

Tesi doctoral presentada per En/Na

Berta ALGUERÓ CAMA

amb el títol

**"Anàlegs d'oligonucleòtids que incorporen grups
tioèter i/o imidazole: reacció amb transplatí i
entrecreuament amb la cadena complementària "**

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

QUÍMICA

Barcelona, 13 de gener de 2006.

Facultat de Química
Departament de Química Orgànica



UNIVERSITAT DE BARCELONA



INTRODUCCIÓ

1 ELS OLIGONUCLEÒTIDS COM A AGENTS TERAPÈUTICS

En els darrers anys, els àcids nucleics han rebut molta atenció degut a la seva possible aplicació com a agents terapèutics.¹ Els oligonucleòtids poden establir interaccions específiques amb altres cadenes d'àcids nucleics, donant lloc a la formació de complexos que poden interferir en els processos d'expressió gènica. El reconeixement específic de cadenes complementàries té lloc a través de la formació d'enllaços d'hidrogen entre les nucleobases (Figura 1). D'altra banda, també es poden establir interaccions entre proteïnes i oligonucleòtids estructurats, per exemple, en forma de quàdruplex de guanines.²

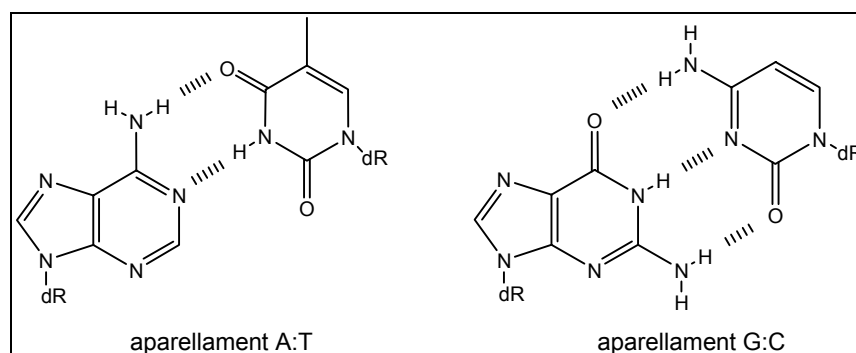


Figura 1. Reconeixement per enllaços d'hidrogen entre nucleobases.

En funció de la diana a la qual es dirigeixen, es poden donar diverses estratègies terapèutiques (Figura 2):

- En la **teràpia antigen**,³ un oligonucleòtid s'uneix al DNA bicatenari dels cromosomes i, formant una triple hèlix, bloqueja la transcripció de la informació genètica a RNA missatger (mRNA).
- En la **teràpia antisentit**,⁴ la diana a la qual es dirigeixen els oligonucleòtids és el mRNA. La formació del complex oligonucleòtid-mRNA inhibeix la traducció a proteïnes

de la informació continguda en el mRNA, ja sigui per activació de l'enzim RNAsa H (que degrada la molècula de mRNA) o per bloqueig estèric.

- Els **ribozims**⁵ són cadenes oligoribonucleotídiques que s'uneixen al mRNA, de manera específica, i el degraden, fent també que la transferència d'informació genètica quedi interrompuda.
- Els oligonucleòtids anomenats **aptàmers**⁶ s'uneixen a proteïnes de manera específica, modificant-ne la seva correcta activitat. Recentment, la FDA* ha aprovat la comercialització del primer fàrmac d'aquestes característiques, que s'anomena Macugen® i està indicat per al tractament de la degeneració macular de l'ull de tipus neovascular relacionada amb l'edat (malaltia que afecta a adults per sobre dels 50 anys, provocant una forta pèrdua de visió).

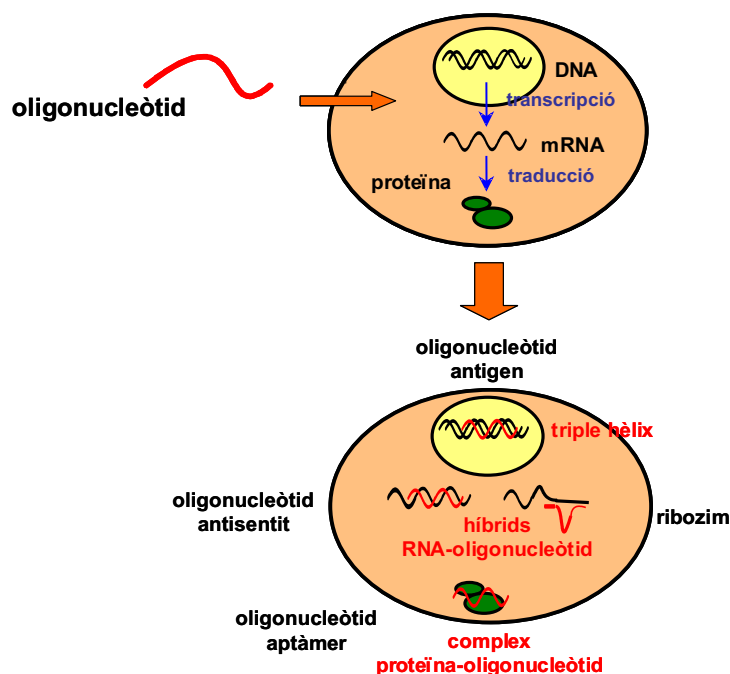


Figura 2. Aplicacions terapèutiques dels oligonucleòtids derivades de la seva interacció amb diferents components cel·lulars.

En els últims anys, s'ha desenvolupat una tècnica anomenada **interferència per RNA (RNAi)**,⁷ que consisteix en introduir dins la cèl·lula dúplexs de RNA de 21-23 parells de bases que són capaços d'activar la degradació del mRNA del qual són complementaris per mitjà de la formació d'un complex enzimàtic. S'estan dedicant grans esforços a l'estudi d'aquest mecanisme de silenciar gens, que en un futur podria donar millors resultats que l'aproximació antisentit.

* Sigles de "Food and Drug Administration" d'Estats Units.

El desenvolupament dels oligonucleòtids com a agents terapèutics s'ha vist limitat per diferents causes, com és la seva baixa estabilitat en condicions fisiològiques (degradació per nucleases) o la dificultat de travessar membranes biològiques. S'han estudiat un gran nombre de modificacions químiques, tant de l'esquelet com de les nucleobases, per tal de minimitzar aquests problemes i així permetre la utilització terapèutica dels oligonucleòtids sintètics.

1.1 La teràpia antisentit

De les diferents estratègies terapèutiques basades en oligonucleòtids, la que ha estat més desenvolupada fins a l'actualitat és la teràpia antisentit, que es basa en la capacitat d'un oligonucleòtid sintètic d'incidir en l'expressió gènica a través del reconeixement específic de mRNA, inhibint la traducció a proteïna. Molts laboratoris arreu del món estan treballant per aconseguir que el control de l'expressió gènica mitjançant aquest mecanisme d'acció, simple en principi, pugui esdevenir una realitat.

1.1.1 Breu història i estat actual

L'any 1978, Zamecnik i Stephenson⁸ van ser els primers a proposar la utilització d'oligonucleòtids sintètics antisentit amb finalitats terapèutiques. Van emprar un oligonucleòtid complementari al DNA del sarcoma de Rous per a inhibir el creixement d'aquest tipus de virus en la cèl·lula. La inhibició específica es basa en el reconeixement de tipus Watson-Crick entre els parells de bases de l'oligonucleòtid antisentit i l'àcid nucleic viral. Des d'aleshores la tecnologia antisentit s'ha anat desenvolupant i s'ha convertit en una eina molt potent per a la validació de dianes i per a finalitats terapèutiques.⁹ A finals de la dècada dels 90, es va aprovar el primer oligonucleòtid antisentit com a fàrmac, Vitravene[®], un oligonucleòtid 21mer de tipus fòsforotioat que és un antiviral desenvolupat per ISIS Pharmaceuticals i introduït al mercat per CibaVision. S'utilitza per a tractar una infecció inflamatòria viral de l'ull (retinitis) que és causada pel citomegalovirus, el qual afecta normalment a pacients amb el sistema immunològic deprimat com són els malalts de la SIDA. L'aprovació del Vitravene[®] va ser un gran avenç per a la tecnologia antisentit, perquè va demostrar la capacitat dels oligonucleòtids antisentit d'entrar en el mercat farmacèutic. Hi ha oligonucleòtids que han arribat a la fase clínica III i no han pogut superar-la, però alguns d'aquests, com l'oligonucleòtid fòsforotioat Genasense[®], estan essent reavaluats per al tractament d'altres malalties (el Genasense[®], en particular, com a anticancerígen, en teràpies combinades amb paclitaxel, irinotecan, fludarabina, ciclofosfamida, etc.). Sense pretendre fer una revisió exhaustiva, val la pena comentar que actualment hi ha diversos oligonucleòtids antisentit en fase II (a més d'altres en fases I o preclínica). En queda algun de "primera generació", és a dir, de tipus fòsforotioat, com l'Alicaforsen, que podria ser útil per al tractament de la colitis ulcerativa, però la majoria són de "segona generació". Aquests són anàlegs que incorporen noves modificacions químiques (2'-O-metilribonucleòsids, per

exemple) que milloren les propietats dels oligonucleòtids fòsforotioat, i que s'estan assajant per a combatre la diabetis, el càncer, la psoriasi, o els efectes del colesterol.

1.1.2 Mecanismes d'acció dels oligonucleòtids antisentit

La regulació de l'expressió gènica mitjançant mecanismes de tipus antisentit es pot trobar també a la natura, tant en cèl·lules procariotes com en eucariotes.¹⁰ La inhibició de la traducció del mRNA diana ve donada per un mecanisme que pot ser actiu i/o passiu.¹¹

- **Inhibició de la traducció per bloqueig estèric**

El mecanisme passiu es dona quan es forma un dúplex que no permet que el complex ribosomal llegeixi la informació continguda en el mRNA. L'oligonucleòtid antisentit es pot unir a diferents punts del mRNA. La formació d'un dúplex amb el mRNA en el punt on comença la traducció pot evitar, per impediment estèric, la unió dels factors d'iniciació al ribosomes.¹² Si ja ha començat la interacció mRNA-ribosoma, la presència d'un oligonucleòtid hibridat al mRNA pot evitar la translocació dels ribosomes al llarg del mRNA.¹³ No està clar si els ribosomes poden arribar a desplaçar els oligonucleòtids del mRNA mitjançant l'ajuda d'enzims com són les helicases,¹⁴ encara que l'estabilitat tèrmica dels híbrids sigui elevada, i sembla que això depèn de l'oligonucleòtid hibridat en cada cas.¹⁵ Tot i així, quan la inhibició de la traducció es dona per bloqueig estèric, es fa necessària una elevada afinitat d'unió oligonucleòtid antisentit-mRNA.¹⁶

- **Mecanisme de la RNasa H**

En el mecanisme actiu, la formació del dúplex promou l'actuació de la RNasa H, enzim endogen que hidrolitza la cadena de RNA en un dúplex RNA-DNA.¹⁷ Aquest procés deixa l'oligodesoxiribonucleòtid intacte, de manera que es pot hibridar a una nova molècula de mRNA i continuar amb la seva activitat antisentit. La RNasa H es troba tant en cèl·lules vegetals com animals i en retrovirus. Tot i que les seves funcions fisiològiques no estan completament clares, se sap que participa en la replicació i reparació del DNA i que, per tant, es troba activa en totes les cèl·lules que s'estan dividint.

Algunes modificacions químiques dels oligonucleòtids activen l'acció de la RNasa H de manera molt eficient, però la gran majoria de modificacions no tenen aquesta capacitat. Només oligonucleòtids amb càrrega negativa i no modificats a la posició 2' permeten la formació de dúplexs susceptibles de ser reconeguts i atacats per la RNasa H. D'altra banda, però, la RNasa H no requereix una homologia molt extensa entre el mRNA i l'oligonucleòtid antisentit. De fet, s'ha descrit que la RNasa H reconeix com a substrats dúplexs amb una extensió de sis parells de bases.¹⁸ Això pot ser un avantatge, però també pot implicar riscos lligats a una falta d'especificitat.

1.1.3 Requisits dels oligonucleòtids antisentit

Hi ha una sèrie de requisits que han de complir els oligonucleòtids que es vulguin emprar com a agents antisentit.¹⁹

1. Els oligonucleòtids han de poder ser sintetitzats eficientment i a escala gran.
2. El complex format entre l'oligonucleòtid i la seva seqüència diana complementària ha de ser estable en condicions fisiològiques.
3. La interacció entre l'oligonucleòtid i la diana ha de ser específica.
4. L'oligonucleòtid ha de tenir una vida mitjana en els fluids biològics prou llarga com per a ser capaç de desenvolupar la seva acció dins la cèl·lula; és a dir, ha de ser resistent a les nucleases.
5. L'oligonucleòtid ha de ser capaç de travessar membranes cel·lulars per tal d'arribar al seu punt d'actuació i ha de poder ser retingut dins de la cèl·lula.
6. L'agent antisentit no hauria d'interaccionar de manera inespecífica amb altres macromolècules.

Per tal que els oligonucleòtids antisentit tinguin aplicabilitat en teràpia, cal la introducció de modificacions químiques que afavoreixin el compliment dels requisits anteriorment esmentats. A l'apartat 1.2, es comenten els diferents punts de l'estructura oligonucleotídica susceptibles de modificació química.

Després de més d'una dècada de realitzar experiments basats en l'estratègia antisentit, han sorgit seriosos dubtes de si l'observació d'un determinat efecte biològic respon exclusivament a un mecanisme de tipus antisentit. És per això que cal tenir en compte una sèrie de consideracions,²⁰ a l'hora de dissenyar un oligonucleòtid antisentit:

- ✓ Tot i que comencen a aparèixer aproximacions semiempíriques²¹ per a la selecció d'oligonucleòtids antisentit amb una elevada probabilitat estadística d'èxit, encara és necessari escollir la seqüència oligonucleotídica d'entre un ventall de possibilitats. En la majoria dels casos, un bon disseny previ de la seqüència antisentit és fonamental per a l'èxit de la teràpia.
- ✓ S'ha de demostrar la supressió o inhibició de l'expressió d'una diana molecular rellevant (normalment una proteïna).²²
- ✓ No és recomanable utilitzar oligonucleòtids amb tots els enllaços internucleosídics sense modificar pel fet que donen com a productes de degradació nucleòtids monofosfat que poden ser tòxics.²³
- ✓ Cal maximitzar l'especificitat de seqüència i, òbviament, minimitzar la no especificitat.

- ✓ No s'han d'emprar oligonucleòtids rics en guanina o amb quatre residus de guanina consecutius. Aquests es poden estructurar formant quartets de G^{24} que poden donar lloc a efectes no específics de seqüència.²⁵
- ✓ En experiments amb animals, cal no utilitzar oligonucleòtids que continguin el motiu CpG sense modificar ni seqüències palindròmiques, perquè se sap que estimulen el sistema immunològic.²⁶ De vegades, si la seqüència de l'oligonucleòtid conté el motiu CpG, es pot evitar l'efecte immunoestimulant substituint la C per 5-metilcitosina. Tot i així, en altres casos oligonucleòtids amb motius CpG poden ser útils, precisament perquè aprofiten els dos efectes.²⁷

1.2 Modificacions químiques dels oligonucleòtids antisentit

L'estructura dels oligonucleòtids permet introduir modificacions químiques en diverses posicions, tal i com es mostra a la següent figura.¹⁸

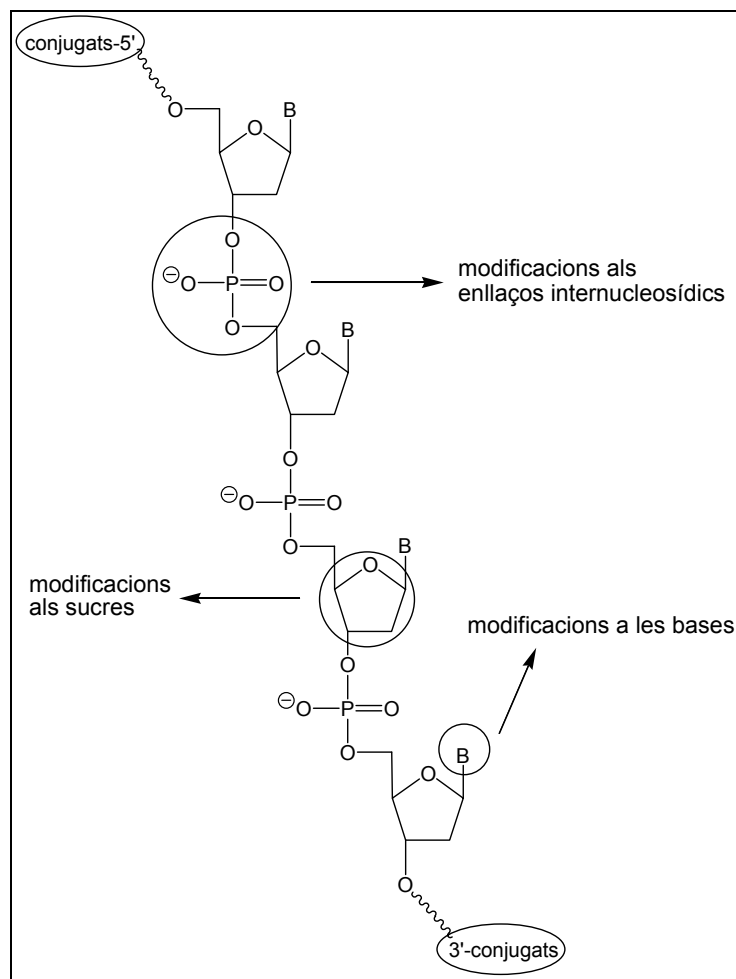


Figura 3. Representació de les diverses posicions dels oligonucleòtides que poden ser modificades químicament.

Per una banda, la modificació dels enllaços internucleosídics o dels sucres que formen part de l'esquelet dels àcids nucleics dóna lloc a un elevat nombre d'anàlegs amb propietats ben diverses.²⁸ També les bases nitrogenades són susceptibles de modificacions químiques, les quals poden afectar la seva capacitat de reconeixement per enllaços d'hidrogen. D'altra banda, els oligonucleòtids es poden unir covalentment a una gran varietat de molècules, ja sigui per millorar el seu transport, l'estabilitat front a les nucleases o bé per incidir en les seves propietats d'hibridació.

De totes les modificacions possibles, en aquest treball només es farà un breu repàs d'aquelles relacionades i més emprades en la teràpia antisentit.

Les modificacions dels **enllaços internucleosídics** tenen com a principal efecte la millora de l'estabilitat dels oligonucleòtids a les condicions fisiològiques. S'havia pensat que la introducció d'unions internucleosídiques neutres o catióniques, que redueixen la càrrega negativa de l'esquelet, podria afavorir l'afinitat dels oligonucleòtids per la seva diana biològica i, a més, millorar la seva capacitat per travessar membranes (Figura 4). Malauradament, els resultats de què es disposa indiquen que els oligonucleòtids neutres no travessen les membranes o no ho fan fàcilment (vegeu més endavant).

La substitució del grup fosfat per un grup fòsforotioat²⁹ ha estat de les més estudiades i emprades. Un bon exemple d'això és el fàrmac Vitravene[®], que conté aquest tipus de modificació. Els oligonucleòtids fòsforotioat se sintetitzen fàcilment, són resistents a l'acció de les nucleases (encara que menys que altres oligonucleòtids modificats) i poden activar l'enzim RNasa H en hibridar-se amb un mRNA diana. El principal problema que presenten és que provoquen efectes no específics per unió a proteïnes intra- i extracel·lulars, a més a més d'activar la degradació per part de la RNasa H de molècules de RNA que no són dianes però a les quals són parcialment complementaris. D'altra banda, el mètode de síntesi emprat habitualment proporciona dos isòmers per cada grup fòsforotioat, de manera que els oligonucleòtids s'obtenen i s'administren com a mesclades diastereomèriques.

De totes les modificacions de l'esquelet, les que impliquen la substitució dels grups fosfodiester per una unió neutra són les més abundants. Els metilfosfonats,³⁰ en els quals un dels àtoms d'oxigen del grup fosfodiester no enllaçat al nucleòsid se substitueix per un grup metil, van ser els primers a ser estudiats. Són oligonucleòtids molt resistents a l'acció de les nucleases, però poc solubles en aigua. D'altra banda, els homooligòmers que presenten aquesta modificació no activen la RNasa H i tenen menys afinitat per als àcids nucleics complementaris que no pas els oligonucleòtids naturals. Altres modificacions internucleosídiques amb derivats de fòsfor són els fosforamidats,³¹ els boranofosfats,³² els esters de fosfat¹⁸ i els metilfosfonats.³³

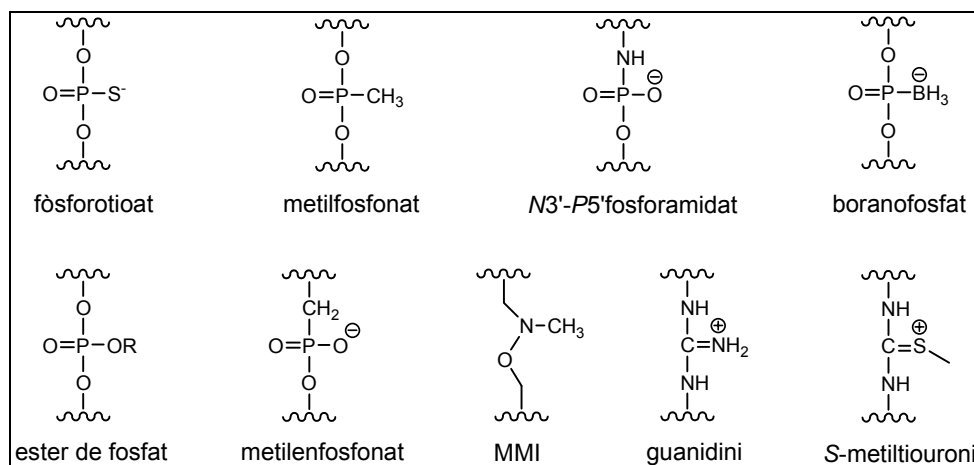


Figura 4. Alguns exemples de modificacions de les unions internucleosídiques.

D'altra banda, s'ha sintetitzat un elevat nombre d'anàlegs on no intervé cap derivat de fòsfor en la unió entre nucleòsids, com per exemple els mímic que contenen un enllaç internucleosídic de tipus metilen(metilimido) (MMI).³⁴ Aquest tipus d'unió és aquiral i neutra, i els oligonucleòtids són estables en condicions fisiològiques. Per si sols no activen la RNasa H, però sí formant quimeres amb fòsforotioats.³⁵

Finalment, també s'han introduït grups catiónics a les unions internucleosídiques, com els guanidinis³⁶ i els S-metiltiuronis.³⁷ S'ha observat en determinats casos un augment en l'estabilitat dels dúplexs que formen gràcies a interaccions de tipus electrostàtic.

L'**anell de ribosa** també ha estat subjecte de múltiples modificacions. La introducció de diferents substituents en la posició 2' del sucre, com per exemple grups alquil, proporciona una major resistència dels oligonucleòtids a l'acció de les nucleases, però modifica en major o menor grau l'afinitat d'unió a la diana terapèutica (Figura 5) i dóna lloc a dúplexs que no activen la RNasa H.³⁸ El cas més estudiat ha estat el dels 2'-O-metoxietiloligonucleòtids (2'-O-MOE), que són actius a dosis relativament baixes. Aquesta disminució en la dosi terapèutica compensa l'alt cost de la seva síntesi. En aquest context són importants els LNA (*locked nucleic acids*),³⁹ que són oligoribonucleòtids que contenen un pont metilènic que uneix l'oxigen en 2' de la ribosa amb el carboni en 4', afavorint així la conformació *north* o 3'-endo de la ribosa que permet un augment de l'afinitat per cadenes de RNA. Que els oligonucleòtids modificats en la posició 2' no activin la RNasa H pot ser degut al fet que els dúplexs formats tenen més caràcter RNA-RNA que l'estructura de RNA-DNA necessària per a provocar l'acció de la RNasa H. Per resoldre aquest problema s'ha plantejat l'ús d'oligonucleòtids mixtes de LNA i DNA, o bé quimeres que presenten nucleòtids modificats amb 2'-alquil en els extrems d'una seqüència antisentit. Aquesta és la tecnologia anomenada del *gapmer*, que consisteix en l'ús d'una seqüència central de monòmers de DNA o de fòsforotioats que forma un dúplex capaç d'activar la RNasa H, que està flanquejada per extrems amb nucleòtids modificats en 2' que proporcionen una major afinitat per la diana i una major estabilitat front a nucleases.

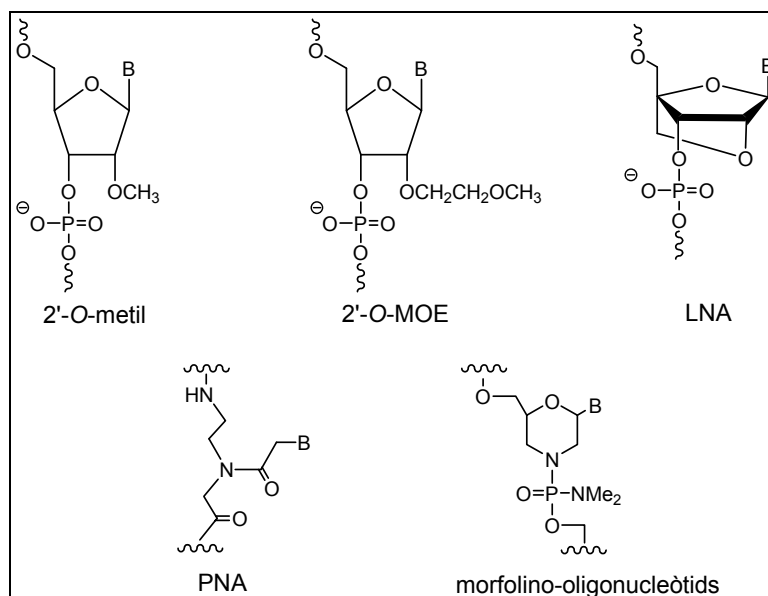


Figura 5. Modificacions de l'anell de ribosa i de l'esquelet ribosa-fosfat.

L'**esquelet ribosa-fosfat**²⁸ ha estat substituït per altres agrupacions, com en el cas dels PNAs (àcids nucleics peptídics) o dels morfolino-oligonucleòtids (Figura 5), presentant certs avantatges respecte als oligonucleòtids naturals. Els PNAs⁴⁰ són oligòmers peptídics formats per unitats de *N*-(2-aminoetil)glicina amb les bases nitrogenades unides al N de la glicina mitjançant un enllaç de tipus amida. Són poc solubles en aigua i no travessen membranes cel·lulars, però formen dúplexs amb RNA i DNA més estables que els corresponents dúplexs naturals. Els morfolino-oligonucleòtids⁴¹ consten de nucleòsids on l'anell de ribosa s'ha substituït per un de morfolina, units per enllaços de tipus fosforamidat. Presenten una elevada solubilitat en aigua i són extremadament estables a la degradació en fluids biològics. A més a més, s'ha demostrat que els anàlegs de tipus morfolino són més efectius com a agents en teràpia antisentit que els oligòmers fòsforotioat amb la mateixa seqüència, tot i que no activen la RNAsa H.⁴² Aquesta major efectivitat s'explica pel fet que els morfolino-oligonucleòtids no s'uneixen de manera inespecífica a proteïnes i que presenten una major especificitat seqüencial.

Les modificacions de les **nucleobases**⁴³ estan més enfocades a millorar l'afinitat de la cadena oligonucleotídica per la seva cadena complementària. Els punts més atractius per a introduir modificacions a les nucleobases són aquelles posicions del solc major que estan exposades als dissolvents, és a dir les posicions 4 i 5 de les pirimidines i les 6 i 7 de les purines (veure la numeració estàndard de les bases a l'annex I, pàg. 233). Les substitucions en aquests punts s'espera que no interfereixin en l'aparellament de les bases i que tampoc suposin un impediment estèric que afecti la geometria de la doble hèlix. Les modificacions que poden ser positives per a l'estabilitat del dúplex són les que augmenten el nombre d'enllaços d'hidrogen

que es poden formar entre les nucleobases o les que augmenten les interaccions d'apilament, que suposen una extensió del sistema π de les nucleobases.

Pel que fa a les nucleobases púriques, són conegudes la hipoxantina i la xantina, que presenten la capacitat d'hibridar-se amb les quatre nucleobases naturals i d'actuar com a nucleobases universals en experiments de polimerització en cadena (Figura 6).⁴⁴ També és coneguda la 2,6-diaminopurina,⁴⁵ anàleg d'adenina que s'aparella amb la timina mitjançant tres ponts d'hidrogen de tipus Watson-Crick, donant lloc a una interacció més estable que l'original. La introducció de nucleòsids de 2'-desoxipurines amb la posició 7 desnitrogenada i amb la incorporació de substituents de tipus metil, propinil o halogen també ha donat lloc a dúplex més estables gràcies a una major hidrofobicitat o a una extensió del sistema π de les nucleobases.⁴⁶

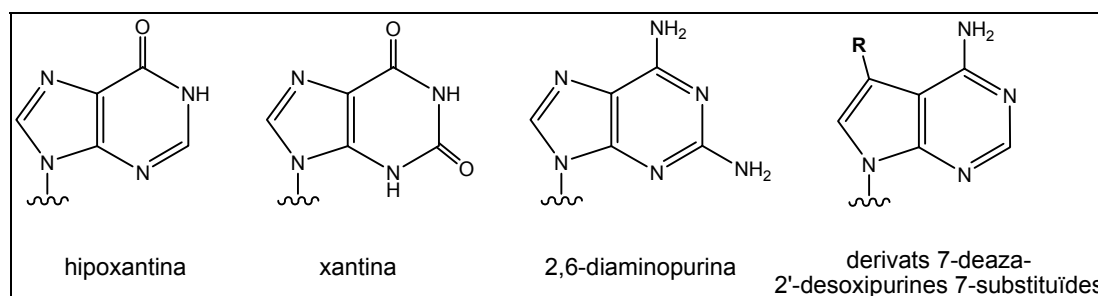


Figura 6. Exemples de nucleobases púriques modificades.

La substitució més freqüent a les nucleobases pirimidíniques és en la posició 5, pel fet que no interfereix en els aparellaments de les bases naturals (Figura 7). La substitució de l'àtom d'hidrogen per un grup metil és la manera més habitual d'estabilitzar dúplex d'oligonucleòtids.⁴⁷ En general, incrementant la grandària del grup introduït en 5, disminueix l'estabilitat tèrmica del dúplex, tot i que la presència d'insaturacions té un efecte beneficiós.⁴⁸ També és freqüent la introducció d'un àtom de brom, el qual modifica la distribució electrònica de l'anell pirimidínic, afectant la seva interacció amb les nucleobases veïnes.⁴⁹ Pel que fa al grup amino de la posició 4 de la citosina, un dels dos hidrògens participa en l'aparellament de Watson-Crick amb el carbonil en 6 de la guanina. L'altre H queda situat en el solc major i és un punt susceptible per a la introducció de modificacions a l'estructura de la citosina. Tot i així, la substitució d'aquest hidrogen pot pertorbar el procés d'hibridació per efectes electrònics, encara que l'estabilitat del dúplex depèn també de la localització de la modificació al llarg de la seqüència.⁵⁰ Per exemple, a la Figura 7 es mostra un anàleg de citosina modificada amb un grup catiònic en posició 4, que en determinades seqüències afavoreix l'estabilitat tèrmica del dúplex gràcies a la presència d'una càrrega positiva que disminueix la repulsió electrostàtica amb els fosfats.⁵¹ En el capítol 1, es comentarà la introducció de dos grups funcionals diferents a la posició 4 de la 5-metilcitosina, i l'avaluació de l'efecte d'aquestes modificacions a l'estabilitat tèrmica d'un dúplex.

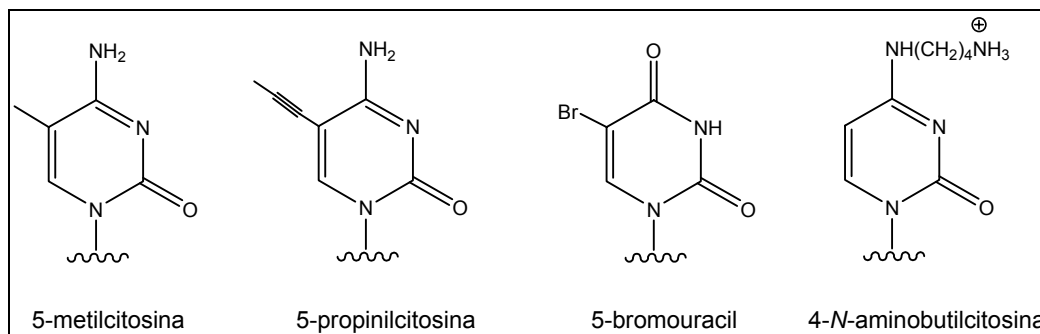


Figura 7. Exemples de nucleobases pirimidíniques modificades.

Finalment, els oligonucleòtids també es poden **conjuguar** a altres molècules mitjançant els seus **extrems 5' i 3'**,^{18,52} per tal de millorar l'estabilitat a nucleases, augmentar l'estabilitat dels complexos per mitjà d'una unió covalent a lligands de DNA, conferir propietats addicionals a la cadena oligonucleotídica com la fluorescència o millorar la internalització cel·lular.

Per tal de fer irreversible la formació del dúplex amb el mRNA diana, s'han unit als oligonucleòtids reactius químics que per activació lumínica o bé espontàniament donen lloc a un entrecreuament o unió covalent amb la cadena complementària, com per exemple agents alquilants.⁵³ En molts casos s'ha observat la formació de diversos productes d'entrecreuament,⁵⁴ segurament degut a l'ús d'agents alquilants molt reactius que actuen fins i tot quan només hi ha hibridació parcial amb la diana terapèutica. En aquest sentit, l'ús de reactius d'entrecreuament fotoactivables permet que la reacció només tingui lloc un cop l'oligonucleòtid s'ha hibridat correctament a la diana en estudi.⁵⁵ Un exemple d'això són els estudis realitzats amb oligonucleòtids metilfosfonats derivatitzats amb psoralèn,* en què l'entrecreuament té lloc per irradiació amb llum ultraviolada ($\lambda=365$ nm).⁵⁶ L'ús d'agents fotoactivables és una eina molt útil per a l'estudi de l'expressió gènica i per a la validació de noves dianes terapèutiques, però és de difícil aplicació en experiments *in vivo*. Una altra possible via per unir un oligonucleòtid antisentit a la cadena complementària de mRNA és emprar ions metàl·lics capaços de produir entrecreuaments termodinàmicament estables i al mateix temps cinèticament inerts.⁵⁷ Una premissa important és que la reactivitat de l'ió metàl·lic ha de ser tal que no interfereixi en el procés d'hibridació entre les dues cadenes oligonucleotídiques. En aquest sentit, l'ús de complexos de platí(II) és una bona opció, molt millor que per exemple els de pal·ladi(II), que reaccionen més ràpidament però amb una menor selectivitat. A l'apartat 3 es comentaran diferents estratègies d'entrecreuament via platí(II), alhora que la present tesi estudiarà una nova alternativa (capítol 3).

* Els derivats de psoralèn donen lloc, específicament, a reaccions de cicloadició amb bases pirimidíniques i preferentment formen adductes amb residus de timina o uracil (Cimino, G.D.; Gamper, H.B.; Isaacs, S.T.; Hearst, J.E. *Annu. Rev. Biochem.* **1985**, *54*, 1151-1193).

2 UTILITZACIÓ TERAPÈUTICA DE COMPLEXOS METÀL·LICS

Des del segle XIX i fins avui dia, tant metalls com complexos metàl·lics han estat emprats en medicina per a tractar diferents tipus de malalties com la sífilis⁵⁸ (compostos organometàl·lics d'arsènic), l'artritis⁵⁹ (compostos d'or), trastorns bipolars⁶⁰ (sals de liti) o el càncer⁶¹ (compostos de platí) (Figura 8).⁶² Recentment, s'ha publicat que el tungstat podria ser útil per al tractament de la obesitat.⁶³ El coneixement dels mecanismes pels quals aquests compostos exerceixen la seva activitat terapèutica és de gran importància, tant per a minimitzar la seva toxicitat i efectes secundaris com per al disseny racional de nous anàlegs més efectius.

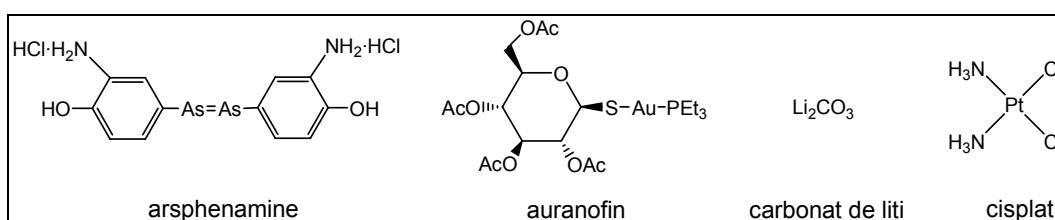


Figura 8. Compostos metàl·lics emprats en medicina.

Dels compostos metàl·lics mencionats, els complexos de platí són els únics relacionats amb els objectius de la tesi (veure apartat 4), de manera que es comentarà breument l'activitat terapèutica del cisplatí, que ha donat origen a tota una nova generació de compostos platinats encaminats al tractament del càncer (Figura 9).

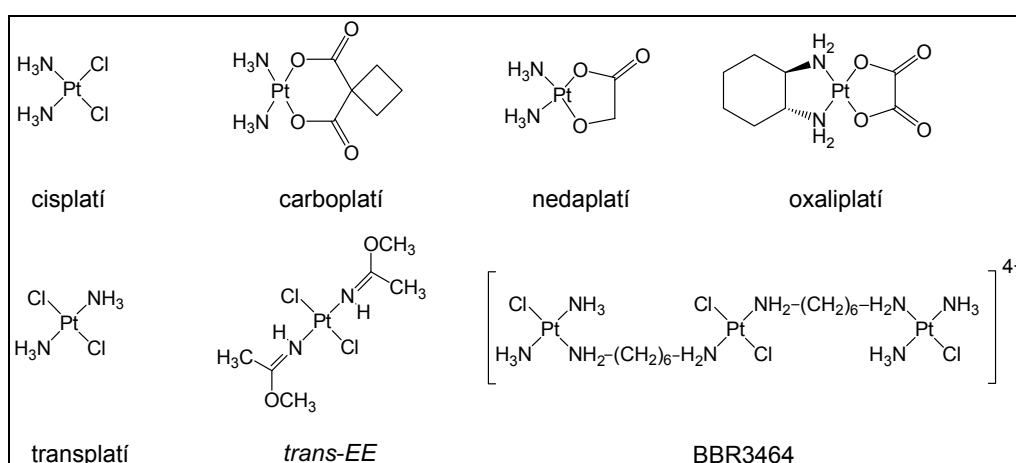


Figura 9. Exemples de compostos platinats amb activitat antitumoral, excepte el transplatí.

El **cisplatí**, *cis*-diaminodicloroplatí(II), descobert per casualitat per Rosenberg i col·laboradors⁶¹ als anys seixanta, és encara un dels fàrmacs antitumorals més emprats en el tractament d'un gran nombre de càncers. Nogensmenys, la seva utilització presenta algunes limitacions, com són una solubilitat limitada en medi aquós, efectes secundaris que en limiten la dosi i el

desenvolupament de mecanismes de resistència que presenten alguns tumors després d'un tractament inicial. És per això que des del seu descobriment s'han sintetitzat i estudiat nombrosos compostos de platí (Figura 9), amb la intenció de millorar el seu espectre d'acció i aconseguir la màxima activitat i selectivitat amb la mínima toxicitat. Tot i així, actualment només el cisplatí i el carboplatí s'empren en el tractament d'algun tipus de càncer a escala mundial; el nedaplatí està aprovat al Japó i l'oxaliplatí a Europa, Amèrica llatina i Àsia. En un principi, es va creure que era necessària una disposició *cis* dels lligands per tal que el complex fos actiu. Ara bé, existeixen compostos en *trans*⁶⁴ i complexos multinuclears⁶⁵ que són actius.

2.1 Mecanisme d'actuació del cisplatí

Està acceptat que la diana biològica del cisplatí, així com de nombrosos compostos de platí, és el DNA.⁶⁶ L'eficàcia d'aquests complexos depèn, en gran mesura, de la seva capacitat per unir-se al DNA, modificant-ne l'estructura i interferint en els processos de replicació i transcripció, i provocant, en última instància, la mort cel·lular per apoptosi.⁶⁷

El cisplatí interacciona amb el DNA del nucli; per tant, ha de ser transportat fins a l'interior de la cèl·lula. La concentració d'ions clorur en el plasma és molt elevada (aproximadament de 100 mM), de manera que el compost pot mantenir-se neutre i travessar la membrana cel·lular per difusió passiva, ja que la concentració de clorurs dins la cèl·lula és molt inferior (aproximadament 20 mM). Últimament s'ha descobert que el transport de cisplatí a través de membrana està molt lligat al metabolisme del coure, de manera que ambdós podrien interferir-se mútuament en el transport cel·lular.⁶⁸ També s'ha descrit que el cisplatí pot ser internalitzat a través d'un transportador anomenat MRP2, i hi ha qui considera que aquesta proteïna de membrana és la responsable de la resistència al fàrmac, pel fet que podria ser capaç de transportar espècies de platí conjugades amb glutatió cap a l'exterior cel·lular.⁶⁹

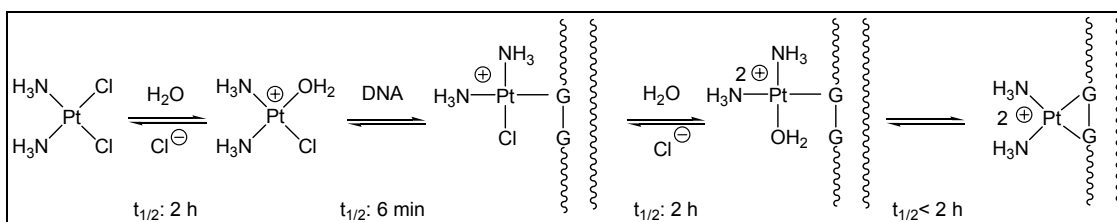


Figura 10. Mecanisme proposat per a la unió del cisplatí al DNA.

Un cop dins la cèl·lula, el cisplatí experimenta el procés d'hidròlisi que es mostra a la Figura 10, que dóna lloc a una forma aquatitzada molt activa que pot reaccionar ràpidament amb les dianes cel·lulars.⁷⁰ Més recentment, s'ha suggerit que també podrien tenir un paper rellevant les formes doblement aquatitzades $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NH}_3)_2]^{2+}$ i $[\text{Pt}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})(\text{NH}_3)_2]^+$.⁷¹

La unió del cisplatí al DNA es pot produir a través dels nitrògens de les bases púriques i pirimidíniques. De tots els possibles punts reactius, els principals candidats són el N7 de la guanina, el N7 i N1 de l'adenina i el N3 de la citosina, amb el següent ordre de preferència: N7G>N7A>N1A>N3C.⁷²

El cisplatí reacciona preferentment amb les bases púriques del DNA, formant majoritàriament adductes bifuncionals intracatenaris. Les lesions més abundants són els adductes 1,2-intracadena-d(GpG) i els 1,2-intracadena-d(ApG), en un 65 i 25 % respectivament.⁷³ En menor grau es troben els adductes 1,3-intracadena-d(GpXpG) (Figura 11). D'altra banda, els adductes bifuncionals intercatenaris, els monofuncionals (units per un únic punt) i els que estan units simultàniament a DNA i a alguna proteïna representen, cadascun d'ells, un percentatge inferior al 1 %. Així, doncs, l'adducte 1,2-intracadena-d(GpG) és el majoritari i es considera que té un paper clau en la citotoxicitat del cisplatí. La formació d'aquest quelat provoca un canvi en l'estructura secundària i terciària del DNA que consisteix en una torsió d'entre 30 i 35° de la doble hèlix i un desenrotllament d'uns 20°.⁷⁴ Tot i que encara no es coneix amb exactitud quin és el factor determinant que provoca la mort per apoptosi en certes cèl·lules tumorals, sí que sembla clar que aquest canvi conformacional en l'estructura del DNA, el reconeixement molecular d'aquest canvi per algunes proteïnes i la interacció del fàrmac amb les proteïnes que intervien en la replicació i transcripció cel·lulars juguen un paper molt important.⁶⁷

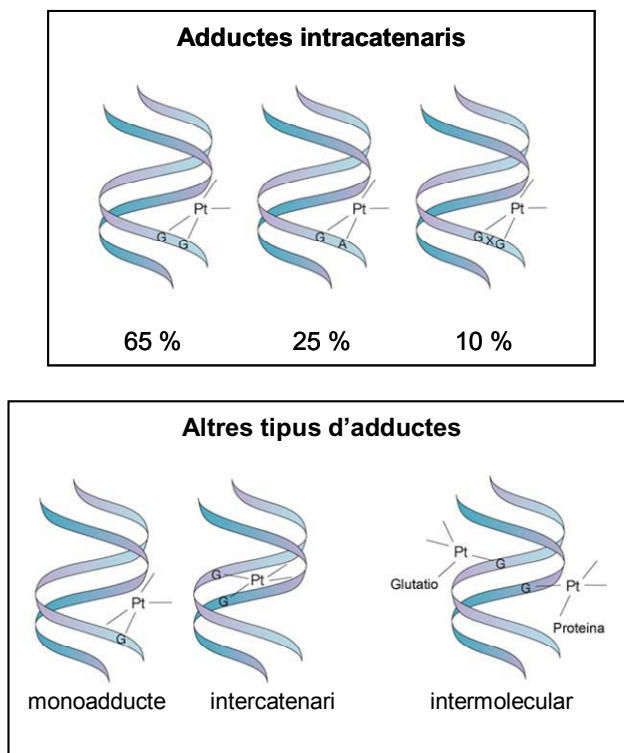


Figura 11. Principals tipus d'adductes que pot formar el cisplatí amb el DNA.

2.2 El transplatí, l'isòmer inactiu

Sorprenentment, l'isòmer *trans* del cisplatí (Figura 9), el *trans*-diaminodicloroplatí(II), presenta molt poca citotoxicitat, tot i que també s'uneix al DNA. S'han realitzat molts estudis comparatius entre els dos isòmers a diferents nivells per tal de trobar respostes a aquest diferent comportament.⁷⁵ *In vitro*, el transplatí forma majoritàriament adductes monofuncionals que lentament evolucionen formant adductes bifuncionals intercatenaris,⁷⁶ no detectant-se adductes bifuncionals intracatenaris a concentracions baixes de complex platinat. Se suposa que el fet que no pugui formar els adductes 1,2-intracadena és la causa de la seva ineficiència com a agent antitumoral. En el cas del cisplatí, proteïnes cel·lulars amb dominis HMG⁷⁷ reconeixen aquest tipus de lesió majoritària i s'hi uneixen.⁷⁸ La unió d'aquestes proteïnes al DNA platinat pot actuar impedint els enzims de reparació d'interaccionar amb el DNA "lesionat" o, alternativament, segrestant proteïnes com factors de transcripció i impedint que puguin exercir la seva funció perquè no poden arribar al seu lloc d'unió en el DNA.⁷⁹ En canvi, les lesions del DNA provocades pel transplatí no són reconegudes per les mateixes proteïnes cel·lulars que les que provoca el cisplatí, essent aquesta una possible causa de la seva inactivitat. A més a més, el llarg temps de vida dels adductes monofuncionals amb transplatí permet que reaccionin amb glutatió, que fa de destoxificador i evita la formació d'adductes bifuncionals en el DNA. Tal i com es mostra a la Figura 12, nucleòfils intracel·lulars que contenen sofre inactiven els adductes monofuncionals amb transplatí, ja que labilitzen l'enllaç Pt-guanina per efecte *trans*.⁷⁶ Pel que fa al cisplatí, els adductes monofuncionals evolucionen més ràpidament a adductes bifuncionals. A més a més, la reacció amb glutatió no trencaria la unió a DNA, sinó que en tot cas promouria la substitució d'un amoníac per un nou lligand.

En un principi, arran de la diferent citotoxicitat entre cisplatí i transplatí, es va creure que era necessària una disposició *cis* dels lligands perquè el complex fos actiu. Tot i així, darrerament s'han estudiat compostos amb disposició *trans* que han donat bons resultats en línies cel·lulars en les quals el cisplatí no és actiu o presenta resistència.⁸⁰ El fet que aquests complexos amb configuració *trans* donin lloc a una menor resistència pot ser degut a l'espectre d'adductes que formen amb el DNA cel·lular (diferent que en el cas del cisplatí), de manera que l'efecte antitumoral es donaria per un altre tipus de mecanisme. Un exemple és el dels complexos de fórmula general *trans*-[PtCl₂(*E*-iminoèter)₂],⁸¹ on els amoníacs del transplatí se substitueixen per grups iminoèter. Un dels compostos que ha donat millors resultats és el *trans-EE* (Figura 9). En la reacció *in vitro* amb DNA de doble cadena, es formen majoritàriament adductes monofuncionals, que evolucionen encara més lentament que en el cas del transplatí a adductes bifuncionals intercadena.⁸² Aquests adductes monofuncionals són més resistents a l'acció de la tiourea (o del glutatió) que els del transplatí, segurament per impediment estèric dels grups iminoèter, i això podria estar en concordança amb la diferent citotoxicitat d'aquests compostos i la del transplatí. Així mateix, la formació d'entrecreuaments DNA-proteïna és més favorable per a *trans-EE* que en el cas de transplatí. De fet, encara no està clar si són els adductes bifuncionals intercadena, tot i formar-se molt lentament, els causants de l'elevada citotoxicitat

de *trans-EE*, o bé l'entrecuament dels adductes monofuncionals amb proteïnes. En termes generals, s'ha suggerit que una variació en l'eficiència de formació d'entrecuaments entre DNA i proteïnes podria explicar la diferent activitat dels complexos platinats.⁸³

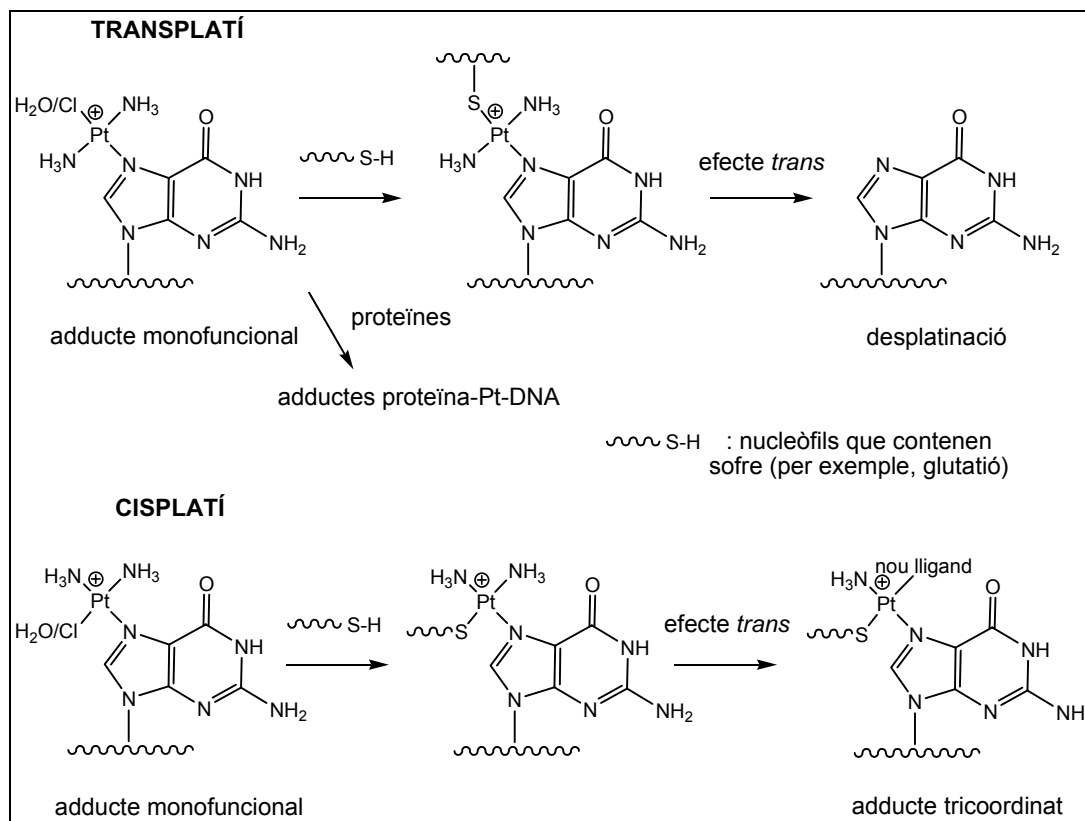


Figura 12. Diferent reactivitat dels adductes monofuncionals de transplatí i de cisplatí en presència de nucleòfils que contenen sofre. S'exemplifica amb adductes platinats on el metall es coordina al N7 d'una guanina.

Tornant al transplatí, ja s'ha indicat que aquest complex no dona lloc a adductes bifuncionals intracadena en reaccionar amb DNA bicatenari. Ara bé, en presència d'un sol filament de DNA, més flexible que un dúplex, sí que es formen adductes d'aquest tipus. Per raons estèriques, en general no es poden formar adductes 1,2-intracadena,⁸⁴ però sí que es formen adductes amb residus separats per un o més nucleòtids, majoritàriament entre dues G (aproximadament en un 60 %).⁸⁵ Un dels adductes majoritaris és el (G1,G3)-intracadena, on el transplatí es coordina a seqüències d(GpXpG), i on X és qualsevol nucleòtid. Aquests adductes són relativament inerts, però en hibridar-se la cadena platinada amb la seva complementària té lloc una migració per donar un entrecuament entre les dues cadenes⁸⁶ (vegeu Figura 13 i més informació a l'apartat 3). Aquesta reorganització, promoguda exclusivament per la formació de la doble hèlix, permetria una unió específica i irreversible entre un oligonucleòtid platinat i una possible diana biològica. Així, doncs, hi ha un potencial interès en aquest tipus d'oligonucleòtids platinats intracadena en el camp de la teràpia antisentit.⁸⁷

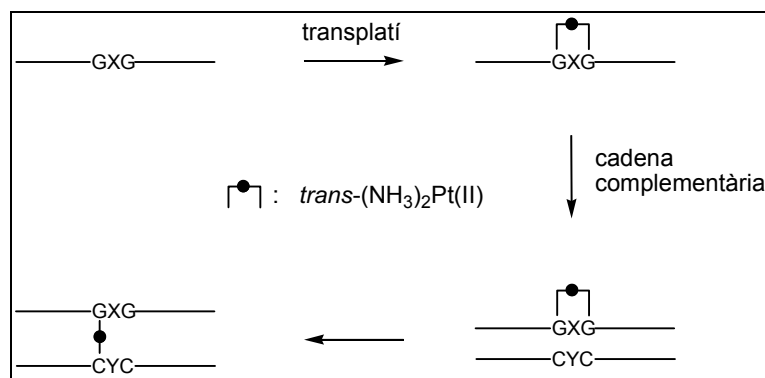


Figura 13. Esquema de formació d'una unió del tipus *trans*-Pt(II)(NH₃)₂ entre dues cadenes oligonucleotídiques, via un adducte amb transplati (G1,G3)-intracadena.

3 COMPLEXOS DE PLATÍ EN TERÀPIA ANTISENTIT

Tal i com s'ha comentat a l'apartat 1.1, la utilització d'oligonucleòtids en una estratègia antisentit constitueix un principi d'actuació farmacèutica que es basa en el reconeixement específic entre nucleobases.

La idea d'utilitzar ions metàl·lics per tal d'unir irreversiblement un oligonucleòtid antisentit i la seva diana és més recent. Es requereixen espècies metàl·liques amb una geometria de coordinació específica i apta per a la formació d'unions termodinàmicament estables, i alhora inerts cinèticament, entre les cadenes oligonucleotídiques. Els compostos bifuncionals de Pt(II), estudiats per primer cop tant per Vlassov i col·laboradors⁸⁸ com per Chu i Orgel,⁸⁹ en són un bon exemple (veure capítol 3).

Com ja s'ha comentat, la formació d'entrecreuaments entre dues cadenes de DNA es dona més freqüentment amb transplati que amb cisplati.⁹⁰ Degut a la geometria de coordinació lineal, els entrecreuaments amb transplati només causen petites distorsions a la doble hèlix, que afecten els dos parells de bases més propers tant en 5' com en 3'.⁹¹

Recentment, s'ha aconseguit portar a terme la formació d'unions entre un oligonucleòtid i la seva seqüència diana a través d'unitats de *trans*-Pt(NH₃)₂.⁹² S'ha posat de manifest que aquest tipus d'entrecreuament estabilitza eficientment l'híbrid oligonucleòtid antisentit/mRNA, tot impedit l'acció de la maquinària traduccional, la qual cosa significa que l'ús d'aquest tipus d'enllaç és una alternativa molt interessant per a l'estratègia antisentit en general, i per a tots aquells oligonucleòtids modificats que no activen l'enzim RNasa H en particular.

En principi, existeixen dues alternatives per generar una unió específica amb *trans*-Pt(NH₃)₂ entre un oligonucleòtid i la seva diana (Figura 14). La primera es basa en la capacitat dels oligonucleòtids que contenen entrecreuaments 1,3-*trans*-{Pt(NH₃)₂[(GXG)]} de reorganitzar-se en presència de la diana complementària, donant lloc a la unió entre les dues cadenes (vegeu també la Figura 13, a l'apartat anterior).⁸⁶ La segona estratègia parteix d'un oligonucleòtid modificat en forma d'adducte monofuncional per coordinació del metall al N7 d'una guanina,

que en presència de la cadena complementària també dóna lloc a una unió irreversible entre dues posicions ben definides d'ambdues cadenes.⁹³ Un element essencial de les dues estratègies és el fet que el reconeixement específic entre la seqüència platinada (tant de l'adducte bifuncional intracadena com del monofuncional) i la corresponent diana complementària té lloc abans de la formació de l'entrecruament intercadena.

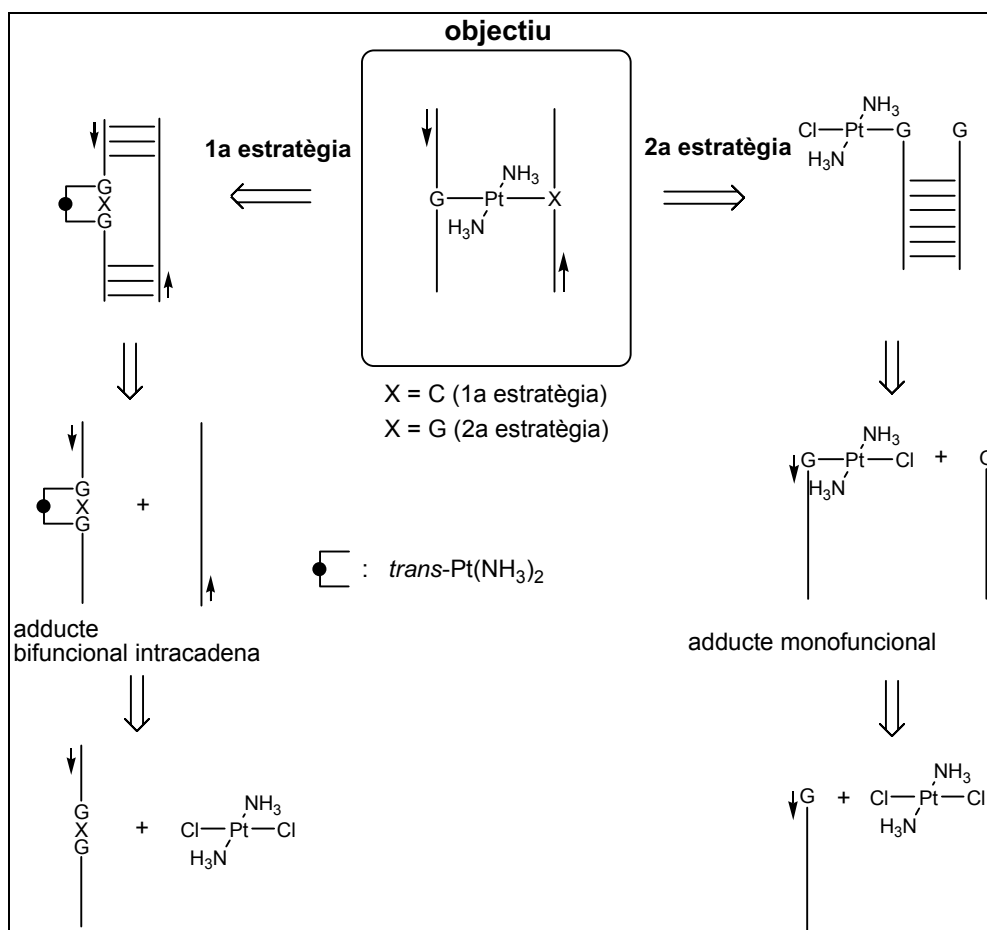


Figura 14. Dues estratègies per a crear entrecruaments intercadena amb *trans*-Pt(NH₃)₂ en posicions específiques entre dues cadenes oligonucleotídiques complementàries.

Per a l'aplicació d'aquesta aproximació en teràpia antisentit, es fa necessària la síntesi d'oligonucleòtids platinats en posicions específiques. La reacció d'un oligonucleòtid amb transplatí en solució dóna lloc a múltiples productes, sense massa regioespecificitat, amb una preferència pel N7 de les bases púriques per donar adductes monofuncionals que poden evolucionar a unions intracadena GXG.⁹⁴ És necessari tenir un únic producte de platinació, d'estructura ben definida, per poder avaluar la seva influència en una determinada acció biològica. Aquest fet força a restringir la seqüència de l'oligonucleòtid, de manera que en la primera estratègia només s'ha efectuat la platinació de cadenes on hi ha exclusivament una

unitat de d(GXG) i en la segona una única dG, essent la resta de nucleòtids de la seqüència timidines o citosines (i en algun cas també adenines).

Diferents grups de recerca han dedicat molts esforços per a desenvolupar una metodologia que permeti la incorporació de sintons platinats a cadenes oligonucleotídiques, i així obtenir cadenes platinades en posicions específiques i sense restriccions de seqüència.⁹⁵ Tot i que ja hi ha algun resultat esperançador,⁹⁶ fins a l'actualitat no s'ha assolit la síntesi de cap monòmer platinat que sigui compatible amb la metodologia estàndard de síntesi automàtica d'oligonucleòtids (veure capítol 3).

4 OBJECTIUS DEL TREBALL

L'objectiu del present treball és posar a punt una metodologia que permeti augmentar l'estabilitat dels dúplex formats per oligonucleòtids antisentit i el seu mRNA diana a través de la formació d'entrecreuaments amb unitats de *trans*-Pt(NH₃)₂. Aquesta alternativa hauria d'incrementar els efectes dels oligonucleòtids antisentit ja que, en ser més estable, el dúplex oligonucleòtid antisentit-mRNA hauria de tenir un temps de vida més llarg. L'estratègia que es planteja a la Memòria comporta la utilització d'oligonucleòtids modificats amb un o més grups funcionals que dirigirien la reacció amb transplatí, la qual cosa permetria dur a terme la platinació sense restriccions de seqüència i reduiria els efectes indesitjats derivats de la platinació indiscriminada. L'oligonucleòtid modificat hauria de:

- ser de "fàcil" obtenció
- reaccionar regioselectivament amb transplatí en els punts de modificació
- formar un complex intracadena estable
- tenir afinitat i especificitat seqüencial pel mRNA complementari
- evolucionar a un dúplex amb una unió intercadena *trans*-Pt(NH₃)₂

Es planteja abordar la síntesi d'anàlegs d'oligonucleòtids platinats sobre la base de precedents del nostre laboratori, en els que s'ha estudiat la reacció entre transplatí i conjugats pèptid-oligonucleòtid,⁹⁷ i que es comenten en el capítol 2 d'aquesta Memòria. La idea és obtenir oligonucleòtids que incorporin anàlegs de nucleobases que continguin un grup tioèter i/o un imidazole, aprofitant que el platí té una gran afinitat per aquests grups funcionals. El tractament d'aquests oligonucleòtids modificats amb transplatí hauria de conduir a la formació d'un adducte bifuncional on l'àtom metàl·lic unís dos grups funcionals de la cadena modificada. En presència de la cadena complementària, aquest adducte hauria d'evolucionar a un complex intermolecular, amb una reorganització dels punts de platinació.

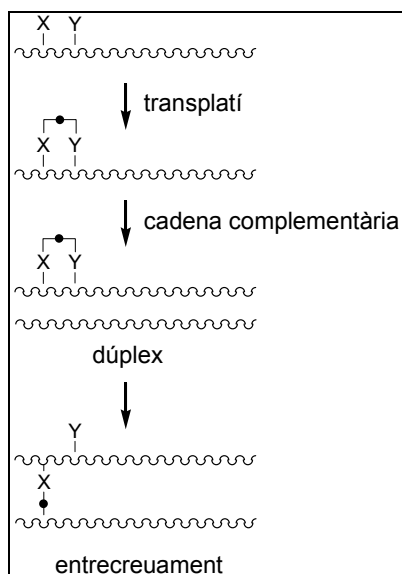


Figura 15. Formació d'entrecreuaments intercadena a partir de la hibridació entre un oligonucleòtid modificat platinat i la seva seqüència complementària. X i Y corresponen a la introducció de grups funcionals per a dirigir la platinació.

Així, doncs, els objectius concrets del treball són:

- Obtenir oligonucleòtids modificats amb un grup tioèter, amb un grup imidazole o amb els dos tipus de grups funcionals. Això implica, com a pas previ, la síntesi dels corresponents precursors fosforamidit per tal d'introduir-los a les cadenes oligonucleotídiques utilitzant la metodologia estàndard del fosfit triester.
- Estudiar les reaccions amb transplatí d'oligonucleòtids model que contenen un o els dos nous grups funcionals i diferent composició en nucleobases, per mirar d'optimitzar el disseny dels oligonucleòtids a emprar en els estudis amb una cadena complementària.
- Estudiar la formació d'entrecreuaments intercadena entre cadenes modificades platinades i cadenes complementàries, i comparar els resultats d'aquest procediment amb els de la formació d'unions intercadena a partir d'una mescla dels dos oligonucleòtids i transplatí.

5 BIBLIOGRAFIA

- ¹ Cook, P.D. *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*. John Wiley & Sons, **2000**, 4.1.1-4.1.17.
- ² Bock, L.C.; Griffin, L.C.; Latham, J.A.; Vermaas, E.H.; Toole, J.J. *Nature* **1992**, *355*, 564-566.
- ³ a) Moser, H.E.; Dervan, P.B. *Science* **1987**, *238*, 645-650. b) Le Doan, T.; Perrouault, L.; Praseuth, D.; Habhoub, N.; Decout, J-L.; Thuong, N.T.; Lhomme, J.; Hélène, C. *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 7749-7760. c) Praseuth, D.; Guieysse, A.L.; Hélène, C. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1489*, 181-206.
- ⁴ a) Milligan, J.F.; Matteucci, M.D.; Martin, J.C. *J. Med. Chem* **1993**, *36*, 1923-1937. b) Stein, C.A.; Krieg, A.M. *Antisense Res. Dev.* **1994**, *4*, 67-69. c) Kurreck, J. *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 1628-1644. d) Crooke, S.T. *Annu. Rev. Med.* **2004**, *55*, 61-95.
- ⁵ a) Cech, T.R. *Scientific American* **1986**, *255*, 64-75. b) Rossi, J.J. *Chem. Biol.* **1999**, *6*, R33-R37. c) Castanotto, D.; Scherr, M.; Rossi, J.J. *Methods Enzymol.* **2000**, *313*, 401-420.
- ⁶ a) Ellington, A.D.; Szostak, J.W. *Nature* **1990**, *346*, 818-822. b) Cerchia, L.; Hamm, J.; Libri, D.; Tavitian, B.; de Franciscis, V. *FEBS Lett.* **2002**, *528*, 12-16.
- ⁷ a) Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M.K.; Kostas, S.A.; Driver, S.E.; Mello, C.C. *Nature* **1998**, *391*, 806-811. b) Tuschl, T. *ChemBioChem* **2001**, *2*, 239-245. c) Ryther, R.C.C.; Flynt, A.S.; Phillips, J.A.; Patton, J.G. *Gene Therapy* **2005**, *12*, 5-11.
- ⁸ Zamecnik, P.C.; Stephenson, M.L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, *75*, 280-284.
- ⁹ Dean, N.M. *Current Opinion in Biotechnology* **2001**, 622-625.
- ¹⁰ Stein, C.A. *Nature Biotechnology* **2001**, *19*, 737-738.
- ¹¹ a) Gewirtz, A.M.; Sokol, D.L.; Ratajczak, M.Z. *Blood* **1998**, *92*, 712-736. b) Galderisi, U.; Cascino, A.; Giordano, A. *J. Cell. Phys.* **1999**, *181*, 251-257. c) Kvaerno, L.; Wengel, J. *Chem. Commun.* **2001**, 1419-1424.
- ¹² Lawson, T.G.; Ray, B.K.; Dodds, J.T.; Grifo, J.A.; Abramson, R.D.; Merrick, W.C.; Betsch, D.F.; Weith, H.L.; Thach, R.E. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 13979-13989.
- ¹³ Häuptle, M.T.; Frank, R.; Dobberstein, B. *Nucleic Acids Res.* **1986**, *14*, 1427-1248.
- ¹⁴ Nellen, W.; Lichtenstein, C. *Trends Biochem. Sci.* **1993**, *18*, 419-423.
- ¹⁵ Liebhaber, S.A.; Cash, F.E.; Shakin, S.H. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 15597-15602.
- ¹⁶ a) Melton, D.A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 144-148. b) Maher, L.J.; Dolnick, B.J. *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 3341-3358. d) Johansson, H.E.; Belsham, G.J.; Sproat, B.S.; Hentze, M.W. *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 4591-4598. e) Bonham, M.A.; Brown, S.; Boyd, A.L.; Brown, P.H.; Bruckenstein, D.A.; Hanvey, J.C.; Thomson, S.A.; Pipe, A.; Hassman, F.; Bisi, J.E.; Froehler, B.C.; Matteucci, M.D.; Wagner, R.W.; Noble, S.A.; Babiss, L.E. *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23*, 1197-1203.
- ¹⁷ a) Crouch, R.J.; Dirksen, M-L. *Nucleases*, Linn, S.M.; Roberts, R.J., Eds., Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Lab. Press, **1985**, pp. 211-241 b) Zamaratscki, E.; Pradeepkumar, P.I.; Chattopadhyaya, L. *Biochem. Biophys. Methods* **2001**, *48*, 189-208.

- ¹⁸ Uhlmann, E.; Peyman, A. *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 543-584.
- ¹⁹ a) Stein, C.A.; Cheng, Y-C. *Science* **1993**, *261*, 1004-1012. b) Kvaerno, L.; Wengel, J. *Chem. Commun.* **2001**, 1419-1424.
- ²⁰ Stein, C.A. *J. Clin. Invest.* **2001**, *108*, 641-644.
- ²¹ a) Walton, S.P.; Gregory N. Stephanopoulos, G.N.; Yarmush, M.L.; Roth, C.M. *Biotechnology and Bioengineering* **1999**, *65*, 1-9. b) Patzel, V.; Steidl, U.; Kronenwett, R.; Haas, R.; Sczakiel, G. *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 4328-4334.
- ²² Crooke, S.T. *Antisense & Nucleic Acid Drug Development* **1996**, *6*, 145-147.
- ²³ Vaerman, J.L.; Moureau, P.; Deldime, F.; Lewalle, P.; Lammineur, C.; Morschhauser, F.; Martiat, P. *Blood* **1997**, *90*, 331-339.
- ²⁴ a) Sen, D.; Gilbert, W. *Biochemistry* **1992**, *31*, 65-70. b) Williamson, J.R. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1993**, *3*, 357-362.
- ²⁵ Benimetskaya, L.; Berton, M.; Kolbanovsky, A.; Benimetsky, S.; Stein, C.A. *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 2648-2656.
- ²⁶ a) Krieg, A.M.; Yi, A.K.; Matson, S. *Nature* **1995**, *374*, 546-549. b) Ballas, Z.K.; Rasmussen, W.L.; Krieg, A.M. *J. Immunol.* **1996**, *157*, 1840-1845. c) Klinman, D.M.; Yi, A.K.; Beaucage, S.L.; Conover, J.; Krieg, A.M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 2879-2883.
- ²⁷ Dove, A. *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 121-124.
- ²⁸ Micklefield, J. *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 1157-1179.
- ²⁹ Levin, A.A. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1489*, 69-84.
- ³⁰ a) Hamma, T.; Miller, P.S. *Biochemistry* **1999**, *38*, 15333-15342. b) Thiviyathan, V.; Vyazovkina, K.V.; Gozansky, E.K.; Bichenchova, E.; Abramova, T.V.; Luxon, B.A.; Lebedev, A.V.; Gorenstein, D.G. *Biochemistry* **2002**, *41*, 827-838.
- ³¹ Gryaznov, S.M. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1489*, 131-140.
- ³² a) Rait, V.; Sergueev, D.S.; Summers, J.S.; He, K.; Huang, F.; Krzyzanowska, B.; Shaw, B.R. *Nucleosides & Nucleotides* **1999**, *18*, 1379-1380. b) Sergeeva, Z.A.; Sergueev, D.S.; Ribeiro, A.A.; Summers, J.S.; Shaw, B.R. *Helv. Chim. Acta* **2000**, *83*, 1377-1391.
- ³³ Winqvist, A.; Strömberg, R. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 1509-1515.
- ³⁴ a) Morvan, F.; Sanghvi, Y.S.; Perbost, M.; Vasseur, J-J.; Bellon, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 255-256. b) Yang, X.; Han, X.; Cross, C.; Barc, S.; Sanghvi, Y.S.; Gao, X. *Biochemistry* **1999**, *38*, 12586-12596.
- ³⁵ Sanghvi, Y.S.; Swayze, E.E.; Peoc'h, D.; Bhat, B.; Dimock, S. *Nucleosides & Nucleotides* **1997**, *16*, 907-916.
- ³⁶ Dempcy, R.O.; Luo, J.; Bruice, T.C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 4326-4330.
- ³⁷ Arya, D.P.; Bruice, T.C. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6619-6620.

- ³⁸ Manoharan, M. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1489*, 117-130.
- ³⁹ Braasch, D.A.; Corey, D.R. *Chemistry & Biology* **2001**, *8*, 1-7.
- ⁴⁰ a) Nielsen, P.E.; Egholm, R.H.; Berg, R.H.; Buchardt, O. *Science*, **1991**, *254*, 1497-1500. b) Nielsen, P.E. *Methods Enzymol.* **1999**, *313*, 156-164. c) Braasch, D.A.; Corey, D.R. *Biochemistry* **2002**, *41*, 4503-4510.
- ⁴¹ a) Corey, D.R.; Abrams, J.M. *Genome Biology* **2001**, *2*, 1015.1-1015.3. b) Summerton, J. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1489*, 141-158.
- ⁴² a) Summerton, J.; Stein, D.; Huang, S-B.; Matthews, P.; Weller, D.; Partridge, M. *Antisense & Nucleic Acid Drug Dev.* **1997**, *7*, 63-70. b) Taylor, M.F.; Paulauskis, J.D.; Séller, D.D.; Kobzile, L. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 17445-17452.
- ⁴³ a) Luyten, I.; Herdewijn, P. *Eur. J. Med. Chem.* **1998**, *33*, 515-576. b) Herdewijn, P. *Antisense & Nucleic Acid Drug Development* **2000**, *10*, 297-310.
- ⁴⁴ Martin, F.H.; Castro, M.M.; Aboul-ela, F.; Tinoco, I.Jr. *Nucleic Acids Res.* **1985**, *13*, 8927-8938.
- ⁴⁵ a) Cheong, C.; Tinoco, I.Jr.; Chollet, A. *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 5115-5122. b) Bailly, C.; Waring, M.J. *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 4309-4314.
- ⁴⁶ a) Seela, F.; Thomas, H. *Helv. Chim. Acta* **1995**, *78*, 94-108. b) Buhr, C.A.; Wagner, R.W.; Grant, D.; Froehler, B.C. *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 2974-2980.
- ⁴⁷ a) Hotchkiss, R.D. *J. Biol. Chem.* **1948**, *168*, 315-322. b) Uesugi, S.; Miyashiro, H.; Tomita, K.; Ikejara, M. *Chem. Pharm. Bull.* **1986**, *34*, 51-60.
- ⁴⁸ a) Hayakawa, T.; Ono, A.; Ueda, T. *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 4761-4776. b) Sági, J.; Szemző, A.; Ébinger, K.; Szabolcs, A.; Sági, G.; Ruff, E.; Ötvös, L. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 2191-2194.
- ⁴⁹ Brennan, C.A.; Van Cleve, M.D.; Gumpport, R.I. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 7270-7278.
- ⁵⁰ Le Brun, S.; Duchange, N.; Namane, A.; Zakin, M.M.; Huynh-Dinh, T.; Igolen, J. *Biochimie* **1989**, *71*, 319-324.
- ⁵¹ Allerson, C.R.; Chen, S.L.; Verdine, G.L. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 7423-7433.
- ⁵² a) Lebedeva, I.; Benimetskaya, L.; Stein, C.A.; Vilenchik, M. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2000**, *50*, 101-119. b) Bijsterbosch, M.K.; Rump, E.T.; De Vruh, R.L.; Dorland, R.; van Veghel, R.; Tivel, K.L.; Biessen, E.A.; van Berkel, T.J.; Manoharan, M. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 2717-2725. c) Tung, C-H.; Stein, S. *Bioconj. Chem.* **2000**, *11*, 605-618.
- ⁵³ a) Knorre, D.G.; Vlassov, V.V. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **1985**, *32*, 291-320. b) Maruenda, H.; Tomasz, M. *Bioconj. Chem.* **1996**, *7*, 541-544.
- ⁵⁴ Gorshkova, I.I.; Zenkova, M.A.; Karpova, G.G.; Levina, A.S.; Solov'ev, V.V. *Mol. Biol. (Moscow)* **1986**, *20*, 1084-1097.
- ⁵⁵ a) Bhan, P.; Miller, P.S. *Bioconj. Chem.* **1990**, *1*, 82-88. b) Woo, J.; Hopkins, P.B. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 5457-5459. c) Lentzen, O.; Defrancq, E.; Constant, J-F.; Schumm, S.; García-Fresnadillo, D.; Moucheron, C.; Dumy, P.; Kirsch-De Mesmaeker, A. *J. Biol. Chem.* **2004**, *9*, 100-108.

- ⁵⁶ Kean, J.M.; Murakami, A.; Blake, K.R.; Cushman, C.D.; Miller, P.S. *Biochemistry* **1988**, *27*, 9113-9121.
- ⁵⁷ Lippert, B.; Leng, M. *Metallopharmaceuticals* (Topics in Biological Inorganic Chemistry, vol. 1), Clarke, M.J.; Sadler, P.J., Eds., Springer, Berlin Heidelberg New York, **1999**, pp. 118-142.
- ⁵⁸ Albert, A. *Selective Toxicity*, Chapman & Hall, New York, **1987**, vol. 6, pp. 206-265.
- ⁵⁹ Snyder, R.M.; Mirabelli, C.K.; Crooke, S.T. *Semin. Arthritis Rheum.* **1987**, *17*, 71-80.
- ⁶⁰ Cade, J.F.L. *Med. J. Austr.* **1949**, *36*, 349-352.
- ⁶¹ Rosenberg, B.; Van Camp, L.; Krigas, T. *Nature*, **1965**, *205*, 698-699.
- ⁶² a) Abrams, M.J.; Barry, A.M. *Science* **1993**, *261*, 725-730.
- ⁶³ Claret, M.; Corominola, H.; Canals, I.; Saura, J.; Barcelo-Batllo, S.; Guinovart, J.J.; Gomis, R. *Endocrinology* **2005**, *146*, 4362-4369.
- ⁶⁴ a) Brabec, V.; Neplechova, K.; Kasparova, J.; Farrel, N. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2000**, *5*, 364-368. b) Najajreh, Y.; Perez, J.M.; Navarro-Ranninger, C.; Gibson, D. *Journal of Medicinal Chemistry* **2002**, *45*, 5189-5195.
- ⁶⁵ Komeda, S.; Bombard, S.; Perrier, S.; Reedijk, J.; Kozelka, J. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2003**, *96*, 357-366.
- ⁶⁶ *Cisplatin, Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*, Lippert, B., Ed., Verlag Helvetica Chimica Acta, Zürich, **1999**.
- ⁶⁷ a) Jamieson, E.R.; Lippard, S.J. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2467-2498. b) Wang, D.; Lippard, S.J. *Nature Reviews. Drug Discovery* **2005**, *4*, 307-320.
- ⁶⁸ Ohashi, K.; Kajiya, K.; Inaba, S.; Hasegawa, T.; Seko, Y.; Furuchi, T.; Naganuma, A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *310*, 148-152.
- ⁶⁹ Guminski, A.; Harnett, P.R.; deFazio, A. *The Lancet Oncology* **2002**, *3*, 312-318.
- ⁷⁰ Reedijk, J.; Fichtinger-Shepman, A.M.J.; van Oosterom, A.T.; van de Putte, P. *Structure and Bonding*, **1987**, *67*, 53-89.
- ⁷¹ a) Kozelka, J.; Legendre, F.; Reeder, F.; Chottard, J-C. *Coord. Chem. Rev.* **1999**, *190-192*, 61-82. b) Legendre, F.; Bas, V.; Kozelka, J.; Chottard, J-C. *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 2002-2010.
- ⁷² Sóvágó, I.; Kiss, A.; Lippert, B. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1995**, 489-494.
- ⁷³ Fichtinger-Shepman, A.M.J.; van der Veer, J.L.; den Hertog, J.H.J.; Lohman, P.H.M.; Reedijk, J. *Biochemistry* **1985**, *24*, 707-713.
- ⁷⁴ a) Takahara, P.M.; Frederick, C.A.; Lippard, S.J. *Nature* **1995**, *377*, 649-652. b) Yang, D.; van Boom, S.S.G.E.; van Boom, J.H.; Wang, A.H.J. *Biochemistry* **1995**, *34*, 12912-12920. c) Gelasco, A.; Lippard, J.S. *Biochemistry* **1998**, *37*, 9230-9239.
- ⁷⁵ a) Millard, J.T.; Wilkes, E.E. *Biochemistry* **2000**, *39*, 16046-16055. b) Hofr, C.; Brabec, V. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 9655-9661. c) Peleg-Shulman, T.; Najajreh, Y.; Gibson, D. *J. Inorg. Biochem.* **2002**, *91*, 306-311. d) Wozniak, K.; Walter, Z. *Cell Biol. Int.* **2002**, *26*, 495-503.

- ⁷⁶ Eastman, A.; Barry, M.A. *Biochemistry* **1987**, *26*, 3303-3307.
- ⁷⁷ a) Bianchi, M.E.; Beltrame, M.; Falciola, L. *Nucleic Acids Mol. Biol.* **1992**, *6*, 112-128. b) Read, C.M.; Cary, P.D.; Crane-Robinson, C.; Driscoll, P.C.; Carrillo, M.O.M.; Norman, D.G. *Nucleic Acids Mol. Biol.* **1992**, *9*, 222-250.
- ⁷⁸ a) Pil, P.M.; Lippard, S.J. *Science* **1992**, *256*, 234-237. b) Bruhn, S.L.; Pil, P.M.; Essigmann, J.M.; Housman, D.E.; Lippard, S.J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 2307-2311. c) McA'Nulty, M.M.; Lippard, S.J. *Nucleic Acids Mol. Biol.* **1992**, *9*, 264-284. d) Chow, C.S.; Barnes, C.M.; Lippard, S.J. *Biochemistry* **1995**, *34*, 2956-2964. e) Turchi, J.J.; Li, M.; Henkels, K.M. *Biochemistry* **1996**, *35*, 2992-3000. f) Dunham, S.U.; Lippard, S.J. *Biochemistry* **1997**, *36*, 11428-11436. g) Jung, Y.; Lippard, S.J. *Biochemistry* **2003**, *42*, 2664-2671. h) Zhang, C.X.; Chang, P.V.; Lippard, S.J. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6536-6537.
- ⁷⁹ a) Huang, J.-C.; Zamble, D.B.; Reardon, J.T.; Lippard, S.J.; Sancar, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 10394-10398. b) Zamble, D.B.; Mu, D.; Reardon, J.T.; Sancar, A.; Lippard, S.J. *Biochemistry* **1996**, *35*, 10004-10013.
- ⁸⁰ a) Montero, E.I.; Diaz, S.; González-Vadillo, A.M.; Perez, J.M.; Alonso, C.; Navarro-Ranniger, C. *Journal of Medicinal Chemistry* **1999**, *42*, 4264-4268. b) Leng, M.; Locker, D.; Giraud-Panis, M.-J.; Schwartz, A.; Intini, F.P.; Natile, G.; Pisano, C.; Boccarelli, A.; Giordano, D.; Coluccia, M. *Molecular Pharmacology* **2000**, *58*, 1525-1535. c) Najajreh, Y.; Perez, J.M.; Navarro-Ranniger, C.; Gibson, D. *Journal of Medicinal Chemistry* **2002**, *45*, 5189-5195. d) Khasanov, Y.; Barenholz, Y.; Gibson, D.; Najajreh, Y. *Journal of Medicinal Chemistry* **2002**, *45*, 5196-5204.
- ⁸¹ a) Coluccia, M.; Nassi, A.; Loseto, F.; Boccarelli, A.; Marigiò, M.A.; Giordano, D.; Intini, F.P.; Caputo, P.; Natile, G. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 510-512. b) Kelland, L.R.; Barnard, C.F.J.; Evans, I.G.; Murrer, B.A.; Theobald, B.R.C.; Wyer, S.B.; Goddard, P.M.; Jones, M.; Valenti, M.; Bryant, A.; Rogers, P.M.; Harrap, K.R. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 3016-3024. c) Coluccia, M.; Boccarelli, A.; Mariaggiò, M.A.; Cardelicchio, N.; Caputo, P.; Intini, F.P.; Natile, G. *Chem. Biol. Interact.* **1995**, *98*, 251-266. d) Farrell, N. *Metal Ions in Biological Systems*, Sigel, A.; Sigel, H., Eds., Marcel Dekker, New York, **1996**, vol. 32, pp. 603-639.
- ⁸² a) Brabec, V.; Vrana, O.; Novakova, O.; Kleinwachter, V.; Intini, F.P.; Coluccia, M.; Natile, G. *Nucleic Acids Research* **1996**, *24*, 336-341. b) Zaludova, R.; Zakowska, A.; Kasparkova, J.; Balcarova, Z.; Vrana, O.; Coluccia, M.; Natile, G.; Brabec, V. *Molecular Pharmacology* **1997**, *52*, 354-361. c) Boccarelli, A.; Coluccia, M.; Intini, F.P.; Natile, G.; Locker, D.; Leng, M. *Anticancer Drug Discovery* **1999**, *4*, 253-264.
- ⁸³ Novakova, O.; Kasparkova, J.; Malina, J.; Natile, G.; Brabec, V. *Nucleic Acids Research* **2003**, *31*(22), 6450-6460.
- ⁸⁴ Liu, Y.; Vinje, J.; Pacifico, C.; Natile, G.; Sletten, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12854-12862.
- ⁸⁵ a) Eastman, A.; Jennerwein, M.M.; Nagel, D.L. *Chem. Biol. Interact.* **1988**, *67*, 71-80. b) Pinto, A.P.; Lippard, S.J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 4616-4619. c) Lepre, C.A.; Chassot, L.; Costello, C.E.; Lippard, S.J. *Biochemistry* **1990**, *29*, 811-823.
- ⁸⁶ a) Dalbiès, R.; Payet, D.; Leng, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 8147-8151. b) Boudvillain, M.; Guérin, M.; Dalbiès, R.; Sison-Behmoaras, T.; Leng, M. *Biochemistry* **1997**, *36*, 2925-2931.

- ⁸⁷ Giraud-Panis, M.-J.; Leng, M. *Pharmacology & Therapeutics* **2000**, *85*, 174-181.
- ⁸⁸ Vlassov, V.V.; Gorn, V.V.; Ivanova, E.M.; Kazakov, S.A.; Mamaev, S.V. *FEBS Letters* **1983**, *162*, 286-289.
- ⁸⁹ a) Chu, B.C.F.; Orgel, L.E. *Nucleic Acids Research* **1989**, *17*, 4783-4798. b) Chu, B.C.F.; Orgel, L.E. *Nucleic Acids Research* **1990**, *18*, 5163-5171. c) Chu, B.C.F.; Orgel, L.E. *Nucleic Acids Research* **1991**, *24*, 6849-6854.
- ⁹⁰ Eastman, A. *Biochemistry* **1985**, *24*, 5027-5032.
- ⁹¹ Paquet, F.; Boudvillain, M.; Lancelot, G.; Leng, M. *Nucleic Acids Research* **1999**, *27*, 4261-4268.
- ⁹² a) Boudvillain, M.; Guérin, M.; Dalbiès, R.; Saison-Behmoaras, T.; Leng, M. *Biochemistry* **1997**, *36*, 2925-2931. b) Gee, J.E.; Robbins, I.; van der Laan, A.C.; van Boom, J.H.; Colombier, C.; Leng, M.; Raible, A.R.; Nelson, J.S.; Lebleu, B. *Antisense & Nucleic Acid Drug Development* **1998**, *8*, 103-111. c) Aupeix-Scheidler, K.; Chabas, S.; Bidou, L.; Rousset, J.-P.; Leng, M.; Toulmé, J.-J. *Nucleic Acids Research* **2000**, *28*, 438-445.
- ⁹³ a) Janik, M.B.L.; Lippert, B.; Leng, M. *J. Biol. Inorg. Chem.* **1999**, *4*, 645-653. b) Müller, J.; Drumm, M.; Boudvillain, M.; Leng, M.; Sletten, E.; Lippert, B. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2000**, *5*, 603-611.
- ⁹⁴ Reedijk, J. *Chem. Commun.* **1996**, 801-806.
- ⁹⁵ a) Schliepe, J.; Berghoff, U.; Lippert, B.; Cech, D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *35*, 646-648. b) Manchanda, R.; Dunham, S.; Lippard, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 5144-5145.
- ⁹⁶ Schmidt, K.S.; Filippov, D.V.; Meeuwenoord, N.J.; van der Marel, G.A.; van Boom, J.H.; Lippert, B.; Reedijk, J.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 375-376.
- ⁹⁷ a) Marchán, V.; Moreno, V.; Pedroso, E.; Grandas, A. *Chem Eur. J.* **2001**, *7*, 808-815. b) Marchán, V.; Pedroso, E.; Grandas, A. *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 1-8.

CONCLUSIONS

- El tractament de 5'-O-dimetoxitritil-1-[5-metil-4-(1,2,4-triazolil)-pirimidin-2(1*H*)-onil]-β-D-2'-desoxiribofuranòsid amb 2-(metiltio)etilamina o histamina permet obtenir anàlegs de citidina modificats amb grups tioèter (X^S) o imidazole (X^I), respectivament. Per a l'obtenció dels derivats fosforamidit, la fosfitilació de l'hidroxil 3' amb (2-cianoetoxi)cloro(*N,N*-diisopropilamino)fosfina en medi bàsic dóna millor resultat que la reacció amb (2-cianoetoxi)bis(*N,N*-diisopropilamino)fosfina i tetrazole. Utilitzant la metodologia estàndard del fosfit triester, aquests sintons poden ser incorporats en qualsevol posició d'una cadena oligonucleotídica sense que calgui protegir els grups tioèter o imidazole. De tota manera, per a evitar l'oxidació dels grups tioèter a sulfòxid al llarg de la síntesi cal emprar com a dissolvent acetonitril anhidre d'alta qualitat, i dur a terme l'oxidació dels fosfits a fosfats amb hidroperòxid de *t*-butil.

Durant la purificació i manipulació dels oligonucleòtids que contenen grups tioèter cal intentar minimitzar el contacte amb l'oxigen atmosfèric. Ara bé, cas de produir-se l'oxidació a sulfòxid, es pot recuperar l'oligonucleòtid reduït desitjat per tractament amb *N*-metilmercaptoacetamida.

La presència dels anàlegs nucleosídics amb grups tioèter o imidazole té un efecte desestabilitzant en els dúplexs que formen les cadenes modificades amb els oligonucleòtids complementaris. Aquest efecte és molt més marcat si la base modificada es troba al mig del dúplex que si es troba en un extrem, essent les diferències amb les temperatures de fusió dels dúplexs no modificats d'uns -20 i -5 °C, respectivament.

- Per a dur a terme la reacció d'oligonucleòtids amb transplatí, cal, prèviament, activar el complex metàl·lic. Dels tres mètodes assajats, la simple aquatització per escalfament en aigua és el protocol que permet obtenir crus menys heterogenis, i és el que s'ha emprat sistemàticament.

L'anàlisi per HPLC en fase reversa és la tècnica més convenient tant per a seguir les reaccions de platinació com per a l'aïllament dels diferents productes. La HPLC de bescanvi aniònic i l'electroforesi en gel de poliacrilamida (PAGE) han estat molt útils en alguns casos,

sobretot per analitzar l'evolució de les reaccions d'entrecruament. Ara bé, abans de procedir a caracteritzar els productes aïllats de HPLC de bescanvi aniònic cal efectuar un dessalatge de la mostra.

La informació que proporciona l'anàlisi per espectrometria de masses, juntament amb la que s'obté en utilitzar aquesta tècnica després d'haver tractat els adductes aïllats amb H₂O₂ i amb 3'- i 5'-exonucleases, ha permès dur a terme la seva caracterització. En alguns casos s'ha observat que les exonucleases, en no poder digerir un oligonucleòtid perquè estava platinada la base de l'extrem, començaven a degradar la molècula actuant com a endonucleases.

- Les reaccions de platinació d'oligonucleòtids que contenen X^S són molt ràpides. No s'han detectat mai adductes monofuncionals en els crús, sinó mesclades d'adductes bifuncionals intracadena en els quals el platí sempre està unit al sofre i a una de les altres nucleobases (preferentment guanina). Això indica que el primer punt de coordinació és el sofre del tioèter, i que molt ràpidament, com a conseqüència de l'efecte *trans* del grup tioèter, es formen els quelats. En absència d'adenines, citosines o guanines, el metall s'uneix al tioèter i a una timina, encara que en el medi de reacció les timines no estiguin desprotonades. Els quelats S-Pt-nucleobase no són gaire estables, observant-se desplatinació i/o interconversió durant la seva manipulació. Malgrat la dificultat que ha comportat la caracterització dels adductes formats, ha estat possible concloure que, en els oligonucleòtids de seqüència ⁵dX^SNNNN (N = A, C o T), majoritàriament es formen els adductes ⁵dX^SNNNN-Pt(NH₃)₂ i ⁵dX^SNNNN-Pt(NH₃)₂ (les bases marcades en negreta són les que s'uneixen al platí), i que la reacció de ⁵dTTX^STT amb transplatí condueix preferentment a adductes on la timina coordinant es troba cap a l'extrem 5' del nucleòsid modificat.
- La reacció amb transplatí d'oligonucleòtids model de seqüència ⁵dX^ITTNT (N ≠ T) són més ràpides a pH ~ 5.5 que a pH ~ 7.5, i evolucionen de manera diferent. A pH àcid es forma, en primer lloc, l'adducte monofuncional en què el metall s'uneix a la nucleobase N, que evoluciona cap al quelat ⁵dX^ITTNT-Pt(NH₃)₂ (de fet es tracta d'una mescla de dos productes, que resulten de la coordinació del platí a la nucleobase N i als dos nitrògens π i τ de l'anell imidazòlic). En medi bàsic es formen directament els quelats, excepte quan N = G en què també es detecta adducte monofuncional a l'inici de la reacció. L'oligonucleòtid ⁵dX^ITTTT no reacciona amb transplatí.

La platinació de l'oligonucleòtid ⁵dX^IACGTTGAG ha conduït a adductes on el transplatí coordina dues guanines, però no s'uneix a l'imidazole de X^I. Ara bé, sorprenentment, en comptes del quelat ⁵dX^IACGTT**GAG**-Pt(NH₃)₂ que hom esperaria trobar en base als

resultats descrits a la bibliografia, es formen majoritàriament els adductes $5'dX^lACGTTGAG-Pt(NH_3)_2$ i $5'dX^lACGTTGAG-Pt(NH_3)_2$. Duent a terme aquesta reacció en medis diferents, s'ha posat de manifest que la velocitat varia amb el medi de la següent manera: $H_2O >$ tampó perclorat/acetat pH 5.3 \geq tampó fosfat pH 7.0 \gg NaCl/MgCl₂/tampó fosfat pH 7.0 (en les darreres condicions $5'dX^lACGTTGAG$ no reacciona).

- Les reaccions dels oligonucleòtids $5'dX^sX^lTTTT$ i $5'dX^lX^sTTTT$ amb transplatí són força ràpides, i difereixen bàsicament en el fet que la reacció amb $5'dX^lX^sTTTT$ és, sobretot al principi, més neta. En els dos casos s'acaben formant els quelats $5'dX^sX^lTTTT-Pt(NH_3)_2$ i $5'dX^lX^sTTTT-Pt(NH_3)_2$, productes estables malgrat que un dels punts de coordinació del platí sigui el sofre del tioèter.

Quan les cadenes oligonucleotídiques contenen les dues nucleobases modificades i les quatre naturals ($5'dX^sX^lACGTTGAG$, $5'dX^lX^sACGTTGAG$), en els primers estadis de la reacció de platinació (tant en tampó fosfat a pH neutre, com en el medi lleugerament àcid de perclorat/acetat) es formen els adductes bifuncionals $5'dX^sX^lACGTTGAG-Pt(NH_3)_2$ i $5'dX^lX^sACGTTGAG-Pt(NH_3)_2$. Aquests quelats es poden aïllar, caracteritzar i manipular relativament bé (no són estables, per exemple a l'anàlisi per PAGE), però en el medi de reacció acaben evolucionant cap a quelats més estables ($5'dX^sX^lACGTTGAG-Pt(NH_3)_2$ i $5'dX^lX^sACGTTGAG-Pt(NH_3)_2$).

- En condicions que afavoreixen la formació de dúplex (tampó fosfat i medi neutre), tant $5'dX^sX^lACGTTGAG-Pt(NH_3)_2$ com $5'dX^lX^sACGTTGAG-Pt(NH_3)_2$ evolucionen, en presència de l'oligonucleòtid $3'dGTTTGTGCAACTC$, cap als dúplex amb les dues cadenes entrecruades ($5'dX^sX^lACGTTGAG-Pt(NH_3)_2-3'dGTTTGTGCAACTC$ i $5'dX^lX^sACGTTGAG-Pt(NH_3)_2-3'dGTTTGTGCAACTC$, respectivament).

Els mateixos productes finals d'entrecruament s'obtenen en fer reaccionar la cadena que conté les dues nucleobases modificades ($5'dX^sX^lACGTTGAG$ o $5'dX^lX^sACGTTGAG$), transplatí i $3'dGTTTGTGCAACTC$. El seguiment de l'evolució d'aquestes reaccions mostra que s'arriba al producte final més lentament que a partir d'un oligonucleòtid pre-platinat, i que abans de formar-se l'entrecruament té lloc la formació del quelat intracadena. La reacció amb $5'dX^lX^sACGTTGAG$ és més ràpida i dóna lloc a un percentatge del producte desitjat més gran que quan les bases modificades es troben en ordre invers ($5'dX^sX^lACGTTGAG$).

La repetició de la reacció que condueix a la formació de $5'dX^lX^sACGTTGAG-Pt(NH_3)_2-3'dGTTTGTGCAACTC$ a una escala més gran ha permès aïllar-lo en quantitats suficients com per a avaluar la seva estabilitat tèrmica i abordar un estudi estructural per RMN. El seguiment de la desnaturalització tèrmica per espectroscòpia ultraviolada ha posat de

manifest que l'entrecreuament produeix una gran estabilització del dúplex ($\Delta T_m = 40\text{ }^\circ\text{C}$), i les dades de RMN confirmen que es tracta d'una mescla de dos productes d'entrecreuament en els que la unitat de *trans*-Pt(NH₃)₂ està unida al N7 de la guanina i a cadascun dels dos nitrògens (π i τ) de l'imidazole de X^I.

L'estudi de les reaccions d'entrecreuament entre ⁵dX^IX^SACGTTGAG i cadenes complementàries que tan sols difereixen en l'ordre de les bases de la zona que no queda aparellada (³dGTTTGTGCAACTC, ³dTGTTGTGCAACTC, ³dTTGTGTGCAACTC i ³dTTTGGTCAACTC), ha mostrat petites diferències en la cinètica de les diferents reaccions. Encara més important, ha posat de manifest que en el producte final d'entrecreuament l'àtom metàl·lic sempre s'uneix a la guanina que en el dúplex queda "enfrentada" a X^S (³dNNNNGT...), fins i tot quan hi ha una altra guanina al costat (³dTTTGGT...).

Diferents experiments amb oligonucleòtids que no contenen X^S o en els que X^S s'ha oxidat a sulfòxid han fet palès el paper clau del grup tioèter per a fer que la reacció evolucioni cap al dúplex entrecreuat amb una extensió i cinètica raonables. S'ha vist, també, que la reacció entre un oligonucleòtid modificat, transplatí i una cadena no complementària no condueix a cap producte d'entrecreuament, posant-se de manifest que no hi ha entrecreuament si no hi ha hibridació entre les dues cadenes oligonucleotídiques, resultat molt rellevant per a una possible aplicació d'aquesta metodologia en teràpia antisentit.

1 OLIGONUCLEÒTIDS MODIFICATS AMB GRUPS TIOÈTER I/O IMIDAZOLE: SÍNTESI I ESTABILITAT DELS CORRESPONENTS DÚPLEXS

1.1 INTRODUCCIÓ

Tal i com s'ha comentat a la introducció de la Tesi, les nucleobases són un dels components dels oligonucleòtids sobre el qual s'han introduït un gran nombre de modificacions químiques.¹ Molt sovint, aquestes modificacions van encaminades a una millora de les propietats d'hibridació en presència d'una cadena complementària. Ara bé, en aquest treball, s'ha plantejat la introducció de grups funcionals adients per a una posterior interacció amb compostos de platí(II).

En el nostre grup de treball, s'han sintetitzat híbrids pèptid-oligonucleòtid^{*} i nucleopèptids[†] amb diferents finalitats.² Un dels conjugats sintetitzats, PhacHisGlyMet-espaiador-^{5'}dCATGGCT (Figura 1.1), s'ha utilitzat com a molècula model per a estudiar les interaccions que poden establir compostos com el cisplatí i el transplatí en presència de DNA i proteïnes.^{2b,2f}

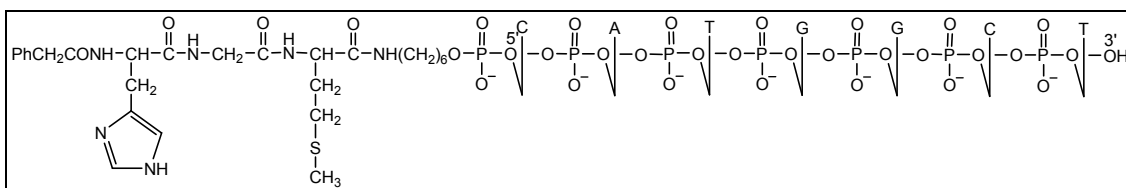


Figura 1.1. Estructura de l'híbrid pèptid-oligonucleòtid PhacHisGlyMet-espaiador-^{5'}dCATGGCT.

^{*} Terme que engloba qualsevol molècula de naturalesa híbrida que incorpora un fragment peptídic i un d'oligonucleotídics units mitjançant un enllaç covalent. Els termes híbrid i conjugat s'utilitzen indistintament.

[†] Híbrids pèptid-oligonucleòtid units per un enllaç de tipus fosfat diester entre la cadena lateral d'un aminoàcid hidroxilat (serina, treonina, tirosina, homoserina) d'un pèptid i l'extrem 3' o 5' d'un oligonucleòtid.

En el cas del cisplatí, s'ha observat la formació d'adductes tricoordinats que involucren la unió simultània del metall a histidina, metionina i una guanina. Aquests adductes són molt estables i romanen inalterats en presència de la cadena complementària. En la reacció amb transplatí, es formen adductes bifuncionals entre un aminoàcid i una nucleobase que, en presència de la cadena complementària, donen lloc a un entrecreuament intercadena (veure Figura 2.6 del capítol 2). A la vista dels resultats obtinguts i dels papers que juguen els aminoàcids metionina i histidina,^{2b,2f} s'ha plantejat la síntesi d'oligonucleòtids que continguin un "braç" amb un grup tioèter (mimetitzant el residu de metionina) i/o un grup imidazole (com el residu d'histidina), per a dur a terme estudis de platinació relacionats amb la teràpia antisentit (capítol 3). La possibilitat d'introduir en qualsevol punt de la cadena oligonucleotídica un nucleòtid modificat d'aquest tipus (Figura 1.2) representa un gran avantatge respecte a la síntesi d'híbrids pèptid-oligonucleòtid,³ donat que la preparació d'aquests anàlegs oligonucleotídics és, en principi, més senzilla.

Com ja s'ha comentat a la introducció de la Tesi, els anells pirimidínics han estat subjectes de múltiples modificacions. La posició 4 de la citosina, i especialment quan està "activada" (unida a un bon grup sortint), reacciona fàcilment amb nucleòfils.⁴ Les nucleobases derivades de citosina modificades en la posició 4 poden, en principi, hibridar-se amb la guanina formant els tres enllaços d'hidrogen necessaris pel reconeixement Watson-Crick, tot i que la presència de la modificació pot afectar lleugerament a l'estabilitat del dúplex.^{4b}

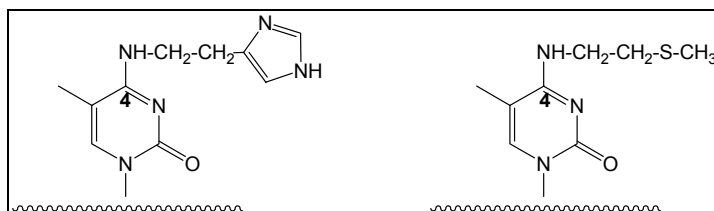


Figura 1.2. Anàlegs de 5-metilcitosina modificats en la posició 4 amb cadenes que contenen un imidazole o un grup tioèter.

La síntesi d'oligonucleòtids amb nucleobases pirimidíniques modificades en la posició 4 pot portar-se a terme usant dues alternatives diferents (Figura 1.3).⁴ La primera estratègia requereix la síntesi d'un monòmer específic per a cada nucleobase no natural que es vulgui introduir. En aquest cas, depenent del tipus de grups funcionals presents en les unitats modificades, caldrà tenir en compte un esquema de protecció ortogonal que garanteixi la seva compatibilitat química amb les metodologies emprades durant l'assemblatge en fase sòlida i posterior desprotecció i escissió de la cadena oligonucleotídica. En la segona estratègia, la cadena oligonucleotídica s'elonga usant un monòmer modificat que és precursor del nucleòsid objectiu. Aquest precursor, anomenat nucleòsid convertible, pot ser transformat a les etapes finals de la síntesi en tot un ventall de nucleòsids diferents, tots ells modificats en la posició 4

de l'anell pirimidínic. Aquesta segona estratègia pot ser molt útil en cas d'incorporar grups funcionals complexos, i ha estat emprada en el nostre grup.⁵ També és una metodologia interessant per a l'obtenció de biblioteques d'oligonucleòtids modificats, essent més senzilla que l'anterior perquè no comporta la síntesi de diferents monòmers nucleosídics. L'inconvenient és que no permet la introducció regioselectiva d'una determinada modificació en una cadena que conté diversos nucleòsids convertibles. Per aquesta raó, en el nostre treball es va optar per la primera estratègia, que consisteix en preparar cadascun dels monòmers modificats, per tal de poder incorporar les dues modificacions en una mateixa cadena oligonucleotídica.

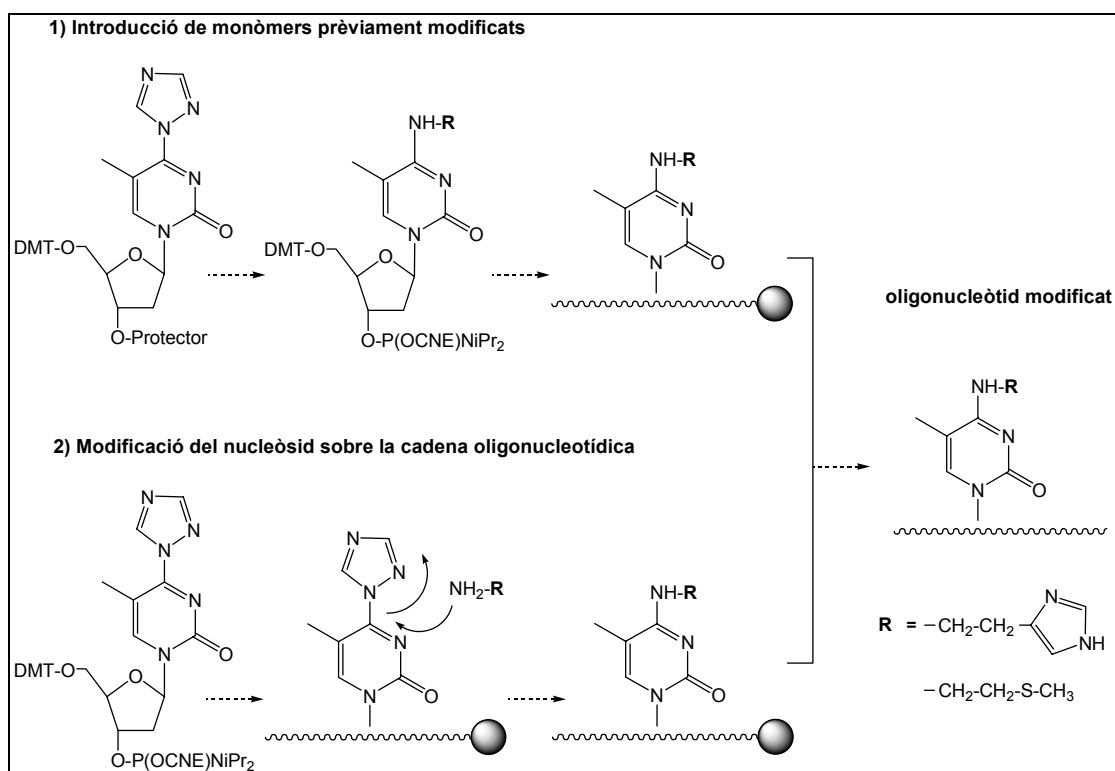


Figura 1.3. Estratègies per a la síntesi en fase sòlida d'oligonucleòtids modificats, emprant la metodologia del fosfit triester. En ambdós casos s'indica el grup triazole com a grup convertible.

Els dos derivats es prepararen fent ús de la tecnologia del nucleòsid convertible, emprant com a precursor comú un nucleòsid que conté un grup triazole a la posició 4 de l'anell pirimidínic.⁵ Existeixen altres tipus de grups convertibles, tots ells basats en la presència de grups aromàtics amb substituents electroatracants, que són bons grups sortints en presència d'una amina o d'un alcohol en medi bàsic.⁶ Tal i com es comenta més endavant, el grup triazole va donar molt bons resultats, de manera que no va ser necessari l'assaig amb altres derivats. D'aquesta manera, el nucleòsid amb la posició 4 activada reacciona amb una amina del tipus NH₂-CH₂-CH₂-R per a donar lloc a l'anàleg modificat (ja sigui amb un grup tioèter o amb un imidazole). Es van triar com a amines la 2-(metiltio)etilamina i la histamina, que són amines comercials que contenen els grups funcionals de les cadenes laterals dels aminoàcids metionina i histidina.

La síntesi dels oligonucleòtids es dugué a terme emprant la metodologia estàndard del fosfit triester, que en principi hauria de ser compatible amb les dues modificacions plantejades a les nucleobases (veure més endavant).⁷ A la Figura 1.4, s'esquemmatitzen les diferents etapes de cada cicle d'incorporació d'un nucleòtid (veure també l'apartat 3 de Materials i Mètodes).

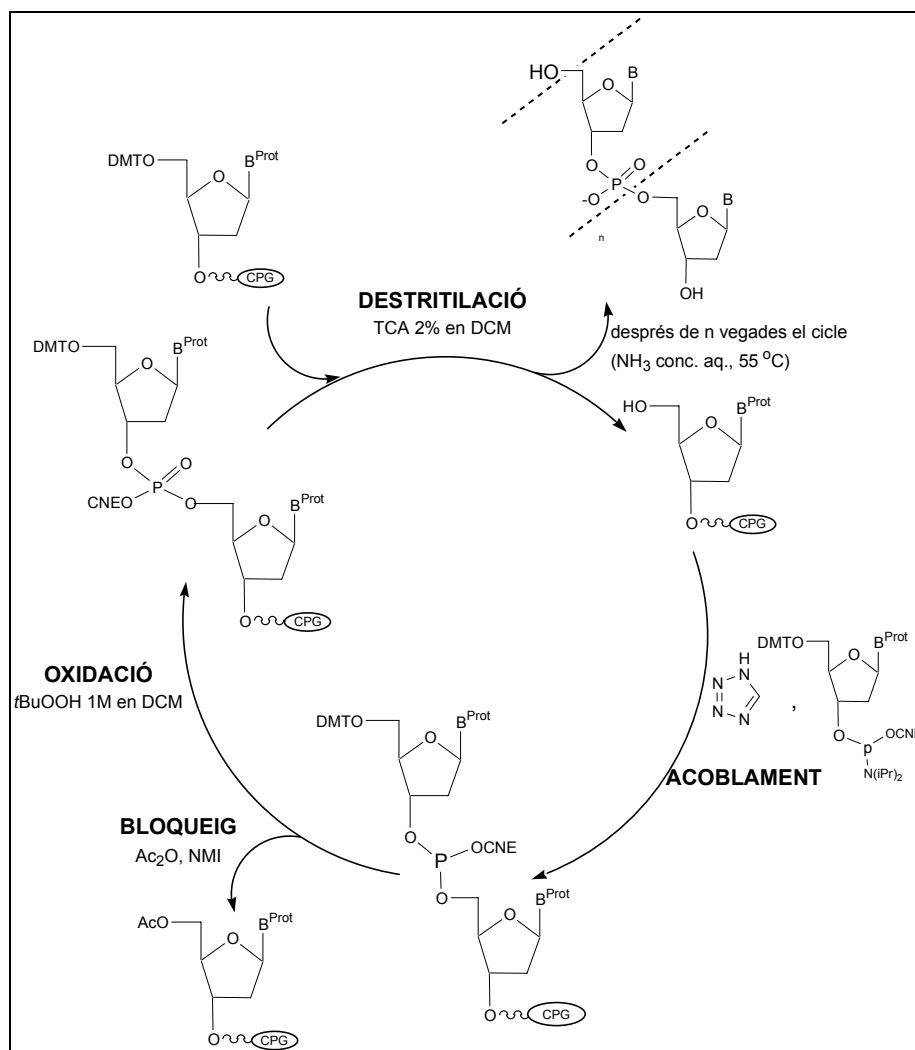


Figura 1.4. Esquema del cicle de síntesi d'oligonucleòtids pel mètode del fosfit triester.

L'elongació de la cadena es realitza de l'extrem 3' al 5'. El nucleòtid a incorporar es troba derivatitzat en forma de 2-cianoetil-*N,N*-diisopropilfosforamidit, espècie de P(III) que reacciona ràpidament en presència d'un catalitzador àcid. El tetrazol és suficientment àcid per protonar el nitrogen del fosforamidit i activar-lo, sense causar la pèrdua del grup 4,4'-dimetoxitritil que protegeix l'hidroxil en 5' ni hidrolitzar la unió glicosídica. L'espècie activada es condensa amb l'hidroxil 5' del nucleòtid ancorat al suport (boles de vidre de porus controlat, CPG), formant-se un grup fosfit triester que és relativament làbil. És per això que cal oxidar el P(III) a P(V) en cada cicle, donant lloc a la forma estable de fosfat triester. Els grups amino exocíclics de les

nucleobases naturals estan degudament protegits, en forma d'amida, amb un grup benzoïl (per a dA i dC) o isobutiril (per a dG). Un cop elongada la cadena, té lloc en una mateixa etapa la desprotecció de les nucleobases i dels grups fosfat, alhora que s'escindeix l'oligonucleòtid del suport CPG (tractament amb NH_3 conc. aquós a 55°C durant 12 h).

Per a la preparació d'oligonucleòtids que incorporen els nucleòsids modificats, calia sintetitzar els corresponents derivats fosforamidit, les estructures dels quals es mostren a la Figura 1.5. Els grups protectors són els estàndards: 4,4'-dimetoxitritil per a l'hidroxil 5' i 2-cianoetil per al fosforamidit.

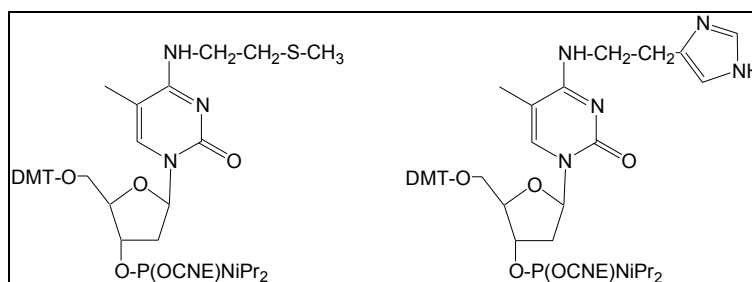


Figura 1.5. Derivats fosforamidit que permeten la introducció dels nucleòsids amb les nucleobases modificades (DMT: 4,4'-dimetoxitritil; CNE: 2-cianoetil).

Així, doncs, en aquesta primera part de la Tesi s'aborda la síntesi dels derivats nucleòsid-fosforamidit modificats que es mostren a la Figura 1.5. Posteriorment, es realitza la introducció dels nucleòsids modificats a cadenes oligonucleotídiques. La problemàtica d'incorporar aquests dos derivats, i en particular la necessitat o no de protegir els grups funcionals tioèter i imidazole, es discuteix en els apartats 1.2 i 1.3. Finalment, s'estudia l'efecte de la presència d'aquestes modificacions a l'estabilitat de dúplexs de DNA.

La tria de les seqüències oligonucleotídiques respon a criteris lligats als estudis de platinació que es descriuen en els capítols 2 i 3 de la Memòria.

1.2 INTRODUCCIÓ DEL GRUP TIOÈTER EN CADENES OLIGONUCLEOTÍDIQUES MODEL

A la bibliografia s'han trobat dos exemples d'incorporació de la 2-(metiltio)etilamina en cadenes de DNA o RNA seguint la segona estratègia esquematitzada a la Figura 1.3, on el braç amb el grup tioèter s'introdueix després de la síntesi de la cadena oligonucleotídica. D'una banda, s'ha incorporat la 2-(metiltio)etilamina a una cadena de DNA que conté O^6 -[2-(*p*-nitrofenil)etil]-2-fluoro-2'-desoxiinosina (NPE-FdI),⁸ la qual per reacció amb una solució aquosa concentrada de 2-(metiltio)etilamina dóna lloc a una guanina modificada en posició 2 (Figura 1.6).⁹ En un segon treball, la mateixa amina es fa reaccionar amb cadenes de RNA que contenen un nucleòsid

convertible (ja sigui derivat de citosina, guanina o adenina),¹⁰ tractant l'oligonucleòtid ancorat a resina amb una solució 2 M d'amina en metanol, durant 18 h a 42 °C.

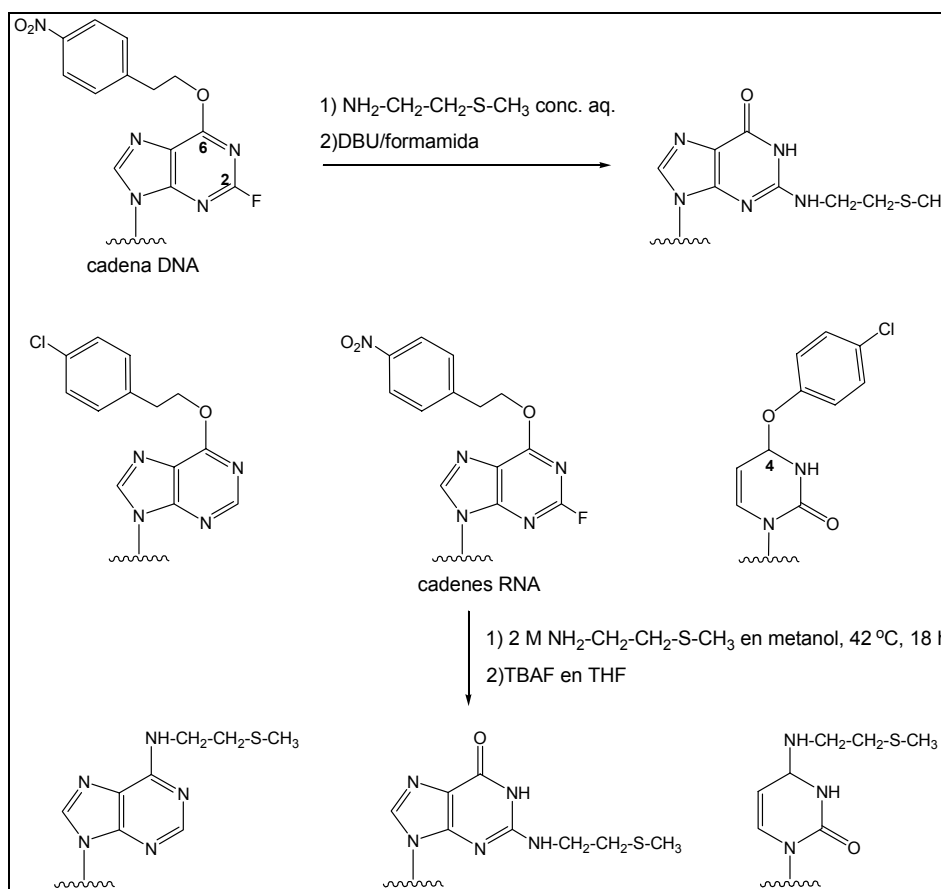


Figura 1.6. Incorporació de la 2-(metiltio)etilamina en cadenes de DNA o RNA que contenen un nucleòsid convertible. Aquesta reacció té lloc amb l'oligonucleòtid protegit ancorat a resina.

En el nostre cas, tal i com s'ha comentat prèviament, es va seguir l'estratègia que consisteix en la síntesi del derivat fosforamidit degudament modificat i posterior incorporació a la cadena oligonucleotídica.

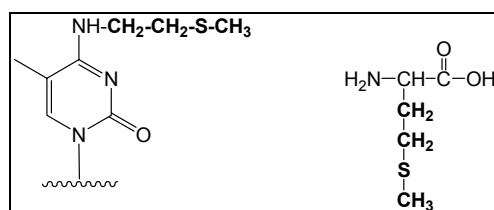


Figura 1.7. Semblança entre la modificació de la nucleobase i la cadena lateral de la metionina.

Com es mostra a la Figura 1.7, el braç que s'uneix al N-4 és idèntic a la cadena lateral de l'aminoàcid metionina. Per tant, abans d'introduir-lo en oligonucleòtids calia estudiar la problemàtica que planteja aquest aminoàcid. És ben conegut que aquest residu aminoacídic és molt sensible a experimentar canvis en el grup tioèter de la seva cadena lateral durant la síntesi peptídica.¹¹ La principal reacció secundària de la metionina és l'alquilació de l'àtom de sofre amb carbocations per a donar lloc a sals de sulfoni relativament estables. Aquest procés pot tenir lloc durant les etapes de desprotecció repetitiva dels grups amino en condicions àcides, o bé durant el tractament acidolític final d'escissió i desprotecció. D'altra banda, la metionina és sensible a l'oxidació espontània amb oxigen atmosfèric per a donar el derivat metionina sulfòxid.¹² Aquesta reacció secundària es pot produir tant a nivell de peptidil-resina durant l'elongació del pèptid com durant el processat del mateix després de l'escissió de la resina. El risc d'oxidació es veu incrementat quan hi ha etapes de fotòlisi en l'estratègia sintètica,¹³ o bé quan és necessari l'ús d'agents oxidants. L'ús de metionina sulfòxid durant la síntesi peptídica en fase sòlida evita la S-alquilació i l'oxidació que afecten al grup tioèter.¹⁴

Quan es vol sintetitzar un híbrid pèptid-oligonucleòtid fent créixer la cadena oligonucleotídica sobre la peptidil-resina,¹⁵ el grup tioèter es pot veure afectat sobretot a l'etapa d'oxidació del cicle de síntesi estàndard d'oligonucleòtids (veure Figura 1.4). En el cas d'emprar el derivat de metionina-sulfòxid, en síntesi de nucleopèptids s'ha observat una reducció parcial del grup funcional, probablement per reacció amb les espècies de P(III) presents en el medi durant l'etapa d'acoblament.¹⁶ Se sap que els sulfòxids són capaços d'oxidar compostos de P(III) a derivats de P(V),¹⁷ amb la seva concomitant reducció a tioèters. Per tant, és concebible que durant la incorporació de cada nucleòtid en el cicle de síntesi, alguns dels grups sulfòxid siguin reduïts a tioèter. D'altra banda, en l'etapa d'oxidació dels fosfites a fosfats amb *t*BuOOH pot tenir lloc altre cop una re-oxidació del grup tioèter a la forma sulfòxid, tot i que hi ha alguns autors que descriuen que l'ús de *t*BuOOH en dissolució anhidra evita l'oxidació de grups tioèter a sulfòxid.¹⁸

En el nostre cas, s'optà per treballar amb el grup tioèter sense protegir. En cas que durant les etapes d'oxidació dels fosfites a fosfats tingués lloc una oxidació del grup tioèter, caldria una etapa extra de reducció amb *N*-metilmercaptoacetamida (MMA).¹⁹ Aquest reactiu és soluble en aigua i totalment compatible amb els oligonucleòtids, però la reacció de reducció no és ràpida i sovint és incompleta.

1.2.1 Síntesi del derivat fosforamidit del nucleòsid modificat amb un grup tioèter

Per a la modificació de la posició 4 de la pirimidina, és necessari treballar amb el nucleòsid amb els dos hidroxils de l'anell de desoxiribosa protegits. Inicialment, es va provar d'introduir el triazole en la posició 4 de l'anell de timidina protegint l'hidroxil 3' amb el grup protector trimetilsilil (TMS).²⁰ Partint del nucleòsid comercial 5'-dimetoxitritimidina, la síntesi es va portar

a terme sense aïllar el producte intermedi (veure Figura 1.8), ja que emprant el trimetilsilil-1,2,4-triazole com a agent sililant només es genera triazole com a subproducte de la primera reacció. Per a la segona, s'afegia més triazole, oxiclòrid de fòsfor i trietilamina. L'anàlisi del cru resultant de la reacció amb trimetilsilil-1,2,4-triazole per EM ES (+) i per ^1H RMN va indicar la presència tant del producte desitjat com del producte sense el protector TMS. L'intent d'aïllar el nucleòsid triazolilat per cromatografia en columna de gel de sílice no va funcionar, ja que només es va recuperar el producte de partida. Així, doncs, tant el grup triazolil com el trimetilsilil no es mostraren prou estables a les condicions de purificació.

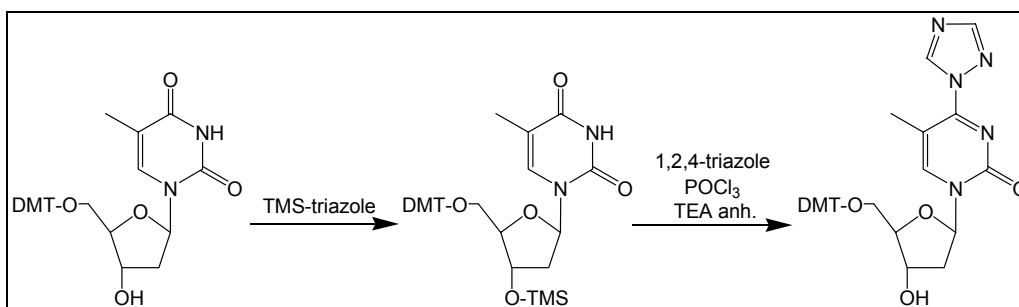


Figura 1.8. Intent de triazolilació prèvia protecció de l'hidroxil 3' de la 5'-dimetoxitritilimidina.

Degut a la labilitat del grup trimetilsilil, es decidí protegir l'hidroxil 3' amb el grup *t*-butildimetilsilil (TBDMS). A la Figura 1.9 es mostra la seqüència sintètica de cinc etapes que va permetre l'obtenció del fosoramidit modificat amb el penjoll de tioèter amb un rendiment global del 48 %.

Es va partir del derivat 5'-dimetoxitritilimidina comercial i en primer lloc es va protegir l'hidroxil 3' per reacció amb clorur de *t*-butildimetilsilil i imidazole com a catalitzador. L'excés d'agent sililant s'hidrolitzà per addició de metanol al medi de reacció, però el *t*-butildimetilsilanol no es va poder eliminar per precipitació sobre hexà, ja que part del producte desitjat se solubilitza en aquest dissolvent. El producte es va purificar per cromatografia en columna de gel de sílice, condicions en què el grup protector TBDMS és prou estable.⁵

La següent etapa sintètica va consistir en l'activació de la posició 4 de la timidina. A la Figura 1.10 es mostra el mecanisme de la reacció d'introducció del grup triazole a la posició C4 de la timidina. El punt clau de la reacció és la preparació de la mescla de 1,2,4-triazole, trietilamina anhidra i oxiclòrid de fòsfor, per formar l'espècie activa POtriaz₃. En una segona etapa, l'oxigen en posició 4 de l'anell de timidina pot atacar el fòsfor de POtriaz₃, assistit per la trietilamina del medi, i finalment és una molècula de triazolur la que desplaçaria l'oxigen unit a fòsfor. Tot i que la reacció està descrita a la bibliografia,^{5,21} va resultar difícil la reproducció del procediment experimental i fins i tot es provaren altres relacions molars entre els components d'aquesta mescla.²² Cal no oblidar que en aquells casos en què el derivat nucleosídic no reaccionà quantitativament, no es pogué aïllar el producte desitjat per cromatografia en columna de gel de sílice, ja que el derivat amb el grup triazolil no resulta ser prou estable, tal i com ja s'havia vist

anteriorment. De fet, en la majoria d'articles en què es descriu l'obtenció d'aquest derivat, no es realitza cap purificació del producte mitjançant cromatografia.⁵ D'altra banda, MacMillan i Verdine^{4b} han comentat la dificultat de treballar amb 4-triazolilpirimidines, per efectes d'instabilitat del grup triazolil. Per tant, quan s'obtingué una conversió total a producte "triazolilat" i amb un grau de puresa del nucleòsid acceptable, es dugué a terme la següent reacció sense cap etapa addicional de purificació. Un tret característic d'aquest derivat nucleosídic és el fet que el metil en posició 5 de l'anell pirimidínic surt a camps més baixos que el metil de la timidina en l'anàlisi per ¹H-RMN, segurament degut a l'efecte de l'anell de triazole.

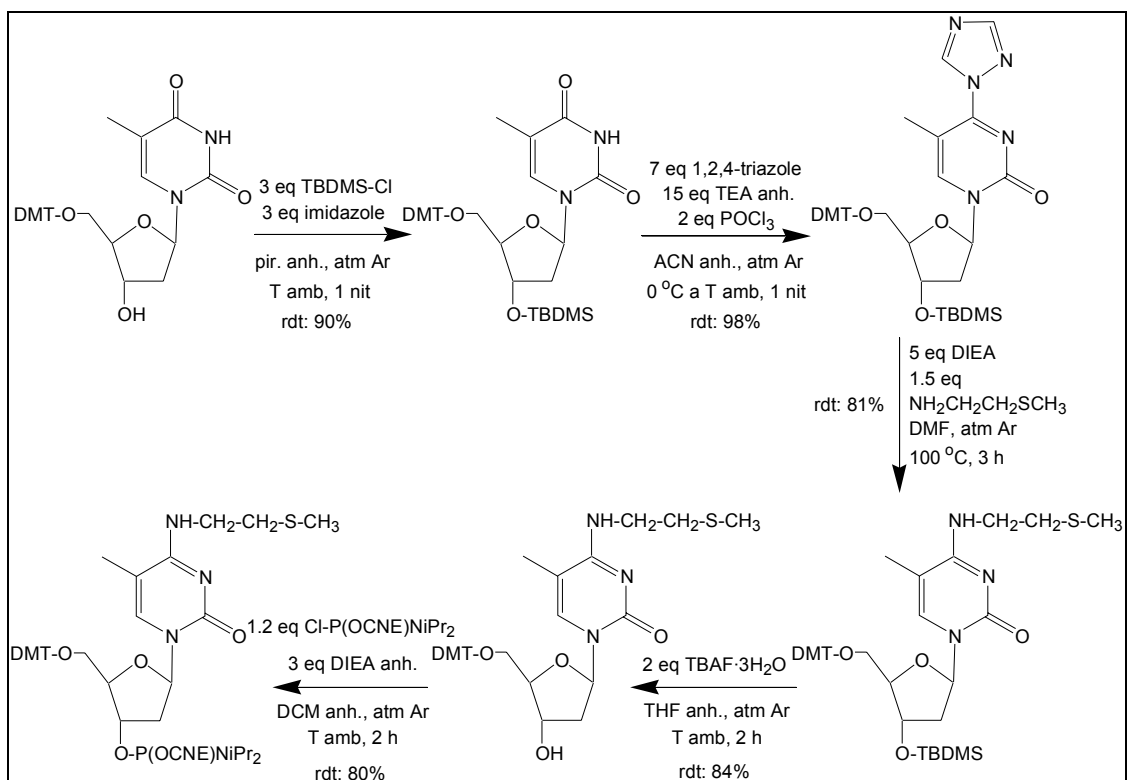


Figura 1.9. Síntesi del derivat fosforamidit del nucleòsid modificat amb un penjoll de tioèter.

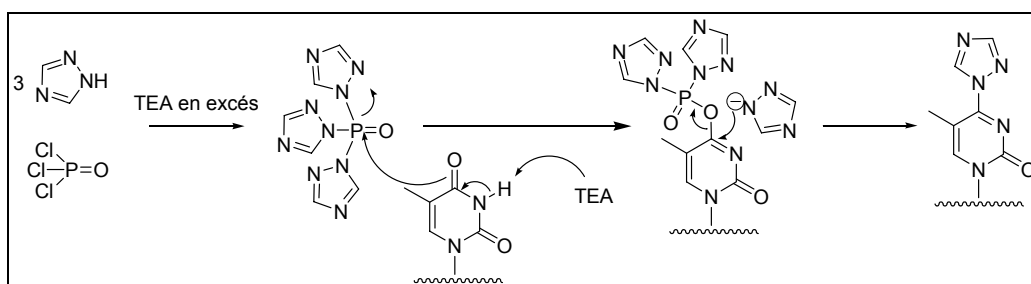


Figura 1.10. Mecanisme de la reacció d'introducció del triazole sobre el C4.

Així, doncs, un cop obtingut el derivat triazòlic, té lloc l'etapa d'incorporació de la 2-(metiltio)etilamina. En un primer assaig, es va fer reaccionar el nucleòsid "triazolilat" amb l'amina a temperatura ambient en ACN anh., en presència de trietilamina per tal d'assegurar que l'amina reaccionant no estigués en forma protonada, però no va funcionar. En escalfar a 100 °C, emprant DMF i en presència de DIEA, la reacció va procedir satisfactòriament, aïllant-se el producte desitjat per cromatografia en columna de gel de sílice amb bon rendiment. La presència d'aquest nou grup funcional es detectà per ¹H-RMN, observant l'aparició d'un senyal característic a $\delta = 2.13$ ppm que correspon al metil unit a sofre. En cas que el grup tioèter estigués en forma oxidada a sulfòxid, el metil sortiria desplaçat ~ 0.5 ppm a camps més baixos.

Posteriorment a la introducció de l'aminotioèter, es va eliminar el grup protector *t*-butildimetilsilil de l'hidroxil 3' per tractament amb fluorur de tetrabutilamoni i es va funcionalitzar en forma de fosforamidit, sintó necessari per a la síntesi oligonucleotídica.

Per a aquesta darrera etapa, inicialment s'assajaren diferents condicions de reacció, emprant (2-cianoetoxi)bis(*N,N*-diisopropilamino)fosfina (bisfosfina) com a agent fosfitilant, el qual necessita un agent catalitzador àcid. L'ús de tetrazole va conduir a un baix grau de fosfitilació, i l'addició de tetrazolur de diisopropilamoni²³ i més fosfina només va millorar lleugerament la conversió.

Donada la baixa reactivitat del derivat nucleosídic, s'assajà la reacció amb un agent fosfitilant més reactiu, la (2-cianoetoxi)cloro(*N,N*-diisopropilamino)fosfina (clorofosfina). En aquest cas, s'observà una millora en la solubilitat dels diferents productes reaccionants, assolint-se una fosfitilació de l'hidroxil quantitativa, donat que la clorofosfina i l'amina (DIEA) van ajudar a una millor homogeneïtzació del medi de reacció. Per precipitació sobre hexà fred s'obtingué el fosforamidit desitjat, que s'analitzà per ³¹P-RMN, HPLC i CCF, observant-se en tots els casos els dos senyals corresponents a les dues formes diastereomèriques del derivat sintetitzat (la introducció de l'àtom de fòsfor genera un nou centre quiral).

1.2.2 Incorporació en oligonucleòtids del nucleòsid modificat amb un grup tioèter

Un cop preparat el derivat fosforamidit del nucleòsid modificat amb un grup tioèter, es va procedir a la seva introducció en cadenes oligonucleotídiques. Tal i com s'ha comentat a l'apartat 1.2, es va decidir no protegir el grup tioèter, i es va emprar *t*BuOOH en DCM anhidre, en comptes de I₂ aq., perquè en principi això hauria d'evitar l'oxidació del grup tioèter durant l'etapa d'oxidació dels grups fosfit a fosfat (veure la Figura 1.4).²⁴

Primerament, es realitzaren dues síntesis d'oligonucleòtids curts amb tot timines i un nucleòtid modificat amb tioèter (X^S al mig de la seqüència o a l'extrem 5'), per tal de detectar possibles problemes deguts a la modificació introduïda. Posteriorment, es van sintetitzar cadenes amb la

resta de nucleòtids naturals. L'interès de totes aquestes seqüències és l'estudi de la seva reacció amb transplatí (capítol 2).

1.2.2.1 Síntesi de $5'dX^S$ TTTT

La síntesi es va dur a terme a escala petita (0.2 μ mol) i sobre un suport de CPG (*controlled pore glass* o boles de vidre de mida de porus controlat), seguint la metodologia estàndard per a la síntesi d'oligonucleòtids amb el mètode del fosfit triester (apartat 3 de Materials i Mètodes).

Tal i com s'explica a la Part Experimental (apartat 1.2.1.1), es van assajar diferents temperatures i temps de reacció en l'etapa d'escissió, conclouent que la modificació és estable a les condicions estàndard de desprotecció i escissió d'oligonucleòtids (NH₃ conc. aquós, 55 °C, 12 h).

La incorporació del nucleòtid modificat va tenir lloc en un 62 %, de manera que en el cru d'escissió es va observar la presència del producte de delecció corresponent a la no incorporació del nucleòtid modificat ($5'd$ TTTT). Aquest percentatge d'incorporació és relativament baix, però posteriorment s'ha comprovat que la utilització del derivat fosforamidit liofilitzat de benzè anhidre (apartat 1.3.2 a la Part Experimental) permet l'eliminació de traces d'humitat i de trietilamina, de manera que s'obté un percentatge d'incorporació similar al dels derivats fosforamidit dels nucleòsids comercials (superior al 98 %).

L'anàlisi del cru per HPLC en fase reversa (Figura 1.11-A) i EM MALDI-TOF va indicar que el producte desitjat s'havia obtingut quantitativament en forma oxidada (t_R : 18.8 min), juntament amb diferents productes de delecció. Així, doncs, tot i emprar una dissolució de *t*BuOOH en dissolvents anhidres, el grup tioèter s'havia oxidat. Aquest resultat no és sorprenent, ja que anteriorment s'havia comprovat que el nucleòsid modificat en solució s'oxida en presència d'aquest reactiu.

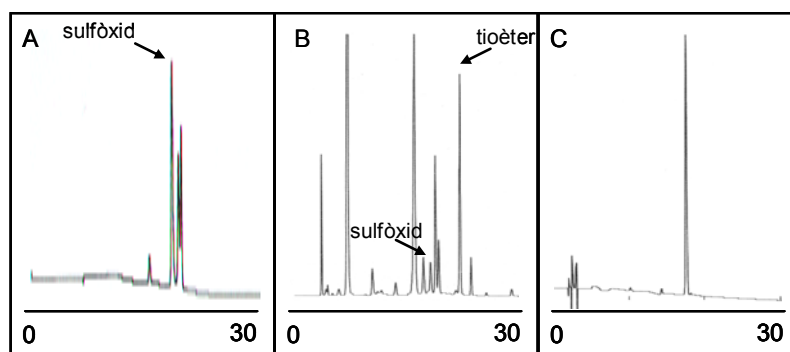


Figura 1.11. Perfils de HPLC de $5'dX^S$ TTTT corresponents al cru d'escissió (A), després de l'etapa de reducció i eliminació parcial d'impureses de l'agent reductor (B) i del producte reduït purificat (C). [gradient: 5-35 % de B en 30 min a A i B, 10-40 % de B en 30 min a C].

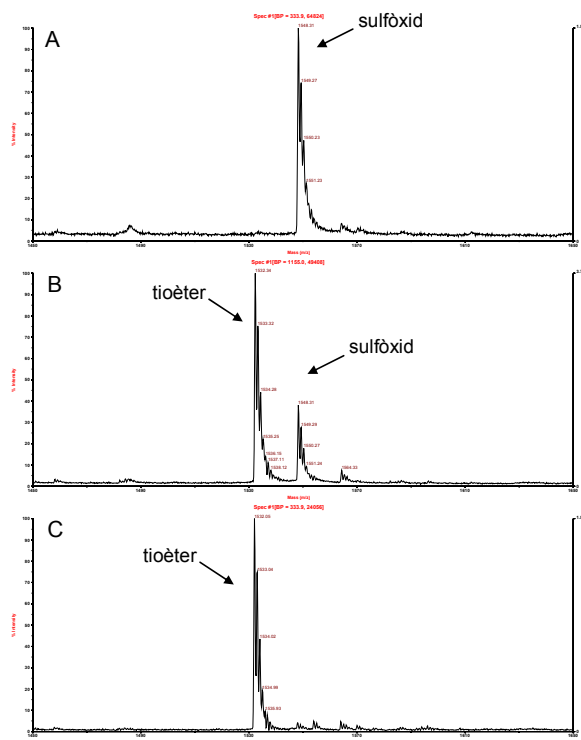


Figura 1.12. Espectres de masses (MALDI-TOF) corresponents a la reacció de reducció de $5'$ dX^STTTT amb MMA, a l'inici (A), als 2 dies (B) i als 5 dies (C).

Degut a l'oxidació del nucleòtid modificat, calgué una etapa de reducció que es portà a terme (sense prèvia purificació del cru sintètic) amb *N*-metilmercaptoacetamida (MMA),¹⁹ agent reductor habitual per a la reducció en condicions suaus de pèptids que contenen residus de metionina sulfòxid. Aquest reductor també s'ha demostrat efectiu a nivell de nucleopèptids,¹⁶ ja que és completament compatible amb una cadena oligonucleotídica. Cal dir, però, que la cinètica de reducció és lenta i sovint no s'arriba a una conversió quantitativa. En el nostre cas, s'assolí una conversió aproximada del 80 % als 5 dies de reacció. El seguiment de la reacció es va realitzar per HPLC en fase reversa (obtenint-se crús molt bruts degut a l'agent reductor) i per EM MALDI-TOF del propi cru de reducció. Aquesta tècnica es va mostrar molt adient per al seguiment de la reacció de reducció (veure Figura 1.12).

En una primera etapa, es van eliminar gran part de restes orgàniques del propi agent de reducció mitjançant elució a través de columnes NAP, per tal de facilitar la posterior purificació de l'oligonucleòtid mitjançant HPLC en fase reversa (veure a la Figura 1.11, els cromatogrames del cru de reducció després de la cromatografia d'exclusió molecular (B) i del producte desitjat purificat (C)). També s'aïllà l'oligonucleòtid de seqüència troncada $5'$ dX^STTT, que posteriorment va emprar-se per a alguns assajos enzimàtics i de platinació. Per quantificació mitjançant UV es va determinar un rendiment global del 11 %.

Un aspecte rellevant a tenir en compte és la capacitat de reconeixement dels oligonucleòtids modificats amb el grup tioèter (i/o imidazole) per part de les nucleases. En el nostre cas, és especialment important per tal de dur a terme la caracterització dels oligonucleòtids platinats (capítols 2 i 3) mitjançant digestions enzimàtiques. Així, doncs, es va emprar l'oligonucleòtid $5'dX^S TTT$ per a determinar com afecta el nucleòtid modificat amb un grup tioèter a la capacitat nucleolítica de les 3'- i 5'-exonucleases (més fosfatasa alcalina). Es van realitzar paral·lelament les dues digestions, seguint el protocol descrit a l'apartat 3.7 de Materials i Mètodes. D'altra banda, es va tractar una petita mostra de 5'-O-dimetoxitritil-1-[5-metil- N^4 -(2-metiltioetil)]-2'-desoxicitidina amb una dissolució d'àcid trifluoroacètic al 5 % en DCM, per tal d'eliminar el grup DMT i disposar d'un patró del nucleòsid modificat (X^S) per a l'anàlisi per HPLC. Com es pot veure als cromatogrames següents (Figura 1.13), en ambdues digestions es van detectar dos pics, que corresponen a timidina i al nucleòsid modificat amb el grup tioèter (t_R : 24.7 min). A partir de l'àrea dels dos pics, es va determinar una composició en nucleòsids que coincideix amb l'esperada. Aquest resultat és important pel fet que indica que la presència del penjoll de tioèter no afecta a la capacitat de reconeixement de la cadena oligonucleotídica per part d'ambdues exonucleases (ni de la fosfatasa alcalina, que permet la corresponent digestió a nucleòsids), la qual cosa és de gran utilitat en la posterior anàlisi d'oligonucleòtids platinats (capítols 2 i 3).

També cal indicar que els oligonucleòtids modificats amb el grup tioèter es van mostrar completament estables, tret d'una lleugera oxidació del grup tioèter amb el temps.

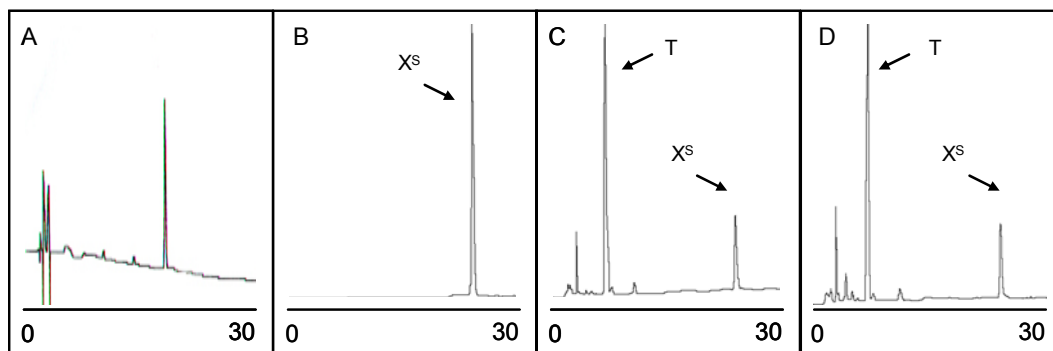


Figura 1.13. Perfils de HPLC de $5'dX^S TTT$ (A), del patró del nucleòsid modificat X^S (B) i dels crús de digestió enzimàtica de $5'dX^S TTT$ (3'- i 5'-exonucleases, C i D respectivament). [gradient: 5-35 % de B en 30 min a A i el típic per a aquest tipus d'estudis a B-D].

1.2.2.2 Síntesi de $5'dTTX^S TT$, $5'dX^S CCCC$, $5'dX^S AAAA$, $5'dX^S GGGG$ i $5'dX^S GGGGTT$

La síntesi de $5'dTTX^S TT$ va permetre avaluar l'estabilitat de la nucleobase modificada a la repetició de les diferents etapes del cicle de síntesi dels oligonucleòtids. En aquest cas també es va detectar el producte de doble oxidació, és a dir, el grup tioèter oxidat a sulfona, en una

relació sulfòxid/sulfona 84:16. La corresponent etapa de reducció amb MMA va permetre reduir el grup sulfòxid a tioèter, tot i que no quantitativament, no tenint evidència que la sulfona s'hagués pogut reduït. Tot i així, després de l'etapa de purificació, es va obtenir un 18 % del producte desitjat.

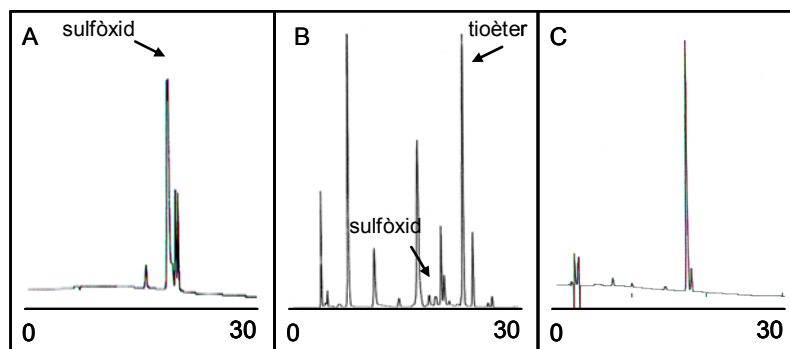


Figura 1.14. Perfils de HPLC del cru d'escissió de $5'dTTX^S TT$ (A), després de l'etapa de reducció i cromatografia d'exclusió molecular (B) i del producte reduït purificat $5'dTTX^S TT$ (C). [gradient: 5-35 % de B en 30 min a A i B, 10-40 % de B en 30 min a C].

Així, doncs, semblava que la incorporació del nucleòsid modificat al mig d'una seqüència oligonucleotídica comportava un cert problema perquè hi havia sobreoxidació parcial a sulfona, ja que la seva reducció es podria veure dificultada. Ara bé, com s'explica més endavant, posteriorment es va aconseguir sintetitzar oligonucleòtids modificats amb tioèter, de seqüència més llarga, sense que ni tan sols es donés oxidació a sulfòxid (veure apartat 1.5.2).

A les síntesis de $5'dX^S CCCC$, $5'dX^S AAAA$, $5'dX^S GGGG$ i $5'dX^S GGGGTT$, la incorporació del nucleòsid modificat va ser quantitativa en tots els casos. L'anàlisi dels crus d'escissió i desprotecció per EM MALDI-TOF va posar de manifest que el producte desitjat s'havia obtingut en forma oxidada (sulfòxid) de manera que, com en els casos anteriors, va ser necessària una etapa de reducció. Un cop assolida la situació estacionària (5 dies), es va procedir directament a la purificació per MPLC en fase reversa. A la Figura 1.15 es mostren els cromatogrames dels crus i dels productes purificats.

Pel que fa la síntesi de $5'dX^S CCCC$, cal destacar que es va aïllar amb una puresa superior al 98 % (rendiment global del 23 %), mentre que l'oligonucleòtid $5'dX^S AAAA$ presentava una puresa de l'ordre d'un 90 % (rendiment global del 5 %). Tenint en compte el baix rendiment, no es va considerar oportuna una etapa de repurificació de $5'dX^S AAAA$, i posteriorment es realitzaren els estudis de platinació amb el producte amb aquest grau de puresa. El problema bàsic de la seqüència $5'dX^S GGGG$ fou la seva baixa solubilitat en aigua, de manera que tot i aïllar el producte pur no es va poder quantificar ni emprar en els estudis de platinació. Finalment, la síntesi de $5'dX^S GGGGTT$ va donar lloc al producte pur, que no presenta tants problemes de

solubilitat com $5'dX^S GGGG$, podent-lo aïllar i quantificar (rendiment global del 3 %), així com emprar-lo en els posteriors estudis de platinació

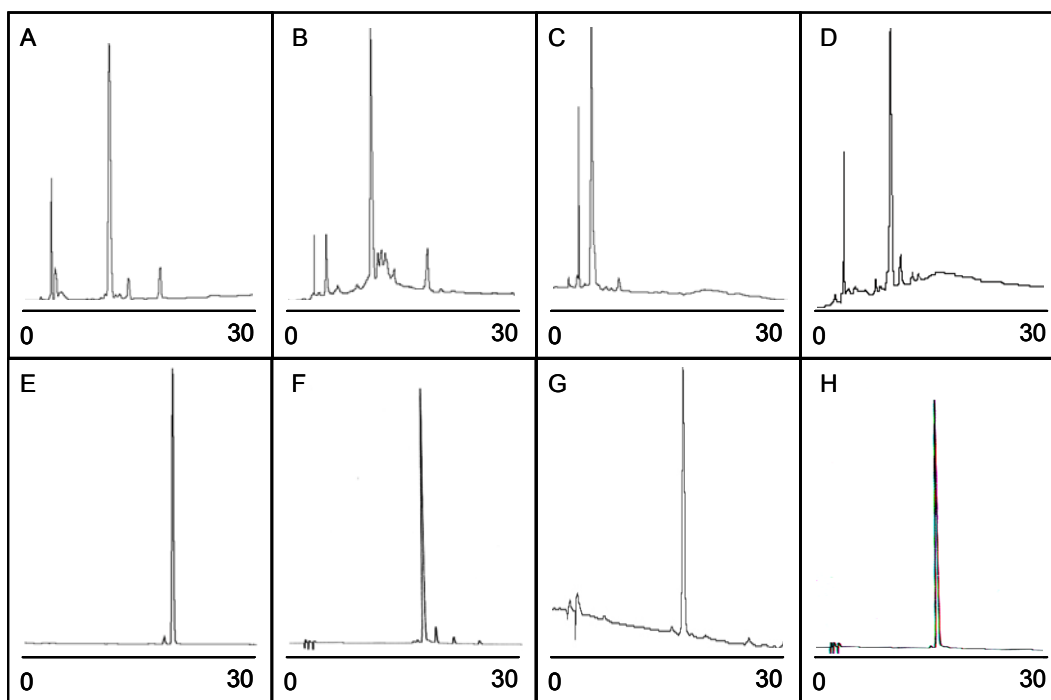


Figura 1.15. Perfils de HPLC dels crus d'escissió de $5'dX^S CCCC$ (A), $5'dX^S AAAA$ (B), $5'dX^S GGGG$ (C) i $5'dX^S GGGGTT$ (D), i dels corresponents productes reduïts purificats (E-H, respectivament). [gradient: 10-40 % de B en 30 min a A-D i 5-35 % de B en 30 min a E-H].

Així, doncs, es pot concloure que el nucleòsid modificat amb un grup tioèter (X^S) s'incorpora correctament a cadenes oligonucleotídiques de diferent seqüència, tot i que el grup tioèter s'oxida a sulfòxid durant la síntesi i és necessària una etapa addicional de reducció amb MMA. Com es descriu més endavant, alguns canvis en les condicions experimentals permeten l'obtenció d'oligonucleòtids que incorporen el nucleòsid modificat X^S sense oxidació al grup tioèter.

Un resultat rellevant per a la posterior caracterització d'adductes platinats d'oligonucleòtids que incorporen aquesta modificació és el fet que X^S no impedeix la degradació per part de les 3'- i 5'-exonucleases, les quals actuen de la mateixa manera que amb els nucleòsids naturals.

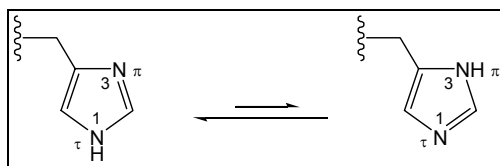
1.3 INTRODUCCIÓ DEL GRUP IMIDAZOLE EN CADENES OLIGONUCLEOTÍDIQUES MODEL

La histidina és un aminoàcid natural que presenta un grup imidazole a la cadena lateral. Dels tres residus bàsics proteïnogènics, la histidina és el que presenta un menor caràcter bàsic, amb un pKa de 6.1.²⁵ En condicions fisiològiques, existeixen quantitats pràcticament equimolars

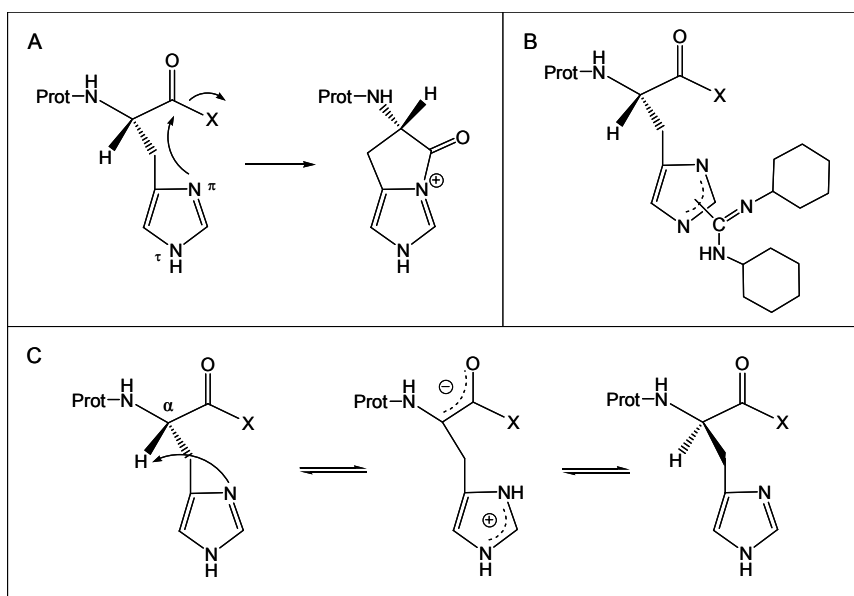
d'imidazole lliure i d'imidazole en forma protonada. Per aquest motiu, la histidina és un aminoàcid que està involucrat en un elevat número de processos biològics, formant part del centre actiu de nombrosos enzims, actuant com a donador-acceptor de protons en funció de les necessitats de l'entorn. Per exemple, té un paper clau en aldolases, serinproteases (com la α -quimotripsina)²⁶ i les ribonucleases.²⁷ D'altra banda, la histidina és un component clau de les metal·loproteïnes,²⁸ en les que interacciona amb un ió metàl·lic, bé sigui actuant en el centre actiu (en aquest cas la funció de la proteïna sol ser de transport de l'ió metàl·lic), bé sigui determinant l'estructura de la proteïna (com és el cas dels dominis coneguts com a dits de zinc).

La introducció d'anells imidazòlics a cadenes oligonucleotídiques està essent cada vegada més freqüent, ja sigui per al disseny de petites molècules que mimetitzin centres actius (aplicacions catalítiques, en forma de ribozims i DNazims) o per a millorar la internalització dels oligonucleòtids a les cèl·lules. La introducció en oligonucleòtids d'anells imidazòlics s'ha realitzat unint un braç histamínic amb un enllaç internucleosídic fosforamidat al grup amino,²⁹ o per enllaç a l'extrem 5' de l'oligonucleòtid mitjançant un espaiador de tipus amida,³⁰ o bé en forma de residu d'histidina per donar lloc a un conjugat pèptid-oligonucleòtid.³¹ Degut a les capacitats tant catalítica com quelant de l'anell imidazòlic, s'han dissenyat ribonucleases artificials constituïdes per un oligonucleòtid antisentit unit covalentment a un residu d'histidina o bé a un anell imidazòlic³² (molt sovint acompanyat d'un residu de lisina,³³ aminoàcid que també juga un paper molt important en el centre actiu de molts enzims). La idea, formulada per primer cop fa més de 15 anys, és sintetitzar conjugats d'oligonucleòtids antisentit amb un fragment del centre actiu d'una ribonucleasa com a grup reactiu, per tal d'escindir cadenes de RNA per uns punts específics.³⁴ D'aquesta manera, s'han mimetitzat enzims com la ribonucleasa A³⁵ (enzim que conté dues histidines i una lisina en el centre catalític), amb la capacitat d'hidrolitzar RNA per unes posicions específiques d'una seqüència diana.^{30,31a,36} D'altra banda, s'ha estudiat la capacitat dels grups imidazole de fusionar membranes de liposomes,³⁷ així com d'afavorir la transfecció de material genètic,³⁸ sempre i quan el pH del medi sigui lleugerament àcid (per tal que l'anell imidazòlic es trobi protonat). Així mateix, la internalització d'oligonucleòtids models de dodecatimidines s'ha vist afavorida en cèl·lules HeLa per la unió covalent de sis residus histamínics a l'àtom de fòsfor (en forma de fosforamidat), de manera que s'han introduït a l'interior cel·lular mitjançant endocitosi, seguit d'una desestabilització de la membrana, i un cop en el citoplasma els oligonucleòtids s'han localitzat en el nucli.³⁹

En el nostre cas, l'interès d'incorporar grups imidazole a cadenes oligonucleotídiques rau en el fet que l'anell d'imidazole és un bon lligand per coordinar amb el platí, de manera que pot competir amb les nucleobases naturals per a interaccionar amb aquest ió metàl·lic. L'anell imidazòlic presenta un equilibri tautomèric desplaçat cap a la forma en la qual el N τ està protonat (Figura 1.16).


Figura 1.16. Equilibri tautomèric de l'anell d'imidazole.

El caràcter àcid-bàsic i nucleòfil que presenta l'anell d'imidazole és la causa de possibles reaccions secundàries en el transcurs de la síntesi peptídica. Per una part, es pot formar una espècie cíclica durant l'activació de l'aminoàcid⁴⁰ que condueix a l'escissió de la cadena peptídica (Figura 1.17-A), pot tenir lloc l'acilació⁴¹ de l'anell en un dels dos nitrògens, i la reacció amb l'agent acoblant diciclohexilcarbodiimida per donar un anàleg d'isourea⁴² (Figura 1.17-B). Tot i així, la reacció secundària més important de la histidina és la racemització que pot experimentar durant el seu acoblament, pel fet que l'anell imidazòlic pot arrencar el protó situat en posició α donant lloc al corresponent enolat⁴³ (Figura 1.17-C).


Figura 1.17. Reaccions secundàries lligades a la presència de l'anell d'imidazole lliure durant la síntesi peptídica. A: escissió de la cadena peptídica; B: guanidilació de l'anell imidazòlic; C: racemització al C $^{\alpha}$.

Per tant, per a l'elongació de pèptids cal treballar amb l'anell imidazòlic protegit, bàsicament per evitar la racemització. En el cas de la preparació de nucleopèptids, dels possibles grups protectors existents per a la cadena lateral d'histidina, tant el grup 2,4-dinitrofenil (Dnp) com el tosil (Tos) són compatibles amb la síntesi oligonucleotídica sobre una peptidil-resina, tot i que el tetrazole va eliminant parcialment el grup tosil. Ambdós són làbils a les condicions habituals d'escissió i desprotecció dels oligonucleòtids (NH_3 conc. aq.). D'altra banda, s'ha comprovat que durant l'elongació de la cadena oligonucleotídica no és necessària la protecció de

l'imidazole, alhora que la presència dels grups protectors Dnp o Tos donen lloc a crús de síntesi més impurs.^{31b} No s'han detectat productes deguts a la possible fosfitilació de l'anell imidazòlic lliure durant l'acoblament dels fosforamidits a la cadena oligonucleotídica (Figura 1.18).⁴⁴

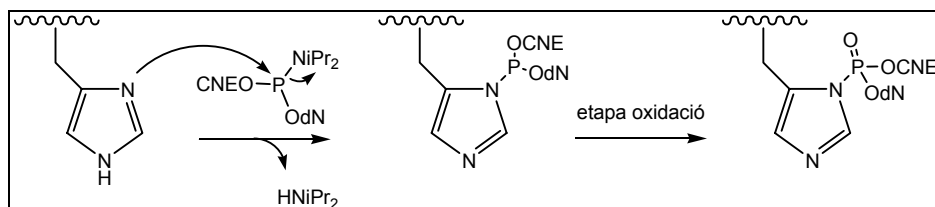


Figura 1.18. Mecanisme per a la possible fosfitilació de l'anell imidazòlic durant la síntesi oligonucleotídica.

En aquest treball, com ja s'ha comentat, per a la introducció d'un grup imidazole a cadenes oligonucleotídiques es va preparar un fosforamidit de metilcitosina modificat en la posició 4 amb un braç d'histamina. Arran dels resultats obtinguts prèviament,^{3,31b} no es va considerar necessari protegir l'anell d'imidazole durant la síntesi oligonucleotídica.

1.3.1 Síntesi del derivat fosforamidit del nucleòsid modificat amb un grup imidazole

Per a l'obtenció del derivat fosforamidit del nucleòsid modificat amb un grup imidazole, es va partir del mateix derivat nucleosídic amb un grup triazole en la posició 4 de l'anell pirimidínic que per a la síntesi del derivat fosforamidit amb un penjoll de tioèter (apartat 1.2.1). El nucleòsid amb l'anell de triazole és, per tant, un precursor comú per a la preparació dels fosforamidits dels dos anàlegs de citidina.

La incorporació de la histamina es va realitzar escalfant a 100 °C per tal d'afavorir la solubilitat de l'amina en DMF. La reacció va tenir lloc amb bon rendiment i no va ser necessària cap etapa de purificació. El producte desitjat es va caracteritzar tant per RMN com per EM ES (+).

L'eliminació del grup protector TBDMS es va portar a terme amb fluorur de tetrabutilamoni i, tot i que en cap cas es va assolir una conversió total a producte desprotegit, el rendiment de l'etapa va ser força bo.

L'etapa final de fosfitilació es va realitzar amb les condicions de reacció optimitzades per al fosforamidit amb el braç de tioèter. Així, doncs, es va emprar clorofosfina i DIEA, solubilitzant la mescla reaccionant amb DCM/ACN 6:1. Només va ser necessària una etapa de precipitació sobre hexà fred per tal d'eliminar subproductes d'hidròlisi en forma d'hidrogenfosfonat.

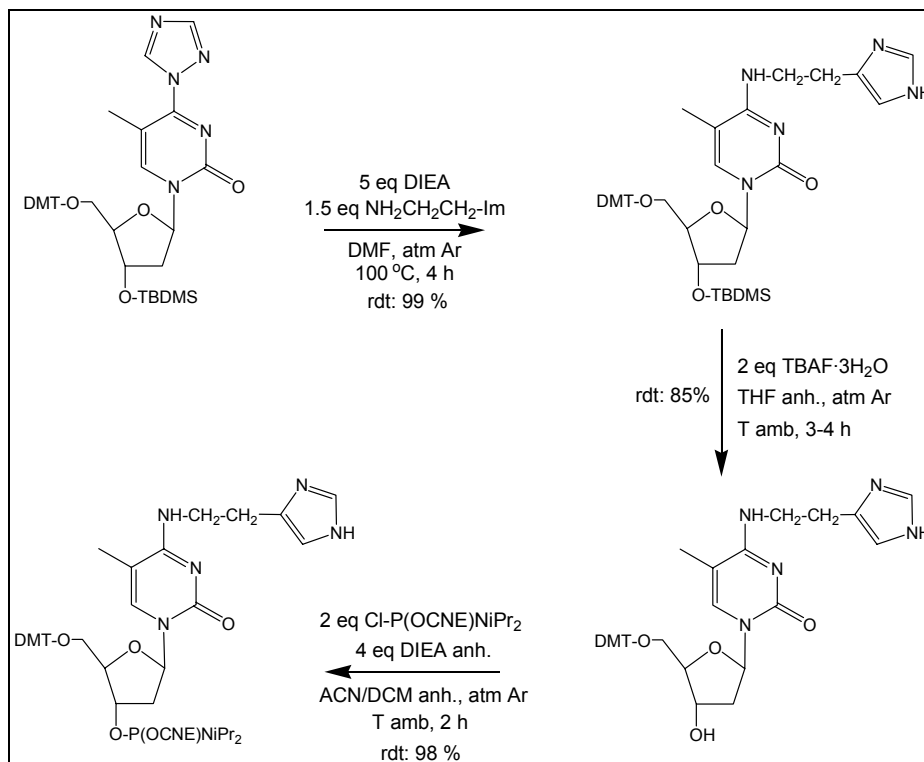


Figura 1.19. Esquema sintètic d'obtenció del derivat fosforamidit modificat amb un penjoll imidazòlic.

Globalment, partint de la 5'-dimetoxitritilimidina comercial, es va obtenir el derivat fosforamidit objectiu amb un rendiment del 77 % per a una seqüència de cinc etapes (Figura 1.19). Aquest rendiment és superior al de la síntesi del fosforamidit de tioèter (48 %), i bàsicament és el resultat d'una millor conversió en l'etapa d'introducció de l'amina funcionalitzada (on no va ser necessària una etapa de purificació) i d'una òptima derivatització de l'hidroxil 3' en forma de fosforamidit.

1.3.2 Incorporació en oligonucleòtids del nucleòsid modificat amb un grup imidazole: síntesi de $5'dX^lTTTT$, $5'dX^lTTCT$, $5'dX^lTTAT$ i $5'dX^lTTGT$

Malgrat els antecedents, que indicaven que no calia protegir l'imidazole per l'assemblatge de cadenes oligonucleotídiques, en primer lloc es va sintetitzar l'oligonucleòtid $5'dX^lTTTT$ per tal d'avaluar com tenia lloc la incorporació del nucleòsid modificat amb l'anell imidazòlic (X^l) emprant la metodologia estàndard de síntesi d'oligonucleòtids, així com detectar possibles reaccions secundàries. Donat els bons resultats obtinguts, es va procedir a la preparació dels altres oligonucleòtids amb totes les nucleobases naturals.

En l'anàlisi del cru d'escissió de $^5\text{dX}^1\text{TTTT}$ per EM MALDI-TOF, no es va observar que la presència de l'anell imidazòlic lliure en el derivat de 5-metilcitosina hagués donat lloc a cap producte secundari.

En la preparació de $^5\text{dX}^1\text{TTCT}$, $^5\text{dX}^1\text{TTAT}$ i $^5\text{dX}^1\text{TTGT}$, la incorporació del fosforamidit modificat no va ser quantitativa (50-60 %), tal i com es mostra als diferents cromatogrames dels crús d'escissió i desprotecció (veure Figura 1.20), on a més a més del producte desitjat es detecta l'oligonucleòtid de delecció corresponent ($^5\text{dTTCT}$, $^5\text{dTTAT}$ o $^5\text{dTTGT}$). En aquest cas es va emprar un lot diferent del fosforamidit de X^1 , i la presència de traces d'humitat o de trietilamina podria explicar la mala incorporació d'aquest derivat. La liofilització de benzè sembla, doncs, aconsellable.

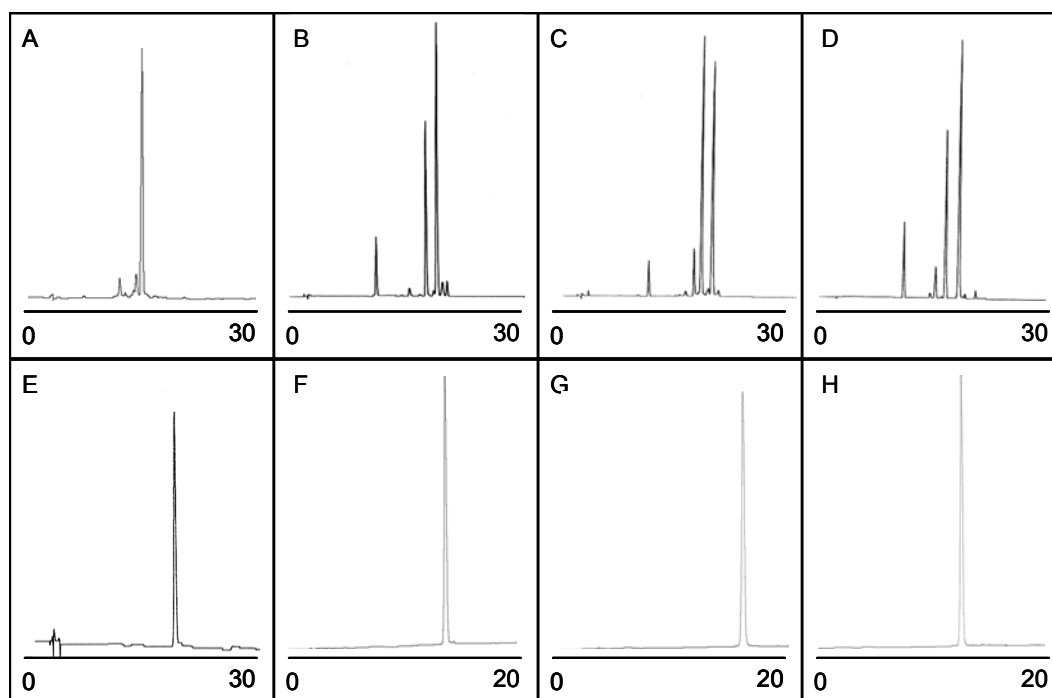


Figura 1.20. Perfils de HPLC dels crús d'escissió de $^5\text{dX}^1\text{TTTT}$ (A), $^5\text{dX}^1\text{TTCT}$ (B), $^5\text{dX}^1\text{TTAT}$ (C) i $^5\text{dX}^1\text{TTGT}$ (D), i dels corresponents productes purs (E-H, respectivament). [gradient: 10-40 % de B en 30 min a A, 5-35 % de B en 30 min a B-E i 10-30 % de B en 20 min a F-H].

D'altra banda, és important destacar que la 3'-exonucleasa reconeix el nucleòsid modificat X^1 , resultat interessant per a la caracterització estructural d'adductes platinats (capítols 2 i 3).

1.4 INTRODUCCIÓ DELS DOS GRUPS FUNCIONALS: SÍNTESI DE $5'dX^S X^L TTTT$ I $5'dX^L X^S TTTT$

Un cop comprovat que és possible la introducció de cadascuna de les nucleobases modificades en un oligonucleòtid seguint la metodologia estàndard, es va plantejar la síntesi de cadenes curtes amb la presència de les dues modificacions. Aquestes es van introduir a l'extrem 5' d'una seqüència de quatre timines.

En ambdues síntesis, el rendiment d'incorporació dels derivats fosforamidit modificats va ser del mateix ordre que el de timidina i l'anàlisi per HPLC (Figura 1.21) va mostrar un producte majoritari que correspon a l'oligonucleòtid oxidat en el grup tioèter. Així, doncs, també va ser necessària una etapa de reducció amb MMA.

La digestió enzimàtica amb la 3'-exonucleasa i fosfatasa alcalina va donar els valors esperats per als nucleòsids. Per tant, s'han pogut preparar oligonucleòtids amb la incorporació dels dos nucleòsids modificats X^S i X^L , no observant-se cap incompatibilitat sintètica ni de caracterització mitjançant enzims.

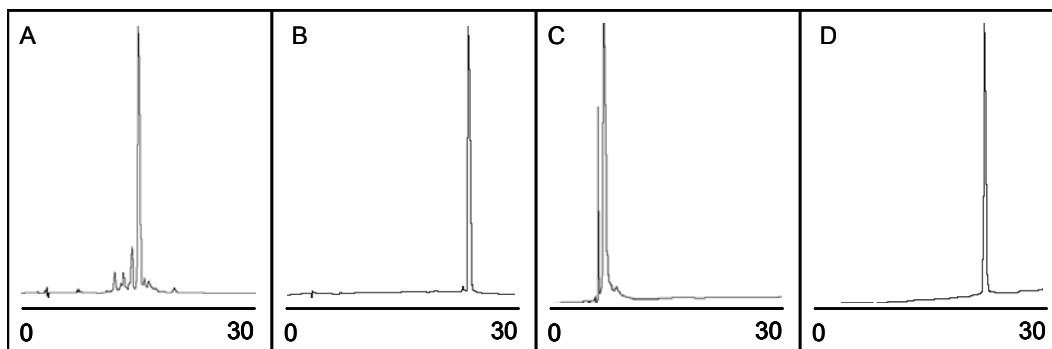


Figura 1.21. Perfils de HPLC dels crús d'escissió de $5'dX^S X^L TTTT$ (A) i $5'dX^L X^S TTTT$ (C), i dels productes purs (B i D, respectivament). [gradient: 10-40 % de B en 30 min a A i C, 5-35 % de B en 30 min a B i D].

1.5 AVALUACIÓ DE L'ESTABILITAT DE DÚPLEXS EN ELS QUE UNA CADENA INCORPORA MODIFICACIONS TIOÈTER I/O IMIDAZOLE

Les nucleobases modificades emprades en aquest treball, X^S i X^L , són derivats de 5-metilcitosina que poden interaccionar amb una guanina complementària formant els mateixos enllaços d'hidrogen de tipus Watson-Crick que la citosina sense modificar. És conegut que el metil en posició 5 no impedeix estèricament la interacció, sinó que sembla tenir un efecte estabilitzant per efectes electrònics.⁴⁵ El substituent en la posició 4 de l'anell pirimidínic en principi no té perquè impedir la formació del tercer enllaç d'hidrogen amb la guanina, ja que es pot situar també al solc major. Tot i així, s'ha observat una disminució en l'estabilitat de dúplexs

en els que intervenen nucleobases similars (tota una varietat de cadenes alquíliques amb grups funcionals diferents, però sense la posició 5 metilada).^{4b} Això pot estar relacionat amb el fet que, per tal que hi hagi aparellament de tipus Watson-Crick, s'ha de formar el rotàmer *anti* entre l'enllaç C4-N⁴, que és el menys afavorit termodinàmicament (veure Figura 1.22).⁴⁶ En el nostre cas, el rotàmer *anti* encara estaria menys afavorit termodinàmicament, pel fet que hi ha un grup metil en 5 que suposa una major interferència estèrica que un simple hidrogen. Per tant, malgrat que no calia esperar que aquestes modificacions establitessin el dúplex de DNA, es va voler estudiar quin era el seu efecte. Per una banda, es va estudiar l'efecte de les nucleobases modificades a l'estabilitat d'un dúplex de nou parells de bases, on la modificació es troba a la part central d'una de les cadenes. Per altra banda, es va estudiar l'efecte d'introduir les modificacions a l'extrem 5' d'una seqüència oligonucleotídica que se sap que té interès en teràpia antisentit (vegeu apartat 1.5.2).

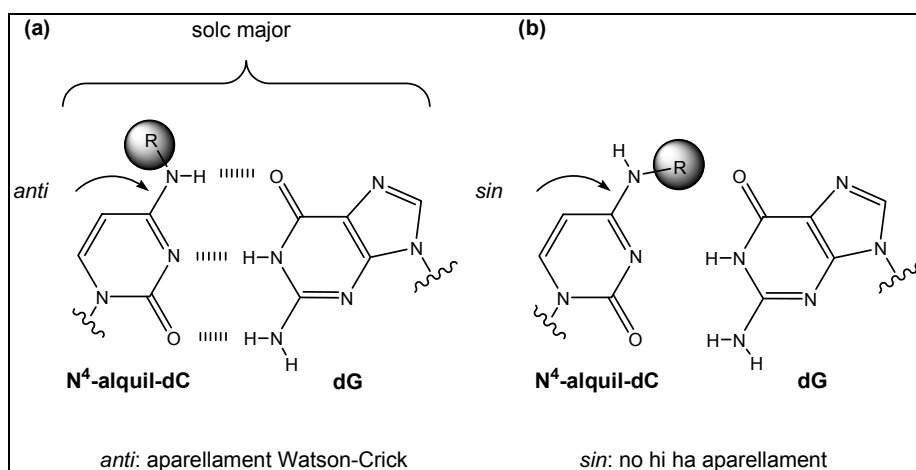


Figura 1.22. El rotàmer *anti* de N⁴-alquil-dC (a) està desafavorit termodinàmicament en el nucleòsid lliure, però afavorit en el DNA perquè pot formar aparellament de Watson-Crick amb dG, mentre que el rotàmer *sin* (b) no permet la interacció mitjançant aquests enllaços d'hidrogen.

1.5.1 Efecte d'una modificació central a l'estabilitat d'un dúplex

L'estudi de l'efecte d'una nucleobase modificada situada enmig d'una cadena oligonucleotídica en l'estabilitat d'un dúplex es va dur a terme amb una seqüència de nou bases: ⁵dGCATXCAGC, on X és X^S o X^L. L'estabilitat dels dúplexs formats per una d'aquestes cadenes i la complementària, ³dCGTAGGTTCG, s'ha comparat amb la del dúplex control on X = C.

Els diferents oligonucleòtids, ⁵dGCATCCAGC, ⁵dGCATX^SCAGC, ⁵dGCATX^LCAGC i ³dCGTAGGTTCG, es van sintetitzar a escala 1 μmol sobre boles de vidre, tal i com s'explica a la part experimental d'aquesta Memòria. En conjunt, es van obtenir uns crús sintètics on el producte majoritari per HPLC en fase reversa corresponia a l'oligonucleòtid desitjat, el qual es va aïllar en tots els casos mitjançant MPLC. Com en els casos anteriors, l'oligonucleòtid modificat amb un grup tioèter es va obtenir en la forma de sulfòxid, alhora que es va observar la

presència d'un subproducte de 66 unitats de massa menor que la forma oxidada. En realitzar l'etapa de reducció amb MMA, es va detectar la massa de l'oligonucleòtid reduït i la d'aquest subproducte (que no va variar de massa, i que per tant és de 50 unitats menor respecte a l'oligonucleòtid desitjat). La presència d'aquest subproducte ja s'havia detectat per EM MALDI-TOF de forma molt minoritària en algunes de les síntesis d'oligonucleòtids de mida curta, tot i que en aquest cas la seva presència va ser molt més destacable. La separació cromatogràfica d'ambdós productes va ser difícil, i és per aquest motiu que $5'dGCATX^S CAGC$ es va obtenir amb un rendiment força inferior a la resta de seqüències.

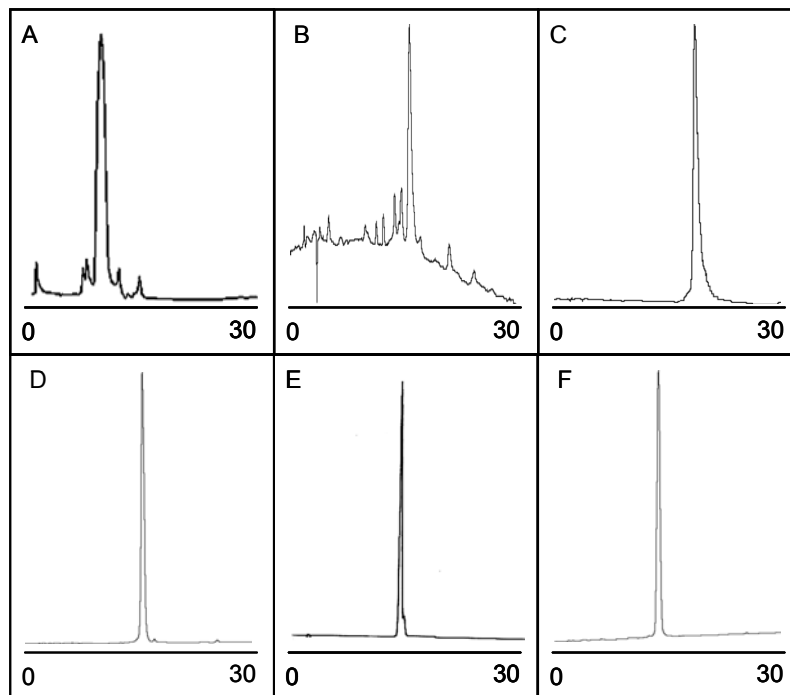


Figura 1.23. Perfils de HPLC dels crús d'escissió de $5'dGCATX^S CAGC$ (A) i de $5'dGCATX^I CAGC$ (B), i dels productes purificats $5'dGCATX^S CAGC$ (C), $5'dGCATX^I CAGC$ (D), l'oligonucleòtid control (E) i la cadena complementària (F). [gradient: 10-40 % de B en 30 min a A, 5-35 % de B en 30 min a B-F].

Per tal d'assegurar una composició en nucleòsids correcta, es van realitzar les corresponents digestions enzimàtiques. A la Figura 1.24, es mostren els perfils de HPLC obtinguts per a les tres cadenes que només varien en el nucleòsid X, de manera que es pot comparar la diferent distribució dels pics cromatogràfics corresponents als nucleòsids C, X^S o X^I . Els nucleòsids modificats presenten un màxim d'absorció al voltant de 277 nm, de manera que enregistrant el cromatograma a 260 nm (λ típica per a l'anàlisi d'oligonucleòtids i nucleobases naturals) i a 277 nm, s'observa una variació en la intensitat dels pics que ajuda a identificar la nucleobase modificada.

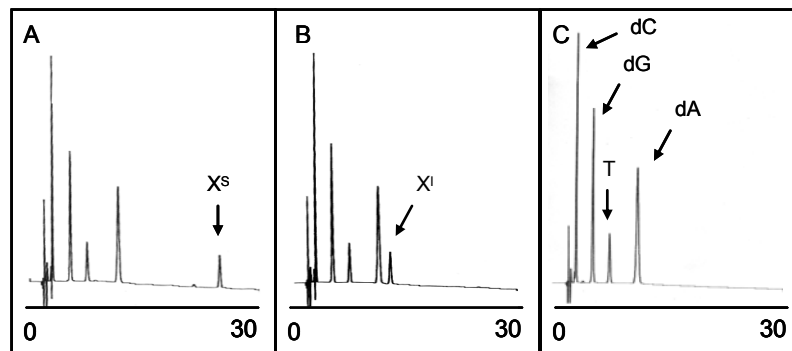


Figura 1.24. Perfils de HPLC de les digestions enzimàtiques de $5^{\text{d}}\text{GCATXCAGC}$ amb una 3'-exonucleasa i fosfatasa alcalina, enregistrats a 260 nm (A: $X = X^{\text{S}}$; B: $X = X^{\text{I}}$; C: $X = \text{C}$).

Respecte a la presència del subproducte de 50 unitats de massa menys observat en la síntesi de $5^{\text{d}}\text{GCATX}^{\text{S}}\text{CAGC}$, tan sols s'ha pogut concloure que deriva de la nucleobase X^{S} . En un cas en què es va aïllar un oligonucleòtid de massa $M-50$, la digestió enzimàtica no va donar el pic de X^{S} , sinó un altre amb menor t_{R} . De fet, semblaria que està relacionat amb l'oxidació del grup tioèter durant la síntesi oligonucleotídica, ja que en les síntesis en les que no hi ha oxidació no es detecta aquest subproducte. A la Figura 1.25 s'indica un possible mecanisme que explicaria la formació de cadenes oligonucleotídiques de massa 48 unitats inferior a l'esperada que, per tant, no acabaria d'explicar els resultats experimentals.

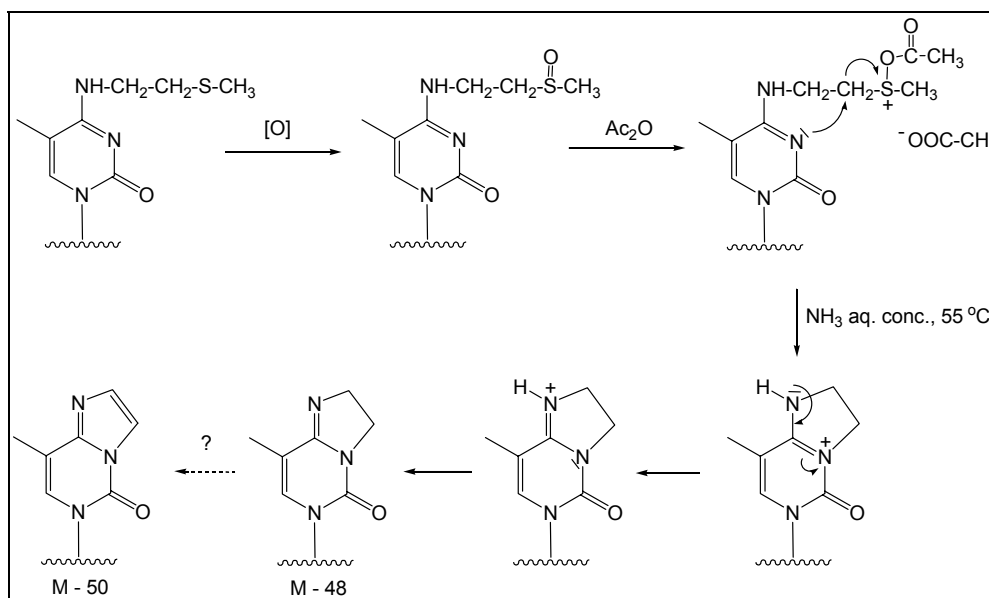


Figura 1.25. Mecanisme que explicaria la formació de cadenes oligonucleotídiques de massa 48 unitats inferior a l'esperada.

Les corbes obtingudes en els estudis de desnaturalització tèrmica es mostren a la Figura 1.26, així com el valor de la temperatura de fusió (T_m) experimental per a cada dúplex i la diferència respecte al dúplex control (ΔT_m).

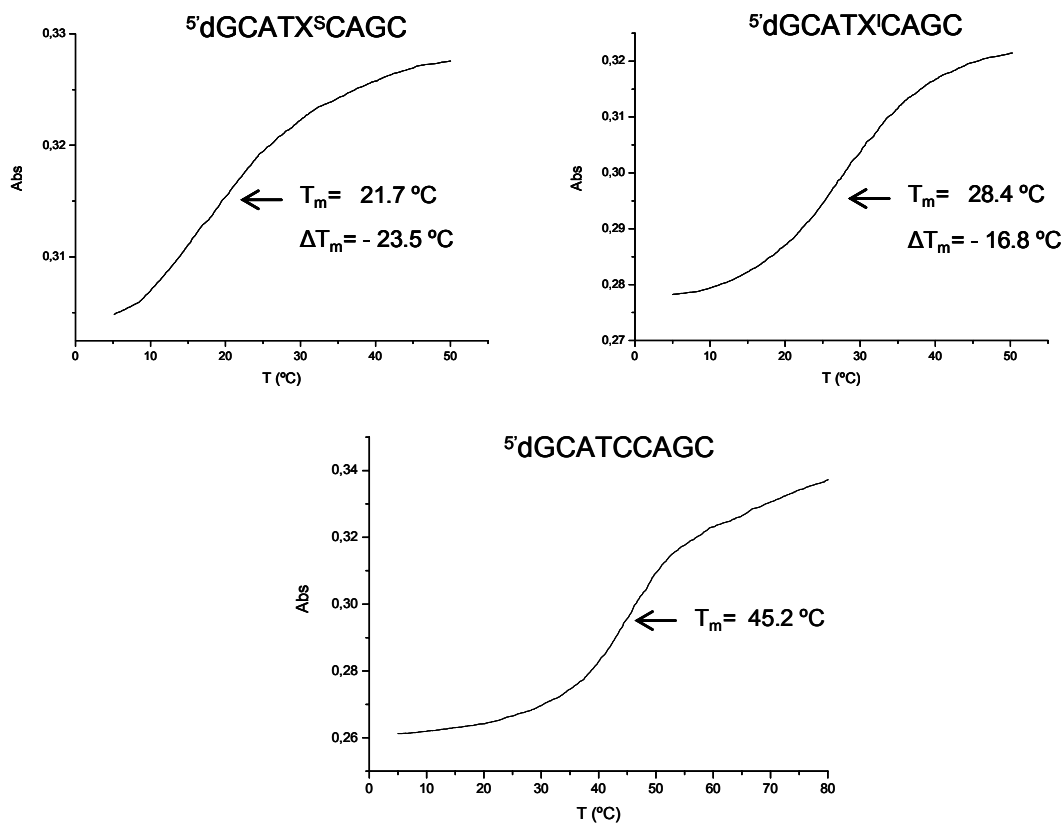


Figura 1.26. Corbes de fusió de $5'dGCATXCAGC$ ($X = X^S, X^I, C$) amb la cadena complementària $3'dCGTAGGTCG$.

Els resultats obtinguts ratifiquen el que ja s'havia descrit a la bibliografia: la presència d'aquestes modificacions a l'anell pirimidínic tenen un efecte desestabilitzant. En el cas de l'oligonucleòtid modificat amb un grup tioèter hi ha una disminució d'uns $24\text{ }^\circ\text{C}$ respecte al dúplex control, mentre que el grup imidazole provoca una desestabilització inferior, d'aproximadament $17\text{ }^\circ\text{C}$. S'ha trobat documentada la T_m d'un dúplex de 12 nucleòtids de RNA que conté en el centre de la seqüència un monòmer de citosina amb el mateix substituent tioèter en la posició 4 de l'anell.¹⁰ En aquest cas no hi ha el grup metil en posició 5, i la desestabilització respecte a un dúplex control és de més de $9\text{ }^\circ\text{C}$. Amb les dades disponibles sembla, doncs, que la presència del braç amb un tioèter té un efecte desestabilitzant més gran si hi ha un grup metil en posició 5. D'altra banda, també s'ha trobat documentada la T_m d'un oligonucleòtid autocomplementari de 18 nucleòtids amb una guanina modificada en posició 2 amb el penjoll d'aminotioèter que és $2\text{ }^\circ\text{C}$ superior al dúplex control sense modificar.⁹ Cal dir

que, en aquest cas, el substituent s'introduiria en el solc petit i no en el solc gran, la qual cosa podria estar relacionada amb l'efecte del substituent.

Degut a l'efecte desestabilitzant que provoquen les modificacions a la hibridació amb la cadena complementària, es va decidir preparar els oligonucleòtids a emprar en els assajos de platinació (capítol 3) introduint els nucleòsids modificats a l'extrem. Aquesta opció també havia de permetre minimitzar les possibles reaccions secundàries sobre el grup tioèter durant les diferents etapes del cicle de síntesi.

1.5.2 Oligonucleòtids modificats a l'extrem 5'

En aquest punt de la Tesi, es va plantejar la síntesi de cadenes oligonucleotídiques que presentessin una o dues nucleobases modificades a l'extrem 5', amb la idea d'obtenir-les platinades per estudiar l'entrecruament en presència d'una cadena complementària. Per tal de treballar amb un cas "real", es va buscar una seqüència a la bibliografia que formés part d'un oligonucleòtid antisentit en estudi. Es va triar la següent: ⁵dCACGTTGAGGGGCAT, oligonucleòtid que va dirigit al lloc d'inici de traducció del mRNA de rata que codifica l'expressió del gen *c-myc* (és complementari als primers cinc codons⁴⁷). Aquest gen és crucial per al creixement de les cèl·lules musculars llises, i la supressió de la proliferació d'aquest tipus de cèl·lules és un primer pas per a la prevenció de la restenosi vascular després d'una intervenció coronària.⁴⁸

Com que aquesta cadena antisentit és força llarga, i conté quatre G que podrien comportar tant problemes d'estructuració⁴⁹ com de platinació múltiple, es va decidir treballar amb el fragment ⁵dCACGTTGAG. Aquesta seqüència conté una C en la posició 5' que podria ser substituïda per X^S o X^L. La presència del triplet GAG, susceptible de reaccionar amb transplatí, hauria de permetre avaluar si el transplatí reacciona preferentment amb les dues guanines del triplet GAG o amb la nucleobase modificada, així com estudiar si aquestes guanines interfereixen en el procés d'entrecruament amb la cadena complementària. També es van preparar cadenes amb les dues modificacions, afegint un nucleòtid més a l'extrem 5' però mantenint sempre intacta la part de la seqüència ⁵dACGTTGAG.

A la Taula 1.1, es llisten les seqüències sintetitzades i s'indica el corresponent nom abreujat, tant de les cadenes antisentit com de les diferents cadenes complementàries. Tots els oligonucleòtids que apareixen en aquest llistat es van emprar en els assajos de platinació que es descriuen en el capítol 3 d'aquesta Memòria. Com era previsible, únicament les síntesis dels que contenen l'anàleg X^S van plantejar algun problema, que es comenta a continuació. Pel que fa a l'estabilitat dels dúplexs, tan sols es dugueren a terme estudis de desnaturalització tèrmica dels dúplexs formats per les cadenes oligonucleotídiques que van donar millors resultats en els experiments de platinació.

nom	seqüència
oligonucleòtid C	^{5'} dCACGTTGAG
oligonucleòtid S	^{5'} dX ^S ACGTTGAG
oligonucleòtid I	^{5'} dX ^I ACGTTGAG
oligonucleòtid IS	^{5'} dX ^I X ^S ACGTTGAG
oligonucleòtid SI	^{5'} dX ^S X ^I ACGTTGAG
complementari N	^{3'} dGTGCAACTC
complementari G1	^{3'} dGTTTGTGCAACTC
complementari G2	^{3'} dTGTTGTGCAACTC
complementari G3	^{3'} dTTGTGTGCAACTC
complementari G4	^{3'} dTTGGTGTGCAACTC

Taula 1.1. Oligonucleòtids antisentit i seqüències complementàries.

Tal i com s'explica a la part experimental, es van sintetitzar els oligonucleòtids a escala 1 µmol sobre boles de vidre, emprant les condicions estàndard. En general, l'etapa de purificació es va portar a terme amb els oligonucleòtids amb el grup dimetoxitritil protegint l'hidroxil de l'extrem 5'. D'aquesta manera, se separa fàcilment l'oligonucleòtid desitjat de la possible presència en el cru de síntesi de seqüències troncades (que no presentarien el grup dimetoxitritil, sinó que l'hidroxil estaria acetilat). Les principals incidències van estar relacionades amb la preparació dels oligonucleòtids que contenen X^S.

És rellevant mencionar que en aquestes síntesis es van introduir dos canvis importants: els nucleòsids modificats es van assecar prèviament mitjançant una liofilització de benzè anhidre i es va emprar un acetonitril de més elevada qualitat als rentats en el sintetitzador automàtic. Aquest acetonitril és molt sec (15 ppm H₂O) i està especialment indicat per a síntesi de DNA/RNA. Tot plegat va redundar en una millora en la incorporació dels nucleòtids (tant dels naturals com dels modificats). D'altra banda, en la síntesi dels oligonucleòtids que contenen el grup tioèter no hi va haver pràcticament oxidació (< 5 %, tal i com es va comprovar per HPLC i EM MALDI-TOF), així com tampoc no es va observar el subproducte que presenta una pèrdua de 50 unitats de massa. Aquests resultats estan d'acord amb el descrit²⁴ (en condicions anhidres el *t*BuOOH no oxida el tioèter a sulfòxid), que en el nostre cas no sempre s'ha pogut reproduir.

Tal i com s'ha comentat, les purificacions dels crús sintètics es van realitzar amb el DMT a l'extrem 5'. Un cop aïllat el pic corresponent a l'oligonucleòtid desitjat, es va eliminar el grup protector 4,4'-dimetoxitritil per tractament àcid. L'anàlisi per HPLC va mostrar, en el cas dels oligonucleòtids amb un monòmer X^S, la presència de dos pics, que corresponen a l'oligonucleòtid desitjat i a la seva forma oxidada (oligonucleòtid reduït/oxidat 90:10). En un principi, és de suposar que l'oxidació es va produir durant l'eliminació del DMT (bé sigui perquè

es va emprar metil-*tert*-butilèter que potser contenia traces de peròxids, bé sigui per l'oxigen atmosfèric). En tot cas, aquests oligonucleòtids no es van reduir per tractament amb MMA, sinó que es van repurificar mitjançant HPLC, intentant evitar en la mesura del possible el contacte amb l'oxigen atmosfèric. Aquests oligonucleòtids posteriorment es van emprar en estudis de platinació amb transplatí i no es va observar que s'oxidessin més durant la seva manipulació habitual, tot i que una llarga exposició a l'oxigen atmosfèric pot provocar certa oxidació. Aquest és un fenomen habitual en el cas de pèptids que contenen l'aminoàcid metionina.¹²

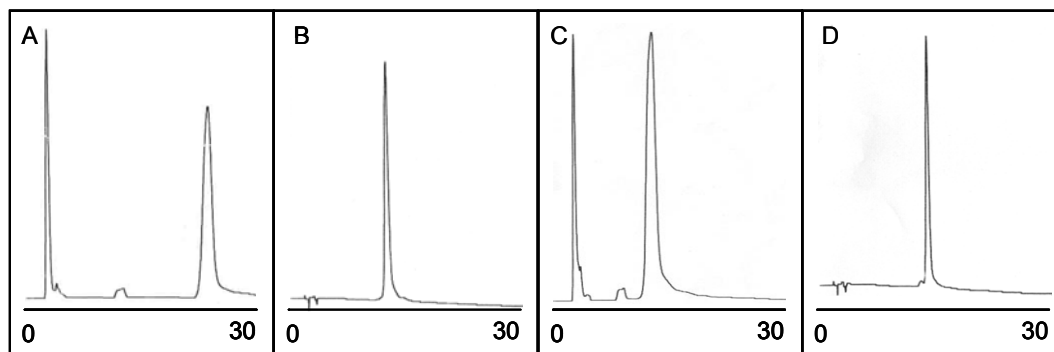


Figura 1.27. Perfils de HPLC de l'oligonucleòtid C del cru d'escissió (amb el DMT) (A) i del producte pur (B), i de l'oligonucleòtid I del cru d'escissió (amb el DMT) (C) i del producte pur (D). [gradient: 30-50 % de B en 30 min a A, 40-60 % de B en 30 min a C, 5-35 % de B en 30 min a B i D].

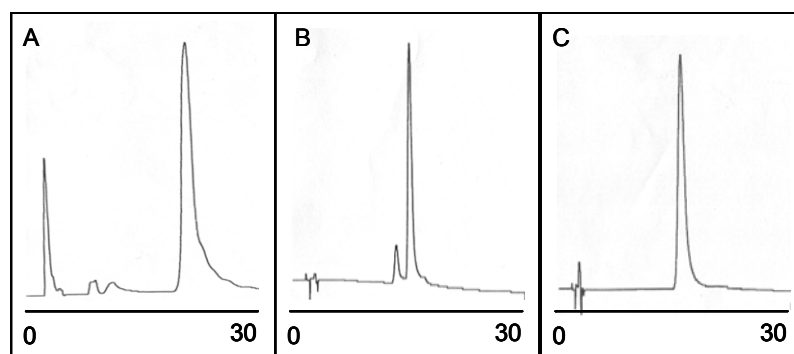


Figura 1.28. Perfils de HPLC de l'oligonucleòtid S del cru d'escissió (amb el DMT) (A), del producte parcialment oxidat després d'eliminar el grup DMT (B) i del producte pur (C). [gradient: 40-60 % de B en 30 min a A, 5-35 % de B en 30 min a B, 10-20 % de B en 30 min a C].

En el cas dels oligonucleòtids $5'$ dX^SX^LACGTTGAG i $5'$ dX^LX^SACGTTGAG també es va realitzar la síntesi eliminant el grup DMT en el propi sintetitzador (purificació sense DMT). En el cas de les síntesis DMT ON (Figura 1.29), els resultats obtinguts van ser similars a la síntesi de l'oligonucleòtid S, detectant aproximadament un 10 % d'oligonucleòtid oxidat després de l'etapa d'eliminació del grup DMT.

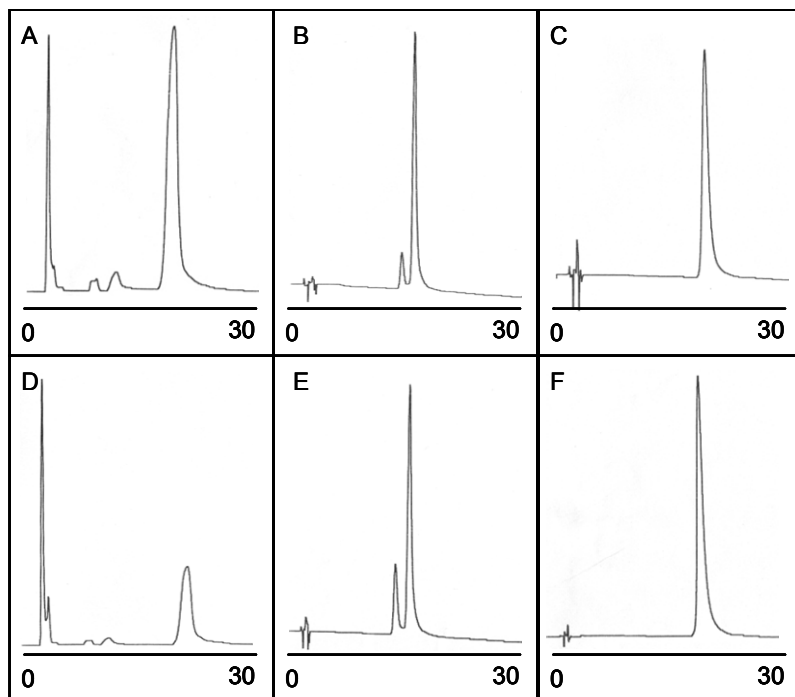


Figura 1.29. Perfils de HPLC de l'oligonucleòtid IS del cru d'escissió (amb el DMT) (A), del producte parcialment oxidat després d'eliminar el grup DMT (B) i del producte pur (C), i de l'oligonucleòtid SI del cru d'escissió (amb el DMT) (A), del producte parcialment oxidat després d'eliminar el grup DMT (B) i del producte pur (C). [gradient: 40-60 % de B en 30 min a A i D, 5-35 % de B en 30 min a B i E, 10-20 % de B en 30 min a C i F].

Per a les síntesis DMT OFF, en el cru d'escissió i desprotecció pràcticament només es va detectar la cadena desitjada i la purificació es va realitzar mitjançant MPLC (Figura 1.30). En aquest cas, i possiblement degut al major temps de manipulació que suposa aquesta tècnica, no es van aïllar productes purs, sinó contaminats amb una mica d'oligonucleòtid oxidat. Per tant, sembla més aconsellable la purificació mitjançant HPLC i congelant ràpidament les fraccions que contenen el producte reduït.

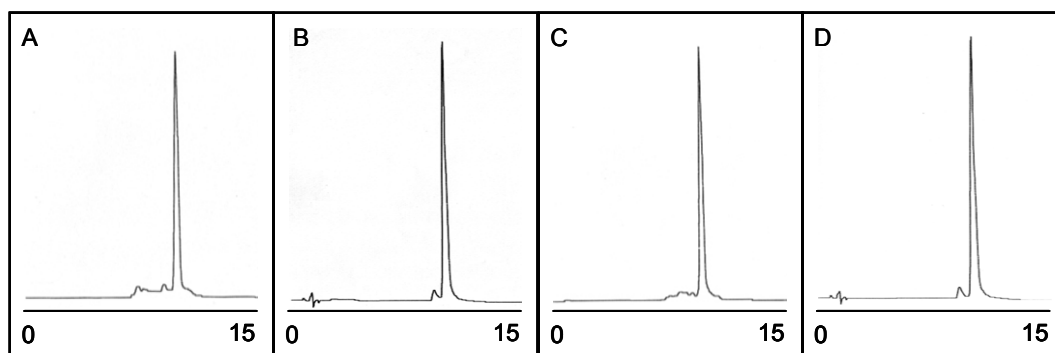


Figura 1.30. Perfils de HPLC dels oligonucleòtids IS i SI, dels cru d'escissió (sense el DMT) (A i C, respectivament) i dels producte purificats mitjançant MPLC (B i D, respectivament). [gradient: 5-35 % de B en 15 min].

Com es descriu més endavant (capítol 3), els resultats més interessants dels estudis d'entrecreament amb transplatí i els diferents oligonucleòtids sintetitzats els va proporcionar la cadena antisentit IS. Per aquest motiu, es va fer un estudi comparatiu de l'estabilitat de diferents dúplexs que la contenen (IS+CN, IS+G1), respecte als dúplexs control (C+CN, C+G1). D'aquesta manera, es pot analitzar quin és l'efecte en l'estabilitat de la doble cadena de la introducció dels nucleòsids modificats (X^S i X^I) en un extrem, i quin és l'efecte del fragment $3'$ dGTTT monocatenari de l'extrem 3' de la cadena complementària G1 (veure Taula 1.2).

Per tal d'avaluar l'estabilitat dels dúplexs, es van determinar les diferents temperatures de fusió, utilitzant la mateixa solució tampó que s'empra per a les reaccions d'entrecreament. Les corbes obtingudes es mostren a la Figura 1.31, així com el valor de la temperatura de fusió (T_m) trobada per a cada dúplex. A la Taula 1.2 es resumeixen els resultats experimentals.

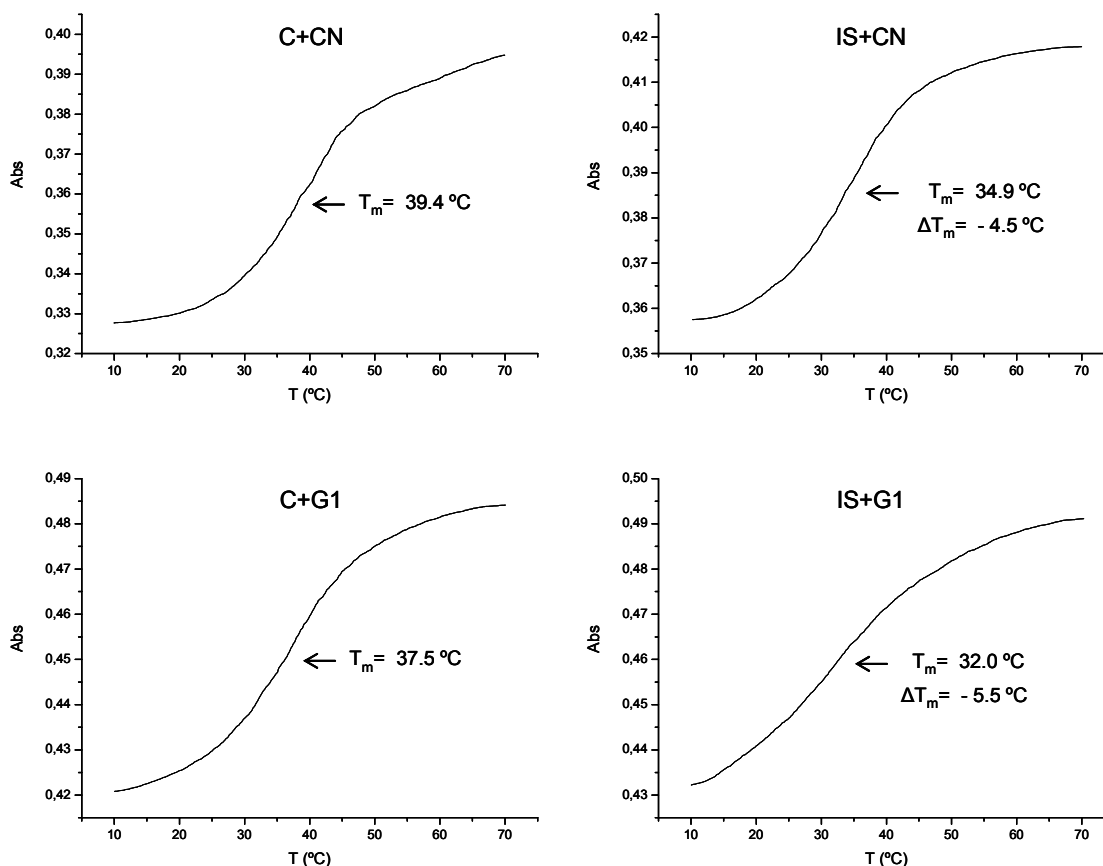


Figura 1.31. Corbes de fusió de C+CN, IS+CN, C+G1 i IS+G1. ΔT_m fa referència a la diferència en les T_m del dúplex amb la cadena IS respecte a l'homòloga control.

codi	dúplex	T _m (°C)	ΔT _m (°C)	
a: C+CN	^{5'} dCACGTTGAG ^{3'} dGTGCAACTC	39.4	-	-
b: IS+CN	^{5'} dX ^I X ^S ACGTTGAG ^{3'} dGTGCAACTC	34.9	-4.5 ^(b-a)	-
c: C+G1	^{5'} dCACGTTGAG ^{3'} dGTTTGTGCAACTC	37.5	-	-1.9 ^(c-a)
d: IS+G1	^{5'} dX ^I X ^S ACGTTGAG ^{3'} dGTTTGTGCAACTC	32.0	-5.5 ^(d-c)	-2.9 ^(d-b)

Taula 1.2. Resultats obtinguts en els estudis de desnaturalització tèrmica.

El primer que s'observa és que la presència de dos nucleòsids modificats en un extrem del dúplex, un que es pot aparellar amb G (X^S) i un que no (X^I), té un petit efecte desestabilitzant (d'uns 5 °C en el valor de T_m), ja sigui en presència de la cadena més curta (CN) com d'una més llarga (G1) que conté a l'extrem 3' un fragment monocatenari ^{3'}dGTTT. Per tant, la incorporació dels dos nucleòsids modificats X^S i X^I a l'extrem 5' de la seqüència té un efecte desestabilitzant molt menor que situar un d'aquests dos nucleòsids enmig d'una seqüència oligonucleotídica de llargària similar (veure apartat 1.5.1). D'altra banda, la presència del fragment monocatenari ^{3'}dGTTT a l'extrem 3' de la cadena complementària G1 té un lleuger efecte desestabilitzant en la formació del dúplex (d'uns 2-3 °C), tal i com es posa de manifest en comparar els valors de les temperatures de fusió dels dúplexs C+CN i C+G1. Per al dúplex IS+G1, l'efecte desestabilitzant del penjoll monocatenari és molt similar al cas anterior (comparant les T_m de IS+CN i IS+G1), la qual cosa és una mica sorprenent si es té en compte que aquí X^I queda enfrontat a una timina. Tal i com es determinarà posteriorment en un estudi per RMN (capítol 3), en el dúplex IS+G1 hi ha formació d'enllaços d'hidrogen en tota la seqüència a partir de la A de l'extrem 5' de la cadena antisentit IS. L'extrem 3' de la cadena complementària es troba en forma desestructurada, però això no té una gran repercussió negativa en l'estabilitat global de la macroestructura.

1.6 BIBLIOGRAFIA

- ¹ Luyten, I.; Herdewijn, P. *Eur. J. Med. Chem.* **1998**, *33*, 515-576.
- ² a) Beltrán, M.; Onoa, G.B.; Pedroso, E.; Moreno, V.; Grandas, A. *J. Biol. Inorg. Chem.* **1999**, *4*, 701-707. b) Marchán, V.; Moreno, V.; Pedroso, E.; Grandas, A. *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 808-815. c) Debéthune, L.; Kohlhagen, G.; Grandas, A.; Pommier, Y. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 1198-1204. d) Gómez-Pinto, I.; Marchán, V.; Gago, F.; Grandas, A.; González, C. *ChemBioChem* **2003**, *4*, 40-49. e) Gómez-Pinto, I.; Marchán, V.; Gago, F.; Grandas, A.; González, C. *Chem Commun.* **2003**, 2558-2559. f) Marchán, V.; Pedroso, E.; Grandas, A. *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 1-8.
- ³ Marchán, V.; Rodríguez-Tanty, C.; Estrada, M.; Pedroso, E.; Grandas, A. *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 2495-2500.
- ⁴ a) Ferentz, A.E.; Verdine, G.L. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4000-4002. b) MacMillan, A.M.; Verdine, G.L. *Tetrahedron* **1991**, *47*, 2603-2616. c) Harris, C.M.; Zohu, L.; Strand, E.A.; Harris, T.M. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4328-4329. d) Xu, Y.Z.; Zheng, Q.; Swann, P.F. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 1729-1740.
- ⁵ Robles, J.; Grandas, A.; Pedroso, E. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 179-194.
- ⁶ a) Xu, Y-Z.; Zheng, Q.; Swann, P.F. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 3839-3845. b) Miah, A.; Reese, C.B.; Song, Q. *Nucleosides Nucleotides* **1997**, *16*, 53-55. c) Allerson, C.R.; Chen, S.L.; Verdine, G.L. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 7423-7433.
- ⁷ Beaucage, S.L.; Caruthers, M.H. In *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry* **2000**. John Wiley & Sons, Inc., 3.3.1-3.3.19.
- ⁸ a) Lee, H.; Hinz, M.; Stezowski, J.J.; Harvey, R.G. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 6773-6776. b) Harris, C.M.; Zhou, L.; Strand, E.A.; Harris, T.M. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4328-4329.
- ⁹ Erlanson, D.A.; Chen, L.; Verdine, G.L. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 12583-12584.
- ¹⁰ Allerson, C.R.; Chen, S.L.; Verdine, G.L. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 7423-7433.
- ¹¹ Barany, G.; Merrifield, R.B. *Solid-Phase Peptide Synthesis. The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology. Volume 2. Special Methods in Peptide Synthesis, Part A*, Gross, E.; Meienhofer, J., Eds., Academic Press, **1981**, pp. 223-233.
- ¹² Hofmann, K.; Haas, W.; Smithers, M.J.; Wells, R.D.; Wolman, Y.; Yanaihara, N.; Zanetti, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 620-631.
- ¹³ Hammer, R.P.; Albericio, F.; Gera, L.; Barany, G. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1990**, *36*, 31-45.
- ¹⁴ Lloyd-Williams, P.; Albericio, F.; Giralt, E. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1991**, *37*, 58-60.
- ¹⁵ Robles, J.; Beltrán, M.; Marchán, V.; Pérez, I.; Travesset, E.; Pedroso, E.; Grandas, A. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 13251-13263.
- ¹⁶ Marchán, V. *Tesi doctoral*; Universitat de Barcelona, **2000**.
- ¹⁷ Amonoo-Neizer, E.H.; Ray, S.K.; Shaw, R.A.; Smith, B.C. *J. Chem. Soc.* **1965**, 4296-4300.

- ¹⁸ Andrews, D.M.; Kitchin, J.; Seale, P.W. *Int. J. Peptide Prot. Res.* **1991**, *38*, 469-475.
- ¹⁹ Houghen, R.A.; Li, C.H. *Anal. Biochem.* **1979**, *98*, 36-46.
- ²⁰ a) Fernandez-Forner, D.; Palom, Y.; Ikuta, S.; Pedroso, E.; Eritja, R. *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 5729-5734. b) Urdea, M.S.; Warner, B.D.; Running, J.A.; Stempein, M.; Clyne, J.; Horn, T. *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 4937-4956.
- ²¹ Reese, C.; Skone, P.A. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1984**, 1263-1271.
- ²² a) Horn, T.; Urdea, M.S. *Nucleic Acids Res.* **1989**, *17*, 6959-6967. b) Abdel-Rahman, A-H.; Ali, O.M.; Pedersen, E.B. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 15311-15324.
- ²³ Barone, A.D.; Tang, J-Y.; Caruthers, M.H. *Nucleic Acids Res.* **1984**, *12*, 4051-4061.
- ²⁴ *Novabiochem Catalog & Peptide Synthesis Handbook*, Synthesis Notes, **2002**, 3.28.
- ²⁵ Sundberg, R.J.; Martin, R.B. *Chem. Rev.* **1974**, *74*, 471-517.
- ²⁶ Matuszak, C.A.; Matuszak, A.J. *J. Chem. Edu.* **1976**, *53*, 280-284.
- ²⁷ a) Deakyne, C.A.; Allen, L.C. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 3951-3959. b) Breslow, R.; Labelle, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 2655-2659. c) Anslyn, E.; Breslow, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 4473-4482. d) Anslyn, E.; Breslow, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 5972-5973. e) Breslow, R. *Acc. Chem. Res.* **1991**, *24*, 317-324.
- ²⁸ Lippard, S.J.; Berg, J.M. *Principles of Bioinorganic Chemistry*, University Science Books, Mill Valley, **1994**.
- ²⁹ Michel, T.; Moulis, L.; Debart, F.; Vasseur, J-J. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **2003**, *22*, 1263-1265.
- ³⁰ Ushijima, K.; Gouzu, H.; Hosono, K.; Shirakawa, M.; Kagoshima, K.; Takai, K.; Takaku, H. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1379*, 217-233.
- ³¹ a) Truffert, J-C.; Asseline, U.; Brack, A.; Thuong, N.T. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 3005-3016. b) Beltrán, M.; Pedroso, E.; Grandas, A. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 4115-4118.
- ³² a) Beloglazova, N.G.; Epanchintsev, A.Y.; Sil'nikov, V.N.; Zenkova, M.A.; Vlasov, V.V. *Molecular Biology* **2002**, *36*, 581-588. b) Beloglazova, N.G.; Fabani, M.M.; Zenkova, M.A.; Bichenkova, E.V.; Polushin, N.N.; Sil'nikov, V.V.; Douglas, K.T.; Vlassov, V.V. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 3887-3897.
- ³³ Ushijima, K.; Shirakawa, M.; Kagoshima, K.; Park, W-S.; Miyano-Kurosaki, N.; Takaku, H. *Bioorganic & Medicinal Chem.* **2001**, *9*, 2165-2169.
- ³⁴ a) *Topics in Molecular and Structural Biology*, Cohen, J.S., Ed., London: Macmillan, vol. 12, **1989**. b) *Antisense Research and Applications*, Crooke, S.T.; Meunier, B., Eds., CRC Press: Boca Raton, **1993**, pp. 330. c) Baker, B.F.; Monia, B.P. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1489*, 3-18.
- ³⁵ a) Crestfield, A.M.; Stein, W.H.; Moore, S. *J. Biol. Chem.* **1963**, *238*, 2421-2428. b) Richards, F.M.; Wyckoff, H. *The Enzymes* **1971**, *4*, 647-806.

- ³⁶ a) Lermer, L.; Roupioz, Y.; Ting, R.; Perrin, D.M. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9960-9961. b) Beloglazova, N.G.; Fabani, M.M.; Zenkova, M.A.; Bichenkova, E.V.; Polushin, N.N.; Sil'nikov, V.V.; Douglas, K.T.; Vlassov, V.V. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 3887-3897.
- ³⁷ a) Wang, C-Y.; Huang, L. *Biochemistry* **1984**, *23*, 4409-4416. b) Uster, P.S.; Deamer, D.W. *Biochemistry* **1985**, *24*, 1-8.
- ³⁸ a) Midoux, P.; Kichler, A.; Boutin, V.; Maurizot, J-C.; Monsigny, M. *Bioconjugate Chem.* **1998**, *9*, 260-267. b) Pichon, C.; Roufai, M.B.; Monsigny, M.; Midoux, P. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 504-512.
- ³⁹ Morvan, F.; Castex, C.; Vivès, E.; Imbach, J-L. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **2001**, *20*, 805-808.
- ⁴⁰ Sheenan, J.C.; Hasspacher, K.; Yeh, Y.L. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 6086.
- ⁴¹ a) Ishiguro, T.; Eguchi, C. *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, *37*, 506-508. b) Kusunoki, M.; Nakagawa, S.; Seo, K.; Hamana, T.; Fukuda, T. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1990**, *36*, 381-386.
- ⁴² Rink, H.; Riniker, B. *Helv. Chim. Acta* **1974**, *57*, 831-835.
- ⁴³ a) Barany, G.; Merrifield, R.B. *Solid-Phase Peptide Synthesis. The Peptides. Analysis, Synthesis, Biology (volume 2, Special Methods in Peptide Synthesis, part A)*, Gross, E.; Meienhofer, J., Eds., Academic Press, New York, **1980**, pp. 179-189. b) Jones, J.H.; Ramage, W.I.; Witty, M.J. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1980**, *15*, 301-303. c) Geiger, R.; König, W., *Amine Protecting Groups. The Peptides. Analysis, Synthesis, Biology (volume 3, Protecting of Functional Groups in Peptide Synthesis)*, Gross, E.; Meienhofer, J., Eds., Academic Press, New York, **1981**, pp. 70-80.
- ⁴⁴ Beltrán, M. *Tesi doctoral*, Universitat de Barcelona, **1999**.
- ⁴⁵ a) Hotchkiss, R.D. *J. Biol. Chem.* **1948**, *168*, 315-322. b) Uesugi, S.; Miyashiro, H.; Tomita, K.; Ikejara, M. *Chem. Pharm. Bull.* **1986**, *34*, 51-60.
- ⁴⁶ Engel, J.D.; von Hippel, P.H. *Biochemistry* **1974**, *13*, 4143-4158.
- ⁴⁷ Biro, S.; Fu, Y-M; Yu, Z-X; Epstein, S.E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 654-658.
- ⁴⁸ a) Reidy, M.A.; Jackson, C.; Lindner, V. *Vascular Medicine Review* **1992**, *3*, 156-167. b) Liu, M.W.; Roubin, G.S.; Spencer, B.K. *Circulation* **1989**, *79*, 1374-1387. c) Bennett, M.R.; Schwartz, S.M. *Circulation* **1995**, *92*, 1981-1993.
- ⁴⁹ Burgess, T.L.; Fisher, E.F.; Ross, S.L.; Bready, J.V.; Qian, Y-X.; Bayewitch, L.A.; Cohen, A.M.; Herrera, C.J.; Hu, S.S-F.; Kramer, T.B.; Lott, F.D.; Martin, F.H.; Pierce, G.F.; Simonet, L.; Farrell, C.L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 4051-4055.