han obtingut resultats similars.^{133a}

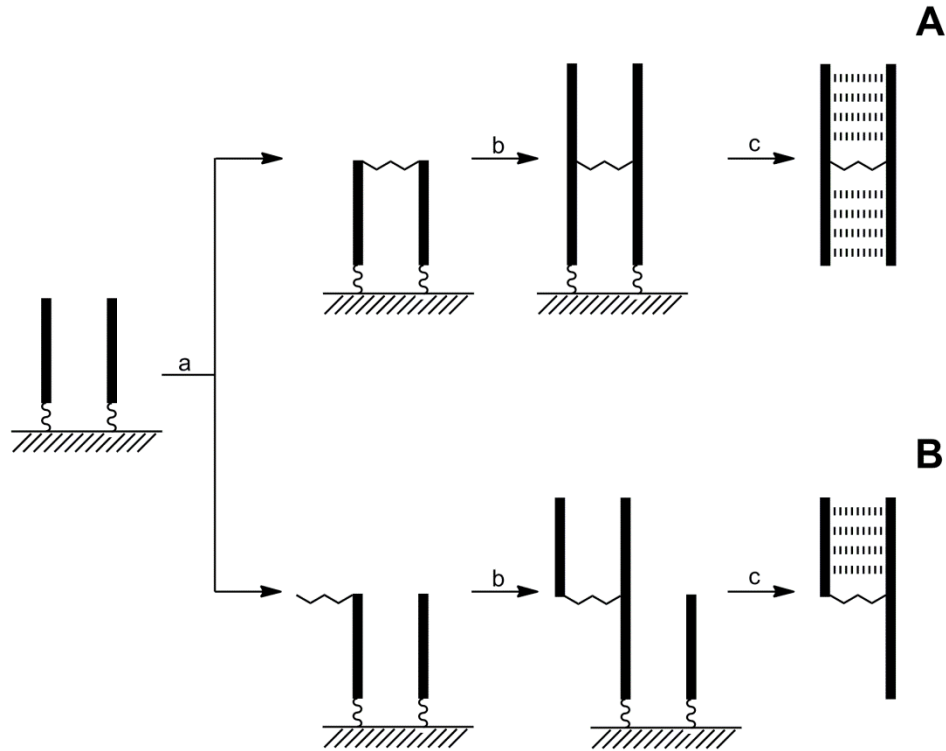


Figura 1.4. Esquema de síntesi d'oligonucleòtids entrecreuats en fase sòlida emprant un bisamidit per introduir la unió. **a.** Incorporació del bisamidit. **b.** Elongació de l'oligonucleòtid en sentit 5' usant fosforamidits 3'. **c.** Desancoratge de l'oligonucleòtid. Si el bisamidit es capaç d'unir correctament dues cadenes en creixement s'obté el dúplex entrecreuat desitjat (**A**); si no és així el producte resultant és el dúplex incomplet **B**.

Dins de les diferents metodologies descrites per obtenir oligonucleòtids entrecreuats, la síntesi en fase sòlida emprant bisamidits ens va semblar la més atractiva per preparar dúplexs que continguessin repeticions. Deixant de banda els avantatges ja comentats respecte a la síntesi en fase sòlida usant un monoamidit, es tracta d'un mètode molt més eficient i selectiu que l'entrecreuament directe dels oligonucleòtids no modificats, en el qual a més es solen usar reactius tòxics com poden ser les mostasses nitrogenades. Pel que fa a l'entrecreuament entre oligonucleòtids modificats, la majoria de metodologies descrites requereixen de la síntesi tant de dos fosforamidits diferents com de dos oligonucleòtids. En definitiva, davant la major simplicitat de la síntesi en fase sòlida emprant un bisamidit per introduir l'entrecreuament vam decidir que aquesta seria l'aproximació que usaríem per tal de preparar oligoribonucleòtids amb cadenes entrecreuades que continguessin repeticions CUG.

1.2 Entrecreuament de nucleòsids

Un cop elegida l'aproximació mitjançant la qual volíem obtenir els oligonucleòtids entrecreuats, calia decidir la naturalesa i la localització de la unió. En la literatura es troben descrits entrecreuaments entre els sucres^{128a-c,240,253} o els fosfats dels nucleòtids,^{241,254} però nosaltres ens vam decidir per dur-lo a terme entre les nucleobases, que en la majoria de casos és el punt d'unió preferit.^{105c,131,132c,133a,245,250,255} Moltes de les metodologies d'entrecreuament de nucleòsids descrites, però, es basen en rutes sintètiques llargues i laborioses, les quals solen implicar la síntesi de dos derivats nucleosídics diferents que s'uneixen entre ells mitjançant una reacció química. Aquestes rutes, a més, acostumen a estar farcides d'intercanvis de grups protectors que n'allarguen, n'encareixen i en dificulten la síntesi. El nostre objectiu era dissenyar un entrecreuament que ens permetés esquivar aquests entrebancs.

Una de les reaccions més clàssiques existents en la síntesi orgànica és la reacció de Michael, la qual es defineix com l'addició d'un nucleòfil (donador de Michael) sobre el carboni β d'un compost carbonílic α,β insaturat (acceptor de Michael). Una de les seves variants és coneguda com a reacció d'aza-Michael, en la qual el nucleòfil de la reacció és un compost nitrogenat. En la bibliografia existeixen diversos exemples d'aquesta reacció en els que s'usen nucleòsids i bases nitrogenades com a donadors de Michael, principalment la timidina.²⁵⁶ En un d'ells, Engels i col·laboradors van dur a terme una addició de Michael entre la timidina i diverses vinilsulfones,²⁵⁷ les quals són excel·lents acceptors de Michael.²⁵⁸ En aquest sentit, si l'acceptor de Michael posseís dos grups vinil en lloc de tan sols un, com en el cas de la divinilsulfona, aquesta es podria usar per entrecreuar el nucleòsids (*FIGURA 1.5*).

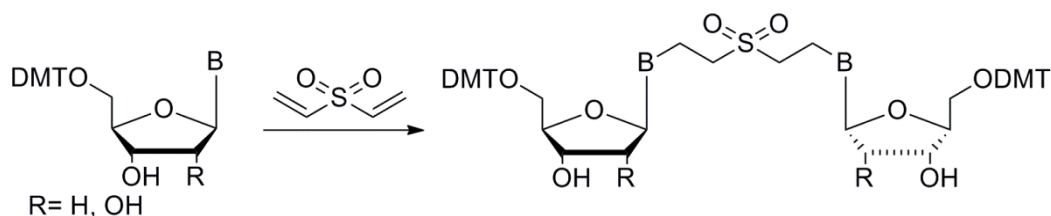


Figura 1.5. Entrecreuament de nucleòsids usant una doble addició de Michael de dos nucleòsids sobre la divinilsulfona.

Durant la realització del seu Màster en Química Avançada, Carlos Rodergas va abordar l'entrecreuament de timidines mitjançant una reacció de Michael catalitzada per PBU_3 , usant com a acceptors de Michael el divinilsulfòxid i la divinilsulfona (FIGURA 1.6.A).²⁵⁹ A partir del derivat bisamidit del producte d'addició de la timidina sobre el divinilsulfòxid va ser capaç de sintetitzar un undecàmer autocomplementari entrecreuat de DNA amb una unió dietilsulfòxid entre el nitrògen 3 de dues timidines enfrontades (FIGURA 1.6.B).

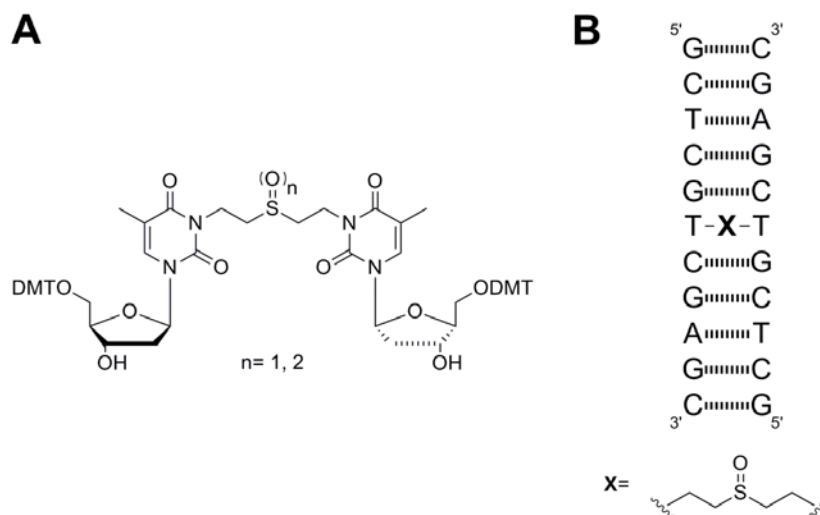


Figura 1.6. A. Timidines entrecruades per un pont dietilsulfona o dietilsulfòxid sintetitzades per Carlos Rodergas en el seu Màster.²⁵⁹ **B.** Dúplex de DNA entrecreuat amb una unió dietilsulfòxid preparat per Carlos Rodergas.²⁵⁹

El treball realitzat per en Carlos Rodergas obria la porta a una nova metodologia d'entrecreuament d'oligonucleòtids ràpida, senzilla i econòmica, ja que el bisamidit usat en l'estratègia s'obtenia en tan sols dues etapes sintètiques a partir del nucleòsid comercial. La metodologia era, *a priori*, fàcilment exportable a la síntesi d'oligonucleòtids d'RNA entrecruats, duent a terme la unió entre els nitrògens 3 de dues uridines enfrontades, pel que ens semblava una aproximació excel·lent per tal de preparar oligonucleòtids entrecruats que continguessin repeticions CUG.

La metodologia desenvolupada, però, podia ser millorada. Tot i que havia sigut possible sintetitzar els dinucleòsids entrecruats tant amb la divinilsulfona com amb el divinilsulfòxid, els rendiments obtinguts amb la divinilsulfona havien sigut bastant majors (>70% davant un <50%). Aquests resultats eren fàcilment explicables si tenim en compte que la divinilsulfona és un acceptor de Michael sensiblement millor que el

divinilsulfòxid, atès que el grup vinil de la primera és força més deficitari d'electrons que el segon. Tot i la major dificultat en la seva obtenció, el dinucleòsid emprat en l'obtenció del dúplex entrecreuat va ser l'obtingut en l'addició de Michael sobre el divinilsulfòxid. Això va ser degut al fet que es creia que la unió dietilsulfona podia experimentar una reacció de retro-Michael (eliminació) durant el tractament de desancoratge de l'oligonucleòtid de la resina amb bases nucleòfiles, com és ara l'amoníac, destruint així l'entrecreuament format (*FIGURA 1.7*). Els anàlisis preliminars duts a terme per en Carlos Roderigas així semblaven indicar-ho, ja que després d'un tractament amb AMA a 65°C durant 48 hores aquest dinucleòsid s'havia degradat per donar lloc a la timidina de partida en un 75%.²⁵⁹

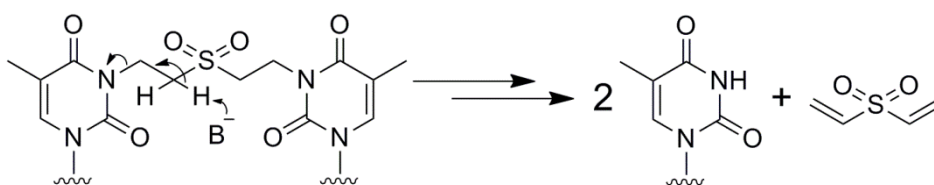


Figura 1.7. Reacció d'eliminació que pot sofrir el pont de divinilsulfona en presència de bases nucleòfiles.

Analitzant aquests estudis amb detall, però, s'observava que un 25% del dinucleòsid de timidina entrecreuat amb la divinilsulfona es mantenia inalterat tot i haver sigut sotmès a un tractament força agressiu. Aquestes dades ens feien pensar que potser seria possible trobar unes condicions de desancoratge de l'oligonucleòtid en les quals la reacció d'eliminació de la unió dietilsulfona fos mínima, al mateix temps que obrien la porta a l'existència d'una propietat molt interessant per a la nova metodologia d'entrecreuament: la reversibilitat. Idealment seria possible trobar unes condicions de desancoratge de l'oligonucleòtid en les quals el pont dietilsulfona romangués intacte per tal de poder trencar-lo, si es desitjava, emprant-ne unes de més energiques.

Per tant, com a objectius primaris del Segon Bloc ens vam plantejar l'adaptació de la metodologia de síntesi d'oligonucleòtids entrecreuats mitjançant un pont dietilsulfòxid desenvolupada per en Carlos Roderigas a la síntesi de dúplexs de DNA entrecreuats per una unió dietilsulfona, així com l'extensió d'aquesta aproximació a l'obtenció d'oliribonucleòtids amb repeticions CUG entrecreuats, objectiu final d'aquesta tesi.

CAPÍTOL 2:
SÍNTESI
D'OLIGODESOXIRIBONUCLEÒTIDS
ENTRECREUATS

2 Síntesi d'oligodesoxiribonucleòtids entrecreuats

2.1 Introducció i objectius

Tal com s'ha exposat en la Introducció, l'objectiu d'aquest Segon Bloc era l'obtenció d'oligoribonucleòtids entrecreuats amb una unió dietilsulfona que continguessin repeticions CUG. En primer lloc, però, volíem optimitzar la preparació de dúplexs de DNA units amb el pont dietilsulfona per tal de poder traslladar després la metodologia a l'RNA amb les millors garanties possibles. Aquesta optimització passava per la preparació del dinucleòsid de timidina entrecreuat amb la unió dietilsulfona i la cerca d'unes condicions de desancoratge de l'oligonucleòtid en les quals la unió romangués intacta.

2.2 Entrecreuament de timidines

2.2.1 *Obtenció de DMT-T entrecreuada 60*

Per tal de preparar el dinucleòsid de timidina entrecreuat amb el pont dietilsulfona es va seguir el procediment experimental descrit per en Carlos Rodergas en el seu Màster en Química Avançada.²⁵⁹ En ell, el dinucleòsid **60** es prepara per doble addició de Michael de la DMT-timidina comercial sobre la divinilsulfona, emprant PBU₃ com a catalitzador (*FIGURA 2.1*). L'augment de la temperatura fins als 50°C ens va permetre obtenir un rendiment major (del 85% enfront del 72% descrit anteriorment) i reduir el temps de reacció de les 26 a les 16 hores.

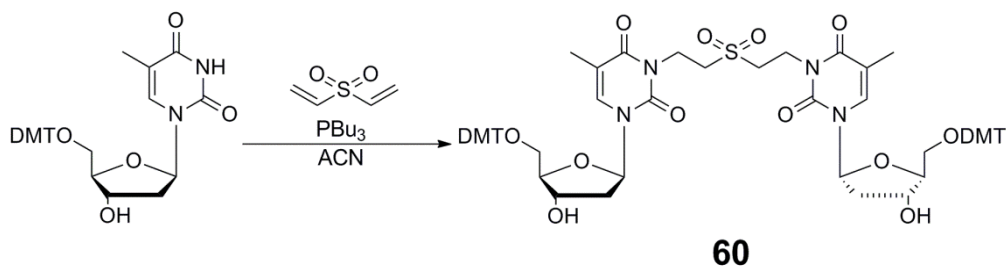


Figura 2.1. Reacció d'entrecruament de la DMT-timidina per doble addició de Michael sobre la divinilsulfona amb catàlisi de PBU_3 .

La utilització del TBAOH com a catalitzador, descrit per Engels i col·laboradors per l'addició de Michael de la timidina sobre vinilsulfones,²⁵⁷ donava crusc de reacció força més bruts i rendiments inferiors que l'ús de la PBU_3 , descrit per Vallribera i col·laboradors.²⁶⁰ Segons el mecanisme de reacció proposat pels autors,^{260b,261} l'addició s'inicia amb l'atac de la fosfina sobre la divinilsulfona per tal de generar el zwitterió **61**, el qual causa la desprotonació de la DMT-timidina generant la seva base conjugada **63**, que és la que desencadena el cicle catalític. La base **63** s'addiciona sobre la vinilsulfona donant lloc a l'anió **64**, a partir de la qual s'obté la timidiletilsulfona **65**. Aquest compost es pot formar per reacció de la sulfona **64** amb una altra DMT-timidina, permetent que el cicle catalític continuï, o bé amb la fosfina **62**, donant altre cop lloc al zwitterió **61**, a partir del qual es pot regenerar la PBU_3 (FIGURA 2.2). Aquest cicle catalític, en el nostre cas, ha de tenir lloc dues vegades per tal de poder donar lloc a l'entrecruament del les timidines.

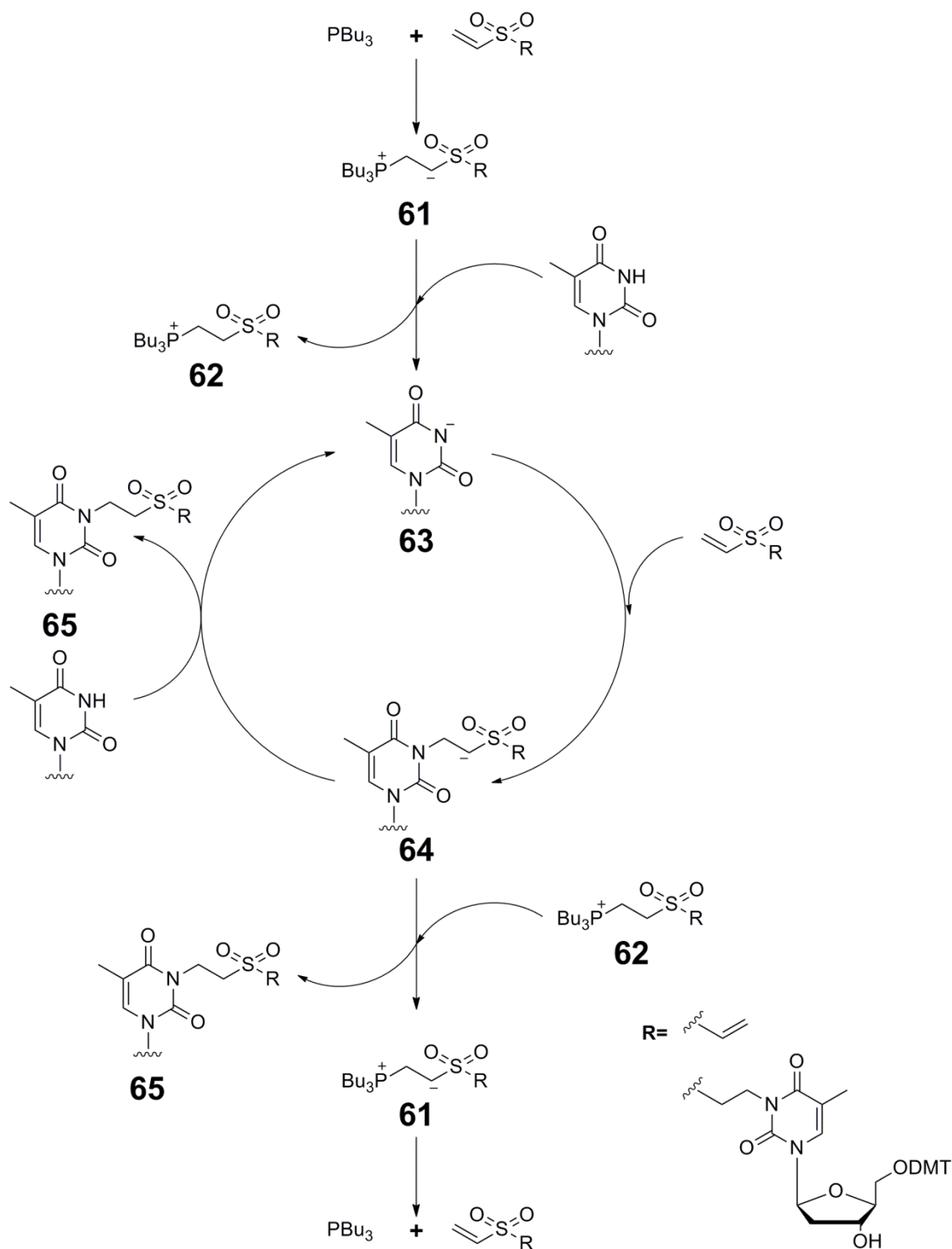


Figura 2.2. Mecanisme suggerit per l'addició de Michael sobre divinilsulfona catalitzada per PBu_3 a partir del proposat per Vallibera i col·laboradors.^{260b,261}

2.2.2 Estudi de l'estabilitat de la unió dietilsulfona enfront bases nucleòfiles

Un cop preparat el dinucleòsid, vam dur a terme assaigs d'estabilitat de la unió dietilsulfona davant diferents bases nucleòfiles, per tal de cercar unes condicions de desprotecció i desancoratge de l'oligonucleòtid de la resina en les quals no es donés la reacció d'eliminació de la dietilsulfona.

Els diferents assaigs de desprotecció es van dur a terme amb el dinucleòsid **60**, emprant com a bases nucleòfiles el K_2CO_3 0.05 M en MeOH i l'AMA. Ambdós medis de reacció es van avaluar a temperatura ambient i a 65°C, agafant alíquotes a diferents temps de reacció (1 h, 2 h, 6 h i 24 h, a més de 0.5 h en el cas de l'assaig amb AMA a 65°C) i analitzant-les per HPLC en fase inversa. Els resultats obtinguts es mostren en la *TAULA 2.1*, i així com en la *FIGURA 2.3*.

		AMA		K_2CO_3 0.05 M/MeOH	
		t. a.	65°C	t.a	65°C
% inalterat	0.5 h	-	78	-	-
	1 h	71	76	98	52
	2 h	75	69	96	39
	6 h	76	29	98	26
	24 h	70	3	96	0

Taula 2.1. Proporció de dinucleòsid **60** que resta inalterat després de ser sotmès a diferents tractaments amb bases nucleòfiles. Els valors es van calcular a partir de les integracions relatives dels diferents pics detectats en l'anàlisi per HPLC en fase inversa de cadascuna de les condicions assajades.

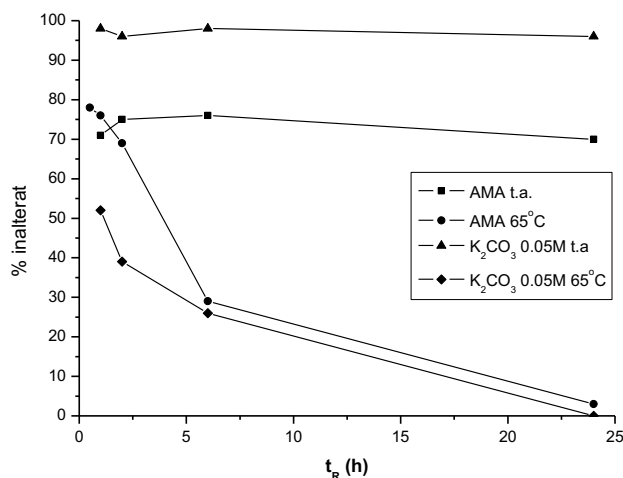


Figura 2.3. Representació gràfica dels valors de % de dinucleòsid **60** que resta inalterat després de ser sotmès a diferents tractaments amb bases nucleòfiles.

Analitzant el resultat obtingut, es pot afirmar que el pont dietilsulfona és làbil tant a l'AMA com al K_2CO_3 0.05 M en MeOH a 65°C, ja que després d'incubar el dinucleòsid durant 6 hores en aquestes condicions de reacció tan sols en restava inalterat al voltant del 30%, arribant a degradar-se completament a les 24 hores. En el cas concret de l'AMA a 65°C, després de tan sols 30 minuts de reacció (tractament estàndard en la desprotecció i desanclatge de l'RNA)¹⁴⁸ ja s'observava una degradació al voltant del 20%, que augmentava ràpidament conforme avançava el temps. Pel que fa a l'AMA a temperatura ambient, el comportament era força curiós: en tan sols una hora la degradació es situava al voltant del 25%, però un cop allí la reacció sembla arribar a l'equilibri, ja que no evolucionava gaire al llarg del temps, ni tan sols passades 24 hores. Cal tenir present que les condicions bàsiques d'aquests assaigs poden, eventualment, catalitzar la reacció de Michael d'addició de la timidina sobre la divinilsulfona. A diferència dels altres assaigs, els resultats obtinguts en el tractament amb K_2CO_3 0.05 M en MeOH a temperatura ambient indicaven l'estabilitat del pont de dietilsulfona enfront aquestes condicions de reacció; ni tan sols després de 24 hores s'apreciava pràcticament degradació del dinucleòsid. Aquests resultats eren molt interessants, ja que per una banda disposàvem d'unes condicions de desanclatge i desprotecció de l'oligonucleòtid en les quals la unió dietilsulfona era estable (fins a 24 hores amb K_2CO_3 0.05 M en MeOH a temperatura ambient), mentre que de l'altra n'havíem trobat unes de diferents que ens permetien trencar l'entrecreuament, si així ho desitjàvem.

Amb les dades obtingudes en aquest estudi d'estabilitat, estàvem preparats per emprar la unió dietilsulfona per unir cadenes d'oligonucleòtids sense perill de patir una reacció d'eliminació de la unió durant la desprotecció i desanclatge de l'oligonucleòtid.

2.2.3 Obtenció del derivat bisamidit de DMT-T entrecreuada

Per tal de preparar el bisamidit **66** a partir del dinucleòsid **60** vam seguir un procediment experimental anàleg a l'emprat per en Carlos Rodergas per obtenir el derivat bisamidit de la DMT-T entrecreuada amb una unió dietilsulfòxid.²⁵⁹ La reacció va tenir lloc amb un rendiment del 77%, usant 2-cianoetil-*N,N*-diisopropilclorofosforamidit com a agent fosfítant (*FIGURA 2.4*). Els millors resultats es van obtenir usant la totalitat de la clorofosfina subministrada per la casa comercial, ja

que es tracta d'un reactiu molt sensible que s'hidrolitza fàcilment, el que pot fer caure de forma significativa els rendiment de fosfitilació.

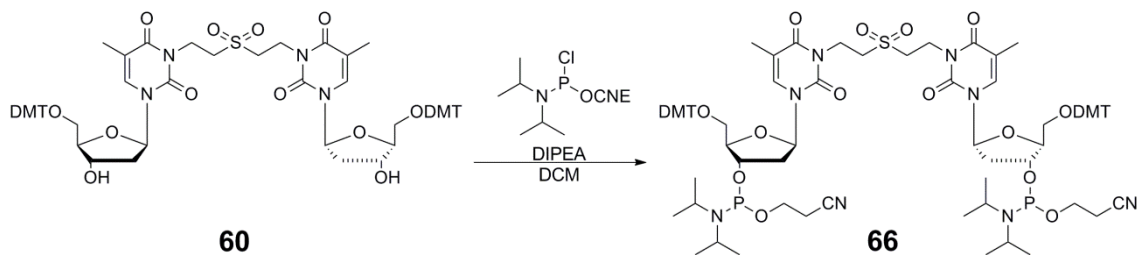


Figura 2.4. Obtenció del bisamidit **66** per doble fosfitilació del dinucleòsid **60**.

Cal destacar que en aquest cas era molt important assegurar-nos de la integritat de totes dues funcions fosforamidit, ja que la hidròlisi d'una de les dues a hidrogenfosfonat impediria el correcte entrecreuament de les cadenes, arruïnant d'aquesta manera l'aproximació. Afortunadament, en cap dels lots de bisamidit preparats i purificats vam detectar la presència del producte d'hidròlisi.

2.3 Síntesi d'oligonucleòtids entrecreuats amb la unió dietilsulfona

2.3.1 Obtenció del dúplex d(GCTCGTCGAGC) entrecreuat 67

La seqüència oligonucleotídica elegida per dur a terme la primera prova d'entrecreuament d'un dúplex amb la unió dietilsulfona va ser d(GCTCGTCGAGC) (**67**), on **T** representa el nucleòsid a través del qual s'uneixen totes dues cadenes (FIGURA 2.5.A). Aquest dúplex és el mateix que havia sintetitzat en Carlos Rodergas prèviament, si bé amb totes dues cadenes entrecreuades amb una unió dietilsulfòxid.²⁵⁹ D'aquesta manera podríem no només aprofitar la seva experiència amb la síntesi, purificació i caracterització del dúplex, sinó que a més tindríem un oligonucleòtid amb el que comparar les propietats del nou undecàmer entrecreuat.

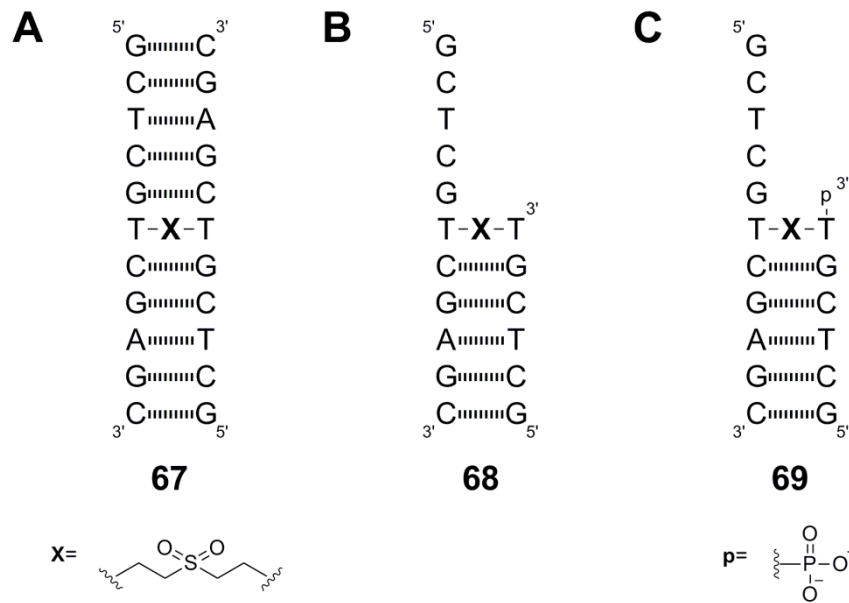


Figura 2.5. Undecàmer entrecreuat d(GCTCGT-CGAGC), així com els productes secundaris obtinguts durant la seva síntesi. **A.** Dúplex 4/4 entrecreuat. **B.** Dúplex incomplet 3/4. **C.** Dúplex incomplet 3/4 fosforilat en l'extrem 3' d'una de les cadenes.

2.3.1.1 Síntesi, purificació i caracterització

La síntesi del dúplex entrecreuat d(GCTCGT-CGAGC) es va dur a terme en el sintetitzador automàtic a escala 1 µmol, usant un cicle de síntesi on les úniques modificacions respecte de l'estàndard van ser un lleuger augment del temps d'acetilació de les seqüències no reaccionades i l'allargament fins als 10 minuts del temps d'acoblament del bisamidit **66**. L'elongació de la cadena oligonucleotídica va tenir lloc emprant derivats fosforamidits *Ultra-Mild* comercials dels diferents DMT-desoxiribonucleòsids, així com el bisamidit **66** sintetitzat per nosaltres. L'ús de l'estratègia *Ultra-Mild* de protecció dels nucleòsids era imprescindible ja que les condicions de desancoratge i desprotecció que preteníem usar, elegides per tal de mantenir la integritat de la unió dietilsulfona, no eren suficientment agressives per tal d'eliminar alguns dels protectors emprats en l'estratègia de protecció estàndard de les nucleobases. D'altra banda cal destacar que la concentració de la solució del bisamidit va ser de 0.03 M, inferior a la 0.1 M usada habitualment en el cas dels monoamidits, per tal d'afavorir la formació del dúplex entrecreuat **67** (anomenat per nosaltres 4/4) i minimitzar la generació del dúplex incomplet **68** (anomenat per nosaltres 3/4). Per acabar, cal dir que es va mantenir el grup DMT en l'extrem 5' de l'oligonucleòtid en acabar la síntesi per tal de facilitar la purificació de l'oligonucleòtid.

Un cop finalitzada la síntesi de l'oligonucleòtid se'n va dur a terme el desancoratge del suport sòlid, així com la seva desprotecció, mitjançant un tractament amb K_2CO_3 0.05 M en MeOH durant 16 hores a temperatura ambient. El cru de desancoratge es va neutralitzar amb TEAA 2 M a pH=7 i es va purificar directament per HPLC semipreparatiu en fase inversa. Tal com es mostra en el cromatograma de la FIGURA 2.6, s'observaven dos productes majoritaris diferents que tenen temps de retenció de l'ordre dels oligonucleòtids que contenen el grup DMT en l'extrem 5'. Ambdós productes van ser purificats i, un cop eliminat el grup protector DMT, degudament caracteritzats per EM-MALDI-TOF, revelant-se que el producte amb temps de retenció menor es corresponia a l'oligonucleòtid 4/4 **67** ($[M-2H^++K^+]^-_{calc}=6817$; $[M-2H^++K^+]^-_{exp}=6818$), mentre que el que presentava un temps major es tractava de l'oligonucleòtid 3/4. Cal destacar que en el cas del producte 3/4 s'observava la massa tant de l'oligonucleòtid amb un fosfat en l'extrem 3' de la cadena curta (**69**) ($[M-2H^++K^+]^-_{calc}=5349$; $[M-2H^++K^+]^-_{exp}=5349$), (FIGURA 2.5.B) com el que l'havia perdut (**68**) ($[M-2H^++K^+]^-_{calc}=5272$; $[M-2H^++K^+]^-_{exp}=5271$), (FIGURA 2.5.C).

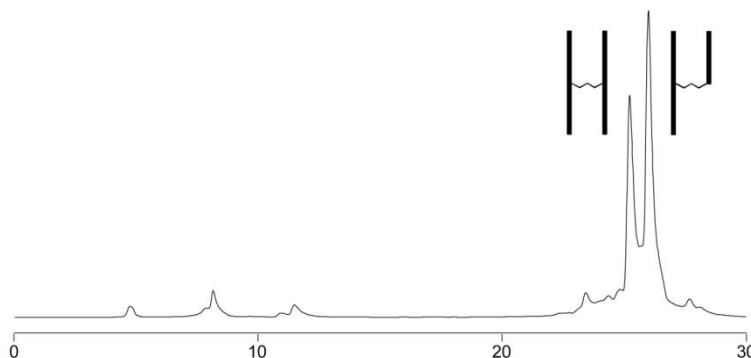


Figura 2.6. Cromatograma obtingut en la purificació per HPLC en fase inversa de l'undecàmer d(GCTCGTCGAGC). El pic amb un temps de retenció menor es correspon al dúplex entrecreuat **67**, mentre que el que presenta un temps de retenció major es tracta d'una barreja dels dúplexs incomplets **68** i **69**.

Un cop convenientment purificats, vam obtenir 13 OD₂₆₀ de l'oligonucleòtid 4/4 **67**, el que corresponia a un rendiment del 13%. Per la seva banda, de la barreja d'oligonucleòtids 3/4 **68** i **69** vam obtenir 8 OD₂₆₀, el que equivalia a un rendiment del 5%. En aquest punt cal indicar que, al llarg de la present Tesi Doctoral, s'ha calculat el rendiment d'oligonucleòtid 4/4 obtingut tenint en compte que, si l'acoblament entre les cadenes hagués tingut lloc de forma quantitativa, s'obtidrien 0.5 μmol de dúplex entrecreuat per cada μmol de resina usada.

Es va dur a terme una segona síntesi d'aquesta seqüència a una escala 2x1 µmol, obtenint-se 19 OD₂₆₀ del dúplex 4/4 (rendiment del 10%) i 35 OD₂₆₀ de la barreja d'oligonucleòtids 3/4 **68** i **69** (rendiment del 11%). Cal destacar que en Carlos Roderigas havia obtingut rendiments sensiblement inferiors (al voltant del 4%) en la síntesi del mateix dúplex entrecreuat amb el pont dietilsulfòxid,²⁵⁹ en gran part degut a l'ús d'un protocol de purificació diferent.

Finalment, per tal de confirmar la presència de l'entrecreuament entre les timidines en el dúplex **67**, aquest es va sotmetre a una digestió enzimàtica amb fosfodiesterasa de verí de serp (SVPD) i fosfatasa alcalina (AP) i es va comparar la proporció de nucleòsids i dinucleòsid entrecreuat esperada amb la que es va trobar experimentalment. Com es pot observar en la *TAULA 2.2*, es va poder confirmar la presència del dinucleòsid unit pel pont dietilsulfona en el dúplex.

	dC	dG	T	dA	T-T
Proporció Esperada	8.0	8.0	2.0	2.0	1.0
Proporció Trobada	8.3	8.4	1.6	1.6	1.0

Taula 2.2. Comparació entre la proporció de nucleòsids i del dinucleòsid entrecreuat T-T trobats experimentalment en sotmetre el dúplex 4/4 **67** a digestió enzimàtica amb els valors esperats.

Així doncs, havíem dut a terme la síntesi de l'undecàmer entrecreuat **67** amb un pont dietilsulfona amb rendiments força acceptables donat les característiques del mètode de síntesi (10-13%). La metodologia, a més, es caracteritza per la fàcil separació per HPLC en fase inversa del dúplex 4/4 desitjat de la seqüència 3/4, degut a la diferència en el temps de retenció d'ambdós oligonucleòtids quan es troben protegits amb els grups DMT.

2.3.2 Obtenció del dúplex d(GCTGCTGCTGC) entrecreuat 70

El següent objectiu que ens vam plantejar va ser la síntesi d'un dúplex de DNA entrecreuat format per repeticions CTG. L'expansió d'aquestes repeticions, com ja s'ha explicat en la introducció, és la causa primària de l'aparició de malalties com la DM1,³¹ pel que ens semblava interessant abordar la síntesi d'un dúplex de DNA entrecreuat que les contingués. La seqüència elegida va ser l'undecàmer d(GCTGCTGCTGC) (**70**), formada per tres repeticions CTG als quals s'addiciona un parell C-G a cada extrem. En la seqüència **T** representa el nucleòsid a través del qual s'uneixen totes dues cadenes mitjançant la unió dietilsulfona (FIGURA 2.7).

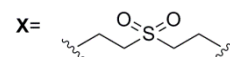
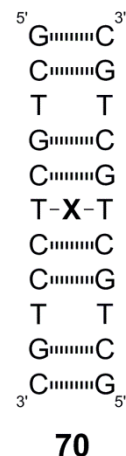


Figura 2.7. Dúplex d(GCTGCTGCTGC) entrecreuat **70**

2.3.2.1 Síntesi, purificació i caracterització

La síntesi del 11mer **70** es va dur a terme en el sintetitzador automàtic a escala 2x1 µmol de forma anàloga a la descrita en l'apartat 2.3.1.1. Un cop finalitzada la síntesi, l'oligonucleòtid es va desancorar de la resina i es va purificar seguint el mateix protocol descrit en l'apartat 2.3.1.1. Durant la purificació per HPLC en fase inversa es va observar també una clara separació entre el dúplex entrecreuat 4/4 **70** ($[M-H^++Na^+]_{calc}=6789$; $[M-H^++K^+]_{exp}=6788$), i el producte 3/4 no desitjat, els quals van ser caracteritzats de forma inequívoca per EM-ESI. Un cop convenientment repurificat, es van obtenir 45 OD₂₆₀ de l'oligonucleòtid 4/4 **70**, el que equival a un rendiment del 17%. En darrer lloc, es va corroborar la presència de l'entrecreuament entre timidines per mitjà de digestió enzimàtica (TAULA 2.3).

	dC	dG	T	T-T
Proporció Esperada	8.0	8.0	4.0	1.0
Proporció Trobada	7.4	9.0	3.8	0.8

Taula 2.3. Comparació entre la proporció de nucleòsids i del dinucleòsid entrecreuat T-T trobats experimentalment en sotmetre el dúplex 4/4 **70** a digestió enzimàtica amb els valors esperats.

2.3.3 Oligonucleòtids entrecreuat per una unió escalonada

Fins a aquest punt tots els oligonucleòtids units pel pont dietilsulfona que havíem preparat presentaven l'entrecreuament del dúplex entre dues bases enfrontades. Això suposava una certa limitació en els dúplexs que es podien preparar, pel que ens vam plantejar obtenir oligonucleòtids entrecreuat on la unió no tingués lloc entre dues bases enfrontades sinó entre dues d'escalonades (*staggered*). El principal avantatge d'unir les cadenes d'un dúplex de forma escalonada en lloc de fer-ho entre les bases enfrontades és que, un cop eliminat l'entrecreuament, el dúplex resultant podria ser perfectament complementari en lloc de presentar un *mismatch* (FIGURA 2.8).

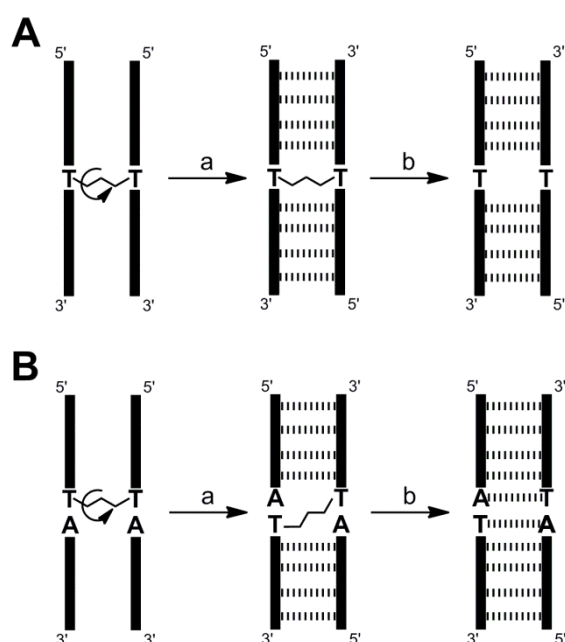


Figura 2.8. Les cadenes entrecreuat es sintetitzen en foase sòlida de forma paral·lela, però degut a l'autocomplementarietat de la seqüència, es poden estructurar en forma de dúplex antiparal·lel un cop es separen de la resina (a). Quan s'elimina la unió (b), s'obté un dúplex que presentés un *mismatch* en el cas que l'entrecreuament tingui lloc entre bases enfrontades (A) o bé un dúplex perfectament complementari en el cas que la unió sigui de tipus *staggered* (B).

En aquest sentit, la Roser Borràs en el seu Màster en Química Avançada²⁶² va preparar el dúplex entrecreuat d(CCGTACCGG) **71**, en el qual la unió entre les cadenes del dúplex té lloc de forma escalonada. Aquí ens limitarem a fer un breu comentari sobre els resultats obtinguts. Tant la síntesi com la purificació del dúplex es van portar a cap a escala 1 μ mol seguint el protocol descrit en l'apartat 2.3.1.1, obtenint-se 29 OD₂₆₀ del dúplex **71**, el que equivalia a un rendiment del 5%. Aquests rendiment, inferiors als obtinguts en el cas dels oligonucleòtids **67** i **70**, van ser en gran part degut a un rendiment de síntesi inferiors als habituals. A l'espera de portar a cap l'anàlisi

estructural d'aquest dúplex, es pot afirmar que la metodologia d'entrecreuament d'oligonucleòtids mitjançant un pont dietilsulfona és útil per preparar dúplexs on la unió tingui lloc entre dues bases no enfrontades.

2.4 Estudi de les propietats dels oligonucleòtids entrecreuats

2.4.1 Reversibilitat de l'entrecreuament

La primera de les propietats del dúplex entrecreuat que ens vam plantejar estudiar va ser la reversibilitat de la unió dietilsulfona, és a dir, la capacitat d'eliminar-la després d'haver-la introduït. Com ja s'ha explicat anteriorment, aquest unió pot sofrir una reacció d'eliminació en presència de bases, trencant d'aquesta manera l'entrecreuament entre els dos oligonucleòtids. La capacitat d'eliminar la unió entre totes dues cadenes quan ho desitgèssim, recuperant d'aquesta manera la seqüència lineal, ens semblava molt interessant, pel que vam decidir dur a terme diferents assaigs per tal de trobar unes condicions de reacció en les que fos possible.

Els primers medis bàsics nucleòfils que vam decidir provar per tal de dur a terme la reacció de ruptura de la unió dietilsulfona van ser l'AMA a 65°C i el K₂CO₃ 0.05 M en MeOH, també a 65°C, ja que havíem observat que totes dues mescles eren capaces de provocar la reacció d'eliminació en el dinucleòsid **60** (TAULA 2.1., FIGURA 2.3).

Vam dissoldre dues mostres del dúplex una amb AMA i l'altra amb K₂CO₃ 0.05 M en MeOH, i les vam deixar reaccionant a 65°C. Vam agafar dues alíquotes de cada mescla de reacció, una a les 8 hores i l'altra a les 24 hores, i les vam analitzar per PAGE (FIGURA 2.9).

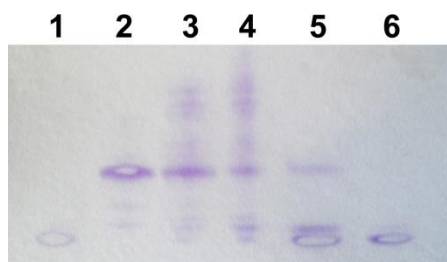


Figura 2.9. Anàlisi per PAGE dels diversos assaigs de trencament del dúplex **67** amb bases nucleòfiles. **1.** Undecàmer d(GCTCGTCGAGC) lineal **72**. **2.** Dúplex d(GCTCGTCGAGC) 4/4 entrecreuat **67**. **3.** Assaig de trencament amb AMA a 65°C durant 8 h. **4.** Assaig de trencament amb AMA a 65°C durant 24 h. **5.** Assaig de trencament amb K₂CO₃ 0.05 M en MeOH a 65°C durant 8 h. **6.** Assaig de trencament amb K₂CO₃ 0.05 M en MeOH a 65°C durant 24 h.

Com es pot apreciar en el PAGE, el tractament amb AMA a 65°C no va ser suficient per tal de provocar de forma complerta la reacció d'eliminació, ja que després de 24 hores (carril 4) el producte majoritari de la reacció seguia sent el dúplex entrecreuat **67**. En canvi, en el cas del tractament amb K₂CO₃ 0.05 M en MeOH a 65°C, després de 8 hores (carril 5) l'oligonucleòtid lineal **72** (FIGURA 2.10) era ja el producte majoritari de la reacció, observant-se, però, encara part del dúplex entrecreuat **67**, així com una banda amb una mobilitat electroforètica lleugerament inferior a l'oligonucleòtid lineal **72** que imaginàvem que era un producte de trencament. Passades 24 hores (carril 6) la reacció era gairebé complerta, observant-se encara restes del producte desconegut però no així del dúplex **67** de partida. El tractament amb K₂CO₃ 0.05 M en MeOH a 65°C semblava, per tant, ésser un mètode eficaç per obtenir l'oligonucleòtid lineal a partir del seu corresponent dúplex entrecreuat.

Seguidament vam dur a terme un estudi cinètic de la reacció d'eliminació del dúplex entrecreuat **67** amb K₂CO₃ 0.05 M en MeOH a 65°C. Vam agafar alíquotes a les 4, 8, 16, 24 i 48 hores del cru de reacció i es van analitzar per HPLC en fase inversa (FIGURA 2.10). Ambdós oligonucleòtids (**72** i **73**), juntament amb el dúplex **67**, van ser caracteritzats per EM-MALDI-TOF i van poder ser assignats de forma inequívoca als diferents pics dels cromatogrames d'HPLC.

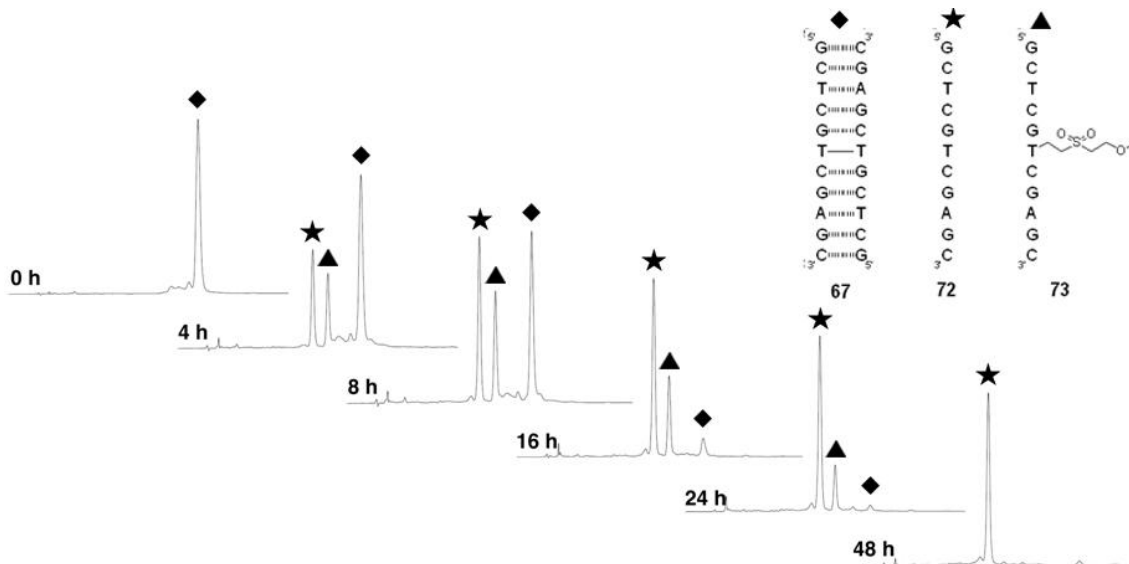


Figura 2.10. Superposició dels cromatogrames obtinguts en analitzar el trencament del dúplex entrecreuat **67** mitjançant el tractament amb K₂CO₃ 0.05 M en MeOH a 65°C per HPLC en fase inversa.

Com es pot apreciar, ja a les 4 hores s'observava l'aparició de dos pics amb un temps de retenció menor que el del dúplex entrecreuat. El pic que s'el·luïa primer es corresponia a la seqüència lineal **72**, mentre que el que ho feia en segon lloc es corresponia al producte de trencament del dúplex **73**. Aquest oligonucleòtid es genera en dues etapes: primerament té lloc la reacció de retro-Michael d'una de les unions etilsulfona, regenerant-se la vinilsulfona, la qual actua com a acceptor de Michael del MeO^- present en el medi, formant-se així l'oligonucleòtid **73**. Aquest sofreix posteriorment una segona reacció de retro-Michael en l'etilsulfona que resta unida a la cadena oligonucleotídica, generant d'aquesta manera la seqüència lineal **72** (FIGURA 2.11).

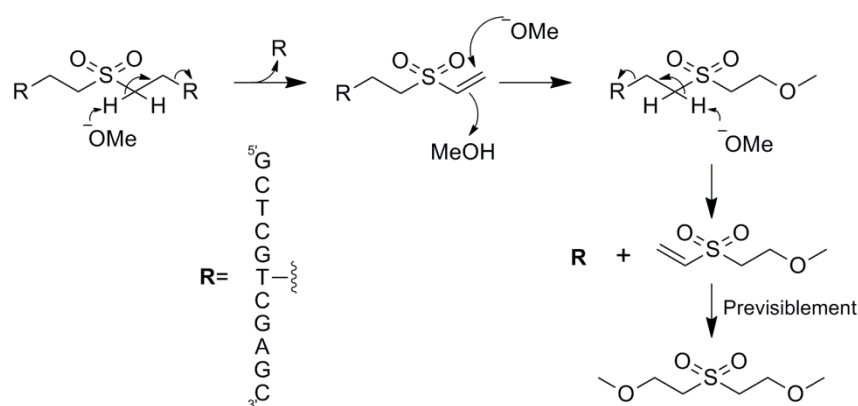


Figura 2.11. Mecanisme proposat pel trencament de dúplex **67** en presència de $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{MeOH}$ via una doble reacció d'eliminació.

A partir de les àrees integrades de cada pic, i tenint en compte el coeficient d'extinció molar de cada seqüència, vam poder calcular la proporció de cadascun dels oligonucleòtids als diferents temps de reacció. Les dades obtingudes, mostrades en la TAULA 2.4, revelaven que, si bé després de 16 hores més d'un 95% del dúplex entrecreuat 4/4 s'havia trencat, havien sigut necessàries 48 hores per tal que la reacció fos completa i la totalitat de dúplex entrecreuat **67** s'hagués convertit en l'oligonucleòtid lineal **72**. Aquest resultat estava en concordança amb el que s'observa per PAGE a les 24 hores de tractament amb K_2CO_3 en MeOH (FIGURA 2.9). En ell es podia apreciar que, si bé el trencament del dúplex **67** era gairebé total, encara quedava una part del producte **73** en el medi.

	Oligonucleòtid 67	Oligonucleòtid 73	Oligonucleòtid 72
0 h	100%	0%	0%
4 h	42%	24%	34%
8 h	27%	29%	44%
16 h	4%	29%	67%
24 h	1%	18%	81%
48 h	0%	0%	100%

Taula 2.4. Taula resum dels resultats obtinguts en el trencament del dúplex **67** amb K_2CO_3 0.05 M en MeOH a 65°C. Els valors indiquen la proporció de cadascun dels oligonucleòtids a diferents temps de reacció, calculats a partir de l'àrea integrada de cada pic en els anàlisis per HPLC en fase inversa.

Tot i els bons resultats obtinguts, els temps de reacció ens semblaven una mica massa llargs, pel que vam decidir emprar un captador d'acceptors de Michael (*scavenger*) per intentar accelerar-la. Els *scavengers* triats van ser el CH_3NO_2 ²⁶³ i la piperidina,²⁶⁴ els quals van ser afegits a la mescla de reacció en un 10%. L'anàlisi per HPLC en fase inversa va revelar que la piperidina no només no disminuïa el temps de reacció sinó que l'augmentava; això sembla indicar que el propi metòxid present en la mescla original és un millor *scavenger* que la piperidina. En el cas del nitrometà no va ser possible analitzar el cru de trencament per HPLC en fase inversa, atès que la gran absorbància d'aquest reactiu saturava el detector UV del cromatògraf. Per la seva banda, l'anàlisi del cru per PAGE no va mostrar una millora apreciable respecte les condicions originals. Finalment, es va dur a terme una prova emprant K_2CO_3 0.05 M en MeOH a 60°C al microones, amb uns resultats també inferiors als obtinguts anteriorment.

En resum, la unió dietilsulfona usada per entrecreuar les cadenes d'un dúplex és totalment reversible, ja que un tractament de l'oligonucleòtid amb K_2CO_3 0.05 M en MeOH a 65°C durant 48 hores permet eliminar aquest entrecreuament i recuperar l'oligonucleòtid lineal. És particularment destacable el fet que la solució usada per desancorar l'oligonucleòtid de la resina, mantenint l'entrecreuament intacte, i la usada per trencar el pont entre les cadenes sigui la mateixa, essent tant sols la temperatura de reacció el factor que determina la integritat o no de la unió dietilsulfona.

2.4.2 Estudi de l'estabilitat tèrmica dels dúplex entrecreuats

Quan els oligonucleòtids estan estructurats, com en un dúplex, les seves nucleobases es troben apilades. Aquest apilament causa una disminució en la intensitat d'absorció en l'espectre d'UV, el que es coneix com a hipocromicitat.²⁶⁵ En augmentar la temperatura del medi es produeix una desestructuració (desnaturalització) del dúplex, el que provoca un desapilament de les bases nitrogenades i, conseqüentment, un augment de l'absorbància. La mesura d'aquesta variació de l'absorbància amb la temperatura, que dóna lloc a corbes de tipus sigmoide, és el que es coneix com a corba de desnaturalització tèrmica o de fusió. El punt d'inflexió en la variació de l'absorbància és l'anomenada temperatura de fusió (T_m) i representa la temperatura en la que el 50% de l'oligonucleòtid es troba estructurat mentre l'altre 50% està desnaturalitzat, pel que és un bon mètode per tal de mesurar l'estabilitat tèrmica d'un dúplex (FIGURA 2.12).

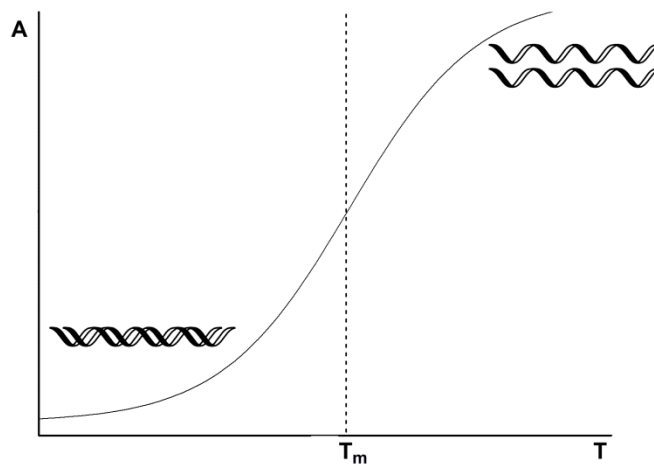


Figura 2.12. Exemple de corba de fusió per UV. En la part inferior de la corba sigmoïdal l'oligonucleòtid està totalment estructurat. Segons s'augmenta la temperatura el dúplex es dissocia donant lloc a dues cadenes separades en el plató superior de la corba. El punt mig de la corba, on la meitat de l'oligonucleòtid es troba hibridat i l'altra meitat desestructurat, és el que es coneix com a temperatura de fusió (T_m).

A l'hora d'enregistrar la corba de fusió, el primer pas és dur a terme l'estructuració (*annealing*) del dúplex. Un cop estructurat correctament es quantifica la variació de l'absorbància de la mostra a l'augmentar la temperatura dels 15 al 95°C. Les dades experimentals obtingudes es s'ajusten matemàticament a una sigmoide, obtenint-se una equació a partir de la qual es calcula el valor de la T_m .

L'anàlisi mitjançant corbes de fusió de la influència de l'entrecreuament del oligonucleòtids amb una unió dietilsulfona en l'estabilitat tèrmica dels dúplexs vam dur-lo a terme emprant els dos undecàmers que havíem sintetitzat, tant el d(GCTCGTCGAGC) **67** com el d(GCTGCTGCTGC) **70**.

2.4.2.1 Estabilitat del dúplex d(GCTCGTCGAGC) entrecreuat **67**

El primer oligonucleòtid entrecreuat del qual vam avaluar l'estabilitat tèrmica (T_m) va ser el dúplex **67** d(GCTCGTCGAGC) (FIGURA 2.13.A), la qual volíem comparar amb la del dúplex format per la seqüència lineal. El dúplex **74** format per l'undecàmer **72** (FIGURA 2.13.B), però, no és perfectament complementari, ja que presenta un *mismatch* entre les dues timidines del centre de la seqüència. Per aquest motiu ens va semblar interessant comparar també el dúplex entrecreuat **67** amb el **76**, que formarien l'11mer **72** i el seva seqüència complementària d(GCTCGACGAGC) **75** (FIGURA 2.13.C).

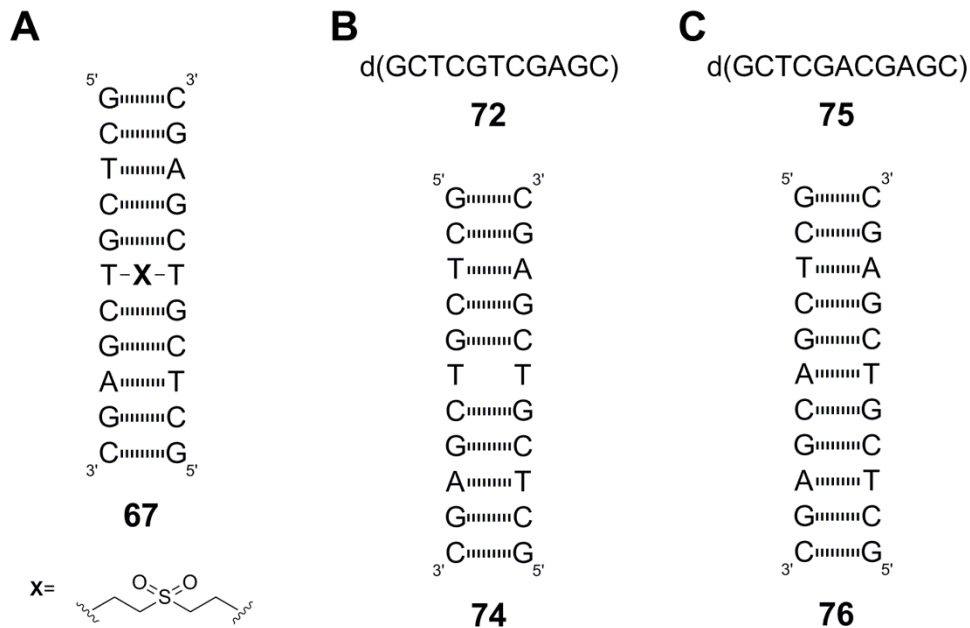


Figura 2.13. Diferents oligonucleòtids emprats en l'estudi de l'estabilitat tèrmica del dúplex d(GCTCGTCGAGC) **67**. **A.** Dúplex entrecreuat **67**. **B.** Oligonucleòtid lineal d(GCTCGTCGAGC) (**72**) i dúplex que forma al hibridar-se de forma autocomplementària (**74**). **C.** Oligonucleòtid lineal d(GCTCGACGAGC) (**75**) i dúplex que forma (**76**) al hibridar-se amb l'oligonucleòtid **72**.

Per dur a terme aquests estudis calia primer preparar els oligonucleòtids lineals **72** i **75**. La seqüència d(GCTCGTCGAGC) (**72**) havia sigut sintetitzada anteriorment per en Carlos Roderigas durant el transcurs del seu Màster.²⁵⁹ Un anàlisi de l'oligonucleòtid va revelar que no calia repurificar-lo.

L'oligonucleòtid **75** d(GCTCGACGAGC), en canvi, vam haver de preparar-lo. La síntesi (a escala 1 µmol), desancoratge i desprotecció de la seqüència va realitzar-se de forma anàloga a la descrita en l'apartat 2.2.2.1 del Bloc 1 per l'obtenció del d(GCA)₆ variant, però, la seva purificació, que va dur-se a terme per HPLC en fase inversa, obtenint-se 52 OD₂₆₀, el que representava un rendiment del 50%.

Per dur a terme les corbes de fusió dels diferents dúplexs vam emprar una concentració de 2 µM del dúplex en un medi tamponat format per Pipes 10 mM, NaCl 100 mM i MgCl₂ 10 mM.

En la *FIGURA 2.14* es mostra la superposició de les corbes de fusió obtingudes per cada dúplex, així com els valors de T_m obtinguts. El valors de T_m mostrats es corresponen a la mitjana aritmètica de tres mesures independents.

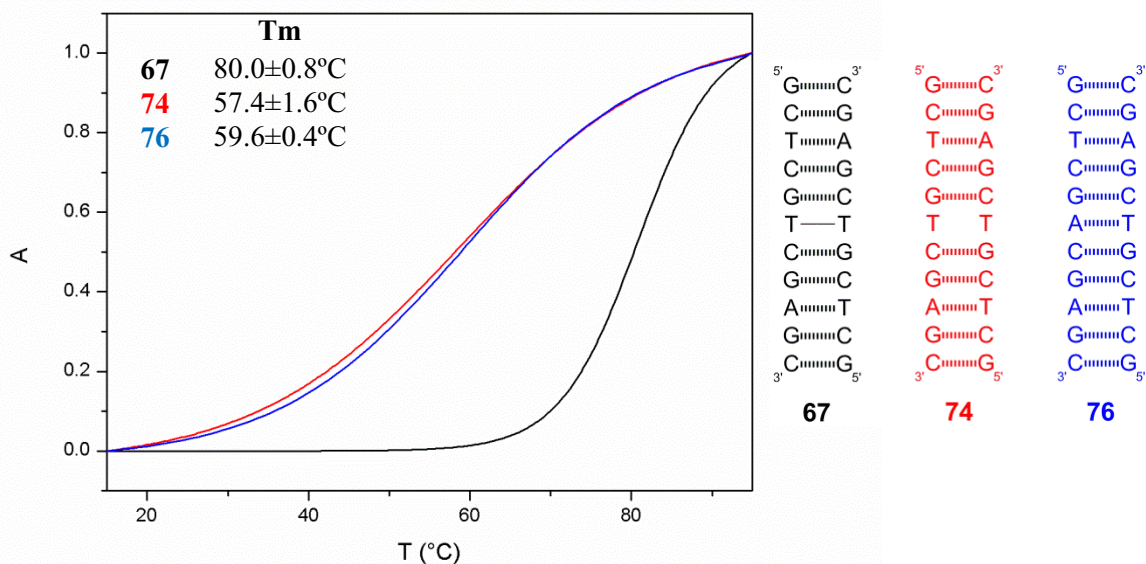


Figura 2.14. Superposició de les corbes de fusió obtingudes pel dúplex de l'oligonucleòtid entrecruat **67** (—) i els dúplexs amb un mismatch **74** (—) i perfectament complementaris **76** (—). En el gràfic es mostren els valors de T_m calculats per cada dúplex.

Analitzant els resultats obtinguts, s'observa una clara diferència entre el dúplex entrecreuat **67** i els dúplexs bimoleculars **74** i **76**. D'una banda, el perfil de la corba canvia de forma important, mostrant una fusió molt més cooperativa en el cas del dúplex entrecreuat. Això podria ser degut a que l'oligonucleòtid **67** no pot adoptar altres conformacions, mentre que ambdós dúplexs bimoleculars (**74** i **76**) es poden estructurar diversament, per exemple en forma de *hairpins*. D'altra banda, s'observa un augment molt significatiu de la T_m de l'oligonucleòtid entrecreuat **67** ($>20^\circ\text{C}$), tant respecte al dúplex que presenta un *mismatch* **74** com amb el perfectament complementari **76**. Aquest augment de l'estabilitat tèrmica dels dúplex units covalentment respecte als seus anàlegs no entrecreuats no és cap sorpresa i es troba vastament descrit en la bibliografia.^{133b,c,241,251,255a} La variació és en gran part deguda al fet que a l'estar totes dues cadenes unides de forma covalent el procés de desnaturalització és unimolecular, el qual és independent de la concentració de l'oligonucleòtid, mentre que si no ho estan el procés és bimolecular.²⁵²

Si comparem el valors de la T_m obtinguts en el cas dels dos dúplexs bimoleculars **74** i **76** observem, com és lògic, que el dúplex perfectament complementari **76** és lleugerament més estable que el seu anàleg amb un *mismatch* **74** (59.6°C davant 57.4°C). Val la pena destacar també que el valor de T_m obtingut experimentalment en el cas del dúplex perfectament complementari **76** es troba en bona consonància amb l'anticipat per l'eina de càlcul OligoAnalyzer 3.1²⁶⁶ (58.8°C calculat enfront 59.6°C experimental).

Finalment, comparant la T_m obtinguda en el cas del dúplex d(GCTCGTCGAGC) entrecreuat **67** mitjançant la unió dietilsulfona amb la del seu anàleg unit pel pont dietilsulfòxid mesurada per en Carlos Roderigas,²⁵⁹ s'observa que la diferència entre totes dues (80.0°C dietilsulfona enfront 79.2°C dietilsulfòxid) és del mateix ordre que l'error experimental, pel que podem considerar que el grau d'oxidació del sofre present en la unió entre les dues cadenes del dúplex no influeix en l'estabilitat del mateix.

En resum, la unió covalent d'ambdues cadenes d'un dúplex a través d'una dietilsulfona augmenta de forma significativa l'estabilitat tèrmica del propi dúplex. La restricció conformacional introduïda provoca un augment notable de l'estabilitat (més de 20°C) de l'estructura que hauria de facilitar l'estudi de seqüències com per exemple les que contenen repeticions del triplet CTG.

2.4.2.2 Estabilitat de l'undecàmer d(GCTGCTGCTGC) entrecreuat 70

El següent pas consistia en avaluar la influència de la unió dietilsulfona en el dúplex entrecreuat d(GCTGCTGCTGC) **70**, el qual conté repeticions CTG i presenta diversos *mismatches* entre les T enfrontades. Les corbes de fusió i el valor de Tm obtinguts els comparàrem amb el seu anàleg no entrecreuat **78**, format per l'oligonucleòtid lineal d(GCTGCTGCTGC) **77** (FIGURA 2.15).

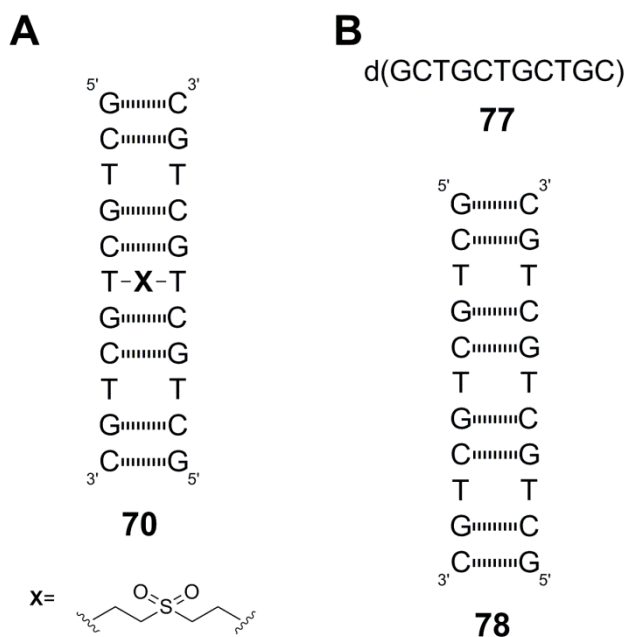


Figura 2.15. Diferents oligonucleòtids emprats en l'estudi de l'estabilitat tèrmica del dúplex d(GCTGCTGCTGC). **A.** Dúplex d(GCTGCTGCTGC) entrecreuat **70**. **B.** Oligonucleòtid lineal d(GCTGCTGCTGC) **77** i dúplex que forma al hibridar-se (**78**).

Per preparar l'oligonucleòtid lineal d(GCTGCTGCTGC) **77** ens vam servir de la reversibilitat de la unió dietilsulfona descrita en l'apartat 2.4.1, i el vam obtenir a partir del dúplex entrecreuat **70** mitjançant una reacció de retro-Michael amb K₂CO₃ 0.05 M en MeOH a 65°C durant 48 hores. Passat aquest temps es va purificar l'oligonucleòtid lineal per HPLC semipreparatiu. Cal destacar que després d'aquest tractament restava encara un 8% de producte anàleg a l'oligonucleòtid **73** (divinilsulfona monosubstituïda), mentre que en l'estudi de reversibilitat dut a terme amb el dúplex **67** no s'observava la presència d'aquest producte passades 48 hores de reacció (TAULA 2.4). Això sembla indicar que depenent de la seqüència o d'altres factors experimentals és possible que es requereixi un major temps per a que la reacció de trencament de la unió dietilsulfona sigui completa.

La mesura de les corbes de fusió tant del dúplex entrecreuat **70** com del dúplex bimolecular **78** es va dur a terme usant les condicions i el procediment descrit en l'apartat anterior. En la *FIGURA 2.16* es mostra la superposició de diferents corbes enregistrades.

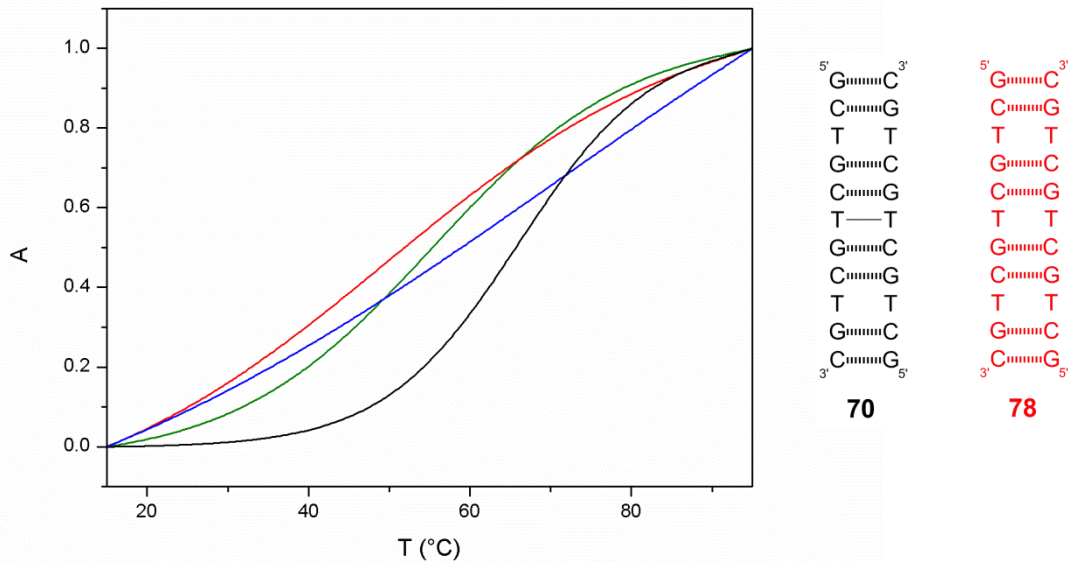


Figura 2.16. Superposició de la corba de fusió obtinguda de l'oligonucleòtid entrecreuat **70** (—) i de 3 de les enregistrades del dúplex **78** (—, — i —).

Els resultats obtinguts en aquest estudi van resultar molt particulars. D'una banda, cal destacar la impossibilitat d'obtenir perfils reproduïbles en la fusió del dúplex no entrecreuat **78** format per l'oligonucleòtid lineal d(GCTGCTGCTGC). Aquests experiments es van realitzar fins a sis vegades, enregistrant en cada cas una corba de fusió amb un perfil completament diferent, essent sempre corbes no cooperatives i mostrant histèresi entre les pujades i les baixades. A més a més, sovint no mostraven una fusió definida, el que feia que no tingués sentit calcular cap temperatura de fusió. A tall d'exemple es mostren en la *FIGURA 2.16* tres de les corbes obtingudes. Aquesta disparitat està amb consonància amb l'existència d'un conjunt de conformacions diferents adoptades pels oligonucleòtids amb repeticions CTG, tot i que el procés d'*annealing* va portar-se a cap sempre de la mateixa manera.

La situació en el cas del dúplex entrecreuat **70**, en canvi, va ser molt diferent. Com es pot observar en la *FIGURA 2.16*, es va obtenir una corba cooperativa amb una fusió definida, la qual va permetre calcular que la T_m del dúplex entrecreuat era de $65.5 \pm 1.2^\circ\text{C}$. La introducció de la unió dietilsulfona en el dúplex d(GCTGCTGCTGC), per tant, havia comportat l'eliminació de gran part de l'equilibri conformacional que mostrava el dúplex no entrecreuat que contenia repeticions CTG, estabilitzant l'estructura dúplex.

En darrer lloc vam voler comparar els dos dúplex entrecreuats sintetitzats. Tal com es pot apreciar en la *FIGURA 2.17*, el dúplex **67** presenta una fusió força més cooperativa que el seu anàleg **70** format per repeticions CTG i amb dos *mismatches* T-T, a més de ser sensiblement més estable (80°C enfront 66°C). La introducció d'un *mismatch* a prop de cada extrem del dúplex **70** pot, al menys en part, justificar aquesta diferència. En definitiva, l'estabilització i restricció conformacional introduïda per part de la unió dietilsulfona és suficientment important per tal de permetre l'estudi de les seqüències que continguin repeticions CTG, el qual era el nostre objectiu.

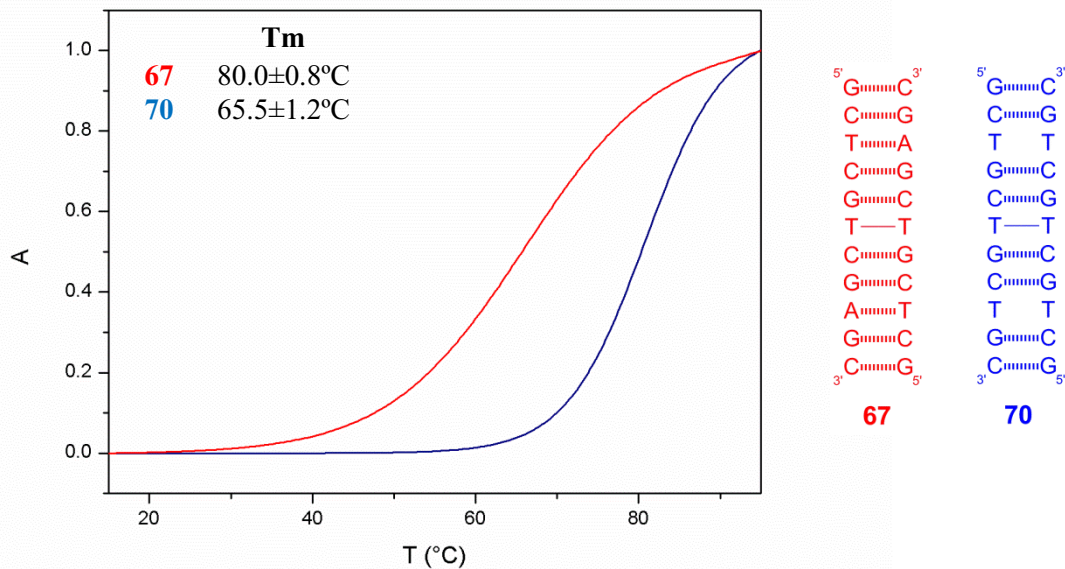


Figura 2.17. Superposició de les corbes de fusió obtingudes en el cas dels oligonucleòtid entrecreuat d(GCTCGTGCAGC) **67** (—) i d(GCTGCTGCTGC) **70** (—). En el gràfic es mostren els valors de T_m calculats per cada dúplex.

2.4.3 Estudi de la conformació dels dúplex entrecreuats

La tercera i última de les propietats del dúplex entrecreuat que vam decidir analitzar va ser la seva conformació mitjançant el dicroisme circular.²⁶⁷

El dicroisme circular és una tècnica espectroscòpica consistent en fer interaccionar amb un feix de llum polaritzada circularment una molècula òpticament activa i quantificar la diferència en l'absorció de les components polaritzades circularment a l'esquerra i a la dreta a diferents longituds d'ona ($\Delta A = A_L - A_R$). Això és degut a que en un medi òpticament actiu els coeficients d'extinció molar per a la llum polaritzada a la dreta i a l'esquerra són diferents, pel que al sortir del medi les dues components es troben desfasades i amb diferent amplitud, el que provoca que la llum s'hagi convertit en llum polaritzada el·lípticament. Per raons històriques es sol representar l'angle d'el·lípticitat θ (en graus), calculat mitjançant la ΔA mesurada a partir de $\theta = \Delta A \cdot 32.98$. En aquesta tesi hem decidit representar l'el·lípticitat molar $[\Theta]_M$, la qual permet compensar els efectes de la concentració i comparar els espectres entre diferents oligonucleòtids, calculada (en $\text{deg} \cdot \text{cm}^2/\text{dmol}$) mitjançant

$$[\Theta]_M = \frac{\theta_\lambda}{10 \cdot l \cdot c}$$

on θ_λ és l'el·lípticitat mesurada en miligrans (mdeg), l és la longitud del pas òptic en cm i c és la concentració molar (mol/dm^3).

Les bases nitrogenades presents en els àcids nucleics són importants cromòfors, tot i que degut a que presenten un pla de simetria no són òpticament actives per elles mateixes, convertint-s'hi un cop unides amb el sucre quiral a través de l'enllaç glicosídic. Quan un oligonucleòtid es troba formant una estructura helicoïdal, les bases interaccionen entre elles i donen lloc a espectres de dicroisme circular molt intensos. Aquests espectres depenen principalment de la interacció entre les bases, convertint consegüentment el dicroisme circular en una tècnica extremadament sensible per tal de detectar variacions en l'estructura dels àcids nucleics, les quals modifiquen les relacions espacials entre les diferents nucleobases. Tot i això, resulta molt complicat dur a terme una interpretació directa de les bandes, pel que la informació estructural es sol obtenir a partir de la comparació amb els espectres realitzats de compostos amb una conformació coneguda (FIGURA 2.18²⁶⁸).

En el nostre cas, el principal interès era saber si la introducció de la unió dietilsulfona modificava la conformació de B DNA adoptada per part del dúplex. Aquesta informació la podríem obtenir per comparació dels espectres de dicroisme circular entre el dúplex entrecreuat i el que no presenta unió entre les cadenes.

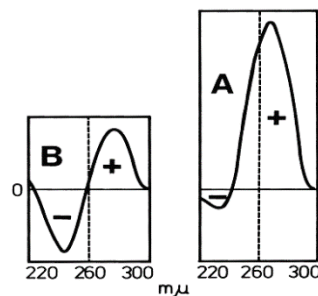


Figura 2.18. Espectres de dicroisme circular característics de les formes B i A del DNA.

2.4.3.1 Conformació de l'undecàmer d(GCTCGTCGAGC) entrecreuat

En primer lloc vam dur a terme l'anàlisi conformacional del dúplex entrecreuat **67**, així com dels dúplex bimoleculars **74** i **76**, mitjançant dicroisme circular. Aquest estudi es va realitzar enregistrant l'espectre de dicroisme circular del dúplex en variar la longitud d'ona de 320 a 220 nm a 25°C. L'oligonucleòtid es trobava en el medi en una concentració de 2 μM, dissolt en un medi tamponat format per Pipes 10 mM, NaCl 100 mM i MgCl₂ 10 mM. En la *FIGURA 2.19* es mostren els espectres enregistrats dels tres dúplex, **67**, **74** i **76**.

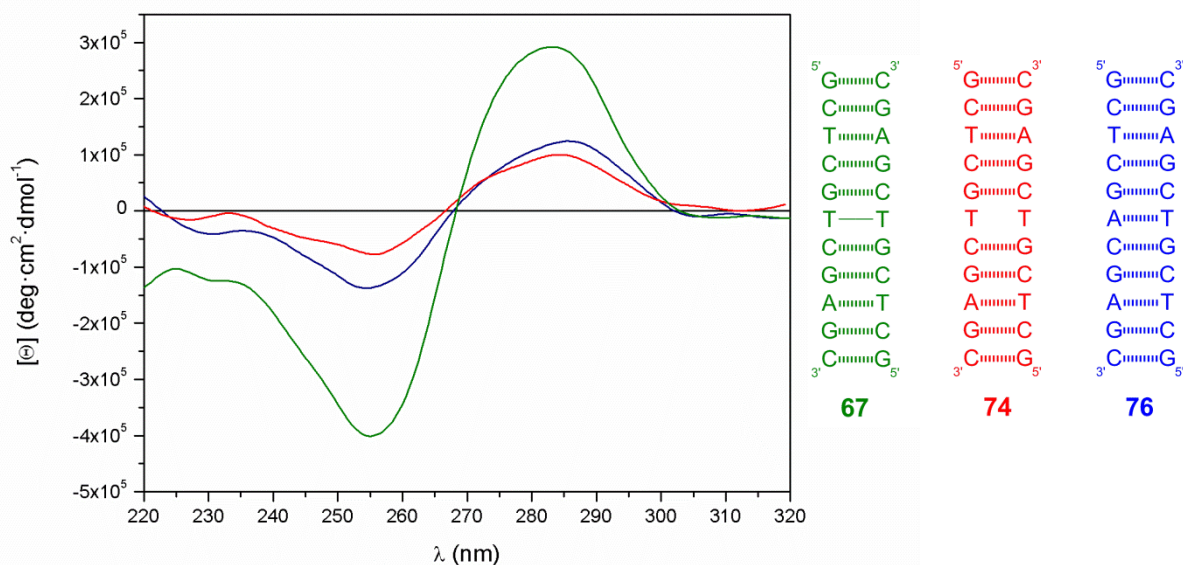


Figura 2.19. Superposició dels espectres de dicroisme circular obtinguts en el cas de l'oligonucleòtid entrecreuat **67** (—) i dels dúplex no units amb un mismatch **74** (—) i perfectament complementaris **76** (—).

Com es pot apreciar, en tots tres casos l'espectre de dicroisme circular es correspon al d'una estructura de B DNA, caracteritzada per un màxim a aproximadament 280 nm i un mínim al voltant dels 255 nm. Els perfils són força semblants en tots tres dúplexs, on ni el màxim ni el mínim no mostren desplaçaments hipsocròmics (cap a longituds d'ona menors) ni batocròmics (cap a longituds d'ona majors) significatius. De tota manera, l'el·lipticitat mostrada pel dúplex entrecreuat **67** és força major a l'observada en els dúplexs no units, la qual cosa posa de manifest un grau d'estructuració superior com a conseqüència de la introducció de l'entrecreuament.

2.4.3.2 Conformació de l'undecàmer d(GCTGCTGCTGC) entrecreuat

En segon lloc es va portar a cap l'anàlisi conformacional per dicroisme circular del dúplex entrecreuat **70** i del dúplex bimolecular **78**. En la *FIGURA 2.20* es mostren els espectres enregistrats dels dos dúplex, **70** i **78**.

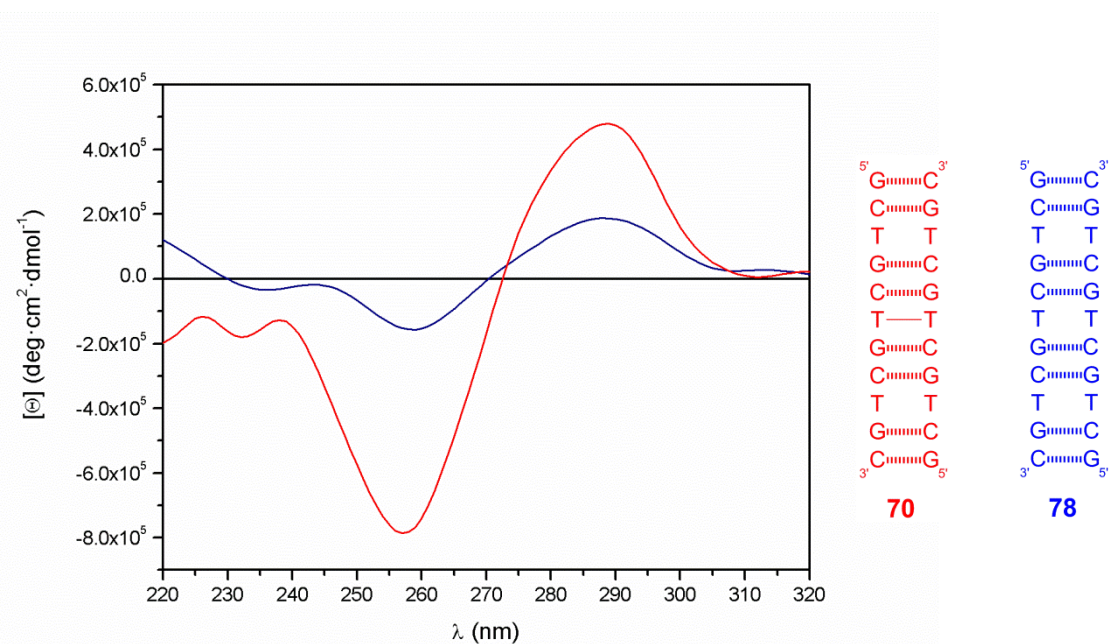


Figura 2.20. Superposició dels espectres de dicroisme circular obtinguts en el cas de l'oligonucleòtid entrecreuat **70** (—) i del dúplex no unit **78** (—).

De forma anàloga al que s'havia descrit en el cas dels dúplexs amb la seqüència d(GCTCGTCGAGC), tots dos espectres es corresponen amb el d'una estructura del tipus B DNA. En aquest cas l'augment d'el·lipticitat entre la seqüència no entrecreuada i el dúplex unit covalentment és molt major que en el cas del dúplex **67** i els seus anàlegs no entrecreuat. Aquest augment tant important de l'el·lipticitat es pot

relacionar amb la restricció conformacional que provoca la introducció de la unió dietilsulfona, ja que **78** no és un dúplex perfecte en aquestes condicions sinó més aviat una mescla de conformacions.

Així doncs, a la vista dels resultats obtinguts en l'anàlisi per dicromisme circular dels dos dúplexs entrecreuats, i comparant-los amb els seus anàlegs no units covalentment, podem concloure que el pont dietilsulfona no sembla modificar de forma significativa l'estructura B-DNA del dúplex.

2.5 Exploració d'alternatives per l'obtenció de dúplexs entrecreuats

Tal com s'ha exposat al llarg d'aquest Capítol, la síntesi en fase sòlida d'oligonucleòtids entrecreuats amb la unió dietilsulfona havia demostrat ser un mètode útil, senzill i ràpid per obtenir dúplexs units de forma covalent. Tot i això, ens plantejàvem si es podria aprofitar la reactivitat de la divinilsulfona en presència de PBU_3 per tal de poder entrecreuar oligonucleòtids d'una manera anàloga a l'emprada per unir nucleòsids, obtenint així seqüències entrecreuades d'una manera més senzilla. Dues van ser les aproximacions que ens vam plantejar d'entrecreuament directe d'oligonucleòtids: en solució i en fase sòlida.

2.5.1 Intent d'entrecreuament d'oligonucleòtids en solució

Tal com s'ha explicat en el Capítol 1 d'aquest segon Bloc, un dels mètodes emprats per preparar oligonucleòtids entrecreuats consisteix en fer reaccionar el dúplex convenientment hibridat amb un agent capaç d'unir totes dues cadenes de forma covalent. En aquest sentit ens vam plantejar adaptar la nostra metodologia d'entrecreuament mitjançant la unió dietilsulfona a aquesta aproximació, fent reaccionar l'oligonucleòtid d(GCTCGTCGAGC) **72** amb la divinilsulfona i una fosfina (*FIGURA 2.21*).

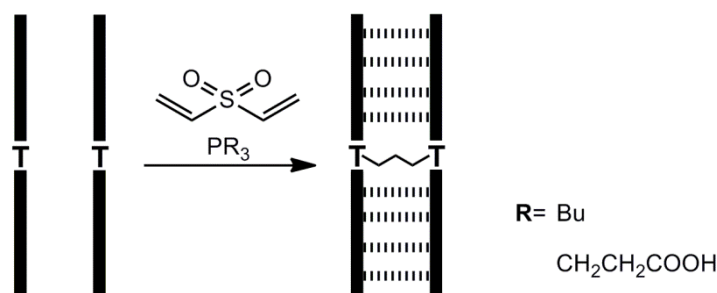


Figura 2.21. Aproximació usada per entrecreuar cadenes de DNA en dissolució. A una solució que conté l'oligonucleòtid que es vol unir covalentment s'afegeix divinilsulfona i una fosfina, per veure si té lloc la doble addició de Michael i, per tant, la formació del dúplex entrecreuat.

Vam dur a terme dos assaigs d'entrecreament usant dues fosfines diferents, la PBu_3 , la qual hem emprat habitualment en les addicions de Michael sobre la divinilsulfona, i la tris(carboxietil)fosfina (TCEP), la qual presenta la particularitat de ser soluble en aigua. En tots dos casos les reaccions es van dur a terme en una mescla $\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}$, emprant un excés de divinilsulfona per afavorir la reacció, així com quantitats catalítiques de la fosfina. Els resultats van ser analitzats tant per HPLC en fase inversa com per EM-MALDI-TOF, no observant-se cap pic nou en el cromatograma ni cap massa diferent a la de l'oligonucleòtid de partida en cap dels dos assaigs.

La reacció d'entrecreament, per tant, no havia tingut lloc, el que podia ser degut a diversos factors. El medi en que es va dur a terme la reacció, a més de contenir ACN , no es trobava tamponat ni presentava una elevada concentració salina, pel que era probable que l'oligonucleòtid no es trobés estructurat com a dúplex. Això provocaria que les timines entre les que havia de tenir lloc l'entrecreament es trobessin llunyanes en l'espai dificultant, per tant, la reacció. Una perfecta estructuració del dúplex, per la seva banda, podia resultar contraproductiu, atès que la divinilsulfona tindria dificultats per entrar en la doble hèlix per tal que tingués lloc la reacció. D'altra banda, la insolubilitat de la divinilsulfona en aigua feia necessari dur a terme la reacció en una barreja $\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}$, que es probable que no fos compatible amb la reacció de Michael.

A la vista de les dificultats per trobar un medi de reacció ideal, i tot i la possibilitat d'introduir millores en la metodologia, vam preferir abandonar aquesta aproximació.

2.5.2 Intent d'entrecreuant d'oligonucleòtids en fase sòlida

L'aproximació descrita en l'apartat anterior presentava implícitament un inconvenient: la possibilitat que la reacció tingués lloc en qualsevol de les dues timines presents en l'oligonucleòtid. Per tal d'eliminar aquest entrebanc ens vam plantejar una nova aproximació derivada de l'anterior, en la qual l'entrecreuant de les cadenes tingués lloc quan encara es trobessin ancorades a la resina. Aquesta reacció es duria a terme després de la incorporació a la seqüència en creixement de la primera timidina, de tal manera que l'entrecreuant tindria lloc entre les bases que ens interessaven, eliminant així la possibilitat d'entrecreuaments no desitjats.

La síntesi de l'oligonucleòtid entrecreuat es va portar a terme en tres etapes: primerament va tenir lloc l'elongació de la seqüència nucleotídica fins a les timidines entre les que es volia establir la unió, posteriorment es va dur a terme la doble addició de Michael que eventualment permetria l'entrecreuant de les cadenes i, finalment, es va procedir a continuar l'elongació de l'oligonucleòtid fins a completar la seqüència desitjada (FIGURA 2.22).

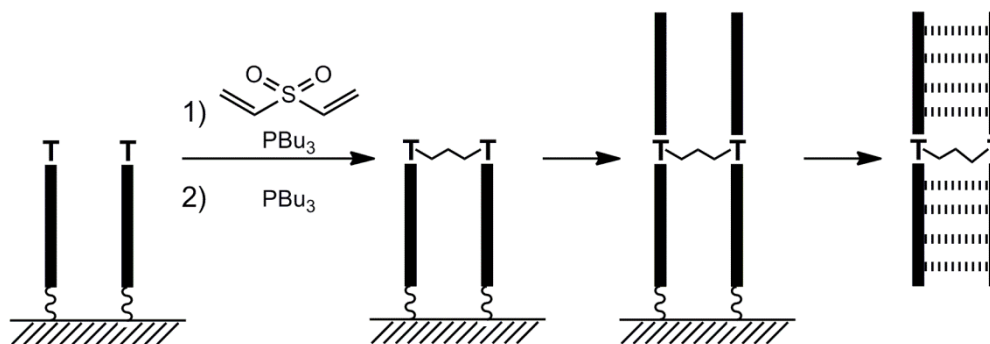


Figura 2.22. Aproximació usada per entrecreuar l'oligonucleòtid ancorat a la resina. Cal destacar que en el moment de dur a terme l'entrecreuant la seqüència contindria una única timidina per tal d'evitar reaccions secundàries.

Per tal d'efectuar l'entrecreuant de les cadenes ancorades al suport polimèric, ens vam plantejar fer-ho en dues etapes. En primer lloc vam afegir a la resina una mescla que contenia tant divinilsulfona com PBU₃, per tal de provocar l'addició de Michael sobre, com a mínim, un dels grup vinílics de la sulfona, per tal de generar així un oligonucleòtid unit a una etilvinilsulfona (Tractament 1). En segon lloc es va canviar el medi de reacció per un que només contenia PBU₃, per tal de forçar la reacció entre l'oligonucleòtid-vinilsulfona generat en l'etapa anterior i una segona cadena, afavorint d'aquesta manera l'entrecreuant desitjat (Tractament 2). Aquest tractaments, les condicions dels quals es troben descrites en la TAULA 2.5, els vam dur a terme repetides vegades.

	Condicions A	Condicions B	Condicions C
Tractament 1	0.25 eq DVSO ₂ 0.05 eq PBU ₃	0.4 eq DVSO ₂ 0.08 eq PBU ₃	20 eq DVSO ₂ 4 eq PBU ₃
Tractament 2	0.05 eq PBU ₃	0.08 eq PBU ₃	4 eq PBU ₃
Nombre Tractaments	3	2	3

Taula 2.5. Taula resum de les diferents condicions emprades per obtenir oligonucleòtids units covalentment per entrecreuaments de les cadenes en fase sòlida. Les reaccions es van dur a terme a 65°C i durant 1 hora (en el cas del Tractament 1) o 2 hores (en el cas del Tractament 2). DVSO₂ es refereix a la divinilsulfona.

L'oligonucleòtid elegit per dur a terme els primers assaigs va ser altre cop l'undecàmer d(GCTCGTCGAGC) **72**. En primer lloc va tenir lloc l'elongació dels sis primers residus de la cadena nucleotídica, formant-se l'oligonucleòtid d(TCGAGC) (**79**) ancorat a resina, en el qual es va mantenir l'hidroxil 5' terminal protegit amb el grup DMT per tal d'evitar reaccions secundàries. El reactor que contenia la resina es va retirar del sintetitzador automàtic i es va tractar emprant les condicions indicades en la *TAULA 2.5*. En aquest punt es va procedir a desancorar i desprotegir l'oligonucleòtid i a analitzar els crús per HPLC en fase inversa i EM-MALDI-TOF. Això es va dur a terme sense acabar d'allargar l'oligonucleòtid fins a obtenir l'11mer, per tal de facilitar l'anàlisi dels resultats.

L'anàlisi tant del cru de l'assaig **A** com del **B** per HPLC va mostrar un pic únic que es corresponia al 6mer **79**; l'anàlisi del cru de reacció per EM-MALDI-TOF no va mostrar cap altra massa que es pogués correspondre a l'oligonucleòtid entrecreuat ni al producte de monoaddició d'una cadena oligonucleotídica sobre la divinilsulfona. Per la seva banda, en el cas de l'assaig **C**, on es van forçar les condicions de reacció afegint un excés tant de divinilsulfona com de PBU₃, l'anàlisi per HPLC també va mostrar un únic pic. Quan es va analitzar el cru per EM-MALDI-TOF, però, es va observar un petit pic corresponent a la incorporació de dues molècules de divinilsulfona sobre el 6mer d(TCGAGC). Això volia dir que, a més de sobre la timina, la divinilsulfona es va addicionar sobre una altra nucleobase (possiblement la citosina²⁶⁴), el que implicava que la selectivitat en la reacció d'entrecreuament que buscàvem no era possible. Davant aquests decepcionants resultats es va decidir abandonar també aquesta via.

Així doncs, a tall de resum d'aquest Capítol, hem desenvolupat una metodologia per obtenir oligonucleòtids entrecreuats amb la unió dietilsulfona de forma ràpida i senzilla per síntesi en fase sòlida, emprant un bisamidit obtingut fàcilment en dues etapes sintètiques a partir del nucleòsid comercial. La unió dietilsulfona, la qual pot ser eliminada amb bases nucleòfiles si així es desitja, no distorsiona l'estructura de B DNA dels oligonucleòtids al mateix temps que n'augmenta sensiblement l'estabilitat tèrmica. La restricció conformacional introduïda permet l'estudi de seqüències que presentin equilibris entre diferents estructures, com és ara el cas dels oligonucleòtids que contenen repeticions CTG. D'altra banda, no ha sigut possible dur a terme l'entrecreuament directe de cadenes oligonucleotídiques, ni en solució ni en fase sòlida.

CAPÍTOL 3:

DELS OLIGONUCLEÒTIDS ENTRECREUATS ALS OLIGONUCLEÒTIDS CÍCLICS

3 Dels oligonucleòtids entrecreuats als oligonucleòtids cíclics

3.1 Introducció i objectius

Un dels objectius d'aquesta Tesi Doctoral era l'obtenció d'oligonucleòtids cíclics que continguessin repeticions del triplet CUG. Com ja s'ha explicat en el Bloc 1, una de les dificultats principal a l'hora de dur a terme la ciclació consistia en la diversitat d'estructures que podia adoptar el precursor lineal. Aquesta era una dificultat creïem que podia ser superada amb l'ajuda de l'entrecruament entre cadenes mitjançant la unió dietilsulfona.

Com s'ha descrit en el Capítol anterior, la introducció d'aquesta unió havia permès establir conformacionalment un oligonucleòtid que contenia repeticions CTG, estructurant-se en forma de dúplex. En ell, els extrems 3' i 5' de les cadenes complementàries es troben relativament pròxims, fet que es podia aprofitar per unir-los entre si i obtenir, així, un oligonucleòtid cíclic. La l'eliminació de la unió dietilsulfona entre les cadenes, la qual podíem dur a terme un cop hagués tingut lloc la ciclació, ens permetria obtenir l'oligonucleòtid cíclic desitjat (*FIGURA 3.1*). Val a dir, però, que aquesta aproximació només seria vàlida en el cas de voler obtenir oligonucleòtids cíclics de DNA, ja que les condicions d'eliminació de la unió dietilsulfona no serien compatibles amb l'RNA, sensible a la hidròlisi bàsica.

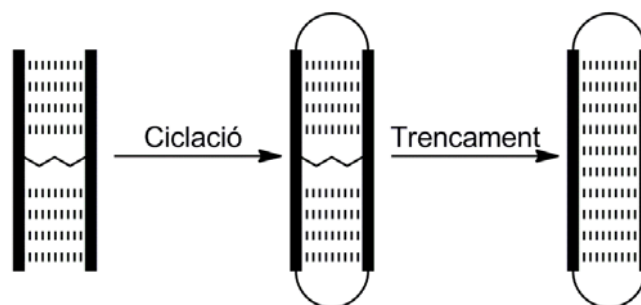


Figura 3.1. Esquema resum de l'estratègia per obtenir oligonucleòtids cíclics a partir d'oligonucleòtids entrecreuats. En primer lloc, el dúplex entrecruat es sotmet a ciclació. Posteriorment, l'eliminació de la unió dietilsulfona entre les dues cadenes permet obtenir l'oligonucleòtid cíclic.

En el Capítol anterior havíem descrit la preparació dúplexs units covalentment pel centre de l'oligonucleòtid (els dúplex **67** i **70**), de tal manera que els extrems 3' i 5' contenien el mateix nombre de residus i quedaven hibridats entre sí (*FIGURA 3.2.A*). Tal com s'ha explicat en la secció 2.4.3 del Bloc 2, el dúplex es trobava estructurat en forma de B-DNA. En aquesta estructura, però, els extrems 3' i 5' enfrontats es troben molt allunyats (*FIGURA 3.2.B*), dificultant enormement que es puguin unir entre si a través d'un enllaç fosfat diester. Per tant, els oligonucleòtids entrecreuats sintetitzats fins al moment (**67** i **70**) no servien a l'hora abordar aquesta estratègia de ciclació. Calia, per tant, dissenyar nous oligonucleòtids entrecreuats que ens permetessin portar a terme aquesta nova aproximació.

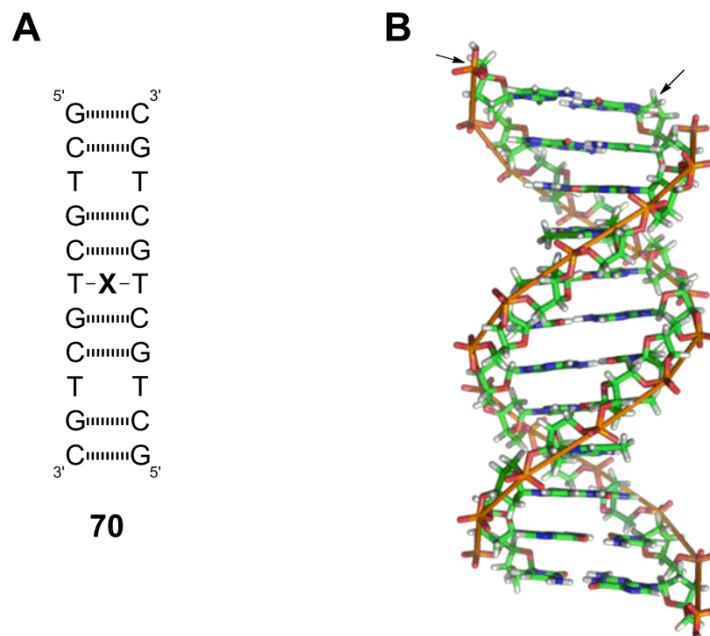


Figura 3.2. A. Dúplex entrecreuat **70**, el qual es troba perfectament hibridat amb les bases enfrontades entre si. **B.**²⁶⁹ B-DNA model. La fletxa de l'esquerra assenyala la situació de l'hidroxil 5' terminal, mentre que la de la dreta assenyala l'hidroxil 3' terminal de l'altra cadena.

Com s'ha explicat en el Capítol 2 del Bloc 1, sovint s'ha usat l'autoestructuració d'un oligonucleòtid com a *nicked dumbbell* per tal de sintetitzar oligonucleòtids cíclics.^{96a,b,158} Aquesta aproximació de ciclació assistida per motlle intern podia adaptar-se a l'estratègia que estàvem dissenyant si es sintetitzava un oligonucleòtid entrecreuat on el punt d'entrecreuament no fos en el centre del dúplex si no prop dels seus extrems. D'aquesta manera, com es pot apreciar en la *FIGURA 3.3*, l'extrem més llarg de cada cadena s'autoestructuraria, aproximant-se així a l'extrem més curt i permetent, d'aquesta manera, que la reacció de ciclació tingués lloc.

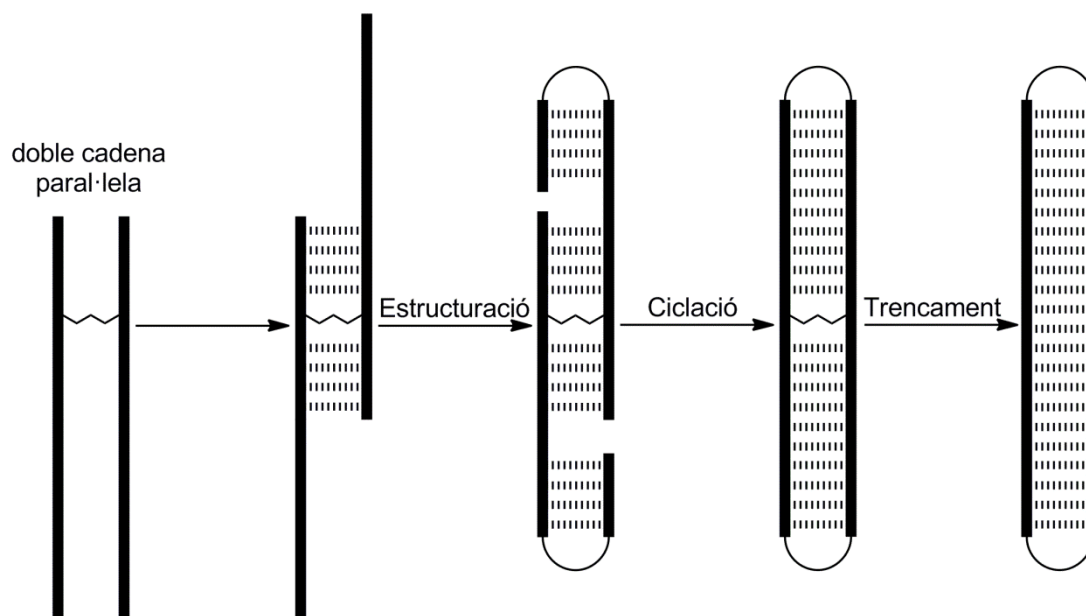


Figura 3.3. Esquema resum de l'estratègia per obtenir oligonucleòtids cíclics a partir d'oligonucleòtids entrecreuat. Els extrems llargs del díplex, degut a la seva autocomplementarietat, s'estructuren com a *nicked dumbbell*, apropant els extrems a unir i possibilitant la ciclació de l'oligonucleòtid.

Amb tot, érem conscients de la varietat de conformacions que poden adoptar els oligonucleòtids amb repeticions CTG, el que podia provocar que, en estructurar-se, els extrems del díplex no es trobessin suficientment pròxims per tal que tingués lloc la reacció de ciclació. Malgrat tot, l'augment d'estabilitat i la restricció conformacional provocada per la introducció de la unió dietilsulfona entre les cadenes creiem que podia facilitar que una part important del díplex es trobés estructurat de la forma que desitjàvem i que, per tant, pogués tenir lloc la ciclació.

En aquest Capítol es descriuen els diferents resultats en l'obtenció d'oligonucleòtids cíclics de DNA a partir d'aquesta aproximació de ciclació de díplex entrecreuat per la unió dietilsulfona.

3.2 Intent d'obtenció del 36mer d<p(CTG)₁₂>

El primer oligonucleòtid cíclic amb repeticions CTG que ens vam plantejar de preparar seguint la metodologia descrita en la Introducció del Capítol va ser el 36mer d<p(CTG)₁₂> **82**, el qual s'obtidria per ciclació del 18mer entrecreuat d(TGCTGCTGCTGCTGCTGC) **80** (on **T** representa el punt d'entrecreuament) i posterior trencament de la unió dietilsulfona per mitjà d'una reacció d'eliminació (FIGURA 3.4).

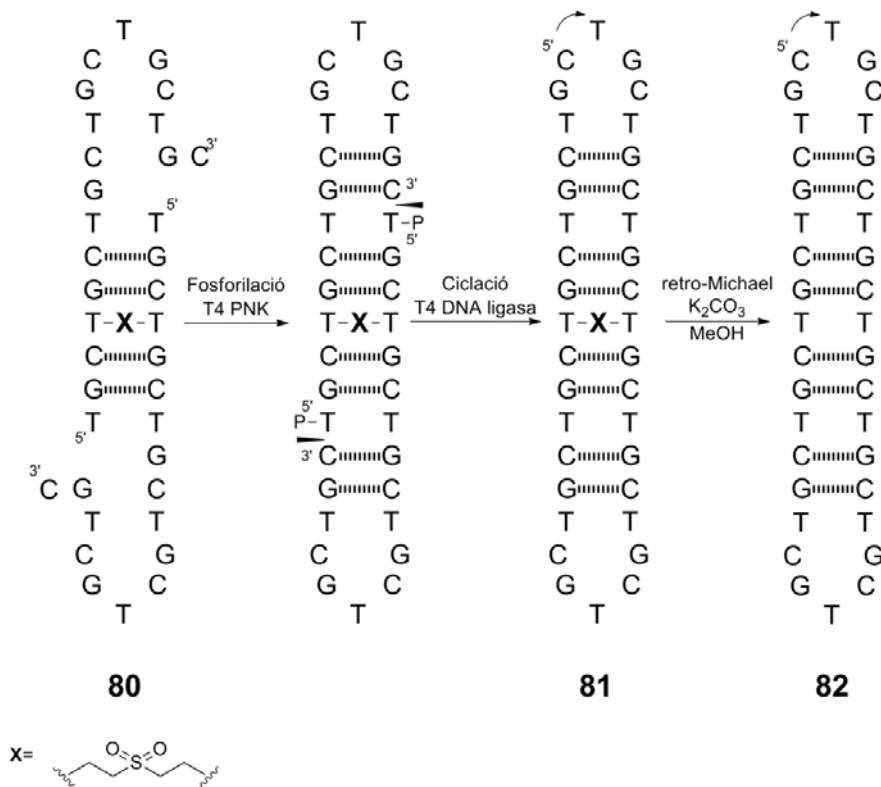


Figura 3.4. Estratègia a seguir per obtenir l'oligonucleòtid cíclic **82** per ciclació del dúplex entrecreuat **80**. En la figura, P representa el grup fosfat addicionat en el dos extrems 5', mentre que les falques negres representen els punts en els que té lloc la ciclació de l'oligonucleòtid.

Un cop convenientment estructurat, el dúplex presentaria una conformació tipus *nicked dumbbell* (amb dos talls), en el que els punts d'unió es situarien en mig de quatre parells G-C, els quals creiem que serien suficients per tal d'estabilitzar l'estructura i aproximar els extrems a unir. La lligació vam decidir portar-la a cap entre una desoxicitidina i una timidina per tal de disminuir l'impediment estèric i, així, facilitar la reacció. Pel que fa a la ciclació, en aquest context podíem dur-la a terme emprant reactius químics, però davant els resultats satisfactoris obtinguts amb la T4 DNA ligasa

descrits en el Capítol 2 del Bloc 1 vam preferir utilitzar l'enzim en comptes d'altres agents condensants (EDC, BrCN). A més a més, amb la T4 DNA ligasa podríem realitzar la fosforilació-lligació *one pot* emprant el mateix medi salí, sense haver de canviar el tampó o purificar el producte entre una reacció i l'altra.

3.2.1 Síntesi del 18mer entrecreuat 80

La síntesi del dúplex entrecreuat d(TGCTGCTGCTGCTGCTGC) **80** es va dur a terme en el sintetitzador automàtic a escala 1 µmol de forma anàloga a la descrita en l'apartat 2.3.1.1 del Bloc 2. Un cop finalitzada la síntesi, l'oligonucleòtid es va desancorar de la resina i purificar seguint el mateix protocol descrit en l'apartat 2.3.1.1 del Bloc 2. El dúplex entrecreuat es va purificar per HPLC en fase inversa, es va caracteritzar per EM-ESI i es va analitzar la puresa de les fraccions per PAGE, observant-se que les diferents fraccions es trobaven impurificades pel dúplex incomplet 3/4. La repurificació del dúplex entrecreuat **80** per HPLC en fase inversa va resultar molt complexa, degut a la petita diferència en la retenció cromatogràfica dels dúplex complet (4/4) i incomplet (3/4), obtenint-se finalment 5.5 OD₂₆₀ de l'oligonucleòtid 4/4 **80**, el que equival a un rendiment del 2%.

3.2.2 Assaigs de ciclació del 18mer entrecreuat 80

Per tal de portar a cap els assaigs de ciclació del dúplex entrecreuat **80** vam adaptar les condicions de fosforilació i ciclació emprades en l'obtenció del 42mer cíclic **59**, descrites en l'apartat 2.3.5 del Bloc 1. Mentre que les condicions de fosforilació van ser lleugerament modificades basant-nos en les condicions descrites per Helm,²⁷⁰ en les de ciclació tan sols es va disminuir lleugerament la concentració de l'oligonucleòtid degut a les noves condicions de fosforilació.

Primerament es va realitzar un assaig de fosforilació i ciclació *one pot* amb una petita quantitat de precursor lineal (0.4 OD₂₆₀), seguint el procediment anteriorment descrit. El dúplex, un cop fosforilat amb l'enzim T4 PNK, es va sotmetre a un procés d'*annealing* per tal d'estructurar-lo correctament per, posteriorment, portar a cap la seva ciclació amb la T4 DNA lligasa. La reacció es va deixar avançar durant 72 hores a 30°C, agafant-n'hi alíquotes cada 24, les quals es van analitzar per PAGE (*FIGURA 3.5*).

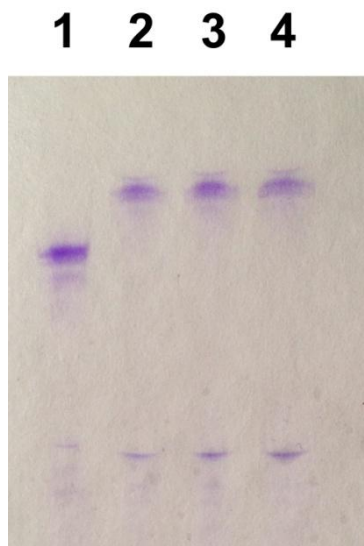


Figura 3.5. Anàlisi per PAGE dels diferents assaigs de ciclació del dúplex entrecreuat **80** amb T4 DNA ligasa. **1.** Dúplex **80** fosforilat. **2.** Assaig de ciclació a les 24 hores. **3.** Assaig de ciclació a les 48 hores. **4.** Assaig de ciclació a les 72 hores.

Tal com es pot apreciar en els carrils 2-4 del PAGE, s'observa la formació quasi quantitativa d'un nou producte amb una mobilitat electroforètica inferior a la del precursor lineal **80** fosforilat, el que seria coherent amb la formació d'un producte cíclic, no existint cap diferència entre l'assaig a les 24 i a les 72 hores. Tot i això, ens cridava l'atenció la rapidesa i netedat de la reacció, ja que no s'observava producte de partida ni tampoc cap altra banda que es pogués correspondre a la ciclació parcial del dúplex **80** fosforilat (és a dir, en el que en un dels extrems s'hagués produït la lligació i en l'altre no). A més a més, ens resultava difícil de creure que la totalitat de l'oligonucleòtid entrecreuat **80** fosforilat es trobés convenientment estructurat per tal que tingués lloc la ciclació, tot i la restricció conformacional introduïda mitjançant la unió de les cadenes del dúplex, degut a la promiscuïtat estructural de les seqüències que contenen repeticions CTG.

Per tal de determinar si la nova banda que s'observava en el PAGE es corresponia a l'oligonucleòtid cíclic **81** o bé a un altre producte, es va repetir la reacció de fosforilació-ciclació a major escala (5 OD₂₆₀). El presumplet producte de ciclació es va purificar per PAGE preparatiu, obtenint-se 0.5 OD₂₆₀. Aquestes es van analitzar per EM-ESI, però no va ser possible observar cap massa pròxima a la dels oligonucleòtids **80** o **81**.

Desafortunadament, duent a terme aquest assaig havíem esgotat tot el dúplex **80** del que disposàvem. Els resultats observats en el PAGE de la *FIGURA 3.5* eren

prometedors, pel que era necessari preparar altre cop l'oligonucleòtid **80** per tal de portar a cap més estudis. Aprofitant, però, que calia sintetitzar el dúplex entrecreuat de nou, vam decidir introduir algunes modificacions en la seqüència que podien contribuir a facilitar-ne la ciclació.

3.3 Primer intent d'obtenció del 42mer d<p(CTG)₁₄>

El fet que s'observés una única banda en els assaigs de ciclació del dúplex entrecreuat **80** ens semblava sospitos, ja que implicava la formació quantitativa d'un únic nou producte, el que ens portava a pensar que era més factible que la nova banda observada en el PAGE de la FIGURA 3.5 es correspongués al producte de ciclació parcial del dúplex **80** fosforilat o bé a un oligonucleòtid diferent fruit d'alguna altra reacció.

Si ens fixem en l'estructura que idealment hauria d'adoptar el dúplex entrecreuat **80** per tal que es pogués produir la ciclació (FIGURA 3.6), es pot apreciar que tan sols es formarien dos parells G-C en cada costat dels talls del *nicked dumbbell*, el que possiblement fos insuficient per tal que l'extrem 3' s'estructurés de la forma desitjada dificultant, per tant, que la reacció de ciclació tingués lloc.

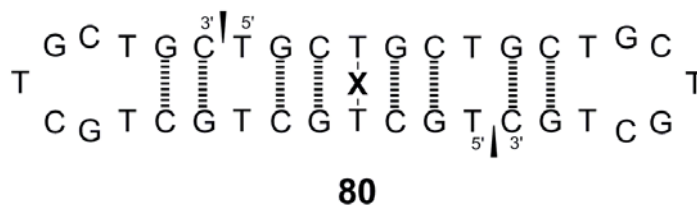


Figura 3.6. Estructuració del dúplex entrecreuat **80** com a doble *nicked dumbbell*. En la figura, la **X** representa la unió dietilsulfona, mentre que les falques negres representen els punts en els que hauria de tenir lloc la ciclació de l'oligonucleòtid

Per tal de facilitar que la conformació del dúplex entrecreuat fos l'adequada per dur-ne a terme la ciclació vam decidir sintetitzar un nou oligonucleòtid entrecreuat, el 21mer d(TGCTGCTGCTGCTGCTGCTGC) **83**, en el qual s'ha allargat el dúplex **80** amb una repetició CTG en cada extrem 3'. D'aquesta manera s'afegirien dos parells G-C en cada extrem del *nicked dumbbell*, per tal de contribuir a augmentar l'estructuració de l'oligonucleòtid entrecreuat (FIGURA 3.7). Pel que fa a les condicions de reacció, tant la fosforilació com la ciclació de l'oligonucleòtid les duríem a terme de forma enzimàtica emprant la T4 PNK i la T4 DNA ligasa, respectivament.

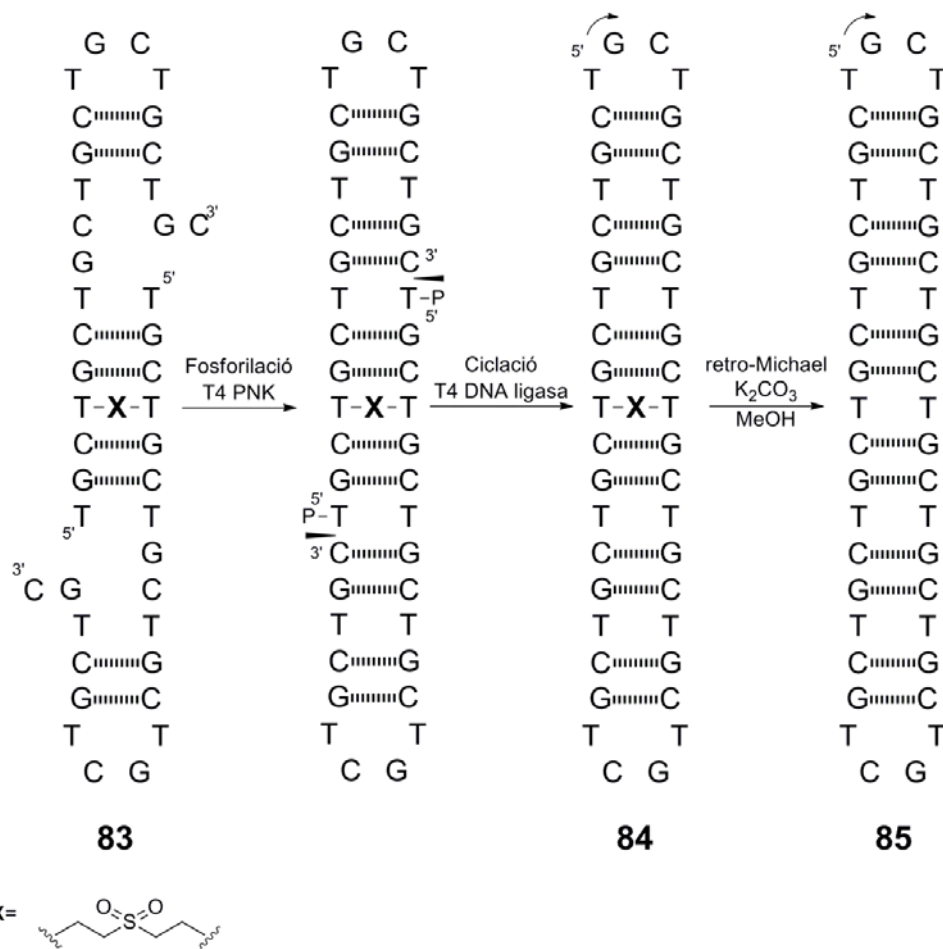


Figura 3.7. Estratègia a seguir per obtenir l'oligonucleòtid cíclic **85** per ciclació del dúplex entrecreuat **83**. En la figura, P representa el grup fosfat addicionat en el dos extrems 5', mentre que les falques negres representen els punts en els que té lloc la ciclació de l'oligonucleòtid.

3.3.1 Síntesi del 21mer entrecreuat **83**

La síntesi del 21mer d(TGCTGCTGCTGCTGCTGC) es va dur a terme en el sintetitzador automàtic a escala 1 μ mol de forma anàloga a la descrita en l'apartat 2.3.1.1 del Bloc 2. Un cop finalitzada la síntesi, l'oligonucleòtid es va desancorar de la resina emprant K_2CO_3 0.05 M en MeOH i es va purificar per HPLC en fase inversa. Les diferents fraccions es van caracteritzar per EM-ESI i es va analitzar per PAGE, revelant-se que la seva puresa era força elevada. La repurificació per HPLC en fase inversa va permetre obtenir 16 OD₂₆₀ de l'oligonucleòtid entrecreuat **83**, el que equival a un rendiment del 5%.

3.3.2 Assaigs de ciclació del 21mer entrecreuat **83**

Les condicions elegides per dur a terme la fosforilació i lligació del dúplex **83** van ser les mateixes que s'havien emprat anteriorment en el cas de l'oligonucleòtid entrecreuat **80**. La única variació que vam introduir va ser la realització en paral·lel de dos assaigs de ciclació, afegint a un d'ells PEG per tal de facilitar la reacció mentre que en l'altre no es va posar cap additiu. Les ciclacions, realitzades a una escala de 0.5 OD₂₆₀, es van deixar avançar durant 16 hores a 30°C i es van analitzar, un cop aturades, per PAGE (FIGURA 3.8).

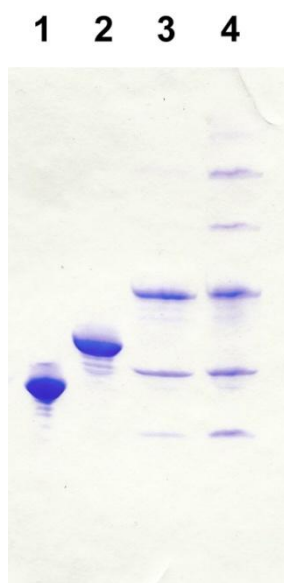


Figura 3.8. Anàlisi per PAGE dels diferents assaigs de ciclació del dúplex entrecreuat **83** amb T4 DNA ligasa. **1.** Dúplex entrecreuat **83**. **2.** Cru de fosforilació del oligonucleòtid entrecreuat **83**. **3.** Assaig de ciclació sense cap additiu. **4.** Assaig de ciclació amb un 5% de PEG.

Si ens fixem en el PAGE, es poden extreure diverses conclusions. En primer lloc, la diferència en la mobilitat electroforètica del dúplex **83** abans i després de sotmetre'l a la fosforilació enzimàtica (carrils *1* i *2*) era molt clara. Això era degut al fet que, en fosforilar el dúplex entrecreuat **83**, s'addicionaven dos fosfats a la molècula, el que disminuïa la mobilitat electroforètica de forma important. Val la pena ressaltar que aquesta fosforilació era, a més, quantitativa. En segon lloc, s'observava clarament l'aparició de dues noves bandes importants en els assaigs de ciclació, tant en el que s'addicionava PEG com en el que no (carrils *3* i *4*). Aquestes dues bandes presentaven una mobilitat electroforètica major i menor, respectivament, a la del precursor **83** fosforilat, i podien correspondre's als productes de ciclació total i parcial (és a dir, de tan sols un dels extrems) del dúplex entrecreuat. Cal destacar que no s'observaven restes de producte de partida **83** ni fosforilat ni sense fosforilar en cap dels assaigs de ciclació.

En darrer lloc, s'apreciava l'aparició d'altres bandes menys intenses en els carrils 3 i 4. Una d'elles, amb una mobilitat electroforètica major a la del dúplex **83**, podria pertànyer a algun tipus de producte de degradació. La resta, amb mobilitats força menors a la del dúplex de partida, podrien correspondre's a productes de dimerització del 21mer entrecreuat **83**. La major concentració efectiva existent en l'assaig analitzat en el carril 4 (causada per l'addició de PEG) respecte a la de l'assaig analitzat en el carril 3 explicaria la major presència d'aquest subproductes en el carril 4, essent notòria la major netedat de la ciclació en absència de PEG.

Per tal d'intentar esbrinar si alguna de les noves bandes es corresponia efectivament a l'oligonucleòtid cíclic **84**, es va repetir la reacció de ciclació (emprant les condicions en les que no s'addicionava PEG) a major escala (8 OD₂₆₀) i es van purificar els dos productes majoritaris formats per PAGE preparatiu. Per major comoditat anomenarem producte **86** a l'oligonucleòtid obtingut de la purificació de la banda superior, del que en vam obtenir 1.8 OD₂₆₀, i producte **87** al que provenia de la banda inferior del que en vam obtenir 1.7 OD₂₆₀. Ambdós es van analitzar per EM-ESI però no va es va observar en l'espectre cap massa pròxima a la dels oligonucleòtids **83** o **84**.

Davant les dificultats per poder confirmar la presència del producte cíclic per EM-ESI ens vam decidir a intentar-ho de forma indirecta a través d'una prova química. Tal i com s'ha descrit en el Capítol 2 del Bloc 2, els oligonucleòtids entrecreuats amb la unió dietilsulfona són susceptibles de patir una reacció de retro-Michael. Si el producte purificat era en efecte l'oligonucleòtid cíclic **84**, a l'eliminar-se l'entrecreuament entre ambdues cadenes i analitzar el cru per PAGE, previsiblement no s'observaria gaire diferència en la mobilitat electroforètica de la banda. Si, per el contrari, la reacció de ciclació no s'havia produït en absolut, les cadenes del dúplex es separarien i s'obtindria l'oligonucleòtid 21mer lineal, el qual presentaria una mobilitat electroforètica molt major que la del dúplex entrecreuat **83**.

Es va agafar una alíquota de cadascun dels productes purificats i es van tractar amb K₂CO₃ 0.05 M en MeOH a 65°C durant 48 hores. Passat aquest temps els crus es van neutralitzar i analitzar tant per EM-ESI com per PAGE. En la *FIGURA 3.9* s'han ajuntat els PAGE obtinguts amb ambdós productes (**86** i **87**).

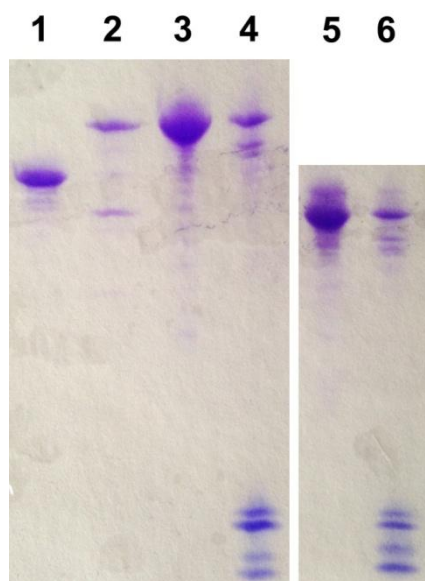


Figura 3.9. Anàlisi per PAGE del cru de trencament amb K_2CO_3 0.05 M en MeOH dels oligonucleòtids **86** i **87**. **1.** Cru de fosforilació del oligonucleòtid entrecreuat **83**. **2.** Assaig de ciclació del dúplex **83** fosforilat contenint els productes **86** i **87**. **3.** Oligonucleòtid **86** purificat. **4.** Oligonucleòtid **86** sotmès a una reacció amb K_2CO_3 0.05 M en MeOH a 65°C durant 48 hores. **5.** Oligonucleòtid **87** purificat. **6.** Oligonucleòtid **87** sotmès a una reacció amb K_2CO_3 0.05 M en MeOH a 65°C durant 48 hores.

Analitzant el PAGE, en concret els carrils 4 i 6, s'observava l'aparició de quatre bandes noves amb unes mobilitats electroforètiques força majors que les dels productes **86** i **87**. Aquestes bandes semblava que podien correspondre's a productes relacionats amb l'oligonucleòtid lineal 21mer fruit del trencament del dúplex entrecreuat, el que indicaria que la reacció de lligació no havia tingut lloc i que ni **86** ni **87** es corresponien al producte cíclic **84**. Desconeixíem, pel moment, de quins oligonucleòtids es tractava.

L'anàlisi per EM-ESI dels crús de trencament del oligonucleòtids **86** i **87** va permetre portar llum a aquest resultat. En tots dos espectres s'observaven senyals corresponents a quatre productes diferents en un rang de masses comprés entre les 6400 i les 7000 uma. Dues d'aquestes senyals van ser fàcilment identificades com a pertanyents al 21mer fosforilat en 5' d(pTGCTGCTGCTGCTGCTGC) i al seu derivat que incorporava una (metoxietil)etilsulfona (oligonucleòtids **88** i **89**, respectivament FIGURA 3.10) . Aquests oligonucleòtids eren els productes de trencament del dúplex entrecreuat **83** fosforilat, obtinguts de forma anàloga als **72** i **73** generats en el trencament de l'oligonucleòtid entrecreuat **67** (apartat 2.4.1 del Capítol 2 del Bloc 2). Per la seva banda, existien també dues senyals (oligonucleòtids **90** i **91**), les masses dels quals es corresponien a l'addició formal d'AMP a **88** i **89**, respectivament, de forma anàloga al que s'ha comentat anteriorment en l'apartat 2.3.5 del Capítol 2 del Bloc 1. Aquestes quatre senyals observades en els espectres de masses (TAULA 3.1) eren

coherents amb les quatre bandes amb gran mobilitat electroforètica observades en els carrils 4 i 6 dels PAGE mostrats en la *FIGURA 3.9*.

Oligonucleòtid	M _{calc} (uma)	M _{exp} (uma)
86	13729	13729
87	13319	13320
88	6476	6476
89	6626	6626
90	6805	6806
91	6956	6956

Taula 3.1. Taula resum de les masses (calculades i obtingudes experimentalment) dels oligonucleòtids formats en l'assaig de ciclació del dúplex entrecreuat **83** fosforilat amb la T4 DNA ligasa (**86** i **87**), així com les seqüències obtingudes al tractar ambdós dúplexs amb K₂CO₃ 0.05 M en MeOH durant 48 hores (**88-91**).

Tot semblava indicar, per tant, que el que realment havia succeït havia sigut una addició d'AMP al dúplex entrecreuat **83** fosforilat. Aquesta hipòtesi va ser confirmada a l'observar en els espectres de masses la presència d'un senyal a M_{exp}=13729, en el cas del trencament de l'oligonucleòtid **86**, i d'un a M_{exp}=13320, en el cas del trencament de l'oligonucleòtid **87**, corresponents als productes **86** i **87** no degradats pel K₂CO₃ en MeOH (*TAULA 3.1*). Aquest senyals es corresponien al dúplex entrecreuat **83** fosforilat on s'havien addicionat, respectivament, dues molècules d'AMP (oligonucleòtid **86**) o bé tan sols una (oligonucleòtid **87**, el qual havia perdut el fosfat no adenilat) (*FIGURA 3.10*). La formació d'aquests productes adenilats **86** i **87** va ser confirmada, a més, comprovant la seva resistència a la degradació amb fosfatasa alcalina.²⁷¹

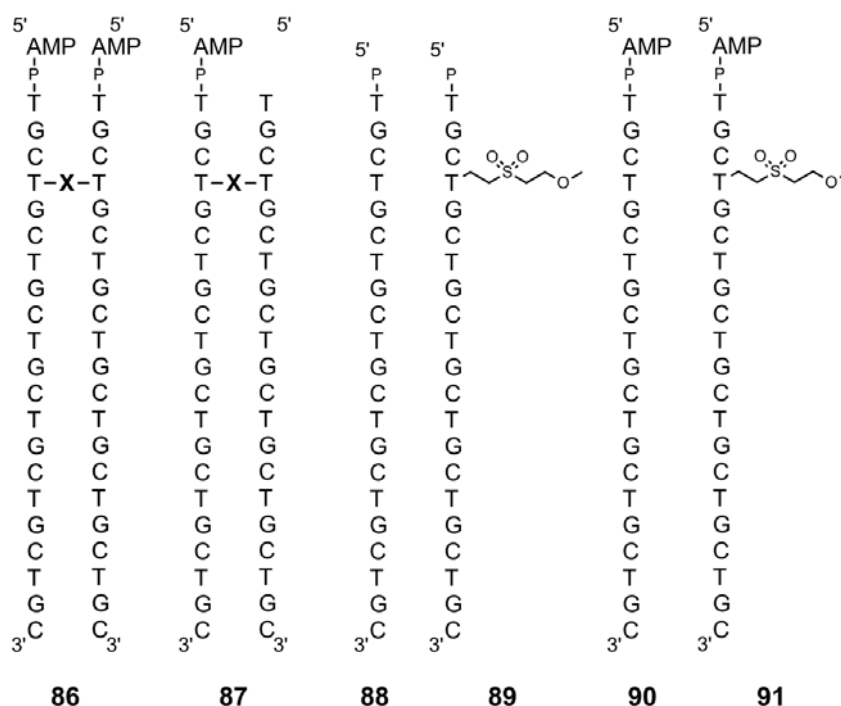


Figura 3.10. Oligonucleòtids formats en l'assaig de ciclació del dúplex entrecreuat **83** fosforilat amb la T4 DNA ligasa (**86** i **87**), així com les seqüències obtingudes al tractar ambdós dúplexs amb K₂CO₃ 0.05 M en MeOH a 65°C durant 48 hores (**88-91**).

Com s'havien format, però, els oligonucleòtids adenilats **86** i **87**? La T4 DNA ligasa és un enzim ATP-depenent que duu a terme la lligació del DNA en tres passos. En el primer la ligasa adquireix el grup AMP de l'ATP, generant-se un complex covalent ligasa-AMP. En el segon l'enzim transfereix el grup AMP al fosfat 5' del DNA donador, formant-se l'AppDNA. En darrer lloc la ligasa catalitza l'atac nucleòfil de l'hidroxil 3' del DNA acceptor sobre el grup fosfat original del AppDNA, tenint lloc la lligació entre ambdós oligonucleòtids i alliberant-se AMP al medi (FIGURA 3.11).²⁷²

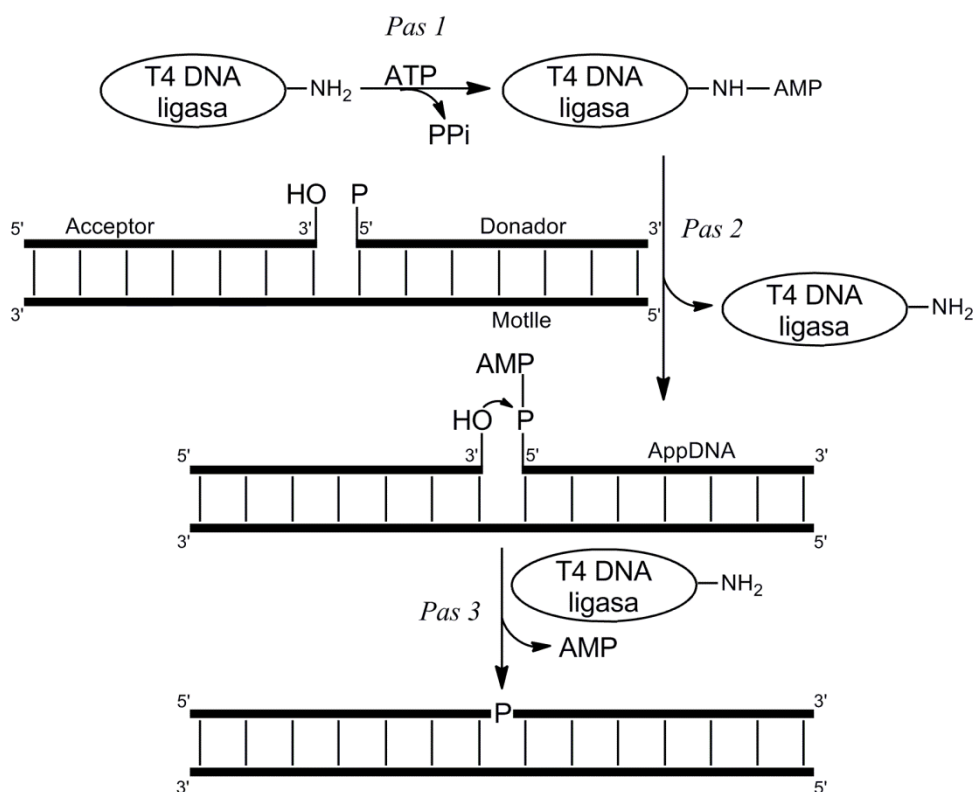


Figura 3.11. Mecanisme en tres etapes seguit per la T4 DNA ligasa per tal de dur a terme la lligació entre dos fragments de DNA.²⁷²

Tot i que normalment no sol fer-ho, l'AppDNA pot acumular-se en el medi de reacció en algunes situacions determinades, com poden ser l'existència de buits (*gaps*) en la seqüència acceptora²³⁴ o bé la presència de *mismatches* a prop del punt d'unió.^{234,154b,273} Si es donen les condicions adequades, aquesta adenilació pot ser quantitativa i, de fet, alguns grups n'han tret avantatge per tal de preparar diversos AppDNA,^{272b,273b} els quals són uns oligonucleòtids difícils de preparar químicament²⁷⁴ i amb interès en diversos camps.²⁷⁵

En el cas dels assaigs de ciclació del dúplex **83** fosforilat ens trobàvem davant d'una de les condicions que afavoreixen l'acumulació de l'AppDNA, com és la presència d'un *mismatch* en el lloc d'unió.^{234,272a} D'altra banda, un altre factor crucial per obtenir quantitats important d'AppDNA és l'absència d'un DNA acceptor.^{272b} Aquest podia tractar-se del nostre cas, ja que existia la possibilitat que el dúplex entrecreuat no s'estructurés de la forma desitjada, deixant la lligació sense DNA acceptor en les proximitats i afavorint l'acumulació dels intermedis **86** i **87**. Tot sumat ajudava a entendre el perquè de l'absència de lligació i l'obtenció dels oligonucleòtids AppDNA. Al mateix temps, però, ens mostrava el camí a seguir per tal de millorar el disseny del dúplex entrecreuat que preteníem ciclar.

3.4 Segon intent d'obtenció del 42mer d<p(CTG)₁₄>

Per tal de facilitar la reacció de ciclació del dúplex entrecreuat havíem d'intentar reduir l'acumulació dels oligonucleòtids AppDNA en el medi. Canviar el punt d'unió en el que s'havia de dur a terme la lligació podia tenir aquest efecte i, per tant, aconseguir la ciclació desitjada.

Per tal d'intentar obtenir l'oligonucleòti cíclic **84** (i, a partir d'aquest, el **85**) ens vam plantejar ciclar el dúplex entrecreuat d(CTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG) **92** (FIGURA 3.12). Aquest oligonucleòtid es va dissenyar movent el punt on havia de tenir lloc la lligació per tal d'intentar afavorir la ciclació amb la T4 DNA ligasa enfront de l'acumulació del producte AppDNA. En primer lloc, introduíem un nou parell G-C en l'extrem 3' terminal, el que *a priori* hauria d'afavorir la correcta estructuració i, així, la presència d'un DNA acceptor. Això era molt important, atès que el punt més arriscat de l'estratègia era que el dúplex **92** fosforilat no adoptés l'estructura esperada. En segon lloc, en el dúplex **92** s'eliminava la presència d'un *mismatch* T-T en l'extrem 5' terminal, el que perjudicava la lligació,^{234,273a} tenint lloc la ciclació en canvi entre dos parell G-C, el que n'afavoriria la reacció.²³⁴ Finalment, la presència d'una unió T-T mitjançant la dietilsulfona adjacent al punt d'unió en l'extrem 5' terminal hauria de dificultar l'acumulació de l'AppDNA.^{272b}

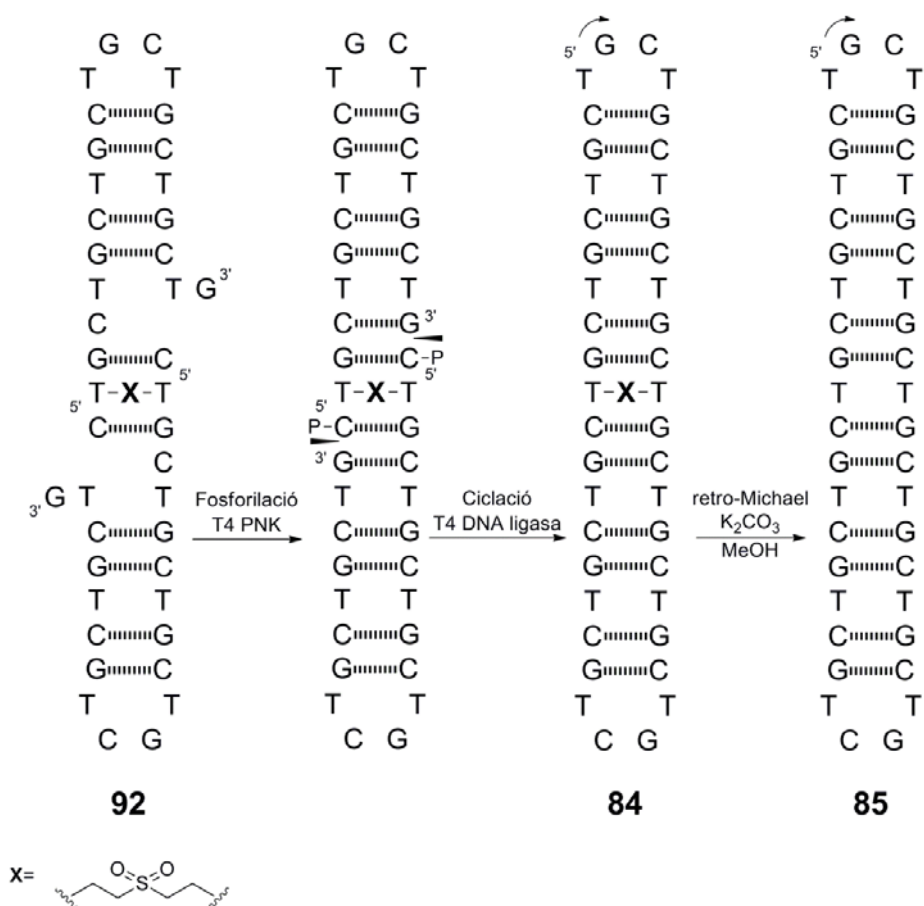


Figura 3.12. Estratègia a seguir per obtenir l'oligonucleòtid cíclic **85** per ciclació del dúplex entrecreuat **92**. En la figura, P representa el grup fosfat addicionat en el dos extrems 5', mentre que les falques negres representen els punts en els que té lloc la ciclació de l'oligonucleòtid.

3.4.1 Síntesi del 21mer entrecreuat 92

La síntesi del 21mer d(CTGCTGCTGCTGCTGCTG) es va dur a terme en el sintetitzador automàtic a escala 1 μmol de forma anàloga a la descrita en l'apartat 3.3.1. Tant el desancoratge com la purificació del dúplex entrecreuat va tenir lloc seguint el procediment descrit en l'apartat 3.3.1, obtenint-se 45 OD₂₆₀ de l'oligonucleòtid **92**, el que equival a un rendiment del 13%.

3.4.2 Assaigs de ciclació del 21mer entrecreuat 92

A l'hora de dur a terme els assaigs de fosforilació i ciclació del dúplex entrecreuat **92** vam emprar les mateixes condicions que es descriuen en l'apartat 3.2.2 per a l'intent de ciclació del dúplex **83**. En aquest cas, a més, vam intentar portar a cap la reacció de

ciclació de forma química, utilitzant els agents condensants EDC i BrCN. En aquests últims assaigs de ciclació, duts a terme seguint procediments experimentals descrits,^{92a,151b} s'eliminava l'ús de la T4 DNA ligasa i, així, les possibilitats d'acumulació de l'AppDNA. Les diferents proves de ciclació, dutes a terme amb 0.15 OD₂₆₀, es van deixar avançar durant 16 hores a la temperatura seleccionada i, un cop aturades, es van analitzar per PAGE (FIGURA 3.13).

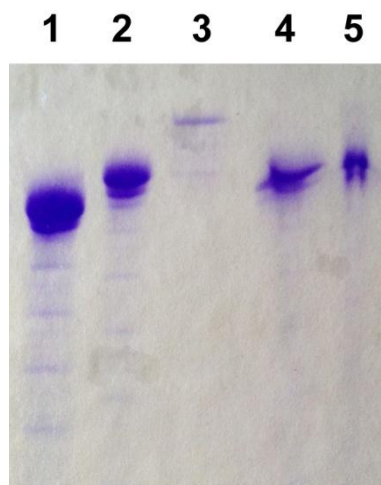


Figura 3.13. Anàlisi per PAGE dels diferents assaigs de ciclació del dúplex entrecreuat **92**. **1.** Dúplex entrecreuat **92**. **2.** Cru de fosforilació de l'oligonucleòtid entrecreuat **92**. **3.** Assaig de ciclació amb T4 DNA ligasa. **4.** Assaig de ciclació amb EDC. **5.** Assaig de ciclació amb BrCN.

En el cas de l'assaig de ciclació amb l'enzim (carril 3), s'observava l'aparició d'una nova banda, molt majoritària, amb una mobilitat electroforètica inferior a la del dúplex **92** fosforilat, del qual s'intuïa que en quedava una part. També s'intuïa la formació d'un segon producte amb una mobilitat electroforètica compresa entre la nova banda majoritària i la del dúplex **92** fosforilat. Per la seva banda, ni en el cas de l'assaig de ciclació amb EDC (carril 4) ni en el de l'assaig amb BrCN (carril 5) s'observava la formació de cap nova banda.

Descartats els mètodes de ciclació química, es va repetir l'assaig de ciclació enzimàtica a major escala (4 OD₂₆₀), es va dessalar el cru i es va analitzar per EM-ESI. Desafortunadament, les tres senyals que van observar-se en l'espectre de masses es corresponien al dúplex entrecreuat **92** fosforilat i als seus derivats amb mono i di adenilats. Davant els diferents resultats obtinguts vam decidir abandonar aquesta aproximació.

L'estratègia d'obtenció d'oligonucleòtids cíclics amb repeticions a través de la ciclació de dúplex entrecreuats no havia resultat exitosa. Els reactius químics s'havien mostrat incapaçs de dur a terme la ciclació dels dúplex entrecreuats, mentre que l'ús de la T4 DNA ligasa havia portat a l'acumulació dels derivats AppDNA dels mateixos. Aquest resultat molt probablement eren deguts a l'existència de *mismatches* en el precursor lineal i, per tant, a la seva deficient estructuració.

CAPÍTOL 4:

SÍNTESI D'OLIGORIBONUCLEÒTIDS

ENTRECREUATS

4 Síntesi d'oligoribonucleòtids entrecreuats

4.1 Introducció i objectius

Un cop optimitzada la metodologia de síntesi de dúplexs de DNA entrecreuats amb una unió dietilsulfona era hora de traslladar-la a l'obtenció d'oligoribonucleòtids entrecreuats que continguessin repeticions CUG. Aquesta unió l'introduiríem mitjançant el bisamidit de la diuridina entrecreuada **93** (FIGURA 4.1), obtingut a partir del dinucleòsid **94**, el qual preteníem preparar de forma anàloga a la timidina entrecreuada **60**. La síntesi d'aquest bisamidit, així com els resultats obtinguts en la preparació de dúplexs d'RNA units covalentment amb un pont dietilsulfona, es descriuen en aquest Capítol.

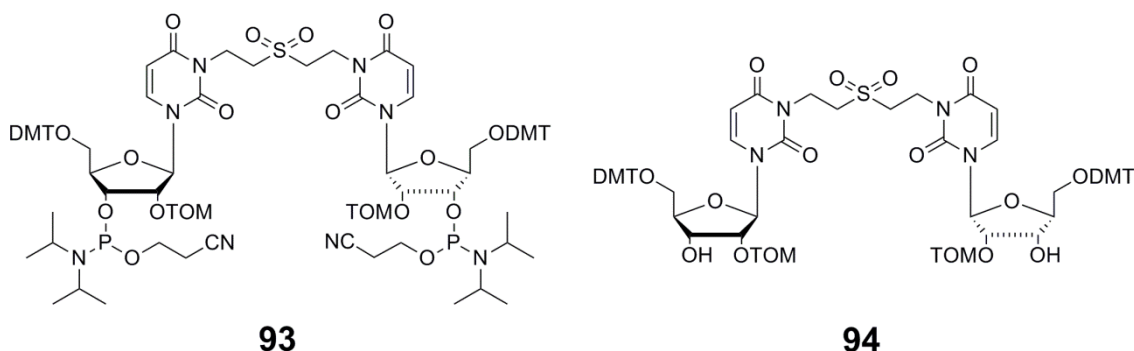


Figura 4.1. Bisamidit amb el que volem introduir una entrecreuant dietilsulfona en un dúplex d'RNA i dinucleòsid a partir del que el prepararem.

4.2 Entrecreuant d'uridines

La preparació del bisamidit **93** es va dur a terme en dues etapes sintètiques, de forma anàloga a la síntesi del bisamidit **66**: entrecreuant del nucleòsid convenientment protegit i fosfitilació del dinucleòsid format. A l'hora d'elegir el grup protector de l'hidroxil 2' de la uridina ens vam decantar pel TOM, degut al menor impediment estèric que presentava enfront altres grups com el TBDMS, el que hauria de facilitar la incorporació del bisamidit a les cadenes en creixement i, per tant, la formació

del dúplex entrecreuat. D'altra banda, ens amoinava que el grup TBDMS pogués patir migració de 2' a 3' en el transcurs de la reacció d'entrecreuament del nucleòsid.

4.2.1 Obtenció de DMT-U_{TOM} 96

El dinucleòsid entrecreuat **94** es volia obtenir a partir d'una doble addició de Michael de la uridina protegida **96** sobre la divinilsufona. Aquesta uridina, però, no era comercial, pel que va ser necessari preparar-la.

La síntesi de la uridina protegida **96** es va dur a terme seguint el procediment descrit per Pitsch i col·laboradors.^{142b,221} En primer lloc es va portar a cap la protecció de l'hidroxil 5' de la uridina comercial amb el grup DMT, el que va conduir a la 5'-O-DMT-uridina **95** amb un 77% de rendiment. L'alquilació d'aquest nucleòsid amb el clorur de TOM **49** preparat anteriorment va portar a una barreja dels isòmers 2' i 3' protegits (**96** i **97**, respectivament), els quals van ser aïllats per cromatografia en columna de gel de sílice i identificats inequívocament mitjançant les regles de Reese,²²⁷ així com per comparació dels seus espectres de ¹H NMR amb els descrits per Pitsch i col·laboradors (FIGURA 4.2).^{142b} Els compostos **96** i **97** es van aïllar amb un 26% i un 25% de rendiment, respectivament

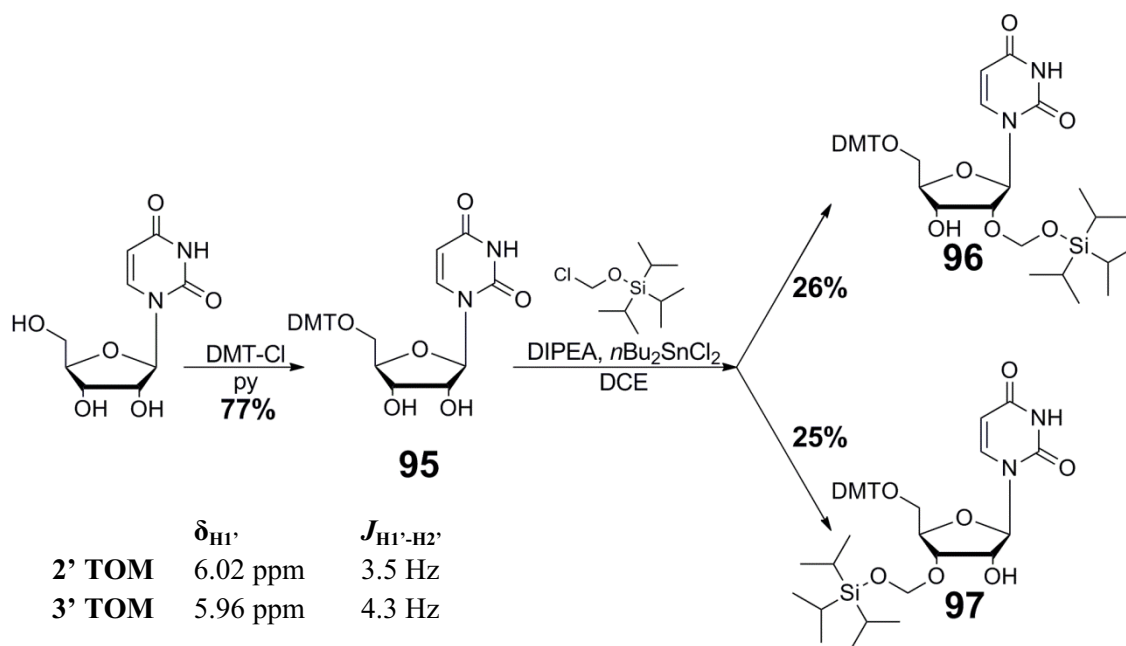


Figura 4.2. Ruta sintètica seguida per preparar la uridina **96**^{142b} i valors de $\delta_{H1'}$ i $J_{H1'-H2'}$ dels isòmers **96** i **97** que ens han permès assignar-los inequívocament segons les regles de Reese.²²⁷

4.2.2 Entrecreuament de la uridina **96** i síntesi del bisamidit **93**

Abans de preparar el dinucleòsid **94** a partir de la uridina **96**, que s'obté amb un procés laboriós i de baix rendiment, vam assajar les condicions d'entrecreuament emprades en la preparació del dinucleòsid **60** amb la uridina **95**, per tal d'optimitzar-les si fos necessari. Els resultats que vam obtenir van ser, però, sorprenents.

En el primer assaig d'entrecreuament de la uridina **95** amb la divinilsulfona, emprant com a catalitzador la PBU_3 , el cru de reacció es va analitzar per EM-MALDI-TOF. L'espectre de masses en mode positiu va mostrar de forma gairebé única un senyal amb $m/z=775$ no observant-se, en canvi, cap rastre ni del producte de partida **95** ni del producte resultant de l'addició de dues uridines **98** (FIGURA 4.3). El cru es va purificar per cromatografia en columna de gel de sílice i el producte aïllat es va caracteritzar per mitjà de diferents experiments de NMR, revelant-se que es tractava d'un derivat de la uridina **95**, en el que aquest nucleòsid i, presumptament, una altra molècula desconeguda s'havien addicionat sobre la divinilsulfona. Per la seva banda, l'anàlisi per EM-ESI va tornar a revelar la presència del senyal amb $m/z=775$.

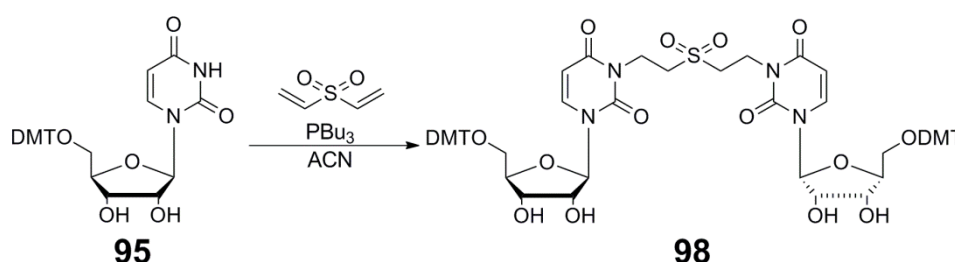


Figura 4.3. Reacció d'entrecreuament de la uridina **95** amb la divinilsulfona per tal de donar lloc al dinucleòsid **98**.

El producte purificat es va analitzar per HPLC en fase inversa, observant-se un pic majoritari (>80%), i posteriorment es va repurificar per HPLC semipreparatiu i analitzar per EM-ESI. Aquest cop, per contra, no es va observar el senyal amb $m/z=775$ sinó un a $m/z=1233$, pertanyent al dinucleòsid **98**. Per la seva banda, els espectres de NMR obtinguts abans de repurificar es corresponien perfectament amb el dinucleòsid **98**. Aquests resultats semblaven indicar que aquest dinucleòsid havia sigut el producte majoritari de la reacció, mentre que la molècula a la qual es correspongués el senyal amb $m/z=775$ era un subproducte que no s'havia eliminat en la purificació per cromatografia en gel de sílice però sí, en canvi, durant la repurificació per HPLC en fase inversa.

Teníem, però, curiositat per saber a quina molècula es corresponia aquest senyal amb $m/z=775$ tant important que observavem, així com per entendre com s'havia format. La diferència de massa existent entre aquest senyal i el nucleòsid **95** era de 229, un valor de m/z que havíem observat en l'espectre de masses del cru d'entrecruament. Aquest senyal, a més, s'havia observat també en analitzar per EM-ESI una barreja de divinilsulfona i PBu_3 . Tot plegat semblava indicar que en posar en contacte la sulfona i la fosfina es formava un nou compost de $m/z=229$, el qual sofria una addició de Michael per part de la uridina **95**, generant el derivat nucleosídic de $m/z=775$. Aquest acceptor de Michael podia correspondre's al catió vinil(tributil)fosfoni **100**, el qual es podria formar segons el mecanisme mostrat en la *FIGURA 4.4.A*.

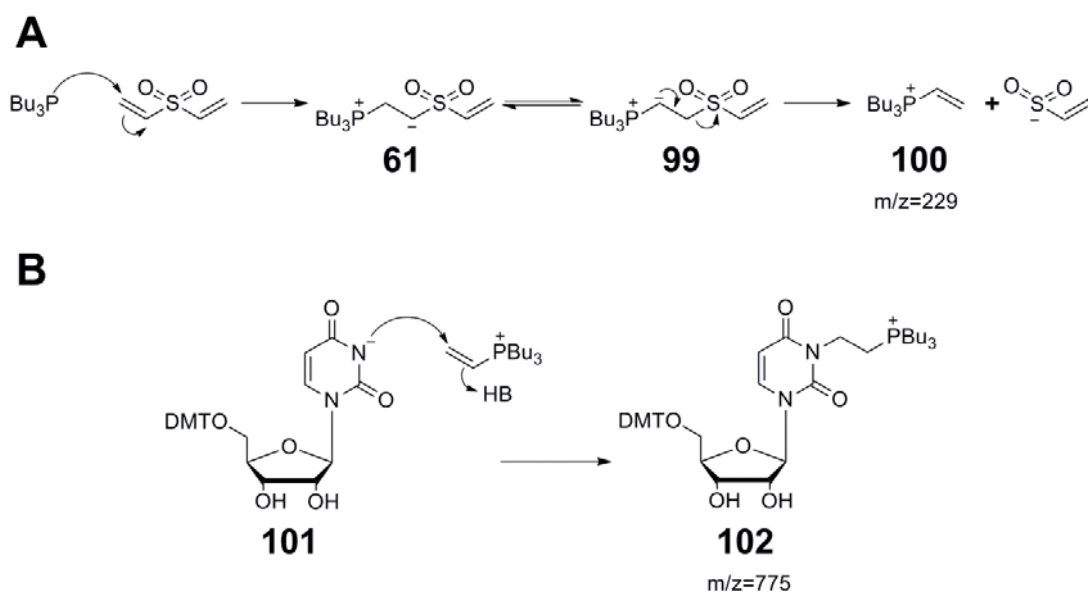


Figura 4.4. Mecanisme proposat per a la formació dels cations **100** (A) i **102** (B).

Tal com s'ha exposat en l'apartat 2.2.1 del Bloc 2, en la primera etapa del cicle catalític de l'addició de Michael catalitzada per PBu_3 la fosfina s'addiciona a la divinilsulfona, generant el zwitterió **61**. Aquest pot continuar el cicle descrit en la *FIGURA 2.2*, o bé donar lloc a l'ilur de fòsfor **99**, a partir del qual es forma el catió vinilfosfoni **100**. Es troba descrit que les sals de vinilfosfoni poden sofrir addicions de Michael,²⁷⁶ pel que l'acceptor **100** podria reaccionar amb la uridina **101** (generada en el cicle catalític), donant lloc al catió **102** (*FIGURA 4.4.B*). Tot i tractar-se segurament d'un producte de reacció molt poc abundant, al trobar-se carregat positivament és àmpliament detectat en mode positiu per l'espectròmetre de masses, no permetent la detecció del dinucleòsid entrecruat neutre **98** (supressió d'ionització), tot i ser el producte de reacció majoritari.²⁷⁷

Es van dur a terme dos experiments més per tal de confirmar la naturalesa dels cations **100** i **102**. En primer lloc, es va barrejar divinilsulfona i PPh_3 i es va analitzar la mescla per EM-ESI, observant-se una $m/z=289$ corresponent al catió vinil(trifenil)fosfoni, l'anàleg de **100** format per la PPh_3 , el que corroborava el mecanisme proposat. En segon lloc, existia la possibilitat que la massa de 775 no es correspongués al catió **102** sinó a un parell iònic format entre el catió **100** i el nucleòsid **95**. Per tal d'esvaïr aquests dubtes, es va analitzar un cru d'entrecreuament de la uridina **95** amb divinilsulfona per EM-MALDI-TOF-TOF.²⁷⁸ En aquesta tècnica, primer es duu a terme la ionització de la mostra, detectant-se un seguit d'ions. Aquest ions poden ser llavors seleccionats individualment i traslladats a una segona cambra d'ionització, on es tornen a fragmentar. D'aquesta manera es pot obtenir informació estructural de l'ió seleccionat, ja que la presència d'una estructura determinada després de la segona ionització és una prova de l'existència d'aquesta estructura en l'ió prèviament seleccionat. En el nostre cas es va seleccionar l'ió 775 i es va tornar a fragmentar, obtenint entre d'altres un senyal amb $m/z=473$, que es corresponia al catió **102** sense el grup protector DMT, el que confirmava, efectivament, la formació del derivat **102** en la reacció d'entrecreuament.

Un cop esvait el misteri de la massa 775, vam procedir a obtenir el dinucleòsid **94**. Introduint lleugeres modificacions sobre el protocol d'obtenció del dinucleòsid **60**, Roser Borràs va preparar el dinucleòsid **94** amb un rendiment del 69% i, a partir d'aquest, el bisamidit **93** amb un rendiment del 45%.²⁶² La fosfitilació va poder ser posteriorment optimitzada, permetent millorar el rendiment fins al 58% (FIGURA 4.5).

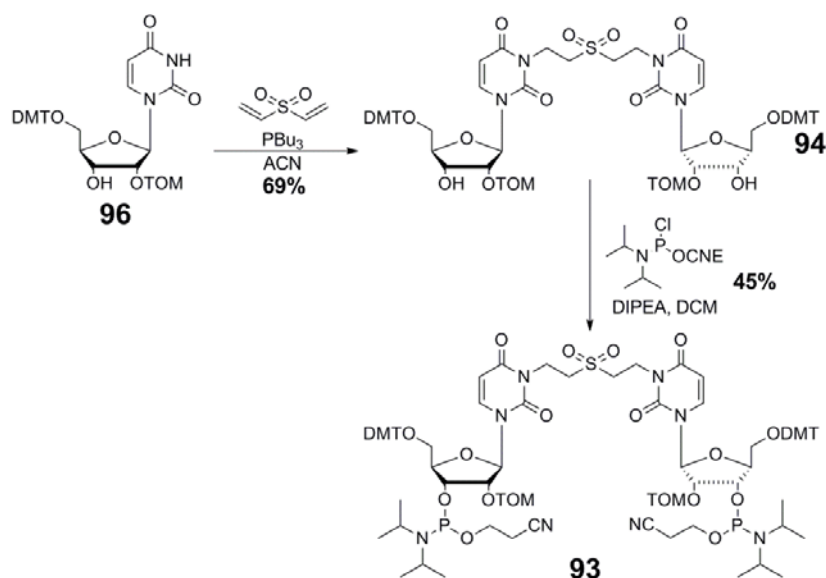


Figura 4.5. Obtenció del dinucleòsid **94** per doble addició de Michael de la uridina **96** sobre la divinilsulfona i síntesi del bisamidit **93** per fosfitilació del dinucleòsid entrecreuat.

4.3 Intent de síntesi d'oligoribonucleòtids entrecreuats

4.3.1 Antecedents

Durant la realització del seu Màster,²⁶² la Roser Borràs va portar a cap uns primers intents de síntesi del dúplex entrecreuat r(GCUCGUCGAGC) (**103**), on U representa el nucleòsid a través del qual s'uneixen totes dues cadenes. La síntesi es va dur a terme a escala 2x1 µmol sobre citidina-resina de forma anàloga a la dels dúplexs **67** i **70** descrita en l'apartat 2.3 del Bloc 2. Es va decidir emprar fosforamidits d'RNA protegits amb el grup TOM, el qual és menys voluminós que l'habitual TBDMS i hauria de facilitar l'acoblament del bisamidit. L'única modificació respecte a la síntesi estàndard que es va introduir va ser un augment del temps d'acoblament dels diferents fosforamidits comercials fins als 10 minuts. En el cas concret del bisamidit **93**, el temps d'acoblament es va allargar fins als 30 minuts, per tal de facilitar una millor incorporació a les cadenes en creixement. Finalment, destacar que la concentració de bisamidit elegida va ser de 0.015 M, atès que aquesta concentració de bisamidit era la que havia permès obtenir dúplexs de DNA entrecreuats amb major rendiment (apartat 3.4.1 del Bloc 2).

La introducció del bisamidit **93**, però, no va resultar satisfactòria. A partir de la quantificació del catió DMT⁺ alliberat després de l'acoblament es pot estimar que el rendiment d'incorporació va ser al voltant del 10%, provocant l'aturada automàtica de la síntesi. Aquest rendiment tan baix podia ser degut a un problema amb el bisamidit (per exemple, que tingués humitat que hidrolitzés la funció fosforamidit) o bé que la concentració del bisamidit fos massa baixa.

4.3.2 Intents d'obtenció de l'oligoribonucleòtid r(GCUGCUGCUGC)

La seqüència oligonucleotídica elegida per dur a terme les primeres proves d'entrecreuament d'un dúplex d'RNA amb la unió dietilsulfona va ser r(GCUGCUGCUGC) (**104**), formada per tres repeticions CUG als quals s'addiciona un parell C-G a cada extrem. En la seqüència U representa el nucleòsid a través del qual s'uneixen totes dues cadenes mitjançant la unió dietilsulfona.

Un cop preparat de nou el bisamidit **93**, vam portar a cap la síntesi del dúplex **104**, emprant els mateixos derivats fosforamidit i cicle de síntesi que havia usat la Roser Borràs (apartat anterior). Per tal d'intentar evitar els problemes que havia tingut la Roser en la síntesi del dúplex **103** vam liofilitzar el bisamidit diferents vegades amb benzè anhidre per tal d'assegurar-nos que estigués ben sec, al mateix temps que vam augmentar la concentració del bisamidit. Vam decidir dur a terme dues síntesis a escala $2 \times 1 \mu\text{mol}$, una amb una concentració de bisamidit **93** de 0.05 M (síntesi A) i l'altra de 0.1 M (síntesi B). Cal destacar que el bisamidit **93**, a diferència del bisamidit **66**, presenta una alta càrrega d'electricitat estàtica, el que dificultava la seva manipulació. En el cas de la síntesi A la incorporació del bisamidit va tenir lloc, aparentment, de forma correcta, mentre que en el cas de la síntesi B el rendiment d'acoblament va ser aproximadament del 20%. Aquesta disparitat de resultats va resultar força sorprenent, atès que el bisamidit emprat en ambdós casos provenia del mateix lot i va ser assecat, pesat i dissolt a la vegada. A més a més, un acoblament incomplet del bisamidit seria més lògic que hagués tingut lloc en usar una concentració inferior, al contrari del que havia succeït.

No tenint cap explicació pel diferent comportament del bisamidit **93** en ambdues síntesis, vam decidir continuar endavant únicament amb la síntesi A. L'oligonucleòtid es va desancorar de la resina amb K_2CO_3 0.05 M en MeOH, es van eliminar els grups TOM que protegien els hidroxils 2' amb TBAF i es va procedir a purificar el cru de desprotecció per HPLC en fase inversa. Tal com es pot observar en la *FIGURA 4.6*, el perfil cromatogràfic obtingut mostra dos pics que eluïen en la zona d'oligonucleòtids amb DMT (fraccions 1 i 2), així com una ampla banda centrada a $t_R \sim 15$ min que es corresponien a productes sense DMT o bé seqüències truncades (fracció 3). Aquest perfil cromatogràfic és similar a l'obtingut en el cas del dúplex **70**, anàleg en DNA de **104**. Cal destacar que els valors d'absorbància dels cromatogrames eren força inferiors als valors esperats, cosa que feia pensar que la quantitat de producte obtingut era poc important.

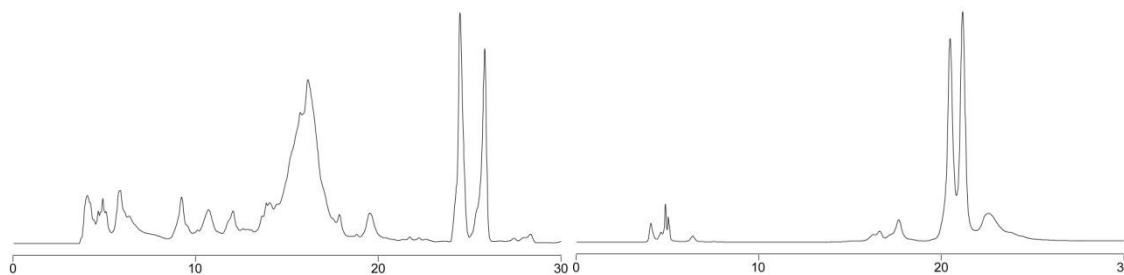


Figura 4.6. Comparació dels perfils cromatogràfics obtinguts en la purificació del dúplex entrecreuat **104** (esquerra) i **70** (dreta).

Un cop eliminat el grup DMT de les fraccions 1 i 2, es va procedir a quantificar-les, obtenint en tots dos casos una quantitat de producte inferior a 0.8 OD, quantificació a més poc fiable degut a la presència de gran quantitat de sals en el medi (probablement tetrabutilamoní). En el cas de la fracció 3 es van obtenir 7.5 OD d'una barreja de productes. Aquestes quantitats obtingudes eren molt inferiors a les 200 OD₂₆₀ teòriques esperades del producte 4/4, el que està amb consonància amb l'observat en els diferents cromatogrames.

Un cop dessalades les diferents fraccions, es van intentar caracteritzar per EM-ESI però en cap dels casos va ser possible observar el senyal de cap oligonucleòtid, detectant-se tan sols el catíon tetrabutilamoní. Semblava clar, doncs, que la quantitat d'oligonucleòtid obtingut en el cas de les fraccions 1 i 2 era massa petita per arribar a obtenir una bona senyal en l'EM. En el cas de la fracció 3, tot i haver una major quantitat de producte es tractava d'una barreja de seqüències, pel que segurament no hi havia quantitat suficient per poder caracteritzar algun oligonucleòtid per EM.

La poca quantitat de producte obtinguda després de la purificació per HPLC en fase inversa era certament sorprenent, el que podia ser degut a dues causes: un desancoratge incomplet de l'oligonucleòtid de la resina o bé la pèrdua de producte durant la seva desprotecció. La primera hipòtesi era poc plausible, atès que en el nostre grup de recerca teníem experiència en l'ús de K₂CO₃ 0.05 M en MeOH per desancorar oligoribonucleòtids, no havent observat mai cap indicatiu de que aquest fos incomplet.

L'eliminació dels grups protectors de l'hidroxil 2' de l'oligonucleòtid, en canvi, podia en part explicar els baixos rendiments de recuperació de producte. El tractament de desprotecció amb TBAF usat és el descrit pel Pitsch i col·laboradors per a l'eliminació del grup TOM,¹⁴⁹ però podria no ser suficient per tal d'eliminar els protectors en el cas de seqüències entrecreuades. Aquests tipus d'oligonucleòtids podrien tenir una

estructura que dificultés la seva correcta interacció amb els fluorurs, donant lloc a una desprotecció incompleta de les seqüències. Aquestes, al conservar total o parcialment el grup TOM en l'hidroxil 2', serien molt més hidrofòbiques, quedant retingudes en la columna d'HPLC i no eluïnt-se en les condicions cromatogràfiques emprades, fent disminuir, per tant, el rendiment de forma apreciable. Una manera de superar aquest impediment seria dur a terme la desprotecció dels oligonucleòtids emprant les mateixes condicions usades per eliminar el grup TBDMS,¹⁴⁸ atès que la reacció de desprotecció té lloc a 65°C, una temperatura suficient per poder trencar les possibles estructures secundàries adoptades pels oligonucleòtids.

Davant la impossibilitat de confirmar l'obtenció del dúplex **104**, vam procedir a repetir la síntesi A a escala 1 µmol (síntesi C), amb intenció d'introduir les millores en la desprotecció descrites anteriorment. La síntesi es va dur a terme emprant una concentració de bisamidit **93** 0.05 M, obtenint, en aquest cas, un rendiment d'acoblament del bisamidit no superior al 20%. La incorporació incompleta del bisamidit observada anteriorment, per tant, no era deguda a la concentració emprada, sinó a alguna altra causa que desconeixem. Una possible explicació era que els protectors dels hidroxils 2' d'ambdós nucleòsids del bisamidit **93** poguessin facilitar la formació d'algun tipus d'agregat (inter o intramolecular), el qual impedís la correcta incorporació del bisamidit **93** a les cadenes en creixement. No tenim, però, cap prova que suporti aquesta hipòtesi. Tampoc es pot descartar que l'alta càrrega estàtica del bisamidit **93** pugui tenir alguna influència en el seu acoblament ineficient.

Una possibilitat per explicar els resultats observats en la síntesi del dúplex **104**, com a mínim en la síntesi C, seria que el bisamidit hagués perdut part del DMT, pel que l'acoblament s'hagués produït correctament però, en canvi, la quantificació del DMT⁺ alliberat no ho reflectís. Per tal de descartar aquesta suposició vam decidir continuar la síntesi: si la hipòtesi fos correcta s'observaria un augment de la quantificació del DMT⁺ alliberat. Això no va ser així, descartant per tant la hipòtesi.

Finalment vam voler comprovar si la petita quantitat de bisamidit **93** incorporat en la síntesi en fase sòlida ho havia fet per totes dues funcions fosforamidit o bé només per una. Una de les resines de la síntesi B va ser desancorada amb K₂CO₃ 0.05 M en MeOH, desprotegida amb TEA·3HF, dessalada i caracteritzada per EM-MALDI-TOF. En l'espectre es va observar de forma molt majoritària un senyal amb m/z=1543, corresponent al 5mer r(GCUGC) **105** ([M-H]⁺_{calc}=1543), l'oligonucleòtid resultant en

el cas que no s'hagués incorporat el bisamidit **93**. D'altra banda, es va observar també un petit pic (amb una intensitat 1000 vegades menor) amb $m/z=2212$, que es corresponia al producte d'addició del bisamidit **93** per un dels seus fosforamidits a l'oligonucleòtid **105** ($[M-H^+]^-_{\text{calc}}=2212$). No es va observar, en canvi, cap producte d'entrecreuament de cadenes. Això demostrava que la petita part de bisamidit que s'incorporava ho feia, a més, per tan sols un dels seus cantons, el que acabaria donant lloc, si la síntesi continués de forma correcta, al producte 3/4 no desitjat, en lloc del dúplex 4/4 que es buscava.

En aquest punt, tenint en compte a més que havíem esgotat tot el bisamidit **93** que havíem preparat, vam decidir aturar-nos. Els resultats obtinguts en els diferents intents d'obtenció dels dúplexs entrecreuat **103** i **104** se'ns presentaven inesperats, incomprendibles i desconcertants, atès que no trobem una explicació per la defectuosa incorporació del bisamidit **93** sobre les cadenes oligoribonucleiques en creixement.

Som conscients de la major dificultat de dur a terme la síntesi d'oligoribonucleòtids respecte als seus anàlegs de DNA, pel que obtenir rendiments d'acoblament del bisamidit **93** menors que en el cas de les síntesis descrites en els Capítols 2 i 3 d'aquest Bloc era previsible. Tampoc hauria sigut estrany obtenir una proporció molt major del producte 3/4 que del 4/4 desitjat (o que, fins i tot, fos l'únic producte que s'obtingués), degut a aquesta major dificultat. Tot i això, aquesta major dificultat de síntesi de l'RNA respecte al DNA no sembla ser suficient per tal d'explicar uns rendiments d'incorporació del bisamidit **93** tan baixos. Finalment tampoc teníem manera d'explicar l'aparent disparitat de resultats en la síntesi A del dúplex **103** respecte a les síntesis B i C.

4.4 Discussió final i perspectives dels entrecreuaments amb unió dietilsulfona

La metodologia de síntesi en fase sòlida d'oligonucleòtids entrecreuat mitjançant una unió dietilsulfona, tot i que no s'ha pogut traslladar amb èxit del DNA a l'RNA, ha permès preparar de forma ràpida i senzilla dúplexs entrecreuat, tant si la unió té lloc entre bases enfrontades com escalonades. L'entrecreuament amb dietilsulfona no modifica de forma apreciable l'estructura B-DNA del dúplex i n'augmenta sensiblement l'estabilitat tèrmica. Al mateix temps, es tracta d'una unió reversible, podent ser

eliminada si així es desitja. Resta per explorar la possibilitat d'emprar la dietilsulfona per unir covalentment altres nucleobases o d'entrecreuar els fosfats o bé els sucres dels nucleòtids.

És cert que la metodologia emprada té la limitació de que els oligonucleòtids preparats han d'estar formats per repeticions invertides (o algunes repeticions directes, com en la present Tesi), però cal destacar que les seqüències repetitives són extraordinàriament nombroses a la natura i, com ja s'ha dit, tenen profundes implicacions biològiques.

Un cas particularment interessant, atès que els oligonucleòtids entrecreuat podrien potencialment formar estructures cruciformes, és el de la unió de Holliday (*Holliday junction*),²⁷⁹ formada per repeticions invertides. La *Holliday junction* és una estructura mòbil en forma de creu formada per quatre cadenes de DNA amb gran importància en el procés de recombinació homòloga dels cromosomes.²⁸⁰

D'altra banda, malgrat els resultats adversos obtinguts en aquesta Tesi, no podem descartar que es pugui dur a terme la ciclació d'oligonucleòtids entrecreuat. Hem pogut comprovar com la ciclació enzimàtica és sensible a la presència de bases incorrectament aparellades (*mismatch*), pel que en el cas que la seqüència de l'oligonucleòtid entrecreuat fos perfectament complementària i no presentés cap *mismatch* es podria dur a terme amb èxit la ciclació enzimàtica. Cal remarcar que aquesta estratègia de ciclació d'oligonucleòtids entrecreuat permetria obtenir cicles de mida intermèdia (20-30mer), els quals avui en dia són els més difícils de preparar pels principals mètodes existents, la ciclació en fase sòlida i la ciclació en solució assistida per un motlle.

Pel que fa als oligoribonucleòtids, hem estat capaços de preparar tant la uridina entrecreuada com el seu derivat bisamidit. Desafortunadament, però, no ha estat possible obtenir un dúplex entrecreuat d'RNA mitjançant síntesi en fase sòlida, resultat inexplicable i difícil d'acceptar sense més. La realització de l'acoblament del bisamidit de forma manual potser podria contribuir a millorar el seu rendiment d'incorporació.

Per tal de determinar la influència del protector de l'hidroxil 2' en la incorporació del bisamidit podria ser interessant preparar anàlegs, on l'hidroxil 2' es trobés protegit amb altres grups o bé s'hagués substituït per un 2'-O-Me, i intentar obtenir dúplex d'oligoribonucleòtids entrecreuat. D'altra banda, més enllà de la substitució del grup protector de l'hidroxil 2', es podrien assajar altres modificacions experimentals com és

ara l'ús d'altres suports sòlids (per exemple, TentaGel) o dissolvents (DCM, THF).

En definitiva, estem convençuts que en el camp de l'RNA, que tant ric és en conformacions diverses, és on precisament fóra més important poder introduir de forma senzilla entrecreuaments de cadenes amb la unió dietilsulfona per tal d'estabilitzar alguna conformació.

CONCLUSIONS |

Conclusions

- S'ha preparat una nova resina per tal de dur a terme la síntesi en fase sòlida d'oligonucleòtids cíclics que continguessin repeticions del triplet CUG. Aquesta resina, que incorpora un anàleg abàsic dels nucleòtids (E), amb la intenció de reduir l'impediment estèric al voltant del lloc de ciclació, s'ha emprat amb èxit per preparar tetràmers cíclics, tant de DNA ($d\langle p(TE)_2 \rangle$) com d'RNA ($r\langle p(UE)_2 \rangle$).
- Els rendiments de ciclació en fase sòlida en l'obtenció dels tetràmers han estat inferiors en el cas del DNA i comparables en el de l'RNA als descrits per a oligonucleòtids de mida similar emprant altres resines.
- Durant la ciclació per obtenir el tetràmer $d\langle p(TE)_2 \rangle$ s'ha observat per primera vegada una doble reacció de ciclació entre dos precursors lineals que ha donat lloc a la formació de l'octàmer $d\langle p(TE)_4 \rangle$.
- S'ha comprovat, en la síntesi del tetràmer $r\langle p(UE)_2 \rangle$, que la protecció de l'hidroxil 2' amb el grup TOM dona millors rendiments de ciclació que quan s'utilitza el grup TBDMS.
- Emprant la nova resina no ha sigut possible obtenir oligonucleòtids cíclics de major mida ($r\langle pEG(CUG)_3CE \rangle$ i $r\langle p(EGCUGCE)_2 \rangle$) per ciclació en fase sòlida. En el cas del tetradecàmer, el producte cíclic no es va poder aïllar, tot i observar-se la massa del producte desitjat en un cru força complex.
- No s'ha aconseguit obtenir l'oligoribonucleòtid cíclic $r\langle p(CUG)_{14} \rangle$ per ciclació enzimàtica amb T4 RNA ligasa del seu precursor lineal totalment desprotegit. Aquest resultat posa de manifest l'escassa estructuració com a *hairpin* del precursor lineal on els extrems a unir no estan suficientment pròxims per que es pugui produir la lligació.
- S'ha abordat també l'ús de la ciclació assistida per motlle amb protecció parcial del precursor lineal per tal d'obtenir oligoribonucleòtids cíclics que continguessin repeticions del triplet CUG. Amb aquest fi ha calgut avaluar diferents grups protectors de la guanosina.
- El grup dmf, que resulta eficaç com a protector temporal del grup amino exocíclic de la 2'-desoxiguanosina per obtenir oligodesoxiribonucleòtids cíclics per ciclació assistida per motlle, no és útil per obtenir oligoribonucleòtids per la mateixa estratègia. En la guanosina, el protector dmf s'ha demostrat làbil al tractament amb fluorurs que s'empra per desprotegir els hidroxils 2' dels oligoribonucleòtids.

- La protecció del grup amino exocíclic de la guanosina amb el grup al·liloxicarbonil (Alloc) s'ha revelat estable enfront els fluorurs però làbil al tractament amb bases nucleòfiles, tot i estar descrita la seva estabilitat enfront l'amoníac. La protecció de l' O^6 de la guanosina amb el grup al·lil (All), en canvi, s'ha demostrat estable tant enfront els fluorurs com les bases nucleòfiles.
- S'ha preparat amb èxit un nou derivat fosforamidit de la guanosina O^6 -al·lil-*N*-acetil protegida, en un total de sis etapes sintètiques i amb un rendiment global del 10%. Aquest fosforamidit s'ha incorporat per síntesi en fase sòlida en diferents oligoribonucleòtids parcialment protegits en les guanosines, $(rG(CUG^{All})_3CUGC$, $rUG^{All}CUG^{All}C$ i $r(UGC)_3(UG^{All}C)_8(UGC)_3$), sense modificar les condicions estàndard d'acoblament i amb rendiments d'incorporació comparables als dels fosforamidits comercials de ribonucleòsids.
- En les síntesis anteriors, el grup acetil que protegeix l'amino exocíclic de la guanosina s'ha revelat sorprenentment estable enfront el tractament amb amoníac/metilamina (AMA), usat per desprotegir els oligoribonucleòtids, essent necessari allargar el temps de desprotecció fins a les 2 hores per aconseguir una eliminació total del protector tot i minimitzant, al mateix temps, la indesitjable substitució de l' O^6 -al·lil per la metilamina.
- El grup All s'ha pogut eliminar dels oligoribonucleòtids parcialment protegits amb catàlisi de Pd^0 en solució, essent imprescindible la presència d'aigua en el medi per tal que la desprotecció tingui lloc de forma quantitativa.
- S'ha obtingut l'oligoribonucleòtid cíclic $r<p(UGC)_6(UG^{All}C)_8>$, caracteritzat per espectrometria de masses, per ciclació enzimàtica amb T4 DNA ligasa assistida per motlle del precursor lineal parcialment protegit amb el grup All. En aquesta, i en ulteriors síntesis, s'ha posat de manifest els avantatges de la fosforilació enzimàtica en 5' del precursor lineal respecte a la fosforilació química. Els resultats obtinguts semblen avalar l'estratègia de protecció utilitzada en la ciclació assistida per motlle amb protecció parcial del precursor lineal per tal d'obtenir oligoribonucleòtids cíclics que continguin seqüències repetitives.
- En els assaigs realitzats, no s'ha pogut confirmar l'eliminació del grup al·lil de l'oligoribonucleòtid cíclic $r<p(UGC)_6(UG^{All}C)_8>$ amb catàlisi de Pd^0 . El fet de no disposar de major quantitat de producte ha impedit dur a terme proves addicionals per confirmar una correcta i completa desprotecció, així com l'aïllament del producte final.

- S'ha dissenyat un tipus entrecreuament entre cadenes d'àcids nucleics que permetin restringir el seu equilibri conformacional i obtenir dúplexs que continguin repeticions del trinucleòtids CTG (en DNA) o CUG (en RNA), entrecreuats per les timines o els uracils, respectivament.
- Una doble addició de Michael de DMT-T sobre divinilsulfona amb catàlisi de PBU_3 ha permès entrecreuar ambdós nucleòsids, obtenint un dinucleòsid unit per un pont dietilsulfona d'una manera directa, fàcil i amb bons rendiments.
- S'ha preparat el derivat bisamidit del dinucleòsid entrecreuat de DMT-T, i s'ha incorporat amb èxit en la síntesi en fase sòlida dels dúplexs entrecreuats $\text{d}(\text{GCTCGTCGAGC})$ i $\text{d}(\text{GCTGCTGCTGC})$, on **T** indica el punt d'entrecreuament, amb rendiments acceptables. El tractament amb K_2CO_3 0.05 M en MeOH a temperatura ambient permet desancorar i desprotegir els oligonucleòtids, tot i mantenint la unió dietilsulfona inalterada. La nova metodologia posada a punt de síntesi en fase sòlida de dúplexs entrecreuats amb la unió dietilsulfona resulta més senzilla, ràpida i pràctica que d'altres metodologies descrites en la literatura.
- L'estudi de les propietats dels dúplexs entrecreuats $\text{d}(\text{GCTCGTCGAGC})$ i $\text{d}(\text{GCTGCTGCTGC})$ revela que l'entrecreuament augmenta de forma molt notable l'estabilitat tèrmica dels dúplexs, sense que es vegi apreciablement alterada l'estructura de B-DNA del dúplex. En particular, en el dúplex entrecreuat $\text{d}(\text{GCTGCTGCTGC})$, la introducció de l'entrecreuament comporta l'estabilització de l'estructura de dúplex amb repeticions CTG i l'eliminació de la varietat de conformacions que presenta $\text{d}(\text{GCTGCTGCTGC})$ no entrecreuat.
- La unió dietilsulfona entre cadenes és reversible, podent ser eliminada de forma neta i quantitativa, si així es desitja, per un tractament amb K_2CO_3 0.05 M en MeOH a 65°C durant al menys 48 h.
- Els intents d'obtenir dúplexs entrecreuats per entrecreuament amb divinilsulfona d'oligonucleòtids en solució han resultat infructuosos. Tampoc han tingut èxit els intents d'incorporar aquest entrecreuament directament sobre cadenes en creixement ancorades a la fase sòlida, comprovant-se que, forçant les condicions de reacció, té lloc l'addició de més d'una unitat de divinilsulfona sobre una cadena d'oligonucleòtid.

- S'han preparat per síntesi en fase sòlida els dúplexs entrecreuat d(TGCTGCTGCTGCTGCTGC), d(TGCTGCTGCTGCTGCTGCTGC) i d(CTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG), que son asimètrics al voltant del punt d'entrecreament, amb la intenció de dur a terme la seva ciclació.
- Tots els intents de ciclació dels dúplexs entrecreuat asimètrics, tant de forma química com enzimàtica, han estat infructuosos, degut a una insuficient estructuració del precursor a ciclar. En la ciclació amb T4 DNA ligasa s'ha acumulat el derivat AppDNA, format durant el procés de lligació enzimàtica, com a conseqüència de que els fragments a unir no són perfectament complementaris.
- S'ha preparat un dinucleòsid d'uridina entrecreuat amb dietilsulfona, de forma anàloga al de timidina, per doble addició de Michael de DMT-U^{TOM} sobre divinilsulfona amb catàlisi de PBU₃. El seguiment del progrés de la reacció d'entrecreament per espectrometria de masses s'ha revelat inviable, degut a la formació del catió vinil(tributil)fosfoni i dels seus derivats, que suprimeixen l'ionització i impedeixen detectar els diferents productes presents en el cru de reacció.
 - A partir del dinucleòsid entrecreuat amb la unió dietilsulfona de DMT-U^{TOM} s'ha sintetitzat el seu derivat bisamidit. De forma sorprenent, tots els intents d'obtenir per síntesi en fase sòlida el dúplex entrecreuat r(GCUGCUGCUGC) han estat infructuosos, degut a una incorporació ineficient del bisamidit. El caràcter inexplicable d'aquest resultat apunta a la necessitat d'emprendre una investigació acurada per aconseguir l'objectiu desitjat d'entrecreuar cadenes d'oligoribonucleòtids.

PART EXPERIMENTAL |

1. Materials i mètodes

1.1 Instrumentació general

Els espectres de ressonància magnètica nuclear de ^1H , ^{13}C i ^{31}P s'han enregistrat en un aparell Varian Inova 300 o Varian Mercury-400. Els desplaçaments químics s'expressen en ppm respecte la referència interna de tetrametilsilà (δ : 0 ppm) en el cas de ^{13}C i ^1H , mentre que en el cas del ^{31}P s'ha usat H_3PO_4 85% en D_2O (δ : 0 ppm) com a referència externa. Els experiments de ressonància de ^{31}P en fase gel s'han realitzat suspent la resina en CD_2Cl_2 o bé en CDCl_3 en tubs especials de fons pla els quals, amb l'ajuda d'un èmbol, permeten concentrar la mostra en la zona d'irradiació (tubs Shigemi Co, LTD, Japó).

Els espectres de masses per MALDI-TOF s'han obtingut en un aparell PerSeptive Biosystems Voyager-DETM RP o en un aparell 4800 Plus MALDI TOF/TOF d'Applied Biosystems, usant THAP o HPA com a matriu. Els espectres realitzats mitjançant ESI (electrosprai) s'han enregistrat en un aparell Micromass ZQ de Waters. Els espectres de masses per ionització química, així com els espectres de masses d'alta resolució, han estat duts a terme per part de la Unitat d'Espectrometria de Masses dels Serveis Científico-Tècnics de la UB. Els aparells usats han sigut un espectròmetre de masses Trace DSQ de Thermo Finnigan (introduint la mostra per sonda directa i usant metà com a gas portador) i un espectròmetre de masses ESI-MS LC/MSD-TOF d'Agilent Technologies, respectivament.

Els espectres d'absorció UV-Vis s'han realitzat en un espectrofotòmetre Perkin-Elmer Lambda 5 UV-Vis o bé en un Uvikon XS, usant cubetes de quars d'1 mL de volum i pas òptic de 10 mm.

Les centrifugacions s'han portat a cap en una centrífuga termostatitzada Beckman GS-15R o bé en una Eppendorf 5430R.

Els punts de fusió s'han mesurat en un aparell Bibby Stuart Scientific SMP10.

Les liofilitzacions de les dissolucions aquoses s'han realitzat en un aparell Virtis Freezemobile 12EL, en un aparell Labconco Freezone 6 o en un aparell Virtis Freezemobile 25EL.

Les mesures de pH s'han fet amb un pHmetre Crison micropH Basic 20.

L'autoclavatge del material de laboratori s'ha dut a terme amb un aparell Autotester ST Dry PV II de Selecta.

El microones emprat ha sigut un aparell Biogate Initiator.

1.2 Reactius, dissolvents i dissolucions tampó

1.2.1. Reactius i dissolvents

ACN: de qualitat HPLC de VWR.

ACN anhidre: Per a la síntesi d'oligonucleòtids s'ha utilitzat ACN anhidre comercial (Applied Biosystems), mentre que l'usat en la resta de casos s'ha obtingut per destil·lació d'ACN de qualitat HPLC sobre CaH_2 en pols, conservant-lo sobre pedres de CaH_2 i sota atmosfera d'argó

AcOEt: de qualitat PRS de Panreac.

Aigua desionitzada: obtinguda mitjançant un sistema Milli-Q de Millipore (18,2 $\text{M}\Omega/\text{cm}$).

Amoníac: dissolució comercial al 33% de qualitat extrapura de Scharlau.

Àcid acètic glacial: de qualitat extrapura de Scharlau.

Benzè anhidre: s'ha obtingut filant sodi sobre benzè de qualitat "grau de reactiu" de Scharlab i deixant-lo tota la nit sota atmosfera d'argó.

DCM: de qualitat "grau de síntesis" de Scharlab.

DCM lliure de traces d'àcids: s'ha obtingut fent passar DCM de qualitat "grau de síntesi" de Scharlab per una columna de Al_2O_3 bàsica.

DCM anhidre: s'ha obtingut per destil·lació de DCM lliure de traces d'àcids sobre CaH_2 en pols, conservant-lo sobre pedres de CaH_2 i sota atmosfera d'argó.

DCE: de qualitat puríssima de Sigma-Aldrich, s'ha guardat sobre tamís molecular activat de 4 Å.

Dioxà: de qualitat espectrofotomètrica de Sigma-Aldrich.

Dioxà anhidre: s'ha obtingut per destil·lació de dioxà de qualitat espectrofotomètrica de Sigma-Aldrich sobre sodi, conservant-lo sobre pedres de CaH_2 i sota atmosfera d'argó.

DIPEA: de qualitat puríssima, de Merck.

DMAP: d'Alfa Aesar.

DMF anhidre: de qualitat puríssima de Panreac. S'ha guardat sobre tamís molecular activat de 4 Å. Abans de ser utilitzada s'hi ha bombollejat N₂ durant 2 hores per tal d'eliminar les impureses volàtils (amines).

DMF lliure d'amines: de qualitat puríssima de Panreac. S'hi ha bombollejat N₂ durant 2 hores per tal d'eliminar les impureses volàtils (amines).

DMT-Cl: d'Alfa Aesar.

Et₂O: de qualitat puríssima de Scharlab o bé de qualitat espectrofotomètrica de Sigma-Aldrich.

EtOH absolut: de Panreac.

Formamida: de qualitat espectrofotomètrica de Sigma-Aldrich.

Hexà: de qualitat puríssima de Scharlab.

Imidazole: de Ferosa.

K₂CO₃ 0,05 M en MeOH: S'ha dissolt K₂CO₃ (*J.Escuder*) triturat en MeOH de qualitat HPLC (VWR).

MeOH: de qualitat HPLC de VWR o Panreac, o bé de qualitat PS de Panreac.

MgCl₂: de Riedel-de Haën.

PEG 4000: de Calbiochem.

Piridina anhidra: s'ha adquirit piridina anhidra comercial (Sigma-Aldrich).

THF: de qualitat "grau de reactiu" de Scharlab.

THF anhidre: s'ha obtingut per destil·lació de THF de qualitat "grau de reactiu" de Scharlab sobre sodi i utilitzant benzofenona com a indicador, conservant-lo sobre sodi i sota atmosfera d'argó.

La resta de reactius utilitzats, si no s'indica el contrari, han sigut de Fluka, Sigma o Aldrich.

1.2.2. Solucions tampó

- Tampó d'acetat d'amoni (AcONH₄) 2 M pH=7

Per preparar 1 L d'aquest tampó s'han pesat 154.2 g d'acetat d'amoni, s'han dissolt en aigua desionitzada i s'ha ajustat el pH de la dissolució a 7 amb NH₃ o AcOH, segons hagi convingut. Finalment s'ha enrasat en un matràs aforat d'1 L. Un cop enrasada s'ha filtrat la dissolució amb un filtre de 45 µm de mida de porus per tal de poder emprar-la com a eluent d'HPLC.

- Tampó d'acetat de trietilamoni (TEAAc) 2 M pH=7

Per preparar 500 mL d'aquest tampó s'han addicionat 140 mL de TEA (1 mol) a 59 mL d'AcOH glacial (1 mol) en un erlenmeyer amb 200 mL d'aigua amb agitació magnètica i en un bany de gel. L'agitació s'ha mantingut durant una hora, s'ha ajustat el pH de la dissolució a 7 amb TEA o AcOH i s'ha enrasat en un matràs aforat a 500 mL. Un cop enrasada s'ha filtrat la dissolució amb un filtre de 45 µm de porus per tal de poder emprar-la com a eluent d'HPLC.

- Tampó d'imidazole-HCl 400 mM pH=7

Per preparar 50 mL d'aquest tampó s'han pesat 1.36 g d'imidazole, s'han dissolt en aigua desionitzada i s'ha ajustat el pH de la dissolució a 7 amb HCl. Finalment s'ha enrasat en un matràs aforat de 50 mL.

- Tampó MES 500 mM pH=6

Per preparar 50 mL d'aquest tampó s'han pesat 4.88 g de MES, s'han dissolt en aigua desionitzada i s'ha ajustat el pH de la dissolució a 6 amb NaOH o bé amb HCl. Finalment s'ha enrasat en un matràs aforat de 50 mL.

- Tampó Na₂PIPES 500 mM pH=7

Per preparar 50 mL d'aquest tampó s'han pesat 8.66 g de Na₂PIPES, s'han dissolt en aigua desionitzada i s'ha ajustat el pH de la dissolució a 7 amb HCl. Finalment s'ha enrasat en un matràs aforat de 50 mL.

- Tampó Tris·HCl 1 M pH=7,5

Per preparar 50 mL d'aquest tampó s'han pesat 6.07 g de Tris, s'han dissolt en aigua desionitzada i s'ha ajustat el pH de la dissolució a 7,5 amb HCl. Finalment s'ha enrasat en un matràs aforat de 50 mL.

1.3 Cromatografia

1.3.1. Cromatografia en capa fina

La cromatografia en capa fina s'ha realitzat sobre cromatofolis de gel de sílice amb indicador de fluorescència a 254 nm sobre suport d'alumini (60 F, 0.2 mm, Merck). El revelat s'ha dut a terme per visualització amb una làmpada d'ultraviolat a 254 nm o per exposició a vapors de HCl.

1.3.2. Cromatografia en columna

La cromatografia en columna s'ha realitzat utilitzant com a fase estacionària gel de sílice (Chromatogel 60Å CC, 35-70 µm, SDS) i emprant com a fase mòbil una barreja adequada de dissolvents orgànics escollits segons la polaritat dels productes a purificar.

1.3.3. Cromatografia líquida d'alta resolució²⁸¹

L'anàlisi per cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) en fase inversa s'ha dut a terme habitualment en un aparell Waters 2695 (Separations Module 2695 i PDA detector 2996), mentre que la purificació s'ha portat a cap en un aparell Waters 600 (Controller 600, Detector 2487).

La columna emprada habitualment en condicions analítiques ha sigut una Kromasil 100 C₁₈ de Teknokroma de 250x4 mm (10 µm de mida de partícula), treballant sempre a un flux d'1 mL/min. La columna usada habitualment en condicions semipreparatives ha sigut una Jupiter C₁₈ de Phenomenex de 250x10 mm (10 µm de mida de partícula, 300 Å), treballant normalment a un flux de 4 mL/min.

Com a sistema d'elució s'ha utilitzat un gradient de dos dissolvent: A: TEAA 0.05 o 0.1 M, en condicions analítiques o preparatives, respectivament, (ocasionalment s'ha emprat AcONH₄ 0.05 M en condicions analítiques) i B: H₂O/ACN (1:1) o ACN. Abans d'usar-los, els eluents s'han desgasat durant 15 min en un bany d'ultrasons.

1.3.4. Cromatografia líquida de mitjana resolució

La purificació per cromatografia líquida de mitja resolució (MPLC) s'ha realitzat en sistemes compostos d'una bomba de pistó Ismatec Mc-Z, un detector d'UV-Vis Uvicord SII de Pharmacia Biotech, un col·lector de fraccions automàtic Ultrorac 7000 de LKB i un enregistrator REC 101 de Pharmacia Biotech o bé Ecograph T RSG30 de

Endress-Hauser. S'ha emprat una columna de fase inversa de gel de sílice C₁₈ (Vydac, 20x2 cm, 15-20 µm de diàmetre de partícula i 300 Å de mida de porus), eluint a un flux de 2-4 mL/min.

Els eluents que s'han usat han estat els mateixos que per a l'HPLC, emprant un sistema de vasos comunicants (gradientòmetre), de 600 mL cada vas, per poder obtenir el gradient d'elució desitjat.

1.3.5. Sep-Pack C₁₈

En ocasions el dessalat dels oligonucleòtids s'ha dut a terme usant cartutxos Sep-Pack C₁₈ de Waters. El protocol usat es descriu a la *TAULA 1.1*.

Etapa	Eluent	Volum (mL)
1	ACN	10
2	H ₂ O	10
3	TEAA 0.05 M	2
4	Oligonucleòtid en H ₂ O	2
5	H ₂ O	30
6	ACN/H ₂ O (1:1)	2 x 5
7	ACN	10

Taula 1.1. Protocol de dessalat amb Sep-Pack C₁₈.

S'ha comprovat la presència d'oligonucleòtid per UV-Vis en les fraccions 5, 6 i 7, idealment trobant-n'hi tan sols en la fracció 6. Finalment, s'han liofilitzat les fraccions que contenien oligonucleòtid.

1.3.6. Cromatografia d'exclusió molecular

El dessalat dels oligonucleòtids s'ha realitzat també per cromatografia d'exclusió molecular, en un sistema format per una bomba peristàtica LKB P-1 de Pharmacia, una columna de vidre (70 x 2.5 cm o bé 140 x 2.5 cm) reblida amb Sephadex G-10 o bé amb Sephadex G-25, un detector Uvicord SII i un enregistrator REC 111 d'Amersham Biosciences o bé Ecograph T RSG30 de Endress-Hauser. La mostra s'ha dissolt en la mínima quantitat possible d'aigua desionitzada i s'ha eluït amb aigua Milli-Q a un flux de 1.5-2.5 mL/min. S'han ajuntat les fraccions que contenien oligonucleòtid i s'han liofilitzat.

En ocasions s'han emprat cartutxos NAP (NAP-5, NAP-10 o NAP-25, segons el volum de mostra, de GE Healthcare) reblits amb Sephadex G-25, per tal de dur a terme el dessalat. Els protocols usats es descriuen a la *TAULA 1.2*.

Etapa	Eluent	Volum (mL)		
		NAP-5	NAP-10	NAP-25
1	TEAA 0.05 M	10	15	25
2	Càrrega del cru	0.1	0.75	1.5
3	H ₂ O	0.4	0.25	1
4	TEAA 0.05 M	0.5	1.2	3.5

Taula 1.2. Protocol de dessalat mitjançant cartutxos NAP d'exclusió molecular.

Les mostres s'han eluït per gravetat, mai s'ha d'aplicar pressió. Per acabar, s'ha comprovat per UV-Vis la presència d'oligonucleòtid en la fracció 4 i s'ha liofilitzat.

1.4 Diàlisi

La diàlisi s'ha dut a terme utilitzant membranes de diàlisi Spectra/Por de Spectrum Laboratories, amb un MWCO de 3500, un diàmetre de tub de 11.5 mm i amb una amplada nominal de 18 mm.

Per tal de dur a terme la diàlisi, primerament s'ha tallat la quantitat de membrana necessària i s'ha hidratat submergint-la en aigua Milli-Q durant 30 minuts. Un cop correctament hidratada, s'ha pinçat per l'extrem inferior amb una pinça que conté un pes, s'ha introduït la mostra dins la membrana i s'ha pinçat en l'extrem superior, assegurant-nos de deixar una cambra d'aire. La membrana de diàlisi s'ha submergit en una proveta d'1 L que contenia la solució contra la que es volia dialitzar (típicament aigua Milli-Q) i s'ha deixat sospesa en una suau agitació magnètica durant 4 hores. Passades les 4 hores, s'ha canviat la solució dialitzant per solució nova i s'ha deixat en agitació 4 hores més, repetint-se passades aquestes 4 hores el canvi de solució dialitzant i deixant en agitació magnètica suau durant tota la nit.

Un cop acabada la dialització, s'ha recuperat el contingut de la membrana de diàlisi amb l'ajuda d'una pipeta Pasteur, s'ha transvasat a un tub de centrífuga i s'ha liofilitzat.

1.5 Electroforesi en gel de poliacrilamida (PAGE)²⁸²

Per realitzar els gels d'electroforesi s'ha utilitzat un aparell Hoefer S6660 de Pharmacia, plaques de vidres de 18x24 cm, pintes i espaiadors de diferent gruix (0.75 mm en el cas dels gels analítics, 1 o 1.5 mm en el cas dels preparatius) i una font de voltatge LKB 2197 Bromma o bé una font EPS 3501 XL de GE Healthcare.

El persulfat amònic usat és de Serva, mentre que la resta de reactius d'electroforesi (acrilamida, bisacrilamida, urea, TEMED, formamida i el reactiu *Stains-All*) són de Sigma-Aldrich, així com el tampó TBE 10x (1.3M de Tris, 0.45M d'àcid bòric, 25 mM d'EDTA).

La solució d'acrilamida/bisacrilamida (38:2) al 20%, 8M d'urea, s'ha preparat de la següent manera: 450 g d'urea, 190 g d'acrilamida, 10 g de bisacrilamida, 100 mL TBE 10x i 250 mL d'aigua Milli-Q. La mescla s'ha agitat vigorosament a 50°C, s'ha enrasat a 1 L i s'ha filtrat a través d'un filtre de 0.45 µm de mida de porus.

Els marcadors usats han sigut bromofenol (migració equivalent aproximadament a un octàmer) i cianoxilenol (migració equivalent a un 28mer). Les proporcions de la dissolució de marcadors són: 0.25% de bromofenol, 0.25% de cianoxilenol, 30% de glicerol i la resta aigua Milli-Q.

1.5.1. Gel analític

S'han ajuntat dues plaques de vidre amb espaiadors de 0.75mm, s'han subjectat amb les pinces i s'ha col·locat la pinta entre els dos vidres. S'han mesurat 35 mL de solució d'acrilamida al 20% i s'han barrejat amb un 1% d'una solució de persulfat amònic al 10% i amb un 0,1% de TEMED. Després d'agitar-ho vigorosament, s'ha abocat ràpidament entre les dues plaques amb l'ajuda d'una xeringa i s'ha deixat polimeritzar durant 30 minuts. Un cop polimeritzat, s'ha retirat la pinta i s'han rentat els pous amb TBE 0.5x, preparat diluint 20 vegades el tampó TBE 10x comercial i que és també la dissolució que s'ha emprat com a solució conductora.

S'han dipositat 2 µL de solució de marcadors en els extrems del gel i s'ha corregut durant 1 hora al voltatge seleccionat (700-850 V).

S'ha dissolt una quantitat de 0.05-0.2 OD₂₆₀ d'oligonucleòtid en una solució d'aigua/formamida (1:1) en un volum no major a 25 µL i s'ha escalfat amb un bany de sorra a 90°C durant 1 minut. S'han carregat les solucions als pous, així com els marcadors, i s'ha corregut el gel al voltatge seleccionat fins que els marcadors han arribat a la distància adequada.

1.5.1.1 Tinció del gel

S'ha emprat el reactiu *Stains-All*, que tenyeix les taques de DNA i RNA de color blau o violeta. Un cop parat el voltatge, s'ha col·locat el gel amb cura en una cubeta amb aigua, on s'ha deixat durant uns 10 minuts per eliminar restes d'urea i facilitar així una tinció més homogènia. S'ha eliminat l'aigua de la cubeta i s'hi han afegit 400 mL de la solució de tinció (40 mg de *Stains-All* dissolts en 50 mL de formamida i diluïts amb 350 mL d'aigua). S'ha deixat durant 30 minuts amb la cubeta tapada amb paper d'alumini i, acabat aquest temps, s'ha decantat la solució de tinció. S'ha rentat el gel amb aigua diverses vegades i s'ha deixat decolorar el fons del gel, ja fos amb llum solar directa o usant una làmpada de llum visible. Un cop decolorat, s'ha tallat la porció de gel que ens interessava, s'ha dipositat sobre un suport de paper porós, s'ha cobert amb una membrana de cel·lofana humitejada i s'ha assecat a l'assecador de gels BioRad 583 durant 2 hores a 60°C.

1.5.2. Gel preparatiu

El procediment ha sigut el mateix que en la preparació del gel analític, amb la diferència que la quantitat de solució preparada ha sigut 45 o 70 mL, segons els separadors usats hagin sigut de 1 o 1.5 mm, respectivament. En cada pou s'han carregat 1-2 OD₂₆₀ d'oligonucleòtid.

Un cop realitzada l'electroforesi, s'ha desmuntat l'aparell i el gel no s'ha tenyit, sinó que s'ha col·locat amb cura sobre un cromatofoli de gel de sílice embolicat amb film transparent i s'ha observat sota llum UV per tal de revelar les diferents bandes. Amb una fulla d'afaitar neta i estèril s'han tallat les bandes desitjades i s'han transferit els trossos de gel a tubs de centrífuga de 15 mL.

L'elució de l'oligonucleòtid purificat dels trossos de gel retallats s'ha dut a terme mitjançant extracció o bé mitjançant electroelució.

1.5.2.1. Elució mitjançant extracció

El gel s'ha triturat bé amb l'ajut d'una vareta de vidre i s'hi ha addicionat 5-10 mL de NaCl 0.2 M. Després d'agitar vigorosament, s'ha deixat agitant durant tota la nit. Finalment, el producte s'ha dessalat mitjançant la tècnica més convenientment.

1.5.2.2. Elució mitjançant electroelució

Per tal de dur a terme l'electroelució dels oligonucleòtids purificats s'ha usat un sistema Elutrap de Whatman. Aquest sistema consisteix en una cambra electroforètica horitzontal en la qual es situen una sèrie de dispositius (*device*) a través dels quals fluirà el corrent elèctric (*FIGURA 1.1*). A cada extrem del dispositiu es col·loca una membrana tipus BT1, la qual permet el pas del flux de corrent però en canvi no permet que els oligonucleòtids la traspassin. Mitjançant la membrana BT2, aquesta sí permeable als oligonucleòtids, es forma una cambra d'elució en el final de cada dispositiu. Al mig de cada dispositiu s'han col·locat els trossos de gel retallats, s'ha cobert el sistema amb tampó (89 mM Tris, 89 mM borat, 2 mM EDTA, pH 8.3) i s'ha aplicat un corrent elèctric de 200 V durant 2 hores. Aquest corrent fa que l'oligonucleòtid migri dels trossos de gel cap a la cambra d'elució i quedi retingut allí.

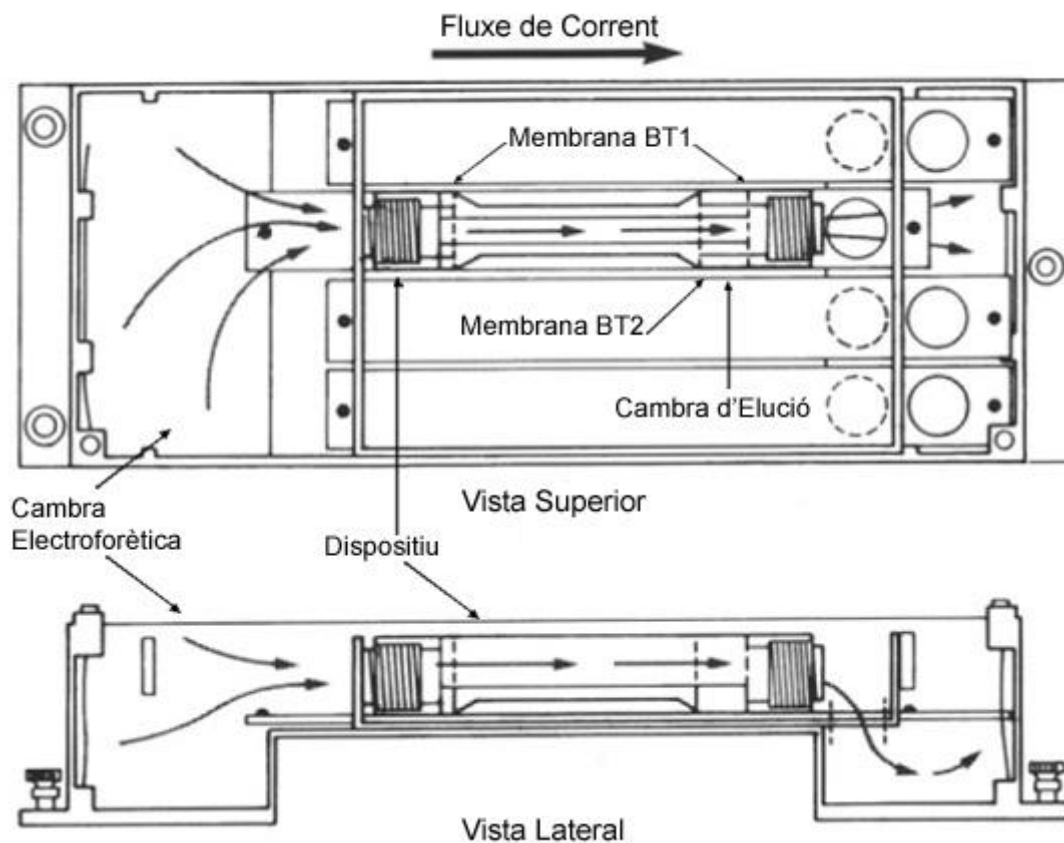


Figura 1.1. Esquema del sistema Elutrap de Whatman. El corrent elèctric, representat en l'esquema per fletxes, passa a través del dispositiu i elueix els oligonucleòtids dels trossos de gel dipositats en el centre del mateix. Aquests oligonucleòtids eluïts traspassen la membrana BT2 però no la BT1, concentrant-se en la cambra d'elució.

Passades les dues hores, s'ha invertit la polaritat durant 15 segons per tal de desenganxar l'oligonucleòtid de les membranes. S'ha col·lectat l'oligonucleòtid electroeluint en la cambra d'elució i s'ha quantificat per UV-Vis a 260 nm. S'ha reomplert la cambra amb tampó, s'ha tornat a eluir, col·lectar i quantificar. El procés es repeteix fins que la quantitat d'oligonucleòtid eluïda sigui inferior a 2-3 OD₂₆₀, típicament 3 elucions.

1.6 Determinació qualitativa i quantitativa de la funcionalització de les resines

1.6.1 Assaig qualitatiu de ninhidrina²⁸³

L'assaig de ninhidrina permet detectar la presència d'amines primàries lliures sobre suports polimèrics. S'ha agafat una alíquota de resina (neta i seca) i s'ha introduït en un petit vial, s'hi han afegit 6 gotes de reactiu A i 2 gotes de reactiu B i s'ha escalfat a 110°C durant 3 minuts. L'aparició d'una coloració blau-violeta indica la presència d'amines lliures, mentre que una coloració groga indica un resultat negatiu de l'assaig. L'avaluació del color s'ha realitzat per comparació amb un control sense resina realitzat amb paral·lel.

Reactiu A: s'ha preparat una dissolució de 40 g de fenol en 10 mL d'EtOH absolut i una altra de KCN 10 mM en 100 mL de piridina anhidra. Ambdues dissolucions s'han agitat per separat amb 4 g de resina Amberlite MB-3 (*Merck*) durant 45 min, s'han filtrat i s'han mesclat.

Reactiu B: s'han dissolt 2.5 g de ninhidrina en 50 mL d'EtOH absolut. La solució s'ha conservat en un recipient protegit de la llum.

1.6.2 Determinació de la funcionalització de les Fmoc-resines

S'ha pesat una alíquota d'uns 10 mg en una xeringa de polipropilè proveïda d'un disc filtrant de polietilè i s'ha deixat en el dessecador fins que ha arribat a pes constant. S'ha tractat amb piperidina al 20% en DMF (v/v) seguint el protocol descrit en la *TAULA 1.3*. S'han recollit els filtrats procedents de les etapes 3, 4 i 5 en un matràs aforat de 25 mL i s'ha enrasat amb DCM. S'ha determinat l'absorbància a 300 nm de la

N-(9-fluorenilmetil)-piperidina formada ($\epsilon=7800 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) i s'ha calculat la funcionalització segons la fórmula:

$$f = \frac{A_{300} \cdot V \cdot 10^6}{\epsilon \cdot l \cdot m}$$

on A_{300} és l'absorbància mesurada, V (mL) és el volum total, ϵ ($\text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) és el coeficient d'extinció molar de la *N*-(9-fluorenilmetil)-piperidina a 300 nm, l (cm) és el pas de llum de la cubeta i m (mg) és la massa de l'alíquota pesada.

Etapa	Dissolvent/Reactiu	Temps (min)
1	DCM	4 x 1
2	DMF	4 x 1
3	20% Piperidina/DMF (200 μL)	3 x 1
4	DMF (100 μL)	1
5	DCM	4 x 1

Taula 1.3. Tractament de desprotecció de les Fmoc-NH-resines.

1.6.3 Determinació de la funcionalització de les DMT-resines

S'ha pesat una alíquota d'uns 10 mg en una xeringa de polipropilè proveïda d'un disc filtrant de polietilè i s'ha deixat en el dessecador fins que ha arribat a pes constant. S'ha tractat amb TCA al 2% en DCM seguint el protocol descrit en la TAULA 1.4. S'han recollit els filtrats procedents de les etapes 2 i 3 i s'ha evaporat a sequedat. El residu s'ha redissolt i enrasat a 100 mL en un matràs aforat amb una solució EtOH/ HClO_4 (3:2). S'ha determinat l'absorbància a 498 nm del catió 4,4'-dimetoxitritil alliberat ($\epsilon=71700 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) i s'ha calculat la funcionalització segons la fórmula:

$$f = \frac{A_{498} \cdot V \cdot 10^6}{\epsilon \cdot l \cdot m}$$

on A_{498} és l'absorbància mesurada, V (mL) és el volum total, ϵ ($\text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) és el coeficient d'extinció molar del catió 4,4'-dimetoxitritil a 498 nm, l (cm) és el pas de llum de la cubeta i m (mg) és la massa de l'alíquota pesada.

Etapa	Dissolvent/Reactiu	Temps (min)
1	DCM	4 x 1
2	2% TCA/DCM	2 x 3
3	DCM	4 x 1

Taula 1.4. Tractament de desprotecció de les DMT-resines.

1.7 Síntesi d'oligonucleòtids

La síntesis d'oligonucleòtids en fase sòlida s'ha realitzat en un sintetitzador automàtic Applied Biosystems 3400, utilitzant el mètode del fosfit triester i derivats fosforamidit dels diferents nucleòsids com a unitat d'elongació de la cadena oligonucleotídica. S'han emprat diferents programes o cicles de síntesi segons el suport o el fosforamidit a acoblar.

Els fosforamidits (prèviament assecats durant una nit al dessecador de buit amb P_2O_5 i KOH) s'han dissolt en ACN o DCM anhidre, segons convingués, sota atmosfera d'argó. Tot el material de vidre o metàl·lic emprat havia d'haver estat assecat a l'estufa a 110°C i temperat en un dessecador de buit.

Els 3'-(2-cianoetil)-N,N-diisopropil-fosforamidits de 5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-desoxiribonucleòsids o ribonucleòsids protegits amb el grup TOM han sigut subministrats per Glen Research, mentre que els nucleòsids protegits amb el grup TBDMS ho han sigut per Link Technologies.

Els reactius usats durant la síntesi estàndard són:

- TCA 3% en DCM com a solució detritilant.
- BTT 0.3 M en ACN o tetrazole 0.45 M en ACN com a solució activadora.
- $\text{Ac}_2\text{O}/2,6\text{-lutidina}/\text{THF}$ (1:1:8) o $\text{Pac}_2\text{O}/\text{py}/\text{THF}$ (1:1:8) (Cap Mix A) i 1-metilimidazole 16% en THF (Cap Mix B) com a solucions de bloqueig.
- I_2 0.1 M en $\text{H}_2\text{O}/\text{Pir}/\text{THF}$ o bé $^t\text{BuOOH}$ 1 M en DCM com a solució oxidant.

Tots els reactius anteriors i l'ACN anhidre s'han adquirit a Glen Research, a excepció del BTT, adquirit a Link Technologies. L'argó usat és de qualitat 5.0, d'Abelló-Linde.

El suport sòlid emprat en la síntesi estàndard ha sigut CPG comercial funcionalitzada amb un nucleòsid (DMT-dN/N-succinil-*lcca*-CPG), ($f=40\text{-}50\ \mu\text{mol/g}$) de Glen Research o bé de Link Technologies.

La preparació d'altres dissolvents i reactius emprats en la síntesi dels oligonucleòtids es descriu en els seus apartats corresponents. En tots els casos s'han filtrat abans de la seva utilització amb un filtre de nylon de $0.45\ \mu\text{m}$ (VWR).

1.8 Quantificació d'oligonucleòtids²⁸⁴

La quantificació dels oligonucleòtids s'ha realitzat mesurant la seva absorbància a 260 nm, longitud d'ona al voltant de la qual els oligonucleòtids presenten el màxim d'absorció. La quantitat d'oligonucleòtid es dona en forma de OD₂₆₀.

Una OD₂₆₀ (densitat òptica a 260 nm) es defineix com la quantitat d'oligonucleòtid que, continguda en un volum d'1 mL en una cubeta d'1 cm de pas de llum, dona una absorbància de valor unitat. Per tant, el nombre d' OD₂₆₀ es calcula com:

$$OD_{260} = A \cdot V(\text{mL})$$

L'equivalent molar d'aquesta unitat es pot calcular tenint en compte que l'absorció de l'oligonucleòtid es deu a les contribucions individuals dels diferents nucleòsids, corregit per un factor relacionat amb el fenomen d'apilament o *stacking*, ja que les interaccions per l'apilament de les bases fan disminuir l'absorbància del DNA respecte d'aquella mesurada pels nucleòsids individuals. Aquest factor és $f=0.9$ en el cas dels oligonucleòtids de cadena lineal i $f=0.8$ en el cas dels oligonucleòtids de doble cadena, de tal manera que

$$\epsilon_{\text{oligonucleòtid}} = \sum(\epsilon_{\text{bases}}) \cdot f$$

Desoxinucleòsid	ϵ_{260}	Nucleòsid	ϵ_{260}
dA	15200	A	15100
dG	11700	G	11500
T	8800	U	10100
dC	7300	C	7700

Taula 1.5. Coeficients d'extinció molar dels diferents nucleòsids mesurats a pH=7, 25°C i 260 nm ($\text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

El coeficient d'extinció molar es pot calcular també de forma més exacta mitjançant el mètode del veí més proper (*nearest-neighbour method*),²⁸⁵ que té en compte l'efecte dels nucleòtids veïns per calcular qualsevol propietat.

Aquest últim és el que s'ha utilitzat, ja que es tracta del mètode més exacte per tal de calcular el coeficient d'extinció molar. D'aquesta manera, si tinguéssim, per exemple, la seqüència dATGCTTC, el coeficient d'extinció es calcularia com:

$$\epsilon_{\text{ATGCTTC}} = 2(\epsilon_{\text{dApdT}} + \epsilon_{\text{dTpdG}} + \epsilon_{\text{dGpdC}} + \epsilon_{\text{dCpdT}} + \epsilon_{\text{dTpdT}} + \epsilon_{\text{dTpdC}}) - \epsilon_{\text{pdT}} - \epsilon_{\text{pdG}} - \epsilon_{\text{pdC}} - \epsilon_{\text{pdT}} - \epsilon_{\text{pdT}}$$

on pdy i dxpdy es corresponen al valors indicats en la *TAULA 1.6*.

Monòmer	ϵ_{260}	Monòmer	ϵ_{260}
pdA	15400	dCpdG	18000
pdC	7400	dCpdT	15200
pdG	11500	dGpdA	25200
pdT	8700	dGpdC	17600
dApdA	27400	dGpdG	21600
dApdC	21200	dGpdT	20000
dApdG	25000	dTpdA	23400
dApdT	22800	dTpdC	16200
dCpdA	21200	dTpdG	19000
dCpdC	14600	dTpdT	16800

Taula 1.6. Coeficients d'extinció molar dels diferents desoxiribonucleòsids mesurats a pH=7, 25°C i 260 nm ($Lmol^{-1}cm^{-1}$).²⁸⁶

Per tal de dur a terme aquest càlculs, que poden convertir-se en molt farragosos en oligonucleòtids llargs, s'han emprat l'eina de càlcul OligoAnalyzer 3.1, disponible en la pàgina web <http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/default.aspx>, la qual es capaç de calcular en pocs segons i amb gran precisió el coeficient d'extinció molar dels oligonucleòtids, tant de DNA com d'RNA, mitjançant el mètode del veí més proper. En el cas del oligonucleòtids cíclics ha sigut necessari aplicar un factor de correcció de 0.97. El coeficients d'extinció molar dels diferents oligonucleòtids sintetitzats en aquesta tesi doctoral es mostren en la *TAULA 1.7*.

Seqüència	Producte	ϵ_{260}	Seqüència	Producte	ϵ_{260}
d<p(CAG) ₅ >	12	153.4	r(UGC) ₃ (UGC) ₈ (UGC) ₃	52	322.8
r<pEG(CUG) ₃ CE>	14	89.0	rG(CUG) ₃ CUGC	53	109.2
r<p(EGCUGCE) ₂ >	15	82.6	rUGCUGC	58	48.0
d<p(TE) ₂ >	18	17.4	d(GCTCGTCGAGC)	67	199.0
r<p(UE) ₂ >	19	17.4	d(GCTGCTGCTGC)	70	180.4
r(UGC) ₁₄	22	322.8	dTGCT(GCT) ₄ GC	80	292.2
d(GCA) ₆	23	178.9	dGCTGCT(GCT) ₅	83	341.2
r(UGC) ₃ CGUAACCUACGA CGAACCUAGAUG(UGC) ₃	25	372.3	dCT(GCT) ₆ G	92	341.4
r(GCU) ₆	29	139.9			

Taula 1.7. Coeficients d'extinció milimolar ($\mu mol^{-1}mLcm^{-1}$) a 25°C i 260 nm dels diferents oligonucleòtids preparats en aquesta tesi. **G** representa la guanosina protegida O⁶-al·lil, mentre que **T** representa el nucleòsid per on s'ha dut a terme l'entrecruament de les cadenes.

Per tal de dur a terme aquests càlculs, s'han hagut d'efectuar algunes aproximacions. En primer lloc, en el cas d'oligonucleòtids amb espaiadors s'han considerat que aquests espaiador no hi eren i que els fragments que interrompien eren independents. Per exemple, en el cas del $r\langle p(\text{EGCUGCE})_2 \rangle$ s'ha considerat el coeficient d'extinció molar com a dos cops el valor del coeficient dels fragment GCUGC, aplicant el factor de correcció 0.97 per tractar-se d'un cicle. En segon lloc, en el cas de la guanosina protegida en forma de *O*-al·lil s'ha usat com a valor del coeficient d'extinció molar el de la guanosina desprotegida. Finalment, en el cas del oligonucleòtids entrecreuat, s'ha considerat el coeficient d'extinció molar com a la suma de les contribucions d'ambdues cadenes i usant el valor de la timidina en la timidina entrecreuada, assumint que l'entrecreuament no en modificava el valor.

1.9 Estudi per espectroscòpia UV-Vis i per dicroisme circular^{267b,287}

Les corbes de fusió per UV-Vis s'han realitzat en un espectrofotòmetre Jasco V-550 UV-Vis, proveït d'un peltier Jasco ETC-505T connectat a un bany d'aigua Pharmacia Biotech Multitemp III. Els espectres de dicroisme circular 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. Les cubetes emprades habitualment han estat de quars d'1 cm de pas de llum, amb una capacitat d'1.5 mL.

Les corbes de fusió en UV-Vis s'han dut a terme mesurant la variació de l'absorbància de la mostra a 260 nm al variar la temperatura 0.5°C/min i mesurant-ho cada 0.5 minuts. S'ha treballat sempre amb flux de N₂ al compartiment de mostres per evitar la condensació. Els resultats experimentals s'han ajustat a una sigmoide mitjançant el programa Origin 7.0383 o OriginPro 8.0724.

La temperatura de fusió es correspon amb el punt d'inflexió de la corba obtinguda, definint-se com la temperatura a la qual el 50% de la mostra es troba hibridada i l'altre 50% es troba lliure, calculat a partir de l'equació de la sigmoide a la que s'havien ajustat les dades experimentals.

Els espectres de dicroisme circular s'han realitzat mesurant la variació de l'el·lipticitat de la mostra al variar la longitud d'ona des de 220 a 320 nm, a una temperatura de 20°C i amb un flux de N₂ de 3 mL/min. Els espectres han sigut el resultat de 4 acumulacions i de la sostracció de la línia de base del blanc. Per a la seva

representació els espectres s'han afinat lleugerament. Per tal de facilitar-ne la comparació, sovint s'ha representat l'el·lipticitat molar en lloc de l'el·lipticitat absoluta.

Abans d'enregistrar els espectres, les mostres s'han escalfat a 95°C durant 10 minuts i s'han deixat refredar lentament fins a temperatura ambient durant unes 4-5 hores o bé s'han escalfat a 95°C durant 10 minuts i s'han refredat en un bany de gel a 0°C immediatament i durant 30 minuts.

1.10 Caracterització per espectrometria de masses

1.10.1. Espectrometria de masses MALDI-TOF²⁸⁸

Les mostres s'han preparat mesclant 0.5 µL de la dissolució que contenia l'analít amb 0.5 µL de solució de citrat d'amoni (CA) i afegint-hi posteriorment 0.5 µL de matriu. De la mescla se n'han pres 0.5 µL i s'han dipositat sobre la placa de MALDI, deixant evaporar el dissolvent.

En el cas d'oligonucleòtids, s'han utilitzat matrius diferents segons la seva grandària. En el cas dels oligonucleòtids de petita grandària (<14-16mer) s'ha emprat 2,4,6-trihidroxiacetofenona (THAP), en una solució 25 mg/mL en H₂O/ACN (1:1), mentre que pels oligonucleòtids de grandària major s'ha usat l'àcid 3-hidroxipicolínic (HPA), en una solució 25 mg/mL en H₂O/ACN (1:1). En el cas de nucleòsids s'ha emprat THAP en una solució 25 mg/mL en H₂O/ACN (1:1). Tant les matrius com el CA (50 mg/mL en H₂O) s'han preparat al moment o s'han conservat fresques al congelador.

A l'hora d'enregistrar els espectres s'ha treballat en diferents condicions experimentals, en funció de la naturalesa de la mostra a analitzar i de la massa esperada. S'ha emprat el mode reflector sempre que ha sigut possible degut a que és més precís, tot i ser menys sensible. El mètode lineal, en canvi, és més sensible però força menys precís, pel que s'ha reservat per analitzar mostres particularment difícils. Els espectres dels oligonucleòtids s'han enregistrat en mode negatiu, mentre que els de derivats nucleosídics s'han enregistrat en mode positiu.

Les masses que s'han calculat han sigut sempre masses monoisotòpiques.

1.10.2. Espectrometria de masses d'electrosprai i d'ionització química²⁸⁹

Els espectres de masses per electrosprai o ionització química han sigut realitzats per la Unitat d'Espectrometria de Masses dels Serveis Científico-Tècnics de la UB. En els casos de nucleòsids o oligonucleòtids de llargada curta les masses que s'han calculat ha sigut sempre monoisotòpiques; en el cas dels oligonucleòtids de mida llarga (majors que 18mers) les masses que s'han calculat han sigut sempre moleculars.

En els casos d'espectres de HPLC-MS els hem obtingut nosaltres mateixos en un aparell Micromass ZQ de Waters, amb detector de simple quadrupol, acoblat a un sistema d'HPLC Waters 2695 i amb un detector de fotodíodes Waters 2996 PDA, del Departament de Química Orgànica de la UB. Les condicions d'elució s'indiquen en cada cas en concret.

1.11. Composició en nucleòsids dels oligonucleòtids²⁹⁰

Per tal de determinar la composició en nucleòsids de les diferents seqüències, aquestes s'han sotmès a una digestió enzimàtica amb SVPD i AP i s'ha analitzat, posteriorment, per HPLC en fase inversa.

SVPD: Fosfodiesterasa de verí de serp *Crotalus durissus* (1.5 U/500 µL, Sigma). Es tracta d'una endonucleasa que degrada l'oligonucleòtid, començant per l'extrem 3'-terminal, que ha de ser un hidroxil lliure, generant nucleòsids 5'-fosfat.

AP: Fosfatasa alcalina (1 U/µL, Boehringer Mannheim). Hidrolitza els nucleòsids 3' o 5'-fosfat generant nucleòsids lliures.

S'han preparat 100 µL de la següent mescla enzimàtica per dur a terme la digestió total de l'oligonucleòtid: 50 µL de Tris·HCl pH 8, 10 µL de MgCl₂ 0.1 M, 1 µL de SVPD, 1.5 µL de AP i 38.5 µL d'aigua. S'han liofilitzat 0.05-0.1 OD₂₆₀ d'oligonucleòtid en un eppendorf i s'han tractat amb 50 µL de la solució enzimàtica durant un mínim de 6 h a 37°C.

L'anàlisi de la digestió s'ha fet per HPLC en fase inversa emprant AcONH_4 0,01 M com a eluent A i $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ (1:1) com a eluent B. Els gradients utilitzats han sigut:

- *En DNA*: isocràtic al 10% B durant 5 minuts, del 10 al 25% de B en 15 minuts. L'ordre d'elució dels nucleòsids ha sigut dC, dG, T, dA.
- *En RNA*: isocràtic al 2% B durant 5 minuts, del 2 al 30% de B en 15 minuts. L'ordre d'elució dels nucleòsids ha sigut C, U, G i A.

La proporció de nucleòsids es determina de la següent manera:

- Càlcul del valor mitjà de la relació àrea/coeficient d'extinció molar:

$$X = \frac{\sum_i \left(\frac{\text{àrea}}{\varepsilon} \right)_i}{N}$$

on i fa referència a cada nucleòsid, *àrea* és l'àrea del pic d'HPLC corresponent a cada nucleòsid, ε és el coeficient d'extinció molar d' i (TAULA 1.5), i N el nombre de nucleobases de la seqüència analitzada.

- Càlcul de la proporció de nucleòsids:

$$n_i = \frac{\left(\frac{\text{àrea}}{\varepsilon} \right)_i}{X}$$

on n_i és el valor experimental trobat per a cada nucleòsid.

2 Síntesi d'oligonucleòtids cíclics mitjançant ciclació en fase sòlida

2.1 Oligodesoxiribonucleòtids cíclics

2.1.1 Síntesi de la nucleotidil-resina 9

2.1.1.1 Obtenció de la resina 6

En una xeringa de 10 mL de polipropilè, proveïda d'un disc filtrant de polietilè, es van pesar 1.5 g (0.33 mmol, 1 eq) de resina TentaGel NH₂ (Rapp Polymere, 0.22 mmol/g) i es va rentar seguint el protocol descrit en la *TAULA 2.1*. Cal destacar, que en la obtenció de les diverses resines preparades en aquest Capítol, el DCM i la DMF emprats van ser lliures d'àcids i d'amines volàtils, respectivament.

Etapa	Dissolvent/Reactiu	Temps (min)
1	DCM	2
2	20% TCA/DCM	3
3	DCM	2
4	20% Piperidina/DMF	3
5	DMF	2
6	MeOH	2

Taula 2.1. Protocol seguit per tal de rentar la resina TentaGel NH₂ abans de dur-hi a terme el primer acoblament. Tots els tractaments es van dur a terme per duplicat.

Un cop rentada la resina, es van addicionar a la xeringa 117 mg (0.33 mmol, 1 eq) d'àcid *N*-Fmoc-6-aminohexanoic i 45 mg (0.33 mmol, 1 eq) d'HOBt. Es van afegir 5 mL d'una barreja que contenia DCM/DMF (1:1) i 51 µL (0.33 mmol, 1 eq) de DIPC i es va deixar reaccionant amb agitació mecànica durant 24 hores. Es va comprovar la correcta incorporació de l'àcid *N*-Fmoc-6-aminocaproic mitjançant un test de ninhidrina, repetint l'acoblament en el cas que aquest no hagués estat quantitatiu.

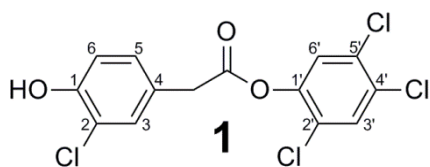
La resina es va rentar amb DMF (4x1 min) i amb DCM (4x1 min) i es va assecar. Per tal d'acetilar els grups amino no reaccionats es va afegir un excés d'una mescla 1:1 d'Ac₂O i DIPEA (15 eq d'Ac₂O respecte a la funcionalització de la resina) en DMF i es va deixar reaccionant durant 30 min. Es va comprovar l'absència d'amines lliures en la resina mitjançant un test de ninhidrina, repetint el tractament en el cas que el resultat fos positiu. Es va rentar la resina amb DMF (4x1 min) i amb DCM (4x1 min) i es va assecar bé. Finalment, es va determinar el grau de funcionalització de la resina seguint el protocol descrit en l'apartat 1.6.2 de la Part Experimental (Materials i Mètodes), el qual va oscil·lar entre els 150 i els 200 μmol NH₂/g resina.

2.1.1.2 Obtenció de l'ester actiu 3

2.1.1.2.1 Síntesi del (3-cloro-4-hidroxifenil)acetat de 2,4,5-triclorofenil 1

En un baló de fons rodó de 250 mL es van pesar 4.7 g (23.8 mmol, 1.1 eq) de 2,4,5-triclorofenol i 4.9 g (23.8 mmol, 1.1 eq) de DCC i es van dissoldre en 30 mL de DCM. En un matràs erlenmeyer es van pesar 4.0 g (21.5 mmol, 1 eq) de l'àcid 3-cloro-4-hidroxifenilacètic i es van dissoldre en 130 mL d'AcOEt. Aquesta solució es va afegir sobre la primera, gota a gota i lentament, amb l'ajuda d'un embut d'addició i sota agitació magnètica i es va deixar reaccionar a temperatura ambient durant 12 h.

Passades les 12 h es va observar l'aparició d'un precipitat en la solució (*N,N'*-diciclohexilurea, subproducte de la DCC), el qual es va separar per filtració. La solució obtinguda es va refredar en un bany amb gel per tal de forçar al màxim la precipitació de la urea i es va tornar a separar per filtració. Es va rentar la fase orgànica amb una solució de NaHCO₃ al 10% (3x50 mL) i amb una de NaCl saturada (3x50 mL). Es van ajuntar les fraccions orgàniques, es van assecar amb MgSO₄ anhidre i es va eliminar el dissolvent a pressió reduïda. El residu es va purificar per cromatografia en columna de gel de sílice eluint amb hexà/DCM (80:20), usant quantitats creixents de DCM (de 80:20 a 30:70). Un cop evaporades les fraccions, i precipitades sobre hexà fred, es van obtenir 3.17 g de producte **1** (rendiment del 41%).



1

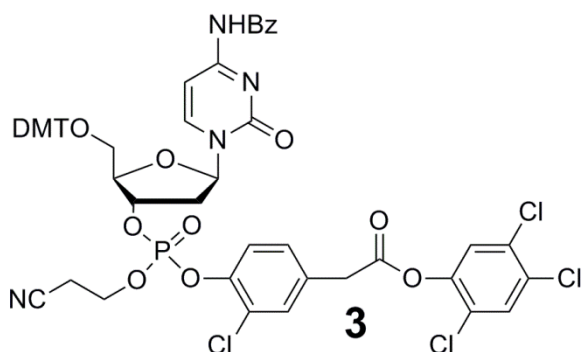
Caracterització: Sòlid blanc; R_f : 78-80°C; R_f : 0.39 (AcOEt/Hexà 3:7); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.53 (s, 1H, H3'), 7.36 (d, $J=2.1$ Hz, 1H, H6), 7.25 (s, 1H, H6'), 7.19 (dd, $J=8.4, 2.1$ Hz, 1H, H5), 7.02 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, H3), 5.20 (s, 1H, OH), 3.82 (s, 2H, CH_2); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 168.2 (CO), 151.1, 146.0 i 131.6 (Ar, Cq), 131.0 (Ar, CH), 130.7 (Ar, Cq), 129.8 (Ar, CH), 129.9 (Ar, CH), 126.3 i 125.9 (Ar, Cq), 125.2 (Ar, CH), 120.3 (Ar, Cq), 117.2 (Ar, CH), 39.4 (CH_2); **HRMS** m/z : 362.9169 $[\text{M}-\text{H}]^-$; ($M_{\text{calc}} \text{C}_{14}\text{H}_7\text{Cl}_4\text{O}_3=362.9155$).

2.1.1.2.2 Preparació de l'ester actiu **3**

En un baló de fons rodó de 25 mL assecat a l'estufa es van pesar 21 mg (0.30 mmol, 1.4 eq) de tetrazole sota atmosfera d'argó. Sobre aquest es van afegir de forma anhidra 250 mg (0.282 mmol, 1.3 eq) del 3'-(2-cianoetil)-*N,N*-diisopropilfosforamidit de la 5'-*O*-DMT-*N*-benzoil-2'-desoxicitidina i, posteriorment, 2 mL de ACN anhidre, formant-se una suspensió blanquinosa.

En un baló de fons cònic de 10 mL assecat a l'estufa es van pesar 78 mg (0.22 mmol, 1 eq) de l'ester de clorofenil **1** sota atmosfera d'argó. Es van dissoldre en 2 mL de DCM anhidre i es van addicionar de forma anhidra sobre el baló de fons rodó que contenia el tetrazole i el fosforamidit. La solució resultant es va deixar agitant a temperatura ambient durant una hora, controlant l'avenç de la reacció mitjançant CCF.

Sobre la solució anterior es van afegir 47 μL (0.28 mmol, 1.3 eq) d'una solució de $t\text{BuOOH}$ 5.5 M en hexà i es van deixar reaccionant durant 20 minuts a temperatura ambient. La solució groguenca es va diluir amb 20 mL de DCM lliure d'àcids i es va rentar amb H_2O (2x20 mL). Es van ajuntar les fraccions orgàniques, es van assecar amb MgSO_4 anhidre i es va eliminar el dissolvent a pressió reduïda. El residu es va purificar per precipitació sobre hexà fred, obtenint-se 198 mg de producte impurificat amb hidrogenfosfonat, el qual no és reactiu en l'acoblament en el que el preteníem usar.



3

Caracterització: Sòlid blanc; R_f : 0.38 (DCM/MeOH 95:5); $^{31}\text{P NMR}$ (CDCl_3 , 120 MHz) δ (ppm): -7.2 i -7.3 ppm (fosfat, 2 diastereoisòmers), 7.9 (hidrogenfosfonat, impuresa).

2.1.1.3 Ancoratge de l'ester actiu 3 a la resina 7

Eliminació del grup Fmoc de la resina 6

En una xeringa de 5 mL de polipropilè, proveïda d'un disc filtrant de polietilè, es van pesar 300 mg (0.053 mmol, 1 eq) de la resina **6** (175 $\mu\text{mol/g}$). Es va rentar la resina amb DMF (3x1 min) i DCM (3x1 min) i es va tractar amb piperidina al 20% en DMF (3x2 min) per tal d'eliminar el grup Fmoc. Un cop comprovada la correcta desprotecció de la resina mitjançant un test de ninhidrina es va rentar amb DMF (3x1 min) i DCM (3x1 min) i es va assecar bé.

Incorporació de l'ester 3 a la resina 7

Es van pesar 37 mg (0.275 mmol, 5 eq) d'HOBt, es van dissoldre en la mínima quantitat possible de DMF anhidra i es van afegir a la xeringa que contenia la resina. Es van pesar 198 mg (puresa estimada per ^{31}P NMR del ~50%, ~0.089 mmol, ~1.7 eq) de l'ester actiu **3**, es van dissoldre en 1 mL de DCM anhidre i es van transvasar a la xeringa que contenia la resina **7** i l'HOBt. En el cas fos necessari, es va afegir DCM anhidre per acabar d'inflar correctament la resina. Finalment es van afegir 40 μL (0.263 mmol, 5 eq) de DIPC a la resina, es va tancar la xeringa amb un sèptum i es va deixar sota atmosfera d'argó i en agitació mecànica durant tota la nit. Un cop comprovada la correcta incorporació de l'ester actiu mitjançant un test de ninhidrina, la resina es va rentar amb DMF (4x1 min) i amb DCM (4x1 min) i es va assecar.

Per tal d'acetilar els grups amino no reaccionats es va afegir un excés d'una mescla 1:1 d' Ac_2O i DIPEA (15 eq d' Ac_2O respecte la funcionalització de la resina) en DMF i es va deixar reaccionant durant 30 min. Es va comprovar l'absència d'amines lliures mitjançant un test de ninhidrina i, finalment, es va rentar la resina amb DMF (4x1 min) i amb DCM (4x1 min) i es va assecar bé.

Caracterització: ^{31}P NMR (CD_2Cl_2 , 120 MHz) δ (ppm): -8.7 ppm.

Desprotecció del grup fosfat de l'extrem 3' terminal

Es va tractar la resina amb una barreja de TEA/py (3x1 h) per tal de desprotegir el grup fosfat, rentant-se entre tractaments amb DCM lliure d'àcids (3x1 min). Un cop acabada la reacció, es va rentar amb DMF lliure d'amines (4x1 min) i amb DCM

(4x1 min) i es va assecar. Finalment, es va comprovar la correcta desprotecció per ^{31}P NMR i es va determinar el grau de funcionalització de la resina seguint el protocol descrit en l'apartat 1.6.3 de la Part Experimental (Materials i Mètodes), obtenint-se graus de funcionalització que van oscil·lar entre els 40 i els 69 $\mu\text{mol/g}$ resina.

Caracterització: ^{31}P NMR (CD_2Cl_2 , 120 MHz) δ (ppm): -5.9 ppm.

2.1.2 Síntesi de $d\langle p(\text{CAG})_5 \rangle 12$

2.1.2.1 Elongació de la cadena nucleotídica

En dos reactors de tefló es van pesar 22 mg de la resina **9**, d'un grau de funcionalització de 69 $\mu\text{mol/g}$, per a un total de $2 \times 1.5 \mu\text{mol}$. Els reactors es van tancar amb filtres i taps i es van segellar amb anelles d'alumini. L'elongació de la cadena nucleotídica va tenir lloc de forma automàtica, seguint un cicle de síntesi detallat en la *TAULA 2.2*.

Per tal de dur a terme la síntesi de l'oligonucleòtid es van usar derivats fosforamidits comercials, on les nucleobases es trobaven protegides pel grup benzoïl en el cas de la desoxiadenosina i pel grup isobutiril en el cas de la desoxiguanosina. Aquests derivats fosforamidits van ser dissolts en DCM anhidre i usats en una concentració de 0.15 M. Com a agent acoblant es va utilitzar tetrazole 0.45 M en ACN, mentre que com a agent oxidant es va usar $^t\text{BuOOH}$ 1 M en DCM. Al finalitzar la síntesi es va eliminar el grup DMT de l'extrem 5' terminal.

Etap	Operació	Dissolvent/Reactiu	Temps (s)
1	Rentat	ACN	30
2	Destritilació	TCA 3% en DCM	120
3	Rentat (x2)	ACN	30
		Argó	50
4	Acoblament	0.15 M fosforamidit en DCM	10+60
		0.45 M tetrazole en ACN	
5	Rentat	ACN	30
6	Acetilació	$\text{Ac}_2\text{O/NMI}$	30+60
7	Rentat	ACN	30
8	Oxidació	$^t\text{BuOOH}$ 1 M en DCM	15+60
9	Rentat	DCM x2	40
		ACN x2	30

Taula 2.2. Cicle de síntesi usat en l'elongació de la cadena oligonucleotídica durant la síntesi dels oligonucleòtids cíclics de DNA sobre resina. El temps es correspon al temps d'entrada de reactiu/dissolvent a la columna o bé al temps d'entrada + el temps d'espera.

2.1.2.2 Cicllació del precursor lineal ancorat a resina

La reacció de ciclació es va realitzar sobre el precursor lineal unit a la resina en la mateixa columna i en el sintetitzador automàtic. El reactiu de ciclació utilitzat va ser una dissolució de MSNT 0.15 M en piridina anhidra, amb la qual es van dur a terme tres tractaments (dos de 4 hores i un de 12 hores), utilitzant per a cada tractament una nova dissolució de MSNT acabada de preparar. La reacció de ciclació va tenir lloc en condicions estrictament anhidres i sota atmosfera inert. El protocol usat per efectuar la reacció en el sintetitzador automàtic és el descrit en la *TAULA 2.3*.

Etapa	Operació	Dissolvent/Reactiu	Temps (s)
1	Secat	Argó	30 s
		ACN anh	10 s
2	Rentat	Argó	30 s
		Piridina anh	10 s
		Argó	30 s
3	Ciclació	MSNT 0.15 M en py anh	2x4 h + 12h
4	Rentat (x3)	ACN anh	10 s
		Argó	30 s

Taula 2.3. Protocol de ciclació amb MSNT usat en l'obtenció d'oligonucleòtids cíclics sobre resina.

2.1.2.3 Desprotecció dels grups fosfat internucleosídics i desancoratge de l'oligonucleòtid cíclic

Per tal de dur a terme l'eliminació dels grups protectors 2-cianoetil dels fosfats es va transvasar la resina sobre la que havia tingut lloc la ciclació a una xeringa de polipropilè proveïda d'un disc filtrant de polietilè. Aquí es va inflar la resina amb la mínima quantitat de DCM i es van realitzar una sèrie de tres tractaments d'1 h amb una barreja de TEA/py (1:1) per tal de desprotegir els fosfats internucleosídics. La resina es va rentar primer amb DMF lliure d'amines (4x1 min) i després amb DCM (4x1 min) i, finalment, es va assecar bé.

Un cop desprotegits els fosfats es va efectuar el desancoratge de l'oligonucleòtid del suport polimèric mitjançant una sèrie de tractaments (4 h + 4 h + 16 h) amb una dissolució de *syn*-piridin-2-aldoximat de tetrametilguanidini 0.2 M en una mescla de dioxà/H₂O (1:1). Després de cada tractament es va rentar la resina amb una mescla de dioxà/H₂O (1:1) i amb H₂O. Els filtrats i els rentats corresponents als diferents tractaments es van recollir en un vial preparat per suportar pressió elevada.

2.1.2.4 Eliminació dels protectors de les bases, dessalat i purificació

Per tal d'eliminar el grups protectors de les nucleobases es van afegir 2 volums d'una solució d' NH_3 al 33% sobre la mescla de desancoratge obtinguda en l'apartat 2.1.2.3 i es va deixar a 65°C durant tota la nit. La dissolució es va deixar tornar a temperatura ambient i es va evaporar a sequedat a pressió reduïda.

El dessalat del residu obtingut es va dur a terme mitjançant filtració molecular a través d'una columna de Sephadex G-10 (140x2.5 cm). El cru es va eluir amb H_2O Milli-Q a un flux de 2 mL/min. Es van recollir les diferents fraccions que contenien oligonucleòtid i es van liofilitzar.

El producte de ciclació va ser purificat per PAGE preparatiu (600 V, 5 h). Els trossos de gel que contenien el producte van ser triturats i l'oligonucleòtid extret amb NaCl 0.2 M. La solució que contenia l'oligonucleòtid va ser liofilitzada i posteriorment dessalada usant un cartutx Sep-Pack. L'oligonucleòtid dessalat va ser quantificat per UV-Vis, obtenint-se 17 OD₂₆₀ de producte cíclic **12** pur ($\eta=3.6\%$). Finalment, l'oligonucleòtid va ser caracteritzat mitjançant EM-MALDI-TOF ($[\text{M}-\text{H}^+]_{\text{calc}}=4658$; $[\text{M}-\text{H}^+]_{\text{exp}}=4657$).

2.2 Oligonucleòtids cíclics d'RNA

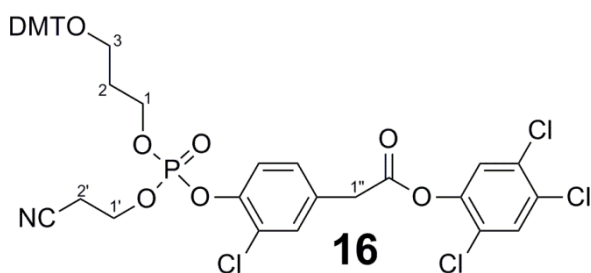
2.2.1 Síntesi de la resina 17

2.2.1.1 Obtenció de l'ester actiu 16

En un baló de fons rodó de 25 mL assecat a l'estufa es van pesar 38 mg (0.54 mmol, 1.5 eq) de tetrazole sota atmosfera d'argó. Sobre aquest es van afegir, de forma anhidra i amb agitació, 250 mg (0.43 mmol, 1.2 eq) del 3'-(2-cianoetil)-*N,N*-diisopropilfosforamidit del DMT-*O*-1,3-propandiòl dissolts en 3 mL de ACN anhidre.

En un baló de fons cònic de 10 mL assecat a l'estufa es van pesar 132 mg (0.36 mmol, 1 eq) de l'ester de clorofenil **1** sota atmosfera d'argó. Es van dissoldre en 2 mL de DCM anhidre i es van addicionar de forma anhidra sobre el baló de fons rodó que contenia el tetrazole i el fosforamidit. La suspensió blanquinosa resultant es va deixar agitant a temperatura ambient durant una hora, comprovant mitjançant CCF que la reacció havia acabat.

Sobre la solució anterior es van afegir 85 μL (0.36 mmol, 1.3 eq) d'una solució de $t\text{BuOOH}$ 5.5 M en hexà i es va deixar reaccionant durant 20 minuts a temperatura ambient. La solució groguenca es va diluir amb 20 mL de DCM lliure d'àcids i es va rentar amb H_2O (2x20 mL). Es van ajuntar les fraccions orgàniques, es va assecar amb MgSO_4 anhidre i es va eliminar el dissolvent a pressió reduïda. El residu es va purificar mitjançant MPLC C_{18} , on A: AcONH_4 0.05 M/ACN (1:1) i B: ACN, usant 600 mL de cadascun. Es van ajuntar les fraccions que contenen producte i es va eliminar el dissolvent a pressió reduïda, obtenint-se 47 mg de producte **16** pur (rendiment del 15%).



Caracterització: Sòlid blanc grogós; R_f : 0.85 (DCM/MeOH 95:5); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.42 (s, 1H, H-Ar), 7.30 (m, 13H, H Ar), 6.84-6.78 (m, 4 H, H-Ar), 4.43 (q, $J=6.7$ Hz, 2H, H1), 4.28 (dq, $J=6.3, 1.4$ Hz, 2H, H1'');

3.78 (s, 6H, OMe), 3.21 (t, $J=6.0$ Hz, 2H, H3), 2.71 (t, $J=5.8$ Hz, 2H, H2'), 2.00 (q, $J=6.2$ Hz, 2H, H2); $^{31}\text{P NMR}$ (CDCl_3 , 120 MHz) δ (ppm): -7.6, -7.5 ppm (2 diastereoisòmers); **HRMS** m/z : 880.0769 [$\text{M}+\text{Na}^+$] $^+$; (M_{calc} $\text{C}_{41}\text{H}_3\text{Cl}_4\text{NO}_9\text{PNa}^+=880.0774$).

2.2.1.2 Ancoratge de l'ester actiu **16** a la resina **7**

Eliminació del grup Fmoc de la resina **6**

En una xeringa de 5 mL de polipropilè, proveïda d'un disc filtrant de polietilè, es van pesar 210 mg (0.046 mmol, 1 eq) de la resina **6** (187 $\mu\text{mol/g}$). Es va rentar la resina amb DMF (3x1 min) i DCM (3x1 min) i es va tractar amb piperidina al 20% en DMF (3x2 min) per tal d'eliminar el grup Fmoc. Un cop comprovada la correcta desprotecció de la resina mitjançant un test de ninhidrina es va rentar la resina amb DMF (3x1 min) i DCM (3x1 min), assecant-se bé al final.

Incorporació de l'ester actiu **16** a la resina **7**

Es van pesar 37 mg (0.275 mmol, 5 eq) d'HOBt, es van dissoldre en la mínima quantitat possible de DMF anhidra i es van afegir a la xeringa que contenia la resina. Es van pesar 47 mg (0.055 mmol, 1.2 eq) de l'ester actiu **16**, es van dissoldre en la mínima quantitat possible de DCM anhidre i es van transvasar a la xeringa que contenia la resina i l'HOBt. En el cas que fos necessari, es va afegir més DCM anhidre per tal

d'acabar d'inflar correctament la resina. Finalment es van afegir 46 μL (0.275 mmol, 5 eq) de DIPC a la resina, es va tancar la xeringa amb un sèptum i es va deixar sota atmosfera d'argó i amb agitació mecànica durant tota la nit. Es va comprovar la correcta incorporació de l'ester actiu mitjançant un test de ninhidrina, rentant la resina posteriorment amb DMF (4x1 min) i amb DCM (4x1 min) i assecant-la bé.

Per tal d'acetilar els grups amino no reaccionats es va afegir un excés d'una mescla 1:1 d' Ac_2O i DIPEA (15 eq respecte la funcionalització de la resina) en DMF lliure d'amines i es va deixar reaccionant durant 30 min. Es va comprovar l'absència d'amines lliures mitjançant un test de ninhidrina i, finalment, es va rentar la resina amb DMF lliure d'amines (4x1 min) i amb DCM (4x1 min) i es va assecar bé.

Caracterització: ^{31}P NMR (CDCl_3 , 120 MHz) δ (ppm): -9.70 ppm.

Eliminació del grup CNE protector del fosfat

Es va tractar la resina amb una barreja de TEA/py (3x1 h) per tal de desprotegir el grup fosfat, rentant-se entre tractaments amb DCM (3x1 min). Un cop acabada la reacció, es va rentar amb DMF (4x1 min) i amb DCM (4x1 min) i es va assecar. Finalment, es va comprovar la correcta desprotecció de la resina per ^{31}P NMR i es va determinar el grau de funcionalització de la resina **17** seguint el protocol descrit en l'apartat 1.6.3 de la Part Experimental (Materials i Mètodes), obtenint-se valors que van oscil·lar entre els 105 i els 120 $\mu\text{mol/g}$ resina.

Caracterització: ^{31}P NMR (CDCl_3 , 120 MHz) δ (ppm): -6.32 ppm

2.2.2 Protocol d'obtenció d'oligoribonucleòtids cíclics

2.2.2.1 Elongació de la cadena nucleotídica

L'elongació de la cadena nucleotídica dels diferents oligonucleòtids cíclics sintetitzats es va dur a terme de forma automàtica, seguint un cicle de síntesi detallat en la *TAULA 2.4*, a partir de la resina **17**.

La síntesi va tenir lloc en reactors de tefló (columnes) de la mida adient, on es va pesar la quantitat de resina adequada. Aquestes columnes es van tancar amb filtres i tancs i es van segellar amb anelles d'alumini.

Els fosforamidits emprats en la síntesi van ser dissolts en DCM anhidre i usats en una concentració de 0.15 M. Com a agent acoblant es va utilitzar BTT 0.3 M en ACN,

mentre que com a agent oxidant es va usar ^tBuOOH 1 M en DCM. L'escala de síntesi va variar des de 0.6 μmol fins als 2.5 μmol. En tots els casos es va eliminar el grup DMT de l'extrem 5' terminal en acabar la síntesi per tal de poder efectuar la reacció de ciclació.

Etapa	Operació	Dissolvent/Reactiu	Temps (s)
1	Rentat	DCM	40
2	Destritilació	TCA 3% en DCM	120
3	Rentat (x2)	ACN	20
		Argó	10
4	Acoblament (x2)	0.15 M fosforamidit en DCM	20+900
		0.3 M BTT en ACN	
5	Rentat	ACN	10
6	Acetilació	Ac ₂ O/NMI	30+120
7	Rentat	ACN	15
8	Oxidació	^t BuOOH 1 M en DCM	40+90
9	Rentat (x2)	DCM	15
		ACN	20

Taula 2.4. Cicle de síntesi usat en l'elongació de la cadena oligonucleotídica durant la síntesi dels oligoribonucleòtids cíclics sobre resina. El temps es correspon al temps d'entrada de reactiu/dissolvent a la columna o bé al temps d'entrada + el temps d'espera.

2.2.2.2 Ciclació del precursor lineal ancorat a resina

La reacció de ciclació es va realitzar sobre el precursor lineal unit a la resina seguint el protocol descrit en la *TAULA 2.3*, amb l'única diferència que el tercer dels tractaments de ciclació es va dur a terme durant 16 hores en lloc de 12 hores.

2.2.2.3 Desprotecció dels grups fosfat internucleosídics i desancoratge de l'oligonucleòtid cíclic

Per tal d'eliminar els grups protectors 2-cianoetil dels fosfats es va procedir de forma anàloga a la descrita en l'apartat 2.1.2.3, realitzant una sèrie de tres tractaments d'1 h amb una barreja de TEA/py (1:1).

El desancoratge de l'oligonucleòtid cíclics també es va portar a cap seguit la metodologia descrita en l'apartat 2.1.2.3, duent a terme una sèrie de tractaments (4 h + 4 h + 16 h) amb una dissolució de *syn*-piridin-2-aldoximat de tetrametilguanidini 0.2 M en una mescla de dioxà/H₂O (1:1). Es van combinar els filtrats corresponents als diferents tractaments i es van evaporar fins a aproximadament la meitat del volum inicial.

2.2.2.4 Eliminació dels protectors de les bases i dessalat

Per tal de desprotegir les nucleobases es van afegir 2 volums d'una solució d' NH_3 al 33%/EtOH (5:1) sobre la mescla de desancoratge anterior i es va deixar reaccionant a 65°C durant tota la nit. La dissolució es va deixar tornar a temperatura ambient i es va evaporar a sequedat. En el cas que les nucleobases no es trobessin protegides es va obviar aquest tractament.

El residu obtingut es va redissoldre amb 2 mL d' H_2O lliure de ribonucleases i es va dessalar mitjançant filtració molecular a través d'una columna de Sephadex G-10 (140x2.5 cm). El cru es va eluir amb H_2O Milli-Q lliure de ribonucleases a un flux de 2 mL/min. Es van recollir les diferents fraccions que contenien oligonucleòtid i es van liofilitzar.

2.2.2.5 Eliminació dels protectors de l'hidroxil 2'

El protocol seguit per a efectuar la desprotecció de l'hidroxil 2' va dependre del grup protector utilitzat. A partir d'aquest punt va caldre utilitzar sempre material, dissolvents i reactius lliures de ribonucleases. En el cas que l'oligonucleòtic cíclic no tingués hidroxil 2' es va obviar aquest pas.

En el cas d'usar el grup protector TBDMS, el residu es va dissoldre en 1 mL d'una barreja DMSO/TEA·3HF (1:1) i es va escalfar a 65°C durant 2.5 h. Es va deixar que la mescla de reacció tornés a temperatura ambient i la reacció es va aturar afegint 2 volums (2 mL) de ${}^i\text{PrOSiMe}_3$. Es va agitar vigorosament uns 5 minuts, apareixent un precipitat, i es va diluir amb 5 volums (5 mL) de Et_2O . La suspensió resultant es va centrifugar durant 10 minuts a 3000 rpm i a 5°C i es va decantar el sobrenedant. Es va suspendre de nou el precipitat amb 5 mL de Et_2O i es va tornar a centrifugar i a decantar, repetint-se aquest procés una segona vegada. Finalment, es van evaporar les restes de dissolvent a pressió reduïda.

En el cas d'usar el grup protector TOM, el residu es va dissoldre en 500 μL d'una solució de TBAF 1 M en THF i es va escalfar a 35°C durant 6 hores. Passades les 6 hores es va neutralitzar amb 2 volums (1 mL) de tampó Tris a $\text{pH}=7$, es va evaporar a sequedat i es va dessalar mitjançant filtració molecular a través d'una columna de Sephadex G-10 (70x2.5 cm) com es descriu en la secció 2.2.2.4. Es van ajuntar les fraccions que contenien oligonucleòtid i es van liofilitzar.

2.2.3 Intent d'obtenció del tridecàmer $r\langle pEG(CUG)_3CE \rangle$ 14

Es van pesar 16.6 mg (1.78 μmol) de la resina **17** en un reactor de tefló. L'elongació de la seqüència oligonucleotídica es va dur a terme emprant el cicle de síntesi descrit en la *TAULA 2.4* i utilitzant derivats fosforamidits amb l'hidroxil 2' protegit amb el grup TBDMS, el quals tenien els grups amino exocíclics protegits amb el grup acetil en el cas de la citidina i amb el grup isopropilfenoxiacetil en el cas de la guanosina.

La ciclació, desprotecció i desanclatge de l'oligonucleòtid cíclic sintetitzat va tenir lloc seguint el protocol descrit en l'apartat 2.2.2. Finalment, es van eliminar els protectors dels hidroxils 2' seguint el protocol descrit a l'apartat 2.2.2.5.

El cru de desprotecció es va analitzar per EM-MALDI-TOF, observant-se un senyal molt ample centrat a $m/z=3982$, 186 Da més de la massa esperada. Degut a que aquest senyal es corresponia al producte de trencament de l'enllaç amida entre l'espaiador i la resina en lloc del de desanclatge del tridecàmer cíclic, no es van dur a terme més anàlisis.

2.2.4 Tetranucleòtids cíclics

2.2.4.1 Obtenció de $d\langle p(TE)_2 \rangle$ 18

Es van pesar 5.7 mg (0.66 μmol) de la resina **17** en un reactor de tefló. L'elongació de la cadena oligonucleotídica es va realitzar usant derivats fosforamidits comercials i emprant el cicle de síntesi descrit en la *TAULA 2.4*.

La ciclació, desprotecció i desanclatge de l'oligonucleòtid cíclic va tenir lloc seguint el protocol descrit en l'apartat 2.2.2, obviant les etapes de desprotecció de les nucleobases i de l'hidroxil 2', ja que no eren necessàries.

Es va quantificar el cru per UV-VIS i es va analitzar tant per EM-MALDI-TOF com per HPLC en fase inversa, usant una columna Nucleosil 5 μm i un gradient del 10 al 30% de B en 20 min (A: AcONH_4 0.05 M, B: $\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}$ 1:1), mostrant la presència de dos productes. Aquests dos productes es van purificar mitjançant HPLC emprant les condicions descrites i es van caracteritzar de forma inequívoca per EM-MALDI-TOF. L'anàlisi va revelar que es tractava del tetràmer cíclic desitjat **18** ($[\text{M}-\text{H}^+]_{\text{calc}}=883$; $[\text{M}-\text{H}^+]_{\text{exp}}=885$) i d'un segon producte ($[\text{M}-\text{H}^+]_{\text{calc}}=1767$; $[\text{M}-\text{H}^+]_{\text{exp}}=1769$), que es

correspondria a l'octàmer **20**. A partir de la quantificació del cru i de les intensitats relatives dels dos pics observats en el cromatograma d'HPLC vam poder estimar que del tetràmer **18** hi havien 2.1 OD₂₆₀ en el cru, el que equivalia a $\eta=18\%$, mentre que de l'octàmer **20** n'hi havien 0.3 OD₂₆₀, el que equivalia a un $\eta=1\%$.

2.2.4.2 Obtenció de r<p(UE)₂> 19

El tetràmer r<p(UE)₂> **19** es va sintetitzar usant dos esquemes de protecció diferents. En el primer es va usar el grup TOM per tal de protegir l'hidroxil 2' de la uridina, mentre que en el segon es va emprar el grup TBDMS. Tots dos derivats fosforamidats de les uridines convenient protegides són comercials.

Es van pesar 5.5 i 6.0 mg (0.63 i 0.69 μmol , respectivament) de la resina **17** en dos reactors de tefló. L'elongació de la cadena oligonucleotídica es va dur a terme usant el cicle de síntesi descrit en la *TAULA 2.4* i emprant l'esquema de protecció TOM en el cas del reactor amb 5.5 mg de resina i l'esquema de protecció TBDMS en el cas del reactor amb 6.0 mg de resina.

La ciclació, desprotecció i desanclatge de l'oligonucleòtid cíclic sintetitzat va tenir lloc seguint el protocol descrit en l'apartat 2.2.2, obviant l'etapa de desprotecció de les nucleobases i eliminant els grups protectors dels hidroxils 2' de forma convenient.

Els crús es van analitzar tant per EM-MALDI-TOF com per HPLC, usant una columna Nucleosil 5 μm i un gradient del 10 al 30% de B en 20 min (A: AcONH₄ 0.05 M, B: ACN/H₂O 1:1). En tots dos casos el perfil cromatogràfic va mostrar un pic majoritari amb el mateix temps de retenció. L'anàlisi per EM-MALDI-TOF va mostrar la presència del producte desitjat tant en el cas d'usar la protecció TOM ($[\text{M-H}^+]^-_{\text{calc}}=887$; $[\text{M-H}^+]^-_{\text{exp}}=888$), com en el de TBDMS ($[\text{M-H}^+]^-_{\text{calc}}=887$; $[\text{M-H}^+]^-_{\text{exp}}=889$). Els crús es van quantificar per UV-VIS, obtenint-se en el cas de la protecció TOM 0.7 OD₂₆₀, el que corresponia a $\eta=5.5\%$, mentre que en el de TBDMS es van obtenir 0.5 OD₂₆₀, el que corresponia a $\eta=3.5\%$.

2.2.5 Tetradecàmer $r\langle p(EGCUGCE)_2 \rangle 15$

Es van pesar dos cops 21.7 mg ($2 \times 2.50 \mu\text{mol}$) de la resina **17** en dues columnes de tefló. L'elongació de la seqüència oligonucleotídica es va dur a terme emprant el cicle de síntesi descrit en la *TAULA 2.4* i utilitzant derivats fosforamidits amb l'hidroxil 2' protegit amb el grup TOM i amb els grups amino exocíclics, en cas de tenir-los, protegits amb el grup acetil.

La ciclació, desprotecció i desancoratge de l'oligonucleòtid cíclic sintetitzat va tenir lloc seguint el protocol descrit en l'apartat 2.2.2. Finalment, es van eliminar els protectors dels hidroxils 2' seguint el protocol descrit a l'apartat 2.2.2.5.

El cru de desprotecció es va analitzar per EM-MALDI-TOF, observant-se un senyal amb $m/z=3758$ ($[M-H]^+$ $_{\text{calc}}=3763$). Es va quantificar el cru per UV-VIS i es van obtenir 10 OD₂₆₀ del producte sense purificar ($\eta=2.4\%$). L'anàlisi per HPLC usant una columna Nucleosil 5 μm i un gradient del 5 al 35% de B en 20 min (A: TEAA 0.05 M, B: ACN/H₂O 1:1) mostrava un perfil molt complex amb diversos pics de diferent intensitat. Es van intentar purificar per HPLC tres zones del cromatograma, obtenint aproximadament 1 OD₂₆₀ de cadascuna, i es van caracteritzar per EM-MALDI-TOF, mostrant totes elles senyals m/z pròximes a la massa calculada (3755, 3757, 3756). L'anàlisi per PAGE (5 h, 700 V) va mostrar la presència de diverses bandes, cap de les quals era majoritària.

3 Síntesi d'oligonucleòtids cíclics mitjançant ciclació assistida per motlle

3.1 Protocol d'obtenció d'oligoribonucleòtids

3.1.1 Elongació de la cadena nucleotídica

L'elongació de la cadena nucleotídica dels diferents oligonucleòtids sintetitzats es va dur a terme de forma automàtica, seguint un cicle de síntesi detallat en la *TAULA 3.1*, a partir de nucleotidil-resines comercials i a escala d'1 μmol , si no s'indica el contrari.

La síntesi va tenir lloc en reactors de tefló (columnes) de la mida adequada, on es va pesar la quantitat adient de resina. En ocasions, però, es van emprar reactors comercials ja preparats que contenien 1 μmol de suport sòlid, subministrats per Glen Research o bé per Link Technologies.

Els derivats fosforamidits comercials dels diferents DMT-ribonucleòsids emprats durant la síntesi dels oligonucleòtids presentaven l'hidroxil 2' protegit amb el grup TBDMS i empraven l'estratègia de protecció *Ultra-Mild* per bloquejar les diferents posicions reactives de les nucleobases amb els grups Ac en el cas de la citosina, Pac en el de l'adenina i ¹PrPac quan es tractava de la guanina. Els diferents fosforamidits van ser subministrats per Link Technologies i van ser dissolts en ACN anhidre i usats en una concentració de 0.1 M per tal de dur a terme la síntesi. Com a agent acoblant es va emprar BTT 0.3 M en ACN, mentre que com a agent oxidant es va utilitzar una solució de I₂/H₂O 0.1 M en piridina. Per la seva banda, a l'usar estratègia *Ultra-Mild* va ser necessari emprar Pac₂O com a agent de *Capping A*.

En tots els casos en que no era necessari incorporar un grup fosfat en l'extrem 5' terminal de l'oligonucleòtid s'hi va mantenir el grup DMT en aquest extrem un cop acabada la síntesi per tal de facilitar la posterior purificació per HPLC en fase inversa.

Per la seva banda, la fosforilació química de l'extrem 5' terminal de l'oligonucleòtid es va dur a terme usant el reactiu *Solid Chemical Phosphorylation Reagent II*, subministrat per Glen Research, el qual s'empra amb la mateixa concentració i temps d'acoblament que un fosforamidit estàndard.

Etapa	Operació	Dissolvent/Reactiu	Temps (s)
1	Rentat	DCM	40
2	Destritilació	TCA 3% en DCM	120
3	Rentat (x2)	ACN	20
		Argó	10
4	Acoblament (x2)	0.1 M fosforamidit en ACN	5+600
		0.3 M BTT en ACN	
5	Rentat	ACN	10
6	Acetilació	Pac ₂ O/NMI	12+16
7	Rentat	ACN	10
8	Oxidació	I ₂ /H ₂ O 0.1 M en py	12+20
9	Rentat (x2)	DCM	20
		ACN	20

Taula 3.1. Cicle de síntesi usat en l'elongació de la cadena oligonucleotídica durant la síntesi dels oligoribonucleòtids. El temps es correspon al temps d'entrada de reactiu/dissolvent a la columna o bé al temps d'entrada + el temps d'espera.

3.1.2 Desancoratge i desprotecció de l'oligonucleòtid

Un cop finalitzada la síntesi, la resina es va assecat bé amb un corrent d'argó i es va transvasar a un vial especial preparat per resistir altes pressions. Es va afegir 1 mL d'una solució d'AMA i es va deixar reaccionant a 65°C durant 30 minuts. Passat aquest temps, es va deixar refredar el vial i es va filtrar el contingut a través d'una pipeta Pasteur reblida amb llana de vidre. El dissolvent es va evaporar a pressió reduïda, fent especial atenció en el cas dels oligonucleòtids que mantenen el grup DMT en l'extrem 5' terminal a que l'ambient en que es duigués a terme fos bàsic per tal d'evitar la pèrdua del grup protector.

3.1.3 Eliminació dels protectors de l'hidroxil 2'

El residu es va dissoldre en 1 mL d'una barreja NMP/TEA/TEA·3HF (6:3:4), en el cas dels oligonucleòtids protegits amb el grup DMT, o DMSO/TEA·3HF (1:1), en el cas dels oligonucleòtids sense el grup DMT, i es va escalfar a 65°C durant 2.5 h. Es va deixar que la mescla tornés a temperatura ambient i es va aturar la reacció afegint 2 volums (2 mL) de ¹PrOSiMe₃. Es va agitar vigorosament uns 5 minuts, apareixent un

precipitat, i es va diluir amb 5 volums (5 mL) de Et₂O. La suspensió resultant es va centrifugar durant 10 minuts a 5000 rpm i a 5°C i es va decantar el sobrenedant. Es va suspendre de nou el precipitat amb 5 mL de Et₂O i es va tornar a centrifugar i a decantar, repetint-se aquest procés una segona vegada. Finalment, es van evaporar les restes d'èter a pressió reduïda. A partir d'aquest moment va ser necessari usar material autoclavat i reactius lliures de ribonucleases per tal d'evitar la degradació enzimàtica de l'oligoribonucleòtid.

3.1.4 Purificació

La purificació dels oligonucleòtids es va portar a cap de forma diferent depenent de si es va mantenir o no el grup DMT en l'extrem 5' terminal.

En el cas dels oligonucleòtids en que s'havia mantingut el grup DMT en l'extrem 5' terminal, la purificació es va dur a terme per HPLC semipreparativa en fase inversa. El residu obtingut es va dissoldre en 2 mL d'H₂O lliure de ribonucleases i va ser purificat usant un gradient del 5 al 60% de B en 30 min, en el cas dels oligonucleòtids més curts (menors a 18mers), o del 10 al 90% de B en 30 min, en el cas dels oligonucleòtids més llargs. En tots dos casos el flux va ser de 4 mL/min i els eluents van ser TEAA 0.1 M en la fase A i una barreja ACN/H₂O (1:1) en la B. La gran hidrofobicitat del grup DMT augmenta molt el temps de retenció de l'oligonucleòtid a purificar, facilitant d'aquesta manera el procés. Un cop efectuada la purificació es va afegir AcOH fins a una concentració del 3% a les diferents fraccions que contenien l'RNA pur per tal d'eliminar el grup DMT. Després de sotmetre l'oligonucleòtid a aquest tractament durant 30 min a temperatura ambient es va liofilitzar la solució de desprotecció. Un cop comprovada que la puresa de les diferents fraccions obtingudes era suficientment alta, es va eliminar el catió DMT⁺ per extracció amb Et₂O. En el cas que la puresa no fos l'adequada, es va tornar a purificar l'oligonucleòtid per HPLC en fase inversa, usant el gradient més convenient en cada cas.

Pel que fa als oligonucleòtids que no presentaven el grup DMT en l'extrem 5' terminal, els crús de desprotecció es van purificar per PAGE preparatiu, típicament usant un gel d'1.5 mm de gruix i corrent-lo durant 8 hores a 750 V. L'oligonucleòtid purificat es va eluir del gel mitjançant el sistema Elutrap, dessalant-se finalment per Sephadex G-10.

3.2 Ciclació d'oligoribonucleòtids no protegits

3.2.1 Intent de ciclació d'oligoribonucleòtids sense utilitzar motlle extern

3.2.1.1 Intent d'obtenció del r<p(CUG)₁₄>

Per tal de dur a terme la síntesi de l'oligonucleòtid **22** es van pesar 0.9 μmol de citidina-resina comercial en un reactor de tefló. L'elongació de la seqüència oligonucleotídica es va dur a terme emprant el cicle de síntesi descrit en la *TAULA 3.1* i utilitzant derivats fosforamidits comercials. Un cop finalitzada, es va fosforilar l'extrem 5' terminal emprant el reactiu *Solid Chemical Phosphorylation Reagent II*, comprovant-se la correcta incorporació del fosforamidit gràcies a la quantificació automàtica del catió DMT⁺ alliberat en la detritilació final de l'oligonucleòtid.

El desancoratge de la cadena de la resina, així com la desprotecció tant de les nucleobases com dels fosfats internucleosídics i dels hidroxils 2' es va dur a terme seguint els protocols descrits en els apartats 3.1.2 i 3.1.3. Cal destacar que durant una de les etapes de liofilització hi van haver problemes que ens van fer perdre part del producte. Es va quantificar el cru de desprotecció, obtenint-se 79 OD₂₆₀ (315 OD₂₆₀ teòriques) i es va caracteritzar per EM-MALDI-TOF, obtenint-se una muntanya centrada a 13480 ([M-H⁺]_{calc}= 13403). L'oligonucleòtid es va purificar per PAGE preparatiu tal com es descriu en l'apartat 3.1.4, obtenint-se finalment 9 OD₂₆₀ de producte pur (rendiment del 3%).

Per tal de dur a terme els diferents assaigs de ciclació es van liofilitzar 0.3 OD₂₆₀ del precursor lineal **22** en diversos tubs de microcentrífuga i es van dissoldre en un volum adequat d'una solució que contingués també Tris·HCl a pH=7.5 50 mM i MgCl₂ 10 mM. Es va escalfar el contingut dels diferents tubs a 95°C durant 10 minuts i es va deixar tornar a temperatura ambient lentament per dur a terme la hibridació de l'oligonucleòtid. Es van afegir tant l'enzim T4 RNA ligasa (Epicenter) com la resta de components del medi de ciclació, es van ajustar les concentracions tant de Tris·HCl com del MgCl₂ i es va deixar reaccionant a 37°C durant 16 hores. Passades les 16 hores, es van parar les reaccions escalfant a 70°C durant 10 minuts, es va liofilitzar el contingut i es van analitzar per PAGE analític (750 V, 8 h). Les condicions experimentals de cada assaig es mostren en la *TAULA 3.2*.

	Assaig 1	Assaig 2	Assaig 3	Assaig 4	Assaig 5
Volum	150	50	50	18	74
Precursor Lineal 22 (μM)	0.15	17	6	6	25
Tris·HCl pH=7.5 (mM)	50	50	50	50	50
MgCl₂ (mM)	10	10	10	10	10
DTT (mM)	10	10	10	10	10
ATP (mM)	1	1	1	1	1
T4 RNA ligasa (U/ μL)	0.5	0.7	4	0.7	0.7
Additiu	DMSO 10%	PEG 4000 40mg/ml	BSA 0.25 $\mu\text{g/ml}$	PEG 4000 40mg/ml	PEG 4000 40mg/ml

Taula 3.2. Taula resum de les condicions usades en cada assaig de ciclació de l'oligonucleòtid **22**.

3.2.2 Ciclació d'oligonucleòtids mitjançant motlle extern

3.2.2.1 Preparació del motlle d(GCA)₆ 23

Tot i tractar-se d'un oligodesoxiribonucleòtid, l'elongació de la seqüència nucleotídica del motlle **23** es va portar a cap emprant el cicle de síntesi descrit en la *TAULA 3.1*, únicament disminuint el temps d'acoblament dels fosforamidits a 60 s i usant tetrazole 0.45 M en lloc de BTT. Es van utilitzar derivats fosforamidit comercials dels desoxinucleòsids, que empen l'isobutiril (iBu) com a grup protector de la desoxiguanina i el benzoïl (Bz) com a grup protector de la desoxicitosina i de la desoxiadenina. La síntesi va tenir lloc a escala 3x1 μmol usant reactors comercials de desoxiadenosa-resina i es va mantenir el grup DMT en l'extrem 5' terminal per tal de facilitar la purificació de l'oligonucleòtid.

Un cop finalitzada la síntesi, la resina es va assecar bé amb un corrent d'argó i es va transvasar a un vial especial preparat per resistir altes pressions. Es va afegir 1 mL d'una solució d' NH_3 concentrat i es va deixar reaccionant a 65°C durant 16 hores. Passat aquest temps, es va deixar refredar el vial i es va filtrar el contingut a través d'una pipeta Pasteur reblida amb llana de vidre. El dissolvent es va evaporar a pressió reduïda i el residu es va purificar per MPLC en fase inversa, usant 600 mL d'una solució de AcONH_4 0.05 M com a fase A i 600 mL d'una solució de ACN/ H_2O (1:1) com a fase B. Es va comprovar per HPLC en fase inversa la puresa de les fraccions purificades, usant una columna Nucleosil 10 μm i un gradient del 5 al 60% de B en 30 min (A: AcONH_4 0.05 M, B: ACN/ H_2O 1:1). Es van ajuntar les fraccions pures, es van liofilitzar i se'n va eliminar el grup DMT tractant l'oligonucleòtid liofilitzat amb 2 mL de AcOH al 80% a 0°C durant 30 min. Posteriorment es va diluir amb 10 mL d'aigua, es va extreure el grup DMT^+ amb Et_2O (3x10 mL) i es va liofilitzar. Es va

quantificar el producte purificat, obtenint-se 105 OD₂₆₀ (rendiment del 20%) i es va caracteritzar per EM-MALDI-TOF ($[M-H]^+$ _{calc}=5527; $[M-H]^+$ _{exp}=5526).

3.2.2.2 Obtenció del 42mer model i assaigs de ciclació

Síntesi del 42mer model 24 i assaigs de ciclació

Per tal de dur a terme la síntesi del 42mer model p(UGC)₃CGUAACCUACGACGAACCUAGAUG(UGC)₃ **24** es va pesar 1 μmol de citidina-resina comercial en un reactor de tefló. L'elongació de la seqüència oligonucleotídica es va dur a terme emprant el cicle de síntesi descrit en la *TAULA 3.1* i utilitzant derivats fosforamidits comercials. Un cop finalitzada, es va fosforilar l'extrem 5' terminal emprant el reactiu *Solid Chemical Phosphorylation Reagent II*, comprovant-se la correcta incorporació del fosforamidit gràcies a la quantificació automàtica del catió DMT⁺ alliberat en la detritilació final de l'oligonucleòtid.

El desancoratge de la cadena de la resina, així com la desprotecció tant de les nucleobases com dels fosfats internucleosídics i dels hidroxils 2' es va dur a terme seguint els protocols descrits en els apartats 3.1.2 i 3.1.3. Es va quantificar el cru de desprotecció, obtenint-se 200 OD₂₆₀ (391 OD₂₆₀ teòriques) i es va caracteritzar per EM-MALDI-TOF, obtenint-se una muntanya centrada a 13501 ($[M-H]^+$ _{calc}=13469). L'oligonucleòtid es va purificar per PAGE preparatiu tal com es descriu en l'apartat 3.1.4, obtenint-se finalment 58 OD₂₆₀ de producte pur (rendiment del 16%).

Per tal de dur a terme el primer assaig de ciclació es van liofilitzar 0.4 OD₂₆₀ del precursor lineal **24** i 0.2 OD₂₆₀ del motlle **23** en un tub de microcentrífuga i es van dissoldre en 39 μL d'una solució Tris·HCl a pH=7.5 50 mM i MgCl₂ 10 mM. Es va escalfar el contingut del tub de microcentrífuga a 95°C durant 10 minuts i es va deixar tornar a temperatura ambient lentament per a que tingués lloc la hibridació entre el motlle i el precursor lineal. Es va diluir la mescla a 100 μL (per a una concentració final de 10 μM del precursor lineal i del motlle), ajustant les concentracions de Tris·HCl a 50 mM, de MgCl₂ a 10 mM, de DTT a 5 mM, d'ATP a 5 mM i d'enzim T4 DNA ligasa (Epicenter) a 1 U/μL. Es va deixar reaccionant a 30°C i es van agafar alíquotes a les 24 i a les 72 hores. Les diferents reaccions es van escalfar a 70°C durant 15 minuts per tal d'aturar-les i es van analitzar per PAGE analític (750 V, 8 h).

Paral·lelament, es van liofilitzar 0.2 OD₂₆₀ del precursor lineal **24** i 0.1 OD₂₆₀ del motlle **23** en sengles tubs de microcentrífuga, per dur a terme assaigs d'estabilitat enfront la ligasa. Cada oligonucleòtid es va dissoldre en un volum de 50 µL que contenia també Tris·HCl a pH=7.5 50 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 5 mM, ATP 5 mM i enzim T4 DNA ligasa (Epicenter) 1 U/µL i es van incubar a 30°C durant 24 hores. Les diferents reaccions es van escalfar a 70°C durant 15 minuts per tal d'aturar-les i es van analitzar per PAGE analític amb els assaigs de ciclació anteriors (24 i 72 hores).

Anàlisi de la presència de nucleases en l'enzim T4 DNA ligasa

Per tal de comprovar la presència de nucleases en el nou lot de T4 DNA ligasa facilitada per Epicenter es van liofilitzar, d'una banda i per duplicat, 0.2 OD₂₆₀ del precursor lineal **24** (assaigs A i B) en sengles tubs de microcentrífuga i, d'una altra i també per duplicat, 0.1 OD₂₆₀ del motlle **23** (assaigs C i D) en dos tubs de microcentrífuga. Es va dissoldre cadascun dels oligonucleòtids en un volum de 50 µL que contenia també Tris·HCl a pH=7.5 50 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 5 mM i ATP 5 mM. En els assaigs B i D, a més, es va afegir l'enzim T4 DNA ligasa (Epicenter, segon lot) fins a una concentració d'1 U/µL i es van incubar els tubs a 30°C durant 16 hores. Les diferents reaccions es van escalfar a 70°C durant 15 minuts per tal d'aturar-les i es van analitzar per PAGE analític (750 V, 8 h). Aquests experiments es van repetir emprant la ligasa subministrada per Fermentas.

3.2.2.3 Nova síntesi del 42mer model i obtenció del producte cíclic

Síntesi i purificació del 42mer model 25

La síntesi del 42mer r(UGC)₃CGUAACCUACGACGAACCUAGAUG(UGC)₃ **25** es va dur a terme a escala 1 µmol sobre citidina-resina comercial en un reactor de tefló. L'elongació de la seqüència oligonucleotídica va tenir lloc emprant el cicle de síntesi descrit en la *TAULA 2.4* i utilitzant derivats fosforamidits comercials. Un cop finalitzada la síntesi es va mantenir el grup DMT en l'extrem 5' de l'oligonucleòtid per tal de facilitar-ne la purificació.

El desancoratge de la cadena de la resina, així com la desprotecció tant de les nucleobases com dels fosfats internucleosídics i dels hidroxils 2' es va dur a terme seguint els protocols descrits en els apartats 3.1.2 i 3.1.3. L'oligonucleòtid es va

purificar per HPLC preparatiu tal com es descriu en l'apartat 3.1.4, usant un gradient per a oligonucleòtids llargs. Cal destacar que durant la purificació vam observar una pèrdua progressiva del grup DMT causada per l'ambient àcid en l'interior de l'HPLC i que la puresa del producte obtingut, un cop eliminat el grup DMT, va ser suficientment alta per no requerir d'una segona purificació. Es va quantificar el producte pur, obtenint-se 24 OD₂₆₀ (rendiment del 6%) i es va caracteritzar per EM-ESI ($[M-2H^++2K^+]_{\text{calc}}=13474$; $[M-2H^++2K^+]_{\text{exp}}=13475$).

Fosforilació del precursor lineal **25** i ciclació

Es van liofilitzar 0.15 OD₂₆₀ del precursor lineal en un tub de microcentrífuga. Es van dissoldre en un volum de 25 µL que contenia també Tris·HCl a pH=7.5 70 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 5 mM, ATP a 0.063 mM i enzim T4 PNK (Fermentas) 0.5 U/µL. Es va incubar la mescla de reacció a 37°C durant 3 hores. Passat aquest temps, es va escalfar el medi de reacció a 70°C durant 15 minuts per tal de parar la reacció i es va analitzar per PAGE o bé es va utilitzar directament per dur a terme assaigs de ciclació.

Per tal de dur a terme els diferents assaigs de ciclació, sobre la mescla de la reacció de fosforil·lació anterior es van afegir 0.07 OD₂₆₀ del motlle **23**. Es va escalfar el contingut del tub de microcentrífuga a 95°C durant 10 minuts i es va deixar tornar a temperatura ambient lentament. Es van ajustar les concentracions dels components del medi de ciclació, s'hi van afegir tant l'enzim T4 DNA ligasa (Fermentas) com els additius corresponents i es va deixar reaccionant a 30°C durant 8 hores. Passat aquest temps, es van parar les reaccions escalfant-les a 70°C durant 15 minuts, es van liofilitzar i es van analitzar per PAGE analític (750 V, 8 h). Les condicions experimentals de cada assaig es mostren en la *TAULA 3.3*.

	Assaig 1	Assaig 2	Assaig 3	Assaig 4
Volum (µL)	38	38	51	51
Precursor 25 Fosforilat (µM)	10	10	10	10
Motlle 23 (µM)	10	10	10	10
Tris·HCl pH=7.5 (mM)	50	50	50	50
MgCl₂ (mM)	10	10	10	10
DTT (mM)	5	5	5	5
ATP (mM)	1	1	1	1
T4 DNA ligasa (U/µL)	1	1	1	1
Additiu	-	PEG 4000 1%	BSA 50µg/ml	PEG 4000 10%

Taula 3.3. Taula resum de les condicions usades en cada assaig de ciclació del precursor lineal **25** fosforilat.

Ciclació del 42mer 25 fosforilat a gran escala

Es van liofilitzar 6 OD₂₆₀ del precursor lineal **25** en un tub de centrífuga. Es van dissoldre en un volum d'1 mL que contenia també Tris·HCl a pH=7.5 70 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 5 mM, ATP a 0.063 mM i enzim T4 PNK (Fermentas) 0.5 U/µL. Es va incubar la mescla de reacció a 37°C durant 3 hores. Passat aquest temps, es va escalfar el tub de microcentrífuga a 70°C durant 15 minuts per tal de parar la reacció. Sobre la mescla de fosforil·lació anterior es van afegir 3 OD₂₆₀ del motlle d(GCA)₆. Es va escalfar el contingut del tub de centrífuga a 95°C durant 10 minuts i es va deixar tornar a temperatura ambient lentament. Es va diluir la mescla a 1540 µL (per a una concentració final del precursor lineal de 10 µM i del motlle de 10 µM), ajustant les concentracions de Tris·HCl a 50 mM, de MgCl₂ a 10 mM, de DTT a 5 mM, d'ATP a 1 mM i d'enzim T4 DNA ligasa (Fermentas) a 1 U/µL i es va deixar reaccionant a 30°C durant 8 hores. Passat aquets temps, es va parar la reacció escalfant-la a 70°C durant 15 minuts, es va liofilitzar el contingut i es va purificar el presumpte producte de ciclació (el que presentava una menor mobilitat electroforètica) per PAGE preparatiu (800 V, 8 h). Desafortunadament la purificació no va ser correcta degut a la poca diferència de mobilitat electroforètica entre el precursor lineal i el producte presumptament cíclic. Aquest producte impurificat es va recuperar del gel per extracció amb NaCl 0.2 M i, un cop dessalat per Sephadex G-10, va ser caracteritzat per EM-ESI, observant-se la massa del producte cíclic buscat ($M_{\text{calc}}=13460$; $M_{\text{exp}}=13459$), així com la del precursor lineal fosforilat ($M_{\text{calc}}=13478$; $M_{\text{exp}}=13478$).

3.3 Ciclació d'oligoribonucleòtids parcialment protegits

3.3.1 El grup dmf com a protector de la guanosina

3.3.1.1 Obtenció de l'octadecàmer r(G^{dmf}CU)₆ i anàlisi de la seva estabilitat

La síntesi del 18mer r(G^{dmf}CU)₆ **29** es va dur a terme a escala 1 μmol sobre uridina-resina comercial en un reactor de tefló. L'elongació de la seqüència oligonucleotídica va tenir lloc emprant el cicle de síntesi descrit en la *TAULA 3.1* i utilitzant derivats fosforamidits comercials, entre ells el derivat de la G^{dmf}, subministrat per Glen Research. Cal destacar que en el cas de la citosina va ser necessari que es trobés protegida amb el grup Ac. Un cop finalitzada la síntesi es va mantenir el grup DMT en l'extrem 5' de l'oligonucleòtid per tal de facilitar-ne la purificació.

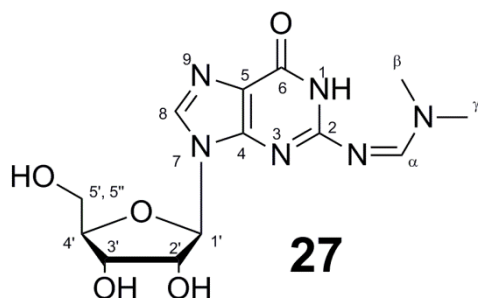
Es va dur a terme un tractament amb 1 mL de K₂CO₃ 0.05 M en MeOH a temperatura ambient durant 6 hores, per tal de desancorar l'oligonucleòtid i eliminar els grups protectors dels fosfats internucleosídics i de les citidines però no així els grups dmf que protegien la guanosina. Posteriorment es va neutralitzar amb 2 mL de TEAA 2 M a pH=7, es va filtrar la solució i es va eliminar el dissolvent a pressió reduïda. Per la seva banda la desprotecció de l'hidroxil 2' es va dur a terme emprant TEA·3HF seguint el protocol descrit en l'apartat 3.1.3.

El cru de desprotecció va ser analitzat per EM-MALDI-TOF, observant-se que el pic majoritari (m/z=5788) no es corresponia al producte desitjat ([M-H⁺]⁻_{calc}=6004) sinó molt probablement a un producte d'eliminació parcial dels protectors dmf. El cru va ser digerit enzimàticament i analitzat per HPLC en fase inversa, seguint la metodologia descrita en l'apartat 1.11 de la Part Experimental (Materials i Mètodes). Com a patrons es van usar els diferents ribonucleòsids comercials així com la G^{dmf} **27** sintetitzada per nosaltres tal com es descriu en l'apartat 3.3.1.2.

3.3.1.2 Síntesi de G^{dmf} i anàlisi de la seva estabilitat

En un baló de 10 mL es van suspendre 250 mg (0.88 mmol, 1 eq) de guanosina en 2.5 mL de MeOH anhidre sota atmosfera d'argó. Es van afegir 425 μL (3.19 mmol, 3.6 eq) del dimetilacetal de la *N,N*-dimetilmetilamina i es va agitar durant 5 dies. El producte en suspensió es va filtrar en una placa filtrant i es va rentar amb

MeOH i Et₂O freds. El producte es va assecar, primer a l'aire i després al dessecador. Es van obtenir 181 mg de producte pur (rendiment 61%).



27
Caracterització: Sòlid blanc; **P_f:** 255°C descomposa; **¹H NMR** (400 MHz, (CD₃)₂SO) δ (ppm): 11.33 (s, 1H, NH), 8.53 (s, 1H, H_α), 8.03 (s, 1H, H₈), 5.79 (d, *J*=6.1 Hz, 1H, H_{1'}), 5.40 (d, *J*=6.1 Hz, 1H, OH 2'), 5.17 (d, *J*=4.7 Hz, 1H, OH 3'), 5.02 (t, *J*=5.6 Hz, 1H, OH 5'), 4.48 (dd, *J*=11.2, 5.9 Hz, 1H, H_{2'}), 4.11 (dd, *J*=8.1, 4.7 Hz, 1H, H_{3'}), 3.90 (q, *J* 3.9 Hz, 1H, H_{4'}), 3.65-3.51 (m, 2H, H_{5'} i H_{5''}), 3.15 i 3.03 (2s, 2H, H_β i H_γ); **¹³C NMR** (101 MHz, (CD₃)₂SO) δ (ppm): 157.94, 157.79, 157.28 i 149.99 (C_α, C₂, C₄ i C₆), 136.95 (C₈), 108.79 (C₅), 86.72 (C_{1'}), 85.42 (C_{4'}), 73.78 (C_{2'}), 70.48 (C_{3'}), 61.50 (C_{5'}), 34.66 (C_β i C_γ); **HRMS** *m/z*: 339.1413 [M+H⁺]⁺; (M_{calc} C₁₃H₁₉N₆O₅⁺=339.1411).

Estudi d'estabilitat de la G^{dmf}

Tots els assaigs d'estabilitat es van dur a terme amb 0.5 mg de la guanosina **27** i es van analitzar per HPLC en fase inversa usant una columna Kromasil de 10 μm i un gradient de 5 min al 2% de B i després del 2 al 30% de B en 15 min (A: TEAA 0.05 M, B: ACN/H₂O 1:1).

- Es va dissoldre la G^{dmf} en 500 μL de K₂CO₃ 0.05 M/MeOH i es va deixar reaccionant 4 hores a temperatura ambient. Passat el temps es van afegir 500 μL de TEAA 2 M a pH=7, es va diluir amb H₂O i es va analitzar per HPLC.
- Es va dissoldre la G^{dmf} en 200 μL de DMSO, s'hi van afegir 200 μL de TEA·3HF i es va deixar reaccionant 2.5 hores a 65°C. Passat el temps es van afegir 400 μL de ⁱPrOSiMe₃, es va diluir amb H₂O i es va analitzar per HPLC. Aquest assaig es va repetir dues vegades a terme la reacció durant 6 hores a temperatura ambient.
- Es va dissoldre la G^{dmf} en 650 μL d'una solució de TBAF 2 mM en py/H₂O (1.5:1) i es va deixar reaccionant 2 hores a temperatura ambient. Passat el temps es va diluir amb H₂O, es va extreure la mescla de reacció amb àcid cítric al 10% i es va analitzar per HPLC, no essent possible observar cap senyal degut a que la piridina saturava el detector UV de l'HPLC.
- Es va dissoldre la G^{dmf} en 250 μL d'una solució AcOH 1 M i TBAF 1 M en H₂O i es va deixar reaccionant 6 hores a temperatura ambient. Passat el temps es va diluir amb H₂O i es va analitzar per HPLC.

- Es va dissoldre la G^{dmf} en 200 µL de DMSO, s'hi van afegir 200 µL de TBAF 1 M en THF i es va deixar reaccionant 6 hores a temperatura ambient. Passat el temps es va diluir en H₂O i es va analitzar per HPLC.
- Es van preparar 500 µL d'una solució HF 10% i TEMED 20% en ACN, en un bany de gel i vigilant d'usar sempre material de plàstic. Es va dissoldre la G^{dmf} en 250 µL d'ACN i s'hi van afegir 250 µL de la solució preparada anteriorment, deixant-ho reaccionar durant 6 hores a temperatura ambient. Passat el temps es van afegir 500 µL de ⁱPrOSiMe₃, es va diluir amb H₂O i es va analitzar per HPLC.

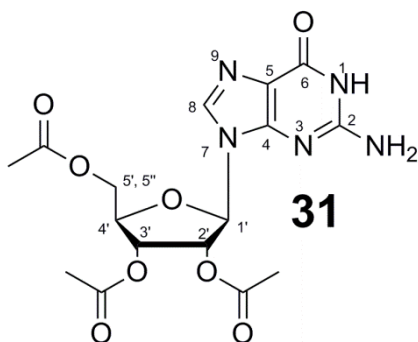
Els resultat obtinguts en els diferents assaigs d'estabilitat es mostren en la *TAULA 2.3* del Bloc 1 de la Part Teòrica.

3.3.2 A la recerca d'un nou esquema de protecció

3.3.2.1 Obtenció de G^{All-Alloc} 30

3.3.2.1.1 Obtenció de 2',3',5'-O-triacetilguanosina 31

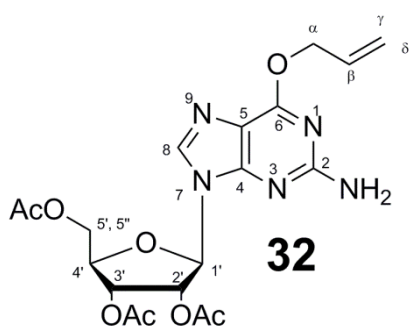
En un baló de 250 mL, prèviament assecat a l'estufa i deixat temperar en un dessecador, vam pesar-hi 5 g (17.65 mmol, 1 eq) de guanosina i els vam deixar al dessecador una nit. Sota atmosfera d'argó es va suspendre el nucleòsid en 5 mL de piridina anhidre i 12.5 mL de DMF anhidre, addicionant-hi posteriorment 10 mL (105.9 mmol, 6 eq) d'Ac₂O. La mescla de reacció es va agitar a 75°C durant 3 hores, deixant-se després refredar fins a temperatura ambient durant 30 min. Es van afegir 35 mL de ⁱPrOH i es va continuar agitant fins que va precipitar. El precipitat es va filtrar al buit, es va assecat a l'aire i després en un dessecador. Es van obtenir 7.3 g de producte (rendiment quantitatiu).



Caracterització: Sòlid blanc; **P_f:** 212-216°C; **R_f:** 0.20 (Hexa/AcOEt 1:3); **¹H NMR** (400 MHz, (CD₃)₂SO) δ (ppm): 10.74 (s, 1H, H1), 7.93 (s, 1H, H8), 6.54 (s, 2H, NH₂), 5.99 (d, *J*=6.1 Hz, 1H, H1'), 5.80 (t, *J*=6.0 Hz, 1H, H2'), 5.50 (dd, *J*=5.9, 4.1 Hz, 1H, H3'), 4.51–4.01 (m, 3H, H4', H5' i H5''), 2.12 (s, 3H, AcO 5'), 2.05 i 2.04 (2s, 6H, AcO 2' i AcO3'); **¹³C NMR** (101 MHz, (CD₃)₂SO) δ (ppm): 170.73, 170.08 i 169.91 (CO 2', CO 3' i CO 4'), 157.26 (C6), 154.54 (C2), 151.76 (C4), 136.26 (C8), 117.48 (C5), 85.04 (C1'), 80.19 (C2'), 72.69 i 70.96 (C3' i C4'), 63.73 (C5'), 21.19, 21.04 i 20.85 (CH₃ 2', CH₃ 3' i CH₃ 4'); **HRMS** *m/z*: 410.1306 [M+H⁺]⁺; (M_{calc} C₁₆H₂₀N₅O₈⁺=410.1306).

3.3.2.1.2 Obtenció de \mathcal{O} -al·lil-2',3',5'-*O*-triacetilguanosina **32**

En un baló de 100 mL assecat a l'estufa es van pesar 1.5 g (3.66 mmol, 1 eq) del nucleòsid **31** sota atmosfera d'argó. Es van suspendre en 30 mL de dioxà anhidre i s'hi van afegir 1.9 mL (27.96 mmol, 7.65 eq) d'alcohol al·lilic i 1.5 mL (6.08 mmol, 1.66 eq) de PBU₃. Es va agitar durant 15 minuts a 45°C i s'hi van afegir 1.5 mL (7.62 mmol, 2.08 eq) de DIAD. La solució homogènia tarongenca que es va formar es va agitar durant tota la nit a 45°C. El dissolvent es va evaporar a pressió reduïda i el residu es va purificar per cromatografia en columna de gel de sílice eluint amb DCM/AcOEt (9:1), usant quantitats creixents de AcOEt (de 9:1 a 1:1). Un cop evaporades les fraccions desitjades es van obtenir 491 mg de producte (rendiment del 30%).

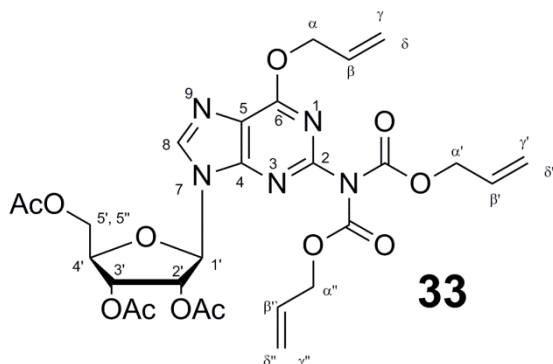


Caracterització: Oli groc; **R_f**: 0.45 (DCM/AcOEt 1:1); **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.71 (s, 1H, H₈), 6.21–6.06 (m, 1H, H _{β}), 6.04–5.94 (m, 2H, H1'/2'), 5.80 (t, $J=5.0$ Hz, 1H, H3'), 5.43 (dd, $J=7.2, 1.4$ Hz, 1H, H _{γ}), 5.27 (dd, $J=10.5, 1.2$ Hz, 1H, H _{δ}), 5.00 (d, $J=5.8$ Hz, 1H, H _{α}), 4.56–4.26 (m, 3H, H4', H5' i H5''), 2.14 (s, 3H, AcO 5'), 2.09 i 2.08 (2s, 6H, AcO 2' i AcO3'); **¹³C NMR** (101 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 171.25, 170.31 i 170.07 (CO 2', CO 3' i CO 4'), 161.77 (C6), 160.11 (C2), 154.18 (C4), 138.51 (C8), 133.30 (C _{β}), 119.00 (C _{γ}), 116.81 (C5), 87.08 (C1'), 80.54 (C4'), 73.55 (C2'), 71.32 (C3'), 68.01 (C _{α}), 63.79 (C5'), 21.44, 21.28 i 21.16 (CH₃ 2', CH₃ 3' i CH₃ 4'); **HRMS** m/z : 450.1644 [M+H]⁺; (M_{calc} C₁₉H₂₄N₅O₈⁺=450.1619).

3.3.2.1.3 Obtenció de \mathcal{O} -al·lil-*N*²,*N*²-bisal·loxicarbonil-2',3',5'-*O*-triacetilguanosina **33**

En un baló de 10 mL es van pesar 255 mg (0.57 mmol, 1 eq) del nucleòsid **32** sota atmosfera d'argó. Aquest es va dissoldre en 3.5 mL de THF anhidre i s'hi van afegir 175 μ L (1.64 mmol, 2.9 eq) de cloroformiat d'al·lil. Es va refredar la mescla de reacció a 5°C i s'hi van afegir, gota a gota i durant 5 minuts, 1.5 mL (1.5 mmol, 2.65 eq) de clorur de *tert*-butilmagnesi 1 M en THF. Es va deixar agitant a 5°C i, passades 3 hores, es va parar la reacció afegint 200 μ L de MeOH. Es va diluir amb 20 mL de AcOEt i es va rentar amb 20 mL d'una solució saturada de NH₄Cl, 20 mL d'una solució saturada de NaHCO₃ i 20 mL d'una solució saturada de NaCl. Es van ajuntar les fraccions orgàniques, es van assecar amb MgSO₄ anhidre i es va eliminar el dissolvent a pressió

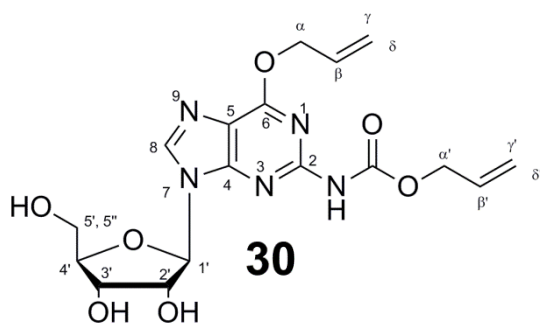
reduïda. El residu es va intentar purificar per cromatografia en columna de gel de sílice eluint amb DCM/AcOEt (9:1), usant quantitats creixents de AcOEt (de 9:1 a 2:3), però no va ser possible separar el producte di-Alloc d'una altra impuresa. Es van ajuntar les fraccions que contenien producte i es van obtenir 160 mg.



Caracterització: MS-ESI m/z : 640.15
 $[M+Na]^+$; ($M_{\text{calc}}=640.19$).

3.3.2.1.4 Obtenció de \mathcal{O}^6 -al·lil- N^2 -al·lioxicarbonil-guanosina **30**

En un baló on teníem 160 mg impurs de la guanosina **33** vam afegir 1.5 mL d'EtOH absolut i 8 mL de NaOH 0.1 M/EtOH 95%. El producte dissolt es va agitar a temperatura ambient durant 30 minuts. Passat aquest temps, es va afegir AcOH 80% fins que el pH de la mescla va ser aproximadament 7. Es va eliminar el dissolvent a pressió reduïda i el residu es va intentar purificar per cromatografia en columna de gel de sílice eluint amb MeOH/AcOEt/hexà (1:5:5). Es van obtenir 58 mg de producte (rendiment de les dues etapes del 25%), però amb una puresa aproximadament del 80%. Vam decidir repurificar 25 mg per MPLC, usant 600 mL d'una solució al 60% de TEAAc 0.05 M i al 40% de ACN/H₂O (1:1) com a eluent A i 600 mL d'una solució al 30% de TEAAc 0.05 M i al 70% de ACN/H₂O (1:1) com a eluent B. Es van obtenir 2.5 mg de producte pur.



Caracterització: NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.00 (s, 1H, H8), 6.16–6.07 (m, 1H, H β), 6.01–5.84 (m, 1H, H β'), 5.85 (d, $J=4$ Hz, H1'), 5.48–5.22 (m, 4H, H γ , H δ , H γ' i δ'), 5.04–5.02 (m, 2H, CH₂ α), 4.84–4.63 (m, 3H, H2' i CH₂ α'), 4.59–4.56 (m, 1H, H3'), 4.47–4.43 (m, 1H, H4'), 3.87–3.85 (m, 1H, H5'), 3.78–3.74 (m, 1H, H5''); MS-ESI m/z : 408.05 $[M+H]^+$; ($M_{\text{calc}}=408.15$).

3.3.2.2 Anàlisi d'estabilitat de $G^{\text{All-Alloc}}$ **30**

Tots els assaigs d'estabilitat es van dur a terme amb 0.2 mg de la guanosina **30** i es van analitzar per HPLC en fase inversa usant una columna Kromasil de 10 μm i un gradient de 5 min al 2% de B i després del 2 al 30% de B en 15 min (A: TEAA 0.05 M, B: ACN/H₂O 1:1), així com per HPLC-MS emprant la mateixa columna i un gradient de 5 min al 5% de B i després del 5 al 80% de B en 30 min (A: AcONH₄ 0.01 M, B: ACN/H₂O 1:1).

- Es va dissoldre la $G^{\text{All-Alloc}}$ en 250 μL de NH₃ i es va deixar reaccionant a temperatura ambient durant 6 hores. Passat el temps es van afegir 500 μL de AcONH₄ 2 M a pH=7 i es va analitzar per HPLC i HPLC-MS.
- Es va dissoldre la $G^{\text{All-Alloc}}$ en 250 μL de AMA i es va deixar reaccionant a temperatura ambient durant 30 min. Passat el temps es van afegir 500 μL de AcONH₄ 2 M a pH=7 i es va analitzar per HPLC i HPLC-MS. L'assaig es va repetir duent a terme la reacció a 65°C durant 10 min.
- Es va dissoldre la $G^{\text{All-Alloc}}$ en 250 μL de K₂CO₃ 0.05 M en MeOH i es va deixar reaccionant a temperatura ambient durant 4 hores. Passat el temps es van afegir 500 μL de AcONH₄ 2 M a pH=7 i es va analitzar per HPLC i HPLC-MS.
- Es va dissoldre la $G^{\text{All-Alloc}}$ en 250 μL d'una solució DMSO/TEA·3HF (1:1) i es va deixar reaccionant 2.5 hores a 65°C. Passat el temps es van afegir 500 μL de Me₃SiOⁱPr, es va diluir amb H₂O i es va analitzar per HPLC i HPLC-MS.
- Es va dissoldre la $G^{\text{All-Alloc}}$ en 250 μL de TBAF 1 M en THF i es va deixar reaccionant 16 hores a temperatura ambient. Passat el temps es va diluir amb H₂O i es va analitzar per HPLC i HPLC-MS.

Els resultat obtinguts en els diferents assaigs d'estabilitat es mostren en la *TAULA* 2.4 del Bloc 1 de la Part Teòrica.

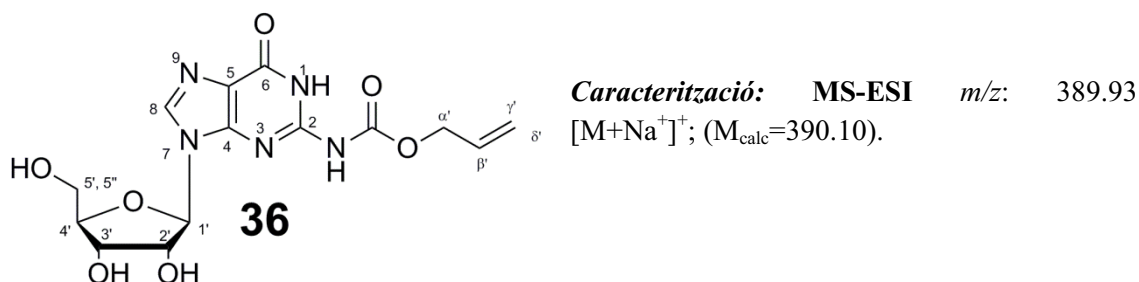
3.3.2.3 Obtenció de G^{Alloc} i G^{All} i avaluació de la seva estabilitat

3.3.2.3.1 Obtenció de la N^2 -al·liloxicarbonil-guanosina **36**

En un baló de 25 mL es van pesar 200 mg (0.49 mmol, 1 eq) del nucleòsid **31** sota atmosfera d'argó. El nucleòsid es va dissoldre en 5 mL de THF anhidre i 0.7 mL de HMPA. Es van afegir 1.5 mL (1.47 mmol, 3 eq) de clorur de *tert*-butilmagnesi 1 M en THF i es va deixar reaccionant a temperatura ambient durant 1 h, formant-se una

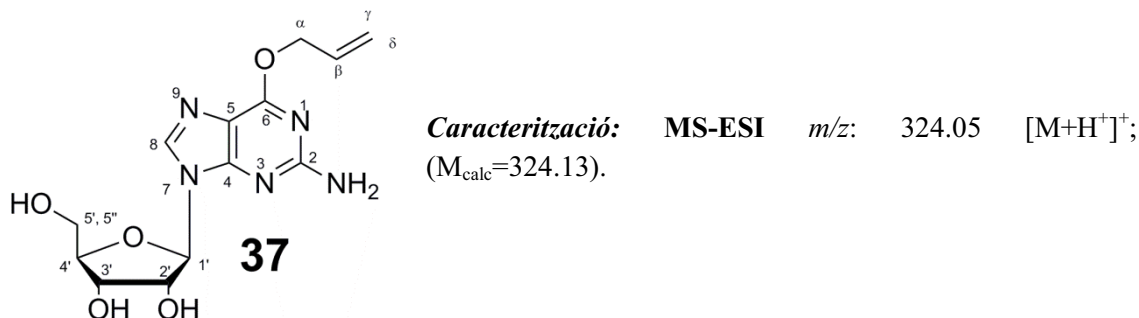
suspensió grogosa. Es van afegir 130 μL (1.23 mmol, 2.5 eq) de cloroformat d'al·lil i la dissolució formada es va deixar agitant a temperatura ambient. Passats 20 minuts, es va parar la reacció afegint 400 μL de MeOH. El dissolvent es va evaporar a pressió reduïda, obtenint-se un oli taronjós. El residu es va dissoldre en 20 mL de AcOEt i es va rentar amb 20 mL d'una solució d'EDTA 0.15 M, 20 mL d'una solució saturada de NaHCO_3 i 20 mL d'una solució saturada de NaCl aturat. Es van ajuntar les fraccions orgàniques, es van assecar amb MgSO_4 anhidre i es va eliminar el dissolvent a pressió reduïda.

El residu obtingut es va dissoldre en 3.5 mL de EtOH absolut i s'hi van afegir 15 mL (3 eq) de NaOH 0.1 M/EtOH 95%. Es va deixar reaccionant durant 1 hora a temperatura ambient, es va parar la reacció neutralitzant la suspensió formada amb AcOH 80% i es va eliminar el dissolvent a pressió reduïda. El residu obtingut es va dissoldre en 10 mL de MeOH, del qual se'n van agafar 250 μL que es van purificar per HPLC en fase inversa, usant un gradient de 5 min al 5% de B i del 5 al 80% de B en 25 min, on A= TEAA 0.05M i B= ACN/ H_2O 1:1.



3.3.2.3.2 Obtenció de la σ^6 -al·lil-guanosina **37**

En un tub de microcentrífuga d'1.5 mL es van pesar 10mg (0.02 mmol, 1 eq) de la guanosina **32**. Aquest es va dissoldre en 150 μL de EtOH absolut i s'hi van afegir 600 μL (3 eq) de NaOH 0.1 M/EtOH 95%. Es va deixar reaccionant durant 1 hora a temperatura ambient. Passat el temps es va evaporar el dissolvent a pressió reduïda i es va obtenir el producte de forma quantitativa.



3.3.2.3.3 Avaluació de l'estabilitat de les guanosines **36** i **37**

Tots els assaigs d'estabilitat es van dur a terme amb 0.2 mg de la guanosina seleccionada. Els nucleòsids es van dissoldre en 250 µL de la solució que s'estava avaluant i es va deixar avançar la reacció a la temperatura elegida el temps desitjat. Les reaccions es van aturar afegint 500 µL de AcONH₄ 2 M a pH=7 i es van analitzar per HPLC en fase inversa, usant una columna Kromasil de 10 µm i un gradient de 5 min al 2% de B i després del 2 a 30% de B en 15 min (A: TEAA 0.05 M, B: ACN/H₂O 1:1), i per HPLC-MS, emprant la mateixa columna i un gradient de 5 min al 5% de B i després del 5 a 80% de B en 30 min (A: AcONH₄ 0.01 M, B: ACN/H₂O 1:1). Els resum de les diferents condicions experimentals assajades es mostra en la *TAULA 3.4*

Assaig	Nucleòsid	Reactiu	Temperatura	Temps
1	36	NH ₃	t.a.	1 h
2	36	NH ₃	t.a.	6 h
3	36	NH ₃	t.a.	24 h
4	36	AMA	55°C	10 min
5	37	NH ₃	t.a.	1 h
6	37	NH ₃	t.a.	6 h
7	37	AMA	55°C	10 min
8	37	AMA	55°C	1 h

Taula 3.4. Taula resum de les diferents condicions experimentals usades per avaluar l'estabilitat de guanosines **36** i **37**.

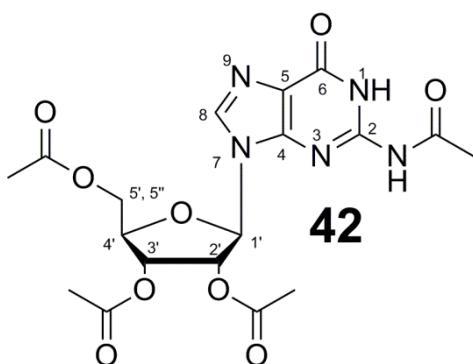
Els resultat obtinguts en els diferents assaigs d'estabilitat es mostren en la *TAULA 2.5* del Bloc 1 de la Part Teòrica.

3.3.3 Obtenció del fosforamidit de *G^{All-Ac}*

3.3.3.1 Obtenció de 2',3',5'-O-N²-tetraacetilguanosina **42**

En un baló de 250 mL es van suspendre 8 g (28.24 mmol, 1 eq) de guanosina en 40 mL de piridina anhidra i 40 mL de DMF anhidra i s'hi van addicionar 40 mL (424 mmol, 15 eq) d'Ac₂O. La mescla de reacció es va agitar a reflux (160°C) durant tota la nit. La solució es va deixar refredar a temperatura ambient durant 30 min i es va evaporar el dissolvent a pressió reduïda. El residu es va dissoldre en 50 mL de DCM i es va rentar amb 50 mL d'una solució d'àcid cítric al 10%, 50 mL d'una solució de NaHCO₃ al 10% i 50 mL de H₂O. Es van ajuntar les fraccions orgàniques, es van assecar amb MgSO₄ anhidre i es va eliminar el dissolvent a pressió reduïda. El residu es

va purificar per cromatografia en columna de gel de sílice eluint amb DCM/MeOH (97:3), usant quantitats creixents de MeOH (de 97:3 a 95:5). Un cop evaporades les fraccions es van obtenir 11.28 g de producte (rendiment del 89%).



Caracterització: Sòlid groc taronjós; **P_f**: 196-197°C; **R_f**: 0.65 (DCM/MeOH 9:1); **¹H NMR** (400 MHz, (CDCl₃) δ (ppm): 11.94 (s, 1H, NH1), 9.08 (s, 1H, NH2), 7.69 (s, 1H, H8), 5.97–5.90 (m, 2H, H1', H2'), 5.74 (t, *J*=4.0 Hz, 1H, H3'), 4.68 (q, *J*=7.9 Hz, 1H, H4'), 4.54–4.42 (m, 2H, H5', H5''), 2.32 (s, 3H, AcO NH2), 2.16 (s, 3H, AcO 5'), 2.09 (s, 6H, AcO 2' i AcO 3'); **¹³C NMR** (101 MHz, (CDCl₃) δ (ppm): 172.03, 171.75, 169.88 i 169.55 (CO 2', CO 3', CO 4' i CO N2), 155.47 (C6), 147.54 i 147.47 (C2 i C4), 138.60 (C8), 122.88 (C5), 87.71 (C1'), 80.17 (C2'), 73.00 (C3'), 71.16 (C4'), 63.36 (C5'), 24.42 (CH₃ N2), 21.08, 20.74 i 20.56 (CH₃ 2', CH₃ 3' i CH₃ 4'); **ESI *m/z***: 474.02 [M+Na⁺] (*M*_{calc}=474.12); **HRMS *m/z***: 452.1411 [M+H⁺]⁺; (*M*_{calc} C₁₈H₂₂N₅O₉⁺=452.1412).

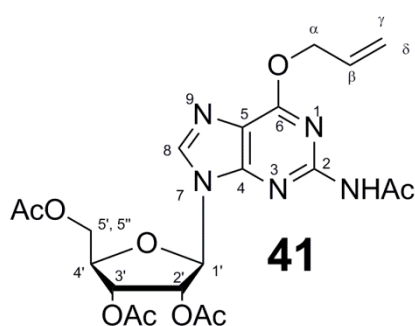
3.3.3.2 Síntesi de O⁶-al·lil-2',3',5'-O-N²-tetraacetilguanosina 41

Obtenció mitjançant la reacció de Mitsunobu

En un baló de 250 mL assecat a l'estufa es van pesar 11.28 g (25.0 mmol, 1 eq) de la guanosina **42** sota atmosfera d'argó. Es van suspendre en 140 mL de THF anhidre i s'hi van afegir sota agitació 2.5 mL (36.8 mmol, 1.5 eq) d'alcohol al·lilic, 9.3 mL (7.59 mmol, 1.5 eq) de PBU₃ i, gota a gota durant 10 minuts, 7.4 mL (37.5 mmol, 1.5 eq) de DIAD. La solució homogènia tarongenca formada es va agitar durant tota la nit a 30°C. Un cop acabada la reacció, es va evaporar el dissolvent a pressió reduïda. El residu es va dissoldre en 50 mL de AcOEt i es va rentar amb 50 mL d'una solució d'àcid cítric al 10% i 50 mL d'una solució saturada de NaCl. Es van ajuntar les fraccions orgàniques, es van assecar amb MgSO₄ anhidre i es va eliminar el dissolvent a pressió reduïda. El residu es va purificar per cromatografia en columna de gel de sílice eluint amb AcOEt, usant quantitats creixents del 0.5% de MeOH (del 0.5 al 2%). Les fraccions pures es van evaporar separatament de les fraccions impures, les quals es van tornar a purificar per cromatografia en columna de gel de sílice usant les mateixes condicions. Un cop evaporades i ajuntades totes les fraccions pures es van obtenir 6.83 g de producte (rendiment del 56%).

Obtenció mitjançant substitució nucleòfila

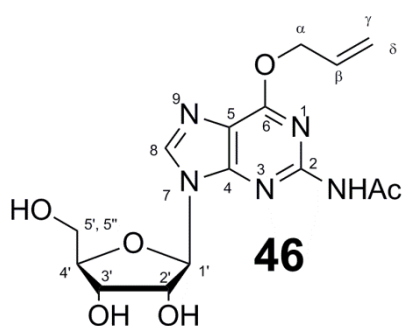
En un baló de 10 mL assecat a l'estufa es van pesar 200 mg (0.44 mmol, 1 eq) de la guanosina **42** sota atmosfera d'argó. Per altra banda, es van pesar també sota argó 192 mg (0.88 mmol, 2 eq) de clorur de mesitilensulfonil i 2 mg (0.018 mmol, 0.04 eq) de DMAP en un tub de microcentrífuga de 2 mL. El nucleòsid es va dissoldre en 6 mL de DCM anhidre i el contingut del tub de microcentrífuga en 1 mL de DCM anhidre. Aquesta segona dissolució es va addicionar amb agitació a la primera i es va deixar agitant a temperatura ambient durant 30 minuts. Es va comprovar per CCF (DCM/MeOH 95:5) la formació quantitativa d'un nou producte més apolar. El baló de reacció es va refredar a 0°C amb un bany d'aigua i gel i s'hi van addicionar 1.1 mL (10.3 mmol, 23 eq) de *N*-metilpirrolidina seca. Es va deixar reaccionant a 0°C durant 30 minuts i es va comprovar per CCF (DCM/MeOH 95:5) la formació quantitativa d'un nou producte amb $R_f=0$. Es van afegir 210 μ L (3.1 mmol, 7 eq) d'alcohol al·lílic i 200 μ L (1.34 mmol, 3 eq) de DBU seca a 0°C a la mescla de reacció, es va treure el baló del bany d'aigua amb gel, es va deixar que evolucionés fins a temperatura ambient i es va mantenir en agitació durant 3 hores. Un cop acabada la reacció, es va eliminar el dissolvent a pressió reduïda. El residu es va dissoldre en 10 mL DCM i es va rentar amb H₂O (2x10 mL). Les fraccions orgàniques es van ajuntar, es van assecar amb MgSO₄ anhidre i es va eliminar el dissolvent a pressió reduïda. El residu es va purificar per cromatografia en columna de gel de sílice eluint amb DCM, usant quantitats creixents de MeOH (del 0 al 2%). Un cop evaporades i ajuntades totes les fraccions pures es van obtenir 132 mg de producte (rendiment del 61%).



Caracterització: Sòlid blanc; P_f : 56-58°C; R_f : 0.65 (AcOEt/MeOH 95:5); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, (CDCl₃) δ (ppm): 7.99 (s, 1H, NH), 7.93 (s, 1H, H8), 6.17–6.07 (m, 1H, H β), 6.06 (d, $J=4.5$ Hz, 1H, H1'), 5.92 (dd, $J=5.4$, 4.6 Hz, 1H, H2'), 5.71 (t, $J=5.3$ Hz, 1H, H3'), 5.45 (ddd, $J=17.3$, 2.9, 1.5 Hz, 1H, H γ), 5.31 (ddd, $J=10.5$, 2.5, 1.2 Hz, 1H, H δ), 5.06 (dt, $J=5.7$, 1.4 Hz, 2H, H α), 4.52–4.34 (m, 3H, H4', H5' i H5''), 2.53 (s, 3H, AcO NH2), 2.14 (s, 3H, AcO 5'), 2.10, 2.09 (2s, 9H, AcO 2' i AcO 3'); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, (CDCl₃) δ (ppm): 171.43, 170.56 i 170.35 (CO 2', CO 3', CO 4' i CO N2), 161.78 (C6), 153.38 i 153.28 (C2 i C4), 140.93 (C8), 132.95 (C β), 119.91 i 119.56 (C γ i C5), 87.89 (C1'), 80.96 (C2'), 74.17 (C3'), 71.41 (C α), 69.09 (C4'), 64.03 (C5'), 26.20 (CH₃ N2), 21.76, 21.54 i 21.42 (CH₃ 2', CH₃ 3' i CH₃ 4'); **HRMS** m/z : 492.1730 [M+H⁺]⁺; (M_{calc} C₂₁H₂₆N₅O₉⁺=492.1725).

3.3.3.2 Síntesi de O⁶-al·lil-N²-acetilguanosina 46

En un baló d'1 L es van pesar 6.83 g (13.91 mmol, 1 eq) de la guanosina **41** i es van dissoldre en 100 mL d'EtOH absolut. Es van afegir 420 mL (41.93 mmol, 3 eq) de NaOH 0.1 M en EtOH al 95% i es va deixar reaccionar sota agitació magnètica durant 5 minuts a temperatura ambient. Passats els 5 minuts, es va neutralitzar el contingut del baló ràpidament amb 100 mL de AcOH 80%. La mescla es va deixar agitant 5 minuts més i es va eliminar el dissolvent a pressió reduïda. El residu resultant es va purificar per MPLC en fase inversa, eluint primerament amb ACN i després amb MeOH. Les fraccions que contenien producte es van ajuntar i es va eliminar el dissolvent a pressió reduïda. Es van obtenir 4.69 g de producte (rendiment del 92%).

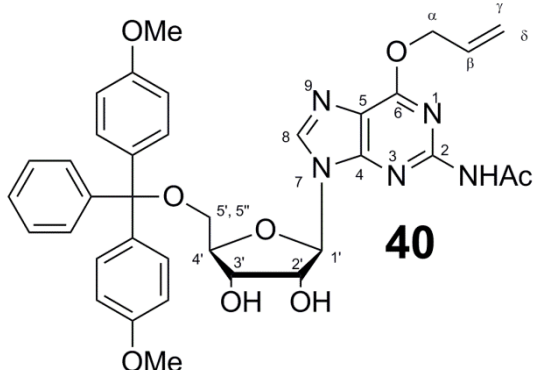


Caracterització: Sòlid blanc; **P_f:** 176-180°C **R_f:** 0.27 (DCM/MeOH 9:1); **¹H NMR** (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 10.46 (s, 1H, NH), 8.46 (s, 1H, H8), 6.24-6.09 (m, 1H, Hβ), 5.88 (d, *J*=5.9 Hz, 1H, H1'), 5.53 (s, 1H, OH), 5.46 (tdd, *J*=3.2, 1.5, 0.8 Hz, 1H, Hγ), 5.30 (dd, *J*=10.4, 1.2 Hz, 1H, Hδ), 5.23 (s, 1H, OH), 5.05 (d, *J*=5.5 Hz, 2H, Hα), 5.00 (t, *J*=5.3 Hz, 1H, H2'), 4.58 (t, *J*=4.9 Hz, 1H, H3'), 4.17 (s, 1H, OH), 3.91 (dd, *J*=7.8, 4.1 Hz, 1H, H4'), 3.68–3.49 (m, 2H, H5' i H5''), 2.22 (s, 3H, Ac); **¹³C NMR** (101 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 161.16 (C6), 154.57 (C4), 153.60 (C2), 142.96 (C8), 134.48 (Cβ), 120.35 (Cγ), 118.85 (C5), 88.68 (C1'), 87.17 (C4'), 75.14 (C2'), 71.96 (Cα), 68.61 (C3'), 62.92 (C5'), 26.32 (Ac); **HRMS** *m/z*: 388.1225 [M+H]⁺; (M_{calc} C₁₅H₂₀N₅O₆⁺=388.1228).

3.3.3.3 Síntesi de 5'-O-dimetoxitritil-O⁶-al·lil-N²-acetilguanosina 40

En un baló de 100 mL prèviament assecat a l'estufa, es van pesar 2.60 g (7.12 mmol, 1 eq) de la guanosina **46** i es va deixar en un dessecador durant 4 hores. Paral·lelament es van pesar 4 fraccions de 905 mg de clorur de dimetoxitritil (DMT-Cl) en 4 tubs de microcentrífuga de 2 mL (total de 3.62 g, 10.68 mmol, 1.5 eq), que també es van deixar en el dessecador 4 hores. Passat aquest temps el nucleòsid es va dissoldre en 10 mL de piridina anhidra i es va coevaporar. Es van fer dues coevaporacions més i es va dissoldre el nucleòsid en 35 mL de piridina anhidra. Es va afegir la primera de les fraccions de DMT-Cl al baló de reacció, així com 87 mg (7.12 mmol, 0.1 eq) de DMAP, i la solució groguenca es va deixar agitant a temperatura ambient durant 10 minuts sota atmosfera d'argó. Passats els 10 minuts, es va afegir la segona fracció de DMT-Cl, es va tornar a purgar amb argó i es va deixar reaccionant 10 minuts més. El mateix procés es va repetir amb la tercera i quarta fracció. Un cop afegida aquesta darrera es va deixar

agitant a temperatura ambient tota la nit. La solució tarongenca es va evaporar a pressió reduïda i el residu es va purificar per cromatografia en columna de gel de sílice eluint amb DCM/TEA (98:2), usant quantitats creixents del 0.5% de MeOH (de 98:2:0 a 96:2:2). Un cop evaporades les fraccions es van obtenir 3.89 g de producte (rendiment del 82%).



Caracterització: Sòlid groc; **P_f**: 125-127°C **R_f**: 0.46 (DCM/MeOH 9:1); **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.19, 8.10 (2s, 2H, NH, H8), 7.29–7.03 (m, 9H, Ar-DMT), 6.72–6.66 (m, 4H, Ar-DMT), 6.17-6.07 (m 1H, H_β), 5.91 (d, *J*=6.2 Hz, 1H, H1'), 5.46 (ddd, *J*=17.2, 2.9, 1.4 Hz, 1H, H_γ), 5.31 (ddd, *J*=10.5, 2.4, 1.2 Hz, 1H, H_δ), 5.06 (d, *J*=5.5 Hz, 1H, H_α), 4.93 (t, *J*=5.6 Hz, 1H, H2'), 4.47 (t, *J*=2.9 Hz, 1H, H4'), 4.39 (d, *J*=5.2 Hz, 1H, H3'), 3.75 (s, 6H, OMe), 3.27 (ddd, *J*=67.6, 10.6, 3.3 Hz, 2H, H5' i H5''), 2.29 (s, 3H, Ac); **¹³C NMR** (101 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 168.79 (CO), 160.87 (C6), 158.57 (Ar-DMT), 151.77 (C4), 151.07 (C2), 144.41 (Ar-DMT), 140.23 (C8), 135.58 i 135.48 (Ar-DMT), 132.09 (C_β), 130.07, 130.03, 128.03, 127.86 i 126.89 (Ar-DMT), 118.98 (C_γ), 118.79 (C5), 113.18 (Ar-DMT), 92.02 (C1'), 86.92 i 86.64 (C4' i Ar-DMT), 76.61 (C2'), 73.85 (C_α), 68.21 (C3'), 64.00 (C5'), 55.30 (C OMe), 25.22 (Ac); **HRMS** *m/z*: 690.2532 [M+Na⁺]⁺; (M_{calc} C₃₆H₃₇N₅O₅Na⁺=690.2534).

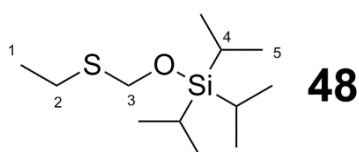
3.3.3.4 Síntesi de 5'-O-dimetoxitritil-O⁶-al·lil-2'-O-[(triisopropilsiloxi)metil]-N²-acetilguanosina 39

3.3.3.4.1 Síntesi de clorur de TOM (TOM-Cl) 49

Obtenció de (etiltiometoxi)triisopropilsilà 48

En una baló de 100 mL, prèviament assecat a l'estufa, es van pesar 1.65 g (55 mmol, 1.05 eq) de paraformaldehyd, es va purgar amb argó i es va traslladar a una vitrina ben ventilada. Sota atmosfera d'argó es van afegir 4.1 mL (55 mmol, 1.05 eq) d'etantíol usant una xeringa de plàstic. La suspensió formada es va posar en un bany d'aigua i gel fins que va arribar a uns 3°C. Mentre es tenia sota agitació es va afegir una gota de NaOH 10 M i es va retirar el baló del bany. Quan la temperatura del baló s'apropava a la temperatura ambient es va sentir un soroll gasós (degut a la despolimerització del paraformaldehyd) i es va observar que la suspensió es transformava en una dissolució de color groc pàl·lid. Es va posar el baló a 40°C i es va deixar agitant durant 1 hora. Es va refredar el baló a temperatura ambient, s'hi van afegir 50 mL de DCM i, tot seguit es van afegir 7.69 g (113 mmol, 2.17 eq) d'imidazole i, ràpidament, 11.1 mL (52 mmol, 1 eq) de clorur de triisopropilsilà (TIPS-Cl).

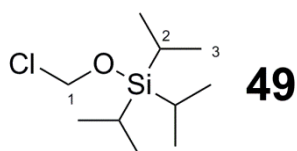
La suspensió es va deixar agitant durant tota la nit. Passades 16 hores es va avocar el contingut del baló sobre un matràs que contenia 120 mL d'hexà i 80 mL una solució de NaH_2PO_4 al 10% amb agitació. Es va extreure la fase orgànica i es va tornar a rentar la fase aquosa amb 100 mL d'hexà. Es van ajuntar les fraccions orgàniques, es van assecar amb Mg_2SO_4 anhidre i es va evaporar a pressió reduïda durant varies hores per intentar eliminar restes de EtSH. El residu es va destil·lar al buit (<1 mbar) i es va recollir el destil·lat, que típicament destil·lava a 85°C . Vam obtenir 9.45 g de producte pur (rendiment del 73%). *Tot el material que hagués estat en contacte amb l'etantíol es va netejar immediatament amb lleixiu.*



Caracterització: Líquid incolor; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 4.85 (d, $J=1.2$ Hz, 2H, H3), 2.68 (qd, $J=7.4$, 1.3 Hz, 2H, H2), 1.28 (td, $J=7.4$, 1.2 Hz, 3H, H1), 1.11–1.03 (m, 21H, $^i\text{Pr}_3\text{Si}$); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 66.26 (C3), 24.86 (C2), 18.11 i 17.92 (C5 i C5'), 15.15 (C1), 12.17 (C4).

Obtenció de TOM-Cl 49

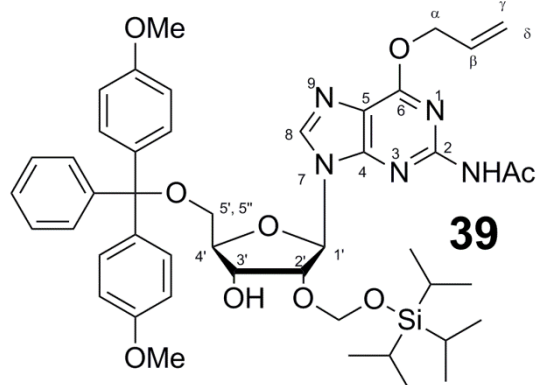
En una baló de 100 mL, prèviament assecat a l'estufa, es van dissoldre 9.45 g de l'èter de silil **48** (38 mmol, 1 eq) en 25 mL de DCM anhidre i es va purgar amb argó. El contingut del baló es va agitar en un bany d'aigua i gel durant 10 minuts. Mantenint una purga constant d'argó, es van afegir 3.4 mL (42 mmol, 1.1 eq) de clorur de sulfuril (SO_2Cl_2) gota a gota durant 10 minuts. La mescla de reacció es va deixar evolucionar fins a temperatura ambient i es va agitar durant 1 hora. La solució grogosa es va evaporar a pressió reduïda durant varies hores per intentar eliminar al màxim els subproductes volàtils. El residu es va destil·lar al buit (<1 mbar) i es va recollir el producte destil·lat, que típicament va destil·lar a 70°C . Es van obtenir 6.37 g de producte (rendiment del 71%). *Cal guardar el producte sota atmosfera d'argó per evitar la seva descomposició.*



Caracterització: Líquid incolor; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 5.66 (d, $J=0.7$ Hz, 2H, H1), 1.10–1.05 (m, 21H, $^i\text{Pr}_3\text{Si}$); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 76.41 (C1), 17.67 (C3), 11.82 (C2); **MS-Cl** m/z : 223.6 $[\text{M}+\text{H}^+]^+$; ($M_{\text{calc}}=223.1$).

3.3.3.4.2 Protecció en 2' de la O^5 -dimetoxitritil- O^6 -alil- N^2 -acetilguanósina

En un baló de 50 mL assecat a l'estufa es van pesar 2 g (3.00 mmol, 1 eq) de la guanósina **40** i es van deixar durant 2 hores al dessecador. El nucleòsid es va dissoldre en 10 mL de dicloroetà sec i es va agitar sota atmosfera d'argó, amb un refrigerant de reflux, durant 10 minuts. Es van afegir 1.9 mL (10.90 mmol, 3.6 eq) de DIPEA, seguits de l'addició de 912 mg (3.00 mmol, 1 eq) de n -Bu₂SnCl₂ dissolts en dicloroetà. És imprescindible que el n -Bu₂SnCl₂ s'addicioni després de la DIPEA. La reacció es va deixar avançar durant 1 hora a temperatura ambient i, tot seguit, durant 10 minuts a 80°C. Es van afegir 840 µL (3.90 mmol, 1.3 eq) de TOM-Cl (**49**) i es va deixar en agitació durant 20 minuts a 80°C. L'avenç de la reacció es va controlar per CCF (hexà/AcOEt 2:8), on els productes amb R_f ≈ 0.9 i 0.8 es corresponen als isòmers 2'-O-TOM (**39**) i 3'-O-TOM (**51**), respectivament, essent molt majoritari el primer. La reacció es va parar afegint 5 mL de DCM passat per alumina i evaporant a sequedat. El residu es va purificar per cromatografia en columna de gel de sílice eluint amb Hexà/AcOEt/TEA 58:40:2, usant quantitats creixents de AcOEt (de 58:40:2 a 38:60:2). En el moment que els dos isòmers s'havien eluït es va canviar l'eluent a DCM/MeOH/TEA (93:5:2) per tal de recuperar el producte de partida no reaccionat. Un cop evaporades les fraccions es van obtenir 951 mg d'isòmer 2'-O-TOM (rendiment del 37%), així com 288 mg de l'isòmer 3'-O-TOM (rendiment del 11%) i 697 mg de producte de partida (35%).

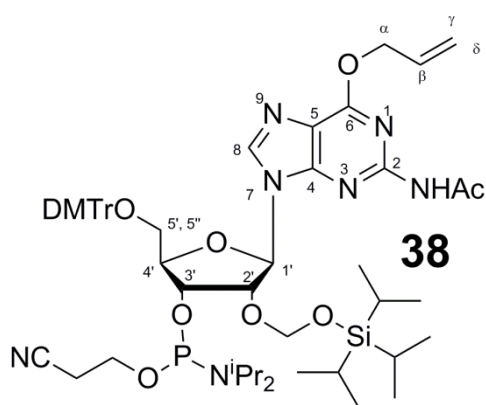


Caracterització: Sòlid groc; **P_f**: 85-87°C; **R_f**: 0.87 (AcOEt/Hexà 8:2); **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.98 (s, 1H, NH), 7.72 (s, 1H, H8), 7.46–7.17 (m, 9H, Ar-DMT), 6.86–6.76 (m, 4H, Ar-DMT), 6.19–6.07 (m, 1H, Hβ), 6.10 (d, *J*=5.7 Hz, 1H, H1'), 5.49–5.42 (m, 1H, Hγ), 5.31 (ddt, *J*=10.5, 2.5, 1.2 Hz, 1H, Hδ), 5.12 (d, *J*=4.8 Hz, 1H, OCH₂O), 5.05 (dt, *J*=5.6, 1.2 Hz, 2H, Hα), 4.94 (d, *J*=4.9 Hz, 1H, OCH₂O), 4.86 (t, *J*=5.4 Hz, 1H, H2'), 4.53 (dd, *J*=4.9, 3.5 Hz, 1H, H3'), 4.28 (dd, *J*=6.9, 3.5 Hz, 1H, H4'),

3.77 (s, 6H, OMe), 3.46–3.36 (m, 2H, H5' i H5''), 2.43 (s, 3H, Ac), 1.10–0.98 (m, 21H, ¹Pr₃Si); **¹³C NMR** (101 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 160.62 (C6), 158.58 (Ar-DMT), 152.80 (C4), 152.04 (C2), 144.53 i 141.11 (Ar-DMT), 140.40 (C8), 135.63 (Ar-DMT), 132.09 (Cβ), 130.03, 128.12, 127.90 i 126.98 (Ar-DMT), 118.82 (Cγ), 118.43 (C5), 113.20 (Ar-DMT), 90.88 (OCH₂O), 86.61 (C1'), 84.23 (C4'), 82.20 (C2'), 71.06 (C3'), 67.99 (Cα), 63.69 (C5'), 55.21 (C OMe), 25.06 (Ac), 17.75, 11.88 i 11.82 (C ¹Pr₃Si); **HRMS** *m/z*: 854.4148 [M+H⁺]; (M_{calc} C₄₆H₆₀N₅O₉Si⁺=854.4153).

3.3.3.5 Síntesi de 5'-O-dimetoxitritil-O⁶-al·lil-2'-O-[(triisopropilsiloxi)metil]-N²-acetilguanosa -3'-cianoetil-N-diisopropil-fosforamidit **38**

En un baló de 10 mL assecat a l'estufa es van pesar 500 mg (0.59 mmol, 1 eq) de la guanosina **39** i es van dissoldre en 5 mL de DCM anhidre. Es van afegir 250 μ L (1.47 mmol, 2.5 eq) de DIPEA sota atmosfera d'argó i es va deixar agitant durant 5 minuts. Es van addicionar 155 μ L (0.70 mmol, 1.2 eq) de 2-cianoetil N-diisopropilclorofosfina a la mescla de reacció i, un cop purgat amb argó, es va deixar reaccionant 2.5 hores. Es va eliminar el dissolvent de la reacció a pressió reduïda i el residu es va purificar per cromatografia en columna de gel de sílice eluint amb Hexà/AcOEt/TEA 78:20:2, usant quantitats creixents de AcOEt (de 78:20:2 a 58:40:2). Un cop evaporades les fraccions vam procedir a precipitar el producte sobre hexà fred, obtenint finalment 463 mg de producte pur (rendiment del 75%).



Caracterització: Sòlid blanc; **R_f**: 0.72 (AcOEt/Hexà 1:1); **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.99 i 7.97 (2s, 1H, NH), 7.69 i 7.68 (2s, 1H, H8), 7.45–7.19 (m, 9H, Ar-DMT), 6.82–6.76 (m, 4H, Ar-DMT), 6.17–6.11 (m, 1H, H β), 6.10 (dd, $J=6$ Hz, 14 Hz, 1H, H1'), 5.45 (dd, $J=20$, 2 Hz, 1H, H γ), 5.30 (dd, $J=10$, 2 Hz, 1H, H δ), 5.06 (dd, $J=6$, 3 Hz, 2H, H α), 5.03–4.86 (m, 3H, OCH₂O, H2'), 4.56–4.52 (m, 1H, H3'), 4.39 i 4.33 (2q, $J=3$ Hz, 1H, H4'), 3.94–3.74 (m, 2H, CH₂ α'), 3.78 i 3.77 (2s, 6H, OMe), 3.68–3.55 (m, 5H, CHⁱPr), 3.48 (dd, $J=8$, 4 Hz, 1H,

H5'), 3.43–3.34 (m, 1H, H5''), 2.65 (td, $J=8$, 4 Hz) i 2.35 (t, $J=8$ Hz) (2H, CH2 β'), 2.44 (s, 3H, Ac), 1.26–0.87 (m, 30H, ⁱPr₃Si); **¹³C NMR** (101 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 162.04 (C6), 160.05 (Ar-DMT), 153.45 (C4), 152.63 (C2), 145.91, (Ar-DMT), 141.97 (C8), 137.06 (Ar-DMT), 133.62 (C β), 131.48, 129.69, 129.38 i 128.45 (Ar-DMT), 120.19 (C γ), 114.67 (Ar-DMT), 90.92 (OCH₂O), 88.04 (C1'), 85.98 i 85.74 (C4' i C2'), 69.43 (C3'), 65.03 (C α), 65.03 (C5'), 59.93 (C α'), 56.70 (C OMe), 44.73 (CHⁱPr), 26.09 (Ac), 21.86 (C β'), 19.12 i 13.28 (CⁱPr₃Si); **³¹P NMR** (121 MHz, CDCl₃): 150.97 i 150.05 (2 estereoisòmers); **HRMS** m/z : 1054.5232 [M+H⁺]⁺; (M_{calc} C₅₅H₇₇N₇O₁₀PSi⁺=1054.5233).

3.3.4 Obtenció d'oligonucleòtids que incorporen G^{All}

3.3.4.1 14mer rG(CUG^{All})₃CUGC 53

3.3.4.1.1 Síntesi, purificació i caracterització del tetradecàmer 53

La síntesi del 14mer rG(CUG^{All})₃CUGC es va dur a terme a escala 1 µmol sobre citidina-resina comercial en un reactor de tefló. L'elongació de la seqüència oligonucleotídica va tenir lloc emprant el cicle de síntesi descrit en la *TAULA 3.1* i utilitzant derivats fosforamidits comercials així com el fosforamidit **38** sintetitzat per nosaltres. Un cop finalitzada la síntesi es va mantenir el grup DMT en l'extrem 5' de l'oligonucleòtid per tal de facilitar-ne la purificació.

El desancoratge de la cadena de la resina, així com la desprotecció tant de les nucleobases com dels fosfats internucleosídics i de l'hidroxil 2' es va dur a terme seguint els protocols descrits en els apartats 3.1.2 i 3.1.3. L'oligonucleòtid es va purificar per HPLC preparatiu tal com es descriu en l'apartat 3.1.4, usant un gradient per oligonucleòtids curts, i es va eliminar el grup DMT seguint el protocol descrit el aquell apartat. Es va verificar la puresa del producte purificat per HPLC en fase inversa usant una columna Kromasil C₁₈, amb un gradient del 15 al 50% de B en 30 min (A: TEAA 0.05 M, B: ACN/H₂O 1:1), revelant-se que teníem, com a mínim, quatre productes diferents, els quals es diferenciaven pel nombre de grups Ac presents en la molècula. Les diferents fraccions es van ajuntar i es van repurificar per HPLC amb un gradient del 20 al 30% de B en 30' (A: TEAA 0.05 M, B: ACN/H₂O 1:1), aïllant 4 productes diferents. Aquests 4 oligonucleòtids (**53-56**) van ser quantificats i caracteritzats per EM-MALDI-TOF. Les quantitats obtingudes dels diferents productes (amb 0, 1, 2 i 3 grups Ac), així com els valor trobats en els espectres de EM-MALDI-TOF i l'assignació de cada oligonucleòtid es troba en la *TAULA 2.6* del Bloc 1 de la Part Teòrica. El 14mer **56** va ser digerit enzimàticament i analitzat per HPLC en fase inversa, seguint la metodologia descrita en l'apartat 1.11 de la Part Experimental (Materials i Mètodes). En la *TAULA 3.5* es comparen les proporcions de nucleòsids trobades experimentalment i les esperades en el cas que el 14mer conservés efectivament 3 grups Ac.

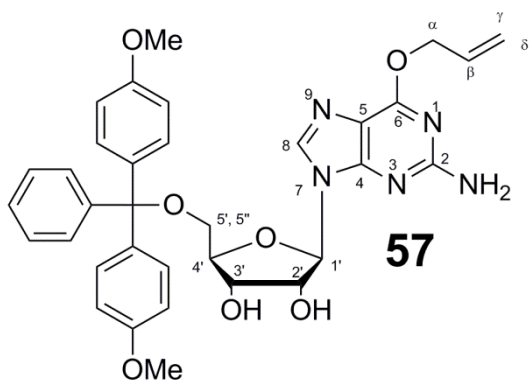
	C	U	G	G ^{All-Ac}
Proporció Esperada	5.0	4.0	2.0	3.0
Proporció Trobada	4.8	3.9	1.9	3.4

Taula 3.5. Comparació entre les proporcions de nucleòsids esperats i trobats experimentalment en la digestió enzimàtica del 14mer **56**.

3.3.4.1.2 Estudi de desprotecció del nucleòsid DMT-G^{All}

Síntesi de DMT-G^{All} **57**

En un baló de 100 mL es van pesar 250 mg (0.38 mmol, 1 eq) de la guanosina **40** i es van dissoldre en 4 mL de EtOH absolut. S'hi van afegir 40 mL d'una solució NaOH 0.1 M en EtOH 95% (4 mmol, 10.5 eq) i es va deixar reaccionar a temperatura ambient durant tota la nit. Passades 16 hores es va eliminar el dissolvent a pressió reduïda. El residu es va dissoldre en 10 mL DCM i es va rentar amb H₂O (3x10 mL). Es van ajuntar les fraccions orgàniques, es van assecar amb MgSO₄ anhidre i es va eliminar el dissolvent a pressió reduïda. El residu es va purificar per cromatografia en columna de gel de sílice eluint amb DCM/TEA (98:2), usant quantitats creixents del 1% de MeOH (de 98:2:0 a 94:2:4). Un cop evaporades les fraccions es van obtenir 153 mg de producte (rendiment del 65%).



Caracterització: Sòlid blanc; **P_f**: 114-116°C; **R_f**: 0.38 (DCM/MeOH 9:1); **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.83 (d, *J*=1.3 Hz, 1H, H8), 7.35–7.15 (m, 9H, Ar-DMT), 6.78–6.74 (m, 4H, Ar-DMT), 6.11 (ddd, *J*=16.1, 10.9, 5.7 Hz, 1H, Hβ), 5.87 (d, *J*=5.9 Hz, 1H, H1'), 5.43 (ddd, *J*=4.3, 3.4, 1.9 Hz, 1H, Hγ), 5.27 (dd, *J*=10.4, 1.3 Hz, 1H, Hδ), 5.00 (dt, *J*=5.6, 1.2 Hz, 1H, Hα), 4.75 (td, *J*=5.6, 3.2 Hz, 1H, H2'), 4.39 (dd, *J*=5.2, 2.6 Hz, 1H, H4'), 4.33 (dd, *J*=6.4, 3.6 Hz, 1H, H3'), 3.76 (s, 6H, OMe), 3.35 (ddd, *J*=62.6, 10.4, 3.7 Hz, 2H, H5' i H5''); **¹³C NMR** (101 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 158.99 (C6), 158.62, 153.41, 144.62, 137.91, 137.70 i 135.81, (Ar-DMT i Ar-base), 132.69 (Cβ), 130.16, 128.23, 127.97 i 126.97 (Ar-DMT), 118.44 (Cγ), 113.26 (Ar-DMT), 89.68 (C1'), 86.54 i 85.39 (C4', Ar-DMT), 74.96 (C2'), 72.09 (Cα), 67.50 (C3'), 63.78 (C5'), 55.33 (C OMe); **HRMS** *m/z*: 626.2607 [M+H]⁺; (M_{calc} C₃₄H₃₆N₅O₇⁺=626.2609).

Estudi d'eliminació del grup al·lil de DMT-G^{All}

En un vial assecat a l'estufa es van dissoldre 12.5 mg (0.02 mmol, 1 eq) de la guanosina **57** en 250 µL de THF i s'hi van afegir 250 µL d'una solució que contenia 4 µmol (0.2 eq) de PPh₃ i 1 µmol (0.05 eq) de Pd(PPh₃)₄ en THF. A aquesta solució es van afegir 0.04 mmol (2 eq) del nucleòfil elegit (2.8 mg de dimedona en el primer assaig, 5.5 µL d'una solució equimolar de *n*BuNH₂/HCOOH en el segon). La solució es va deixar reaccionar a temperatura ambient i es van agafar alíquotes cada 10 minuts, analitzant-les per CCF (DCM/MeOH 9:1), EM-MALDI-TOF i HPLC en fase inversa usant una columna Kromasil C₁₈ i un gradient del 40 al 80% de B en 20 min (A: TEAA 0.05 M, B: ACN).

3.3.4.1.3 Estudi de desprotecció del 14mer **55**

Es van liofilitzar 0.2 OD₂₆₀ del 14mer **55** en un tub de microcentrífuga. Sobre aquest es va afegir les quantitats necessàries de solucions 1.1 mM de [Pd(PPh₃)₄] en THF, de 11 mM de (PPh₃)₄ en THF i de 44 mM de HCOOH/*n*BuNH₂ (1:1), així com el volum de dissolvent necessari fins a 60 µL. Els volums adicionats de cada solució i de dissolvent es mostren en la *TAULA 3.6*, mentre que el resum de les diferents condicions experimentals usades es mostra en la *TAULA 2.7* del Bloc 1 de la Part Teòrica. Les diferents mescles de reacció es van fer reaccionar a la temperatura desitjada i es van agafar alíquotes per a enregistrar espectres de MALDI-TOF a les 1.5, 3, 6 i 19 hores.

	Assaig 1	Assaig 2	Assaig 3	Assaig 4
[Pd(PPh ₃) ₄]	10 µL	20 µL	20 µL	10 µL
PPh ₃	10 µL	20 µL	20 µL	10 µL
HCOOH/ <i>n</i> BuNH ₂	10 µL	20 µL	20 µL	10 µL
THF	30 µL	-	-	-
H ₂ O	-	-	-	30 µL

Taula 3.6. Volum addicionat de cada solució o dissolvent a cadascun dels diferents assaigs de desprotecció de l'oligonucleòtid **55**.

3.3.4.1.4 Desprotecció del 14mer **53**

Es van liofilitzar 0.2 OD del 14mer **53** en un tub de microcentrífuga. Sobre aquest es van afegir 10 µL d'una solució 1.1 mM de [Pd(PPh₃)₄] en THF preparada just abans d'utilitzar-la, 10 µL d'una solució 11 mM de (PPh₃)₄ en THF, 10 µL d'una solució 44 mM de HCOOH/*n*BuNH₂ (1:1) i 30 µL d'H₂O. Es va deixar reaccionant a 65°C

durant 2 hores i es va analitzar per MALDI-TOF, observant-se únicament producte totalment desprotegit ($M_{w\text{ calc}}=4413.6$, $M_{w\text{ exp}}=4413.5$).

Posteriorment es van agafar 0.1 OD de la mescla de reacció, es van liofilitzar en un tub de microcentrífuga i s'hi van afegir 35 μL de dtc 2 mg/mL per complexar el Pd. Es van analitzar per HPLC, usant una columna Kromasil C_{18} , amb un gradient del 20 al 30% de B en 30 min (A: TEAA 0.05 M, B: ACN/ H_2O 1:1).

3.3.4.2 Síntesi del 6mer $\text{rUG}^{\text{All}}\text{CUG}^{\text{All}}\text{C}$ 58 i estudi de desancoratge i desprotecció

La síntesi del 6mer $\text{rUG}^{\text{All}}\text{CUG}^{\text{All}}\text{C}$ 58 es va dur a terme a escala 1 μmol sobre citidina-resina comercial en un reactor de tefló. L'elongació de la seqüència oligonucleotídica va tenir lloc emprant el cicle de síntesi descrit en la *TAULA 3.1* i utilitzant derivats fosforamidits comercials així com el fosforamidit 38 sintetitzat per nosaltres.

Estudi de desprotecció amb AMA

Es van pesar 5 mg de la resina (corresponents a 125 nmol d'oligonucleòtid) en un vial especial per suportar altes pressions, s'hi van afegir 125 μL AMA i es van deixar reaccionar a 65°C, agafant mostres per a enregistrar espectres EM-MALDI-TOF als 30 min, 60 min, 90 min, 2 hores, 3 hores i 5 hores.

Estudi de desprotecció amb K_2CO_3 0.05 M en MeOH

Es van pesar dos cops 5 mg de la resina (corresponents a 125 nmol d'oligonucleòtid) en sengles vials especials, s'hi van afegir 100 μL de K_2CO_3 0.05 M en MeOH a cadascun i es van deixar reaccionar durant 6 hores a temperatura ambient i a 65°C, respectivament. Passades les 6 hores es van neutralitzar les solucions amb 100 μL de TEAA 2 M a pH=7 i es van analitzar els crus per EM-MALDI-TOF.

3.3.4.3 Síntesi del 42mer r(UGC)₃(UG^{All}C)₈(UGC)₃ **52**

La síntesi del 42mer r(UGC)₃(UG^{All}C)₈(UGC)₃ **52** es va dur a terme a escala 1 μmol sobre citidina-resina comercial en un reactor de tefló. L'elongació de la seqüència oligonucleotídica va tenir lloc emprant el cicle de síntesi descrit en la *TAULA 3.1* i utilitzant derivats fosforamidits comercials així com el fosforamidit **38** sintetitzat per nosaltres. Un cop finalitzada la síntesi es va mantenir el grup DMT en l'extrem 5' de l'oligonucleòtid per tal de facilitar-ne la purificació.

El desancoratge de la cadena de la resina, així com la desprotecció tant de les nucleobases com dels fosfats internucleosídics i de l'hidroxil 2' es va dur a terme seguint els protocols descrits en els apartats 3.1.2 i 3.1.3, introduint com a única modificació l'allargament del tractament de desancoratge amb AMA a 65°C fins a les 2 hores. L'oligonucleòtid es va purificar per HPLC semipreparatiu tal com es descriu en l'apartat 3.1.4, usant un gradient per oligonucleòtids llargs, i es va eliminar el grup DMT seguint el protocol descrit en aquell apartat.

Es va analitzar la puresa del producte purificat per HPLC en fase inversa usant una columna Kromasil C₁₈, amb un gradient del 10 al 90% de B en 30 min (A: TEAA 0.05 M, B: ACN/H₂O 1:1), revelant-se que teníem una barreja de productes. Les diferents fraccions es van ajuntar i es van repurificar per HPLC semipreparatiu amb un gradient del 25 al 40% de B en 30 min (A: TEAA 0.05 M, B: ACN/H₂O 1:1). Es van col·lectar diverses fraccions i es van analitzar per EM-ESI, determinant-se en quines teníem el producte desitjat ($M_{\text{calc}}=13650$, $M_{\text{exp}}=13651$). Les fraccions que contenien el producte desitjat es van ajuntar, es van liofilitzar i es van quantificar, obtenint-se 5 OD₂₆₀ (rendiment de l'1.3%).

3.3.5 Obtenció del 42mer cíclic per ciclació assistida per motlle amb protecció parcial del precursor lineal

3.3.5.1 Assaig de fosforilació i ciclació del 42mer **52**

Es van liofilitzar 0.4 OD₂₆₀ del precursor lineal **52** en un tub de microcentrífuga. Es van dissoldre en un volum de 80 μL (per a una concentració del precursor lineal de 15 μM) que contenia també Tris·HCl a pH=7.5 70 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 5 mM, ATP 0.063 mM i enzim T4 PNK (Fermentas) 0.5 U/μL. Es va incubar la mescla de

reacció a 37°C durant 5 hores. Passat aquest temps, es va escalfar el medi de reacció a 70°C durant 15 minuts per tal de parar la reacció i es van separar 0.2 OD₂₆₀ com a patró de fosforilació, que es van conservar liofilitzades.

Sobre les 0.2 OD₂₆₀ restant de la mescla de fosforil·lació anterior es van afegir 0.1 OD₂₆₀ del motlle **23**. Es va escalfar el contingut del tub de centrífuga a 95°C durant 10 minuts i es va deixar tornar a temperatura ambient lentament. Es va diluir la mescla a 57 µL (per a una concentració final del precursor lineal de 10 µM i del motlle de 10 µM), ajustant les concentracions de Tris·HCl a 50 mM, de MgCl₂ a 10 mM, de DTT a 5 mM, d'ATP a 1 mM i d'enzim T4 DNA ligasa (Fermentas) a 1 U/µL i es va deixar reaccionant a 30°C durant 16 hores. Passades les 16 hores, es va parar la reacció escalfant-la a 70°C durant 15 minuts, es va liofilitzar el contingut i es va analitzar conjuntament amb el patró de fosforilació per PAGE analític (750 V, 8 h).

3.3.5.2 Fosforilació i ciclació del 42mer **52** a major escala

Es van liofilitzar 0.5 OD₂₆₀ del precursor lineal **52** en un tub de microcentrífuga. Es van dissoldre en un volum de 100 µL (per a una concentració del precursor lineal de 15 µM) que contenia també Tris·HCl a pH=7.5 70 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 5 mM, ATP 0.063 mM i enzim T4 PNK (Fermentas) 0.5 U/µL. Es va incubar la mescla de reacció a 37°C durant 5 hores. Passat aquest temps, es va escalfar el medi de reacció a 70°C durant 15 minuts per tal de parar la reacció. Sobre la mescla de fosforil·lació es van afegir 0.25 OD₂₆₀ del motlle **23**. Es va escalfar el contingut del tub de centrífuga a 95°C durant 10 minuts i es va deixar tornar a temperatura ambient lentament. Es va diluir la mescla a 143 µL (per a una concentració final del precursor lineal de 10 µM i del motlle de 10 µM), ajustant les concentracions de Tris·HCl a 50 mM, de MgCl₂ a 10 mM, de DTT a 5 mM, d'ATP a 1 mM i d'enzim T4 DNA ligasa (Fermentas) a 1 U/µL i es va deixar reaccionant a 30°C durant 16 hores. Passades les 16 hores, es va parar la reacció escalfant-la a 70°C durant 15 minuts, es va liofilitzar el contingut i es va dessalar amb un cartutx NAP-5 i es va analitzar per EM-ESI, observant la massa de l'oligonucleòtid cíclic **59** ($M_{\text{calc}}=13712$, $M_{\text{exp}}=13712$), entre d'altres, com la del precursor lineal **52** fosforilat ($M_{\text{calc}}=13730$, $M_{\text{exp}}=13731$) o la del subproducte AppRNA format ($M_{\text{calc}}=14060$; $M_{\text{exp}}=14059$).

3.3.5.3 Desprotecció del 42mer cíclic 59

Es van liofilitzar 2 OD₂₆₀ del precursor lineal **52** en un tub de microcentrífuga i es va fosforilar i ciclar en uns volums de 400 i 570 µL, respectivament, seguint el protocol descrit en l'apartat anterior. Un cop dessalat el cru de ciclació amb NAP-5 es va dividir en dues fraccions d'1 OD₂₆₀ i es van liofilitzar totes dues en tubs de microcentrífuga.

Sobre la primera meitat es van afegir 20 µL d'una solució 3.1 mM de [Pd(PPh₃)₄] en THF preparada just abans d'utilitzar-la, 20 µL d'una solució 31 mM de (PPh₃)₄ en THF, 20 µL d'una solució 124 mM de HCOOH/*n*BuNH₂ (1:1), 62 µL d'H₂O i 2 µL de THF. Es va deixar reaccionant a 65°C durant 2 hores, es va dessalar amb un cartutx NAP-5 i es va analitzar per EM-ESI, no observant-se cap massa que no es correspongués al motlle **23** o als seus derivats (fosforilat o AppDNA).

Aquest assaig de desprotecció es va repetir dissolent el producte un cop dessalat amb 100 µL d'una solució de dtc 2 mg/mL. Aquesta dissolució es va tornar a dessalar amb un cartutx NAP-5 i a analitzar per EM-ESI, no observant-se cap diferència apreciable respecte l'espectre obtingut en l'assaig anterior.

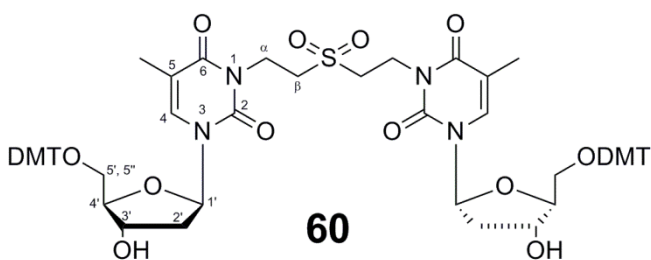
4 Síntesi d'oligodesoxiribonucleòtids

entrecreuats

4.1 Entrecreuament de timidines

4.1.1 Obtenció del dinucleòsid de DMT-T entrecreuada 60

En un baló de 25 mL assecat a l'estufa es van pesar 3.00 g (5.51 mmol, 2.22 eq) de DMT-timidina i es van suspendre en 12 mL de ACN anhidre. Es va escalfar el baló de reacció a 50°C i, un cop dissolt el nucleòsid, es van afegir 250 µL (2.48 mmol, 1 eq) de divinilsulfona i 125 µL (0.50 mmol, 0.2 eq) de PBU₃ i es va deixar agitant a 50°C durant tota la nit sota atmosfera d'argó. Finalitzada la reacció, es va eliminar el dissolvent a pressió reduïda i el residu obtingut es va purificar per cromatografia en columna de gel de sílice eluint amb DCM/MeOH/TEA 98:0:2, usant quantitats creixents de MeOH (de 98:0:2 a 95:3:2). Un cop evaporades les fraccions es van obtenir 2.54 g de producte (rendiment del 85%).



Caracterització: Sòlid blanc; **P_f**: 150-153°C; **R_f**: 0.54 (DCM/MeOH 96:4); **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.53 (d, *J*=1.1 Hz, 1H, H6), 7.34–7.12 (m, 9H, Ar-DMT), 6.79–6.70 (m, 4H, Ar-DMT), 6.31 (dd, *J*=7.2, 6.2 Hz, 1H, H1'), 4.49 (dt, *J*=6.2, 3.1 Hz, 1H, H3'), 4.41–4.27 (m, 2H, CH₂α), 3.98

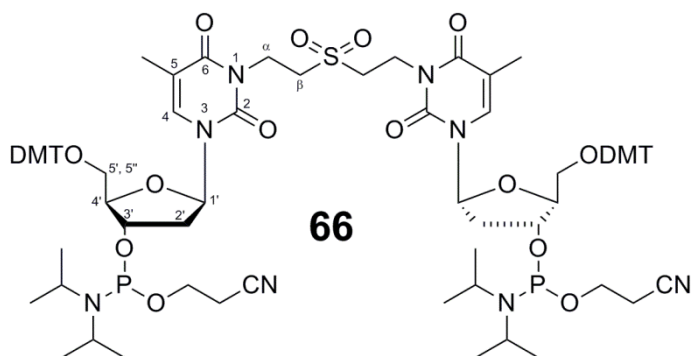
(q, *J*=3.0 Hz, 1H, H4'), 3.71 (s, 6H, OMe), 3.52–3.43 (m, 2H, CH₂β), 3.40 (dd, *J*=10.5, 3.1 Hz) i 3.28 (dd, *J*=10.5, 3.0 Hz) (2H, H5',5''), 2.37 (ddd, *J*=13.5, 5.9, 3.3 Hz) i 2.30–2.20 (m) (2H, H2' i H2''), 1.40 (d, *J*=0.7 Hz, 3H, CH₃); **¹³C NMR** (101 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 162.13 (C4), 157.70 (Ar-DMT), 149.60 (C2), 143.27, 134.38 i 134.31 (Ar-DMT), 133.23 (C6), 129.05, 127.11, 126.99, 126.12 i 112.27 (Ar-DMT), 109.19 (C5), 85.91, 85.06 i 84.54 (C1', C4' i Ar-DMT), 71.10 (C3'), 62.44 (C5'), 54.25 (OMe), 48.11 (CH₂β), 40.10 (C2'), 34.00 (CH₂α), 11.46 (CH₃); **HRMS** *m/z*: 1224.4846 [M+NH₄⁺]⁺; (M_{calc} C₆₆H₇₄N₅O₁₆S⁺=1224.4846).

4.1.2 Estudi de l'estabilitat de la unió dietilsulfona enfront bases nucleòfiles

Tots els assaigs d'estabilitat es van dur a terme amb 3 mg del dinucleòsid **60** descrit en l'apartat 4.1.1, el qual es va dissoldre en 1.5 mL de la solució bàsica que es volia avaluar (AMA o bé K_2CO_3 0.05 M en MeOH). La reacció es va deixar avançar a la temperatura elegida (temperatura ambient o $65^\circ C$), agafant de cada solució alíquotes de 10 μL a les 1 h, 2 h, 6 h i 24 h, així com als 30 min en el cas de l'AMA a $65^\circ C$. Les alíquotes es van neutralitzar amb 10 μL de TEAA 2 M a pH=7 i es van analitzar per HPLC en fase inversa usant una columna Kromasil de 10 μm , emprant un gradient del 60 al 85% de B en 20 min (A: TEAA 0.05 M, B: ACN).

4.1.3 Obtenció del derivat bisamidit de la DMT-T entrecreuada **66**

En un baló de 10 mL assecat a l'estufa es van pesar 1.96 g (1.62 mmol, 1 eq) del dinucleòsid **60** i es van dissoldre en 25 mL de DCM anhidre. Es van afegir 1.15 mL (6.59 mmol, 4 eq) de DIPEA sota atmosfera d'argó i es va deixar agitant durant 5 minuts. Es va addicionar 1.00 g (4.22 mmol, 2.6 eq) de 2-cianoetil *N,N*-diisopropilclorofosfina a la mescla de reacció i, un cop purgada amb argó, es va deixar reaccionant durant 2.5 hores. Es va diluir el contingut del baló amb 100 mL de DCM i es va rentar amb $NaHCO_3$ al 10% (3x100 mL). Es van ajuntar les fraccions orgàniques, es van assecar amb $MgSO_4$ anhidre i es va eliminar el dissolvent a pressió reduïda. El residu es va purificar per cromatografia en columna de gel de sílice eluint amb Hexà/AcOEt/TEA 48:50:2, usant quantitats creixents de AcOEt (de 48:50:2 a 28:70:2). Un cop evaporades les fraccions i precipitades sobre hexà fred es van obtenir 2.00 g de producte (rendiment del 77%).



Caracterització: Sòlid blanc; R_f : 0.74 (AcOEt/Hexà 7:3); 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.67 i 7.63, (2d, $J=4$ Hz, 1H, H6), 7.41–7.23 (m, 9H, Ar-DMT), 6.85–6.6.82 (m, 4H, Ar-DMT), 6.39 (q, $J=8$ Hz, 1H, H1'), 4.67–4.61 (m, 1H, H3'), 4.17 i 4.13 (2q, $J=4$ Hz, 1H, H4'), 4.46–4.41 (m, 2H, $CH_2\alpha$), 3.79 (s, 6H, OMe), 3.82–3.69 (m, 2H, $CH_2\alpha'$), 3.63–3.47 (m, 4H, $CH_2\beta$, CH 1Pr), 3.33–3.28 (m, 2H, H5' i H5''),

2.62 (t, $J=6$ Hz) i 2.41 (t, $J=6$ Hz) (2H, CH₂β'), 2.57-2.46 (m) i 2.37-2.30 (m) (2H, H2' i H2''), 1.43 (d, $J=2$ Hz, 3H, CH₃), 1.17, 1.16 i 1.05 (3d, $J=4$ Hz, 12H, CH₃ ⁱPr); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 163.33 (C4), 158.88 (Ar-DMT), 150.74 (C2), 144.39, 133.52 i 133.46 (Ar-DMT), 134.36 (C6), 130.34, 128.41, 128.13, 127.28 i 113.40 (Ar-DMT), 110.46 (C5), 87.04 (C1'), 85.84, 84.65 (C4', Ar-DMT), 73.23 (C3'), 63.28 (C5'), 58.56 (CH₂α'), 55.43 (OMe), 49.06 (CH₂β), 43.43 (CH ⁱPr), 40.40 (C2'), 35.22 (CH₂α), 24.75 (CH₃ ⁱPr), 20.53 (CH₂β'), 12.55 (CH₃); ³¹P NMR (121 MHz, CDCl₃): 148.95, 148.93 i 148.49 (3 estereoisòmers); HRMS m/z : 1624.6958 [M+NH₄⁺]⁺; (M_{calc} C₈₄H₁₀₈N₉O₁₈P₂S⁺=1624.7003).

4.2 Obtenció d'oligonucleòtids entrecreuats amb la unió dietilsulfona

4.2.1 Protocol general d'obtenció d'oligonucleòtids entrecreuats amb la unió dietilsulfona

L'elongació de la cadena nucleotídica dels diferents oligonucleòtids entrecreuats sintetitzats es va dur a terme de forma automàtica, seguint un cicle de síntesi detallat en la *TAULA 4.1*, a partir de nucleotidil-resines comercials i a escala d'1 μmol, si no s'indica el contrari. La síntesi va tenir lloc en reactors de tefló (columnes) de la mida adequada, on es va pesar la quantitat de resina necessària.

Els derivats fosforamidits comercials dels diferents DMT-nucleòsids emprats durant la síntesi dels oligonucleòtids empraven estratègia de protecció *Ultra-Mild* per bloquejar les diferents posicions reactives de les nucleobases (Ac en el cas de la desoxicitidina, Pac en el de la desoxiadenosina i ⁱPrPac quan es tractava de la desoxiguanosina). Els diferents fosforamidits, subministrats per Glen Research, van ser dissolts en ACN anhidre i usats en una concentració de 0.1 M per tal de dur a terme la síntesi. Pel que fa al bisamidit **66**, es va dissoldre en benzè anhidre i es va liofilitzar per tal d'eliminar traces d'aigua, repetint el procés un mínim de dos cops. Si no s'indica el contrari, es va dissoldre en ACN anhidre i es va usar en una concentració de 0.03 M. El temps d'acoblament del bisamidit es va allargar fins als 10 minuts. Com a agent acoblant es va utilitzar tetrazole 0.45 M en ACN, mentre que com a agent oxidant es va usar una solució de I₂ 0.1 M en piridina/H₂O. Per la seva banda, a l'usar estratègia *Ultra-Mild* va ser necessari emprar Pac₂O com a agent de *Capping A*. En tots els casos es va mantenir el grup DMT en l'extrem 5' terminal per tal de facilitar la posterior purificació per HPLC en fase inversa.

Etapa	Operació	Dissolvent/Reactiu	Temps (s)
1	Rentat	DCM	25
2	Destritilació	TCA 3% en DCM	110
3	Rentat (x2)	ACN	35
		Argó	35
4	Acoblament (x2)*	0.1 M fosforamidit en ACN	60*
		0.45 M tetrazole en ACN	
5	Rentat	ACN	5
6	Acetilació	Pac ₂ O/NMI	25
7	Rentat	ACN	5
8	Oxidació	I ₂ 0.1 M en py/H ₂ O	30
9	Rentat (x2)	DCM	40
		ACN	40

Taula 4.1. Cicle de síntesi usat en l'elongació de la cadena oligonucleotídica durant la síntesi dels oligonucleòtids de DNA entrecreuats amb la unió dietilsulfona. El temps es correspon al temps d'entrada de reactiu/dissolvent a la columna o bé al temps d'entrada + el temps d'espera. *En el cas de l'acoblament del bisamidit **66** la concentració usada ha sigut de 0.03 M i el temps d'espera en la columna de 600 s.

Un cop finalitzada la síntesi, la resina es va assecar bé amb un corrent d'argó i es va transvasar a un vial de desancoratge. Es va afegir 1 mL d'una solució de K₂CO₃ 0.05 M en MeOH i es va deixar reaccionant a temperatura ambient durant 16 hores. Passat aquest temps, es va neutralitzar amb 1 mL de TEAA 2 M a pH=7, es va filtrar el contingut a través d'una pipeta Pasteur reblida amb llana de vidre i, finalment, es va filtrar amb l'ajuda d'una xeringa i d'un filtre de nylon de 0.45 µm per eliminar l'excés de sals del medi.

El cru de desancoratge es va purificar directament per HPLC semipreparatiu, usant una columna Jupiter de Phenomenex, amb un gradient del 10 al 90% de B en 30 min (A: TEAA 0.1 M, B: ACN/H₂O 1:1) i un flux de 4 mL/min. Es van col·lectar dues fraccions diferents, una amb un t_R~24 min i una altra amb t_R~26 min, les quals es van caracteritzar per EM-ESI per tal d'identificar els productes 3/4 i 4/4. Sobre les fraccions col·lectades es va afegir AcOH fins a una concentració del 3%, es va deixar reaccionant durant 30 min a temperatura ambient per tal d'eliminar el grup DMT i es va liofilitzar. En el cas que la puresa no fos l'adequada, es va tornar a purificar l'oligonucleòtid per HPLC semipreparatiu en fase inversa, usant un gradient del 15 al 45% de B en 30 min (A: TEAA 0.05 M, B: ACN/H₂O 1:1) i un flux de 4 mL/min. Un cop comprovat que la puresa de les diferents fraccions obtingudes era suficientment alta, es va eliminar el catió DMT⁺ per extracció amb Et₂O.

4.2.2 Obtenció de l'undecàmer d(GCTCGTTCGAGC) entrecreuat 67

Per tal de dur a terme la síntesi del d(GCTCGTTCGAGC) entrecreuat 67 es va pesar 1 µmol de desoxicitidina-resina comercial en un reactor de tefló. L'elongació de la seqüència oligonucleotídica, el desancoratge, la desprotecció i la purificació del dúplex es van portar a cap seguint el procediment descrit en l'apartat 4.2.1. Un cop purificat es van obtenir 13 OD₂₆₀ de l'oligonuclètid 4/4 67 (rendiment del 13%) i 8 OD₂₆₀ de la barreja d'oligonucleòtids 3/4 68 i 69 (rendiment del 5%). El dúplex entrecreuat 67 es va caracteritzar per EM-MALDI-TOF en mode negatiu ($[M-2H^++K^+]_{\text{calc}}=6817$; $[M-2H^++K^+]_{\text{exp}}=6818$) i per digestió enzimàtica, el resultat es mostren en la TAULA 2.2 del Bloc 2 de la Part Teòrica.

Una segona síntesi d'aquesta seqüència a una escala 2x1 µmol va permetre obtenir 19 OD₂₆₀ del dúplex 4/4 (rendiment del 10%) i 35 OD₂₆₀ de la barreja d'oligonucleòtids 3/4 68 i 69 (rendiment del 11%).

4.2.3 Obtenció de l'undecàmer d(GCTGCTIGGCTGC) entrecreuat 70

Per tal de dur a terme la síntesi del d(GCTGCTIGGCTGC) entrecreuat 70 es van pesar 2x1 µmol de desoxicitidina-resina comercial en sengles reactor de tefló. L'elongació de la seqüència oligonucleotídica, el desancoratge, la desprotecció i la purificació del dúplex es van portar a cap seguint el procediment descrit en l'apartat 4.2.1. Un cop purificat, es van obtenir 45 OD₂₆₀ de l'oligonuclètid 4/4 70 (rendiment del 17%), el qual es va caracteritzar per EM-MALDI-TOF en mode negatiu ($[M-H^++Na^+]_{\text{calc}}=6789$, $[M-H^++Na^+]_{\text{exp}}=6788$). Els resultats de la digestió enzimàtica del dúplex 70 es mostren en la TAULA 2.3 del Bloc 2 de la Part Teòrica.

4.3 Estudi de les propietats dels oligonucleòtids entrecreuats

4.3.1 Reversibilitat de l'entrecreuament

Tots els assaigs de trencament de la unió dietilsulfona es van dur a terme de la mateixa manera. Es van liofilitzar 0.2 OD₂₆₀ del dúplex entrecreuat **67** en un tub de microcentrífuga, es van dissoldre en 100 µL de la solució que es volia avaluar i es van posar a reaccionar a 65°C durant el temps elegit. Passat aquest temps, es va neutralitzar la solució amb 2 vol (200 µL) de AcOH 10%, es va liofilitzar i es va analitzar emprant el mètode escollit.

En primer lloc es va avaluar la capacitat de trencament de la unió de l'AMA i del K₂CO₃ 0.05 M en MeOH a les 8 i a les 24 h, analitzar el resultat per PAGE (3 h, 700V). Els resultats es mostren en la *FIGURA 2.9* del Bloc 2 de la Part Teòrica.

En segon lloc es va avaluar el K₂CO₃ 0.05 M en MeOH a les 4, 8, 16, 24 i 48 h, analitzar el resultat per HPLC en fase inversa usant una columna Kromasil de 10 µm, amb un gradient del 10 al 40% de B en 30 min (A: TEAA 0.05 M, B: ACN/H₂O 1:1). Els resultats es mostren en la *FIGURA 2.10* i la *TAULA 2.4* del Bloc 2 de la Part Teòrica. Els diferents pics es van col·lectar i es van caracteritzar mitjançant EM-MALDI-TOF en mode negatiu (*TAULA 4.2*).

Oligonucleòtid	M _{calc} (uma)	M _{exp} (uma)
67	6780	6781
72	3330	3331
73	3481	3481

Taula 4.2. Taula resum de les masses (calculades i obtingudes experimentalment) del dúplex entrecreuat **67** i dels seus productes de trencament **72** i **73**.

En tercer lloc es va voler avaluar la influència de l'ús d'*scavengers* en la velocitat de reacció. Es va afegir un 10% v/v de CH₃NO₂ o de piperidina a la solució de K₂CO₃ 0.05 M en MeOH i es va deixar avançar la reacció durant 24 hores. Passat aquest temps es va analitzar el resultat per HPLC en fase inversa emprant les condicions anteriorment descrites. En el cas de la piperidina la quantitat de dúplex entrecreuat **67** inalterat era del 13%. L'assaig que incorporava CH₃NO₂ no va ser possible analitzar-lo per HPLC en fase inversa, pel que es va analitzar per PAGE (3 h, 700V), no mostrant una millora respecte a l'assaig sense *scavenger*.

Finalment es va analitzar la influència de l'ús de microones. Es van liofilitzar 0.2 OD₂₆₀ de dúplex entrecreuat **67** en un tub de microones, es van dissoldre en 500 µL de K₂CO₃ 0.05 M en MeOH i es van deixar reaccionant a 60°C (temperatura màxima acceptada pel microones en el cas del MeOH) durant 24 hores. Passat aquest temps, es va neutralitzar la solució amb 2 vol (1 mL) de AcOH 10%, es va liofilitzar i es va analitzar per HPLC en fase inversa emprant les condicions anteriorment descrites. En aquest assaig la quantitat de dúplex entrecreuat **67** inalterat va ser del 14%.

4.3.2 Estudi de l'estabilitat tèrmica dels dúplexs entrecreuat

Totes les corbes de fusió realitzades es van dur a terme de la següent manera. En un tub de microcentrífuga es va liofilitzar la quantitat adequada de l'oligonucleòtid que es volia estudiar i es va redissoldre en 1 mL d'una solució 10 mM PIPES a pH=7, 100 mM NaCl i 10 mM MgCl₂ per tal d'obtenir una concentració de 2 µM. La mostra es va desnaturalitzar posant-la en un bany d'aigua a 95°C durant 10 minuts, refredant-la immediatament a 0°C durant 30 minuts per tal d'estructurar-la. El contingut del tub es va transvasar a una cubeta d'UV-Vis i es va enregistrar la corba de fusió de 15 a 95°C, augment la temperatura 0.5°C/min. En tots els casos es van dur a terme un mínim de 3 mesures.

4.3.2.1 Estabilitat tèrmica del dúplex d(GCTCGTCGAGC) entrecreuat

4.3.2.1.1 Obtenció dels 11mers lineals d(GCTCGTCGAGC) **72 i d(GCTCGACGAGC) **75****

L'oligonucleòtid lineal d(GCTCGTCGAGC) **72** havia sigut preparat anteriorment per en Carlos Rodergas en el seu Màster en Química Avançada. Es va comprovar la seva integritat per EM-MALDI-TOF i per HPLC en fase inversa amb un gradient del 10 al 40% de B en 30 min (A: TEAA 0.05 M, B: ACN/H₂O 1:1). L'oligonucleòtid es va emprar sense necessitar de cap tipus de repurificació.

L'oligonucleòtid lineal d(GCTCGACGAGC) **75** es va obtenir de forma anàloga a la descrita pel 18mer **23** preparat en l'apartat 3.2.2.1. L'única diferència va ser el mètode de purificació emprat, el qual va ser per HPLC semipreparatiu, usant una columna Jupiter de Phenomenex, amb un gradient del 10 al 60% de B en 30 min

(A: TEAA 0.1 M, B: ACN/H₂O 1:1) i un flux de 4 mL/min. Per tal d'eliminar el grup DMT es va afegir AcOH fins a una concentració del 3%, es va deixar reaccionant durant 30 min a temperatura ambient i es va liofilitzar. Un cop comprovada que la puresa de les diferents fraccions obtingudes era suficientment alta, es va eliminar el catió DMT⁺ del medi per extracció amb Et₂O. Es van obtenir 52 OD₂₆₀, el que correspon a un rendiment del 50%.

4.3.2.1.2 Corbes de desnaturalització tèrmica

Per tal d'enregistrar les corbes de fusió dels dúplex **67**, **74** i **76** es va seguir el procediment descrit a l'inici d'aquest apartat 4.3.2. Les diferents corbes obtingudes es van ajustar a una sigmoide i, a partir de l'equació de la mateixa, es va calcular la temperatura de fusió.

En el cas del dúplex **67**, la corba es va realitzar amb 0.4 OD₂₆₀ del dúplex entrecreuat **67**. La temperatura de fusió obtinguda va ser de 80.0±0.8°C.

Pel que fa al dúplex **74**, la corba es va mesurar emprant 0.2 OD₂₆₀ de l'oligonucleòtid lineal **72**. La temperatura de fusió obtinguda va ser de 57.4±1.6°C.

En el cas del dúplex **76**, la corba es va dur a terme emprant 0.1 OD₂₆₀ de l'oligonucleòtid lineal **72** i 0.1 OD₂₆₀ de l'oligonucleòtid lineal **75**. La temperatura de fusió obtinguda va ser de 59.6±0.4°C.

4.3.2.2 Estabilitat tèrmica del d(GCTGCIGCTGC) entrecreuat **70**

4.3.2.2.1 Obtenció de l'11mer lineal d(GCTGCTGCTGC)

En un tub de centrífuga es van liofilitzar 5 OD₂₆₀ del dúplex **70**, es van dissoldre en 2.5 mL de K₂CO₃ 0.05 M en MeOH i es van deixar reaccionant a 65°C durant 48 hores. Passat aquest temps, la solució es va neutralitzar amb 5 mL d'AcOH al 10% i es va liofilitzar. El residu obtingut es va redissoldre i purificar per HPLC semipreparatiu, usant una columna Jupiter de Phenomenex, amb un gradient del 15 al 45% de B en 30 min (A: TEAA 0.1 M, B: ACN/H₂O 1:1) i un flux de 4 mL/min. Es van obtenir 3.2 OD₂₆₀ de l'oligonucleòtid **77**.

4.3.2.2 Corbes de desnaturalització tèrmica

Per tal d'enregistrar les corbes de fusió dels dúplex **70** i **78** es va seguir el procediment descrit a l'inici d'aquest apartat 4.3.2. Les diferents corbes obtingudes es van ajustar a una sigmoide i, a partir de l'equació de la mateixa, es va calcular la temperatura de fusió.

En el cas del dúplex **70**, la corba es va realitzar amb 0.4 OD₂₆₀ del dúplex **70** entrecreuat. La temperatura de fusió obtinguda va ser de 65.5±1.2°C.

Pel que fa al dúplex **78**, la corba es va mesurar emprant 0.2 OD₂₆₀ de l'oligonucleòtid lineal **77** preparat en l'apartat anterior. En aquest cas no es va poder calcular una temperatura de fusió, ja que tot i enregistrar sis corbes diferents no va ser possible obtenir-ne dues amb un perfil similar.

4.3.3 Estudi de la conformació dels dúplexs entrecreuats

La preparació de les mostres per dur a terme els espectres de dicroisme circular dels dúplexs **67**, **74** i **76**, així com la dels dúplexs **70** i **78**, es va dur a terme de forma anàloga a la descrita en l'apartat 4.3.2 per preparar-les per tal d'enregistrar les seves corbes de fusió.

Els espectres de dicroisme circular es van enregistrar a 25°C, mesurant l'el·lipticitat al variar la λ de 320 a 220 nm. Per tal de representar els espectres, els valors d'el·lipticitat obtinguts es van convertir a el·lipticitat molar emprant la fórmula mostrada en l'apartat 2.4.3 del Bloc 2.

4.4 Exploració d'alternatives per l'obtenció de dúplexs entrecreuats

4.4.1 Intent d'entrecreuament d'oligonucleòtids en solució

Es van liofilitzar dues mostres de 0.2 OD₂₆₀ (19 nmol, 1 eq) de l'oligonucleòtid lineal **72** en sengles tubs de microcentrífuga. En cadascun dels tubs es van afegir 200 nmol (11 eq) de divinilsulfona dissolta en ACN i 4 nmol (0.2 eq) de la fosfina elegida, PBu₃ en un cas i TCEP en l'altre, dissolta en ACN o en H₂O, respectivament. Es va ajustar el volum de cada solució fins als 25 μ L de H₂O/ACN 1:1 i es va deixar

reaccionant a 65°C durant 24 hores. Passat aquest temps, es va liofilitzar el contingut dels tubs i es va analitzar per EM-MALDI-TOF i per HPLC en fase inversa, usant una columna Kromasil de 10 µm, amb un gradient del 10 al 40% de B en 30 min (A: TEAA 0.05 M, B: ACN/H₂O 1:1). En cap dels dos anàlisi no es va observar presència de cap producte d'entrecreuament.

4.4.2 Intent d'entrecreuament d'oligonucleòtids en fase sòlida

4.4.2.1 Síntesi de l'oligonucleòtid ancorat a resina

L'oligonucleòtid d(TCGAGC) **79** va ser sintetitzat a escala de síntesi de 2 µmol (2x1 µmol) seguint el protocol descrit en l'apartat 4.2.1. Al finalitzar la síntesi es va mantenir el grup DMT de l'extrem 5' terminal.

4.4.2.2 Assaigs d'entrecreuament de resines

Es van pesar 0.25 µmol de la resina amb l'oligonucleòtid ancorat (sintetitzat en l'apartat anterior) en una columna de síntesi d'oligonucleòtids. Amb l'ajuda de dues xeringues es van afegir 300 µL d'una solució que contenia divinilsulfona i PBU₃ en ACN anhidre, assegurant-nos que la resina quedés ben mullada, i es va deixar reaccionant durant 1 hora a 65°C. Passada aquesta hora, es van eliminar els reactius ajudant-nos d'un sistema de síntesi en fase sòlida, es va rentar amb ACN (5 x 5 mL) i es va assecar bé. La resina seguidament es va tractar amb 300 µL d'una solució que contenia PBU₃ en ACN anhidre de manera anàloga a la descrita anteriorment. Es va deixar evolucionar la reacció durant 4 hores a 65°C i, passat aquest temps, es van eliminar els reactius ajudant-nos d'un sistema de síntesi en fase sòlida i es va rentar amb ACN (5 x 5 mL). Aquests dos processos es van repetir diverses vegades. La quantitat de divinilsulfona i de PBU₃, així com el nombre de tractaments realitzats es detallen en els Assaig A-C.

Un cop finalitzada la reacció, i per tal de poder eliminar el grup DMT de l'extrem 5' terminal, les columnes que contenien les resines es van acoblar a un sistema de síntesi en fase sòlida, es van rentar amb DCM (2 x 5 mL) i, seguidament, es van tractar amb una solució de TCA al 3% en DCM fins que es va deixar d'observar una coloració taronja (un volum aproximat de 2-3 mL). Posteriorment es van tornar a rentar amb DCM (5 x 5 mL) i es van deixar assecar bé.

Per tal de dur a terme el desancoratge i desprotecció dels oligonucleòtids, es van transvasar les resines en sengles vials per tal de realitzar en cadascun un tractament amb 200 μL de K_2CO_3 0.05 M en MeOH a temperatura ambient 16 hores. Posteriorment es van afegir 2 volums (400 μL) de TEAA 2 M a pH=7, es van filtrar, es van diluir amb aigua Milli-Q i es van liofilitzar. Els residus es van redissoldre en H_2O Milli-Q i es van caracteritzar per EM-MALDI-TOF, analitzant-los també, en el cas de l'assaig C, per HPLC en fase inversa, usant una columna Kromasil de 10 μm , amb un gradient del 10 al 30% de B en 30 min (A: TEAA 0.05 M, B: ACN/ H_2O 1:1).

Assaig A

La primera de les solucions usades contenia 62.5 nmol (0.25 eq) de divinilsulfona i 12.5 nmol (0.05 eq) de PBU_3 , mentre la segona contenia 12.5 nmol (0.05 eq) de PBU_3 . El tractament d'entrecreuament es va repetir 3 vegades. L'anàlisi per EM-MALDI-TOF en mode negatiu va revelar una única massa que es corresponia a l'oligonucleòtid **79** ($[\text{M}-\text{H}^+]^-_{\text{calc}}=1790$; $[\text{M}-\text{H}^+]^-_{\text{exp}}=1791$).

Assaig B

La primera de les solucions usades contenia 100 nmol (0.4 eq) de divinilsulfona i 20 nmol (0.08 eq) de PBU_3 , mentre la segona contenia 20 nmol (0.08 eq) de PBU_3 . El tractament d'entrecreuament es va repetir 2 vegades. L'anàlisi per EM-MALDI-TOF en mode negatiu va revelar una única massa que es corresponia a l'oligonucleòtid **79** ($[\text{M}-\text{H}^+]^-_{\text{calc}}=1790$; $[\text{M}-\text{H}^+]^-_{\text{exp}}=1791$).

Assaig C

La primera de les solucions usades contenia 5 μmol (20 eq) de divinilsulfona i 1 μmol (4 eq) de PBU_3 , mentre la segona contenia 1 μmol (4 eq) de PBU_3 . El tractament d'entrecreuament es va repetir 3 vegades. L'anàlisi per EM-MALDI-TOF en mode negatiu va revelar, a més d'un pic majoritari corresponent a l'oligonucleòtid **79** ($[\text{M}-\text{H}^+]^-_{\text{calc}}=1790$; $[\text{M}-\text{H}^+]^-_{\text{exp}}=1790$), un petit pic que es corresponia a l'addició de dues metoxietil-vinilsulfones a l'oligonucleòtid **79** ($[\text{M}-\text{H}^+]^-_{\text{calc}}=2092$; $[\text{M}-\text{H}^+]^-_{\text{exp}}=2092$).

5 Dels oligonucleòtids entrecreuat als oligonucleòtids cíclics

5.1 Protocol de fosforilació i ciclació d'oligonucleòtids entrecreuat

5.1.1 Fosforilació d'oligonucleòtids entrecreuat

Es va liofilitzar la quantitat desitjada del dúplex entrecreuat que es pretenia fosforilar en un tub de microcentrífuga. Es va dissoldre en un volum adequat (per tal que la concentració del dúplex entrecreuat fos 10 μM) d'una solució que contenia també Tris·HCl 70 mM a pH=7.5, MgCl₂ 10 mM, DTT 5 mM, ATP a 0.5 mM i enzim T4 PNK (Fermentas) 0.13 U/ μL . Es va incubar la mescla de reacció a 37°C durant 1 hora. Passat aquest temps, es va escalfar el medi de reacció a 70°C durant 15 minuts per tal de parar la reacció i, si es desitjava, es van separar 0.1 OD₂₆₀ com a patró de fosforilació, que es van conservar liofilitzades. La mescla de fosforilació es va usar directament per tal de dur a terme la ciclació o bé es va dessalar mitjançant diàlisi contra H₂O Milli-Q.

5.1.2 Ciclació d'oligonucleòtids entrecreuat

Es va escalfar l'oligonucleòtid fosforilat (en la mescla de fosforilació) a 95°C durant 10 minuts i es va deixar tornar a temperatura ambient lentament. Es va diluir la mescla fins al volum adequat (per tal que la concentració de l'oligonucleòtid fos 6 μM), ajustant les concentracions de Tris·HCl a 50 mM, de MgCl₂ a 10 mM, de DTT a 5 mM, d'ATP a 1 mM i d'enzim T4 DNA ligasa (Fermentas) a 1 U/ μL . Es va deixar reaccionant a 30°C el temps desitjat i, passat aquest temps, es va escalfar el medi de reacció a 70°C durant 15 minuts per tal de parar la reacció. Els crús de ciclació es van analitzar per PAGE analític (750 V, 8 h) o bé es van purificar per PAGE preparatiu (750 V, 8 h).

5.2 Intent d'obtenció del 36mer cíclic 82

5.2.1 Síntesi del 18mer entrecreuat 80

Per tal de dur a terme la síntesi del d(TGCTGCTGCTGCTGCTGC) entrecreuat **80** es va pesar 1 μmol de desoxicitidina-resina comercial en un reactor de tefló. L'elongació de la seqüència oligonucleotídica es va dur a terme emprant el cicle de síntesi descrit en la *TAULA 4.1* i utilitzant derivats fosforamidits comercials, així com el bisamidit **66**.

El desancoratge, desprotecció i purificació es va portar a cap seguint el protocol descrit en l'apartat 4.2.1, purificant per HPLC semipreparatiu, usant una columna Jupiter de Phenomenex, amb un gradient del 5 al 60% de B en 30 min (A: TEAA 0.1 M, B: ACN) i un flux de 4 mL/min. El dúplex entrecreuat **80** va ser repurificat per HPLC semipreparatiu, usant una columna Jupiter de Phenomenex, amb un gradient del 20 al 30% de B en 30 min (A: TEAA 0.1 M, B: ACN/H₂O 1:1) i un flux de 4 mL/min. L'oligonucleòtid es va caracteritzar per EM-ESI ($M_{\text{calc}}=11064$, $M_{\text{exp}}=11065$) i es va quantificar per UV-Vis, obtenint-se 5.5 OD₂₆₀ de l'oligonucleòtid **80** (rendiment del 2%).

5.2.2 Assaigs de ciclació del 18mer entrecreuat 80

5.2.2.1 Fosforilació i ciclació del dúplex entrecreuat 80 a petita escala

La fosforilació del dúplex entrecreuat **80** es va dur a terme amb 0.4 OD₂₆₀ seguint el protocol descrit en l'apartat 5.1.1 (volum de reacció de 140 μL); es van separar 0.1 OD₂₆₀ com a patró de fosforilació. Els assaigs de ciclació es va realitzar amb 0.3 OD₂₆₀ d'acord amb el procediment descrit en l'apartat 5.1.2 (volum de reacció de 170 μL). Es van agafar alíquotes de 0.1 OD₂₆₀ a les 24, 48 i 72 hores. Les diferents mescles de reacció es van analitzar per PAGE analític.

5.2.2.2 Fosforilació i ciclació del dúplex entrecreuat 80 a gran escala

La fosforilació del dúplex entrecreuat **80** es va dur a terme amb 5 OD₂₆₀ seguint el protocol descrit en l'apartat 5.1.1 (volum de reacció de 1700 μL). La ciclació es va realitzar amb 5 OD₂₆₀ d'acord amb el procediment descrit en l'apartat 5.1.2 (volum de reacció de 2850 μL), deixant avançar la lligació durant 24 hores. Passat aquest temps, el

producte de ciclació es va purificar per PAGE preparatiu. L'oligonucleòtid es va extreure amb NaCl 0.2 M en agitació durant tota la nit i es va dialitzar contra aigua desionitzada. El residu es va quantificar, obtenint-se 0.5 OD₂₆₀, i es va analitzar per EM-ESI, no observant-se cap massa pròxima a la dels oligonucleòtids **80** o **81**.

5.3 Primer intent d'obtenció del 42mer cíclic 85

5.3.1 Síntesi del 21mer entrecreuat 83

Per tal de dur a terme la síntesi del d(TGCTGCTGCTGCTGCTGC) entrecreuat es va pesar 1 μmol de desoxicitidina-resina comercial en un reactor de tefló. L'elongació de la seqüència oligonucleotídica es va dur a terme emprant el cicle de síntesi descrit en la *TAULA 4.1* i utilitzant derivats fosforamidits comercials, així com el bisamidit **66**. La concentració d'aquest reactiu es va disminuir de 0.03 M a 0.025 M, per tal d'intentar incrementar la proporció del dúplex entrecreuat 4/4 enfront de la del dúplex incomplet 3/4.

El desancoratge, desprotecció i purificació es va portar a cap seguint el protocol descrit en l'apartat 5.2.1. Es va comprovar la puresa de l'oligonucleòtid purificat per PAGE analític (750 V, 8 h) i, posteriorment, es va repurificar per HPLC semipreparatiu, usant una columna Jupiter de Phenomenex, amb un gradient del 15 al 45% de B en 30 min (A: TEAA 0.1 M, B: ACN/H₂O 1:1) i un flux de 4 mL/min. L'oligonucleòtid es va caracteritzar per EM-ESI ($M_{\text{calc}}=12910$, $M_{\text{exp}}=12909$) i es va quantificar per UV-Vis, obtenint-se 16 OD₂₆₀ del dúplex **83** (rendiment del 5%).

5.3.2 Assaigs de ciclació del 21mer entrecreuat 83

5.3.2.1 Fosforilació i ciclació del dúplex entrecreuat 83 a petita escala

La fosforilació del dúplex entrecreuat **83** es va dur a terme amb 0.7 OD₂₆₀ d'acord amb el protocol descrit en l'apartat 5.1.1 (volum de reacció de 205 μL); es van separar 0.1 OD₂₆₀ com a patró de fosforilació. Es van realitzar dos assaigs de ciclació amb 0.3 OD₂₆₀ seguint el procediment descrit en l'apartat 5.1.2 (volum de reacció de 90 μL); en un d'ells es va afegir PEG 4000 fins a una concentració del 5%. Les reaccions es van deixar avançar a 30°C durant 16 hores i es van analitzar per PAGE analític (750 V, 8 h).

5.3.2.2 Fosforilació i ciclació del dúplex entrecreuat **83** a gran escala

La fosforilació del dúplex entrecreuat **83** es va dur a terme amb 8 OD₂₆₀ seguint el protocol descrit en l'apartat 5.1.1 (volum de reacció de 2350 µL). La ciclació es va realitzar d'acord amb el procediment descrit en l'apartat 5.1.2 (volum de reacció de 3920 µL), deixant avançar la lligació durant 16 hores.

Passades les 16 hores, es va parar la reacció i es van purificar els dos productes de ciclació formats (oligonucleòtids **86** i **87**) per PAGE preparatiu. Els oligonucleòtids es van extreure amb NaCl 0.2 M en agitació durant tota la nit i es van dialitzar contra aigua desionitzada.

Els residus es van quantificar, obtenint-se 1.8 OD₂₆₀ en el cas de l'oligonucleòtid **86** i 1.7 OD₂₆₀ en el del **87**. Ambdós productes es van analitzar per EM-ESI, no observant-se cap massa pròxima a la dels oligonucleòtids **83** o **84**.

5.3.2.3 Eliminació de la unió dietilsulfona dels oligonucleòtids **86** i **87**

Es va liofilitzar 1 OD₂₆₀ dels oligonucleòtids **86** i **87** en sengles tubs de microcentrífuga, es van dissoldre en 150 µL de K₂CO₃ 0.05 M en MeOH i es van deixar reaccionant a 65°C durant 48 hores. Passat aquest temps, ambdós crus es van neutralitzar amb 300 µL d'AcOH al 10%, es van diluir amb 1 mL d'H₂O i es van liofilitzar. Finalment, ambdós oligonucleòtids van ser dessalats emprant cartutxos NAP-5 i analitzats per PAGE (750 V, 8 h) i per EM-ESI, revelant-se la naturalesa tant de l'oligonucleòtid **86** i com del **87**. Amb aquest anàlisi també es van poder identificar els oligonucleòtids **88**, **89**, **90** i **91**.

5.3.2.4 Digestió amb fosfatasa alcalina de l'oligonucleòtid **86**

Es van liofilitzar 0.1 OD del dúplex **86** en un tub de microcentrífuga i es van dissoldre en 100 µL d'una solució que contenia 50 µL de Tris·HCl 0.1 M a pH=7.5, 10 µL de MgCl₂ 0.1 M i 1.5 µL de fosfatasa alcalina (1 U/µL). Es va deixar reaccionar a 37°C durant 16 hores, es va dessalar amb un cartutx NAP-5 i es va analitzar per EM-ESI, revelant-se únicament la massa del dúplex entrecreuat **86** ($M_{\text{calc}}=13729$, $M_{\text{exp}}=13729$).

5.4 Segon intent d'obtenció del 42mer cíclic 85

5.4.1 Síntesi del 21mer entrecreuat 92

Per tal de dur a terme la síntesi del d(CTGCTGCTGCTGCTGCTG) entrecreuat **92** es va pesar 1 μmol de desoxiguanosina-resina comercial en un reactor de tefló. L'elongació de la seqüència oligonucleotídica es va dur a terme emprant el cicle de síntesi descrit en la *TAULA 4.1* i utilitzant derivats fosforamidits comercials, així com el bisamidit **66**, la concentració del qual es va disminuir de 0.025 M a 0.015 M, per tal d'intentar incrementar encara més la formació del dúplex entrecreuat 4/4 enfront de la del dúplex incomplet 3/4.

El desancoratge, desprotecció i purificació es va portar a cap seguint el protocol descrit en l'apartat 5.2.1, no essent necessària la repurificació del producte per HPLC semipreparativa, eliminant el catió DMT⁺ per tractament amb AcOH al 10% i posterior extracció amb Et₂O (apartat 3.1.4). L'oligonucleòtid es va caracteritzar per EM-ESI ($M_{\text{calc}}=12910$, $M_{\text{exp}}=12910$) i es va quantificar per UV-Vis, obtenint-se 45 OD₂₆₀ del dúplex **92** (rendiment del 13%).

5.4.2 Assaigs de ciclació del 21mer entrecreuat 92

5.4.2.1 Fosforilació del dúplex entrecreuat 92

La fosforilació del dúplex entrecreuat **92** es va dur a terme amb 5 OD₂₆₀ seguint el protocol descrit en l'apartat 5.1.1 (volum de reacció de 1465 μL). Passada 1 hora, la reacció es va aturar i es va separar 0.1 OD₂₆₀ com a patró de fosforilació, que es va conservar liofilitzada. La resta del dúplex fosforilat es va dialitzar contra H₂O, obtenint-se 4.5 OD₂₆₀.

5.4.2.2 Assaigs de ciclació del dúplex entrecreuat 92 fosforilat

Per a dur a terme cada assaig de ciclació, es van liofilitzar tres fraccions de 0.15 OD₂₆₀ del dúplex entrecreuat **92** fosforilat que havíem dialitzat en 3 tubs de microcentrífuga. En cadascun d'ells es va afegir el medi tamponat en que tindria lloc la reacció, es van escalfar a 95°C durant 10 minuts i es van deixar tornar a temperatura ambient lentament. En cada assaig es van afegir la resta de components del medi de

ciclació que corresponguessin i es van deixar avançar les reaccions durant 16 hores a la temperatura indicada (TAULA 5.1).

	T4 DNA ligasa	EDC	BrCN
Volum (μL)	75	45	45
Dúplex entrecreuat 92 fosforilat (μM)	6	10	10
Tris·HCl pH=7.5 (mM)	50	-	-
MgCl₂ (mM)	10	20	-
DTT (mM)	5	-	-
ATP (mM)	1	-	-
T4 DNA ligasa (U/μL)	1	-	-
MES pH=6.0 (mM)	-	50	-
EDC (mM)	-	250	-
Imidazole (mM)	-	-	200
NiCl₂ (mM)	-	-	100
BrCN (mM)	-	-	100
Temperatura (°C)	30	4	4

Taula 5.1. Taula resum de les condicions usades en cada assaig de ciclació de l'oligonucleòtid **92**.

Passades les 16 hores es van aturar les diferents reaccions (escalfant a 70°C durant 15 minuts en el cas de la ciclació enzimàtica, liofilitzant directament les altres) i es van analitzar per PAGE analític (750 V, 8 h).

La reacció de ciclació enzimàtica es va repetir a major escala (4 OD, 1170 μL) emprant les mateixes condicions. El cru va ser dessalat amb un cartutx NAP-25 i analitzat per EM-ESI, observant-se 3 productes diferents corresponents al dúplex **92** fosforilat ($[M-6H^++6Na^+]_{calc}=13202$, $[M-6H^++6Na^+]_{exp}=13203$) i els producte de mono ($[M-6H^++6K^+]_{calc}=13531$, $[M-6H^++6K^+]_{exp}=13532$) i diadenilació ($[M-7H^++6Na^++K^+]_{calc}=13861$, $[M-7H^++6Na^++K^+]_{exp}=13862$).

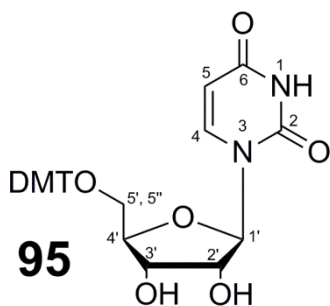
6 Síntesi d'oligoribonucleòtids entrecreuat

6.1 Entrecreuament d'uridines

6.1.1 *Obtenció de la DMT-UTM 96*

6.1.1.1 Síntesi de 5'-O-dimetoxitritil-uridina 95

En un baló de 100 mL, prèviament assecat a l'estufa i deixat temperar en un dessecador sota atmosfera d'argó, es van pesar 3.0 g (12.28 mmol, 1 eq) d'uridina i es van posar en un dessecador durant 4 hores. Paral·lelament, es van pesar 8 fraccions de 675 mg de DMT-Cl en 8 tubs de micricentrífuga de 2 mL (total de 5.4 g, 15.94 mmol, 1.3 eq), que també es van deixar al dessecador 4 hores. Passat aquest temps el nucleòsid es va dissoldre en 10 mL de piridina anhidra i es va coevaporar a pressió reduïda. Es van dur a terme dues coevaporacions més i es va dissoldre la uridina en 40 mL de piridina anhidra. Es va afegir la primera de les fraccions de DMT-Cl al baló de reacció i es va deixar agitant la solució tarongenca a temperatura ambient durant 10 minuts sota atmosfera d'argó. Passats els 10 minuts, es va afegir una segona fracció de DMT-Cl i es va tornar a deixar agitant a temperatura ambient durant 10 minuts, repetint-se el procés amb la resta de les fraccions de DMT-Cl. Un cop afegida aquesta darrera es va deixar reaccionant sota atmosfera d'argó a temperatura ambient durant 16 hores. Un cop acabada la reacció es va evaporar la piridina a pressió reduïda, es va dissoldre el residu en 25 mL de DCM lliure d'àcids i es va extreure amb àcid cítric al 10% (2x25 mL). Les fraccions orgàniques es van ajuntar, es van assecar amb MgSO₄ anhidre i es va eliminar el dissolvent a pressió reduïda. El residu es va purificar per cromatografia en columna de gel de sílice eluint amb DCM/TEA (99:1) i amb quantitats creixents de MeOH (de 99:1:0 a 91:1:8). Un cop evaporades les fraccions es van obtenir 5.2 g de producte (rendiment del 77%).

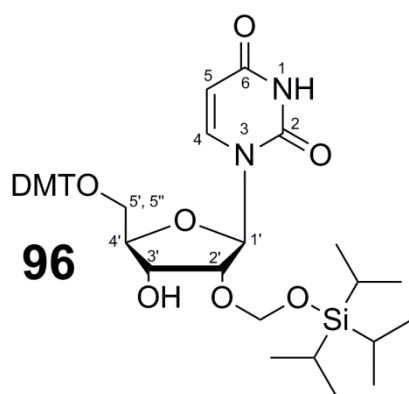


95

Caracterització: Sòlid blanc; **P_f**: 122-125°C; **R_f**: 0.50 (DCM/MeOH 9:1); **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.99 (d, *J*= 8.1 Hz, 1H, H6), 7.38-7.20 (m, 9H, Ar-DMT), 6.85-6.81 (m, 4H, Ar-DMT), 5.87 (d, *J*= 2.6 Hz, 1H, H1'), 5.36 (d, *J*= 8.1 Hz, 1H, H5), 4.42 (t, *J*= 5.6 Hz, 1H, H3'), 4.32 (dd, *J*= 5.1, 2.7 Hz, 1H, H2'), 4.20-4.17 (m, 1H, H4'), 3.78 (s, 6H, OMe), 3.50 (qd, *J*= 11.1, 2.5 Hz, 2H, H5' i H5''); **¹³C NMR** (101 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 164.08 (C4), 158.78 (Ar-DMT), 151.34 (C2), 144.50 (Ar-DMT), 140.62 (C6), 135.47, 135.28, 130.29, 130.22, 128.26, 128.11, 127.21 i 113.41 (Ar-DMT), 102.38 (C5), 90.37 (C1'), 87.12 (Ar-DMT), 83.78 (C4'), 75.53 (C2'), 69.87 (C3'), 62.07 (C5'), 55.35 (OMe); **HRMS** *m/z*: 569.1886 [M+Na⁺]⁺; (M_{calc} C₃₀H₃₀N₂NaO₈⁺=569.1894).

6.1.1.2 Síntesi de 5'-O-dimetoxitritil -2'-O-[(triisopropilsilixi)metil]-uridina **96**

En un baló de 25 mL es van pesar 650 mg (1.19 mmol, 1 eq) de la uridina **95** i es van deixar durant 2 hores al dessecador. El nucleòsid es va dissoldre en 5 mL de dicloretà sec i es va agitar sota atmosfera d'argó, amb un refrigerant de reflux, durant 10 minuts. Es van afegir 750 µL (4.30 mmol, 3.6 eq) de DIPEA, seguits de l'addició de 362 mg (1.19 mmol, 1 eq) de *n*-Bu₂SnCl₂ dissolts en dicloretà. *És imprescindible que el n-Bu₂SnCl₂ s'addicioni després de la DIPEA.* La reacció es va deixar avançar durant 1 hora a temperatura ambient i, tot seguit, durant 10 minuts a 80°C. Es van afegir 335 µL (1.55 mmol, 1.3 eq) de TOM-Cl (**49**) i es va deixar en agitació durant 15 minuts a 80°C. L'avenç de la reacció es va controlar per CCF (hexà/AcOEt 1:1), on els productes amb R_f≈0.9 i 0.8 es corresponen als isòmers 2'-O-TOM (**96**) i 3'-O-TOM (**97**), respectivament, essent majoritari el primer. La reacció es va diluir afegint 5 mL de DCM lliure d'àcids i es va extreure amb NaHCO₃ al 10% (2x25 mL). Les fraccions orgàniques es van ajuntar, es van assecar amb MgSO₄ anhidre i es va eliminar el dissolvent a pressió reduïda. El residu es va purificar per cromatografia en columna de gel de sílice eluint amb Hexà/AcOEt/TEA 58:40:2, usant quantitats creixents de AcOEt (de 58:40:2 a 48:50:2). Quan els dos isòmers s'havien eluït es va canviar l'eluent a DCM/MeOH/TEA (93:5:2) per tal de recuperar el producte de partida. Un cop evaporades les fraccions es van obtenir 223 mg d'isòmer 2'-O-TOM **96** (rendiment del 26%), així com 214 mg de l'isòmer 3'-O-TOM **97** (rendiment del 25%) i 122 mg del nucleòsid **95** (19%).



Caracterització: Sòlid blanc; **P_f:** 85-88°C; **R_f:** 0.60 (Hexa/AcOEt 1:1); **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8.11 (br.d, *J* = 12.4 Hz, 1H, NH), 7.94 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H6), 7.42–7.14 (m, 9H, Ar-DMT), 6.89–6.74 (m, 4H, Ar-DMT), 6.02 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H, H1'), 5.28 (dd, *J* = 8.2, 2.3 Hz, 1H, H5), 5.23 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H, OCH₂O), 5.03 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H, OCH₂O), 4.47 (dd, *J* = 11.0, 5.7 Hz, 1H, H3'), 4.27 (dd, *J* = 4.9, 3.6 Hz, 1H, H2'), 4.15–4.07 (m, 1H, H4'), 3.80 (s, 6H, OMe), 3.51 (d, *J* = 1.9 Hz, 2H, H5' i H5''), 3.16 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H, OH), 1.16–1.02 (m, 21H, ¹Pr₃Si); **¹³C NMR** (101 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 163.05 (C4), 158.83 (Ar-DMT), 150.20 (C2), 144.45 (Ar-DMT), 140.26 (C6), 135.45, 135.20, 130.31, 130.25, 128.29, 128.13, 127.28 i 113.42 (Ar-DMT), 102.34 (C5), 90.78 (OCH₂O), 87.96 (C1'), 87.26 (Ar-DMT), 83.80, 82.99 i 69.52 (C2', C3' i C4'), 62.26 (C5'), 55.38 (OMe), 17.93 i 12.00 (C¹Pr₃Si); **HRMS** *m/z*: 733.3531 [M+H]⁺; (M_{calc} C₄₀H₅₃N₂O₉Si⁺=733.3515).

6.1.2 Entrecreuament de la uridina 96 i síntesi del bisamidit 93

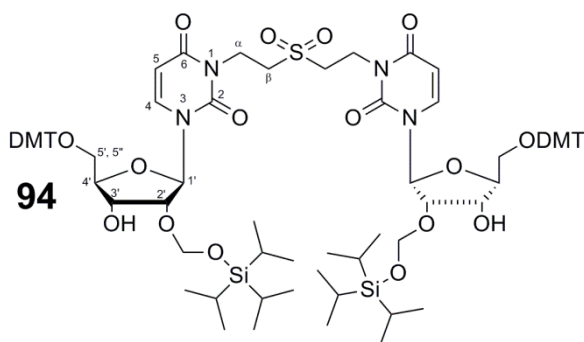
6.1.2.1 Entrecreuament de la uridina 95

En un baló de 10 mL assecat a l'estufa es van pesar 200 mg (0.37 mmol, 3 eq) de la 5'-*O*-uridina **95** i es van suspendre en 10 mL de ACN anhidre. Es va escalfar el baló de reacció a 50°C i, un cop dissolt el nucleòsid, es van afegir 12 μL (0.12 mmol, 1 eq) de divinilsulfona i 6 μL (0.024 mmol, 0.2 eq) de PBU₃ i es va deixar agitant a reflux durant 24 hores sota atmosfera d'argó. El cru es va analitzar per EM-MALDI-TOF, revelant-se de forma gairebé exclusiva la presència d'un senyal amb *m/z*=775. La reacció es va aturar eliminant el dissolvent a pressió reduïda i el residu obtingut es va purificar per cromatografia en columna de gel de sílice eluint amb DCM/acetona/TEA (94:5:1), usant quantitats creixents acetona (de 94:5:1 a 49:50:1). Un cop evaporades les fraccions es van obtenir 55 mg de producte. El producte purificat es va caracteritzar per NMR (¹H, ¹³C, HSQC, COSY) i per EM-ESI, obtenint-se en aquest últim cas un espectre anàleg al del cru.

El producte purificat es va analitzar per HPLC en fase inversa, usant una columna Kromasil i un gradient del 45 al 100% de B en 30 min (A: TEAA 0.05 M, B: ACN), i es va purificar posteriorment per HPLC semipreparatiu, usant una columna Jupiter de Phenomenex i un gradient del 45 al 90% de B en 30 min (A: TEAA 0.1 M, B: ACN) i un flux de 5 mL/min. L'anàlisi per EM-ESI en mode positiu del producte purificat mostrar el dinucleòsid **98** ([M+Na]⁺_{calc}=1233, [M+Na]⁺_{exp}=1233).

6.1.2.2 Obtenció de la uridina entrecreuada 94

En un baló de 10 mL assecat a l'estufa es van pesar 300 mg (0.41 mmol, 2 eq) de la uridina **94** i es van suspendre en 3 mL d'ACN anhidre. Al baló de reacció es van afegir 23 μ L (0.23 mmol, 1.1 eq) de divinilsulfona i 10 μ L (0.04 mmol, 0.2 eq) de PBU_3 . La solució grogosa formada es va deixar agitant sota atmosfera d'argó a temperatura ambient durant 24 hores. Un cop finalitzada la reacció, es va eliminar el dissolvent a pressió reduïda i el residu obtingut es va purificar per cromatografia en columna de gel de sílice eluint amb Hexà/DCM/TEA 50:49:1, usant quantitats creixents de DCM (de 50:49:1 a 47:52:1). Un cop evaporades les fraccions es van obtenir 220 mg de producte (rendiment del 69%).



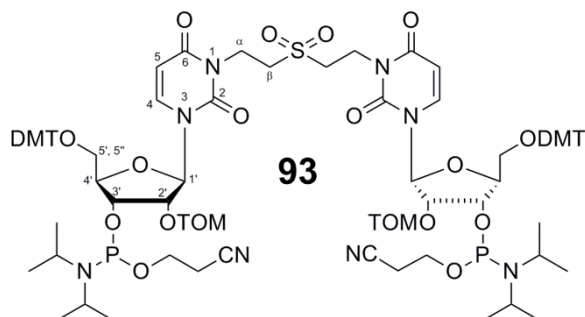
Caracterització: Sòlid blanc; P_f : 96-98°C; R_f 0.49 (DCM/AcOEt 9:1); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.96 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, H6), 7.40-7.20 (m, 9H, Ar-DMT), 6.86-6.82 (m, 4H, Ar-DMT), 6.01 (d, $J=2.8$ Hz, 1H, H1'), 5.33 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, H5); 5.24 (d, $J=4.8$ Hz, 1H) i 5.03 (d, $J=4.8$ Hz, 1H) (OCH_2O), 4.47-4.31 (m, 3H, H3' i $\text{CH}_2\alpha$), 4.26-4.23 (m, 1H, H2'), 4.15-4.07 (m, 1H, H4'), 3.79 (s, 6H, OMe), 3.63-3.43

(m, 4H, H5', H5'' i $\text{CH}_2\beta$), 3.24 (d, $J=6$ Hz, 1H, OH), 1.12-1.04 (m, 21H, ^iPr); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 162.19 (C4), 158.66 (Ar-DMT), 150.62 (C2), 144.31 (Ar-DMT), 138.45 (C6), 135.32, 135.06, 130.16, 130.11, 128.15, 127.97, 127.11 i 113.27 (Ar-DMT), 101.53 (C5), 90.82 (OCH_2O), 88.67 (C1'), 87.07 (Ar-DMT), 83.60, 83.31 i 69.15 (C2', C3' i C4'), 61.93 (C5'), 55.23 (OMe), 48.74 ($\text{CH}_2\beta$), 34.74 ($\text{CH}_2\alpha$), 17.78 i 11.84 (C ^iPr); **HRMS** m/z : 1600.7283 [$\text{M}+\text{NH}_4^+$] $^+$; (M_{calc} $\text{C}_{84}\text{H}_{114}\text{N}_5\text{O}_{20}\text{SSi}_2^+=1600.7311$).

6.1.2.3 Obtenció del bisamidit 93

En un baló de 10 mL assecat a l'estufa es van pesar 500 mg (0.32 mmol, 1 eq) del dinucleòsid **94** i es van dissoldre en 5 mL de DCM anhidre. Es van afegir 215 μ L (1.26 mmol, 4 eq) de DIPEA sota atmosfera d'argó i es va deixar agitant durant 20 minuts. Es van addicionar 250 mg (1.06 mmol, 3.3 eq) de 2-cianoetil N-diisopropilclorofosfina a la mescla de reacció i, un cop purgat amb argó, es va deixar reaccionant durant 3 hores. Es va diluir el contingut del baló amb 25 mL de DCM i es va rentar amb NaHCO_3 al 10% (3x25 mL). Es van ajuntar les fraccions orgàniques, es van assecar amb MgSO_4 anhidre i es va eliminar el dissolvent a pressió reduïda.

El residu es va purificar per cromatografia en columna de gel de sílice eluint amb Hexà/AcOEt/TEA 58:40:2, usant quantitats creixents de AcOEt (de 58:40:2 a 48:50:2). Un cop evaporades les fraccions i precipitades sobre hexà fred es van obtenir 350 mg de producte (rendiment del 56%).



Caracterització: Sòlid blanc; R_f : 0.79 (DCM/AcOEt 9:1); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.93 i 7.88 (2d, $J=8$ Hz, 1H, H6), 7.41-7.11 (m, 9H, Ar-DMT), 6.86-6.81 (m, 4H, Ar-DMT), 6.11-6.09 (m, 1H, H1'), 5.37 i 5.33 (2d, $J=8$ Hz, 1H, H5); 5.09-5.06 (m, 2H, OCH_2O), 4.45-4.26 (m, 4H, H2', H3' i $\text{CH}_2\alpha$), 4.21-4.18 (m, 1H, H4'), 3.97-3.88 i 3.85-3.75 (m, 2H, $\text{CH}_2\alpha$

CNE), 3.80, 3.79 (2s, 6H, OMe), 3.70-3.46 (m, 8H, CH^iPr , H5' i $\text{CH}_2\beta$), 3.43-3.37 (m, 1H, H5''), 2.63 (td, $J=6$, 4 Hz, 1H) i 2.40 (t, $J=6$ Hz, 1H) ($\text{CH}_2\beta$ CNE), 1.18-1.03 (m, 30H, CH_3^iPr); $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 162.27 (C4), 158.68 (Ar-DMT), 150.53 (C2), 144.17 (Ar-DMT), 138.60 (C6), 135.06, 130.22, 130.19, 128.26, 128.23, 127.97 i 127.12 (Ar-DMT), 117.72 (CN), 113.26 (Ar-DMT), 101.57 (C5), 89.38 (Ar-DMT), 88.29 (OCH_2O), 87.14 (C1'), 83.12 i 82.88 (C4', C2'), 70.27 (C3'), 61.99 (C5'), 58.77 ($\text{CH}_2\alpha$ CNE), 55.22 (OMe), 48.97 ($\text{CH}_2\beta$), 43.36, 43.23 i 43.10 (C ^iPr), 34.65 ($\text{CH}_2\alpha$), 24.61, 24.57 i 24.54 (C ^iPr), 20.46 ($\text{CH}_2\beta$ CNE), 17.83 i 11.93 (C ^iPr); $^{31}\text{P NMR}$ (121 MHz, CDCl_3): 150.32 i 150.19; **HRMS** m/z : 2000.9445 [$\text{M}+\text{NH}_4^+$] $^+$; ($\text{M}_{\text{calc}} \text{C}_{102}\text{H}_{148}\text{N}_9\text{O}_{22}\text{P}_2\text{SSi}_2^+ = 2000.9468$).

6.2 Intent de síntesi d'oligoribonucleòtids entrecreuats

6.2.1 Protocol d'obtenció d'oligoribonucleòtids entrecreuats amb la unió dietilsulfona

L'elongació de la cadena nucleotídica dels diferents oligoribonucleòtids entrecreuats sintetitzats es va dur a terme de forma automàtica, seguint un cicle de síntesi detallat en la *TAULA 6.1*, a partir de nucleotídl-resines comercials i a escala d'1 μmol , si no s'indica el contrari. La síntesi va tenir lloc en reactors de tefló (columnes) de la mida adequada, on es va pesar la quantitat de resina (subministrada per Glen Research) necessària.

Els derivats fosforamidits comercials dels diferents DMT-ribonucleòsids emprats durant la síntesi dels oligonucleòtids es trobaven protegits amb el grup TOM en l'hidroxil 2', mentre que el grup que bloquejava els aminos exocíclics de les diferents nucleobases era l'Ac. Els diferents fosforamidits van ser subministrats per Glen

Research i van ser dissolts en ACN anhidre i usats en una concentració de 0.1 M per tal de dur a terme la síntesi. Pel que fa al bisamidit **93**, es va dissoldre en benzè anhidre i es va liofilitzar per tal d'eliminar traces d'aigua, repetint el procés un mínim de dos cops. Es bisamidit es va dissoldre en ACN anhidre i es va usar en una concentració de 0.05 M o 0.1 M, segons s'indiqui. El temps d'acoblament del bisamidit es va allargar fins als 30 minuts. Com a agent acoblant es va utilitzar BTT 0.3 M en ACN, mentre que com a agent oxidant es va usar una solució de I₂ 0.1 M en piridina/H₂O. Per la seva banda, es va emprar Pac₂O com a agent de *Capping A*. En tots els casos es va mantenir el grup DMT en l'extrem 5' terminal per tal de facilitar la posterior purificació per HPLC en fase inversa.

Etapa	Operació	Dissolvent/Reactiu	Temps (s)
1	Rentat	DCM	40
2	Destritilació	TCA 3% en DCM	120
3	Rentat (x2)	ACN Argó	35 35
4	Acoblament (x2)*	0.1 M fosforamidit en ACN 0.3M BTT en ACN	5+600*
5	Rentat	ACN	10
6	Acetilació	Pac ₂ O/NMI	12+16
7	Rentat	ACN	10
8	Oxidació	I ₂ /H ₂ O 0.1 M en py	12+20
9	Rentat (x2)	DCM ACN	20 20

Taula 6.1. Cicle de síntesi usat en l'elongació de la cadena oligonucleotídica durant la síntesi dels oligonucleòtids d'RNA entrecreuat amb la unió dietilsulfona. El temps es correspon al temps d'entrada de reactiu/dissolvent a la columna o bé al temps d'entrada + el temps d'espera. *En el cas de l'acoblament del bisamidit **93** la concentració usada ha sigut 0.05 M o bé 0.1 M i el temps d'espera en la columna de 30 min.

6.2.2 Intent d'obtenció del dúplex entrecreuat r(GCUCGUCGAGC)

Per tal de dur a terme la síntesi del r(GCUCGUCGAGC) entrecreuat **103** es van pesar 2x1 µmol de citidina-resina comercial en un reactor de tefló. L'elongació de la seqüència oligonucleotídica es va dur a terme emprant el cicle de síntesi descrit en la *TAULA 6.1* i utilitzant derivats fosforamidits comercials, així com el bisamidit **93**. En el cas del bisamidit **93**, abans d'emprar-se es va liofilitzar en benzè anhidre dos cop i es va usar amb una concentració de 0.015 M. La incorporació del bisamidit **93**, però, va ser al voltant del 10%, estimada a partir de la quantificació del catió DMT⁺ alliberat després de l'acoblament, el que va provocar l'aturada automàtica de la síntesi.

6.2.3 Intent d'obtenció del dúplex entrecreuat r(GCUGCUGCUGC)

Per tal de dur a terme la síntesi del dúplex entrecreuat r(GCUGCUGCUGC) **104** es van pesar 2 cops 2x1 μmol de citidina-resina comercial en un reactor de tefló, corresponents a les síntesis A i B. L'elongació de la seqüència oligonucleotídica es va dur a terme emprant el cicle de síntesi descrit en la *TAULA 6.1* i utilitzant derivats fosforamidats comercials, així com el bisamidit **93**. En el cas del bisamidit **93**, abans d'emprar-se es va liofilitzar en benzè anhidre quatre cop i es va usar amb una concentració de 0.05 M en el cas de la síntesi A i 0.1 M en el de la B.

En el cas de la síntesi A, la incorporació del bisamidit **93** va tenir lloc de forma aparentment satisfactoria. En canvi, pel que fa a la síntesi B l'acoblament del bisamidit **93** va ser al voltant del 20%, estimada a partir de la quantificació del catió DMT⁺ alliberat després de la incorporació, el que va provocar l'aturada automàtica de la síntesi. Vam decidir reservar les resines de la síntesi B i continuar endavant amb les de la A.

Les resines de la síntesi A es van assecar bé amb un corrent d'argó i es van transvasar a un vial de desancoratge. Es va afegir 1.5 mL d'una solució de K_2CO_3 0.05 M en MeOH i es va deixar reaccionant a temperatura ambient durant 16 hores. Passat aquest temps, es va neutralitzar amb 1.5 mL de TEAA 2 M a pH=7, es va filtrar el contingut a través d'una pipeta Pasteur rebllida amb llana de vidre i es va evaporar a sequedat a pressió reduïda. El residu es va dissoldre amb 2 mL d'una solució de TBAF 1 M en THF i es va deixar reaccionant a 30°C durant 16 hores. Passat aquest temps, es va neutralitzar la solució de desancoratge amb 4 mL d'una solució de Tris·HCl 0.5 M a pH=7 i, finalment, es va filtrar amb l'ajuda d'una xeringa i d'un filtre de nylon de 0.45 μm per eliminar l'excès de sals del medi. A partir d'aquest moment es va fer servir material i reactius lliures de ribonucleases.

El cru de desprotecció es va purificar directament per HPLC semipreparatiu, usant una columna Jupiter de Phenomenex, amb un gradient del 10 al 60% de B en 30 min (A: TEAA 0.1 M, B: ACN) i un flux de 4 mL/min. Es van col·lectar tres fraccions diferents, una amb un $t_R \sim 24$ min (fracció 1), una altra amb $t_R \sim 26$ min (fracció 2) i el conjunt de pics amb un $t_R \sim 15$ min (fracció 3). Sobre les fraccions 1 i 2 es va afegir AcOH fins a una concentració del 3%, es va deixar reaccionant durant 30 min a temperatura ambient per tal d'eliminar el grup DMT i es va liofilitzar, juntament amb la

fracció 3. Les fraccions 1 i 2 es van redissoldre amb H₂O i es va eliminar el catió DMT⁺ per extracció amb Et₂O.

Les fraccions 1, 2 i 3 es van quantificar per UV-Vis, obtenint-se 0.8 OD₂₆₀ en els casos de les fraccions 1 i 2, i 7.5 OD₂₆₀ en el de la fracció 3. Posteriorment es van dessalar totes tres fraccions amb cartutxos NAP-10 i es van intentar caracteritzar per EM-ESI, no observant-se cap senyal que es correspongués a un oligonucleòtid.

Es va tornar a dur a terme la síntesi del dúplex entrecreuat r(GCUGCUGCUGC) **104** a escala 1 μmol (síntesi C). En aquest cas el bisamidit **93** es va usar amb una concentració de 0.05 M. El rendiment de l'acoblament del bisamidit, però, va ser al voltant del 20%, estimada a partir de la quantificació del catió DMT⁺ alliberat després de la incorporació, el que va provocar l'aturada automàtica de la síntesi. Vam decidir continuar la síntesi, comprovant que no es produïa un augment significatiu de la quantitat del catió DMT⁺.

D'altra banda, una de les resines de la síntesi B es va assecar bé amb un corrent d'argó i es va transvasar a un vial de desancoratge. Es va afegir 750 μL d'una solució de K₂CO₃ 0.05 M en MeOH i es va deixar reaccionant a temperatura ambient durant 16 hores. Passat aquest temps, es va neutralitzar amb afegir 750 μL de TEAA 2 M a pH=7, es va filtrar el contingut a través d'una pipeta Pasteur reblida amb llana de vidre i es va evaporar a sequedat a pressió reduïda. El residu es va dissoldre en 1 mL d'una barreja NMP/TEA/TEA·3HF (6:3:4) i es va escalfar a 65°C durant 2.5 h. Es va deixar que la mescla tornés a temperatura ambient i es va aturar la reacció afegint 2 volums (2 mL) de ⁱPrOSiMe₃. Es va agitar vigorosament uns 5 minuts, apareixent un precipitat, i es va diluir amb 5 volums (5 mL) de Et₂O. La suspensió resultant es va centrifugar durant 10 minuts a 5000 rpm i a 5°C i es va decantar el sobrenedant. Es va suspendre de nou el precipitat amb 5 mL de Et₂O i es va tornar a centrifugar i a decantar, repetint-se aquest procés una segona vegada. Finalment, es van evaporar les restes d'èter a pressió reduïda. El residu es va redissoldre en H₂O i es va dessalar amb un cartutx NAP-10. L'anàlisi del producte dessalat per EM-MALDI-TOF va mostrar de forma molt majoritària un senyal amb m/z=1543, corresponent al 5mer r(GCUGC) **105** ([M-H⁺]_{calc}=1543), així com un petit pic (amb una intensitat 1000 vegades menor) amb m/z=2212, que es corresponia al producte d'addició del bisamidit **93** per un dels seus fosforamidits a l'oligonucleòtid **105** ([M-H⁺]_{calc}=2212).

BIBLIOGRAFIA |

Bibliografia

- ¹ a) Ellegren, H. *Nature Rev. Gen.*, **2004**, *5*, 435-445
b) Kozlowski, P.; de Mezer, M.; Krzyżosiak, W. J. *Nucl. Acids Res.*, **2010**, *38*, 4027-4038
- ² Gur-Arie, R.; Hallerman, E. M.; Kashi, Y. et al. *Genome Res.*, **2000**, *10*, 62-71
- ³ Tóth, G.; Gáspári, Z.; Jurka, J. *Genome Res.*, **2000**, *10*, 967-981
- ⁴ International Human Genome Sequencing Consortium, *Nature* **2001**, *409*, 860-921
- ⁵ a) Pearson, C. E.; Edamura, K. N.; Cleary, J. D. *Nature Rev. Gen.*, **2005**, *6*, 729-742
b) Mirkin, S. M. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2006**, *16*, 351-358
c) Mirkin, S. M. *Nature* **2007**, *447*, 932-940
- ⁶ Ranum, L. P. W.; Cooper, T. A. *Annu. Rev. Neurosci.*, **2006**, *29*, 259-277
- ⁷ Cooper, T. A.; Wan, L.; Dreyfuss, G. *Cell*, **2009**, *136*, 777-793
- ⁸ a) Orr, H. T.; Zoghbi, H. Y. *Annu. Rev. Neurosci.*, **2007**, *30*, 575-621
b) La Spada, A. R.; Taylor, J. P. *Nature Rev. Gen.*, **2010**, *11*, 247-258
- ⁹ Cummings, C. J.; Zoghbi, H. Y. *Hum. Mol. Genet.*, **2000**, *9*, 909-916
- ¹⁰ Fleischer, B. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, **1918**, *96*, 91-133
- ¹¹ Zoghbi, H. Y.; Orr, H. Y. *Annu. Rev. Neurosci.*, **2000**, *23*, 217-247
- ¹² Perutz, M. F.; Johnson, T.; Suzuki, M.; Finch, J. T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1994**, *91*, 5355-5358
- ¹³ Shao, J.; Diamond, M. I. *Hum. Mol. Genet.*, **2007**, *16*, R115-R123
- ¹⁴ Ross, C. A.; Tabrizi, S. J. *Neurology*, **2011**, *10*, 83-98
- ¹⁵ a) Knight, S. J. L.; Flannery, A. V.; Hirst, M. C.; Campbell, L. et al. *Cell*, **1993**, *74*, 127-134
b) Coffee, B.; Zhang, F.; Warren, S. T.; Reines, D. *Nature Gen.*, **1999**, *22*, 98-101
- ¹⁶ Patel, P. I.; Isaya, G. *Am. J. Hum. Genet.*, **2001**, *69*, 15-24
- ¹⁷ a) Steinert, H. *Dtsch. Z. Nervenheilkd.*, **1909**, *37*, 58
b) Batién, F. E.; Gibb, H. P. *Brain*, **1909**, *32*, 187-205
- ¹⁸ Harper, P. S. *Myotonic Dystrophy*, W. B. Saunders, London, **2001**
- ¹⁹ Mathieu, J.; De Braekeleer, M.; Prévost, C. *Neurology*, **1990**, *40*, 839-840
- ²⁰ Ashizawa, T.; Epstein, H.F. *Lancet*, **1991**, *338*, 642-643
- ²¹ a) Machuca-Tzili, L.; Brook, D.; Hilton-Jones, D. *Muscle Nerve*, **2005**, *32*, 1-18
b) Gagnon, C.; Laberge, L.; Jean, S.; Mathieu, J. et al. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **2007**, *78*, 800-806
- ²² a) Thornton, C. A.; Griggs, R. C.; Moxley III, R. T. *Ann. Neurol.*, **1994**, *35*, 269-272
b) Finsterer, J. *Euro. J. Neurol.*, **2002**, *9*, 441-447
- ²³ a) Ranum, L. P. W.; Rasmussen, P. F.; Benzow, K.; Koob, M. D.; Day, J. W. *Nat. Genet.*, **1998**, *19*, 196-198
b) Day, J. W.; Roelofs, R.; Benzow, K.; Ranum, L. P. W. et al. *Neuromusc. Disord.*, **1999**, *9*, 19-27
- ²⁴ a) Bachinski, L. L.; Udd, B.; Thornton, C. A.; Harper, P. S. et al. *Am. J. Hum. Genet.*, **2003**, *73*, 835-848
b) Liquorim C. L.; Ricker, K.; Schoser, B. G.H.; Day, J. W.; Ranum, L. P. W. *Am. J. Hum. Genet.*, **2003**, *73*, 849-862
- ²⁵ Tishkoff, S. A.; Kidd, J. R.; Kidd, K. K. Et al. *Am. J. Hum. Genet.*, **1998**, *62*, 1389-1402
- ²⁶ a) Buxton, J.; Williamson, R.; Johnson, K. et al. *Nature*, **1992**, *355*, 547-548

- b) Brook, J. D.; Shaw, D. J.; Housman, D. E. et al. *Cell*, **1992**, *68*, 799-808
- c) Mahadevan, M.; Wieringa, B.; Korneluk, R. G. et al. *Science*, **1992**, *255*, 1253-1255
- ²⁷ Hamshere, M. G.; Harley, H.; Harper, P.; Brook, J. D.; Brookfield, J. F. Y. *J. Med. Genet.*, **1999**, *36*, 59-61
- ²⁸ Ricker, K.; Toyka, K. V.; Mueller, C. R. et al. *Neurology*, **1999**, *52*, 170
- ²⁹ Liquori, C. L.; Day, J. W.; Ranum, L. P. W. et al. *Science*, **2001**, *293*, 864-867
- ³⁰ Schneider, C.; Reiners, K.; Toyka, K. V. et al. *Neurology*, **2000**, *55*, 383-388
- ³¹ Bermúdez de León, M.; Cisneros, B. J. *Neurosci. Res.*, **2008**, *86*, 18-26
- ³² Carango, P.; Noble, J. E.; Marks, H. G.; Funanage, V. L. *Genomics*, **1993**, *18*, 340-348
- ³³ Jansen, G.; Hameister, H.; Wieringa, B. et al. *Nat. Genet.*, **1996**, *13*, 316-324
- ³⁴ Chen, W.; Udd, B.; Li, Y.-P. *J. Mol. Biol.*, **2007**, *368*, 8-17
- ³⁵ Llamusi, B.; Artero, R. *Curr. Genomics*, **2008**, *9*, 509-516
- ³⁶ a) Klesert, T. R.; Otten, A. D.; Bird, T. D.; Tapscott, S. J. *Nat. Genet.*, **1997**, *16*, 402-406
b) Thornton, C. A.; Wymer, J. P.; Simmons, Z.; McClain, C.; Moxley III, R. T. *Nat. Genet.*, **1997**, *16*, 407-409
- ³⁷ Klesert, T. R.; Soriano, P.; Tapscott, S. J. et al. *Nat. Genet.*, **2000**, *25*, 105-109
- ³⁸ Tapscott, S. J.; Thornton, C. A. *Science*, **2001**, *293*, 816-817
- ³⁹ a) Taneja, K. L.; McCurrach, M.; Schalling, M.; Housman, D.; Singer, R. H. *J. Cell Biol.*, **1995**, *128*, 995-1002
b) Margolis, J. M.; Schoser, B. G.; Moseley, M. L.; Day, J. W.; Ranum, L. P. W. *Hum. Mol. Genet.*, **2006**, *15*, 1808-1815
- ⁴⁰ Sobczak, K.; de Mezer, M.; Michlewski, G.; Krol, J.; Krzyżosiak, W. J. *Nuc. Acids. Res.*, **2003**, *31*, 5469-5482
- ⁴¹ Miller, J. W.; Thornton, C. A.; Swanson, M. S. et al. *EMBO J.*, **2000**, *19*, 4439-4448
- ⁴² Kino, Y.; Sasagawa, N.; Ishiura, S. et al. *Hum. Mol. Genet.*, **2004**, *13*, 495-507
- ⁴³ Warf, M. B.; Berglund, J. A. *RNA*, **2007**, *13*, 2238-2251
- ⁴⁴ a) Fardaei, M.; Larkin, K.; Brook, J. D.; Hamshere, M. G. *Nucl. Acids Res.*, **2001**, *29*, 2766-2771
b) Fardaei, M.; Harper, P. S.; Brook, J. D.; et al. *Hum. Mol. Genet.*, **2002**, *11*, 805-814
- ⁴⁵ Kanadia, R. N.; Hauswirth, W. W.; Swanson, M. S. et al. *Science*, **2003**, *302*, 1978-1980
- ⁴⁶ Pistoni, M.; Ghigna, C.; Gabellini, D. *RNA Biology*, **2010**, *7*, 441-452
- ⁴⁷ a) Wang, E. T.; Schroth, G. P.; Burge, C. B. et al. *Nature*, **2008**, *456*, 470-476
b) Pan, Q.; Shai, O.; Lee, L. J.; Frey, B. J.; Blencowe, B. J. *Nat. Genet.*, **2008**, *40*, 1413-1415
- ⁴⁸ Savkur, R. S.; Philips, A. V.; Cooper, T. A. *Nat. Genet.*, **2001**, *29*, 40-47
- ⁴⁹ Philips, A. V.; Timchenko, L. T.; Cooper, T. A. *Science*, **1998**, *280*, 737-741
- ⁵⁰ Timchenko, L. T.; Caskey, C. T.; Swanson, M. S. *Nucl. Acids Res.*, **1996**, *24*, 4407-4414
- ⁵¹ Kuyumcu-Martínez, N. M.; Wang, G.-S.; Cooper, T. A. *Mol. Cell*, **2007**, *28*, 68-78
- ⁵² Lin, X.; Swanson, M. S.; Thornton, C. A. et al. *Hum. Mol. Genet.*, **2006**, *15*, 2087-2097
- ⁵³ Lee, J. E.; Cooper, T. A. *Biochem. Soc. Trans.*, **2009**, *37*, 1281-1286
- ⁵⁴ a) O'Rourke, J. R.; Swanson, M. S. *J. Biol. Chem.*, **2009**, *284*, 7419-7423
b) Sicto, G.; Gourdon, G.; Gomes-Pereira, M. *Hum. Mol. Genet.*, **2011**, *20*, R116-R123
- ⁵⁵ Ebralidze, A.; Wang, Y.; Petkova, V.; Ebralidze, K.; Junghans, R. P. *Science*, **2004**, *303*, 383-387
- ⁵⁶ Rau, F.; Furling, D.; Charlet-Berguerand, N. et al. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **2011**, *18*, 840-845
- ⁵⁷ Krol, J.; Fiszer, A.; Krzyżosiak, W. J. et al. *Mol. Cell*, **2007**, *25*, 575-586
- ⁵⁸ a) Magaña, J. J.; Cisneros, B. J. *Neurosci. Res.*, **2010**, *89*, 275-285
b) Muntoni, F.; Wood, M. J. A. *Nature Rev. Drug Discov.*, **2011**, *10*, 621-637

- ⁵⁹ Mulders, S. A. M.; Wieringa, B.; Wansink, D. G. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2009**, *106*, 13915-13920
- ⁶⁰ Phylactou, L. A.; Darrah, C.; Wood, M. J. A. *Nature Gen.*, **1998**, *18*, 378-381
- ⁶¹ Langlois, M.-A.; Lee, N. S.; Rossi, J. J.; Puymirat, J. *Mol. Ther.*, **2003**, *7*, 670-680
- ⁶² Langlois, M.-A.; Rossi, J. J.; Lee, N. S. et al. *J. Biol. Chem.*, **2005**, *17*, 16949-16954
- ⁶³ Lee, J. E.; Bennet, C. F.; Cooper, T. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2012**, *109*, 4221-4226
- ⁶⁴ Wheeler, T. M.; Dirksen, R. T.; Thornton, C. A. et al. *Science*, **2005**, *325*, 336-339
- ⁶⁵ García-López, A.; Llamusi, B.; Orzáez, M.; Pérez-Payá, E.; Artero, R. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2011**, *108*, 11866-11871
- ⁶⁶ a) Lee, M. M.; Pushechnikov, A.; Disney, M. D. *ACS Chem. Biol.*, **2009**, *4*, 345-355
b) Pushechnikov, A. Lee, M. M.; Disney, M. D. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 9767-9779
c) Lee, M. M.; Childs-Disney, J. L.; Disney, M. D. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 17464-17472
- ⁶⁷ Arambula, J. F.; Ramisetty, S. R.; Baranger, A. M.; Zimmerman, S. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2009**, *106*, 16068-16073
- ⁶⁸ Warf, M. B.; Nakamori, M.; Matthys, C. M.; Thornton, C. A.; Berglund, J. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2009**, *106*, 18551-18556
- ⁶⁹ Wells, R. D.; Dere, R.; Hebert, M. L.; Napierala, M.; Son, L. S. *Nucl. Acids Res.*, **2005**, *33*, 3785-3798
- ⁷⁰ Mitas, M.; Chambers, E. J.; Haworth, I. S. *Nucl. Acids Res.*, **1995**, *23*, 1050-1059
- ⁷¹ Dere, R.; Napierala, M.; Ranum, L. P. W.; Wells, R. D. *J. Biol. Chem.*, **2004**, *279*, 41715-41725
- ⁷² Gacy, A. M.; Goellner, G.; Juranić, N.; Macura, S.; McMurray, C. T. *Cell*, **1995**, *81*, 533-540
- ⁷³ Fojtík, P.; Vorlíčková, M. *Nucl. Acids Res.*, **2001**, *29*, 4684-4690
- ⁷⁴ Sakamoto, N.; Griffith, J. D.; Wells, R. D. et al. *Mol. Cell*, **1999**, *3*, 465-475
- ⁷⁵ Potaman, V. N.; Benham, C. J.; Sinden, R. R. et al. *J. Mol. Biol.*, **2003**, *326*, 1095-1111
- ⁷⁶ a) Napierala, M.; Krzyżosiak, W. J. *J. Biol. Chem.*, **1997**, *272*, 31079-31085
b) Sobczak, K.; de Mezer, M.; Michlewski, G.; Krol, J.; Krzyżosiak, W. J. *Nucl. Acids Res.*, **2003**, *31*, 5469-5482
- ⁷⁷ Moore, H.; Greenwell, P. W.; Liu, C.-P.; Arnheim, N.; Petes, T. D.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1999**, *96*, 1504-1509
- ⁷⁸ Pearson, C. E.; Clearly, J. D.; Nichol, K. et al, *Nucl. Acids Res.* **2002**, *30*, 4534-4547
- ⁷⁹ a) Mariappan, S. V. S.; Garcia, A. E.; Gupta, G. *Nucl. Acids Res.* **1996**, *24*, 775-783
b) Petruska, J.; Arnheim, N.; Goodman, M. F. *Nucl. Acids Res.* **1996**, *24*, 1992-1998
- ⁸⁰ Amrane, S.; Saccà, B.; Mills, m.; Chauhan, M.; Klump, H. H.; Mergny, J.-L. *Nucl. Acids Res.* **2005**, *33*, 4065-4077
- ⁸¹ a) Mooers, B. H. M.; Logue, J. S.; Berglund, J. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2005**, *102*, 16626-16631
b) Kiliszek, A.; Kierzek, R.; Krzyżosiak, W. J.; Rypniewski, W. *Nucl. Acids Res.*, **2009**, *37*, 4149-4156
- ⁸² Riedel, K.; Leppert, J.; Ohlenschläger, O.; Görlach, Ramachandran, R. *J. Biomol. NMR*, **2005**, *31*, 331-336
- ⁸³ Parkesh, R.; Fountain, M.M Disney, M. D. *Biochemistry*, **2011**, *50*, 599-601
- ⁸⁴ Kumar, A.; Nettles, K. W.; Disney, M. D. et al. *Biochemistry*, **2011**, *50*, 9928-9935
- ⁸⁵ Watson, J.D.; Hopkins, N.H.; Roberts, J.W.; Steitz, J.A.; Weiner, A.M. *Molecular Biology of the Gene*, Benjamin/Cummings, **1987**, 193-195
- ⁸⁶ a) Hsu, c.J.; Dennis, D. *Nucl. Acids Res.*, **1982**, *10*, 5637-5647

- b) Ross, P.; Weinhouse, H.; Benziman, M. et al. *Nature*, **1987**, 325, 279-281
- ⁸⁷ a) Zamecnik, P.C; Stephenson, M.L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1978**, 75, 280-284
b) Dean, N.M.; Bennet, C.F. *Oncogene*, **2003**, 22, 9087-9096
c) Álvarez-Salas, L.M. *Curr. Top. Med. Chem.*, **2008**, 8, 1379-1404
d) Hammond, S.M.; Wood, M.J.A. *Trends Gen.*, **2011**, 27, 196-205
- ⁸⁸ a) Uhlmann, E.; Peyman, A. *Chem. Rev.*, **1990**, 90, 543-584
b) Maher III, L.J. *Cancer Invest.*, **1996**, 14, 66-82
c) Nimjee, S.M.; Rusconi, C.P.; Sullenger, B.A. *Annu. Rev. Med.*, **2005**, 56, 555-583
- ⁸⁹ a) Wickstrom, E. *J. Biochem. Biophys. Acta*, **1986**, 13, 97-102
b) Akhtar, S.; Kole, R.; Juliano, R.L. *Life Sciences*, **1991**, 49, 1793-1801
- ⁹⁰ a) Shaw, J.-P.; Kent, K.; Bird, J.; Fishback, J.; Froehler, B. *Nucl. Acids Res.*, **1991**, 19, 747-750
b) Demidov, V.V.; Sönnichsen, S.H.; Nielsen, P.E. et al. *Biochem. Pharmacol.*, **1994**, 15, 1310-1313
c) Graham, M.J.; Martin, M.J.; Crooke, S.T. et al. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1998**, 286, 447-458
d) Nielsen, P.E. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **1999**, 9, 353-357
- ⁹¹ a) Chu, B.C.F.; Orgel, L.E. *Nucl. Acids Res.*, **1992**, 20, 5857-5858
b) Yamakawa, H.; Abe, T.; Saito, T.; Takai, K.; Yamamoto, N.; Takaku, H. *Bioorg. Med. Chem.*, **1998**, 6, 1025-1032
- ⁹² a) Kool, E.T.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113, 6265-6266
b) Prakash, G.; Kool, E.T. *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 3523-3527
- ⁹³ a) Fire, A.; Xu, S.-Q. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **1995**, 92, 4641-4645
b) Daubendiek, S.L.; Ryan, K.; Kool, E.T. *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 7818-7819
c) Frieden, M.; Pedroso, E.; Kool, E.T. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1999**, 38, 3654-3657
- ⁹⁴ a) Lindström, U.M.; Hansma, H.G.; Kool, E.T. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2002**, 99, 15953-15958
b) Hartig, J.S.; Fernandez-Lopez, S.; Kool, E.T. *ChemBioChem*, **2005**, 6, 1458-1462
- ⁹⁵ a) Lizardi, P.M.; Huang, x.; Zhu, Z.; Bray-Ward, P.; Thomas, D.C.; Ward, D.C. *Nature Gen.*, **1998**, 19, 225-232
b) Schweitzer, B.; Lizardi, P.M.; Ward, D.C. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2000**, 97, 10113-10119
- ⁹⁶ a) Erie, D.A.; Jones, R.A.; Olson, W.K.; Sinha, N.K.; Breslauer, K.J. *Biochemistry*, **1989**, 28, 268-273
b) Ashley, G.W.; Kushlan, D.M. *Biochemistry*, **1991**, 30, 2927-2933
c) Rentzeperis, D.; Ho, J.; Marky, L.A. *Biochemistry*, **1993**, 32, 2564-2572
- ⁹⁷ a) Doktycz, M.J.; Goldstein, R.F.; Paner, T.M.; Gallo, F.J.; Benight, A.S. *Biopolymers*, **1992**, 32, 849-864
b) Amaratunga, M.; Snowden-Ifft, E.; Wemmer, D.E.; Benight, A.S. *Biopolymers*, **1992**, 32, 865-879
c) Paner, T.M.; Gallo, F.J.; Doktycz, M.J.; Benight, A.S. *Biopolymers*, **1993**, 33, 1779-1789
d) Owczarzy, R.; Vallone, P.M.; Goldstein, R.F.; Benight, A.S. *Biopolymers*, **1999**, 52, 29-56
e) Mandell, K.E.; Vallone, P.M.; Owczarzy, R.; Riccelli, P.V.; Benight, A.S. *Biopolymers*, **2006**, 82, 199-221
- ⁹⁸ Lin, C.-T.; Lyu, Y.L.; Liu, L.F. *Nucl. Acids Res.*, **1997**, 25, 3009-3016
- ⁹⁹ a) Prakash, G.; Kool, E.T. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1991**, 1161-1163
b) Rubin, E.; Kool, E.T. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1994**, 33, 1004-1007

- c) Wang, S.; Kool, E.T. *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, *116*, 8857-8858
- ¹⁰⁰ a) Leonard, G.A.; Zhang, S.; Hunter, W.N. et al. *Structure*, **1995**, *3*, 335-340
b) Salisbury, S.A.; Wilson, S.R.; Pedroso, E. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1997**, *94*, 551-5518
c) González, C.; Escaja, N.; Rico, M.; Pedroso, E. *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 2176-2177
d) Escaja, N.; Pedroso, E.; Rico, M.; González, C. *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 12732-12742
- ¹⁰¹ a) de Vroom, E.; Broxterman, H.J.G.; Sliedregt, L.A.J.M.; van der Marel, G.A.; van Boom, J.H. *Nucl. Acids Res.*, **1988**, *16*, 4607-4620
b) Vaman Rao, M.; Reese, C.B. *Nucl. Acids Res.*, **1989**, *17*, 8221-8239
c) Capobianco, M.L.; Carcuro, A.; Tondelli, L.; Garbesi, A.; Bonora, G.M. *Nucl. Acids Res.*, **1990**, *18*, 2661-2669
- ¹⁰² a) Barbato, S.; De Napoli, L.; Mayol, L.; Piccilli, G.; Santacroce, C. *Tetrahedron Lett.*, **1987**, *28*, 5727-5728
b) De Napoli, L.; Galeone, A.; Mayol, L.; Piccilli, G.; Santacroce, C. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1993**, 747-749
c) Alazzouzi, E.; Escaja, N.; Grandas, A.; Pedroso, E. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1997**, *36*, 1506-1508
d) Frieden, M.; Grandas, A.; Pedroso, E. *Chem. Commun.*, **1999**, 1593-1594
- ¹⁰³ a) Dolinnaya, N.G.; Sokolova, N.I.; Gryaznova, O.I.; Shabarova, Z.A. *Nucl. Acids Res.*, **1988**, *16*, 3721-3738
b) Li, T.; Liu, D.; Chen, J.; Lee, A.H.F.; Qi, J.; Chan, A.S.C. *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 12901-12902
c) Chen, J.; Liu, D.; Lee, A.H.F.; Qi, J.; Chan, A.S.C.; Li, T. *Chem. Commun.*, **2002**, 2686-2687
- ¹⁰⁴ a) Talhout, R.; Opperhuizen, A.; van Amsterdam, J.G.C. *Food Chem. Toxicol.*, **2006**, *44*, 1789-1798
b) Stevens, J.F.; Maier, C.S. *Mol. Nutr. Food Res.*, **2008**, *52*, 7-25
- ¹⁰⁵ a) Huang, H.; Hopkins, P.B. *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 9402-9408
b) Caulfield, J.L.; Wishnok, J.S.; Tannebaum, S.R. *Chem. Res. Toxicol.*, **2003**, *16*, 571-574
c) Stone, M.P.; Cho, Y.-J.; Rizzo, C.J. et al., *Acc. Chem. Res.*, **2008**, *41*, 793-804
- ¹⁰⁶ Sayre, L.M.; Zelasko, D.A.; Smith, M.A., et al. *J. Neurochem.*, **1997**, *68*, 2092-2097
- ¹⁰⁷ Yoritaka, A.; Hattori, N.; Ucida, K.; Tanaka, M.; Stadtman, E.R.; Mizuno, Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1996**, *93*, 2696-2701
- ¹⁰⁸ Napoli, C.; d'Armiento, F.P.; Palinski, W. et al., *J. Clin. Invest.*, **1997**, *100*, 2680-2690
- ¹⁰⁹ Grillari, J.; Katinger, H.; Voglauer, R. *Nucl. Acids Res.*, **2007**, *35*, 7566-7576
- ¹¹⁰ a) Rajski, S.R.; Williams, R.M. *Chem. Rev.*, **1998**, *98*, 2723-2795
b) Efimov, V.A.; Fedyunin, S.V. *Biochemistry (Moscow)*, **2010**, *75*, 1606-1627
- ¹¹¹ Ross, W.P.; Kaina, B. *Trends Mol. Med.*, **2006**, *12*, 440-450
- ¹¹² a) Goodman, L.S.; Gilman, A.; McLennan, M.T. et al. *J. Am. Med. Assoc.*, **1946**, *132*, 126-132
b) Gilman, A.; Philips, F.S. *Science*, **1946**, *103*, 409-436
- ¹¹³ a) Redacció; "Ulteriori progressi conseguiti a sud e a ovest di Nevel", *Gazzetta de Parma*, 4-12-1943, p. 1
b) di Giacomo, A.; "Un documentario fa luce sulle verità nascoste nel bombardamento al porto di Bari del 1943", *Repubblica*, 30-11-2010, web
c) BO.CA.MI., "Nafta e yprite a mare", *Biografia di una bomba*, <http://www.biografiadiunabomba.it/Nafta%20e%20Yprite%20a%20mare.html>

- ¹¹⁴ Friedman, O.M.; Seligman, A.M. *J. Am. Chem. Soc.*, **1954**, *76*, 655-658
- ¹¹⁵ Rosenberg, B.; van Camp, L.; Trosko, J.E.; Mansour, V.H. *Nature*, **1969**, *222*, 385-386
- ¹¹⁶ a) Iyer, V.N.; Szybalski, W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1963**, *50*, 355-365
b) Tomasz, M.; Lipman, R.; Nakanishi, K. et al. *Science*, **1987**, *235*, 1204-1208
- ¹¹⁷ a) Huerley, L.H.; Gairola, C. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1979**, *15*, 42-45
b) Janjigian, Y.Y.; Calcutt, M.W.; Rizvi, N.A. et al. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **2010**, *65*, 833-838
- ¹¹⁸ Stern, R.S.; Nichols, K.T.; Väkevä, L.H. *N. Engl. J. Med.*, **1997**, *336*, 1041-1045
- ¹¹⁹ Lebwohl, M.; Ting, P.T.; Koo, J.Y.M. *Ann. Rheum. Dis.*, **2005**, *64*, ii83-ii86
- ¹²⁰ a) Kawasaki, T.; Nagatsugi, F.; Sasaki, S. et al. *J. Org. Chem.*, **2004**, *70*, 14-23
b) Ali, M.; Oishi, M.; Sasaki, S. et al. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, *45*, 3136-3140
c) Nagatsugi, F.; Imoto, S. *Org. Biomol. Chem.*, **2011**, *9*, 2579-2585
- ¹²¹ a) Kwak, M.; Herrmann, A.; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, *49*, 8574-8587
b) Okay, O. *Polym. Sci. B Polym. Phys.*, **2011**, *49*, 551-556
- ¹²² Axelrod, V.D.; Feldman, M.Y.; Chuguev, I.I.; Bayev, A.A. *Biochim. Biophys. Acta*, **1969**, *186*, 33-45
- ¹²³ a) Gorelic, L. *Biochemistry*, **1976**, *15*, 3579-3590
b) Brimacombe, R.; Atmadja, J.; Stiege, W.; Schüler, D. *J. Mol. Biol.*, **1988**, *199*, 115-136
c) Noah, J.W.; Tatjana, S.; Wollenzien, P. *Nucl. Acids Res.*, **2000**, *28*, 3785-3792
- ¹²⁴ a) Wollenzien, P.L.; Youvan, D.C.; Hearst, J.E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1978**, *75*, 1642-1646
b) Wollezien, P.L.; Cantor, C.R. *Cell*, **1983**, *32*, 397-407
- ¹²⁵ a) Baranov, P.V.; Dokudovskaya, S.; Brimacimbe, R. et al. *Nucl. Acids Res.*, **1997**, *25*, 2266-2273
b) Nanda, K.; Wollenzien, P. *Biochemistry*, **2004**, *43*, 8923-8934
- ¹²⁶ Sogo, J.M.; Ness, P.J.; Widmer, R.M.; Parish, R.W.; Koller, T. *J. Mol. Biol.*, **1984**, *178*, 897-919
- ¹²⁷ a) Juzumiene, D.; Shapkina, T.; Kirillov, S.; Wollenzien, P. *Methods*, **2001**, *25*, 333-343
b) Lustig, Y.; Wachtel, C.; Safro, M.; Liu, L.; Michaeli, S. *Nucl. Acids Res.*, **2010**, *38*, e5
- ¹²⁸ a) Sigurdsson, S.T.; Tuschl, T.; Eckstein, F. *RNA*, **1995**, *1*, 575-583
b) Cohen, S.B.; Cech, T.R. *J. Am. Chem. Soc.*; **1997**, *119*, 6259-6268
c) Stage-Zimmermann, T.K.; Uhlenbeck, O.C. *Nat. Struct. Biol.*, **2001**, *8*, 863-867
d) Niranjankumari, S.; Lasda, E.; Brazas, R.; Garcia-Blanco, M.A. *Methods*, **2002**, *26*, 182-190
- ¹²⁹ a) Steen, H.; Jensen, O.N. *Mass Spectrom. Rev.*, **2002**, *21*, 163-182
b) Ule, J.; Jensen, K.; Mele, A.; Darnell, R.B. *Methods*, **2005**, *37*, 376-386
- ¹³⁰ a) Borowy-Borowy, H.; Lipman, R.; Chowdary, D.; Tomasz, M. *Biochemistry*, **1990**, *29*, 2992-2999
b) Wang, Y.; Wang, Y. *Anal. Chem.*, **2003**, *75*, 6306-6313
- ¹³¹ Kočalka, P.; el-Sagheer, A.H.; Brown, T. *ChemBioChem*, **2008**, *9*, 1280
- ¹³² a) Tona, R.; Häner, R. *Mol. BioSyst.*, **2005**, *1*, 93-98
b) Pujari, S.S.; Xiong, H.; Seela, F. *J. Org. Chem.*, **2010**, *75*, 8693-8696
c) Kaul, C.; Müller, M.; Wagner, M.; Schneider, S.; Carell, T. *Nature Chem.*, **2011**, *3*, 794-800
- ¹³³ a) Harwood, E.A.; Sigurdsson, S.T.; Edfeldt, N.B.F.; Reid, B.R.; Hopkins, P.B. *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 5081-5082
b) Noronha, A.M.; Noll, D.M.; Wilds, C.J.; Miller, P.S. *Biochemistry*, **2002**, *41*, 760-771
c) Wilds, C.J.; Booth, J.D.; Noronha, A.M. *Tetrahedron Lett.*, **2006**, *47*, 9125-9128

- d) McManus, F.P.; Fang, Q.; Booth, J.D.M.; Noronha, A.M.; Pegg, A.E.; Wilds, C.J. *Org. Biomol. Chem.*, **2010**, *8*, 4414-4426
- ¹³⁴ De Napoli, L.; Montesarchio, D.; Santacroce, C. et al. *Gazz. Chim. Ital.*, **1991**, *121*, 505-508
- ¹³⁵ De Napoli, L.; Messere, A.; Montesarchio, D.; Piccialli, G.; Santacroce, C.; Bonora, G.M. *Nucleosides Nucleotides*, **1993**, *12*, 21-30
- ¹³⁶ a) Alazzouzi, E. Tesi Doctoral, *Universitat de Barcelona*, **1996**
b) Escaja, N. Tesi Doctoral, *Universitat de Barcelona*, **1999**
- ¹³⁷ Caruthers, M.H.; Barone, A.D.; Beaucage, S.L. et al. *Methods Enzymol.*, **1987**, *154*, 287-313
- ¹³⁸ Reese, C.B.; Titmas, R.C.; Yau, L. *Tetrahedron Lett.*, **1978**, *30*, 2727-2730
- ¹³⁹ Ogilvie, K.K.; Theriault, N.Y.; Seifert, J.-M.; Pon, R.T.; Nemer, M.J. *Can. J. Chem.*, **1980**, *58*, 2686-2693
- ¹⁴⁰ a) Frieden, M.; Grandas, A.; Pedroso, E. *Chem. Commun.*, **1999**, 1593-1594
b) Frieden, M. Tesi Doctoral, *Universitat de Barcelona*, **2000**
- ¹⁴¹ Micura, R. *Chem. Eur. J.*, **1999**, *5*, 2077-2082
- ¹⁴² a) Wu, X.; Pitsch, S.; *Nucl. Acids Res.*, **1998**, *26*, 4315-4323
b) Pitsch, S.; Weiss, P.A.; Jenny, L.; Stutz, A.; Wu, X. *Helv. Chim. Acta*, **2001**, *84*, 3773-3795
- ¹⁴³ Daubendiek, S.L.; Kool, E.T. *Nature Biotech.*, **1997**, *15*, 273-277
- ¹⁴⁴ Timchenko, L.T. *Am. J. Hum. Genet.*, **1999**, *64*, 360-364
- ¹⁴⁵ a) Gait, M.J.; Popov, S.G. *Tetrahedron Lett.*, **1980**, *21*, 2841-2842
b) Seth, A.K.; Jay, E. *Nucl. Acids Res.*, **1980**, *8*, 5445-5459
- ¹⁴⁶ Reese, C.B.; Ubasawa, A. *Tetrahedron Lett.*, **1980**, *21*, 2265-2268
- ¹⁴⁷ Patel, T.P.; Chauncey, M.A.M. Millican, T.A.; Bose, C.C.; Eaton, M.A.W. *Nucl. Acids Res.*, **1984**, *12*, 6853-6859
- ¹⁴⁸ Sproat, B.S. *Oligonucleotide synthesis: Methods and Applications*, Humana Press, **2005**, 17-31
- ¹⁴⁹ Pitsch, S.; Weiss, P.A. *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.*, **2001**, Unit 3.8
- ¹⁵⁰ a) Sokolova, N.I.; Ashirbekova, D.T.; Dolinnaya, N.G.; Shabarova, Z.A. *FEBS Lett.*, **1988**, *232*, 153-155
b) Dolinnaya, N.G.; Sokolova, N.I.; Ashirbekova, D.T.; Shabarova, Z.A. *Nucl. Acids Res.*, **1991**, *19*, 3067-3072
c) Harada, K.; Orgel, L.E. *J. Mol. Evo.*, **1994**, *38*, 558-560
d) Rubin, E.; Rummey IV, S.; Wang, S.W.; Kool, E.T. *Nucl. Acids Res.* **1995**, *23*, 3547-3553
- ¹⁵¹ a) Kuznetsova, S.A.; Merenkova, I.N.; Kanevsky, I.E.; Shabarova, Z.A.; Blumenfeld, M. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, **1999**, *9*, 95-100
b) Grimau, M.G.; Aviño, A.; Gargallo, R.; Eritja, R. *Chem. Biodivers.*, **2005**, *2*, 275-283
- ¹⁵² a) Kanaya, E.; Yanagawa, H. *Biochemistry*, **1986**, *25*, 7423-7430
b) Sokolova, N.I.; Ashirbekova, D.T.; Dolinnaya, N.G.; Shabarova, Z.A. *FEBS Lett.*, **1988**, *232*, 153-155
- ¹⁵³ a) Ferris, J.P.; Huang, C.-H.; Hagan, W.J. *Nucleos. Nucleot.*, **1989**, *8*, 407-414
b) Luebke, K.J.; Dervan, P.B. *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, *113*, 7447-7448
- ¹⁵⁴ a) Wemmer, D.E.; Benight, A.S. *Nucl. Acids Res.*, **1985**, *13*, 8611-8621
b) Wu, D.Y.; Wallace, R.B. *Gene*, **1989**, *76*, 245-254
- ¹⁵⁵ Dolinnaya, N.G.; Blumenfeld, M.; Shabarova, Z.A. et al. *Nucl. Acids Res.*, **1993**, *21*, 5403-5407
- ¹⁵⁶ Diegelman, A.M.; Kool, E.T. *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.*, **2000**, Unit 5.2

- ¹⁵⁷ a) Vo, T.; Wang, S.; Kool, E.T. *Nucl. Acids Res.*, **1995**, *23*, 2937-2944
b) Miksimenko, A.V.; Shabarova, Z.A.; Gottik, M.B. et al. *Eur. J. Biochem.*, **2000**, *267*, 3592-3603
- ¹⁵⁸ Lim, C.S.; Hunt, A.C. *Nucleos. Nucleot.*, **1997**, *16*, 41-51
- ¹⁵⁹ a) Rumney IV, S.; Kool, E.T. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1992**, *31*, 1617-1619
b) Gao, H.; Cook, A.; Cohen, J.S. et al. *Bioconjugate Chem.*, **1994**, *5*, 445-453
c) Zhang, L.; Long, H.; Schatz, G.C.; Lewis, F.D. *Org. Biomol. Chem.*, **2007**, *5*, 450-456
- ¹⁶⁰ Zhou, T.; Chen, G.; Wang, Y.; Zhang, Q.; Yang, M.; Li, T. *Nucl. Acids Res.*, **2004**, *32*, e173
- ¹⁶¹ Liu, D.; Chen, J.; Lee, A.H.F.; Chow, L.M.C.; Chan, A.S.C.; Li, T. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, *43*, 797-799
- ¹⁶² Roulon, T.; Le Cam, E.; Escudé, C. *ChemBioChem*, **2006**, *7*, 912-915
- ¹⁶³ a) Carreiro, S.; Damha, M.J. *Org. Lett.*, **2003**, *5*, 273-276
b) Carreiro, S.; Damha, M.J. *J. Org. Chem.*, **2003**, *68*, 8328-8338
c) Mitra, D.; Damha, M.J. *J. Org. Chem.*, **2007**, *72*, 9491-9500
- ¹⁶⁴ Billen, L.P.; Li, Y. *Bioorg. Chem.*, **2004**, *32*, 582-598
- ¹⁶⁵ a) Gryzanov, S.M.; Letsinger, R.L. *Nucl. Acids Res.*, **1993**, *21*, 1403-1408
b) Xu, Y.; Kool, E.T. *Tetrahedron Lett.*, **1997**, *38*, 5595-5598
- ¹⁶⁶ Xu, Y.; Kool, E.T. *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 9040-9041
- ¹⁶⁷ Kuznetsova, S.A.; Blumenfeld, M.; Vasseur, M.; Shabarova, Z.A. *Nucleos. Nucleot.*, **1996**, *15*, 1237-1251
- ¹⁶⁸ Shabarova, Z.A. *Biochimie*, **1988**, *70*, 1323-1334
- ¹⁶⁹ Glick, G.D.; Osborne, S.F.; Knitt, D.S.; Marino, J.P. *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, *114*, 5447-5448
- ¹⁷⁰ Kumar, R.; El-Sagheer, A.; Tumpene, J.; Lincoln, P.; Wilhelmsson, L.M.; Brown, T. *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 6859-6864
- ¹⁷¹ Beaudry, D.; Perreault, J.P. *Nucl. Acids Res.*, **1995**, *23*, 3064-3066
- ¹⁷² Wang, L.; Ruffner, D.E. *Nucl. Acids Res.*, **1998**, *26*, 2502-2505
- ¹⁷³ Wang, S.; Kool, E.T. *Nucl. Acids Res.*, **1994**, *22*, 2326-2333
- ¹⁷⁴ Moore, M.J.; Query, C.C. *Methods Enzymol.*, **2000**, *317*, 109-123
- ¹⁷⁵ Cech, T.R. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2000**, *39*, 34-43
- ¹⁷⁶ a) Lindström, U.M.; Kool, E.T. *Nucl. Acids Res.*, **2002**, *30*, e101
b) Hartig, J.D.; Kool, E.T. *Nucl. Acids Res.*, **2004**, *32*, e152
c) Hartig, J.S.; Fernandez-Lopez, S.; Kool, E.T. *ChemBioChem*, **2005**, *6*, 1458-1462
- ¹⁷⁷ McBride, L.J.; Kierzek, R.; Beaucage, S.L.; Caruthers, M.H. *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, *108*, 2040-2048
- ¹⁷⁸ Engler, M.J.; Richardson, C.C. *The Enzymes*, Academic Press, **1982**, *3*
- ¹⁷⁹ Uhlenbeck, O.C.; Gumpert, R.I. *The Enzymes*, Academic Press, **1982**, *31*
- ¹⁸⁰ Kleppe, K.; van de Sande, J.H.; Khorana, H.G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **1970**, *67*, 68-73
- ¹⁸¹ Romaniuk, P.J.; Uhlenbeck, O.C. *Methods Enzymol.*, **1983**, *100*, 52-59
- ¹⁸² Wincott, F.; Scaringe, S.; Usman, N. et al., *Nucl. Acids Res.*, **1995**, *23*, 2677-2684
- ¹⁸³ Zhu, Q.; Delaney, M.O.; Greenberg, M.M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2001**, *11*, 1105-1107
- ¹⁸⁴ a) Richardson, C.C. *The Enzymes*, Academic Press, **1982**, 229-314
b) Berkner, K.L. Folk, W.R. *J. Biol. Chem.*, **1977**, *252*, 3176-3184.
c) Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (2nd ed.), 10.59-10.67, 11.31-11.33.
- ¹⁸⁵ Guzaev, A.; Azhayev, A.; Lonngberg, H. *Eur. Pat. Appl.*, **1998**, EP 816368

- ¹⁸⁶ Guzaev, A.; Salo, H.; Azhayev, A.; Lonnberg, H. *Tetrahedron*, **1995**, *51*, 9375-9384
- ¹⁸⁷ Horn, T.; Urdea, M. *Tetrahedron Lett.*, **1986**, *27*, 4705-4708
- ¹⁸⁸ a) Ma, M.T.-X.; Summer-Smith, M.; Barnett, R.W. et al. *Nucl. Acids Res.*, **1993**, *21*, 2585-2589
b) Wang, L.; Ruffner, D.E. *Nucl. Acids Res.*, **1998**, *26*, 2502-2504
c) Hamazaki, H.; Abe, T.; Yamakawa, H.; Yokota, T.; Shigeta, S.; Takaku, H. *Helv. Chim. Acta*, **2002**, *85*, 2183-2194
- ¹⁸⁹ Strobel, S.A.; Cech, T.R. *Biochemistry*, **1993**, *32*, 13593-13604
- ¹⁹⁰ a) Moore, M.J.; Sharp, P.A. *Science*, **1992**, *256*, 992-997
b) Kurschat, W.C.; Müller, J.; Wombacher, R.; Helm, M. *RNA*, **2005**, *11*, 1909-1914
c) Hengesbach, M.; Meusburger, M.; Lyko, F.; Helm, M. *RNA*, **2008**, *14*, 180-187
d) Lang, K.; Micura, R. *Nat. Protoc.*, **2008**, *3*, 1457-1466
e) Solomatin, S.; Herschlag, D. *Methods Enzymol.*, **2009**, *469*, 47-68
- ¹⁹¹ a) Hayashi, K.; Nakazawa, M.; Ishizaki, Y.; Obayashi, A. *Nucl. Acids Res.*, **1985**, *13*, 3261-3271
b) Hayashi, K.; Nakazawa, M.; Ishizaki, Y.; Hiraoka, N.; Obayashi, A. *Nucl. Acids Res.*, **1986**, *14*, 7617-7631
- ¹⁹² El-Sagheer, A.F.; Brown, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2010**, *35*, 15329-15334
- ¹⁹³ Viladoms, J. Tesi Doctoral, *Universitat de Barcelona*, **2008**
- ¹⁹⁴ Noll, M.D.; Noronha, A.M.; Miller, P.S. *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 3405-3411
- ¹⁹⁵ Mullah, B.; Andrus, A.; Zhao, H.; Jones, R.A. *Tetrahedron Lett.*, **1995**, *36*, 4373-4376
- ¹⁹⁶ Zhang, L.; Cui, Z.; Zhang, B. *Helv. Chim. Acta*, **2003**, *86*, 703-710
- ¹⁹⁷ a) Dreef-Tromp, C.M.; van Dam, E.M.; van der Marel, G.A.; van Boom, J.H. *Nucl. Acids Res.*, **1990**, *18*, 6491-6495
b) Gasparutto, D.; Roget, A.; Téoule, R. et al. *Nucl. Acids Res.*, **1992**, *20*, 5159-5166
c) Higashibayashi, S.; Shinko, K.; Ishizu, T.; Hashimoto, K.; Shirahama, H.; Nakata, M. *Synlett*, **2000**, *9*, 1306-1308
d) Bellon, L. *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.*, **2000**, Unit 3.6
e) Yamada, C.M.; Dellinger, D.J.; Caruthers, M.H. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 5251-5261
- ¹⁹⁸ a) Reese, C.B. *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.*, **2001**, Unit 2.2
b) Somoza, A. *Chem. Soc. Rev.*, **2008**, *37*, 2668-2675
- ¹⁹⁹ Ogilvie, K.K.; Theriault, N.; Sadana, K.L. *J. Am. Chem. Soc.*, **1977**, *99*, 7741-7743
- ²⁰⁰ Umemoto, T.; Wada, T. *Tetrahedron Lett.*, **2004**, *45*, 9529-9531
- ²⁰¹ Ohgi, T.; Masutomi, Y.; Ishiyama, K.; Kitagawa, H.; Shiba, Y.; Yano, J. *Org. Lett.*, **2005**, *7*, 3477-3480
- ²⁰² Zhou, C.; Honcharenko, D.; Chattopadhyaya, J. *Org. Biomol. Chem.*, **2007**, *5*, 333-343
- ²⁰³ Chaulk, s.G.; MacMillan, A.M.; *Nucl. Acids Res.*, **1998**, *26*, 3173-3178
- ²⁰⁴ Schwartz, M.E.; Breaker, R.R.; Asteriadis, G.T.; de Bear, J.S.; Gough, G.R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1992**, *2*, 1019-1024
- ²⁰⁵ Semenyuk, A.; Földesi, A.; Kwiatkowski, M. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 12356-12357
- ²⁰⁶ Lackey, J.G.; Mitra, D.; Somoza, M.M.; Cerrina, F.; Damha, M.J. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 8496-8502
- ²⁰⁷ Saneyoshi, H.; Seio, K.; Sekine, M. *J. Org. Chem.*, **2005**, *7*, 10453-10460
- ²⁰⁸ Dellinger, D.J.; Ferreira, F.; Caruthers, M.H. et al. US Pat. 12/118655, 20 agost 2009
- ²⁰⁹ Pfister, M.; Schirmeister, H.; Pfeleiderer, F. et al. *Helv. Chim. Acta*, **1995**, *7*, 1705-1737
- ²¹⁰ Scaringe, s.A.; Wincott, F.E.; Caruthers, M.H. *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 11820-11821

- ²¹¹ Reese, C.B.; Saffhill, R.; Sulston, J.E. *J. Am. Chem. Soc.*, **1967**, *89*, 3366-3368
- ²¹² Sandström, A.; Kwiatkowski, M.; Chattopadhyaya, J. *Nucleosides Nucleotides*, **1985**, *4*, 177-1881
- ²¹³ Cielak, J.; Grajkowski, A.; Kauffman, J.S.; Duff, R.J.; Beaucage, S.L. *J. Org. Chem.*, **2008**, *73*, 2774-2783
- ²¹⁴ a) Alvarez, K.; Vasseur, J.-J.; Beltran, T.; Imbach, J.-L. *J. Org. Chem.*, **1999**, *64*, 6319-6328
b) Stutz, A.; Pitsch, S. *Synlett*, **1999**, *6*, 930-934
- ²¹⁵ a) Hayakawa, Y.; Wakabayashi, S.; Kato, h.; Noyori, R. *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, *112*, 1691-1696
b) Spinelli, N.; Meyer, A.; Hayakawa, Y.; Imbach, J.-L.; Vasseur, J.-J. *Eur. J. Org. Chem.*, **2002**, 49-56
- ²¹⁶ Hayakawa, Y.; Kawai, R.; Noyori, R. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 8165-8176
- ²¹⁷ Hayakawa, Y.; Kato, H.; Nobori, T.; Noyori, R.; Imai, J. *Nucl. Acids Res. Symp. Ser.*, **1986**, 97-100
- ²¹⁸ Asanuma, H.; Hara, Y.; Noguchi, A.; Sano, K.; Kashida, H. *Tetrahedron Lett.*, **2008**, *49*, 5144-5146
- ²¹⁹ Hyodo, M.; Hayakawa, Y. *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.*, **2005**, Unit 2.12
- ²²⁰ Sasami, t.; Odawara, Y.; Ohkubo, A.; Sekine, M.; Seio, K. *Bioorg. Med. Chem.*, **2009**, *17*, 1398-1403
- ²²¹ Pitsch, S.; Weiss, P.A. *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.*, **2001**, Unit 2.9
- ²²² Khazanchi, R.; Yu, P.-L.; Johnson, F. *J. Org. Chem.*, **1993**, *58*, 2552-2556
- ²²³ Varasi, M.; Walker, K.A.M.; Maddox, M.L. *J. Org. Chem.*, **1987**, *52*, 4235-4238
- ²²⁴ a) Li, B.F.L.; Swann, P.F.; *Biochemistry*, **1989**, *28*, 5779-5786
b) Mounetou, E.; Debiton, E.; Madelmont, J.-C. et al. *J. Med. Chem.*, **1997**, *40*, 2902-2909
- ²²⁵ Cerichelli, G.; Luchetti, L. *Tetrahedron*, **1993**, *49*, 10733-10738
- ²²⁶ a) Benneche, T.; Gundersen, L.-L.; Undheim, K.A. *Acta Chem. Scand.*, **1988**, *42*, 384-389
b) Gundersen, L.-L.; Benneche, T.; Undheim, K.A. *Acta Chem. Scand.*, **1989**, *43*, 706-709
- ²²⁷ Fromageot, H.P.M.; Griffin, B.E.; Reese, C.B.; Sulston, J.E.; Trentham, D.R. *Tetrahedron*, **1966**, *22*, 705-710
- ²²⁸ a) Höbartner, C.; Kreutz, C.; Micura, R. et al. *Monatsh. Chem.*, **2003**, *134*, 851-873
b) Porcher, S.; Pitsche, S. *Helv. Chim. Acta*, **2005**, *88*, 2683-2704
- ²²⁹ Hayakawa, Y.; Kato, H.; Uchiyama, M.; Kajino, H.; Noyori, R. *J. Org. Chem.*, **1986**, *51*, 2402-2404
- ²³⁰ Chandrasekhar, S.; Reddy, C.R.; Rao, R.J. *Tetrahedron*, **2001**, *57*, 3435-3438
- ²³¹ Spinelli, N.; Meyer, A.; Hayakawa, Y.; Imbach, J.L.; Vasseur, J.-J. *Eur. J. Org. Chem.*, **2002**, 49-56
- ²³² Greenberg, M.M.; Matray, T.J.; Kahl, J.D.; Yoo, D.J.; McMinn, D.L. *J. Org. Chem.*, **1998**, *63*, 4062-4068
- ²³³ Wu, D.Y.; Wallace, R.B. *Gene*, **1989**, *76*, 245-254
- ²³⁴ Shuman, S. *Biochemistry*, **1995**, *34*, 16138-16147
- ²³⁵ Glick, G.D. *Biopoly.*, **1998**, *48*, 83-96
- ²³⁶ Efimov, V.A.; Fedyunin, S.V.; Chakhmakhcheva, O.G. *Russ. J. Bioorg. Chem.*, **2010**, *36*, 49-72
- ²³⁷ Luce, R.A.; Hopkins, P.B. *Methods Enzymol.*, **2001**, *340*, 396-412
- ²³⁸ a) Millard, J.T.; Raucher, S.; Hopkins, P.B. *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, *112*, 2459-2460
b) Rink, S.M.; Solomon, M.S.; Hopkins, P.B. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 2551-2557

- ²³⁹ Ishikawa, S.; Mochizuki, M. *Genes Environ.*, **2007**, *29*, 1-10
- ²⁴⁰ Pujari, S.S.; Seela, F. *J. Org. Chem.*, **2012**, *77*, 4460-4465
- ²⁴¹ Endo, M.; Majima, T. *Org. Biomol. Chem.*, **2005**, *3*, 3476-3478
- ²⁴² Gao, K.; Orgel, L.E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1999**, *96*, 14837-14842
- ²⁴³ Kowalczyk, A.; Carmical, J.R.; Harris, T.M. et al. *Biochemistry*, **2002**, *41*, 3109-3118
- ²⁴⁴ Xiong, H.; Seela, F. *Bioconjugate Chem.*, **2011**, *23*, 1230-1243
- ²⁴⁵ Li, H.-y.; Qiu, Y.-L.; Moyroud, E.; Kishi, Y. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, *40*, 1471-1475
- ²⁴⁶ a) Wilds, C.J.; Noronha, A.M.; Robidoux, S.; Miller, P.S. *J. Am. Chem. Soc.*; **2004**, *126*, 9257-9265
b) Wilds, C.J.; Noronha, A.M.; Robidoux, S.; Miller, P.S. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **2005**, *24*, 965-969
- ²⁴⁷ McManus, F.P.; Fang, Q.; Booth, J.D.M.; Noronha, A.M.; Pegg, A.E.; Wilds, C.J. *Org. Biomol. Chem.*, **2010**, *8*, 4414-4426
- ²⁴⁸ Noronha, A.N.; Wilds, C.J.; Miller, P.S. *Biochemistry*, **2002**, *41*, 9605-8612
- ²⁴⁹ a) Damha, M.J.; Ogilvie, K.K. *J. Org. Chem.*, **1988**, *53*, 3710-3722
b) Dahma, M.J.; Zabarylo, S. *Tetrahedron Lett.*, **1989**, *30*, 6295-6298
c) Hudson, R.H.E.; Dahma, M.J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 2119-2124
d) Ueno, Y.; Takeba, M.; Mikawa, M.; Matsuda, A. *J. Org. Chem.*, **1999**, *64*, 1211-1217
- ²⁵⁰ a) Wilds, C.J.; Booth, J.D.; Noronha, A.M. *Tetrahedron Lett.*, **2006**, *47*, 9125-9128
b) Booth, J.D.; Murphy, S.P.; Noronha, A.M.; Wilds, C.J. *Nucl. Acids Symp. Ser.*, **2008**, *52*, 431-432
- ²⁵¹ Wilds, C.J.; Palus, E.; Noronha, A.M. *Can. J. Chem.*, **2007**, *85*, 249-256
- ²⁵² Wilds, C.J.; Xu, F.; Noronha, A.M. *Chem. Res. Toxicol.*, **2008**, *21*, 686-695
- ²⁵³ a) Alefelder, S.; Sigurdsson, S.T. *Bioorg. Med. Chem.*, **2000**, *8*, 269-273
b) Kiviniemi, A.; Virta, P.; Lönnberg, H. *Bioconjugate Chem.*, **2008**, *19*, 1726-1734
- ²⁵⁴ a) Musier-Forsyth, K.; Schimmel, P.; *Biochemistry*, **1994**, *33*, 773-779
b) Endo, M.; Uegaki, S.; Majima, T. *Chem. Commun.*, **2005**, 3135-3155
- ²⁵⁵ a) Yoshimura, Y.; Ito, Y.; Fujimoto, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2005**, *15*, 1299-1301
b) Angelov, T.; Guainazzi, A.; Schärer, O.D. *Org. Lett.*, **2009**, *11*, 661-664
c) Guainazzi, A.; Campbell, A.J.; Angelov, T.; Simmerling, C.; Schärer, O.D. *Chem. Eur. J.*, **2010**, *16*, 12100-12103
d) Ono, T.; Yoshida, K.; Saotome, Y.; Sakabe, R.; Okamoto, I.; Ono, A. *Chem. Commun.*, **2010**, *47*, 1542-1544
e) Hentschel, S.; Alzeer, J.; Angelov, T.; Schärer, O.D.; Luedtke, N.W. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, *51*, 3466-3469
- ²⁵⁶ a) Lira, E.P.; Huffman, C.W. *J. Org. Chem.*, **1966**, *31*, 2188-2191
b) Yoshida, M.; Ukita, T. *Biochim. Biophys. Acta*, **1968**, *157*, 455-465
c) Scheiner, P.; Geer, A.; Bucknor, A.-M.; Imbach, J.-L.; Schinazi, R.F. *J. Med. Chem.*, **1989**, *32*, 73-76
d) Liu, B.K.; Wu, Q.; Qian, X.Q.; Lin, X.F. *Synthesis*, **2007**, *17*, 2653-2659
e) Zare, A.; Jomhori-Angali, S.; Ghaleh-Golabi, R. et al. *Synth. Commun.*, **2009**, *39*, 139-157
f) Guo, H.-M.; Li, D.-Y.; Qu, G.-R. et al. *Chem. Eur. J.*, **2011**, *17*, 4095-4098
g) Nandi, B.; Pattanayak, S.; Paul, S.; Sinha, S. *Eur. J. Org. Chem.*, **2013**, 1271-1286
- ²⁵⁷ Mag, M.; Engels, J.W. *Nucl. Acids Res.*, **1988**, *16*, 3525-3543
- ²⁵⁸ Simpkins, N.S. *Tetrahedron Lett.*, **1990**, *46*, 6951-6984

- ²⁵⁹ Rodergas, C. Màster en Química Avançada, *Universitat de Barcelona*, **2010**
- ²⁶⁰ a) Gimbert, C.; Lumbierres, M.; Marchi, C.; Moreno-Mañas, M.; Sebastián, R.M.; Vallribera, A. *Tetrahedron*, **2005**, *61*, 8598-8605
b) Gimbert, C.; Moreno-Mañas, M.; Pérez, E.; Vallribera, A. *Tetrahedron*, **2007**, *63*, 8305-8310
- ²⁶¹ Gimbert, C.; Vallribera, A.; Gladysz, J.A.; Jurisch, M. *Tetrahedron Lett.*, **2010**, *51*, 4662-4665
- ²⁶² Borràs, R. Màster en Química Avançada, *Universitat de Barcelona*, **2013**
- ²⁶³ Umemoto, T.; Wada, T. *Tetrahedron Lett.*, **2005**, *46*, 4251-4253
- ²⁶⁴ Zhou, C.; Pathmasiri, W.; Honcharenko, D.; Chatterjee, S.; Barman, J.; Chattopadhyaya, J. *Can. J. Chem.*, **2007**, *85*, 293-301
- ²⁶⁵ Tinoco, I.J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1960**, *82*, 4785-4790
- ²⁶⁶ <http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/default.aspx>
- ²⁶⁷ a) Gray, D.M.; Ratliff, R.L.; Vaughan, M.R. *Methods Enzymol.*, **1992**, *211*, 389-407
b) Bishop, G.R.; Chaires, J.B. *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.*, **2003**, Unit 7.11
- ²⁶⁸ <http://homepage.univie.ac.at/johannes.winkler/circular%20dichroism.php>
- ²⁶⁹ <http://www.wikidoc.org/index.php/DNA>
- ²⁷⁰ Kurschat, W.C.; Müller, J.; wombacher, R.; Helm, M. *RNA*, **2005**, *11*, 1909-19014
- ²⁷¹ Soderhall, S. *Eur. J. Biochem.*, **1975**, *51*, 129-136
- ²⁷² a) Lehman, I.R. *Science*, **1974**, *186*, 790-797
b) Chiuman, W.; Li, Y. *Bioorg. Chem.*, **2002**, *30*, 332-349
- ²⁷³ Patel, M.P.; Baum, D.A.; Silverman, S.K. *Bioorg. Chem.*, **2008**, *36*, 46-56
- ²⁷⁴ Unrau, P.J.; Bartel, D.P. *Nature*, **1998**, *395*, 260-263
- ²⁷⁵ a) Li, Y.; Liu, R.R.; Breaker, R.R. *Biochemistry*, **2000**, *39*, 3106-3114
b) Sreedhara, A.; Li, Y.; Breaker, R.R. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 3454-3460
- ²⁷⁶ a) Schweizder, E.E.; Smucker, L.D.; Votral, R.J. *J. Org. Chem.*, **1966**, *31*, 467-471
b) Karatholuvhu, M.S.; Fuchs, P.L. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 14314-14315
- ²⁷⁷ Santos, L.S.; Rosso, G.B.; Pilli, R.A.; Eberlin, M.N. *J. Org. Chem.*, **2007**, *72*, 5809-5812
- ²⁷⁸ Wang, J.; Wang, Y. *Nucl. Acids Res.*, **2010**, *38*, 6774-6784
- ²⁷⁹ a) Eichman, B.F.; Vargason, J.M.; Mooers, B.H.M.; Ho, P.S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2000**, *97*, 3971-3976
b) Hays, F.A.; Watson, J.; Ho, P.S. *J. Biol. Chem.*, **2003**, *278*, 49663-49666
- ²⁸⁰ Alberts, B. *Molecular Biology of the Cell*, Garland Science, **2002**, 845.
- ²⁸¹ Andrus, A.; Kuimelis, R.G. *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.*, **2001**, Unit 10.5
- ²⁸² Andrus, A.; Kuimelis, R.G. *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.*, **2001**, Unit 10.4
- ²⁸³ Kaiser, E.; Colescott, R.L.; Bossinger, C.D.; Cook, P.I. *Anal. Biochem.*, **1970**, *34*, 595-598
- ²⁸⁴ Brown, T.; Brown, D.J.S. *Oligonucleotide and Analogs: a Practical Approach*, Oxford: IRL Press, **1991**, 20
- ²⁸⁵ Gray, D.M.; Tinoco, T.Jr. *Biopolymers*, **1970**, *9*, 223-244
- ²⁸⁶ Tataurov, A.V.; You, Y.; Owczarzy, R. *Biophys. Chem.*, **2008**, *133*, 66-70
- ²⁸⁷ Plum, G.E. *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.*, **2001**, Unit 7.3
- ²⁸⁸ Chou, C.-W.; Limbach, P.A.; Castleberry, C.M. *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.*, **2008**, Unit 10.1
- ²⁸⁹ Rodicio, L.P.; Limbach, P.A.; Castleberry, C.M. *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.*, **2008**, Unit 10.2
- ²⁹⁰ Andrus, A.; Kuimelis, R.G. *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.*, **2001**, Unit 10.6