



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Análogos de DNA que incorporan nucleósidos con anillo de morfolina y grupos guanidino

Sonia Pérez Rentero

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

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

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Análogos de DNA que incorporan nucleósidos con  
anillo de morfolina y grupos guanidino

Sonia Pérez Rentero

Departamento de Química Orgánica  
Facultad de Química  
Universidad de Barcelona



UNIVERSITAT DE BARCELONA

U

B



Análogos de DNA que incorporan nucleósidos con  
anillo de morfolina y grupos guanidino

Sonia Pérez Rentero

Departamento de Química Orgánica  
Facultad de Química  
Universidad de Barcelona



UNIVERSITAT DE BARCELONA

U

B



Memoria presentada por Sonia Pérez Rentero para optar al  
grado de Doctora por la Universidad de Barcelona

Programa de Doctorado de Química Orgánica  
Bienio 2002-2004

Dirigida y revisada por:

Dr. Jordi Robles Brau

Barcelona, noviembre de 2007



## **Índice**

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	3
1. El DNA y sus estructuras	3
1.1 Las dobles hélices de DNA	4
1.2 Otras estructuras no canónicas del DNA	5
2. Aplicaciones de las propiedades del DNA y sus derivados	8
2.1 Aplicaciones tecnológicas	8
2.2 Aplicaciones terapéuticas	13
3. Soluciones químicas a las limitaciones de los oligonucleótidos en sus múltiples aplicaciones	17
3.1 Oligonucleótidos modificados químicamente	18
3.2 Mejora de la penetrabilidad celular de los oligonucleótidos	22
4. Objetivos	25
5. Bibliografía	27
CAPÍTULO 1. Síntesis de oligonucleótidos que incorporan unidades morfolino-amidina a partir de dinucleósidos	33
1. Introducción	33
1.1 Métodos generales para la obtención de guanidinas	33
1.2 Síntesis de oligonucleótidos guanidino	35
2. Diseño de un esquema sintético para la obtención de un oligonucleótido con alternancia de unidades morfolino-amidina y ribosil-fosfato	37
3. Ensayos de obtención de la guanidina modelo morfolinocarbonimidoil-5'-amino-2',5'-didesoxitimidina	40
3.1 Síntesis de morfolinocarbotioamidas protegidas	40
3.2 Síntesis de 5'-amino-2',5'-didesoxitimidina	43
3.3 Síntesis del derivado guanidino a partir de 5'-amino-2',5'-didesoxitimidina y morfolinocarbotioamida	44
3.3.1 Ensayos realizados siguiendo el método A	44
3.3.2 Ensayos realizados siguiendo el método B	46
4. Ensayos de desprotección de las guanidinas 5b-5g	50
4.1 Ensayos de desprotección de las guanidinas 5b-5f	50

4.2 Ensayos de desprotección de la guanidina 5g	52
5. Síntesis de la guanidina dinucleosídica derivada de morfolinouridina y aminodesoxitimidina (12)	53
5.1 Síntesis de 5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)morfolinouridina, (10)	54
5.2 Síntesis de N-aliloxicarbonil-[6-(4,4'-dimetoxitritil)morfolinouridinil]carbotioamida, (11)	57
5.3 Síntesis de la guanidina dinucleosídica 12	58
5.4 Ensayo de desprotección de la guanidina 12	59
6. Síntesis en fase sólida de un pentámero T( <sup>m</sup> Ug <sub>(Alloc)</sub> T)TC y ensayos de eliminación del grupo aliloxicarbonilo en fase sólida	60
6.1 Consideraciones preliminares	60
6.2 Metodología general de síntesis de oligonucleótidos	61
6.3 Síntesis del derivado 3'-O-fosforamidito del dinucleósido 12	65
6.4 Síntesis en fase sólida de un pentámero T( <sup>m</sup> Ug <sub>(Alloc)</sub> T)TC	67
6.5 Ensayos de desprotección y caracterización de T( <sup>m</sup> UgT)TC	69
6.6 Formación de alilaminas durante la desprotección de alilcarbamatatos	73
7. Resumen de los resultados obtenidos	75
8. Bibliografía	77
CAPÍTULO 2. Síntesis de oligonucleótidos que incorporan unidades morfolinoamidina por formación de enlaces guanidino en fase sólida	81
1. Introducción	81
2. Síntesis de la aminonucleosidilresina 23	83
2.1 Consideraciones preliminares	83
2.2 Síntesis de 3'-O-(succinil)-5'-N-(4-monometoxitritil)amino-2',5'-didesoxitimidina	84
2.3 Síntesis de Fmoc-Sarcosinil-LCAA-CPG	85
2.4 Síntesis de MMT-5'-amino-2',5'-didesoxitimidinil-3'-succinilsarcosinilLCAA-CPG	87
3. Síntesis de guanidina en fase sólida: preparación de DMT-( <sup>m</sup> Ug <sub>(Alloc)</sub> T)-succinilsarcosinil-LCAA-CPG	88
3.1 Método A (mediante el reactivo de Sanger)	89
3.1.1 Obtención de la isotiourea 24	89
3.1.2 Ensayos de acoplamiento de la isotiourea 24 sobre resina	90
3.2 Método B : activación de la tiourea 11 <i>in situ</i>	92

4. Eliminación del grupo Alloc en fase sólida	95
4.1 Consideraciones preliminares: métodos para minimizar la formación de alilaminas durante la eliminación del grupo Alloc	95
4.2 Ensayos de eliminación del grupo Alloc sobre la resina 23	97
5. Síntesis y purificación de los oligonucleótidos modificados con unidades de morfolino-amidinas 14E1 y 14E2	99
5.1 Síntesis del oligonucleótido modificado 14E1	99
5.2. Eliminación del grupo Alloc y purificación de 14E1	99
5.3 Síntesis del oligonucleótido modificados 14E2	101
5.3.1 Síntesis del derivado fosforamidito de 5'-N-(4-monometoxitritil)amino-5'-desoxitimidina	102
5.3.2 Síntesis de 14E2	103
5.3.3 Eliminación del grupo Alloc y purificación de 14E2	104
6. Resumen de los resultados obtenidos	105
7. Bibliografía	107
CAPÍTULO 3. Estudio de dobles y triples hélices que contienen la unidad <sup>m</sup> UgT	109
1. Introducción	109
1.1 Estructura de la doble hélice de B-DNA	109
1.2 Triples hélices de DNA	110
1.3 Espectroscopía de UV-visible como método de estudio de la estabilidad de dobles y triples hélices	112
2. Precedentes en el estudio de hibridación de análogos de DNA o RNA en los que se han reemplazado total o parcialmente grupos fosfato por grupos guanidino	115
2.1 Estudios de hibridación de oligonucleótidos DNG y RNG	115
2.2 Estructura de los complejos formados por los oligonucleótido guanidino	121
2.3 Estudios de hibridación de quimeras DNG/DNA	123
3. Síntesis de oligonucleótidos no modificados	125
4. Análisis de desnaturalización térmica de dobles hélices que contiene la unidad <sup>m</sup> UgT	129
5. Triples hélices que contienen la unidad <sup>m</sup> UgT	131
5.1 Consideraciones preliminares	131
5.2 Curvas de fusión de triples hélices que contienen la unidad <sup>m</sup> UgT	133
6. Resumen de los resultados obtenidos	138
7. Bibliografía	139

CONCLUSIONES	141
MATERIALES Y MÉTODOS	143
SECCIÓN EXPERIMENTAL. Capítulo 1	155
SECCIÓN EXPERIMENTAL. Capítulo 2	181
SECCIÓN EXPERIMENTAL. Capítulo 3	193
ANEXO	195

**Disolventes, reactivos y disoluciones auxiliares**

ACH: ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico  
ACN: acetonitrilo  
Ac<sub>2</sub>O: anhídrido acético  
AcOEt: acetato de etilo  
AcONH<sub>4</sub>: acetato de amonio  
AcOTEA: acetato de trietilamonio  
BuNH<sub>2</sub>: butilamina  
CA: citrato de amonio  
DBU: 1,8-diazabicyclo[5,4,0]-7-undeceno  
DCC: *N,N*-diciclohexilcarbodiimida  
DCM: diclorometano  
DIP: *N,N*-diisopropilcarbodiimida  
DMAP: 4-(dimetilamino)piridina  
DMF: *N,N*-dimetilformamida  
DMSO: dimetilsulfóxido  
DIEA: *N,N*-diisopropiletilamina  
EDCI: hidrocloreto de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida  
HAcO: ácido acético  
HOBt: 1-hidroxibenzotriazol  
LCAA-CPG: bolas de vidrio de poro controlado con un espaciador aminoalquílico (*long chain alkylamine controlled-pore glass suport*)  
NMI: 1-metilimidazol  
Pir.: piridina  
Sar.: sarcosina  
TCA: ácido tricloroacético  
TEA: trietilamina  
TFA: ácido trifluoroacético  
THAP: 2,4,6-trihidroxiacetofenona  
THF: tetrahidrofurano  
Tris-HCl: hidrocloreto de 2'-amino-(hidroximetil)-1,3-propandiol

**Grupos protectores**

Alloc: aliloxycarbonilo  
Bz: benzoílo  
CNE: 2-cianoetil

DMT: 4,4'-dimetoxitritilo  
Fmoc: 9-fluorenilmetoxicarbonilo  
MMT: 4-monometoxitritilo  
Mtr: 4-metoxi-2,3,6-trimetilbencensulfonilo  
Mts: metilen-2-sulfonilo  
Pmc: 2,2,5,7,8-pentametilmroman-6-sulfonilo  
Ibu: isobutirilo

**Unidades y medidas**

OD<sub>260</sub>: densidad óptica a 260 nm  
Pf: punto de fusión  
Tm: temperatura de fusión  
t<sub>R</sub>: tiempo de retención  
Rf: factor de retención

**Técnicas de análisis**

CCF: cromatografía en capa fina  
EM: espectrometría de masas  
ES: electroespray  
FAB: bombardeo de átomos rápidos (*Fast Atom Bombardement*)  
HPLC: cromatografía líquida de alta resolución (*High Performance Liquid Chromatography*)  
IR: infrarrojo  
MALDI-TOF: desorción iónica provocada por láser asistida por matriz y con analizador de tiempo de vuelo (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight*)  
RMN: espectroscopia de resonancia magnética nuclear  
UV-Vis: espectroscopía de Ultravioleta-visible

**4. General**

A: adenina  
anh.: anhidro

C: citosina  
CMV: citomegalovirus  
CPP: *cationic penetrating peptides*  
dA: desoxiadenosina  
dC: desoxicitidina  
dG: desoxiguanosina  
DNA: ácido desoxirribonucleico  
FDA: *Food and Drug Administration*  
FRET: transferencia de energía por resonancia Förster (*Förster Resonance by Energy Transfer*)  
G: guanina  
LNA: ácidos nucleidos bloqueados (*locked nucleic acids*)  
mRNA: RNA mensajero  
miRNA: microRNA  
ODN: oligonucleótido  
PCR: *polymerase chain reaction*  
PNA: ácido nucleido peptídico (*peptide nucleic acid*)  
RISC: *RNA-induced silencing complex*  
RNA: ácido ribonucleico  
RNAi: RNA de interferencia  
SELEX: *Systematic evolution of ligands by exponential enrichment*  
siRNA: *small interfering RNAs*  
SNP: polimorfismos mononucleotídicos (*Single Nucleotide Polymorfism*)  
T: timina  
U: uracilo





En un artículo<sup>1</sup> publicado en la revista *Nature* en 1953, basándose únicamente en las imágenes de difracción de rayos X registradas por R. Franklin y en el apareamiento de nucleobases, J. D. Watson y F. Crick dedujeron lo que ahora se acepta como el primer modelo preciso de la estructura del DNA. Este descubrimiento tuvo inmediatamente un gran impacto en genética y en biología, permitiendo el nacimiento de la biología molecular, ya que finalmente se pudo comprender cómo las instrucciones que determinan un organismo se almacenan y se transmiten de un individuo a otro de generación en generación. Más tarde, el desarrollo de metodologías sintéticas automatizadas para obtener pequeños segmentos de ácidos nucleicos<sup>2</sup>, denominados oligonucleótidos (ODN), ha permitido el desarrollo de diversas técnicas basadas en la complementariedad de las nucleobases que han sido empleadas en biología molecular y biotecnología, diagnóstico y análisis clínico, desarrollo terapéutico y nanotecnología.

El presente trabajo trata del desarrollo metodológico para obtener un nuevo análogo sintético de oligonucleótido y del estudio preliminar de sus propiedades biofísicas. En esta parte introductoria, en primer lugar se tratarán brevemente aspectos básicos de la estructura y función de los ácidos nucleicos, y a continuación se comentarán ejemplos relevantes de las aplicaciones tecnológicas y farmacológicas de los oligonucleótidos y de diferentes aproximaciones químicas diseñadas para abordarlas. Finalmente, se expondrán y explicarán los objetivos del presente proyecto de Tesis.

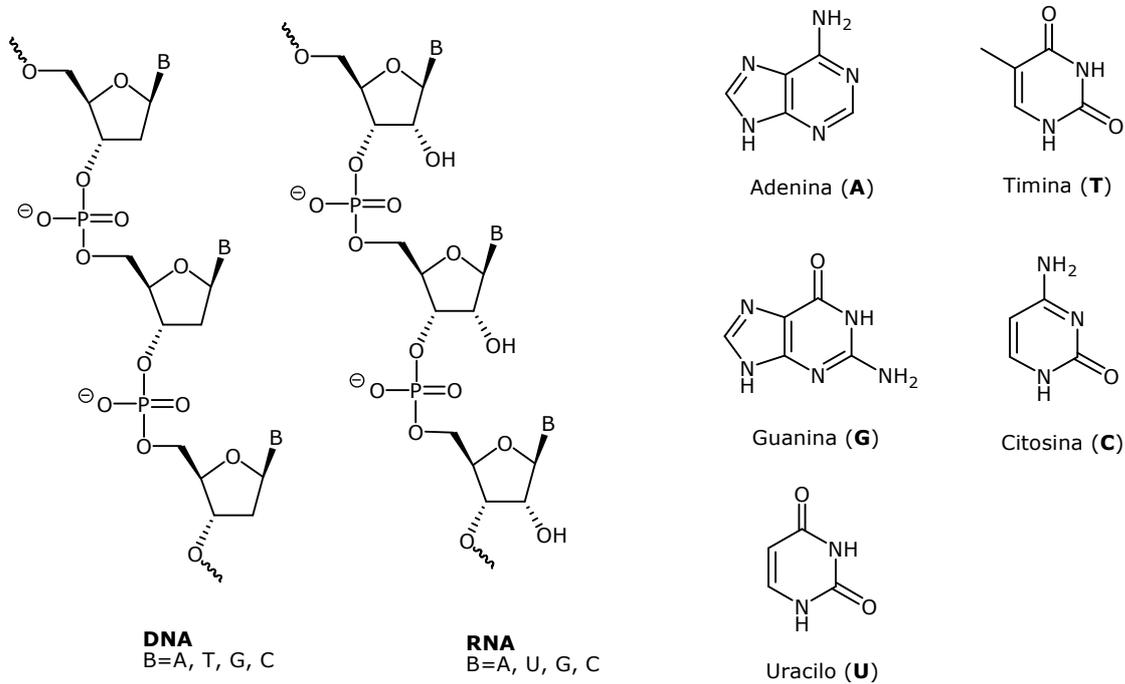
## **1. El DNA y sus estructuras**

El ácido desoxirribonucleico contiene la información empleada en el desarrollo y funcionamiento de todos los organismos vivos conocidos y su principal función es el almacenamiento de información, conteniendo las instrucciones necesarias para construir los otros componentes de las células como las proteínas y los oligosacáridos. La información contenida en un tramo de DNA se transfiere al correspondiente RNA en el proceso llamado transcripción. La información contenida en estas moléculas de RNA es empleada en la biosíntesis de proteínas mediante un proceso conocido como traducción.<sup>3</sup> Las moléculas de ácido ribonucleico hasta hace bien poco se creían meros mensajeros de la información contenida en el DNA. No obstante, los descubrimientos recientes ponen de manifiesto cada vez más su papel fundamental en la regulación de la expresión génica (ribozimas, microRNAs, RNA riboswitch)<sup>4-6</sup> en coordinación con las proteínas.

Desde el punto de vista químico, los ácidos nucleicos son polímeros en los que se alternan residuos de fosfato y nucleósidos (**Fig. 1.1**). En el DNA, los nucleósidos están formados por unidades de 2-desoxiribosa que se une mediante un enlace glicosídico a cuatro posibles nucleobases, dos de tipo pirimidínico, timina y citosina, y otras dos de carácter purínico, adenina y guanina.<sup>7</sup> Es la secuencia de estas cuatro nucleobases a lo largo de la cadena la que codifica la información. En las células el DNA se organiza en estructuras llamadas cromosomas y el conjunto de cromosomas constituye el genoma. La información

contenida en el DNA no sólo descansa en la concatenación de nucleobases, sino también en la estructura tridimensional que adopta, que es variada y dinámica.<sup>3</sup>

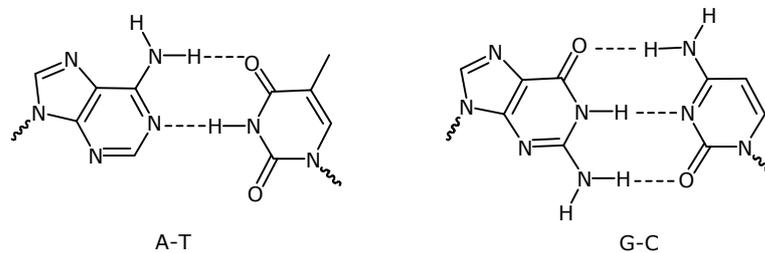
**Figura I.1 Estructura química de las cadenas de DNA y RNA**



### 1.1 Las dobles hélices de DNA

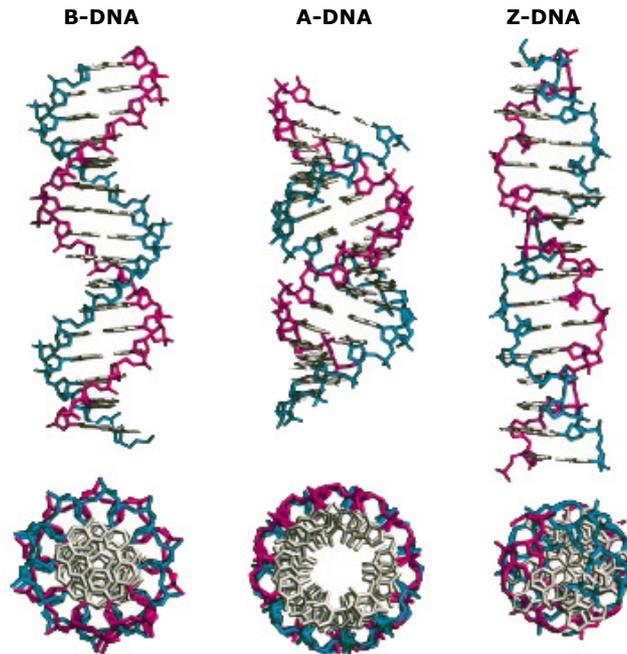
En los organismos vivos, el DNA normalmente no existe en forma de cadena sencilla, sino que se encuentra asociado en forma de doble hélice. Esta doble hélice queda estabilizada principalmente por las interacciones por puente de hidrógeno que se establecen entre las nucleobases de cada cadena (**Fig. I.2**). Ambas cadenas se mantienen unidas también por interacciones de tipo hidrofóbico y por interacciones de apilamiento entre las nucleobases.<sup>8</sup>

**Figura I.2 Enlaces por puente de hidrógeno tipo Watson-Crick entre A-T y C-G**



Por el momento se han identificado hasta tres familias de conformaciones diferentes para la doble hélice, conocidas como A-DNA, B-DNA y Z-DNA, y que se dan de forma natural en sistemas biológicos<sup>8</sup> (**Fig. I.3**). La forma helicoidal B-DNA, descrita por J. D. Watson y F. Crick<sup>1</sup> se cree que es la forma predominante en los organismos vivos.

**Figura I.3 Conformaciones de la doble hélice de DNA identificadas en sistemas biológicos**



Las formas helicoidales A-DNA y Z-DNA difieren significativamente en la geometría y en las dimensiones respecto al B-DNA.<sup>8</sup> El A-DNA se forma en condiciones no fisiológicas de muestras de DNA deshidratadas empleadas para experimentos cristalográficos, mientras que en medio celular la adoptan los híbridos DNA-RNA, y determinados complejos enzima-DNA.<sup>9</sup> En el medio celular, segmentos de DNA que han sido metilados pueden experimentar un gran cambio en su conformación adoptando la forma Z.<sup>8</sup> Las cadenas se disponen a lo largo del eje de la hélice de manera opuesta a las formas A y B, tratándose en este caso de una doble hélice levógira. Estas estructuras pueden ser reconocidas por proteínas que se unen de manera específica a Z-DNA y pueden estar involucradas en procesos de regulación de la transcripción.<sup>10</sup>

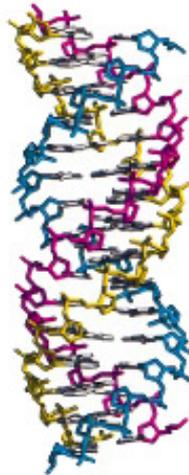
## **1.2 Otras estructuras no canónicas del DNA**

El DNA puede adoptar otras posibles estructuras diferentes de la doble hélice. De estas estructuras no canónicas del DNA, aunque de papel biológico poco conocido, todo parece indicar que están involucradas en las etapas metabólicas cruciales del DNA, como la replicación, la transcripción o la recombinación.

Un tipo de estructura no canónica del DNA es la **triple hélice (Fig. I.4)**, descrita por primera vez en 1957 por G. Felsenfeld y A. Rich.<sup>11</sup> Considerada una curiosidad durante bastantes años, esta estructura se forma al unirse una tercera cadena de DNA al surco mayor de una doble hélice.<sup>12</sup> Las nucleobases de la tercera cadena (en la figura, de color amarillo) interactúan de manera específica con una de las cadenas de la doble hélice según

un esquema de enlaces por puente de hidrógeno (tipo Hoogsteen), diferente al descrito por J. D. Watson y F. Crick. Para que estas estructuras sean estables, la cadena de la doble hélice que interacciona con la tercera cadena ha de ser un tramo rico en purinas (en la figura, de color azul). Por contra, la tercera cadena puede contener pirimidinas o bien purinas (véase apartado 1.2, capítulo 3).

**Figura I.4 Ejemplo de triple hélice de DNA. (La tercera cadena se muestra en amarillo, y la cadena central purínica en azul)**

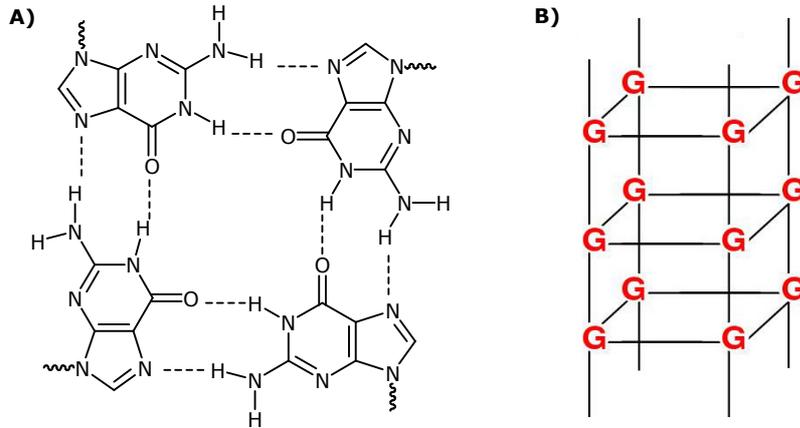


Más adelante, se sugirió que las triples hélices del tipo H-DNA podían tener un papel biológico.<sup>13</sup> Consisten en una triple hélice intramolecular y se forma en regiones homopirimidina-homopurina de secuencia palindrómica. Para adoptar esta estructura, la mitad de un tramo se disocia de forma que la cadena que contiene la secuencia pirimidínica se hibrida con el tramo purínico que no se ha disociado, dejando un segmento purínico sin aparear. De manera similar al H-DNA, se forma el H'-DNA, siendo en este caso un segmento purínico el que se hibrida con la doble hélice, quedando en este caso un segmento pirimidínico sin aparear.<sup>14</sup> La formación de este tipo de estructuras se cree que puede estar relacionada con procesos de regulación de la expresión génica.<sup>15,16</sup>

Los **cuádruplex de guanina** son otro de los motivos estructurales no canónicos de DNA en que participan hasta cuatro cadenas de DNA (**Fig. I.5**), que se forman al apilarse dos o más cuartetos de guaninas coplanares y situadas en los vértices de un cuadrado imaginario. En esta disposición, cada guanina forma cuatro enlaces por puente de hidrógeno, dos con cada una de sus vecinas.<sup>17</sup>

Los cuádruplex de G son estructuras altamente polimórficas. Según el número de moléculas de DNA que forman parte de la estructura pueden ser tetramoleculares (formados por cuatro moléculas de DNA), bimoleculares (dos moléculas que dimerizan donde cada una de ellas forma una horquilla o *hairpin*), o unimoleculares (una sola molécula con varias regiones ricas en guanina se repliega sobre sí misma). Los cuádruplex de guanina se estabilizan en presencia de cationes  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  y son bastante estables en condiciones fisiológicas.<sup>18</sup>

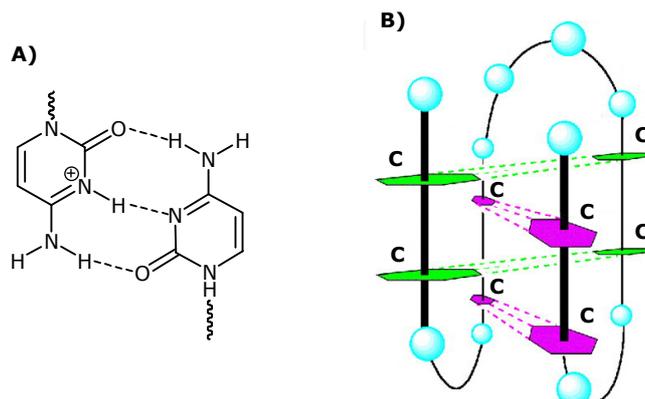
**Figura I.5 A) Interacciones por puente de hidrógeno en un cuarteto de guanina B) Representación esquemática del cuádruplex de guanina**



La existencia de los cuádruplex de guanina *in vivo* es una de las grandes cuestiones que aún quedan por confirmar, aunque existen evidencias indirectas de su formación en medios biológicos. El papel biológico más aceptado tiene relación con la presencia en los telómeros.<sup>19</sup> El DNA telomérico está formado por múltiples repeticiones consecutivas de una secuencia corta y rica en guaninas llamada secuencia telomérica que forma parte de los extremos 3' de los cromosomas en las células eucariotas. Son regiones no codificantes del genoma que se unen a diversas proteínas dando lugar a estructuras bastante complejas, cuya función principal es mantener la estabilidad e integridad de los cromosomas a lo largo de los ciclos de replicación y división celular.<sup>20</sup> En el ser humano, las secuencias teloméricas de las células somáticas se extienden a 8-10 kilobases y están formadas por repeticiones de la secuencia -TTAGGG-. Se han publicado diversos estudios donde se demuestra que las secuencias teloméricas pueden estructurarse en forma de cuádruplex de guanina.<sup>19</sup>

Otra estructura tetracatenaria es el **cuádruplex de citosina o motivo de tipo i (*i-motif*)**.<sup>21,22</sup> Es una estructura que se forma por intercalación de pares de bases C-C<sup>+</sup> (**Fig. I.6**). Por ello, se da únicamente en secuencias ricas en citosina. Al necesitar de la protonación de la citosina es poco estable en condiciones fisiológicas. Este tipo de secuencias se puede encontrar en diferentes partes del genoma y en particular, en la zona telomérica, en la cadena complementaria a la rica en guaninas.<sup>23</sup>

**Figura I.6 A) Interacciones por puentes de hidrógeno en un par C-C<sup>+</sup> B) Representación esquemática del i-motif**



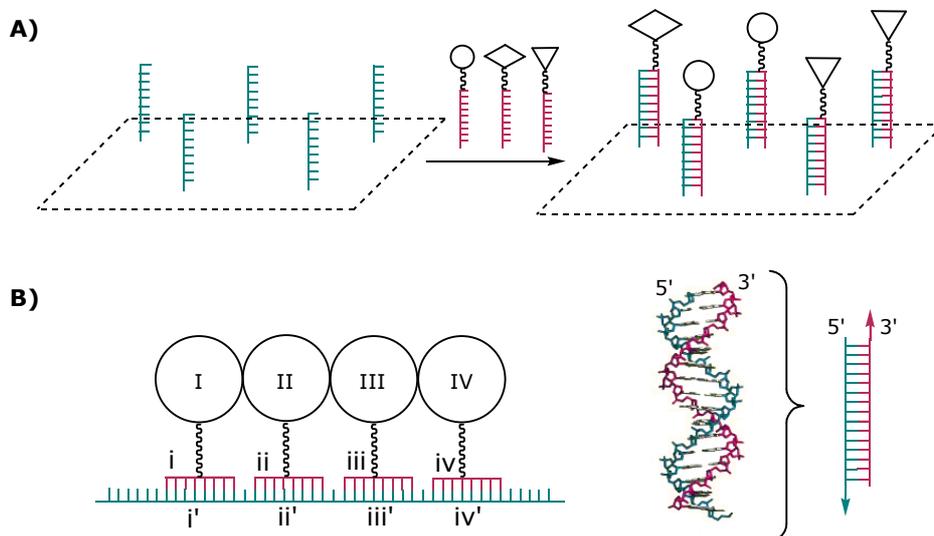
## **2. Aplicaciones de las propiedades del DNA y sus derivados**

Las interacciones específicas que se dan entre las nucleobases de los ácidos nucleicos constituyen las bases de la genética, pero también constituyen el mecanismo de reconocimiento molecular de mayor sencillez y a la vez, de mayor afinidad y especificidad conocido. De ahí, que los oligonucleótidos tengan hoy día múltiples aplicaciones que superan el marco de sus propiedades biológicas. Partiendo de las excelentes propiedades de reconocimiento molecular y de autoestructuración, los oligonucleótidos y sus derivados tienen aplicación hoy día en muy diversos campos, en biología molecular y biotecnología, en diagnóstico y análisis clínico, en el desarrollo de nuevos fármacos e incluso en nanotecnología. A continuación, en este apartado se comentarán algunas de las aplicaciones más relevantes. Como se verá, en cada una de ellas es fundamental la contribución de la química orgánica, procurando metodologías sintéticas sencillas, eficaces y automatizadas para obtener oligonucleótidos y mejorando las limitaciones de la estructura natural de los ácidos nucleicos con el diseño de nuevos análogos.

### **2.1 Aplicaciones tecnológicas**

Las excelentes propiedades de reconocimiento molecular de los ácidos nucleicos por hibridación de cadenas han permitido desarrollar múltiples aplicaciones tecnológicas. Por ejemplo, en los dispositivos denominados *chips* o *arrays* de DNA se inmovilizan un gran número de oligonucleótidos de secuencia aleatoria de entre 10 y 25 nucleobases sobre un soporte sólido o superficie con el fin de emplearlos como sondas, entre otras aplicaciones, para llevar a cabo el cribado de secuencias de DNA, proteínas, pequeñas moléculas, e incluso de nanopartículas<sup>24</sup> (**Fig. I.7, A**). Otras recientes aplicaciones han demostrado que estos microdispositivos se pueden emplear como herramientas eficientes en la desconvolución de quimiotecas.<sup>25</sup>

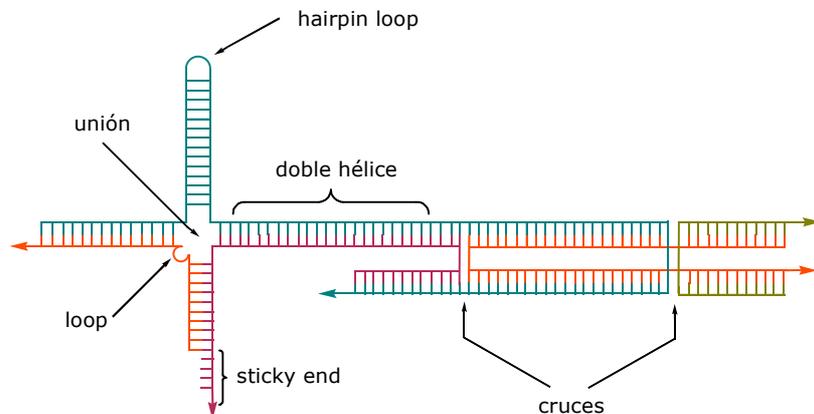
**Figura I.7 A) Cadenas cortas de DNA inmovilizadas sobre un soporte sólido empleadas como sondas B) Ensamblaje direccionado de diferentes nanopartículas**



Las propiedades de reconocimiento molecular por hibridación de dos cadenas de DNA de secuencia complementaria también pueden tener utilidad en el ensamblaje de nanopartículas metálicas y semiconductoras (**Fig. I.7, B**). Esta técnica, introducida en 1996 por C. A. Mirkin<sup>26</sup> y colaboradores, permite de manera sencilla la obtención de nuevos materiales y ha evolucionado para constituir un fructífera área de investigación con múltiples aplicaciones, que engloba desde la investigación en materiales hasta el desarrollo de técnicas de diagnóstico médico.<sup>27-29</sup> Por ejemplo, el ensamblaje de nanopartículas dirigida por la hibridación de las cadenas complementarias podría dar lugar a una estructura supramolecular repetitiva. Las cadenas oligonucleotídicas también se pueden emplear para dirigir el ensamblaje de varios componentes, mediante la adecuada disposición en la superficie de las cadenas oligonucleotídicas de anclaje. Esta metodología, cuya validez inicialmente quedó demostrada en el caso de los complejos de DNA-proteína<sup>30</sup>, también se ha empleado para dirigir el ensamblaje de nanopartículas inorgánicas,<sup>31</sup> y como molde para llevar a cabo la síntesis de pequeñas moléculas orgánicas sobre la superficie de forma programada.<sup>32</sup>

Hay dos tipos de construcciones básicas en nanotecnología: sistemas “de arriba, a abajo” (*top-down*) y “de abajo, a arriba” (*bottom-up*). Como su nombre sugiere, un sistema *top-down* consiste en la manipulación microscópica de un pequeño número de unidades moleculares que a modo de piezas de puzzle permiten construir estructuras ordenadas de gran tamaño. En las construcciones *bottom-up*, la superestructura se origina por autoensamblaje de una serie de pequeñas moléculas con propiedades de reconocimiento molecular. Debido a las excelentes propiedades de reconocimiento y autoestructuración que poseen los ácidos nucleicos, éstos son especialmente interesantes en construcciones *bottom-up*. Sin embargo, las dobles hélices, que son las estructuras típicas de DNA, son lineales y sin ramificaciones, por lo que estos motivos estructurales son insuficientes para construir nanoarquitecturas más complejas en dos y tres dimensiones. Para este propósito se requieren motivos estructurales más complejos como unidades básicas de construcción.<sup>33</sup>

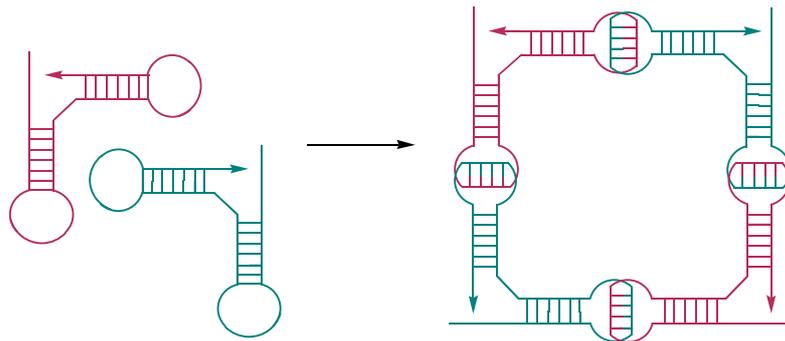
**Figura I.8 Motivos estructurales básicos empleados en construcciones nanotecnológicas**



La secuencia nucleotídica determina la habilidad de un oligonucleótido para hibridarse total o parcialmente con un oligonucleótido complementario, permitiendo de este modo la formación de diferentes motivos como hélices, uniones, cruces y giros. Estos motivos se pueden emplear como unidades básicas de construcción y se pueden ensamblar mediante la interacción con cadenas oligonucleotídicas con extremos cohesivos (*sticky ends*). La combinación de estos elementos puede ser empleada para generar unidades básicas de construcción más complejas para obtener motivos estructurales de mayor orden y enriquecer el abanico de herramientas disponibles para el diseño de nanoarquitecturas.<sup>33-43</sup>

La capacidad del DNA para adoptar otros motivos estructurales diferentes de la doble hélice puede ser también de utilidad en el diseño de nanoestructuras. Por ejemplo, las nanoestructuras obtenidas por autoensamblaje de oligonucleótidos formadores de cuádruplex de guanina son más rígidas que las formadas por dobles hélices.<sup>44</sup> También se han diseñado nanoestructuras complejas empleando como unidad de ensamblaje una forma de horquilla del RNA, conocida con el nombre de tectoRNA<sup>45,46</sup> (**Fig. I.9**).

**Figura I.9 Ejemplo de ensamblaje de un motivo estructural de RNA a partir de tectoRNA como unidades básicas de construcción**



En definitiva, el motivo estructural que actúa como unidad básica de construcción se elige según la construcción supramolecular que se quiere obtener, considerando aspectos tales como la simetría, la periodicidad y las dimensiones de la estructura en crecimiento.

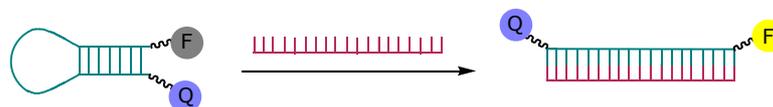
A pesar del extraordinario desarrollo experimentado en los últimos años, no existe aún ningún producto de mercado basado en nanoestructuras de DNA. Actualmente, las aplicaciones hacen referencia a nuevos materiales o construcciones con propiedades estructurales y funcionales, como el posicionamiento dirigido de moléculas y de nanopartículas empleando una estructura de DNA como guía,<sup>37,47-51</sup> la generación de elementos conductores mediante la metalización,<sup>37,52,53</sup> el diseño de dispositivos lógicos y de computación básica basados en DNA,<sup>54-57</sup> o incluso su empleo en la fabricación de nanodispositivos mecánicos, tal y como se comentará a continuación. N. C. Seeman destacaba a principios de los años 80 que uno de las principales objetivos a conseguir era la construcción en tres dimensiones de cristales de DNA con el propósito de emplearlos como unidades repetitivas periódicas para el análisis cristalográfico de moléculas de difícil cristalización.<sup>34</sup> Sin embargo, la construcción de nanoestructuras regulares en tres

dimensiones no se llegó a conseguir hasta el año 2004.<sup>58</sup> Además de éstas, existen ejemplos de estructuras basadas en DNA en forma de nanotubos,<sup>52,59,60</sup> los cuales una vez metalizados dan lugar a elementos conductores,<sup>52,59</sup> e incluso a figuras geométricas como octaedros<sup>61</sup> y tetraedros.<sup>62</sup>

Como ya se señalaba anteriormente, el DNA no sólo puede ser útil en la construcción de estructuras estáticas, sino que también se puede emplear en la fabricación de dispositivos dinámicos. Pueden diseñarse dispositivos con capacidad de llevar a cabo trabajo mecánico<sup>34,63</sup> mediante uno o varios oligonucleótidos con la capacidad de adoptar dos o más estructuras por hibridación alternativa de las cadenas. El cambio de estado topológico puede inducirse externamente mediante la adición de agentes químicos externos. Por ejemplo, simplemente variando el medio iónico o el pH, puede producirse un cambio topológico en el DNA, como el superenrollamiento del DNA,<sup>64</sup> la transición entre la forma B y la forma Z de una doble hélice,<sup>65</sup> el cambio de orientación entre dos cadenas hibridadas,<sup>66</sup> la formación reversible de cuádruplex de G,<sup>67,68</sup> así como la formación del cuádruplex de C y triples hélices.<sup>68-70</sup> Todos estos cambios estructurales son reversibles y la dirección de la transición se puede invertir variando la fuerza iónica del medio o el pH. Entre las potenciales aplicaciones de estos procesos se incluyen interruptores moleculares que se activan o desactivan según la composición del medio para por ejemplo, controlar el espaciamiento de nanopartículas, regular la accesibilidad del DNA a enzimas o simplemente actuar como biosensores en medios celulares.<sup>34,63,66</sup>

Mientras que los ejemplos mencionados hacen referencia a cambios topológicos más o menos graduales ocasionados por la presencia o ausencia de pequeñas moléculas, existe otra estrategia que consiste en inducir cambios de estado de determinados motivos estructurales mediante la hibridación con cadenas complementarias de DNA. El ejemplo más paradigmático de esta estrategia ha sido el desarrollo de sensores moleculares fluorescentes llamados *balizas moleculares* (*molecular beacons*, **Fig. I.10**), basados en fenómenos de resonancia Föster (*FRET* o *Föster Resonance by Energy Transfer*). En este caso, la hibridación con una cadena complementaria produce un cambio de fluorescencia.<sup>71</sup>

**Figura I.10 Mecanismo de una baliza molecular (molecular beacon)**

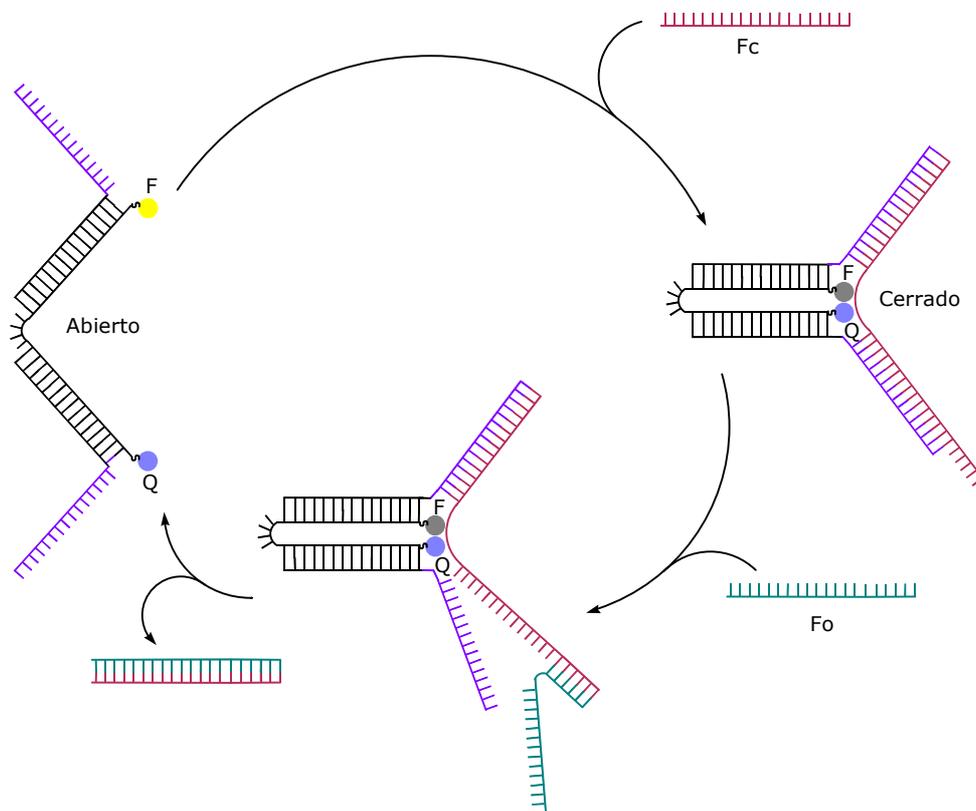


Estos dispositivos moleculares están formados por una cadena oligonucleotídica, que por complementariedad entre sus dos extremos, adopta una estructura de *horquilla-lazo* (*hairpin-loop*) intramolecular. Además, los extremos del oligonucleótido están modificados químicamente con un fluoróforo (F) y una sustancia que atenúa la emisión del fluoróforo (*quencher*, Q), mediante un fenómeno de transferencia de energía por resonancia Föster (FRET). Al hibridarse con una cadena complementaria, Q queda alejado de F conduciendo a un fuerte aumento en la fluorescencia. Siguiendo el mismo principio, existen otros

dispositivos fluorescentes basados en otras estructuras de DNA, que actúan produciendo atenuación o incremento en la fluorescencia según se produzca la hibridación o no con sus cadenas complementarias<sup>72,73</sup> Desde su aparición, se han desarrollado numerosas aplicaciones basadas en *balizas moleculares* que van desde la cuantificación de la amplificación de secuencias vía PCR (*polymerase chain reaction*), hasta la detección de mutaciones, o de los llamados polimorfismos mononucleotídicos (*Single Nucleotide Polymorphism* o SNP) relacionados con determinadas patologías.<sup>72,74</sup>

Se han diseñado otros dispositivos dinámicos basados en el desplazamiento de cadena por hibridación. Si en una doble hélice algunas de las nucleobases no son perfectamente complementarias o bien una de las cadenas tiene un extremo no hibridado, al añadir una cadena perfectamente complementaria se produce el desplazamiento de la cadena parcialmente complementaria para formar un dúplex más estable. Con este principio se han diseñado diversas nanomáquinas de DNA donde el desplazamiento de cadena opera a modo de interruptor entre dos estados.<sup>75-77</sup> La **Fig. 1.11** muestra un ejemplo de este tipo de dispositivos. También se han descrito dispositivos mecánicos en que la adición o sustracción de una cadena oligonucleotídica por hibridación con una cadena añadida externamente produce un cambio estructural, pasando de dúplex a un cuádruplex de guanina.<sup>78</sup> Recientemente, se han diseñado dispositivos nanomecánicos que semejan rudimentarios robots con la capacidad de desplazarse.<sup>79,80</sup>

**Figura 1.11** Ejemplo de un nanodispositivo de DNA que opera entre dos estados por adición o sustracción de un cadena oligonucleotídica parcialmente complementaria



Uno de los aspectos básicos tanto en el diseño de las nanoestructuras como de las máquinas moleculares basadas en DNA es la correcta elección de los elementos autoensamblables, ya que se precisa una elevada afinidad y selectividad para procurar la correcta hibridación de las cadenas oligonucleotídicas. Un factor limitante, en especial en aquellos diseños que implican la participación de un elevado número de cadenas, es la tendencia que presentan las cadenas oligonucleotídicas a adoptar estructuras alternativas, por lo que es necesaria la utilización de complicados algoritmos para su correcta elección.

El gran incremento de publicaciones en este campo indica claramente que el diseño y fabricación de nanoarquitecturas de DNA es mucho más que un desafío intelectual. Avances recientes han propiciado aplicaciones bastante prometedoras como el posicionamiento dirigido de proteínas y nanopartículas, con posible aplicación en biomedicina y el diseño de elementos conductores para la construcción de dispositivos electrónicos de escala nanométrica.<sup>35,47</sup>

## **2.2 Aplicaciones terapéuticas**

Durante los últimos veinte años se ha dedicado un gran esfuerzo a estudiar el empleo de los oligonucleótidos como agentes terapéuticos que actúan como reguladores de la expresión génica. Ésta ha sido sin duda alguna la aplicación más importante de los oligonucleótidos y es de esperar que por los esfuerzos que aquí se comentan siga siéndolo en el futuro. El primer indicio que se obtuvo de su posible aplicación en este campo fue en 1977 por B. M. Paterson<sup>81</sup> y colaboradores, que consiguieron inhibir el proceso de traducción de un RNA mensajero (mRNA) mediante hibridación con un oligonucleótido sintético de cadena complementaria. A lo largo de estos años se han realizado numerosos estudios con el objeto de desarrollar diversas estrategias útiles para el empleo farmacológico de los oligonucleótidos. Como se verá a continuación, el ingente esfuerzo dedicado ha dado sus frutos y actualmente ya se dispone de dos fármacos oligonucleotídicos, y es posible que su número aumente en un futuro próximo. Las diferentes estrategias se pueden clasificar en función de la diana celular sobre la que actúan y el mecanismo de acción.

En la llamada **estrategia antisentido**, el oligonucleótido se diseña para ser complementario a un mRNA. El híbrido oligonucleótido-mRNA así formado interfiere en el proceso de traducción inhibiendo e incluso anulando la expresión del gen responsable de un determinado desorden. Al formarse el híbrido DNA-RNA también puede producirse la degradación del mRNA por activación de la RNasa-H.<sup>82,83</sup> También se ha demostrado que los oligonucleótidos antisentido pueden bloquear los procesos de autoescisión o *splicing* aberrantes en el pre-mRNA,<sup>84</sup> que se desencadenan cuando se producen mutaciones en la secuencia del pre-mRNA, conduciendo a proteínas mutadas. En la actualidad, se encuentra en el mercado un oligonucleótido basado en la estrategia antisentido llamado Vitravene®, comercializado por *Isis Pharmaceuticals*, empleado para tratar la retinitis causada por

citomegalovirus (CMV). Otros oligonucleótidos antisentido se encuentran en fases clínicas avanzadas,<sup>85,86</sup> según se indica en la **Tabla I.1**.

**Tabla I.1 Selección de oligonucleótidos antisentido en fases de desarrollo clínico**

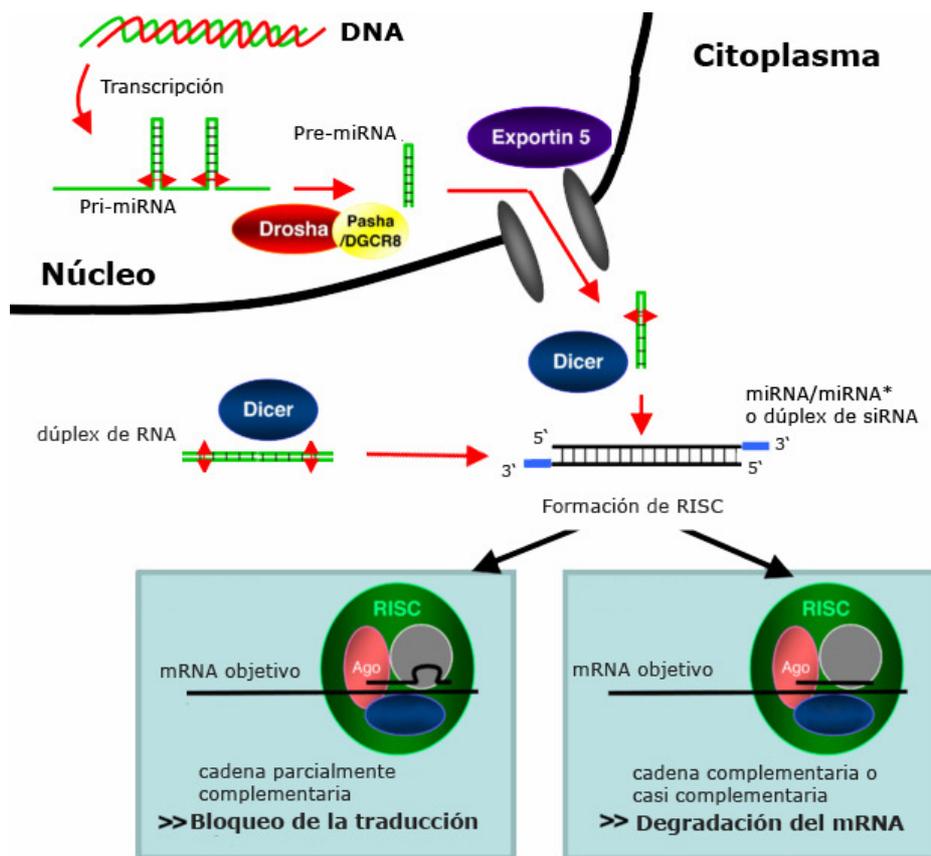
Fármaco	Enfermedad	Estado
Alicaforsen	Enfermedad de Crohn	Fase III
ISIS 301012	Colesterol	Fase II
ISIS 113715	Diabetes	Fase II
Resten-NG	Restenosis	Fase II
AVI-4065	Hepatitis C	Fase Ib
AVI-4557	Metabolismo de fármacos	Fase I
AVI-4020	Virus del oeste del Nilo	Fase I
Genasense*	Cáncer	Fase III
G4450*	Cáncer	Fase I
GTI-2040*	Carcinoma renal, leucemia	FaseII
GTI-2501	Cáncer de pulmón y de próstata	Fase I/II
TPI-ASM8	Asma	Fase II
OGX-011*	Cáncer	Fase II
VRX496	HIV	Fase I

\*En combinación con terapias convencionales para el cáncer

En la **estrategia sentido**, el oligonucleótido se diseña para unirse de manera específica y con gran afinidad a determinadas proteínas, para producir la inhibición o interferir en su actividad biológica; son los llamados oligonucleótidos aptámero. El reconocimiento de las dianas biológicas tiene su origen en la estructura terciaria adoptada por la cadena oligonucleotídica.<sup>87</sup> Los aptámeros se obtienen a través de un proceso de selección *in vitro* conocido como SELEX (*Systematic evolution of ligands by exponential enrichment*), en el que los oligonucleótidos son seleccionados a partir de una biblioteca o quimioteca inicial de secuencias (aproximadamente  $10^{15}$ ) realizando repetidos ensayos de hibridación y separación de los oligonucleótidos de mayor afinidad por las dianas.<sup>88,89</sup> Recientemente, la FDA (*Food and Drug Administration*) estadounidense ha aprobado un fármaco basado en esta estrategia llamado Macugen®, coproducido por *Eyetech Pharmaceuticals* y *Pfizer*, y que se emplea para tratar la degeneración de la retina asociada con el envejecimiento.<sup>90,91</sup> Actualmente hay diversos grupos implicados en el desarrollo de aptámeros, dirigidos a tan diversas patologías como agentes anticoagulantes, tratamientos contra la obesidad, antivirales, tratamientos contra el Alzheimer o el síndrome de Creutzfeldt-Jakob.<sup>92,93</sup> Más recientemente, por su elevada afinidad y especificidad, los aptámeros podrían también tener aplicación en el desarrollo de sensores aplicados a diagnóstico y en la evaluación de nuevas dianas terapéuticas.<sup>93-96</sup>

El **RNA de interferencia (RNAi)** es un mecanismo celular (**Fig. I.12**), que implica la degradación de moléculas de RNA. Descubierta recientemente, ha revolucionado la investigación en biología. Prueba de ello, los primeros investigadores en hacer referencia a este mecanismo en 1998, A. Fire y C. C. Mello<sup>97</sup>, fueron premiados el pasado año con el Premio Nobel. Su descubrimiento consistió en observar una gran eficiencia en la inhibición de un gen del nematodo *Caenorhabditis elegans* si se inyectaba un dúplex de RNA de secuencia complementaria.

**Figura I.12 Mecanismos de silenciamiento por RNAi y miRNA**



El mecanismo de interferencia<sup>98-100</sup>, aún no del todo conocido, se inicia con la ribonucleasa Dicer, la cual se une y corta RNA exógeno bicatenario para producir fragmentos dúplex de RNA más cortos (20-25 nucleobases) y con algunas nucleobases desapareadas en los extremos. Estos fragmentos más cortos, llamados siRNA (*small interfering RNAs*), son separados e integrados en el complejo enzimático RISC (*RNA-induced silencing complex*). Los componentes con actividad catalítica del RISC son conocidos en animales como proteínas Argonata, con actividad endonucleasa, que producen la degradación de mRNA de secuencia complementaria a una de las cadenas de siRNA. De los fragmentos producidos por Dicer, tan sólo la cadena complementaria al mRNA (cadena guía) se une a las proteínas Argonata. La cadena seleccionada como guía tiende a ser aquella cuyo extremo 5' presenta una unión más débil con su cadena complementaria. La cadena se hibrida específicamente con el mRNA objetivo, dirigiendo de este modo la actividad nucleasa del complejo. La otra cadena (cadena

pasajero) es degradada por las proteínas Argonauta antes de la activación del RISC. El mecanismo se esquematiza en la **Fig. I.12**.

Como se indica en la **Tabla I.2**, existen ya ejemplos de RNAs de interferencia en fases clínicas,<sup>86</sup> demostrando que se puede conseguir el silenciamiento del mRNA empleando análogos que mimetizan siRNA.<sup>101-103</sup>

**Tabla I.2 Oligonucleótidos siRNA en fases de desarrollo clínico**

Fármaco	Enfermedad	Estado
Cand5	Degeneración macular	Fase I
Sirna-027	Degeneración macular	Fase I
ALN-RSV01	Infección virus RSV	Fase I

Además del RNAi, se ha observado que existe otro mecanismo endógeno de regulación génica de silenciamiento de mRNA, basado en los llamados **microRNA (miRNA)**. Descrito por primera vez por V. Ambros y colaboradores,<sup>104</sup> los miRNA son también RNA bicatenarios, de secuencia no codificante y de entre 21 y 23 residuos, que están implicados en la regulación génica en plantas y animales.<sup>5</sup> El mecanismo<sup>5,105-110</sup> de acción de los miRNA aún no se conoce completamente (**Fig. I.12**). Se sabe que en primer lugar se transcribe el pri-miRNA, que es procesado en el núcleo para generar un pre-miRNA de menor tamaño (alrededor de 70 nucleobases). En animales, este proceso lo lleva a cabo un complejo proteico compuesto por la nucleasa Drosha y la proteína Pasha, que se unen al RNA bicatenario. El pre-miRNA se procesa luego en el citoplasma para obtener el miRNA maduro por mediación de la endonucleasa Dicer, la cual también inicia la formación del complejo proteico RISC, de forma similar a los siRNA. Las proteínas Argonauta del complejo RISC pueden mediar en la degradación del mRNA aunque la cadena guía del microRNA no sea completamente complementaria. Sin embargo, si la cadena guía es parcialmente complementaria, se sabe que el complejo formado puede interferir en la traducción del mRNA mediante un mecanismo aún no del todo conocido.<sup>110</sup> Existen evidencias que relacionan los microRNA con diversas enfermedades, como la diabetes, desórdenes neurológicos o el desarrollo de varios cánceres<sup>108-110</sup>, de ahí, que se haya sugerido la posible aplicación terapéutica de los oligonucleótidos basados en microRNA.

Existen otras posibles estrategias terapéuticas basadas en oligonucleótidos, pero sus resultados son aún muy modestos. En la **estrategia antígeno** el oligonucleótido se diseña para unirse a un segmento de DNA cromosómico formando una triple hélice, con el objeto de bloquear de este modo la maquinaria encargada del proceso de transcripción.<sup>12</sup> La formación de la triple hélice puede dificultar o impedir la unión de las proteínas encargadas del proceso de transcripción de un determinado gen, interferir en la replicación, alterar la recombinación génica, inducir reparaciones en una secuencia dañada o incluso inducir mutagénesis.<sup>111-115</sup> La ventaja de esta estrategia es que se interviene en el origen de la información, el DNA nuclear, y no en el mRNA, que es el siguiente eslabón y del que existen numerosas copias en

la célula. Sin embargo, la formación de las triples hélices, aparte de verse condicionada por la presencia de secuencias polipurínicas, requiere en ocasiones unas determinadas condiciones iónicas y de pH<sup>12</sup> (véanse los apartados 1.2 y 5.1 del capítulo 3) que difieren de las fisiológicas. En este caso, el blanco biológico es más difícil de alcanzar, ya que el oligonucleótido antígeno ha de poder llegar al núcleo para unirse al DNA. Por todo esto, hasta el momento el empleo de oligonucleótidos antígeno se ha limitado a ensayos biológicos y en modelos celulares.

Otra posible alternativa terapéutica se basa en los **ribozimas**, que son cadenas de RNA que presentan la capacidad de degradar otras secuencias de RNA. Esta actividad fue observada por primera vez por el grupo de T. R. Cech al constatar que el mRNA de *Tetrahema Thermophilia* experimentaba un proceso de autoescisión para generar el mRNA maduro, el llamado proceso de *splicing*, sin participación alguna de proteínas.<sup>116</sup> En los últimos años se han descubierto gran variedad de ribozimas, siendo el más ampliamente estudiado el ribozima cabeza de martillo (*hammerhead*).<sup>117-118</sup> Actualmente, existen algunos RNAs en desarrollo clínico basados en este tipo de ribozima<sup>4</sup> (**Tabla I.3**). Por su contribución al conocimiento de las propiedades enzimáticas de determinadas secuencias de RNA, T. R. Cech recibió el Premio Nobel en 1989.

**Tabla I.3 Fármacos basados en ribozimas que se encuentran en desarrollo clínico**

Fármaco	Enfermedad	Estado
Angiozyme	Cáncer colorectal	Fase II
Herzyme	Cáncer	Fase I
Heptazyme	Hepatitis C	Fase II

Muy relacionadas con las secuencias ribozima, recientemente se ha observado que en muchas bacterias, la expresión de genes cruciales en la biosíntesis de metabolitos o el transporte está regulado por estructuras de mRNA llamados conmutadores de RNA o **riboswitches**. Estas cadenas de RNA pueden re-estructurarse cuando se unen a un metabolito específico. El cambio topológico de la estructura que se produce es la señal que induce a la activación o a la inhibición de la expresión de los genes relacionados con la biosíntesis del metabolito.<sup>6,119-121</sup> Actualmente, el estudio de estas estructuras y sus funciones se cree que puede ser útil en el desarrollo de nuevos antibacterianos.<sup>121</sup>

### **3. Soluciones químicas a las limitaciones de los oligonucleótidos en sus múltiples aplicaciones**

Los oligonucleótidos son moléculas que cumplen con extrema perfección sus funciones biológicas. Sin embargo, presentan importantes limitaciones en las diversas aplicaciones que en los últimos años se han ido desarrollando. Por ejemplo, en la

construcción de nanoestructuras se requiere que sean químicamente estables en condiciones no fisiológicas, muestren una gran afinidad y especificidad y que las estructuras que se formen sean térmicamente muy estables.<sup>24,29</sup> En cuanto a su aplicación en diagnóstico nuevamente se requiere que presenten una elevada capacidad de reconocimiento molecular y que los motivos estructurales que se forman con la diana sean suficientemente estables en condiciones fisiológicas e incluso, *in vivo*.<sup>72</sup> Para su desarrollo como agentes terapéuticos además de las ya mencionadas, se precisa elevada capacidad de reconocimiento molecular, estabilidad enzimática y formación de motivos estructurales suficientemente estables en los medios celulares, y se requiere también que sean capaces de atravesar membranas biológicas para llegar a sus blancos biológicos.<sup>122</sup>

Para solventar las diversas limitaciones de los esqueletos oligonucleotídicos en las múltiples facetas de sus aplicaciones, la modificación química es sin duda alguna una de las mejores herramientas.<sup>122,123</sup> Para mejorar la vehicularización en medios celulares de los oligonucleótidos también se ha recurrido a la modificación química,<sup>124,125</sup> aunque existen otras posibilidades.<sup>126</sup> Se resumen brevemente a continuación los tipos de oligonucleótidos modificados más importantes y sus principales aplicaciones. Dada la especial relevancia de los oligonucleótidos empleados en medios celulares o con aplicación farmacológica, se dedicará un apartado a comentar los esfuerzos dedicados a mejorar las propiedades de penetración celular.

### **3.1 Oligonucleótidos modificados químicamente**

En principio, cualquier posición de la cadena oligonucleotídica puede ser modificada para conseguir una mejora en sus propiedades. Además, los oligonucleótidos se pueden unir covalentemente a una gran variedad de moléculas para dotarlos de propiedades adicionales. Introducir modificaciones químicas en un oligonucleótido puede afectar significativamente a sus propiedades. Así, puede tener efecto en sus propiedades de reconocimiento molecular, alterando el esquema de formación de enlaces por puente de hidrógeno, en las interacciones por apilamiento, de carácter electrostático o simplemente de tipo estérico. Los efectos provocados por las modificaciones no son fácilmente predecibles y dependen del tipo de modificación o de la posición de la secuencia en que se han realizado.

Por lo que respecta al tipo de modificación, la más empleada y químicamente más accesible es la sustitución del grupo fosfato por otras funcionalidades, y permite mejorar normalmente la estabilidad a la degradación enzimática en medios celulares. En este sentido, hay que tener en cuenta que una cadena de DNA presenta una vida media inferior a una hora en condiciones fisiológicas, porque es blanco de nucleasas que hidrolizan sus grupos fosfato. Si se sustituye el grupo fosfato, un grupo aniónico, por un grupo neutro o catiónico, la reducción de la carga negativa global del esqueleto mejora la afinidad de unión por su cadena complementaria e incluso tiene efectos favorables en la penetración celular.<sup>123,127-129</sup>

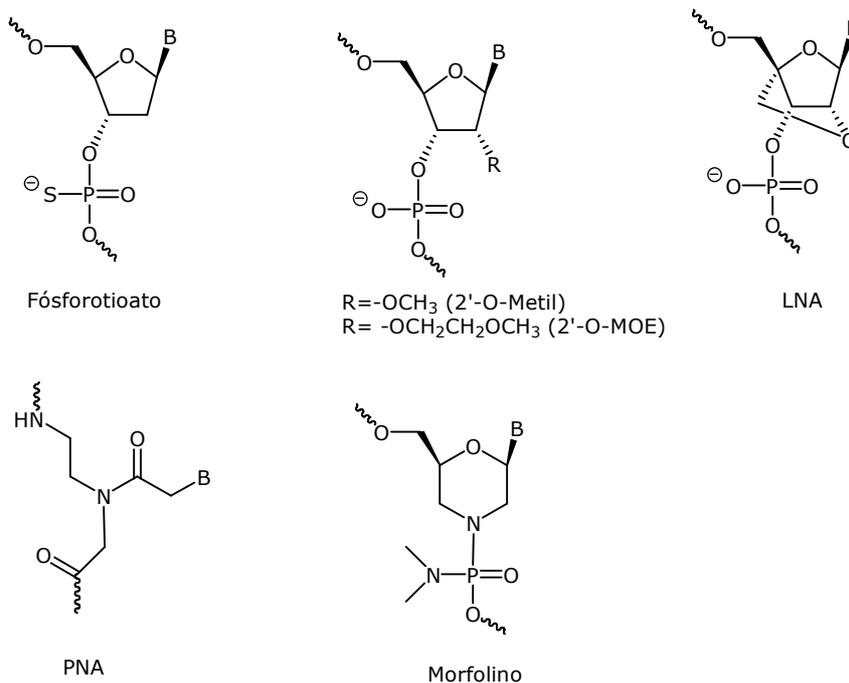
Por otro lado, modificando el anillo de ribosa se puede mejorar sustancialmente la afinidad de unión con su cadena complementaria. También, la incorporación de apéndices en los extremos de la cadena o que penden de posiciones internas pueden incrementar el acercamiento de las cadenas por efecto electrostático o variar el equilibrio conformacional de la cadena favoreciendo la hibridación con RNA.<sup>130</sup>

También se pueden sintetizar oligonucleótidos en los que se ha modificado por completo el esqueleto ribosa-fosfato manteniendo sin embargo, la posición de las nucleobases. Al haberse reemplazado la ribosa y los grupos fosfato por otro tipo de estructuras, estos oligonucleótidos no son sustrato de los enzimas encargados de la degradación de las cadenas de DNA. Con estas modificaciones también se puede mejorar la afinidad de unión al blanco por disminución del carácter aniónico de la cadena o bien forzando una nueva conformación que maximiza las interacciones estabilizantes.<sup>123,127-129</sup>

Se pueden unir covalentemente a los extremos de una cadena oligonucleotídica otras moléculas que incorporan nuevas funcionalidades dando lugar a conjugados. En la bibliografía se han descrito numerosos ejemplos de conjugados oligonucleotídicos con agentes intercalantes,<sup>131</sup> balizas fotoquímicas,<sup>132,133</sup> nanopartículas,<sup>134</sup> péptidos<sup>135-137</sup> o liposomas.<sup>129</sup> La modificación química de los extremos hidroxilo de la cadena también aporta estabilidad fisiológica a los oligonucleótidos, ya que los protege de la degradación enzimática producida por las exonucleasas.<sup>127-129</sup>

Las excelentes propiedades de reconocimiento molecular de los oligonucleótidos descansan esencialmente en las nucleobases. Gracias al patrón de formación de enlaces de hidrógeno entre las nucleobases, las cadenas oligonucleotídicas se hibridan de forma específica pero además, se establecen interacciones estabilizantes de apilamiento entre los anillos aromáticos, en que se combinan efectos hidrofóbicos y de fuerzas de dispersión entre los anillos aromáticos. En conjunto, la hibridación y el apilamiento aportan la mayor parte de la energía necesaria para compensar la repulsión electrostática entre los grupos fosfato. Por tanto, la modificación química de las nucleobases no sólo puede alterar la especificidad de unión del oligonucleótido sino también aumentar significativamente la afinidad por la cadena complementaria, alterando el esquema aceptor-donador de los enlaces de hidrógeno o bien incrementando las interacciones hidrofóbicas y de apilamiento. Además, las nucleobases pueden ser también derivatizadas para unir otras moléculas.<sup>138</sup>

En los últimos años, en la bibliografía se han descrito un gran número de modificaciones químicas, tanto por lo que respecta al enlace internucleosídico, como a la ribosa o a las nucleobases. La **Fig. I.13** resume algunos ejemplos de oligonucleótidos modificados de especial relevancia.

**Figura 1.13 Ejemplos de oligonucleótidos modificados**

La sustitución de un oxígeno no enlazante del grupo fosfato por un átomo de azufre da lugar a los oligonucleótidos **fósforotioato**, y ésta fue la primera modificación de esqueleto en ser ensayada.<sup>139</sup> Estos análogos de DNA son más resistentes a las nucleasas y son capaces de actuar como sustratos de la RNAsa-H, por lo que son unos buenos candidatos para actuar como agentes antisentido.<sup>140, 141</sup> De hecho, Vitravene®, el primer oligonucleótido autorizado como fármaco, es un oligonucleótido fósforotioato y hay otros que se encuentran en fases clínicas avanzadas. Aunque las dobles hélices formadas por este tipo de oligonucleótidos son algo menos estables que las formadas por oligonucleótidos sin modificar, mantienen la especificidad por la cadena complementaria.<sup>141</sup> No obstante, se ha demostrado que tienen tendencia a establecer interacciones no específicas con proteínas.<sup>142</sup>

Modificando la posición 2' del anillo de ribosa se pueden obtener **2'-O-metil-RNA** y **2'-O-metoxietil-RNA**.<sup>130</sup> Ambas modificaciones proporcionan mayor resistencia a las nucleasas y mejoran la afinidad de unión, pero no son capaces de actuar como sustratos de la RNAsa-H. Por otra parte, si sólo se modifican las posiciones de los extremos y se deja la parte central de la cadena oligonucleotídica sin modificar, se obtienen los llamados gápmers, que son capaces de activar la RNAsa-H y presentan mayor estabilidad fisiológica al tener los extremos modificados.<sup>143</sup> Existen algunos ejemplos de este tipo de análogos en ensayo clínico.<sup>123</sup>

Otra modificación de la ribosa conduce al **LNA** (*locked nucleic acid*). Esta modificación tiene el efecto de fijar la conformación 3'-endo de la ribosa, reduciendo el coste entrópico que se produce en el apareamiento de nucleobases y proporcionando un aumento en la estabilidad de los dúplex formados con RNA.<sup>144,145</sup> Este tipo de análogos no activa la

RNAse-H, pero sintetizando gápmers LNA-DNA-LNA se obtienen oligonucleótidos capaces de activar este mecanismo y más resistentes a las nucleasas al tener los extremos modificados.<sup>123</sup>

El llamado ácido nucleico peptídico o **PNA** (*peptide nucleic acid*) constituye una modificación más drástica del esqueleto ribosa-fosfato. Este análogo está formado por unidades de *N*-(2-aminoetil)-glicina unidas mediante enlaces amida, de donde penden las nucleobases distanciadas el mismo número de enlaces que en el DNA.<sup>146</sup> Este análogo posee un esqueleto neutro, por lo que la hibridación con DNA o RNA está más favorecida porque disminuyen las repulsiones electrostáticas con los grupos fosfato. Debido a su estructura no natural presenta una elevada estabilidad tanto a nucleasas como a las proteasas que degradan las proteínas.<sup>147</sup> Debido a la gran estabilidad química y enzimática muestran un gran potencial como herramientas de diagnóstico en biotecnología<sup>148</sup> y en la construcción de nuevos materiales en nanotecnología.<sup>134</sup> El PNA es incapaz de actuar como sustrato de la RNAse-H, pero es capaz de inhibir la expresión génica por bloqueo estérico. Se ha comprobado que su actividad antisentido es mayor que la de los fósforotioatos.<sup>147</sup> No obstante, los PNAs presentan una menor solubilidad en agua que los oligonucleótidos naturales, aunque puede mejorarse sintetizando quimeras DNA-PNA.<sup>149</sup> Una importante limitación es su escasa capacidad para penetrar en células.

Los oligonucleótidos **morfolino** se caracterizan por tener una estructura neutra en la que se ha sustituido el anillo de ribosa por morfolina y las uniones fosfato por grupos fósforodiamidato.<sup>150,151</sup> Como los monómeros pueden ser sintetizados a partir de los correspondientes ribonucleósidos, constituyen una alternativa económica a muchos análogos de DNA descritos en la literatura. Presentan una elevada estabilidad en el medio fisiológico y, a diferencia de otros análogos de DNA no iónicos, son solubles en medio acuoso.<sup>152</sup> Los oligonucleótidos morfolino pueden hibridarse con RNA formando dúplex más estables que los formados por DNA-RNA.<sup>153</sup> En experimentos llevados a cabo en células se ha demostrado que los análogos morfolino son más efectivos como inhibidores antisentido que los oligómeros fósforotioato, aunque los híbridos morfolino-RNA no sean capaces de activar la RNAse-H.<sup>152</sup> Además, los oligonucleótidos morfolino no se unen de manera inespecífica a proteínas y presentan una mayor especificidad de secuencia.<sup>153</sup> Actualmente existen diversos oligonucleótidos morfolino en fases clínicas.<sup>85</sup> También se ha visto que pueden ser útiles en el estudio del desarrollo de vertebrados, ya que pueden provocar el bloqueo de la expresión génica y producir modificaciones fenotípicas al ser inyectados en células embrionarias.<sup>154-156</sup> Con respecto a la estrategia antígeno, se ha comprobado que los oligonucleótidos morfolino pueden formar triples hélices en ausencia de magnesio y en presencia de potasio, condiciones en las que otros análogos de DNA no forman este tipo de estructuras. Experimentos de hibridación y modelización molecular muestran que el esqueleto de un oligonucleótido morfolino es compatible con la estructura de una triple hélice, aunque sólo en uno de los posibles motivos estructurales.<sup>157</sup>

Por otra parte, del mismo modo que ocurre con los PNAs, su principal limitación es que presentan una escasa capacidad para atravesar membranas biológicas.<sup>153</sup> Precisamente, en el siguiente apartado se comentarán algunas de las principales estrategias para mejorar la capacidad de los oligonucleótidos para atravesar membranas biológicas.

### **3.2 Mejora de la penetrabilidad celular de los oligonucleótidos**

Las barreras biológicas han evolucionado para desempeñar diversas funciones, entre ellas prevenir la entrada de agentes exógenos al interior de la célula. Sin embargo, estas barreras limitan o bloquean el beneficio terapéutico de un determinado fármaco. Las propiedades físicas de muchos fármacos quedan limitadas para poder permitir su difusión desde un medio extracelular extraordinariamente polar a través de la bicapa lipídica de las células, externamente muy polar pero internamente muy hidrofóbica.

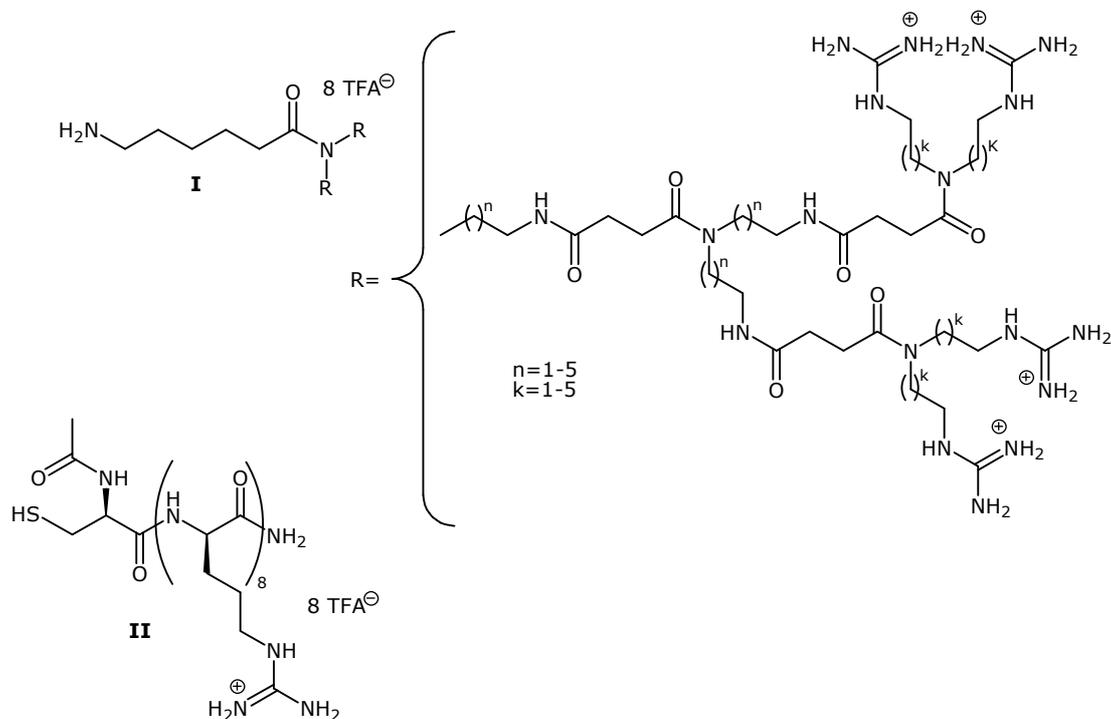
Dada la influencia en las propiedades farmacocinéticas de los fármacos, se han desarrollado diversas técnicas a lo largo de los años para mejorar la penetración celular. Entre otras, la microinyección se ha empleado habitualmente para este propósito, aunque tan sólo es útil para realizar estudios *in vitro*. Habitualmente, la solución ha consistido en mejorar las propiedades físicoquímicas de un determinado candidato mediante la síntesis y evaluación de numerosos análogos, hasta identificar el candidato óptimo. La encapsulación de fármacos utilizando liposomas,<sup>158</sup> por ejemplo, proporciona un medio eficaz de mejorar las propiedades de aquellos candidatos que no presentan inicialmente unas propiedades físicoquímicas óptimas.

Otra técnica para poder mejorar el paso a través de membranas biológicas consiste en aprovechar los mecanismos dependientes de receptores. Por ejemplo, se sabe que el folato se importa al medio celular a través de un receptor específico de membrana. De ahí se ha observado que la unión de ácido fólico a un agente terapéutico puede mejorar su importación al medio celular.<sup>159</sup> Siguiendo este razonamiento, en los últimos años se han ensayado con este fin la importación celular mediada por esteroides, poliaminas, aminoácidos u otros agentes que presentan un mecanismo de transporte celular activo.<sup>126</sup>

Recientemente, también se ha ensayado el uso de transportadores moleculares, moléculas que a modo de lanzadoras son capaces de importar otras moléculas del medio extracelular mediante mecanismos de transporte pasivo como la endocitosis. Dentro del grupo de moléculas que actúan como transportadores moleculares, se incluyen estructuras muy diversas, como dendrímeros, nanotubos, nanopartículas o liposomas. En los últimos años se ha puesto especial interés en los péptidos catiónicos, denominados habitualmente como CPP (*cationic penetrating peptides*).<sup>160-162</sup> Estos transportadores peptídicos se inspiran en secuencias de proteínas con elevada capacidad transportadora, como Tat de VIH-1 o el péptido del homeodominio de *Drosophila Antennapedia*, que se caracterizan por poseer segmentos poliarginina. Basadas en estas secuencias, se han diseñado numerosas moléculas

que actúan como transportadores moleculares, que incluyen péptidos no naturales, peptoides, oligocarbamatos y dendrímeros, todas ellas con numerosos grupos guanidino.<sup>126,163,164</sup> La **Fig. I.14** muestra ejemplos de este tipo de transportadores: **I** es un dendrímero poliguanidino y **II** es un péptido catiónico. En todos ellos los grupos guanidino juegan un papel importante a la hora de conferir propiedades de penetración celular.

**Figura I.14 Ejemplos de transportadores catiónicos**



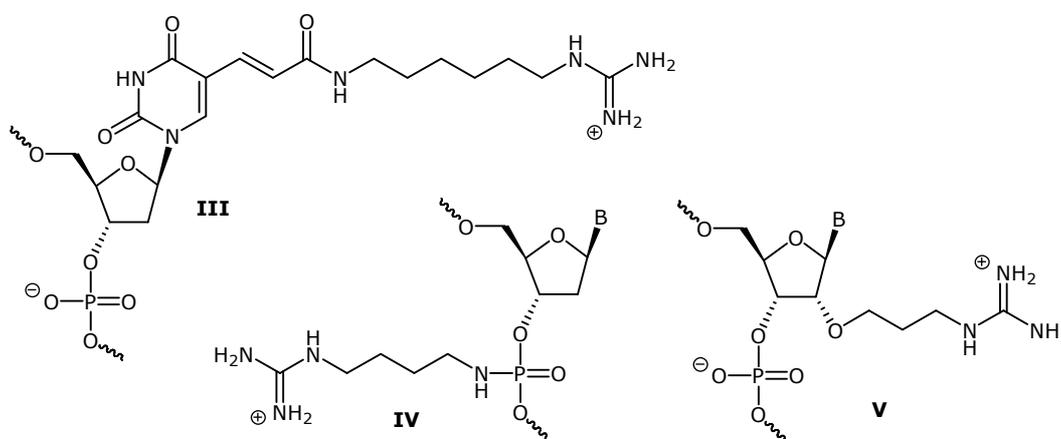
Como ya se ha comentado, el carácter polianiónico de los oligonucleótidos dificulta en gran medida el paso a través de las membranas celulares. Como otras moléculas con una escasa penetrabilidad celular, han podido ser internados favorablemente en presencia de polímeros catiónicos y en especial, mediante los péptidos catiónicos mencionados anteriormente.<sup>165</sup>

Tal y como se ha mencionado anteriormente, cabría suponer que al disminuir el carácter aniónico de los oligonucleótidos sustituyendo el grupo fosfato por otros grupos neutros (PNAs, oligonucleótidos morfolino), se conseguiría una mejora en su capacidad de atravesar membranas biológicas, pero normalmente eso no es así. En este caso, la solución más exitosa ha consistido en la conjugación de los PNAs y oligonucleótidos morfolino a péptidos catiónicos.<sup>137,153,166-170</sup>

Aunque no necesariamente relacionado con la mejora de las propiedades de penetración celular, pero sí con el intento de dotar a los oligonucleótidos con cargas positivas, existen numerosos ejemplos de oligonucleótidos modificados que incorporan el grupo guanidino en diferentes posiciones del esqueleto oligonucleotídico<sup>124,125</sup> (**Fig. I.15**). Las modificaciones más habituales consisten en incorporar grupos alquilguanidino en el

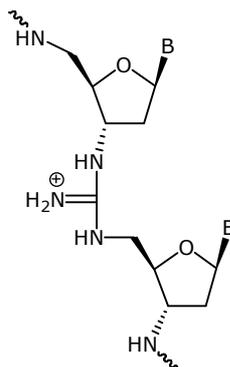
carbono 5 de las pirimidinas (**III**), sustituir el grupo fosfato por el grupo *N*-guanidinoalquilfosforamidato (**IV**), o derivatizar con grupos alquilguanidino la posición 2' de la ribosa (**V**). Como los grupos guanidino a pH fisiológico están protonados dado su elevado  $pK_a$  (alrededor de 12,5), los oligonucleótidos así modificados presentan una buena solubilidad en medio acuoso e incluso pueden favorecer la hibridación al establecer interacciones electrostáticas favorables con los grupos fosfato de la cadena complementaria, formando dobles y triples hélices más estables. Algunos de estos análogos muestran también una capacidad mayor para atravesar membranas biológicas, sin que para ello se haya modificado completamente el esqueleto. Por ejemplo, se consigue un efecto óptimo en 20 meros con sólo introducir cuatro modificaciones del tipo **III**.<sup>124</sup>

**Figura I.15 Oligonucleótidos modificados que incorporan el grupo guanidino**



Por otra parte, T. C. Bruice y colaboradores<sup>171-174</sup> han desarrollado diferentes metodologías para obtener oligonucleótidos con enlaces internucleosídicos de tipo guanidino (**Fig. I.16**). Las cadenas así modificadas, dan lugar a los llamados oligonucleótidos guanidino (DNG), y forman dobles y triples hélices muy estables, probablemente por la interacción electrostática favorable con los grupos fosfato, manteniendo aún así la especificidad de secuencia. En relación con lo mencionado anteriormente, aunque aún no demostrado, la presencia del grupo guanidino podría ser también beneficiosa para facilitar el tránsito a través de las membranas biológicas. Por tener relación con el proyecto de la presente Tesis, se tratarán con mayor detalle las propiedades de los oligonucleótidos guanidino en el capítulo 3.

**Figura I.16 Oligonucleótidos guanidino (DNG)**



## **4. Objetivos**

Los resultados obtenidos con los oligonucleótidos guanidino son realmente notorios (véase apartado 2 del capítulo 2). Sin embargo, esta aproximación presenta enormes dificultades sintéticas para acceder a los sintones nucleosídicos, ya que deben poseer un grupo amino en la posición 3' de la ribosa con la misma estereoquímica que presentan los nucleósidos naturales. Por otra parte, la metodología sintética en fase sólida para preparar este tipo de oligómeros precisa del empleo de sales de mercurio, que además de ser tóxicas, generan sulfuro de mercurio como subproducto de reacción, un residuo demasiado insoluble para permitir la implementación en sintetizadores automáticos.<sup>171-174</sup>

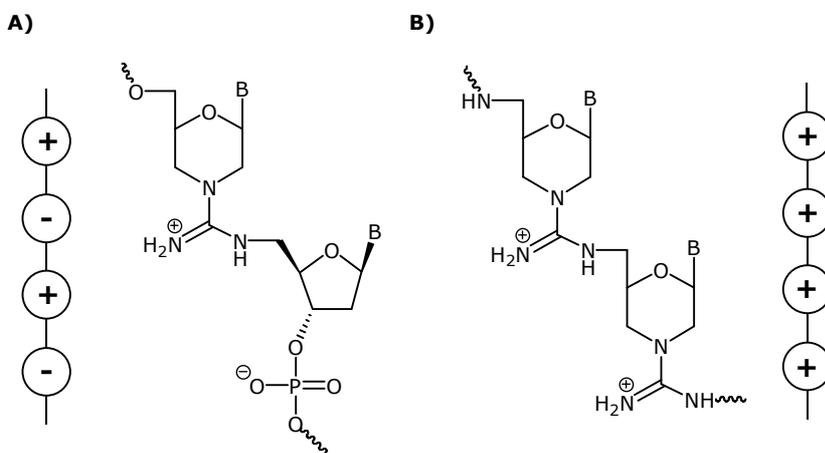
Una posible mejora en el diseño de los oligonucleótidos guanidino podría consistir en la sustitución del anillo de 3',5'-amino-2',3',5'-desoxiribosa por uno de morfolina, creando así un nuevo tipo de oligonucleótido en el que se combinan dos modificaciones. Como se ha explicado anteriormente, los oligonucleótidos morfolino presentan características interesantes como análogos de los oligonucleótidos naturales. Se ha demostrado su capacidad para formar dobles y triples hélices estables, presentan actividad en medios biológicos y se han obtenido buenos resultados en ensayos clínicos, que permiten augurar en un futuro próximo la comercialización de un nuevo fármaco basado en este esqueleto. No obstante, cabe recordar que una limitación importante de los oligonucleótidos morfolino es su escasa capacidad de internación celular, siendo necesaria la conjugación a péptidos poliarginina para aumentar su actividad biológica.

Por tanto, es probable que sustituyendo el enlace internucleosídico neutro del tipo fósforodiamidato de los oligonucleótidos morfolino por el grupo guanidino mejore sustancialmente la capacidad de atravesar membranas biológicas. Por otro lado, la sustitución de un esqueleto neutro por otro total o parcialmente catiónico aumentará también la afinidad por los ácidos nucleicos, como resultado de las interacciones electrostáticas favorables, formándose híbridos de elevada estabilidad. Los grupos guanidino muestran también una elevada estabilidad química y son resistentes a la acción de las enzimas celulares que degradan los ácidos nucleicos. Además, el conjunto de estas potenciales propiedades es deseable no sólo en oligonucleótidos terapéuticos sino también en otras posibles aplicaciones, como por ejemplo, en aquellos que se emplean en DNA arrays de diagnóstico o como unidades autoensamblables en la construcción de nanoestructuras. Este diseño también puede presentar ventajas desde un punto de vista sintético, ya que los sintones nucleosídicos con estructura de morfolina son relativamente fáciles de preparar a partir de los correspondientes ribonucleósidos, siendo éstos unos precursores más económicos que los desoxirribonucleósidos.

Por todo ello, nos pareció interesante combinar las propiedades de los oligonucleótidos morfolino con las de los oligonucleótidos guanidino diseñando un nuevo tipo de oligómero oligonucleotídico que incorpora unidades de morfolino-amidina (**Fig. 1.17**). Por una parte, se podría acceder a oligonucleótidos parcialmente modificados en los que se

alternan las unidades de morfolino-amidina y ribosil-fosfato (A) o bien dar lugar a oligonucleótidos formados exclusivamente por unidades nucleosídicas con estructura de morfolina enlazadas por grupos guanidino (B).

**Figura I.17 Oligonucleótidos formados por A) unidades de morfolino-amidina y ribosil-fosfato en posiciones alternadas y B) por segmentos de morfolino-amidina**



Partiendo de estos razonamientos, los objetivos de la presente Tesis han consistido en desarrollar la metodología sintética destinada a preparar oligonucleótidos modificados que incorporan unidades morfolino-amidina, para luego, evaluar las potenciales propiedades de reconocimiento molecular de estos nuevos oligonucleótidos. Para ello, se han planteado las siguientes etapas:

- Preparar sintones nucleosídicos con estructura de morfolina (morfolinonucleósidos), adaptando si cabe metodologías previamente descritas o desarrollando nuevos procedimientos, y explorar diferentes rutas sintéticas para obtener guanidinas derivadas de nucleósidos.
- Implementar la metodología sintética de la anterior etapa en la obtención de oligonucleótidos que contienen unidades de morfolino-amidina, y adaptarla para poderla llevar a cabo íntegramente en fase sólida.
- Estudiar las propiedades de hibridación de los nuevos oligonucleótidos en la formación de dobles y triples hélices por medio de métodos biofísicos, como por ejemplo, las curvas de fusión por UV.

## **5. Bibliografía**

- (1) Watson, J. D.; Crick, F. H. C.; *Nature*, 171, 737-738, (1953)
- (2) Beaucage, S. L.; Caruthers, M. H.; *Tetrahedron Lett.*, 22, 1859-1862, (1981)
- (3) Voet, D.; Voet, J.; *Bioquímica*, Edicions Omega, (1992)
- (4) Khan, A.; *Clin. Chim. Acta*, 367, 20-27, (2006)
- (5) Bartel, D. P.; *Cell*, 116, 281-297, (2004)
- (6) Nudler, E.; *Cell*, 126, 19-22, (2006)
- (7) Hanlon, S.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 23, 861-867, (1966)
- (8) Saenger W., *Principles of Nucleic Acids Structure*, Springer-Verlag, New York, (1984)
- (9) Blackburn, G. M.; Gait, M. J., *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*, IRL Press, Oxford, (1999)
- (10) Oh, D.; Kim, Y.; Rich, A.; *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 99 (26), 16666-16671, (2002)
- (11) Felsenfeld, G.; Rich, A.; *Biochim. Biophys. Acta*, 26, 457-468, (1957)
- (12) Praseuth, D.; Guieysse, A. L.; Hélène, C.; *Biochim. Biophys. Acta*, 1489, 181-206, (1999)
- (13) Lyamichev, V. I.; Mirkin, S. M.; Frank-Kamenetskii, M. D.; *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 3, 667-669, (1986)
- (14) Kohwi, Y.; Kohwi-Shigematsu, T.; *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 85, 3781-3785, (1988)
- (15) Kinniburgh, A. J.; *Nucleic Acids Res.*, 17, 7771-7778, (1989)
- (16) Pestov, D. G.; Dayn, A.; Siyanova, E.; George, D. L.; Mirkin, S. M.; *Nucleic Acids Res.*, 19, 6527-6532, (1991)
- (17) Williamson, J. R.; *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 3, 357-362, (1993)
- (18) Keniry, M. A.; *Biopolymers*, 56, 123-146, (2001)
- (19) Henderson, E.; Hardin, C. C.; Walk, S. K.; Tinoco, I. Jr.; Blackburn, E. H.; *Cell*, 51, 899-908, (1987)
- (20) Blackburn, E. H.; *Nature*, 350, 569-573, (1991)
- (21) Mergny, J. L.; Lacroix, L.; Han, X.; Leroy, J. L.; Hélène, C.; *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 8887-8898, (1995)
- (22) Guéron, M.; Leroy, J. L.; *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 10, 326-331, (2000)
- (23) Phan, A. T.; Mergny, J. L.; *Nucleic Acids Res.*, 30, 4618-4625, (2002)
- (24) Niemeyer, C. M.; *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 4, 609-618, (2000)
- (25) Lovrinovic, M.; Niemeyer, C. M.; *Angew. Chem. Int. Ed.*, 44, 3179-3183, (2005)
- (26) Mirkin, C. A.; Letsinger, R. L.; Mucic, R. C.; Strohoff, J. J.; *Nature*, 382, 607-609, (1996)
- (27) Katz, E.; Willner, I.; *Angew. Chem. Int. Ed.*, 43, 6042-6108, (2004)
- (28) Daniel, M. C.; Astruc, D.; *Chem. Rev.*; 104, 293-346, (2004)
- (29) Rosi, N. L.; Mirkin, C. A.; *Chem. Rev.*, 105, 1547-1562, (2005)
- (30) Niemeyer, C. M.; Sano, T.; Smith, C. L.; Cantor, C. R.; *Nucleic Acids Res.*, 22, 5530-5539, (1994)
- (31) Alivisatos, A. P.; Johnsson, K. P.; Peng, X.; Wilson, T. E.; Loweth, C. J.; Bruchez Jr., M. P.; Schultz, P. G.; *Nature*, 382, 609-611, (1996)
- (32) Li, X.; Liu, R.; *Angew. Chem. Int. Ed.*, 43, 4848-4870, (2004)

- (33) Feldkamp, U.; Niemeyer, C. M.; *Angew. Chem. Int. Ed.*, 45, 1856-1876, **(2006)**
- (34) Seeman, N. C.; *J. Theor. Biol.*, 99, 237-247, **(1982)**
- (35) Mao, C.; Sun, W.; Seeman, N. C.; *J. Am. Chem. Soc.*, 121, 5437-5443, **(1999)**
- (36) Seeman, N. C.; *Nature*, 421, 427-431, **(2003)**
- (37) Yan, H.; Park, S. H.; Finkelstein, G.; Reif, J. H.; LaBean, T. H.; *Science*, 301, 1882-1884, **(2003)**
- (38) He, Y.; Tian, Y.; Chen, Y.; Deng, Z.; Ribbe, A. E.; Mao, C.; *Angew. Chem. Int. Ed.*, 44, 6694-6696, **(2005)**
- (39) Fu, T.-J.; Seeman, N. C.; *Biochemistry*, 32, 3211-3220, **(1993)**
- (40) Li, X.; Xiaoping, Y.; Jing, Q.; Seeman, N. C.; *J. Am. Chem. Soc.*, 118, 6131-6140, **(1996)**
- (41) LaBean, T. H.; Yan, H.; Kopatsch, J.; Liu, F.; Winfree, E.; Reif, J. H.; Seeman, N. C.; *J. Am. Chem. Soc.*, 122, 1848-1860, **(2000)**
- (42) Shen, Z.; Yan, H.; Wang, T.; Seeman, N. C.; *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 1666-1674, **(2004)**
- (43) Zhang, X.; Yan, H.; Shen, Z.; Seeman, N. C.; *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 12940-12941, **(2002)**
- (44) Zhou, C.; Tan, Z.; Wang, C.; Wei, Z.; Wang, Z.; Bai, C.; Qin, J.; Cao, E.; *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 19, 807, **(2001)**
- (45) Jaeger, L.; Westhof, E.; Leontis, N. B.; *Nucleic Acids Res.*, 29, 455-463, **(2001)**
- (46) Chworos, A.; Severcan, I.; Koyfman, A. Y.; Weinkam, P.; Oroudjev, E.; Hansma, H. G.; Jaeger, L.; *Science*, 306, 2068-2072, **(2004)**
- (47) Park, S. H.; Yin, P.; Liu, Y.; Reif, J. H.; LaBean, T. H.; Yan, H.; *Nano Lett.*, 5, 729-733, **(2005)**
- (48) Xiao, S.; Liu, F.; Rosen, A. E.; Hainfeld, J. F.; Seeman, N. C.; Musier-Forsyth, K.; Kiehl, R. A.; *J. Nanopart. Res.*, 4, 313-317, **(2002)**
- (49) Pinto, Y.; Le, J. D.; Seeman, N. C.; Musier-Forsyth, K.; Taton, T. A.; Kiehl, R. A.; *Nano Lett.*, 5, 2399-2402, **(2005)**
- (50) Li, H.; Park, S. H.; Reif, J. H.; LaBean, T. H.; Yan, H.; *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 418-419, **(2004)**
- (51) Koyfman, A. Y.; Braun, G.; Magonov, S.; Chworos, A.; Reich, N. O.; Jaeger, L.; *J. Am. Chem. Soc.*, 127, 11886-11887, **(2005)**
- (52) Park, S. H.; Yan, H.; Reif, J. H.; LaBean, T. H.; Finkelstein, G.; *Nanotechnology*, 15, S525-S527, **(2004)**
- (53) Deng, Z.; Mao, C.; *Angew. Chem. Int. Ed.*, 43, 4068-4070, **(2004)**
- (54) Adleman, L. M.; *Science*, 266, 1021-1024, **(1994)**
- (55) Liu, Q.; Wang, L.; Frutos, A. G.; Condon, A. E.; Corn, R. M.; Smith, L. M.; *Nature*, 403, 175-179, **(2000)**
- (56) Mao, C.; LaBean, T. H.; Reif, J. H.; Seeman, N. C.; *Nature*, 407, 493-496, **(2000)**
- (57) Carbone, A.; Seeman, N. C.; *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 99, 12577-12582, **(2002)**
- (58) Paukstelis, P. J.; Nowakowski, J.; Birktoft, J. J.; Seeman, N. C.; *Chem. Biol.*, 11, 1119, **(2004)**

- (59) Liu, D.; Park, S. H.; Reif, J. H., LaBean, T. H.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 717-722, **(2004)**
- (60) Mathieu, F.; Liao, S.; Kopatsch, J.; Wang, T.; Mao, C.; Seeman, N. C.; *Nano Lett.*, 5, 661-665, **(2005)**
- (61) Sihih. W. M.; Quispe, J. D.; Joyce, G. F.; *Nature*, 427, 618-621, **(2004)**
- (62) Goodman, R. P.; Berry, R. M.; Tuberfield, A. J.; *Chem. Commun.*, 1372-1373, **(2004)**
- (63) Niemeyer, C. M.; Adler, M.; *Angew. Chem. Int. Ed.*, 41, 20, 3779-3783, **(2002)**
- (64) Yang, X.; Vologodskii, A. V.; Liu, B.; Kemper, B.; Seeman, N. C.; *Biopolymers*, 45, 69-83, **(1998)**
- (65) Mao, C.; Sun, W.; Shen, Z.; Seeman, N. C.; *Nature*, 397, 144-146, **(1999)**
- (66) Ohmichi, T.; Kawamoto, Y.; Wu, P.; Miyoshi, D.; Karimata, H.; Sugimoto, N.; *Biochemistry*, 44, 7125-7130, **(2005)**
- (67) Fahlman, R. P.; Hsing, M.; Sporer-Tuhten, C. S.; Sen, D.; *Nano Lett.*, 3, 1073-1078, **(2003)**
- (68) Miyoshi, D.; Inoue, M.; Sugimoto, N.; *Angew., Chem., Int. Ed.*, 45, 7716-7719, **(2006)**
- (69) Chen, Y.; Mao, C.; *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 13240-13241, **(2004)**
- (70) Brucale, M.; Zuccheri, G.; Samori, B.; *Org. Biomol. Chem.*, 3, 575-577, **(2005)**
- (71) Tyagi, S.; Kramer, F. R.; *Nat. Biotechnol.*, 14, 303-308, **(1996)**
- (72) Asseline, U.; *Curr. Org. Chem.*, 10, 491-518, **(2006)**
- (73) Grossmann, T. N.; Röglin, L.; Seitz, O.; *Angew. Chem. Int. Ed.*, 46, 5223-5225, **(2007)**
- (74) Tan, W.; Fang, X.; Li, J.; Liu, X.; *Chem. Eur. J.*, 6, 7, 1107-1111, **(2000)**
- (75) Yurke, B.; Turberfield, A. J.; Mills Jr.; A. P.; Simmel, F. C.; Neumann, J. L.; *Nature*, 406, 605-608, **(2000)**
- (76) Yan, H.; Zhang, X.; Shen, Z.; Seeman, N. C.; *Nature*, 415, 62-65, **(2002)**
- (77) Chen, Y.; Yang, M.; Mao, C.; *Angew. Chem. Int. Ed.*, 43, 3554-3557, **(2004)**
- (78) Li, J. J.; Tan, W.; *Nano Lett.*, 2, 315-318, **(2002)**
- (79) Kelly, T. R.; *Angew. Chem. Int. Ed.*, 44, 4124-4127, **(2005)**
- (80) Tian, Y.; He, Y.; Chen, Y.; Yin, P.; Mao, C.; *Angew. Chem. Int. Ed.*, 44, 4355-4358, **(2005)**
- (81) Paterson, B. M.; Roberts, B. E.; Kuff, E. L.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 4370-4374, **(1977)**
- (82) Crooke, S. T.; *Biochim. Biophys. Acta*, 1489, 31-44, **(1999)**
- (83) Crooke, S. T.; *Ann. Rev. Med.*, 55, 61-95, **(2004)**
- (84) Kang, S.-H.; Cho, M.-J.; Kole, R.; *Biochemistry*, 37, 6235-6239, **(1998)**
- (85) Potera, C.; *Nature Biotechnol.*, 25, 5, 497-499, **(2007)**
- (86) Corey, D. R.; *Nature Chem. Biol.*, 3, 1, 8-11, **(2007)**
- (87) Breaker, R. R.; *Nature*, 432, 838-845, **(2004)**
- (88) Ellington, A. D.; Szostak, J. W.; *Nature*, 346, 818-822, **(1990)**
- (89) Tuerk, C.; Gold, L.; *Science*, 249, 505-510, **(1990)**
- (90) Lee, J.-H.; Canny, M. D.; De Erkenez, A.; Krilleke, D.; Yin-Shan, N.; Shima, D. T.; Pardi, A.; Jucker, F.; *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 52, 18902-18907, **(2005)**
- (91) Hariprasad, S. M.; Shah, G. K.; Blinder, K. J.; *Am. J. Opt.*, 141, 200-201, **(2006)**
- (92) Lee, J. F.; Stovall, G. M.; Ellington, A. D.; *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 10, 282-289, **(2006)**

- (93) Bunka, D. H. J.; Stockley, P. G.; *Microbiology*, 4, 588-595, (2006)
- (94) Rimmelé, M.; *Chem. Biochem.*, 4, 963-971, (2003)
- (95) Nutiu, R.; Li, Y.; *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 4771-4778, (2003)
- (96) Shangguan, D.; Li, Y.; Tang, Z.; Cao, Z. C.; Chen, H. W.; Mallikaratchy, P.; Sefah, K.; Yang, C. J.; Tan, W.; *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 103, 32, 11838-11843, (2006)
- (97) Fire, A.; Xu, S. Q.; Montgomery, M. K.; Kostas, S. A.; Driver, S. E.; Mello, C. C.; *Nature*, 391, 806-811, (1998)
- (98) Hannon, G. J.; *Nature*, 418, 11, 244-251, (2002)
- (99) Conklin, D. S.; *ChemBiochem*, 4, 1033-1039, (2003)
- (100) Meister, G.; Tuschl, T.; *Nature*, 431, 343-349, (2004)
- (101) Elbashir, S. M.; Harborth, J.; Lendeckel, W.; Yalcin, A.; Weber, K.; Tuschl, T.; *Nature*, 411, 494-498, (2001)
- (102) Bumcrot, D.; Manoharan, M.; Koteliensky, V.; Sah, D. W. Y.; *Nature Chem. Biol.*, 2, 12, 711-718, (2006)
- (103) Zimmermann, T. S. *et al*, *Nature*, 441, 111-114, (2006)
- (104) Lee, R. C.; Feinbaum, R. L.; Ambros, V.; *Cell*, 75, 843, (1993)
- (105) Ruvkun, G.; *Science*, 294, 797-799, (2001)
- (106) Bernstein, E.; Caudy, A. A.; Hammond, S. M.; Hannon, G. J.; *Nature*, 409, 363-366, (2001)
- (107) Denli, A. M.; Tops, B. B.; Pasterk, B. B.; Ketting, R. F.; Hannon, G. J.; *Nature*, 432, 231-235, (2004)
- (108) Esquela-Kerscher, A.; Slack, F. J.; *Nature*, 6, 259-269, (2006)
- (109) Arenz, C.; *Angew. Chem. Int. Ed.*, 45, 5048-5050, (2006)
- (110) Scaria, V.; Hariharan, M.; Brahmachari, S. K.; Maiti, S.; Pillai, B.; *ChemMedchem.*, 2, 789-792, (2007)
- (111) Guntaka, R. V.; Varma, B. R.; Weber, K. T.; *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 35, 22-31, (2003)
- (112) Seidman, M. M.; Glazer, P. M.; *J. Clin. Invest.*, 112, 487-494, (2003)
- (113) Buchini, S.; Leumann, C. J.; *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 7, 717-726, (2003)
- (114) Wang, G.; Vasquez, K. M.; *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 101, 37, 13448-13453, (2004)
- (115) Kalish, J. M.; Seidman, M. M.; Weeks, D. L.; Glazer, P. M.; *Nucleic Acids Res.*, 33, 11, 3492-3502, (2005)
- (116) Kruger, K.; Grawowski, P. J.; Zaug, A. J.; Sands, J.; Gottsclling, D. E.; Cech, T. R.; *Cell*, 31, 147-157, (1982)
- (117) Uhlenbeck, O. C.; *Nature*, 328, 596-600, (1987)
- (118) Haseloff, J.; Gerlach, W. L.; *Nature*, 334, 585-592, (1988)
- (119) Mironov, A. S.; Gusarov, I.; Rafikov, R.; Lopez, L. E.; Shatalin, K.; Kreneva, R. A.; Perumov, D. A.; Nudler, E.; *Cell*, 111, 747-756, (2002)
- (120) Winkler, W.; Nahvi, A.; Breaker, R. R.; *Nature*, 419, 952-956, (2002)
- (121) Blount, K. F.; Breaker, R. R.; *Nature Biotechnol.*, 24, 12, 1558-1564, (2006)
- (122) Stein, C. A.; *Biochim. Biophys. Acta*, 1489, 45-52, (1999)
- (123) Wilson, C.; Keefe, A. D.; *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 10, 607-614, (2006)

- (124) Ohmichi, T.; Kuwahara, M.; Sasaki, N.; Hasegawa, M.; Nishikata, T.; Sawai, H.; Sugimoto, N.; *Angew. Chem. Int. Ed.*, 44, 6682-6685, (2005)
- (125) Deglane, G.; Abes, S.; Michel, T.; Právot, P.; Vives, E.; Debart, F.; Barvik, I.; Lebleu, B.; Vasseur, J.-J.; *ChemBiochem*, 7, 684-692, (2006)
- (126) Goun, E. A.; Pillow, T. H.; Jones, L. R.; Rothbard, J. B.; Wender, P. A.; *ChemBiochem*, 7, 1497-1515, (2006)
- (127) Verma, S.; Eckstein, F.; *Annu. Rev. Biochem.*, 67, 99-134, (1998)
- (128) Micklefield, J.; *Curr. Med. Chem.*, 8, 1157-1179, (2001)
- (129) Braasch, D. A.; Corey, D. R.; *Biochemistry*, 41, 14, 4503-4510, (2002)
- (130) Manoharan, M.; *Biochim. Biophys. Acta*, 1489, 117-130, (1999)
- (131) Kurz, M.; Göbel, K.; Hartel, C.; Göbel, M. W.; *Helvetica Chim. Acta*, 81, 1156-1181, (1998)
- (132) Hu, X.; Smith, G. D.; Sykora, M.; Lee, S. J.; Grinstaff, M. W.; *Inorg. Chem.*, 39, 2500-2504, (2000)
- (133) Hu, X.; Tierney, M. T.; Grinstaff, M. W.; *Bioconjugate Chem.*, 13, 83-89, (2002)
- (134) Williams, K. A.; Veenhuizen, P. T. M.; de la Torre, B. G.; Eritja, R.; Dekker, G.; *Nature*, 420, 761, (2002)
- (135) de la Torre, B. G.; Albericio, F.; Saison-Behmoaras, E.; Bachi, A.; Eritja, R.; *Bioconjugate Chem.*, 10, 1005-1012, (1999)
- (136) Ueno, Y.; Saito, R.; Hata, T.; *Nucleic Acids Res.*, 21, 4451-4457, (1993)
- (137) Moulton, H. M.; Nelson, M. H.; Hatlevig, S. A.; Reddy, M. T.; Iversen, P. L.; *Bioconjugate Chem.*, 15, 290-299, (2004)
- (138) Luyten, I.; Herdewijn, P.; *Eur. J. Med. Chem.*, 33, 515-576, (1998)
- (139) De Clercq, E.; Eckstein, F.; Merigan, T. C.; *Science*, 165, 1137-1139, (1969)
- (140) Campbell, J. M.; Bacon, T. A.; Wickstron, E.; *Biochem. Biophys. Methods.*, 20, 259-267, (1990)
- (141) Stein, C. A.; Subashige, C.; Shinozuka, K.; Cohen, J. S.; *Nucleic Acids Res.*, 16, 3209-3221, (1998)
- (142) Guvakova, M. A.; Yakubov, L. A.; Vlodavsky, I.; Tonkinson, J. L.; Stein, C. A.; *J. Biol. Chem.*, 270, 2620-2627, (1995)
- (143) Monia, B. P.; Lesnik, E. A.; Gonzales, C.; Lima, W. F.; McGee, D.; Guinosso, C. J.; Kawasaki, A. M.; Cook, P. D.; Freier, S. M.; *J. Biol. Chem.*, 268, 14514-14522, (1993)
- (144) Ørum, H.; Wengel, J.; *Curr. Opin. Mol. Ther.*, 3, 239-243, (2001)
- (145) Braasch, D. A.; Corey, D. R.; *Chem. Biol.*, 8, 1-7, (2001)
- (146) Nielsen, P. E.; Egholm, R. H.; Berg, R. H.; Buchardt, O.; *Science*, 254, 1497-1550, (1991)
- (147) Ganesh, K. N.; Nielsen, P. E.; *Curr. Org. Chem.*, 4, 931-943, (2000)
- (148) Nielsen, P. E.; *Lett. Pept. Sci.*, 10, 135-147, (2003)
- (149) Capasso, D.; de Napoli, L.; Di Fabio, G.; Messere, A.; Montesarchio, D.; Pedone, C.; Piccialli, G.; Saviano, M.; *Tetrahedron*, 57, 9481-9486, (2001)
- (150) Strichak, E. P.; Summerton, J. E.; Weller, D. D.; *Nucleic Acids Res.*, 17, 15, 6129-6141, (1989)
- (151) Summerton, J.; Weller, D.; *Nucleosides & Nucleotides*, 16(7-9), 889-898, (1997)

- (152) Summerton, J.; Weller, D.; *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, 7, 187-195, (1997)
- (153) Summerton, J. E.; *Lett. Pept. Sci.*, 10, 215-236, (2003)
- (154) Corey, D. R.; Abrams, J. M.; *Genome Biol.*, 2, 5, 1015.1-1015.3, (2001)
- (155) Heasman, J.; *Dev. Biol.*, 243, 209-214, (2002)
- (156) Luu, K. C.; Nie, G. Y.; Salamonsen, L. A.; *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 101, 21, 8028-8033, (2004)
- (157) Basye, J.; Trent, J. O.; Gao, D.; Ebbinghaus, S. W.; *Nucleic Acids Res.*, 29, 23, 4873-4880, (2001)
- (158) Rui, Y. J.; Wang, P. S.; Low, D. H.; Thompson, J.; *J. Am. Chem. Soc.*, 120, 11213-11218, (1998)
- (159) Leamon, C. P.; Reddy, J. A.; *Adv. Drug Delivery Rev.*, 56, 1127-1141, (2004)
- (160) M. Lindgren, M. Hällbrink, A. Prochiantz, Ü. Langel. *Trends Pharm. Sci.*, 21, 99-103, (2000)
- (161) M, Mäe; Ü. Langel. *Curr. Opin. Pharm.* 6, 509-514, (2006)
- (162) K. M. Wagstaff, D. A. Jans. *Curr. Med. Chem.*, 13, 1371-1387, (2006)
- (163) Wright, L. R.; Rothbard, H. B.; Wender, P. A.; *Curr. Protein Pept. Sci.*, 4, 105-124, (2003)
- (164) Fuchs, S. M.; Raines, R. T.; *Biochemistry*, 43, 2438-2444, (2004)
- (165) D. Lochmann, E. Jauk, A. Zimmer. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 58, 237-251, (2004)
- (166) Sazani, P.; Kang, A.-H.; Maier, M. A.; Wei, C.; Dillman, J.; Sumerton, J.; Manoharan, M.; Kole, R.; *Nucleic Acids Res.*, 29, 19, 3965-3974, (2001)
- (167) Moulton, H. M.; Hase, M. C.; Smith, K. M.; Iversen, P. L.; *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, 13, 31-43, (2003)
- (168) Nelson, M. H.; Stein, D. A.; Kroeker, A. D.; Hatlevig, S. A.; Iversen, P. L.; Moulton, H. M.; *Bioconjugate Chem.*, 16, 959-966, (2005)
- (169) Youngblood, D. S.; Hatlevig, S. A.; Hassinger, J. N.; Iversen, P. L.; Moulton, H. M.; *Bioconjugate Chem.*, 18, 50-60, (2007)
- (170) Amantana, A.; Moulton, H. M.; Cate, M. L.; Reddy, M. Y.; Whitehead, T.; Hassinger, J. N.; Youngblood, D. S.; Iversen, P. L.; *Bioconjugate Chem.*, 18, 1325-1331, (2007)
- (171) Linkletter, B. A.; Szabo, I. E.; Bruice, T. C.; *J. Am. Chem. Soc.*, 121, 3888-3896, (1999)
- (172) Linkletter, B. A.; Szabo, I. E.; Bruice, T. C.; *Nucleic Acids Res.*, 29, 11, 2370-2376, (2001)
- (173) Challa, H.; Bruice, T. C.; *Bioorg. Med. Chem.*, 12, 1475-1481, (2004)
- (174) Szabo, I. E.; Bruice, T. C.; *Bioorg. Med. Chem.*, 12, 4233-4244, (2004)

*Capítulo 1. Síntesis de oligonucleótidos que incorporan unidades morfolino-  
amidina a partir de dinucleósidos*

---



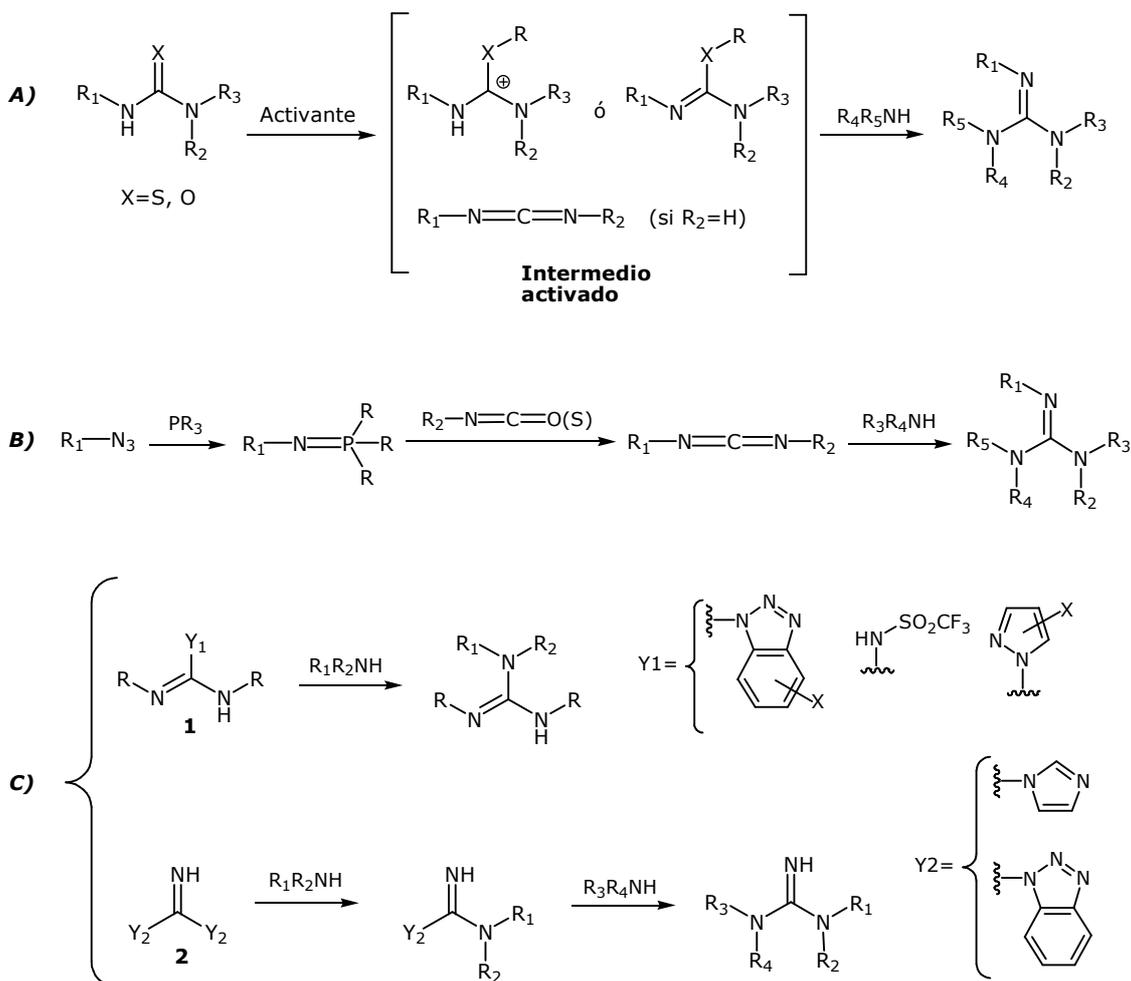
## 1. Introducción

Antes de pasar a describir los resultados obtenidos, resulta conveniente resumir los métodos sintéticos disponibles para la obtención de guanidinas, así como aquellos que específicamente han sido descritos para sintetizar análogos de DNA con uniones internucleosídicas guanidino.

### 1.1. Métodos generales para la obtención de guanidinas

De microorganismos y plantas se ha aislado una gran variedad estructural de moléculas que incorporan el grupo guanidino y también se encuentra presente en muchos compuestos que poseen actividad terapéutica.<sup>1-4</sup> Debido a su basicidad (pKa alrededor de 12,5), las guanidinas se encuentran protonadas en condiciones fisiológicas y es por eso que establecen interacciones electrostáticas con los grupos funcionales de carga negativa, como los grupos fosfato y carboxilato.<sup>5,6</sup> Por todo ello, existen gran número de metodologías destinadas a sintetizar guanidinas. En la **Fig.1.1** se resumen los métodos más comunes para la preparación de guanidinas di-,tri- y tetrasustituidas.

**Figura 1.1 Síntesis química de guanidinas**



### Estrategia A: a partir de tioureas y ureas

La síntesis de guanidinas por reacción entre una tiourea y una amina es una de las estrategias más utilizadas (**Fig. 1.1, A**). Se han empleado una gran variedad de reactivos que transforman una tiourea en un intermedio electrófilo más reactivo. Se pueden activar tioureas por reacción con haluros de alquilo para proporcionar *S*-alquiltioureas o derivados de *S*-alquiltiuronio.<sup>7-11</sup> En este caso, el reactivo más utilizado para activar la tiourea es el yoduro de metilo. La posterior reacción con la amina, aparte de que genera como subproducto el gas metilmercaptano, requiere periodos largos de reacción y elevadas temperaturas. Una manera más suave de obtener guanidinas a partir de tioureas es empleando 1,4-dinitrofluorobenceno (reactivo de Sanger).<sup>7,8,12-14</sup> La reacción de la isotiourea con aminas transcurre en condiciones mucho más suaves que sobre *S*-metilisotioureas.

En la literatura se ha descrito también el uso de carbodiimidas<sup>7,8</sup> para obtener un intermedio activado a partir de tioureas. Se han obtenido buenos resultados empleando diisopropilcarbodiimida (DIP),<sup>15-20</sup> hidrocloreto de (1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDCI)<sup>21-27</sup> y carbodiimidas inmovilizadas en un soporte sólido.<sup>28</sup> La reacción funciona bien con *N,N'*-tioureas disustituidas con grupos atractores de electrones,<sup>20,26-28</sup> mientras que cuando se utilizan *N,N,N'*-tioureas trisustituidas no se llega a obtener la guanidina.<sup>24</sup> Aunque no se conoce con seguridad el tipo de intermedio implicado en la reacción, el mecanismo más aceptado es la transformación de la tiourea en una carbodiimida.<sup>17-19,27</sup>

Las sales de *N*-alquil-2-halopiridinio han sido ampliamente utilizadas como agentes activantes de ácidos carboxílicos.<sup>29-32</sup> En particular, el yoduro de 2-cloro-1-metilpiridinio (reactivo de Mukaiyama), se ha utilizado para convertir ácidos carboxílicos en ésteres, amidas, lactonas, lactamas y también para activar tioureas.<sup>32</sup> En presencia de *N,N'*-tioureas disustituidas conduce también a la formación de carbodiimidas,<sup>33-35</sup> por lo que se ha descrito ampliamente para la formación de guanidinas.<sup>19,21,23-26</sup>

Para activar tioureas y *S*-alquilsotioureas también se han empleado sales inorgánicas de carácter tífilo, esencialmente de Hg(II),<sup>15,17,18,25,36,37</sup> pero también de Bi(III),<sup>38</sup> Cu(II)<sup>39</sup> y Ag(I).<sup>37</sup> La interacción del azufre con el metal y posterior formación de sulfuros muy insolubles<sup>40</sup> convierte a la tiourea en la especie activada capaz de reaccionar con aminas.

Por otra parte, se han activado tioureas por tratamiento con diclorotrifetilfosfina generada *in situ* a partir de trifetilfosfina y hexacloroetano.<sup>41</sup> En este caso se cree que el intermedio reactivo es una carbodiimida si se parte de una tiourea *N,N'*-disustituida, y una sal de uronio si el reactivo de partida es una tiourea trisustituida.

Se ha descrito también la activación de tioureas por oxidación con peróxido de hidrógeno<sup>42,43</sup> o bien con ácido peracético<sup>44,45</sup> generando un derivado de ácido sulfónico. El grupo HSO<sub>3</sub><sup>-</sup> puede ser fácilmente desplazado por aminas para acabar generando guanidinas.

De manera análoga a las tioureas, también se pueden obtener intermedios reactivos a partir de ureas, que por reacción con aminas dan lugar a guanidinas, aunque en condiciones más energéticas (**Fig. 1.1, A**). Una manera de activar ureas es utilizando fosgeno para obtener la sal de Vilsmeier.<sup>5,7,8,23</sup> En la literatura también se ha descrito el uso de  $\text{CBr}_4/\text{PPh}_3/\text{NEt}_3$ <sup>46-48</sup> o bien una mezcla de cloruro de *p*-toluensulfonilo/piridina<sup>49</sup> para llevar a cabo la deshidratación de ureas a carbodiimidas.

### **Estrategia B: a partir de iminofosforanos**

Las carbodiimidas son intermedios sintéticos muy útiles tanto para la obtención de una gran variedad de sistemas heterocíclicos nitrogenados como para la obtención de guanidinas, (**Fig. 1.1, B**). Se ha visto que las carbodiimidas se generan como intermedios en alguno de los métodos de activación de las tioureas y ureas. También se pueden preparar a partir de iminofosforanos, preparados a su vez a partir de azidas y fosfanos mediante la reacción de Staudinger. Las carbodiimidas se obtienen mediante una reacción tipo aza-Wittig entre un iminofosforano y un heterocumuleno como puede ser un isocianato o un isotiocianato.<sup>50-59</sup>

### **Estrategia C: a partir de metaniminas**

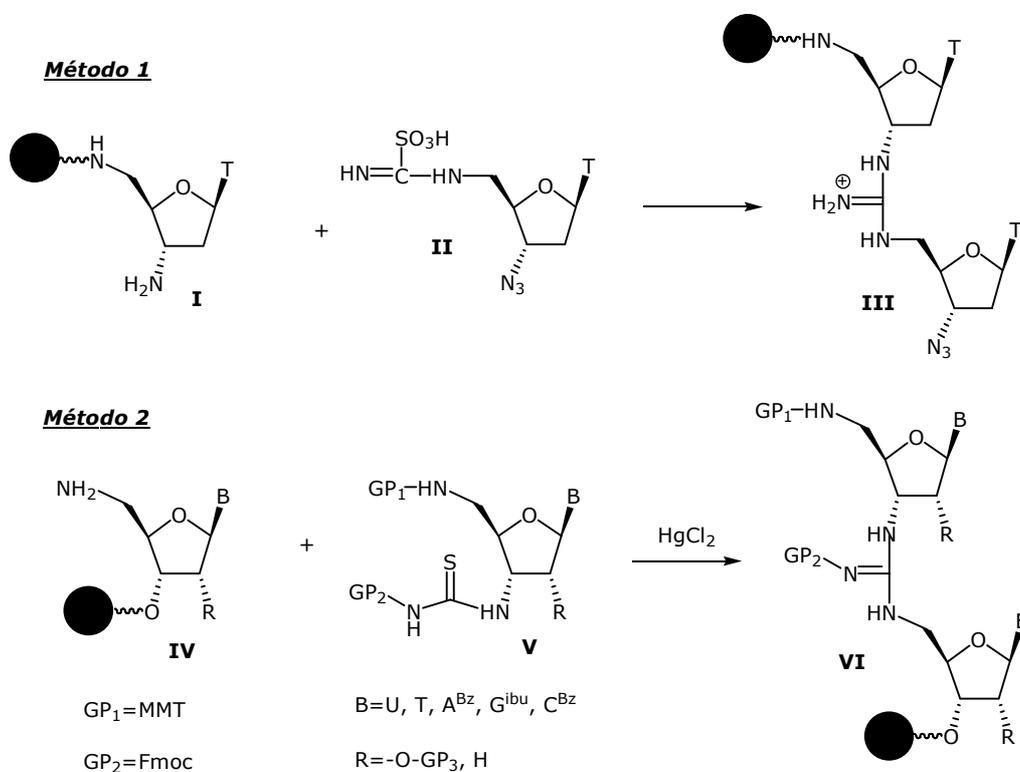
En la **estrategia C** la obtención de guanidinas implica la reacción entre una amina con un agente guanidilante de estructura metanimina. Tal y como se muestra en la **Fig. 1.1**, según el tipo de reactivo se pueden clasificar en dos grupos. En ambos casos el mecanismo seguido es el desplazamiento del grupo saliente  $Y_1$  o  $Y_2$  por una amina. Para los reactivos del grupo 1 habitualmente se requiere que los sustituyentes R sean grupos tipo carbamato, habitualmente grupos protectores como el *tert*-butoxicarbonilo, benciloxicarbonilo y aliloxicarbonilo, por lo que se limita a la obtención de guanidinas mono- y *N,N*-disustituidas. En este grupo se encuentran los reactivos del tipo *N*-(trifluorometilsulfonil)guanidina,<sup>5-8,18,60</sup> 1*H*-pirazolil-1-carboxamidina<sup>15,17,18,34,61</sup> y 1*H*-benzotriazolil-1-carboxamidina.<sup>62</sup> El grupo 2 incluye las metaniminas como la di(benzotriazol-1-il)metanimina<sup>5,8,63,64</sup> y la di(imidazol-1-il)metanimina,<sup>65</sup> que se han empleado en la síntesis de guanidinas *N,N,N'*-tri- y *N,N,N',N'*-tetrasustituidas. El carácter electrófilo de las carboxamidinas resultantes del desplazamiento del primer grupo  $Y_2$  es menor que el de las metaniminas de partida. Por tanto, se necesitan condiciones de reacción más energéticas para producir el segundo desplazamiento que conduce a la formación de la guanidina.

## **1.2 Síntesis de oligonucleótidos guanidino**

El grupo de T. C. Bruice ha desarrollado una metodología que permite llevar a cabo la síntesis de análogos de DNA<sup>10,36,45,66-75</sup> y RNA<sup>76,77</sup> con grupos guanidino como enlaces internucleosídicos. En un primer momento la metodología sintética desarrollada se llevaba a cabo en solución y consistía en activar una tiourea derivada de la timidina mediante haluros

de alquilo<sup>10</sup> o bien ácido peracético,<sup>45</sup> obteniendo mejores resultados con este último reactivo. Con el objetivo de superar las limitaciones inherentes a la química en solución y permitir la síntesis de cadenas oligonucleotídicas más largas, se intentó adaptar la metodología a la química en fase sólida. Inicialmente, la elongación de la cadena consistía en hacer reaccionar la sulfonilcarboxamidina **II** con el 3'-amino-2',3'-desoxirribonucleósido anclado a un soporte sólido **I**, (**Método 1**, **Fig.1.2**). La reacción implicaba el desplazamiento del grupo sulfonilo para generar el grupo guanidino. Después del acoplamiento, el grupo azido se reducía con H<sub>2</sub>S en piridina y se volvía a repetir el ciclo. Sin embargo, el rendimiento por acoplamiento iba disminuyendo sustancialmente a medida que se elongaba la cadena. La longitud máxima alcanzada con esta metodología no superaba las cinco unidades, y no mejoraba sustancialmente la metodología en solución.

**Figura 1.2 Síntesis en fase sólida de oligonucleótidos guanidino**



Este método inicial se optimizó, (**Método 2**, **Fig. 1.2**), con la incorporación de un grupo protector para la unión guanidino, de manera que aumentaba la solubilidad en disolventes orgánicos del oligómero en crecimiento y se evitaba que el grupo guanidino pudiera interferir en las etapas de acoplamiento. En este caso, la activación de la tiourea **V** se llevaba a cabo *in situ* utilizando sales de Hg(II). El intermedio activado generado (véase apartado 1.1), reaccionaba con el derivado 5'-aminonucleósido anclado a un soporte sólido **IV** para obtener la guanidina **VI**. De esta forma se pudo llevar a cabo la síntesis de tetra- y pentanucleótidos modificados.

El esquema de protección fue diseñado para ser compatible con los métodos habituales de síntesis de oligonucleótidos. El extremo 5'-amino se protegía con el grupo MMT, (4-monometoxitritilo), el cual se puede eliminar con un tratamiento ácido suave, (tricloroacético en diclorometano). El grupo guanidino se protegía con el grupo Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonilo)<sup>71-77</sup> y se puede eliminar en la misma etapa en la que se eliminan el resto de grupos protectores permanentes de las nucleobases y en la que también se produce la escisión del enlace que une el oligonucleótido al soporte sólido por tratamiento con amoníaco. Antes de recurrir al uso del grupo Fmoc se habían empleado otros grupos protectores como los grupos acetilo,<sup>66,68</sup> benzoílo,<sup>10,36</sup> aliloxicarbonilo<sup>68</sup> o tricloroetoxicarbonilo,<sup>36,67-70</sup> pero los resultados no eran tan satisfactorios.

Por lo que respecta a la etapa de acoplamiento por formación del grupo guanidino, dejando a un lado la toxicidad, el empleo de las sales de mercurio para activar tioureas genera sulfuro de mercurio. Como se trata de un subproducto muy insoluble para proseguir con la elongación de la cadena, se ha de incluir un tratamiento con tiofenol tras la etapa de acoplamiento para solubilizar la sal de mercurio formada y evitar la obstrucción del lecho de síntesis.

Otra desventaja en la metodología descrita reside en la dificultad sintética para acceder a los sintones convenientemente funcionalizados con un grupo amino en el carbono 3' de la ribosa con la misma estereoquímica que en los nucleósidos naturales. No obstante, hasta la fecha se han conseguido sintetizar oligonucleótidos que incorporan los cuatro posibles desoxirribonucleósidos<sup>73,75</sup> derivados de timina, adenina, guanina y citosina y oligoribonucleótidos formados por los derivados de uracilo<sup>76</sup> y adenina.<sup>77</sup>

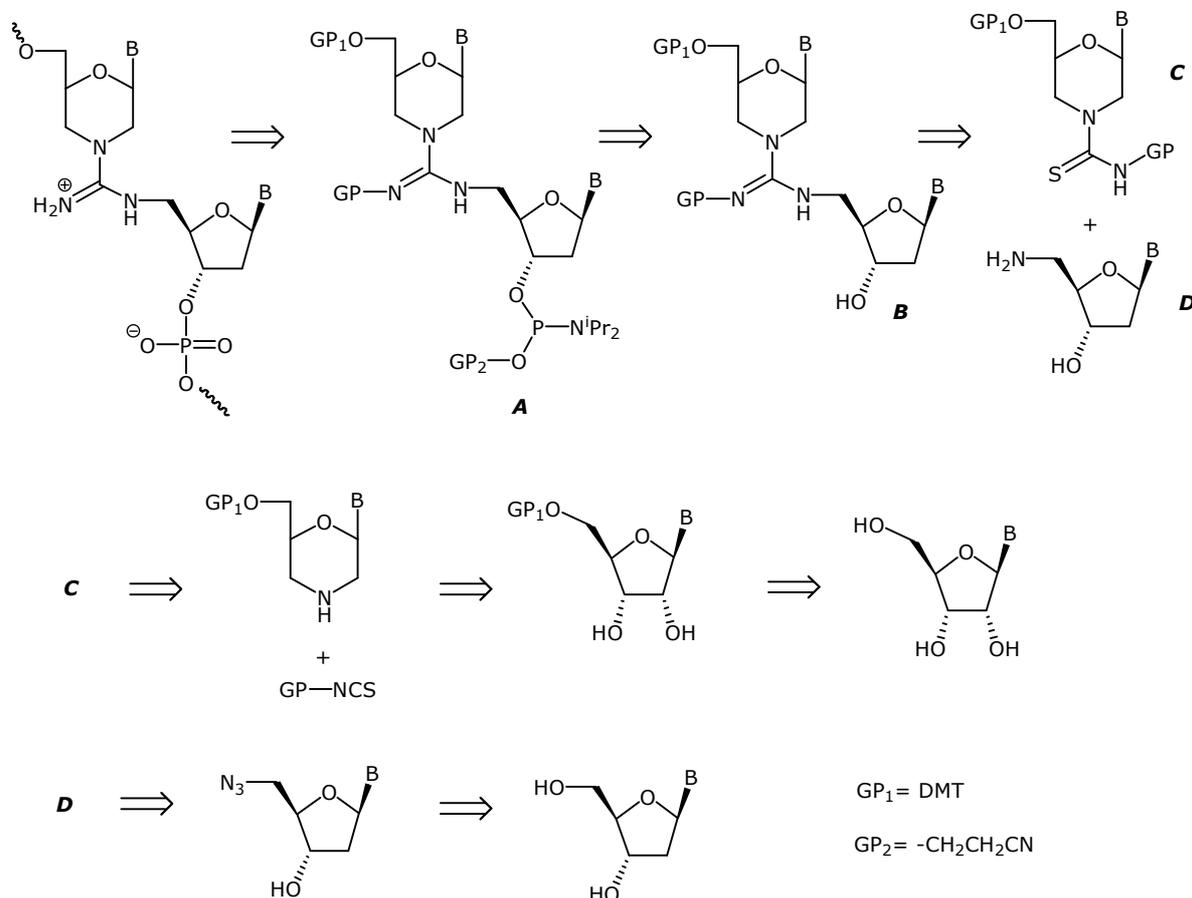
Como ya se ha comentado, el principal objetivo del trabajo aquí expuesto es desarrollar una nueva metodología que permita sintetizar oligonucleótidos con grupos guanidino, combinando para ello el esqueleto de tipo morfolina (véase Introducción) con la presencia de uniones internucleosídicas de tipo guanidino. Con ello se esperan superar algunas de las limitaciones mostradas por los dos tipos de oligonucleótidos modificados y también, por lo aquí expuesto, mejorar en lo posible la metodología desarrollada por el grupo de T. C. Bruice. A continuación, se comentan los esfuerzos destinados a sintetizar oligonucleótidos modificados de estructura alternada, con unidades morfolino-amidina y ribosil-fosfato.

## **2. Diseño de un esquema sintético para la obtención de un oligonucleótido con alternancia de unidades morfolino-amidina y ribosil-fosfato**

El esquema retrosintético que se ha diseñado para la obtención de un oligonucleótido con un esqueleto mixto de morfolino-amidina y ribosil-fosfato se resume en la **Fig.1.3**. Este

esquema está destinado a la obtención de una cadena oligonucleotídica en la que se alternan los grupos catiónicos (guanidino) y los grupos aniónicos (fosfato).

**Fig.1.3. Esquema retrosintético para la obtención de oligonucleótidos formados por morfolino-amidinas y 3'-ribosil-fosfatos en posiciones alternadas**



Por lo que respecta a la presencia de los grupos guanidino, la principal diferencia del modelo aquí expuesto respecto a los oligonucleótidos guanidino sintetizados por el grupo de T. C. Bruice es la presencia de un anillo de morfolina en lugar de una 2'-desoxirribosa.\*

A su similitud, nuestra estrategia sintética también se basa en el uso de tioureas como precursores de las guanidinas. Sin embargo, nos hemos propuesto diseñar una metodología sintética alternativa en la que se evite utilizar sales de mercurio. La metodología de T. C. Bruice presenta como principal limitación la síntesis de los precursores 3'-amino-3'-desoxirribonucleósidos, para cuya obtención se precisan rutas sintéticas de numerosas etapas para disponer de un grupo amino en el carbono 3' con una estereoquímica definida,

\* Con el objeto de simplificar la nomenclatura de los nucleósidos con estructura de morfolina, aunque no se trate de una forma aceptada, nos referiremos a ellos como morfolinonucleósidos, de la misma manera que los nucleósidos naturales con anillo de ribosa son llamados ribonucleósidos o se acepta el término de arabinonucleósidos<sup>78</sup>, para los formados por unidades de arabinosa. Siguiendo este razonamiento, el derivado morfolina de la uridina se nombrará morfolinouridina.

que no son idénticas para todos los nucleósidos. En nuestro diseño, los morfolinonucleósidos no presentarían estas limitaciones, ya que son directamente accesibles a partir de los correspondientes ribonucleósidos con una metodología sintética prácticamente idéntica para todos ellos.<sup>79,80</sup>

Para obtener un análogo de DNA como el que se muestra en la **Fig.1.3**, lo más fácil sería disponer de un dinucleósido como **B**. Al funcionalizar el O3' de la ribosa como un derivado de P(III), (**A**), se pueden obtener precursores que se pueden ir acoplado empleando la metodología habitual de síntesis de oligonucleótidos fosfato en fase sólida para dar lugar a las cadenas oligonucleotídicas quiméricas.<sup>81</sup> Disponiendo del dímero **A** se evita tener que alternar dos tipos de química diferentes para construir el oligómero modificado, es decir, la que se emplea para formar enlaces fosfato y la que se emplea para formar enlaces guanidino, lo que permitiría en principio automatizar su síntesis.

En el apartado 1.2 ya se ha comentado la necesidad de un grupo protector para el grupo guanidino. En el caso que nos ocupa, podrían tener lugar reacciones secundarias durante la formación de los enlaces fosfodiéster, como la fosfitilación del grupo guanidino con la consiguiente elongación de la cadena sobre ese grupo. Por tanto, resulta conveniente que el grupo guanidino permanezca protegido durante el acoplamiento de las unidades nucleosídicas.

Recurriendo al ejemplo más cercano, en la síntesis de péptidos se utilizan habitualmente grupos protectores para evitar reacciones secundarias sobre el grupo guanidino de la arginina. Los protectores más comunes son los grupos metilen-2-sulfonilo (Mts), 4-metoxi-2,3,6-trimetilbencensulfonilo (Mtr), nitro, 2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonilo (Pmc) y benciloxicarbonilo.<sup>82</sup> Ninguno de estos protectores es compatible con el esquema de síntesis de oligonucleótidos, ya que la mayoría se eliminan con tratamientos ácidos que provocarían la rotura del enlace glicosídico por despurinación de las nucleobases.

La elección del grupo protector ha de cumplir dos requisitos: ha de ser compatible con el esquema de protección de los oligonucleótidos y que su eliminación no afecte a la integridad del oligómero final. Puesto que el grupo protector del hidroxilo 5' se elimina en condiciones ácidas suaves antes de cada acoplamiento, sería conveniente elegir un protector que fuera estable a este tratamiento y que una vez finalizada la síntesis, se pueda eliminar en condiciones básicas o neutras compatibles con la estabilidad del oligonucleótido.

Tal y como se ha comentado anteriormente, las tioureas son los intermedios más versátiles para obtener guanidinas. De este modo, en el esquema retrosintético se propone obtener el dinucleósido con unión guanidino **B** por condensación entre una tiourea y una amina. Dicha condensación se puede llevar a cabo de dos maneras: a partir de la 5'-tiourea derivada del desoxirribonucleósido y del morfolinonucleósido, o bien a partir de la tiourea derivada del morfolinonucleósido **C** y la 5'-amino-2',5'-didesoxirribonucleósido **D**. Se opta por esta última vía ya que esta misma química podría ser útil para llevar a cabo la síntesis en

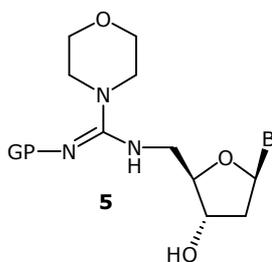
fase sólida de otro tipo de oligonucleótido modificado con unidades de morfolino-amidinas consecutivas.<sup>83</sup>

La síntesis de la tiourea **C** puede realizarse a partir de isotiocianatos y el morfolinonucleósido correspondiente. A su vez, los morfolinonucleósidos se pueden preparar a partir de ribonucleósidos mediante una ruptura oxidativa del anillo de ribosa seguido de una aminación reductora según procedimientos *one-pot* previamente descritos.<sup>79,80</sup> Para la obtención del 5'-amino-2',5'-didesoxirribonucleósido **D** se pueden seguir procedimientos descritos en la literatura, por reducción de un 5'-azido-2',5'-didesoxirribonucleósido,<sup>84</sup> el cual a su vez se obtiene mediante la azidación regioselectiva del correspondiente 2'-desoxirribonucleósido.<sup>85</sup>

### **3. Ensayos de obtención de la guanidina modelo morfolinocarbonimidoil-5'-amino-2',5'-didesoxitimidina**

Con motivo de facilitar la realización de los experimentos preliminares y la caracterización de los productos obtenidos se creyó conveniente trabajar con un modelo de la molécula a sintetizar. Aunque para la obtención de morfolinonucleósidos se requieren muy pocos pasos sintéticos resulta, mucho más cómodo y rápido utilizar un producto comercial en su lugar. Para ello, se ha decidido evaluar la metodología sintética a utilizar preparando un derivado guanidino formado por morfolina en lugar de un morfolinonucleósido (**Fig.1.4**).

**Figura 1.4 Modelo de dímero con unión guanidino**



En primer lugar se describirá la síntesis de morfolinocarbonioamidas (tioureas derivadas de morfolina) protegidas y del derivado 5'-amino-2',5'-didesoxirribonucleósido, y a continuación se explicarán los resultados obtenidos en los diversos ensayos de obtención de la guanidina modelo protegida y de los correspondientes ensayos de eliminación del grupo protector del grupo guanidino.

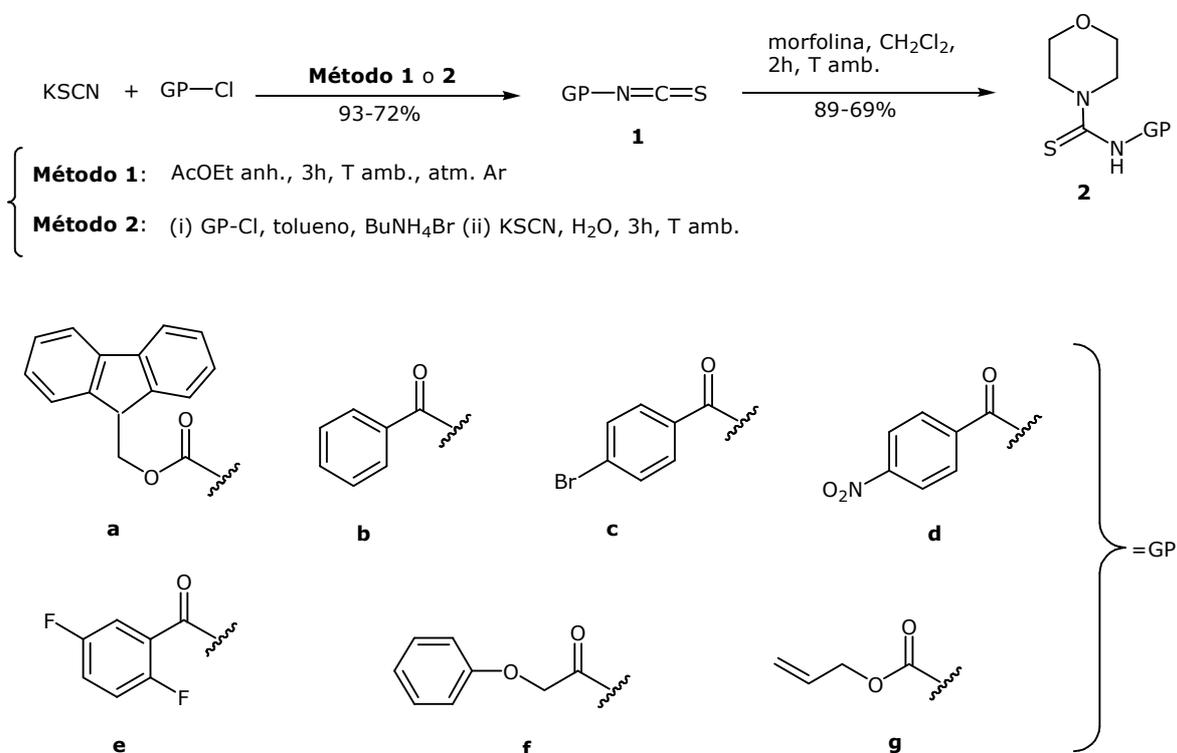
#### **3.1 Síntesis de morfolinocarbonioamidas protegidas**

En la literatura se describen numerosos ejemplos de obtención de tioureas a partir de isotiocianatos y aminas, no sólo en la síntesis de compuestos orgánicos,<sup>86-89</sup> sino también

para acceder a los sintones de oligonucleótidos guanidino.<sup>10,36,45,66-77</sup> En general, se trata de metodologías que proporcionan los derivados tiourea con elevados rendimientos en unas condiciones de reacción suaves, únicamente limitada por la disponibilidad de las aminas y de los isotiocianatos en cuestión.

De este modo, la obtención de las tioureas se realizó a partir de morfolina y un isotiocianato funcionalizado con un grupo protector, (**Fig. 1.5**). En la **Tabla 1.1** se resumen los resultados obtenidos en la síntesis de isotiocianatos y de las correspondientes tioureas protegidas. Para la obtención de isotiocianatos se ensayaron dos metodologías diferentes. En la **Fig. 1.5** se indican las condiciones empleadas según el tipo de metodología.

**Figura 1.5 Síntesis de morfolinocarbotoamidas protegidas**



Tal y como se ha comentado anteriormente, el grupo 9-fluorenilmetoxicarbonilo se ha empleado de manera habitual en la síntesis de oligonucleótidos guanidino, y en menor medida, los grupos benzoilo y aliloxicarbonilo. Este último también se ha empleado para proteger el grupo amino exocíclico de la guanina<sup>81</sup> y para proteger el grupo guanidino de la arginina en síntesis de péptidos.<sup>90,91</sup> El grupo fenoxiacetilo y los de tipo benzoilo también se han empleado en síntesis de oligonucleótidos para proteger guanina.<sup>81</sup> A priori, los grupos protectores seleccionados se pueden eliminar en medio básico (**a-f**) o en condiciones prácticamente neutras con catálisis de paladio (**g**).

**Tabla 1.1 Obtención de los isotiocianatos 1 y las tioureas 2**

Isotiocianato	Rdto.	Tiourea	Rdto.
1a	80	2a	81
1b	Producto comercial	2b	72
1c	93	2c	69
1d*	72	2d	77
1e	88	2e	75
1f	No aislado	2f	26**
1g	76	2g	89

\*El isotiocianato **1d** se obtiene empleando el **método 2** indicado en la **Fig.1.5**

\*\*El valor de **2f** hace referencia al rendimiento global de las dos etapas

Para la síntesis de los isotiocianatos se ha optado por emplear el método clásico en el que se emplea tiocianato de potasio y un cloruro de ácido en condiciones anhidras.<sup>92,93</sup> De esta manera se han obtenido los isotiocianatos **1a**, **1c**, **1e** y **1g** con unos rendimientos que oscilan entre un 76% y un 93%. Para obtener el isotiocianato **1f** se ha tenido que preparar el cloruro de ácido partiendo del ácido fenoxiacético y cloruro de tionilo. El cloruro de ácido obtenido se hizo reaccionar con tiocianato de potasio siguiendo el mismo procedimiento de los isotiocianatos ya preparados anteriormente. En este caso, el crudo obtenido no fue tan limpio y venía acompañado de restos de ácido fenoxiacético. Pensando en la posibilidad de mejorar los resultados en la obtención de isotiocianatos se utilizó una metodología distinta en la síntesis del producto **1d**. Empleando también como productos de partida tiocianato de potasio y el cloruro de ácido, la síntesis del producto se llevó a cabo mediante catálisis por transferencia de fase,<sup>94</sup> obteniendo en este caso resultados similares a los otros isotiocianatos ya sintetizados.

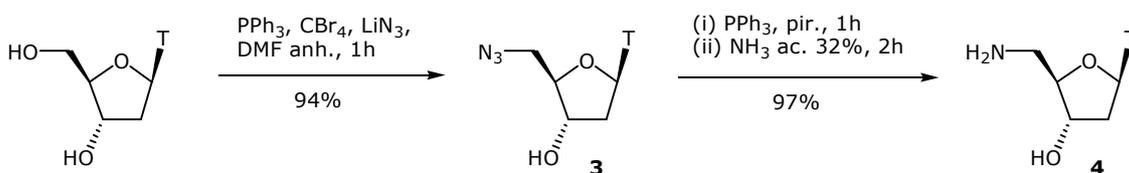
Exceptuando el isotiocianato **1f**, los isotiocianatos se han obtenido con grados de pureza adecuados, por lo que se han podido emplear en la siguiente etapa prácticamente sin purificar. En general, son poco estables y deben guardarse a baja temperatura y en atmósfera inerte. Por este motivo se decidió no realizar la purificación por cromatografía en columna del isotiocianato **1f** y utilizarlo directamente para obtener la correspondiente tiourea.

La siguiente etapa consistió en la obtención de la morfolinocarbotioamida **2** por reacción de los isotiocianatos obtenidos anteriormente con morfolina. Excepto el derivado **2f**, todas las tioureas se han podido obtener con un grado de pureza adecuado después de una simple decantación y con rendimientos bastante aceptables, (89-69%). En el ensayo realizado empleando el isotiocianato **1f** se formaron dos productos mayoritarios, siendo uno de ellos la tiourea **2f**, aislada con un 26% de rendimiento global, y un producto secundario de amidación de la morfolina.

### 3.2 Síntesis de 5'-amino-2',5'-didesoxitimidina

La obtención del 5'-amino-2',5'-didesoxirribonucleósido se realizó a partir del correspondiente 2'-desoxirribonucleósido, preparando en primer lugar el derivado 5'-azido-2',5'-didesoxirribonucleósido (**Fig. 1.6**), y posterior reducción del grupo azido.

**Figura 1.6 Síntesis de la 5'-amino-2',5'-didesoxitimidina**



Hay cuatro posibles derivados 5'-amino a sintetizar según sea el nucleósido de partida escogido. En el caso de utilizar desoxiadenosina (dA), desoxiguanosina (dG) o desoxicitidina (dC) es necesario proteger el grupo amino exocíclico (véase apartado 6.2). En la bibliografía se ha descrito una gran variedad de grupos protectores, aunque los más utilizados son el grupo benzoílo para dA y dC y el grupo isobutirilo para dG.<sup>81</sup> Dado que la timidina no precisa de grupo protector, con el fin de facilitar los ensayos de obtención del dímero con unión guanidino, se decidió sintetizar el derivado 5'-amino-2',5'-didesoxitimidina, **4**.

Siguiendo una metodología descrita<sup>85</sup>, se obtuvo el derivado azido **3** en un solo paso sintético con excelente rendimiento por tratamiento del nucleósido de partida con trifetilfosfina, tetrabromuro de carbono y azida de litio. Comparada con la azida de sodio, la azida de litio presenta la ventaja de ser soluble en dimetilformamida, por lo que la reacción se puede llevar a cabo sin necesidad de calentar. Si en el medio de reacción hay la más mínima traza de agua, la reacción no funciona de manera satisfactoria, por lo que la reacción debe realizarse en condiciones estrictamente anhidras y en atmósfera inerte.

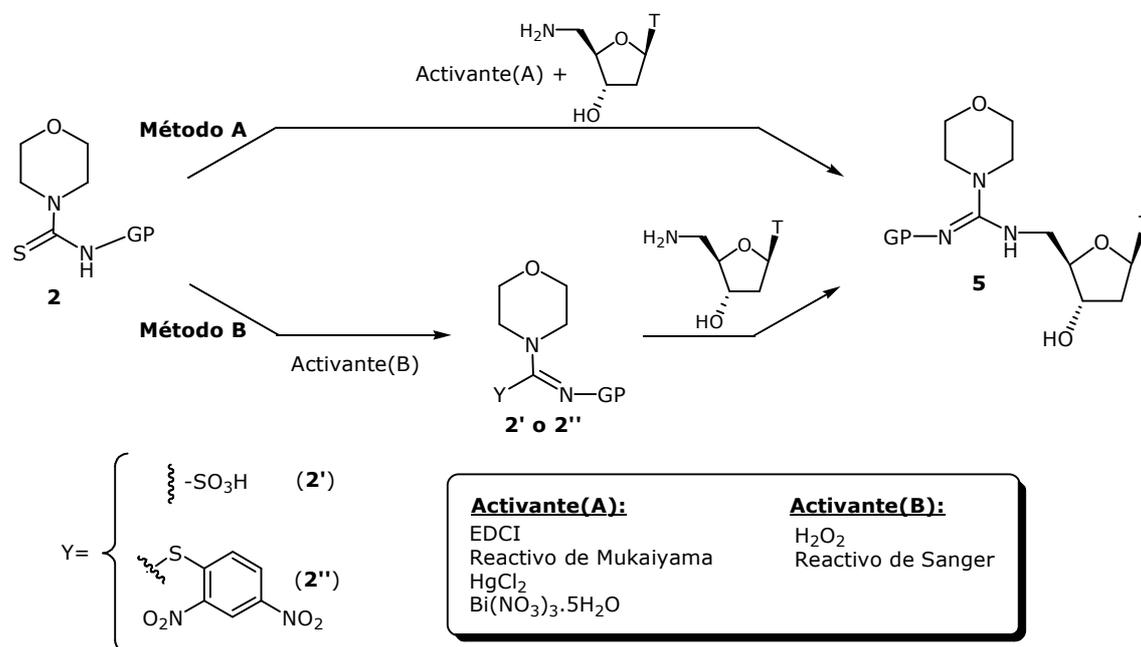
El siguiente paso sintético consistió en la reducción del grupo azido a amina. Si bien la formación de aminonucleósidos por hidrogenación catalítica de azidonucleósidos es bien conocida y ampliamente utilizada,<sup>70,73,75,76,84,95,96</sup> se optó por llevar a cabo la reducción basada en la reacción de Staudinger, que emplea trifetilfosfina.<sup>51,84</sup> De esta manera, se trató el azidonucleósido **3** con trifetilfosfina en piridina durante 1 hora para generar el correspondiente iminofosforano, que se hidroliza *in situ* con una solución de amoníaco al 32% para obtener el aminonucleósido **4** con un 97% de rendimiento. Una vez obtenidos los precursores requeridos, se pasó a ensayar la obtención de la de la guanidina modelo morfolinocarbonimidoil-5'-amino-2',5'-didesoxitimidina **5**.

### 3.3 Síntesis del derivado guanidino a partir de 5'-amino-2',5'-didesoxitimidina y morfolinocarbotioamida

Se ensayó la obtención de guanidinas por reacción de las morfolinocarbotioamidas **2** y 5'-amino-2',5'-didesoxitimidina **4**. Según el reactivo utilizado, se pueden clasificar los ensayos realizados en dos grupos, (**Fig. 1.7**).

- (i) **Método A:** Reacciones en que se han empleado reactivos como el yoduro de 2-cloro-1-metilpiridinio (reactivo de Mukaiyama), EDCI, HgCl<sub>2</sub> o Bi(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O. Estos reactivos transforman la tiourea en una especie electrófila en el propio medio de reacción. La especie que se forma reacciona entonces con 5'-amino-2',5'-didesoxitimidina para dar la guanidina.
- (ii) **Método B:** Consiste en preparar derivados aislables de la tiourea como el ácido sulfónico (**2'**) o la *S*-2,4-dinitrofenilisotiourea (**2''**) utilizando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 1-fluoro-2,4-dinitrobenzoceno (reactivo de Sanger), respectivamente. El intermedio así preparado se hace reaccionar luego con el aminonucleósido para dar la guanidina.

**Figura 1.7 Síntesis de las guanidinas protegidas derivadas de morfolina y 5'-amino-2',5'-didesoxitimidina mediante dos metodologías**



#### 3.3.1 Ensayos realizados siguiendo el método A

La **Tabla 1.2** recoge los ensayos realizados sobre las tioureas *N*-(9-fluorenilmetiloxycarbonil)morfolinocarbotioamida y *N*-benzoilmorfolinocarbotioamida (**2a** y **2b** respectivamente), utilizando el **método A**.

**Tabla 1.2 Ensayos de obtención de las guanidinas protegidas 5 siguiendo el método A**

Condiciones	Tiourea	Ensayo	Resultado
<b>2</b> (1 eq)+ <b>4</b> (1,2 eq)+TEA (2,2 eq)+ <b>R. Mukaiyama</b> (1,2 eq), DMF, 1 día T amb.,+ <b>R. Mukaiyama</b> (1 eq), 1 día T=70°C	2a	1.1	Mezcla de productos Desprotección
	2b	1.2	Mezcla de productos
<b>2</b> (1 eq)+ <b>4</b> (1,5 eq)+TEA (1 eq)+ <b>EDCI</b> (2 eq), DMF, 1 día T amb.,+ <b>EDCI</b> (1 eq), 1 día T=70°C	2a	2.1*	Desprotección
	2b	2.2	Mezcla de productos
<b>2</b> (1 eq)+ <b>4</b> (1 eq)+DIEA (2,5 eq)+ <b>HgCl<sub>2</sub></b> (1,25 eq), DMF, 1 día T amb.	2a	3	Desprotección
<b>2</b> (1 eq)+ <b>4</b> (1 eq)+TEA (4 eq)+ <b>Bi(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O</b> (1eq), DMF, 1 día T amb., 1 día T=70°C	2b	4	Mezcla de productos

\*No se continúa después de 24 horas de reacción a T ambiente

Seguendo la metodología descrita por M. A. Lipton y colaboradores,<sup>34</sup> con la que se han obtenido buenos resultados, se ha ensayado el reactivo de Mukaiyama para activar las tioureas **2a** y **2b** respectivamente, (ensayos 1.1 y 1.2). Sin embargo, mientras que en el ensayo 1.2 no se observó ningún cambio después de 24 horas de reacción a T ambiente, en el ensayo 1.1 la tiourea se había consumido en parte y se había formado un nuevo producto, según indicaba el análisis por CCF. Al añadir 1 equivalente más de reactivo de Mukaiyama y elevar la temperatura a 70°C se obtuvo en ambos casos una mezcla de productos. Con el fin de averiguar si se había formado el producto esperado se decidió purificar los crudos de los ensayos realizados por cromatografía en columna. El análisis por RMN <sup>1</sup>H de las fracciones aisladas del ensayo 1.1 reveló que el producto que se iba generando cuando la reacción transcurría a T ambiente correspondía a la pérdida del grupo protector. En ninguno de los dos ensayos se pudo aislar el derivado guanidino.

Se barajó la posibilidad de emplear otro disolvente en las reacciones de guanidilación, ya que había precedentes en los que el disolvente influía notablemente en los rendimientos de las guanidilaciones mediadas por el reactivo de Mukaiyama. Por ejemplo, en el trabajo realizado por M. A. Lipton y colaboradores,<sup>34</sup> los autores describen que los rendimientos mejoran bastante si se emplea diclorometano en lugar de dimetilformamida. Cuando se ensayó diclorometano se observó que el nucleósido era completamente insoluble. Lo mismo ocurría con otros disolventes, por lo que se descartó la posibilidad de ensayar la reacción en otro medio y se pasaron a estudiar otros reactivos de activación de tioureas.

En sustitución al reactivo de Mukaiyama, se ensayó la formación de guanidina con las tioureas **2a** y **2b** utilizando EDCI, según se describe en la bibliografía.<sup>24</sup> Después de 24 horas de reacción a T ambiente el análisis por CCF del ensayo 2.1 mostraba que la tiourea se había consumido en parte y se había formado un nuevo producto, pero el perfil era similar al observado en ensayo 1.1. Aunque no se disponía del análisis por RMN <sup>1</sup>H se concluyó que en

estas condiciones de reacción se estaba produciendo la pérdida del grupo protector. En el ensayo 2.2 no se observó ningún cambio transcurrido ese tiempo. Al añadir 1 equivalente más de EDCI y elevar la temperatura a 70°C se obtuvo una mezcla de productos.

También se ensayó la reacción de la tiourea **2a** con en presencia de HgCl<sub>2</sub> (ensayo 3) por ser esta la metodología y el grupo Fmoc el protector empleado en la síntesis de oligonucleótidos guanidino.<sup>71-77</sup> En este caso, al igual que en el ensayo realizado con el reactivo de Mukaiyama (ensayo 1.1), la tiourea de partida experimentaba la pérdida del grupo protector. Se llegó a la conclusión de que se trataba de un grupo protector demasiado lábil que no resistía las condiciones de reacción.

En la literatura se puede encontrar una alternativa no tóxica a las sales de mercurio,<sup>38</sup> en la que se emplea Bi(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> como agente activante de tioureas. De este modo, se ensayó este reactivo para activar la tiourea **2b**, (ensayo 4). Sin embargo, después de 1 día de reacción no se observó ningún avance en la reacción, y después de 1 día más de reacción a 70°C se observó que se había generado una mezcla de productos en la que no fue posible detectar el producto esperado.

Por tanto, analizando los resultados obtenidos del conjunto de ensayos realizados se concluyó lo siguiente:

- El grupo Fmoc era demasiado lábil en cualquiera de las condiciones ensayadas, puesto que tras períodos de reacción prolongados, se producía la pérdida del grupo protector y la formación de subproductos.
- En ninguno de los ensayos realizados con el grupo protector benzoílo se observó la formación de la guanidina deseada a temperatura ambiente, y si se aumentaba la temperatura se formaban mezclas de productos.

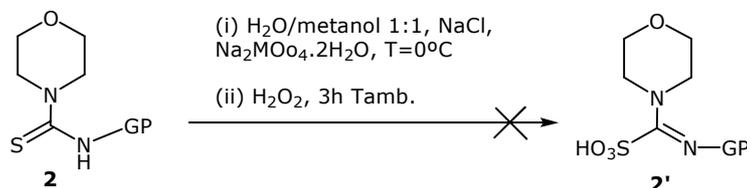
### **3.3.2 Ensayos realizados siguiendo el método B**

Dados los resultados obtenidos con los reactivos activantes de tioureas descritos en el apartado anterior, pareció razonable cambiar de estrategia y ensayar con otros reactivos que podían proporcionar un intermedio aislable. De este modo, se realizaron ensayos utilizando en la etapa de activación H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ensayo 5), o bien el reactivo de Sanger (**Tabla 1.3**, ensayos 6.1-6.8), para transformar las tioureas **2a-2g** en intermedios reactivos.

Se ensayó la obtención de un derivado de ácido sulfónico a partir de la tiourea **2b** (ensayo 5), mediante la oxidación del átomo de azufre (**Fig. 1.8**). C. A. Maryanoff y colaboradores<sup>43</sup> describen la formación de derivados de ácidos sulfónicos a partir de tioureas utilizando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como agente oxidante y molibdato de sodio como catalizador. En el artículo se comenta que la adición de 2 equivalentes de oxidante conduce a la formación de derivados de ácido sulfínico mientras que con la adición de 3 equivalentes se obtienen

derivados de ácido sulfónico, y que en general son estables a temperatura ambiente. Al ser una reacción exotérmica se recomienda controlar la temperatura para evitar la descomposición de los derivados de ácido sulfínico que se vayan formando a medida que avance la reacción.

**Figura 1.8** Ensayo de activación de tiourea empleando  $H_2O_2$

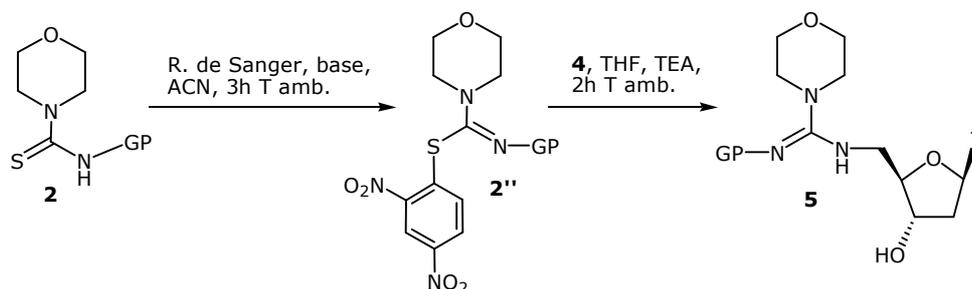


Exceptuando el disolvente, se siguió paso a paso el procedimiento experimental descrito por los autores. En lugar de utilizar agua se empleó una mezcla de agua/metanol 1:1 debido a la solubilidad de la tiourea de partida (**2b**). El análisis por CCF indicaba que, después de haber añadido todo el oxidante, la tiourea de partida se había consumido para dar dos nuevos productos y después de 3 horas de reacción a T ambiente tan sólo quedaba uno de ellos como producto mayoritario. Tras purificar el crudo de reacción por decantación, el análisis por RMN  $^1H$  mostraba señales pertenecientes al grupo benzoílo y al anillo de morfolina, pero las primeras presentaban una integración mucho mayor a las segundas. De esto se puede deducir que la muestra analizada presentaba al menos 2 productos, que podían provenir de la descomposición de la tiourea, de la descomposición de algún intermedio de reacción o bien de la descomposición del producto **2b'**.

En el llamado método de secuenciación de Sanger se determina la secuencia de aminoácidos de un polipéptido por reacción del 1-fluoro-2,4-dinitrobenzoceno con el extremo *N*-terminal mediante un proceso de sustitución nucleófila aromática que, de esta manera, marca el aminoácido terminal como derivado dinitrofenilo. El producto 1-fluoro-2,4-dinitrobenzoceno, llamado reactivo de Sanger, también se ha utilizado en la síntesis de guanidinas porque puede transformar el azufre de una tiourea en un buen grupo saliente ante el ataque nucleófilo de una amina,<sup>12,23</sup> transcurriendo ambos procesos en unas condiciones de reacción suaves. Por ello, se consideró que era un método adecuado para nuestro caso. De este modo, se ensayó la obtención de las isotioureas **2''** a partir de las tioureas **2a-2g** (**Fig.1.9**) con diferentes resultados, según se resume en la **Tabla 1.3**.

Adaptando un procedimiento previamente descrito, en el primer ensayo (6.1) realizado se llevó a cabo la activación de la tiourea **2b** con 1 equivalente de reactivo de Sanger en presencia de  $K_2CO_3$  a T ambiente. Después de 3 horas de reacción la tiourea se había consumido para dar un nuevo producto, pero se detectó por CCF que en el medio de reacción aún quedaban restos del reactivo de Sanger sin reaccionar. Después de procesar el crudo de reacción y al no poder eliminarlo de forma sencilla, se realizó una purificación en columna dando como resultado la descomposición del producto formado.

**Figura 1.9 Ensayos de obtención de la guanidina 5 empleando el R. de Sanger como agente activante de la tiourea**



**Tabla 1.3 Ensayos de obtención de las guanidinas protegidas 5 empleando el R. de Sanger como agente activante de la tiourea**

Tiourea	Ensayo	Condiciones	% 2''	% 5
2b	6.1	<b>2</b> (1 eq)+K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0,8eq)+ <b>R. Sanger</b> (1 eq), ACN, 3 h, T amb.	----	----
2b	6.2	<b>(i) 2</b> (1 eq)+K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0,8 eq)+ <b>R. Sanger</b> (0,8 eq), ACN, 3 h, T amb. <b>(ii) 4</b> (1,2 eq)+TEA (1 eq), THF anh., 2 h, T amb.	92	80
2c	6.3		90	51
2d	6.4		90	53
2e	6.5		88	30
2f	6.6	<b>(i)2</b> (1 eq)+K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0,8 eq)+ <b>R. Sanger</b> (0,8 eq), ACN, 12 h, T amb. <b>(ii) 4</b> (1,2 eq)+TEA (1 eq), THF anh., 2 h, T amb.	----	46*
2a	6.7	<b>2</b> (1 eq)+K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0,8 eq)+ <b>R. Sanger</b> (0,8 eq), ACN, 24 h, T amb, 1 h T=55°C	----	----
2g	6.8	<b>(i)2</b> (1 eq)+K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0,8 eq)+ <b>R. Sanger</b> (0,8 eq), ACN, 3 h, T amb, 1 h T=55°C, DBU (1 eq.) 15 min. T amb. <b>(ii) 4</b> (1,2 eq)+TEA (1 eq), THF anh., 2 h, T amb.	----	21*

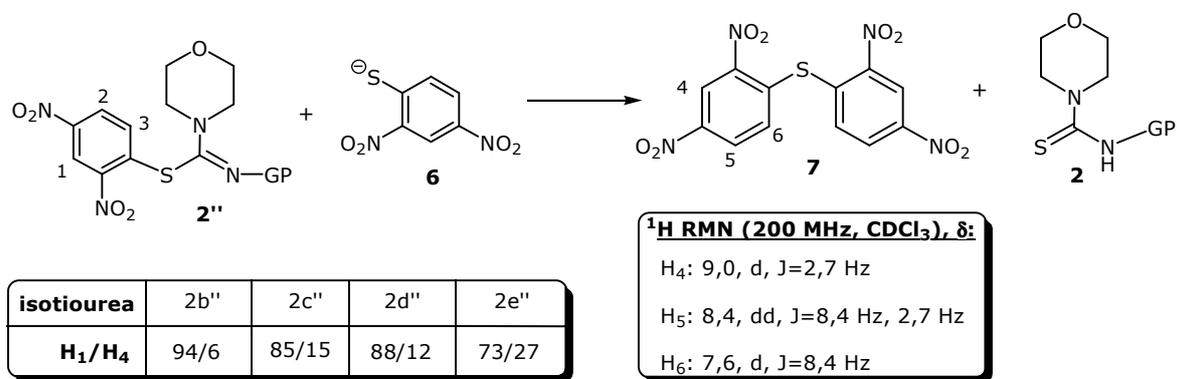
\* El rendimiento de **5** incluye las dos etapas

Puesto que un exceso del reactivo de Sanger podía reaccionar con 5'-amino-2',5'-didesoxitimidina en la siguiente etapa, se decidió emplear un defecto del mismo (0,8 equivalentes) para obtener la isotiourea **2''** en posteriores ensayos. La presencia de una pequeña cantidad de tiourea sin reaccionar no representaba un problema porque no interfería en la reacción de formación de la guanidina.

En los ensayos realizados con los derivados del grupo benzoílo (ensayos 6.2-6.5), al tratarse de productos tan sensibles se decidió no realizar purificación por cromatografía en columna y después de comprobar por CCF que se había consumido todo el reactivo de Sanger se procesó el crudo de reacción mediante una decantación. No obstante, después de la decantación se observó por CCF la aparición de un nuevo producto de R<sub>f</sub> muy similar al del reactivo de Sanger. El análisis por RMN <sup>1</sup>H de cada uno de los crudos de reacción, además de presentar las señales de las isotioureas, también presentaba señales correspondientes a un subproducto del reactivo de Sanger.

En la bibliografía se indica que, en presencia de bases no nucleófilas, las isotioureas formadas empleando el reactivo de Sanger pueden descomponer generando el correspondiente tiolato. Este producto puede reaccionar con otra molécula de isotiourea mediante un mecanismo de sustitución nucleófila aromática para dar el sulfuro de bis(2,4-dinitrofenilo).<sup>12</sup> Por tanto, pareció razonable suponer que este proceso estaba teniendo lugar también en nuestro caso (**Fig. 1.10**). En la figura también se indica el desplazamiento químico de las señales del grupo 2,4-dinitrofenilo del producto **7** y la proporción de este producto en cada caso respecto a la isotiourea **2''**, la cual se calculó a partir de los espectros de RMN <sup>1</sup>H mediante la proporción de áreas de los protones H<sub>1</sub> y H<sub>4</sub>. El subproducto **7** no fue posible separarlo por cromatografía en columna sin que se produjera la descomposición de la isotiourea, por lo que se utilizaron los crudos de reacción directamente en la siguiente etapa.

**Figura 1.10 Formación del sulfuro de bis(2,4-dinitrofenilo)**



La reacción de las isotioureas con 5'-amino-2',5'-didesoximidina fue progresando a temperatura ambiente para dar las guanidinas **5b-5e** al cabo de 3 horas. Un factor indicativo del avance de la reacción era el cambio de color desde el color naranja inicial hacia el rojo oscuro, debido a la formación de 2,4-dinitrobenzotiol como subproducto de reacción. Tras purificación por cromatografía en columna, se aislaron los derivados guanidino con rendimientos globales que iban del 30% al 80%. Las guanidinas así obtenidas se caracterizaron por resonancia magnética nuclear y por espectroscopia de masas, (MALDI-TOF, modo positivo).

Aunque la presencia del subproducto **7** no impide que se forme la guanidina, dado que proviene de la descomposición de la isotiourea, produce una disminución en el rendimiento de su obtención.

Para limitar al máximo la descomposición de la isotiourea, se preparó la guanidina **5f** a partir de la tiourea **2f** sin aislarla (ensayo 6.6). Sin embargo, la mejora no fue significativa respecto a las guanidinas obtenidas en dos etapas.

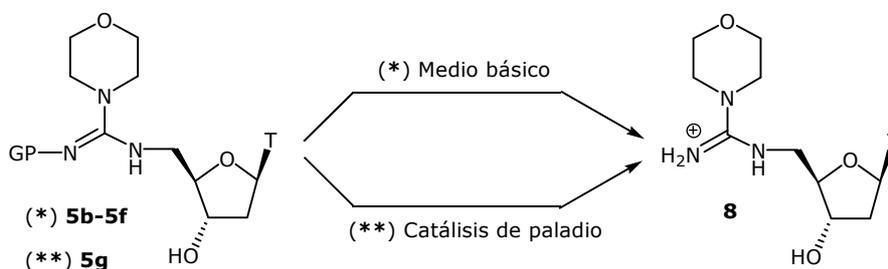
En el ensayo realizado con el derivado protegido con el grupo Fmoc (tiourea **2a**, ensayo 6.7), después de 3 horas de reacción a temperatura ambiente no se pudo preparar la isotiourea. Si se forzaban las condiciones elevando la temperatura a 55°C, lo único que se

conseguida era una mezcla de productos. La tiourea protegida con el grupo aliloxycarbonilo (Alloc) tampoco produjo la isotiourea en las condiciones de reacción de los ensayos 6.2-6.5. No obstante, después de añadir 1 equivalente de DBU el análisis por CCF indicaba que el producto mayoritario seguía siendo la tiourea de partida, pero se había formado un nuevo producto de forma minoritaria y que se había consumido todo el reactivo de Sanger. Al añadir 1 equivalente de aminotimidina se observó que el producto minoritario formado se iba transformando paulatinamente para dar un nuevo producto. Después de realizar una purificación por cromatografía en columna, se caracterizó el producto por resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas (MALDI-TOF, modo positivo), resultando ser el derivado guanidino **5g**. Este derivado se obtuvo con un rendimiento sensiblemente inferior a las otras guanidinas.

#### **4. Ensayos de desprotección de las guanidinas 5b-5g**

Una vez obtenidas las guanidinas protegidas se procedió a ensayar la eliminación de los diferentes grupos protectores empleados. Según el tipo de grupo protector, se pueden clasificar los ensayos realizados en dos grupos. Por un lado están las guanidinas que tienen grupos protectores lábiles en medio básico (**5b**, **5c**, **5d**, **5e** y **5f**), y por otra parte la guanidina **5g**, cuyo grupo protector se elimina con catálisis de paladio (**Fig. 1.11**).

**Figura 1.11 Desprotección de los derivados guanidino 5b-5g**



##### **4.1 Ensayos de desprotección de las guanidinas 5b-5f**

Con el objetivo de evaluar la idoneidad de los grupos protectores benzoílo, *p*-bromobenzoílo, *p*-nitrobenzoílo, 2,5-difluorobenzoílo y fenoxiacetilo, se ensayó la desprotección de las guanidinas **5b**, **5c**, **5d**, **5e** y **5f** con diferentes tratamientos compatibles con la síntesis de oligonucleótidos. La **Tabla 1.4** resume los ensayos realizados sobre aproximadamente 0,01 mmol de guanidina empleando un exceso elevado del reactivo de desprotección respecto al sustrato. La evolución del proceso se siguió por CCF y por HPLC.

Los ensayos realizados con el derivado **5b** en diferentes condiciones (NH<sub>3</sub> ac./dioxano, LiOH en MeOH o K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en MeOH/dioxano) no fueron en ningún caso positivos.

En ninguno de los ensayos se pudo observar desprotección apreciable de las guanidinas, tanto a temperatura ambiente como calentando a 55°C.

El hecho de introducir sustituyentes electroatrayentes en el anillo aromático del grupo benzoílo, como halógenos o grupos nitro debería facilitar la desprotección con tratamientos básicos. Siguiendo este razonamiento, el derivado **5c** teóricamente contiene un grupo protector más lábil que el derivado **5b** a causa del efecto electroatrayente del bromo en posición para.

**Tabla 1.4 Ensayos de desprotección de las guanidinas 5b-5f**

Guanidina(5)	Ensayo	Tratamientos	Resultado
5b	1.1-1.3	(1)-(3)	no se desprotege
5c	2.1-2.5	(1)-(5)	no se desprotege
	2.6	(6)	mezcla de productos
5d	3.1-3.5	(1)-(5)	desprotección parcial
5e	4.1-4.5	(1)-(5)	desprotección parcial
5f	5.1-5.3	(1)-(3)	desprotección parcial
	5.4-5.5	(4) y (5)	desprotección parcial y mezcla de productos

**Tratamientos**

- (1) Dioxano/NH<sub>3</sub> ac. (32%) 1:1, 1 día T amb., 8 h T=55°C
- (2) LiOH 0,1 M en MeOH/dioxano/H<sub>2</sub>O 1,5:1,5:1, 1 día T amb., 8 h T=55°C
- (3) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,05 M en MeOH/dioxano 1:1, 1 día T amb., 8 h T=55°C
- (4) Metilamina/MeOH 1:1, 1 día Tamb., 8 h T=55°C
- (5) Etilendiamina/MeOH 1:1, 1 día Tamb., 8 h T=55°C
- (6) Hidracina/MeOH 1:1, 8 horas T=55°C

Aparte de los tratamientos (1-3) ensayados sobre el derivado **5b**, que no condujeron a la desprotección de la guanidina, se probaron otros tres tratamientos con bases nucleófilas como metilamina, etilendiamina e hidracina. Sin embargo, tampoco en este caso ninguno de los tratamientos realizados sobre la guanidina **5c** produjo una eliminación apreciable del grupo protector. Al calentar en el ensayo 2.6 se observó la descomposición paulatina del derivado para dar una mezcla compleja de productos sin que pudiera ser aislada la guanidina deseada.

Se ensayaron los mismos tratamientos sobre los derivados **5d** y **5e**, protegidos con grupos teóricamente más lábiles como los grupos *p*-nitrobenzoílo y 2,5-difluorobenzoílo (**5d** y **5e** respectivamente), pero tampoco fueron satisfactorios. En este caso sí se observó una eliminación parcial de los grupos protectores al calentar a T=55°C durante 8 horas.

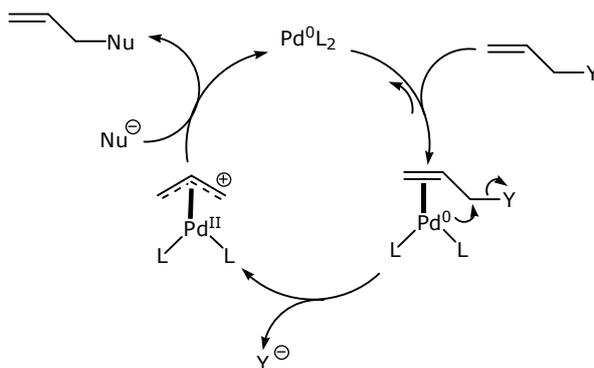
Como se ha comentado en el punto 3.1, el grupo fenoxiacetilo también se ha utilizado en la síntesis de oligonucleótidos como alternativa a los grupos benzoílo para proteger el grupo amino exocíclico de las nucleobases. Por ejemplo, se ha descrito que en el tratamiento con amoniaco acuoso concentrado a 20°C de los residuos de guanina, adenina y citosina, el grupo protector presenta un tiempo de vida media de 8, 7 y 2 minutos respectivamente. En las mismas condiciones el tiempo de vida media de los correspondientes nucleósidos *N*-benzoilados es, en el mismo orden, de 10, 11 y 3 horas.<sup>81</sup> En nuestro caso, como grupo protector de la guanidina **5f** los resultados tampoco resultaron satisfactorios. En los ensayos 5.1-5.3 después de 1 día de tratamiento con NH<sub>3</sub>, LiOH o K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a T ambiente no se observó ningún cambio apreciable, y sólo después de 8 horas de reacción a 55°C se produjo una eliminación parcial del grupo protector. En los ensayos 5.4 y 5.5, realizados con metilamina y etilendiamina respectivamente, después de 1 día de reacción a T ambiente el producto de partida se consumía muy lentamente. Si se calentaba a 55°C, al cabo de 8 horas se observaba la aparición de mezclas de productos, entre los que aún se podía detectar la presencia del producto de partida.

Los resultados obtenidos con los protectores benzoílo y fenoxiacetilo obligaron a realizar un replanteamiento de la estrategia sintética, eligiendo como grupo protector de la guanidina el grupo aliloxicarbonilo. La elección de este grupo protector pareció adecuada porque las condiciones requeridas para su eliminación eran diferentes a las ya ensayadas.

#### **4.2 Ensayos de desprotección de la guanidina 5g**

El grupo aliloxicarbonilo se elimina habitualmente mediante un mecanismo de sustitución alílica catalizada por Pd (reacción de Tsuji-Trost, **Fig. 1.12**). Se trata de un mecanismo muy estudiado, en el que intervienen como catalizador especies de Pd(0), generalmente con estructura PdL<sub>2</sub> o PdL<sub>2</sub>X<sup>-</sup> (siendo X<sup>-</sup> ligandos del tipo Cl<sup>-</sup> o AcO<sup>-</sup>).<sup>97</sup> Los ligandos L son generalmente fosfinas terciarias (normalmente es PPh<sub>3</sub>), y las especies activas se pueden formar *in situ* de diversas maneras.

**Figura 1.12 Mecanismo de la sustitución alílica catalizada por Pd**



El ciclo catalítico de la reacción incluye dos etapas. En la primera etapa la especie  $PdL_2$  actúa como nucleófilo ( $Pd(0)$ ), y en la segunda etapa actúa como grupo saliente, ( $Pd(II)$ ). En el primer paso y después de la coordinación al doble enlace, el fragmento  $PdL_2$  desplaza al grupo saliente Y para formar un complejo  $\pi$ -alilo. Este es un proceso de adición oxidativa, en el que el estado de oxidación del Pd pasa a ser (II). En la siguiente etapa se produce el ataque de un nucleófilo sobre el complejo  $\pi$ -alilo, y se regenera la especie catalítica  $PdL_2$  mediante un proceso de eliminación reductiva.

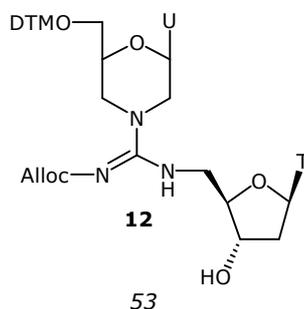
Una condición necesaria para la eliminación del grupo alilo es que Y sea suficientemente buen grupo saliente como para permitir la formación del complejo  $\pi$ -alilo. Los ácidos carboxílicos, fenoles, ácidos fosfóricos y fosfónicos son los principales grupos que reúnen esta condición, aunque también lo son oximas, imidas y alilaminas protonadas. Por otra parte, los éteres o tioéteres alílicos y las alilaminas son demasiado estables al tratamiento con paladio. Estas limitaciones se pueden superar utilizando el grupo aliloxicarbonilo en lugar del grupo alilo para la protección. Por tanto, en estos casos la eliminación del grupo protector va acompañada de descarboxilación.

Por lo que respecta a la química de ácidos nucleicos, el uso de grupos alílicos en la protección del fosfato internucleosídico y de las nucleobases ha sido introducido y desarrollado esencialmente por R. Noyori y Y. Hayakawa.<sup>98-101</sup> Partiendo de la metodología descrita, se ensayó la desprotección del derivado **5g** utilizando  $Pd(PPh_3)_4$  como catalizador y ácido fórmico/butilamina como capturador del complejo  $\pi$ -alilo. En este caso se consiguió eliminar el grupo protector de forma cuantitativa en aproximadamente 40 minutos. El producto de desprotección se aisló por HPLC y se caracterizó por EM (MALDI-TOF, modo positivo,  $m/z=354,3$ , esperado  $m/z=354,4$ ) el cual resultó ser el producto **8**. Debido a los buenos resultados obtenidos, se pasó a ensayar la metodología para obtener la guanidina derivada del morfolinonucleósido.

## **5. Síntesis de la guanidina dinucleosídica derivada de morfolinouridina y aminodesoxitimidina (12)**

Una vez ensayada la síntesis de guanidinas derivadas de morfolina, se pasó a estudiar la obtención de guanidinas formadas por un morfolinonucleósido. Por tanto, con el objeto de facilitar la síntesis, se escogió sintetizar un derivado de morfolinouridina y timidina (**Fig. 1.13**), ya que ninguna de las nucleobases precisa protección.

**Figura 1.13 Guanidina derivada de morfolinouridina y aminodesoxitimidina**

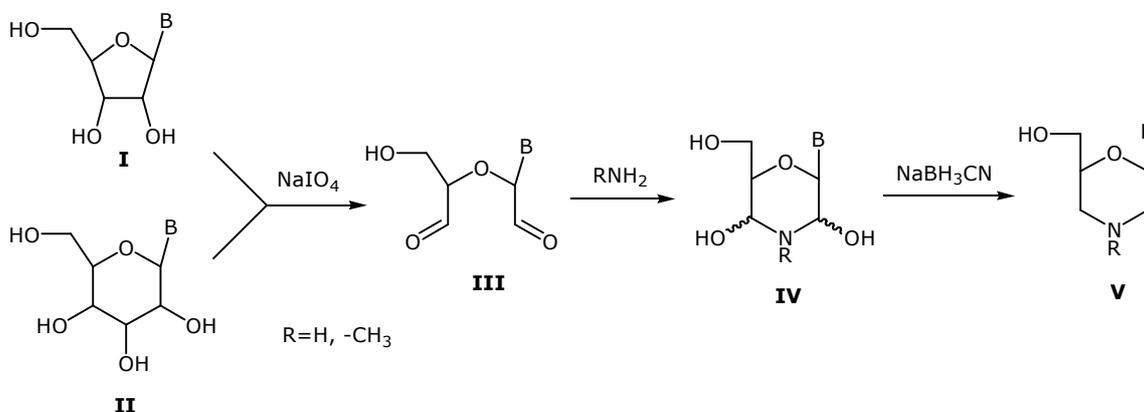


A continuación se describe la síntesis del dímero **12** utilizando la metodología de síntesis que emplea el reactivo de Sanger en la formación de guanidina.

### 5.1. Síntesis de 5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)morfolinouridina, (**10**)

J. X. Khym<sup>102</sup> y posteriormente A. P. Read y D. M. Brown<sup>103</sup> desarrollaron un procedimiento de dos pasos para la preparación de morfolinonucleósidos, que consiste en la rotura oxidativa de un ribonucleósido por reacción con peryodato de sodio y posterior tratamiento del dialdehído resultante con metilamina en condiciones reductoras (Ra-Ni, H<sub>2</sub>), para obtener un derivado *N*4-metilmorfolina (**Fig. 1.14**).

**Figura 1.14 Preparación de morfolinonucleósidos**

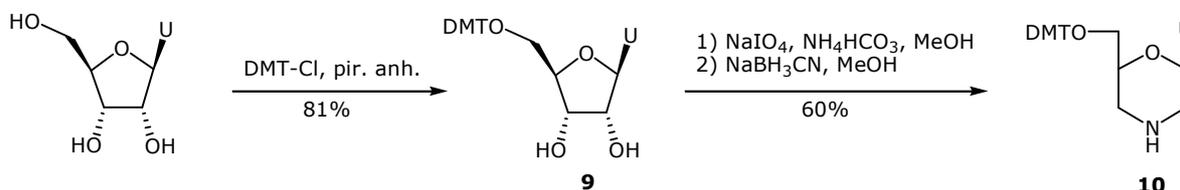


Posteriormente, J. E. Summerton y colaboradores<sup>104</sup> describieron la síntesis de morfolinonucleósidos como intermedios para la preparación de análogos de DNA con enlaces internucleosídicos de tipo fosforoamidato. En este caso, como se requería el nitrógeno del anillo de morfolina sin sustituyentes, se empleó el bborato de amonio como fuente de nitrógeno (**Fig. 1.14**). Inicialmente se eligió este reactivo por sus propiedades amortiguadoras de pH ante la preocupación acerca de la posible epimerización del dialdehído intermedio **III**. Sin embargo, con posterioridad se comprobó que el uso de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> o (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> como fuente de nitrógeno proporcionaba un solo diastereómero del nucleósido morfolino con buen rendimiento. Los morfolinonucleósidos con nucleobases naturales se pueden obtener a partir de ribonucleósidos de esta manera, pero también se pueden preparar otros derivados a partir de hexopiranósidos que provienen de glucosa o galactosa.<sup>105</sup>

Según la metodología así descrita, la obtención del nucleósido **10** partiendo de uridina tan sólo implicaba dos pasos sintéticos (**Fig.1.15**). La primera etapa consistió en proteger el hidroxilo 5' del ribonucleósido, necesario luego para llevar a cabo la síntesis de oligonucleótidos que incorporan el dímero de guanidina. La protección de este hidroxilo también se podría haber realizado una vez obtenido el dímero, pero si se introduce al principio presenta la ventaja de proporcionar al nucleósido mayor solubilidad en disolventes orgánicos, propiedad que sin duda facilita la purificación por cromatografía en columna. La

protección del hidroxilo 5' de la uridina se llevó a cabo por tratamiento con cloruro de dimetoxitritilo en piridina. Se aisló el ribonucleósido protegido con el grupo dimetoxitritilo con un 81% de rendimiento tras purificación por cromatografía en columna.

**Figura 1.15 Síntesis del monómero morfolinouridina**



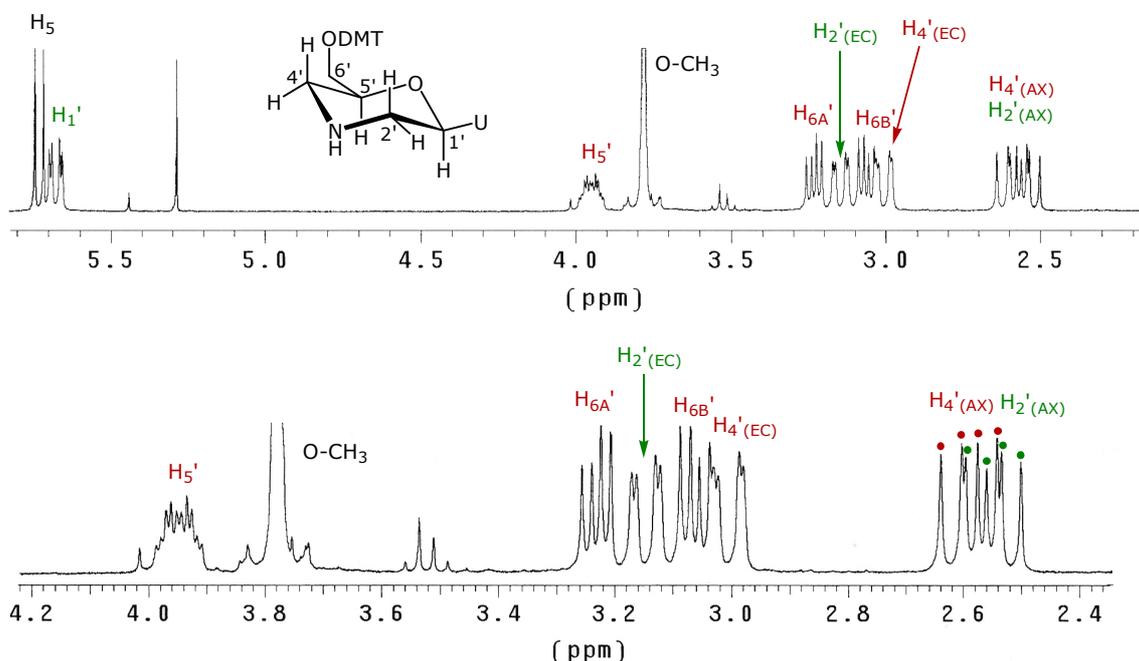
El segundo paso sintético consistió en la transformación del anillo de ribosa del producto **9** en un anillo de morfolina mediante la metodología de dos etapas ya comentada. Basándonos en procedimientos descritos en la literatura,<sup>79,80</sup> se sometió el ribonucleósido protegido a un proceso de rotura oxidativa del diol vecinal seguido de un proceso de aminación reductiva para obtener un producto mayoritario con un 60% de rendimiento después de una purificación por cromatografía en columna. El morfolinonucleósido **10** así obtenido se caracterizó por resonancia magnética nuclear (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) y espectrometría de masas (ES, modo positivo).

Con el espectro monodimensional de RMN <sup>1</sup>H tan sólo se pueden asignar las señales correspondientes al grupo 4,4'-dimetoxitritilometilo (dimetoxitritilo, DMT), las señales de los dos protones aromáticos de la nucleobase y las señales de los protones H<sub>1</sub>' y H<sub>5</sub>' del anillo de morfolina. Por los valores de  $\delta$  y la multiplicidad se puede decir que la señal de  $\delta=5,68$  corresponde a H<sub>1</sub>' y la señal de  $\delta=3,96$  corresponde a H<sub>5</sub>'. Las señales comprendidas entre 3,3 y 2,5 ppm (**Fig. 1.16**) pudieron ser asignadas mediante el espectro bidimensional COSY-<sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H (véase anexo). La **Tabla 1.5** recoge los datos de la zona alifática del espectro de RMN.

La multiplicidad de H<sub>1</sub>' es un doblete de dobletes y está relacionado con los dos protones H<sub>2</sub>' ( $\delta=3,15$  J=2,4 Hz y  $\delta=2,54$  J=9,7 Hz respectivamente), que a su vez están relacionados entre ellos con J=12,1 Hz. El valor de la constante de acoplamiento entre H<sub>1</sub>' y el H<sub>2</sub>' de  $\delta$  más bajo (J=9,7 Hz) sugiere una relación anti entre ambos protones en posiciones axiales. Los valores de  $\delta$  encontrados para H<sub>2</sub>' en posición ecuatorial (H<sub>2'</sub>(<sub>EC</sub>)) y H<sub>2</sub>' en posición axial (H<sub>2'</sub>(<sub>AX</sub>)) concuerdan con la experiencia general de que los protones ecuatoriales están más desapantallados que los axiales.

Teniendo en cuenta que en el nucleósido de partida **9** los protones H<sub>1</sub>' y H<sub>4</sub>' estaban en *cis*, si no se ha producido racemización, estos mismos protones (H<sub>1</sub>' y H<sub>5</sub>' en el producto **10**), deberían mantener la misma disposición. El hecho de que ambos protones estén en posiciones axiales parece sugerir que el anillo de morfolina adopta una conformación tipo silla, en la que los sustituyentes más voluminosos se encuentran en posiciones ecuatoriales, minimizando las repulsiones 1,3-diaxiales.

**Figura 1.16** Asignación de la zona alifática del espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del producto 10. El color verde indica que hay correlación con  $\text{H}_{1'}$  y el rojo que hay correlación con  $\text{H}_{5'}$  en el espectro de COSY- $^1\text{H}, ^1\text{H}$



**Tabla 1.5** Asignación de las señales de la zona alifática del espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del producto 10

H	$\delta$ (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
$\text{H}_5$	5,77	d	7,6
$\text{H}_{1'}$	5,68	dd	9,7 y 2,4
$\text{H}_{5'}$	3,96	m	----
O- $\text{CH}_3$	3,78	s	----
$\text{H}_{6\text{A}'}$	3,24	dd	9,5 y 4,9
$\text{H}_{2'(\text{EC})}$	3,15	dd	12,1 y 2,4
$\text{H}_{6\text{B}'}$	3,07	dd	9,5 y 5,1
$\text{H}_{4'(\text{EC})}$	3,01	dd	12,7 y 2,3
$\text{H}_{4'(\text{AX})}$	2,58	dd	12,7 y 10,7
$\text{H}_{2'(\text{AX})}$	2,54	dd	12,1 y 9,7

En el espectro bidimensional se observa que el multiplete correspondiente a  $\text{H}_{5'}$  está acoplado con cuatro protones, agrupados a su vez en parejas. Esto se corresponde con los dos  $\text{H}_{4'}$  y los dos  $\text{H}_{6'}$ . Los protones de  $\delta=3,01$  y  $\delta=2,58$  están relacionadas entre sí con  $J=12,7$  Hz y con  $\text{H}_{5'}$  con  $J=2,3$  Hz y  $10,7$  respectivamente. El valor de esta última constante de acoplamiento se corresponde con protones en anti, lo cual confirma la disposición axial de  $\text{H}_{5'}$  y permite asignar la anterior pareja de protones a  $\text{H}_{4'}$  en posición ecuatorial ( $\text{H}_{4'(\text{EC})}$ ) y axial ( $\text{H}_{4'(\text{AX})}$ ), respectivamente. Los protones  $\text{H}_{6'(\text{A})}$  ( $\delta=3,24$ ) y  $\text{H}_{6'(\text{B})}$  ( $\delta=3,07$ ) están relacionados entre sí con  $J=9,5$  Hz y con  $\text{H}_{5'}$  con  $J=4,9$  y  $5,1$  Hz respectivamente. Por el valor

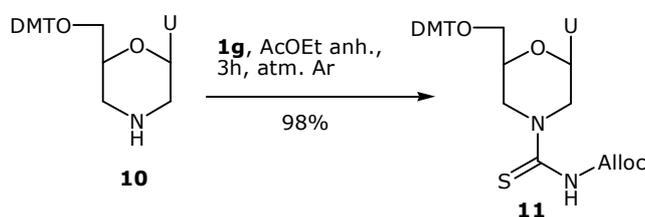
de las constantes de acoplamiento se puede deducir que ambos protones están en una disposición *gauche* respecto a H<sub>5'</sub>.

De todo ello se deduce que el derivado **10** mantiene la disposición *cis* de los protones H<sub>1'</sub> y H<sub>5'</sub>, y que por tanto, no se ha producido racemización durante la transformación del anillo de ribosa a morfolina, manteniéndose la configuración de los carbonos C<sub>1'</sub> y C<sub>4'</sub> del anillo de ribosa. Además, los datos experimentales son compatibles con una estructura tipo silla del anillo de morfolina.

## **5. 2 Síntesis de N-aliloxicarbonil-[6-(4,4'-dimetoxitritil)morfolinouridinil]-carbotioamida, (11)**

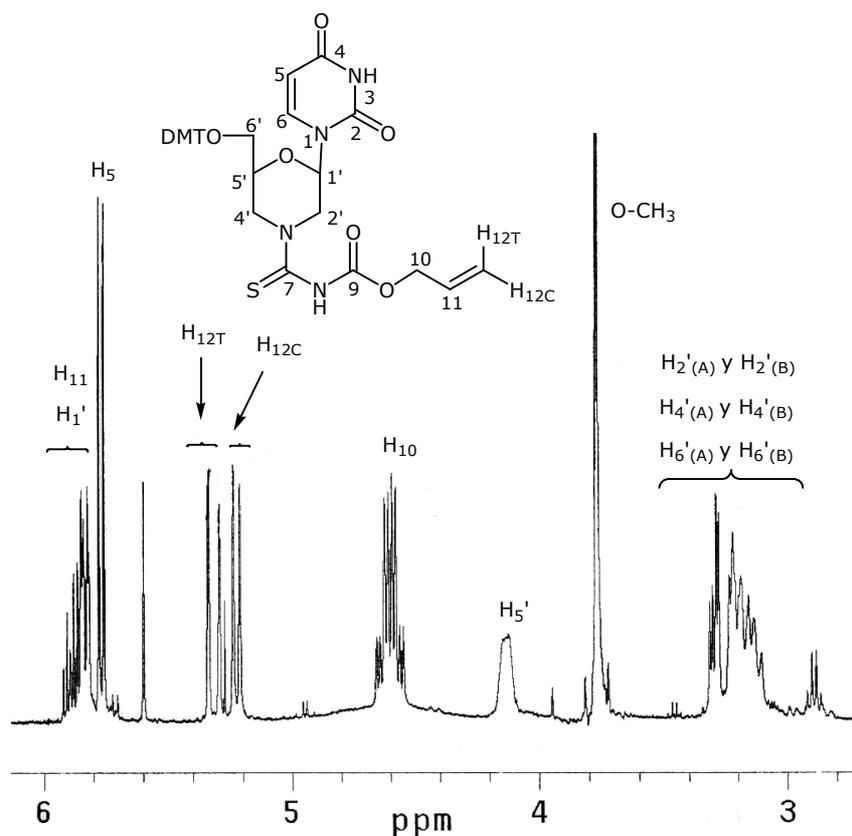
Para la obtención de la tiourea **11** se ha seguido un procedimiento *one-pot* de dos etapas (**Fig.1.17**). En lugar de preparar y procesar el isotiocianato **1g** tal y como se describió en la preparación del derivado tiourea **2g** (apartado 3.1), en este caso no se aisló y se hizo reaccionar directamente con morfolinouridina **10**. El isotiocianato de aliloxicarbonilo mostró ser un producto poco estable y muy sensible a la humedad, por lo que el utilizarlo inmediatamente después de ser preparado debería mejorar el rendimiento de obtención de la tiourea sin tener que añadir un exceso de reactivo. De este modo, después de hacer reaccionar tiocianato de potasio y cloruro de aliloxicarbonilo en acetato de etilo anhidro durante 3 horas a T ambiente y bajo atmósfera de argón, se añadió a esta mezcla una solución del nucleósido en acetato de etilo anhidro y con trietilamina por canulación y se dejó reaccionar durante 2 horas más. Pasado este tiempo se detectó un producto único por CCF. Después de purificarlo mediante una simple decantación se aisló **11** con un rendimiento prácticamente cuantitativo (98%). Comparando con el 68% de rendimiento global obtenido en la síntesis de la tiourea **2g**, se puede ver claramente que con este procedimiento *in situ* se obtienen mejores resultados.

**Figura 1.17 Síntesis de la tiourea 11**



El análisis del producto obtenido por resonancia magnética nuclear (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) y espectrometría de masas (ES, modo negativo) confirmó que se trataba de la tiourea **11**. Al comparar el espectro de RMN <sup>1</sup>H de este producto (**Fig. 1.18**) con el del morfolinonucleósido se pueden observar diferencias en las señales del anillo de morfolina. En este caso, las señales de los protones H<sub>2'</sub>, H<sub>4'</sub> y H<sub>6'</sub> aparecen solapadas entre δ=3,29 y δ=3,98 ppm y las señales de H<sub>1'</sub> y H<sub>5'</sub> aparecen a δ ligeramente superiores. Debido al solapamiento de señales no se pudo en este caso asignar el espectro con detalle.

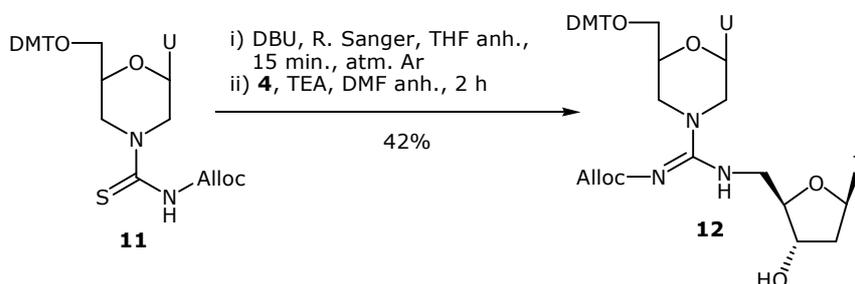
**Figura 1.18** Asignación del espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de la tiourea **11** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



### 5.3 Síntesis de la guanidina dinucleosídica **12**

Para el siguiente paso sintético se siguió un procedimiento similar al descrito en el apartado 3.3.2 (**Fig. 1.19**).

**Figura 1.19** Síntesis de la guanidina **12**



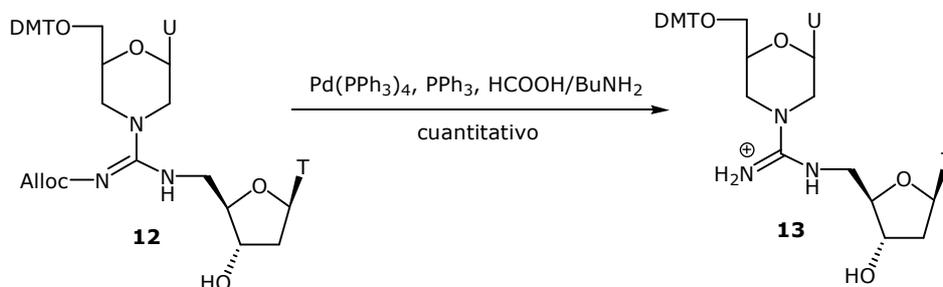
Se preparó una solución de la tiourea **11** en THF anhidro y a continuación en lugar de utilizar  $\text{K}_2\text{CO}_3$  se empleó DBU como base. Una vez añadidos 0,8 equivalentes de reactivo de Sanger el análisis por CCF indicaba que después de 15 minutos se había consumido completamente, y que se había generado un nuevo producto. Sin aislar el intermedio, éste se hizo reaccionar con de 5'-amino-5'-didesoxitimidina en presencia de TEA y disuelta en DMF, al ser el aminonucleósido más soluble en este disolvente. Después de 2 horas de reacción a T

ambiente se había consumido completamente el intermedio de reacción y se había formado un producto mayoritario, el cual se aisló por cromatografía en columna. El análisis del producto obtenido por resonancia magnética nuclear (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) y espectrometría de masas (FAB, modo negativo) confirmó que se trataba de la guanidina **12**. El rendimiento de obtención fue del 42%.

#### 5.4 Ensayo de desprotección de la guanidina **12**

Antes de pasar a sintetizar el intermedio de P(III) (dímero **A**, **Fig.1.3**) a partir del producto **12**, necesario para sintetizar un oligonucleótido y realizar los correspondientes ensayos de incorporación, resultó conveniente comprobar si el grupo aliloxicarbonilo se podía eliminar en las condiciones empleadas con la molécula modelo **5g** (**Fig.1.20**).

**Figura 1.20** Ensayos de desprotección del dímero **12**



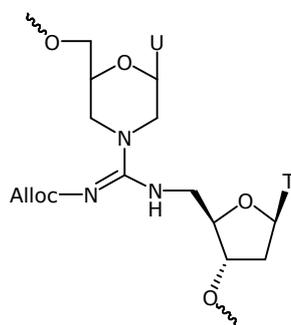
A diferencia del ensayo realizado con la molécula modelo, en este caso, después de 2 horas de reacción a T ambiente únicamente se detectaba por CCF la presencia del producto de partida. Después de añadir 0,05 equivalentes más de  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  y pasados 30 minutos de reacción el producto de partida se había consumido completamente para dar un nuevo producto. Al exponer la CCF empleada para el seguimiento de la reacción a vapores de HCl o bien al calentarla en una estufa a  $55^\circ\text{C}$  durante 5 minutos se observó que la señal del producto formado se teñía de color naranja, lo cual indicaba que el producto contenía el grupo dimetoxitritilo y por tanto, seguramente se trataba del producto de desprotección **13**. En este ensayo se empleó doble cantidad de catalizador que en el ensayo realizado con la molécula modelo porque el catalizador es una sustancia sensible a la humedad, y en las pequeñas cantidades empleadas (alrededor de 2 mg), podría haberse deteriorado parcialmente durante la manipulación.

Para poder comprobar que se trataba del producto de desprotección, se intentó purificar por cromatografía en columna una parte del crudo de reacción, pero el producto obtenido resultó ser tan polar que quedó retenido en la fase estacionaria. Finalmente, el crudo de reacción restante se consiguió purificar por CCF semipreparativa. Mediante el análisis por espectrometría de masas (MALDI-TOF, modo positivo,  $m/z=796,3$ ), se pudo confirmar que el producto aislado se trataba del producto de desprotección.

## **6. Síntesis en fase sólida de un pentámero T(<sup>m</sup>Ug<sub>(Alloc)</sub>T)TC y ensayos de eliminación del grupo aliloxicarbonilo en fase sólida**

Una vez sintetizado el dímero **12** y comprobado que podía eliminarse adecuadamente el grupo Alloc, se procedió a evaluar la idoneidad del producto en la síntesis de oligonucleótidos. Para ello, en primer lugar se transformó en un derivado de P(III) de tipo fosforamidito. Con el objeto de ensayar el acoplamiento en fase sólida del derivado fosforamidito **14**, se ensayó la síntesis del pentámero  $5'T(^mUg_{(Alloc)}T)TC^{3'}$ , donde la unidad  $^mUg_{(Alloc)}T$  es la que se muestra en la **Fig. 1.21**. Finalmente, se realizaron ensayos de eliminación del grupo aliloxicarbonilo en fase sólida.

**Figura 1.21** Unidad  $^mUg_{(Alloc)}T$



### **6.1 Consideraciones preliminares**

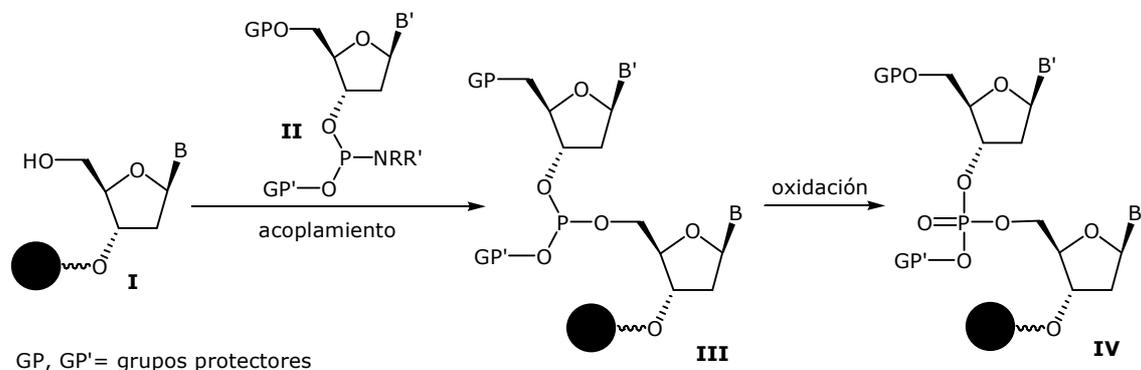
El desarrollo de una metodología eficiente para formar el enlace fosfato internucleosídico fue durante muchos años el principal problema a resolver en la síntesis de oligonucleótidos. Finalmente, se solucionó con el desarrollo del método del fosfitotriéster y en menor medida con el método del *H*-fosfonato (**Fig. 1.22**).<sup>81</sup> En ambos casos se emplea un nucleósido funcionalizado en el extremo 3' en forma de derivado de P(III), fosforamidito en el método del fosfitotriéster e *H*-fosfonato en el método del mismo nombre, y con el hidroxilo 5' convenientemente protegido (**II**), habitualmente con el grupo 4,4'-dimetoxitritilo lábil a tratamientos ácidos suaves.

La etapa de acoplamiento o de formación del enlace internucleosídico consiste en hacer reaccionar el derivado de P(III) con el hidroxilo 5' de un nucleósido, normalmente anclado a un soporte sólido (**I**), dando como resultado un fosfitotriéster (**III**). Después de una etapa de oxidación se obtiene el fosfatotriéster (**IV**).

El desarrollo de los fosforamiditos (**II**) como una nueva clase de intermedios por M. H. Caruthers y S. L. Beaucage<sup>80,106,101</sup> a principios de los años 80 permitió que la síntesis de oligonucleótidos pasara de ser un procedimiento manual o semimanual llevado a cabo por unos pocos especialistas a ser un proceso automatizado. El éxito de esta metodología reside en los elevados rendimientos de acoplamiento que proporciona (>98%). Aunque desde

entonces se ha ensayado una gran variedad de derivados de P(III) en la síntesis automática de oligonucleótidos, habitualmente se emplean derivados diisopropilamino protegidos con el grupo 2-cianoetilo.<sup>81</sup>

**Figura 1.22 Método habitual en la síntesis química de DNA, (método del fosfitotriéster)**



Al inicio del desarrollo de esta metodología se utilizaban clorofosfitos, pero al contrario que los *N,N*-diisopropilfosforamiditos, éstos eran demasiado sensibles a la humedad como para poder ser manipulados en condiciones normales y por tanto, no eran unos candidatos adecuados para su utilización en la síntesis automática. Por el contrario, un fosforamidito es mucho menos reactivo y requiere la protonación del nitrógeno para hacer de él un buen agente fosfitilante. Para ello se utiliza 1*H*-tetrazol, ya que es suficientemente ácido ( $pK_a=4,8$ ) para producir la protonación del grupo amino pero suficientemente suave para no provocar la eliminación prematura del grupo DMT que protege el hidroxilo primario.

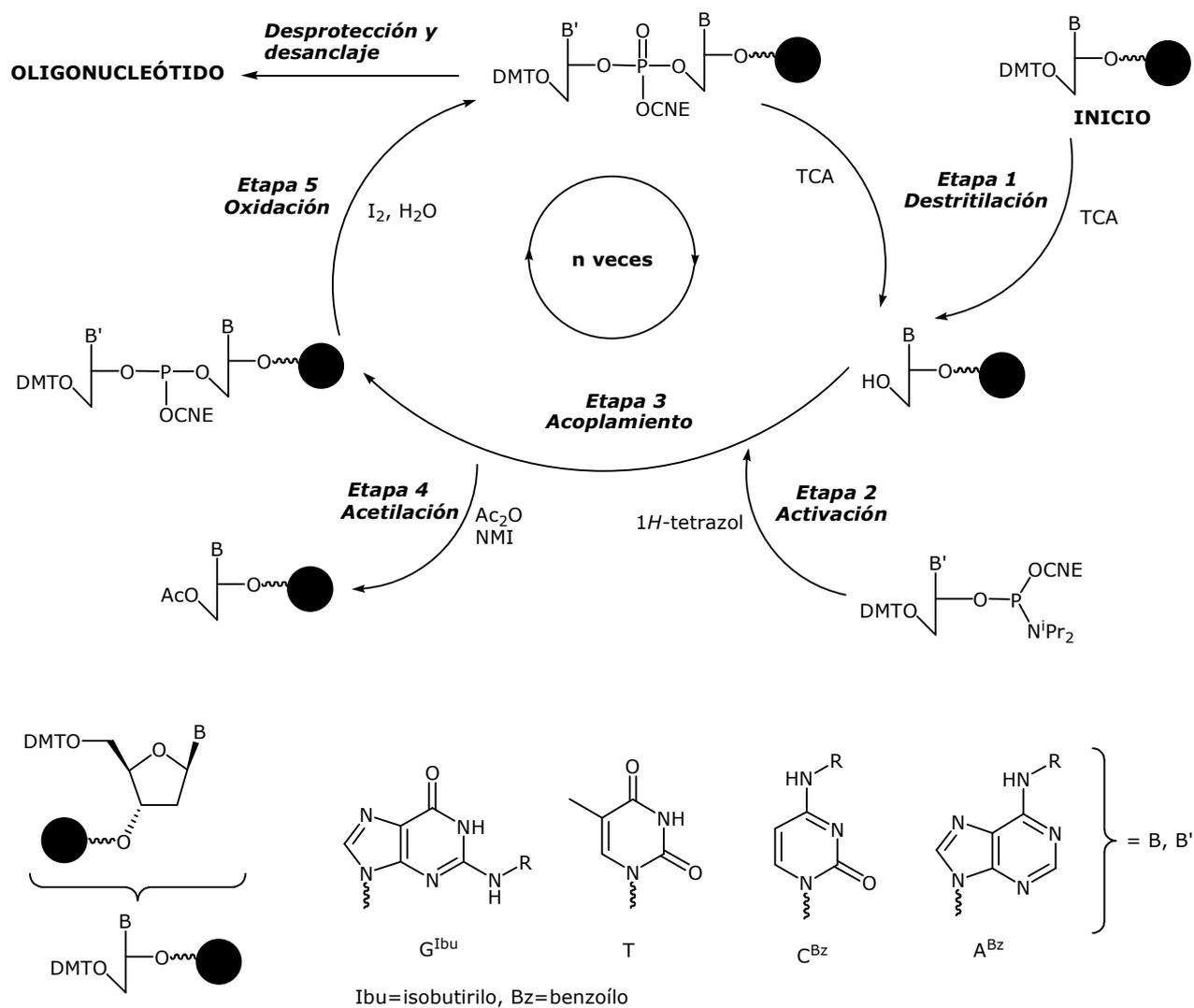
## **6.2 Metodología general de síntesis de oligonucleótidos**

Un oligonucleótido es una cadena de nucleósidos unidos entre ellos por enlaces fosfodiéster entre el extremo 3' de uno y el extremo 5' de otro, tal y como ocurre en los ácidos nucleicos naturales. Recientemente se ha convertido en una práctica habitual utilizar el término de oligonucleótido para referirse a las cadenas de DNA sintéticas.

A diferencia de la síntesis biológica de DNA, la síntesis química habitualmente tiene lugar desde el hidroxilo 3' al hidroxilo 5' (**Fig. 1.23**). Esta estrategia permite aprovechar la mayor reactividad del hidroxilo primario en 5' en las etapas de acoplamiento en que se forma el enlace internucleosídico.

La síntesis automática de oligonucleótidos se lleva a cabo en fase sólida, mediante un ciclo de síntesis en el que se van añadiendo de manera secuencial los nucleósidos de la cadena. Dado que la cadena que está siendo sintetizada se mantiene unida al soporte sólido, la separación de los reactivos en exceso y los disolventes empleados en cada etapa se realiza mediante una simple filtración.

Figura 1.23 Ciclo de síntesis de oligonucleótidos mediante el método del fosfitotriéster

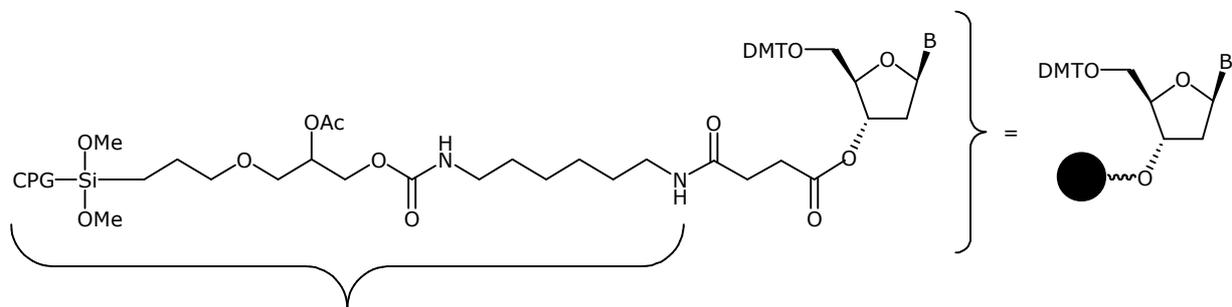


Las bolas de vidrio de poro controlado (CPG, *controlled-pored glass*) son el soporte sólido habitual sobre el que se lleva a cabo la síntesis de oligonucleótidos, ya que presentan las propiedades de ser rígidas, insolubles y con un comportamiento mecánico que no depende del disolvente, permitiendo de este modo una buena accesibilidad y rápida difusión de los reactivos y disolventes a través de la matriz.<sup>81,108</sup> Para asegurar aún más la accesibilidad de los reactivos, las bolas de vidrio se encuentran funcionalizadas con un espaciador, cuyo objetivo es alejar los sitios reactivos de la superficie. La funcionalización de estos soportes oscila entre 10-50 μmol/g, ya que con una funcionalización mayor se pueden producir efectos de impedimento estérico entre las cadenas oligonucleotídicas que se sintetizan.

En la **Fig. 1.24** se muestra el espaciador aminoalquílico (LCAA, *long chain alkylamine*) empleado habitualmente. Tal y como se puede observar en la figura, el primer nucleósido del oligonucleótido a sintetizar se encuentra anclado al soporte sólido, y es de esta manera como se comercializan normalmente. Para llevar a cabo la introducción del primer

nucleósido, se hace reaccionar el grupo amino del soporte sólido con el derivado 3'-O-succinato del nucleósido en presencia de carbodiimidas como agente acoplante.

**Figura 1.24 Soporte sólido utilizado en síntesis de oligonucleótidos**



**LCAA-CPG**=long chain alkylamine controlled-pore glass support

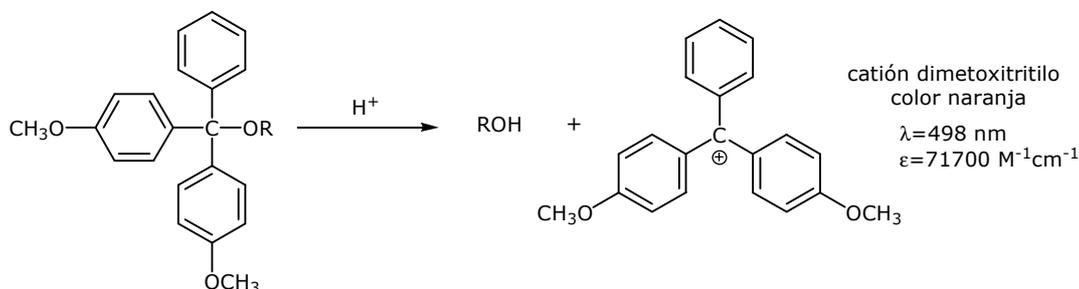
Los ácidos nucleicos son sensibles a un amplio rango de reacciones químicas y se han de emplear condiciones de reacción muy suaves para la síntesis de una cadena oligonucleotídica. Las nucleobases son propensas a sufrir alquilaciones, oxidaciones y reducciones y el enlace fosfodiéster es vulnerable a la hidrólisis. El enlace glicosídico (C1'-N) es lábil a los ácidos, especialmente si la nucleobase es una purina, produciéndose la llamada despurinación. Estas consideraciones limitan el rango de reacciones químicas en la síntesis de oligonucleótidos a tratamientos alcalinos o con ácidos débiles, desplazamientos nucleófilos, reacciones de eliminación catalizadas por bases y algunas reacciones redox poco agresivas (oxidaciones con yodo o peróxidos, eliminaciones reductivas con Zn).<sup>108</sup>

Los principales centros nucleófilos en un 2'-desoxirribonucleósido son los hidroxilos en 5' y 3' y en el caso de dA, dC y dG los grupos amino exocíclicos. Para formar la unión fosfato 3'-5' entre dos 2'-desoxirribonucleósidos, los centros nucleófilos que no intervienen en la formación del grupo fosfato se han de proteger. Tal y como se ha comentado con anterioridad, habitualmente se emplea el grupo 2-cianoetilo como grupo protector de fosfato, y los grupos isobutirilo para proteger G y benzoílo para A y C respectivamente (**Fig. 1.23**). El método estándar que se utiliza para proteger las nucleobases implica en primer lugar hacer reaccionar el nucleósido con cloruro de trimetilsililo para proteger los hidroxilos 3' y 5'. Seguidamente se protege el grupo amino utilizando cloruro de benzoílo o bien anhídrido isobutírico y finalmente se elimina el protector de los grupos hidroxilo.<sup>109</sup> En la **Fig. 1.23** se resumen las diferentes etapas de la síntesis en fase sólida de un oligonucleótido.

**Etapa 1:** Destritilación o eliminación del grupo dimetoxitritilo. El grupo protector utilizado para el hidroxilo 5' de los nucleósidos es el grupo dimetoxitritilo (DMT) (**Fig. 1.25**). La sensibilidad al medio ácido se debe a la estabilidad del catión resultante, estabilizado por el carácter electrodonador de los sustituyentes de los anillos aromáticos.<sup>81</sup> El grupo dimetoxitritilo se elimina por tratamiento con disoluciones diluidas de ácidos como el dicloroacético o tricloroacético en disolventes no acuosos, condiciones que son suficientemente suaves como para evitar la despurinación. Durante la eliminación de este

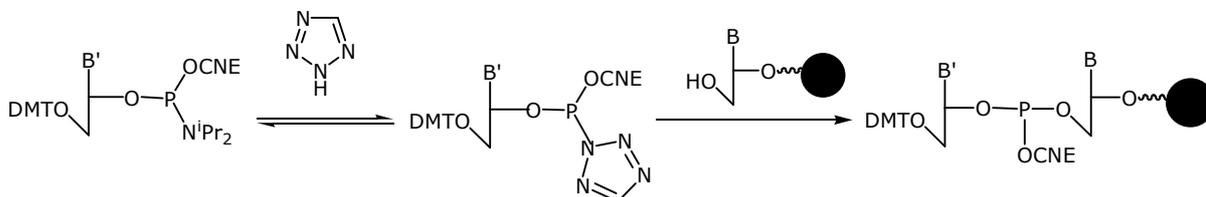
protector se libera el catión dimetoxitritilo, de color naranja, propiedad que es empleada para cuantificar el rendimiento del acoplamiento por UV-Vis.

**Figura 1.25 Eliminación del grupo protector del hidroxilo 5'**



**Etapas 2 y 3:** Activación y acoplamiento del nucleósido fosforamidito. La activación del fosforamidito tiene lugar al mezclar este reactivo con 1*H*-tetrazol en acetonitrilo. El acoplamiento del fosforamidito activado constituye la etapa crucial del ciclo. El mecanismo más aceptado es el que se muestra en la **Fig. 1.26**.<sup>110, 111</sup> En la etapa de activación, el 1*H*-tetrazol protona el fosforamidito y el ión tetrazoluro generado desplaza el ión *N,N*-diisopropilamonio dando lugar a un intermedio reactivo que reacciona rápidamente con el hidroxilo en 5' del nucleósido anclado sobre el soporte sólido.

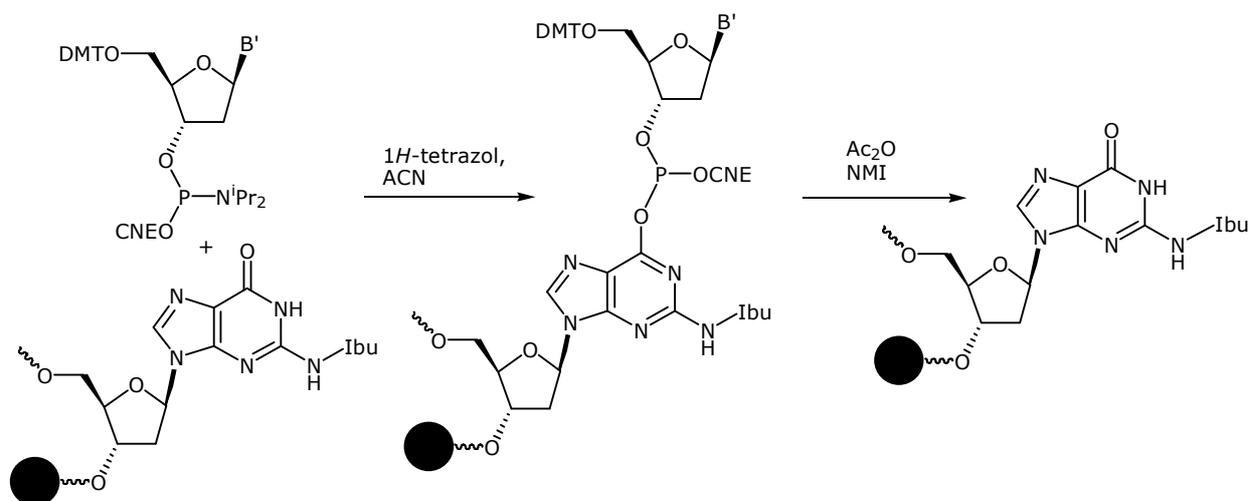
**Figura 1.26 Mecanismo propuesto para la activación con 1*H*-tetrazol**



Con el objeto de aumentar al máximo la eficacia de acoplamiento hasta valores prácticamente cuantitativos, en esta etapa se emplea un elevado exceso de nucleósido fosforamidito con respecto a los grupos hidroxilo sobre la resina (10 equivalentes). De este modo, aunque el 1*H*-tetrazol actúa como catalizador, se añade también un exceso (40 equivalentes) con objeto de incrementar la cinética de la reacción y permitir que el acoplamiento pueda realizarse en tiempos relativamente cortos, habitualmente inferiores a un minuto.

**Etapa 4:** Acetilación. A pesar del elevado rendimiento del acoplamiento, la acetilación de los grupos hidroxilo se lleva a cabo para bloquear las cadenas que por algún motivo no han reaccionado durante la etapa de acoplamiento y de este modo se limita el número de secuencias erróneas. Un beneficio fortuito de esta etapa es que se revierte una reacción secundaria que puede producirse con la guanina durante la etapa de acoplamiento, y es la fosfilitación del O<sub>6</sub> de la guanina (**Fig. 1.27**).

**Figura 1.27 Fosfitilación del O<sub>6</sub> de la guanina**



**Etapa 5:** Oxidación. Finalmente, se lleva a cabo la oxidación del intermedio fosfito a fosfatotriéster por tratamiento con una disolución de yodo acuoso. Dado que en la reacción se genera yoduro de hidrogeno, se suelen utilizar bases como piridina o 2,6-lutidina para neutralizarlo.

El ciclo se va repitiendo hasta obtener el oligonucleótido de longitud y secuencia requeridas. La eliminación de los grupos protectores de las nucleobases y del grupo fosfato así como el desanclaje del oligonucleótido del soporte sólido tiene lugar en una única etapa al realizar un tratamiento con una solución acuosa de amoníaco.

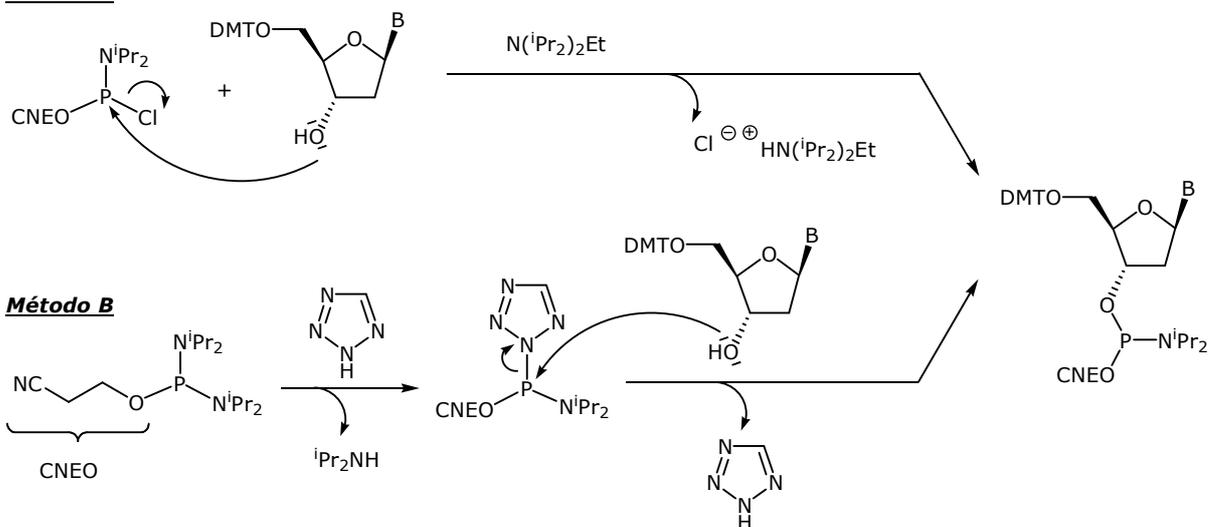
### **6.3 Síntesis del derivado 3'-O-fosforamidito del dinucleósido 12**

Para la obtención de 3'-O-fosforamiditos a partir de 5'-O-DMT-nucleósidos se pueden emplear dos métodos, según sea el agente fosfitilante empleado (**Fig.1.28**).

En la síntesis de este tipo de derivados se utiliza habitualmente como agente fosfitilante 2-cianoetil-cloro-*N,N*-diisopropilaminofosfina (**método A**).<sup>81</sup> Se trata de un agente bastante reactivo capaz de reaccionar directamente con el hidroxilo sin necesidad de ningún activante liberando ácido clorhídrico. Para evitar efectos no deseados como la pérdida del grupo DMT, la rotura del enlace glicosídico o la protonación y posterior hidrólisis del fosforamidito recién formado, la reacción se lleva a cabo en presencia de una base no nucleófila como la trietilamina o la diisopropiletilamina. También se ha de mencionar que se trata de un reactivo inestable a temperatura ambiente y sensible a la humedad.<sup>112</sup>

Figura 1.28 Métodos de síntesis de derivados 3'-fosforamidito

**Método A**



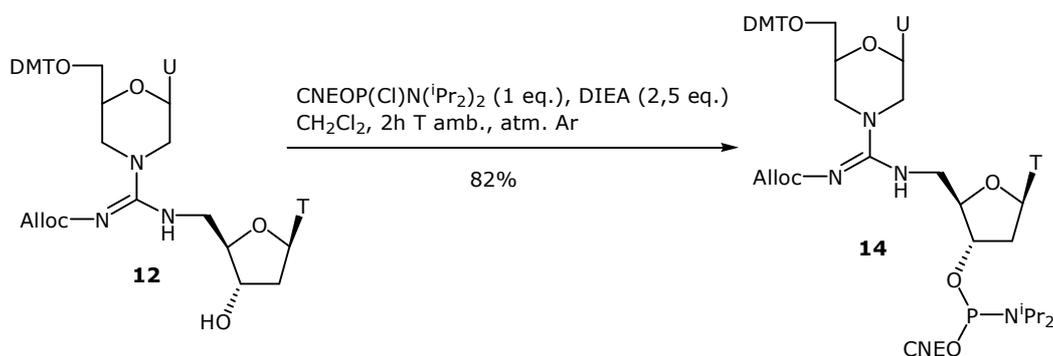
Como alternativa de fosfitilación más suave se ha descrito también el uso como agente fosfitilante del 2-cianoetil-*N,N,N',N'*-tetraisopropilfosforodiamidito (**método B**).<sup>113</sup> Como este agente no es suficientemente reactivo se requiere la presencia de un activante. A escala de laboratorio normalmente se emplea el 1*H*-tetrazol, que es el activante más utilizado debido a los buenos resultados que se obtienen, aunque presenta ciertos problemas. Por ejemplo, si se calienta excesivamente es explosivo, tiene un coste elevado, no es completamente miscible en disolventes orgánicos como ACN o THF y tiene carácter higroscópico.<sup>112</sup> Aunque por el momento no se conoce perfectamente el mecanismo de la reacción, lo más aceptado es que en una primera etapa el 1*H*-tetrazol es suficientemente ácido ( $pK_a=4,9$ ) como para protonar el agente fosfitilante (**Fig. 1.28**). En una segunda etapa la base conjugada del tetrazol desplaza un grupo *N,N*-diisopropilamino para generar un intermedio fosfotetrazólido que reacciona rápidamente con el hidroxilo del 5'-*O*-DMT-nucleósido para formar el derivado fosforamidito.<sup>110,111,114</sup>

Dado que el **método B** presenta la ventaja de emplear un reactivo fosfitilante más estable, se escogió para realizar un primer ensayo de fosfitilación del dímero **12**. Basándonos en metodologías descritas en la literatura,<sup>94,99,110</sup> se hizo reaccionar el producto **12**, en presencia de 1*H*-tetrazol, con 2-cianoetil-*N,N,N',N'*-tetraisopropilfosforodiamidito. Después de 3 horas a T ambiente el análisis por CCF indicaba que el producto de partida era mayoritario, por lo que se añadió más agente fosfitilante y se dejó evolucionar 2 horas más, aunque el exceso de reactivo tampoco produjo una mejora sustancial. Dado el resultado, sobre la mezcla de reacción se decidió añadir 2-cianoetil-cloro-*N,N*-diisopropilaminofosfina (1 equivalente) en presencia de DIEA (2,5 equivalentes) y se dejó evolucionar durante 2 horas a T ambiente. Pasado este tiempo el análisis por CCF indicaba que el producto de partida se había consumido completamente. El producto se aisló con un 65% de rendimiento como una mezcla de diastereómeros después de purificar por cromatografía en columna. El análisis por

RMN  $^{31}\text{P}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 81 MHz) indicaba la presencia de dos señales a  $\delta=149,0$  y  $148,8$  ppm, confirmando que se trataba del producto **14**.

La reacción de fosfitilación se volvió a repetir utilizando este último reactivo desde un inicio (**método A**), (**Fig. 1.29**). Después de 2 horas de reacción a T ambiente generalmente se había consumido todo el reactivo de partida. En este caso se pudo obtener el 3'-O-fosforamidito con un 82% de rendimiento después de una decantación y posterior precipitación sobre hexano a  $-10^\circ\text{C}$  con un grado de pureza aceptable, sin que fuera necesaria una posterior purificación por cromatografía en columna.

**Figura 1.29 Síntesis del derivado 3'-O-fosforamidito del dinucleósido 12**



#### **6.4 Síntesis en fase sólida de un pentámero T(<sup>m</sup>Ug<sub>(Alloc)</sub>T)TC**

Una vez preparado el fosforamidito **14** se pasó a ensayar su incorporación en un fragmento oligonucleotídico, en concreto el pentámero T(<sup>m</sup>Ug<sub>(Alloc)</sub>T)TC. En los diferentes ensayos realizados se evaluó esencialmente el porcentaje de incorporación del dinucleósido **14**, variando el tiempo de reacción y llevando a cabo uno o dos acoplamiento. Los diferentes ensayos y los resultados obtenidos se resumen en la **Tabla 1.6**.

La síntesis de cada uno de los pentámeros se llevó a cabo indistintamente en dos sintetizadores automáticos (*Applied Biosystems 308B* o *PCR-MATE*). Los rendimientos de cada acoplamiento se determinaron midiendo la absorbancia de las disoluciones resultantes de la etapa de eliminación del grupo DMT (véase apartado C.3 de Materiales y Métodos).

En el caso del ensayo 1 la incorporación del fosforamidito **14** se llevó a cabo mediante el procedimiento estándar implementado en el sintetizador, es decir, se realizó el acoplamiento haciendo pasar por la columna que contenía la resina una mezcla 1:1 de las disoluciones de 1*H*-tetrazol y fosforamidito durante 30 segundos. El rendimiento de incorporación fue en este caso del 61%. Lo habitual es que los rendimientos de incorporación de los derivados fosforamidito no modificados sean superiores al 95 %. Con el fin de mejorar el porcentaje de acoplamiento del fosforamidito **14**, se aumentó el tiempo de reacción a 300 segundos (ensayo 2), obteniendo en este caso un 66% de incorporación.

**Tabla 1.6 Ensayos de acoplamiento del fosforamidito 14**

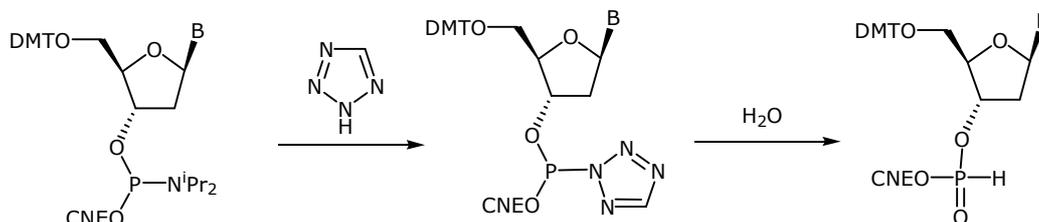
Ensayo	Resina	Activante	nº acopl.	t acopl. (s)	% incorporación
1	PENT(1)	1 <i>H</i> -tetrazol <sup>a</sup>	1	30	61
2	PENT(2)	1 <i>H</i> -tetrazol <sup>a</sup>	1	300	66
3	PENT(3)	1 <i>H</i> -tetrazol <sup>a</sup>	2	30	71
4	PENT(4)	1 <i>H</i> -tetrazol <sup>a</sup>	2	300	78
5	PENT(5)	5-( <i>o</i> -nitrofenil)-1 <i>H</i> -tetrazol <sup>b</sup>	2	300	70
6	PENT(6)	5-etiltio-1 <i>H</i> -tetrazol <sup>a</sup>	2	300	69
7	PENT(7)	Triflato de benzimidazolonio <sup>b</sup>	2	300	77

<sup>a</sup> en ACN, <sup>b</sup> en THF. Todas las soluciones de activante son 0,4 M.

En los ensayos 3 y 4 se optó por realizar un doble acoplamiento para intentar mejorar la incorporación del dímero. Tras el primer acoplamiento, se introdujo en el ciclo de síntesis una etapa de vaciado y lavado de columna, para después llevar a cabo un segundo acoplamiento, tras el cual se continuó con el ciclo habitual. Aunque los rendimientos de incorporación fueron ligeramente mejores (71-78%), no se alcanzaron los valores considerados óptimos para llevar a cabo una síntesis habitual.

Como posibles razones de la baja incorporación del dinucleósido fosforamidito se pueden barajar dos, probablemente relacionadas entre sí. Por un lado, el tamaño molecular del dinucleósido que probablemente es origen de efectos estéricos que dificultan la reacción de formación del enlace fosfito. Por otra parte, la baja reactividad del dinucleósido fosforamidito favorece probablemente la reacción de hidrólisis que compite con la de acoplamiento (**Fig. 1.30**).<sup>115</sup>

**Figura 1.30 Hidrólisis de un fosforoamidito activado a H-fosfonato**



En la literatura se ha escrito el uso de otros agentes acoplantes en la síntesis de oligonucleótidos alternativos al 1*H*-tetrazol.<sup>81,111</sup> Por ejemplo, se han empleado derivados del 1*H*-tetrazol como 5-(*o*-nitrofenil)-1*H*-tetrazol,<sup>116</sup> 5-etiltio-1*H*-tetrazol<sup>117</sup> y también derivados de benzimidazol como triflato de benzimidazolonio<sup>118</sup> con buenos resultados. Para tratar de mejorar el porcentaje de incorporación de fosforamidito **14** sobre resina se ensayó el acoplamiento con cada uno de estos reactivos.

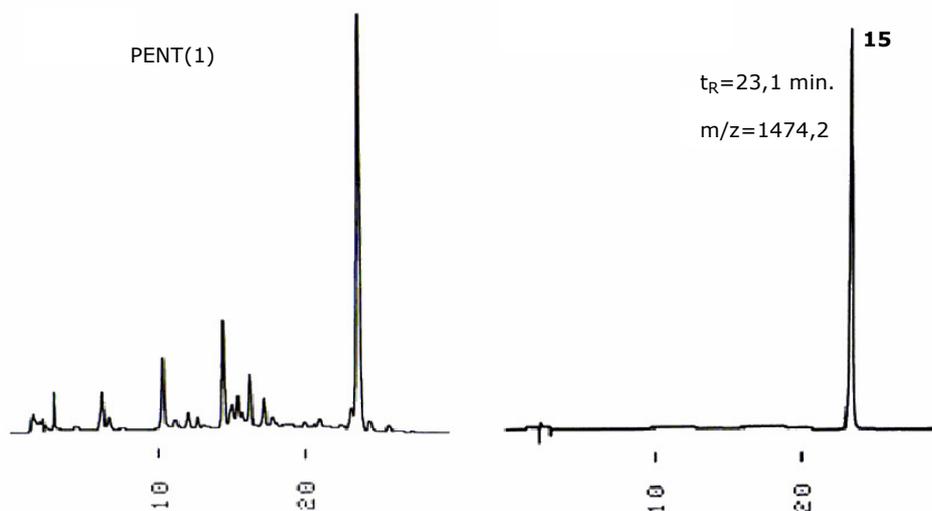
Para llevar a cabo estos experimentos, se empleó 5-(*o*-nitrofenil)-1*H*-tetrazol según un procedimiento descrito<sup>116</sup>, el 5-etiltio-1*H*-tetrazol era un reactivo de origen comercial y el triflato de benzimidazolonio se obtuvo mezclando benzimidazol y ácido trifluorometansulfónico 1:1<sup>118</sup>. Sin embargo, los ensayos realizados empleando estos reactivos (ensayos 5, 6 y 7 respectivamente) no mejoraron los resultados ya obtenidos empleando 1*H*-tetrazol.

Aunque los resultados distaban de ser plenamente satisfactorios, se quiso evaluar la idoneidad de la estrategia sintética analizando los oligonucleótidos obtenidos en los ensayos. Para ello, las resinas así sintetizadas se sometieron a las etapas de desprotección y desanclaje para luego, una vez liberado el producto de la resina, ser convenientemente analizado por cromatografía líquida.

### **6.5 Ensayos de desprotección y caracterización de T(<sup>m</sup>UgT)TC**

Antes de pasar a realizar pruebas de eliminación del grupo aliloxicarbonilo en fase sólida, resultó conveniente aislar y caracterizar el pentámero T(<sup>m</sup>Ug<sub>(Alloc)</sub>T)TC (**15**). Para ello, se trató la resina PENT(1) (véase **Tabla 1.6**) con amoníaco acuoso concentrado a 55°C durante 6 horas para desanclar el producto del soporte sólido y eliminar el grupo protector de la citosina. Tras eliminar el amoníaco y liofilizar, la muestra se redisolvió en agua y se analizó por HPLC (**Fig. 1.31**).

**Figura 1.31** Cromatogramas de HPLC de PENT(1) y T(<sup>m</sup>Ug<sub>(Alloc)</sub>T)TC, (A: AcONH<sub>4</sub> 0,01 M, B: H<sub>2</sub>O/ACN 1:1, 5-30% de B en 30 min.



El cromatograma muestra un producto mayoritario acompañado de otros productos minoritarios. Los oligonucleótidos sintetizados sobre un soporte sólido suelen presentar subproductos cuando los acoplamientos no son cuantitativos, ya que se van generando secuencias truncadas. También es posible que, si las etapas de acetilación no han sido suficientemente efectivas, se produzcan secuencias con deleciones. El producto mayoritario

se aisló con un tiempo de retención de 23,1 min., que resultó ser el oligonucleótido **15** según el análisis por espectrometría de masas. Para calcular el rendimiento, se cuantificó la disolución obtenida según se indica en el apartado C.4 de la sección de Materiales y Métodos, resultando ser del 41%.

Para la eliminación del grupo aliloxicarbonilo en primer lugar se realizó un ensayo sobre la resina PENT(4) (**Tabla 1.7**, ensayo 1) utilizando una solución de Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> y ácido fórmico/butilamina 1:1, que fue el capturador del complejo π-alilo utilizado previamente en los ensayos en solución con la molécula modelo **5g** y con el producto **12**. Basándonos en metodologías descritas en la literatura,<sup>100,101</sup> se trató la resina PENT(4) en las condiciones indicadas en la **Tabla 1.7**. Tras el tratamiento se lavó la resina con una solución de dietilditiocarbamato de sodio. Este lavado se realiza para eliminar la contaminación por paladio del oligonucleótido.<sup>100</sup> Los mismos autores señalan que, aunque la solución es ligeramente básica (pH=9,7), no se produce un desanclaje significativo de los oligonucleótidos.

**Tabla 1.7 Ensayos de eliminación del grupo Alloc**

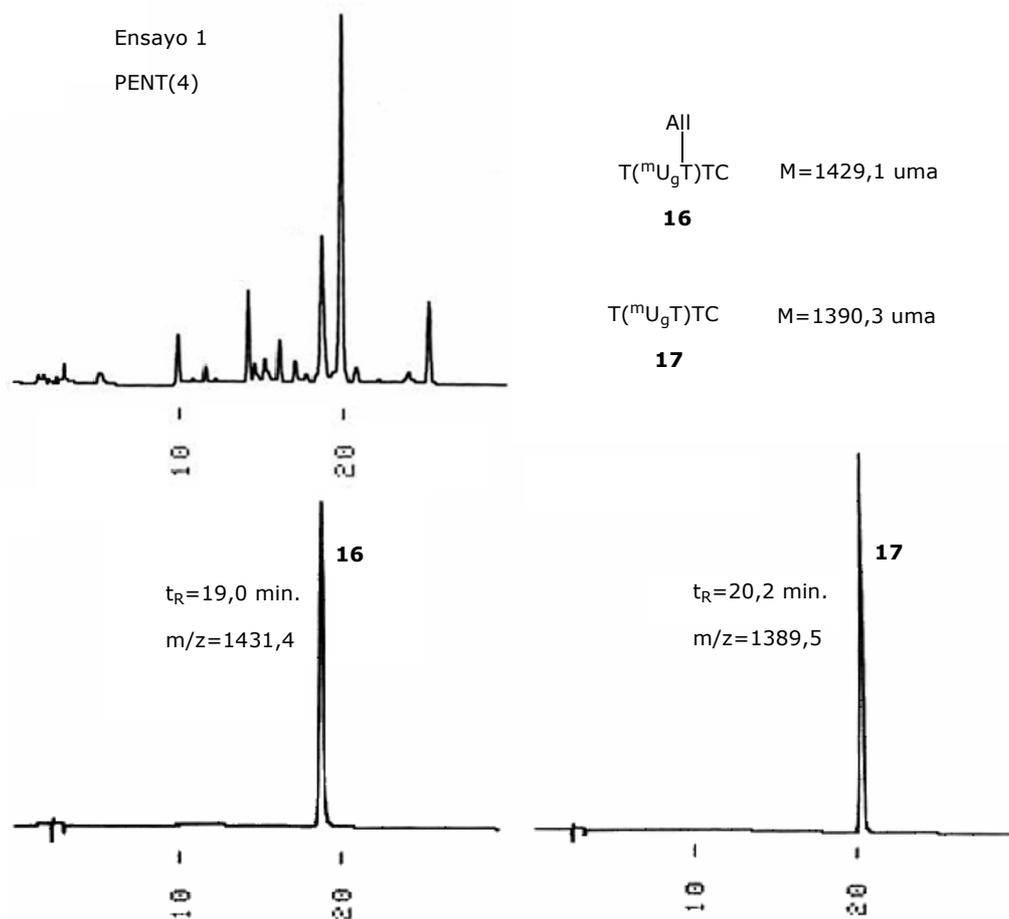
Ensayo	Resina*	Condiciones	17/16	Rdto. 17
1	PENT(4)	(A) HCOOH/BuNH <sub>2</sub> 1:1 0,13 M, PPh <sub>3</sub> 0,02 M, Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> 2X10 <sup>-3</sup> M, 1h T=55°C	1:0,49	40%
2	PENT(2)	(B) PhSiH <sub>3</sub> 0,05 M, 5 min., Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> 5X10 <sup>-3</sup> M, (10 min. T amb.)X2	1:0,57	33%
3	PENT(3)	(C) Me <sub>2</sub> NH.BH <sub>3</sub> 0,05 M, 5 min., Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> , 5X10 <sup>-3</sup> M, (10min. T amb.)X2	1:0,75	32%

\* se describió la síntesis de las resinas PENT(2-4) en el apartado 6.4 (véase **Tabla 1.6**)

En todos los ensayos, una vez realizado el tratamiento de eliminación del grupo Alloc, se procedió al desanclaje y eliminación de los grupos protectores de las nucleobases con amoniaco acuoso concentrado a 55°C durante 6 horas. El análisis por HPLC del ensayo 1 reveló que la eliminación del grupo aliloxicarbonilo había sido completa ya que no se observaban trazas del oligonucleótido **15**. Sin embargo, el crudo mostraba la presencia de un producto mayoritario a t<sub>R</sub>=20,2 min. y otro en menor proporción a t<sub>R</sub>=19,0 min. (**Fig. 1.32**). La proporción de cada uno de ellos se calculó a partir de las áreas de los cromatogramas de HPLC.

El análisis por espectrometría de masas (MALDI-TOF, modo negativo) indicó que el producto de t<sub>R</sub>=20,2 min. correspondía al producto de desprotección (producto **17**), mientras que el producto con menor t<sub>R</sub> correspondía a un subproducto formado durante la eliminación del grupo aliloxicarbonilo. La masa de este producto al ser 41 unidades superior a la del producto **17** hace suponer que se trataba del producto de alilación del grupo guanidino.

**Figura 1.32** Cromatogramas de HPLC del ensayo 1 (Tabla 1.7) y de los productos **16** y **17** purificados. (A:  $\text{AcONH}_4$  0,01 M, B:  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$  1:1, 5-30% de B en 30 min.

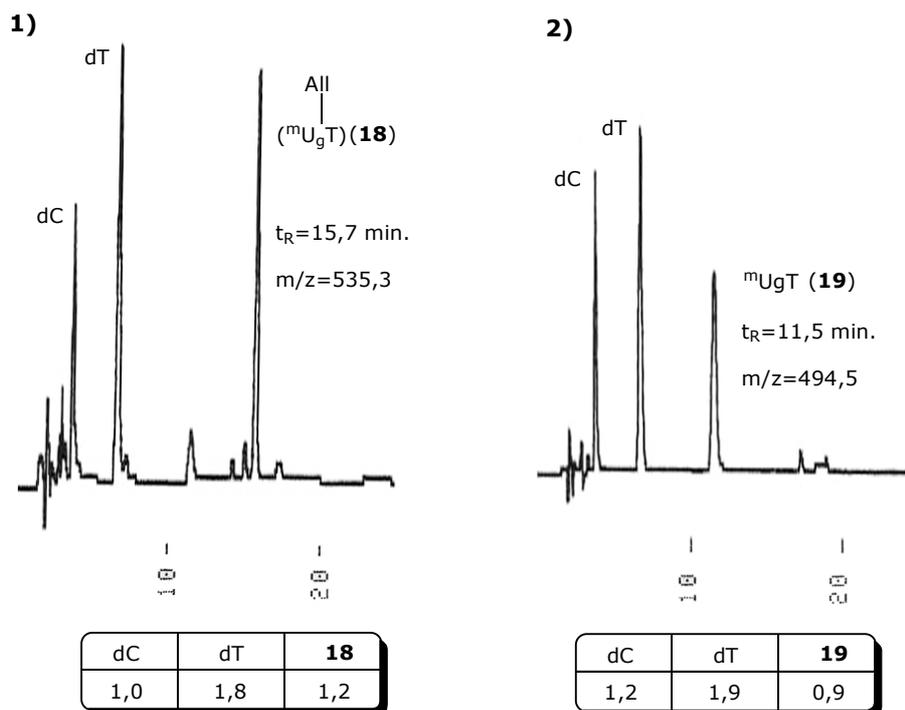


Puesto que en la literatura se ha descrito la formación de alilaminas durante la desprotección de alilcarbamatos catalizada por paladio,<sup>97</sup> de manera análoga podría haberse formado la alilguanidina **16** como producto secundario de la desprotección de la guanidina.

En síntesis de péptidos se ha descrito el uso de reactivos como el feniltrihidrosilano<sup>119</sup> y complejos de amino-borano<sup>120,121</sup> como capturadores del complejo  $\pi$ -alilo que minimizan en gran medida la formación de alilaminas. De este modo, se realizaron dos nuevos ensayos de eliminación sobre las resinas PENT(2) y PENT(3) utilizando  $\text{PhSiH}_3$  y  $\text{Me}_2\text{NH}\cdot\text{BH}_3$  como capturadores respectivamente, pero al analizar los crudos no se observaba una mejora de los resultados ya obtenidos. La **Tabla 1.7** recoge la proporción del subproducto de alilación respecto al producto completamente desprotegido en los crudos de reacción y el rendimiento global de obtención del pentámero **17**.

Para acabar de confirmar que el producto **16** era el producto de alilación del grupo guanidino y el producto **17** era el producto esperado, se realizó el análisis de nucleósidos de cada uno de los productos según se indica en la sección C.5 de Materiales y Métodos. En la **Fig. 1.33** se muestra el análisis por HPLC realizado en cada caso.

**Figura 1.33 1) Cromatograma de HPLC del análisis de nucleósidos del producto 16 y 2) del producto 17. (A: AcONH<sub>4</sub> 0,01 M, B: H<sub>2</sub>O/ACN 1:1, 10% de B 5 min., 10-25% de B en 15 min., 25-100% de B en 5 min.)**

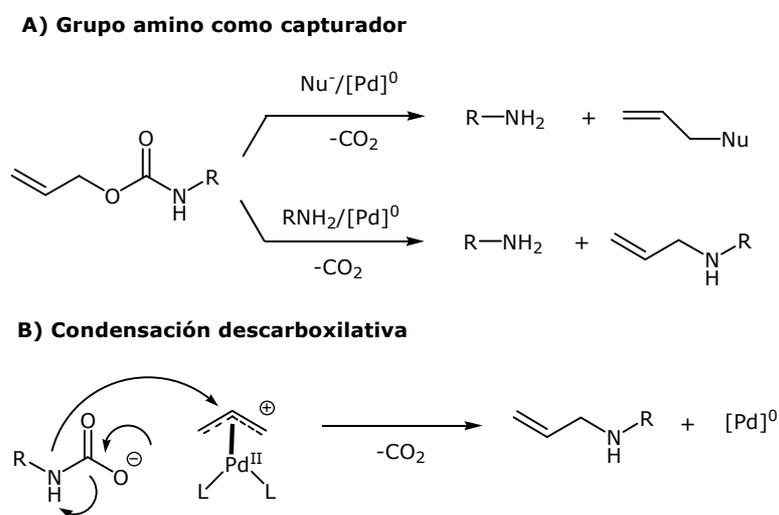


En el análisis del producto **16** se detectó la presencia de dC, dT y un nuevo producto con  $t_R=15,7$  minutos. Tras aislar este último producto por cromatografía líquida, el análisis por espectrometría de masas (MALDI-TOF, modo positivo) indicó que se trataba del dinucleósido alilado **18**. Al analizar el producto **17** por HPLC también se detectó la presencia de dC y dT y un nuevo producto con  $t_R=11,5$  minutos, que, tras analizarlo por espectrometría de masas (MALDI-TOF, modo positivo), resultó ser el dinucleósido de morfolinouridina y timidina **19**. Las proporciones de cada producto se indican en la **Fig. 1.33**, y se han calculado según se indica en el apartado C.5 de la sección de Materiales y Métodos. Tanto para el producto **18** como para el **19** se ha asumido que el valor del coeficiente de extinción molar era  $18,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Por tanto, con el análisis de nucleósidos se confirmó que en las condiciones ensayadas tenía lugar una reacción secundaria de alilación sobre el grupo guanidino.

## 6.6 Formación de alilaminas durante la desprotección de alilcarbamatos

La reacción secundaria de formación de alilaminas durante la desprotección de alilcarbamatos catalizada por paladio puede tener lugar mediante diferentes mecanismos.<sup>97</sup> En primer lugar, el grupo amino que se va generando durante la desprotección puede competir con el captador del complejo  $\pi$ -alilo dando lugar a alilaminas (**Fig. 1.34, A**). Por tanto, en este caso es aconsejable emplear sistemas de desprotección que conduzcan a aminas protonadas, enmascarar el grupo amino dando lugar a una especie no nucleófila, o bien utilizar un gran exceso de captador del complejo  $\pi$ -alilo.

**Figura 1.34 Formación de alilaminas en la desprotección de alilcarbamatos**



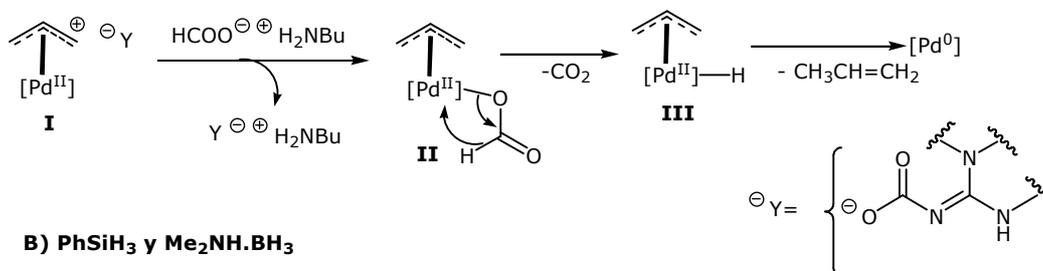
Por otra parte, se sabe que los alilcarbamatos en presencia de cantidades catalíticas de complejos de Pd y sin ningún captador en el medio de reacción pueden experimentar descarboxilación para dar lugar a alilaminas. La conversión de un derivado alilcarbamato a *N*-alilamina implica una condensación con pérdida de  $\text{CO}_2$  entre el complejo  $\pi$ -alilo y el contraión carbamato que se ha generado en la etapa de adición oxidativa (**Fig. 1.34, B**). La cinética del proceso depende de la naturaleza de la amina, siendo generalmente más rápido para aminas secundarias que para aminas primarias.

El captador utilizado en el ensayo realizado sobre la resina PENT(4) era el ácido fórmico, que actúa como un donador de hidruro. El mecanismo más aceptado en este caso (**Fig. 1.35, A**) implica la formación de un complejo de paladio formiloxi- $\pi$ -alilo **II** por intercambio de ligandos del complejo  $\gamma$ - $\pi$ -alilo inicial **I**. Este complejo experimenta descarboxilación para dar un complejo hidruro- $\pi$ -alilo **III** el cual descompone para dar propeno y el complejo de paladio inicial mediante eliminación reductiva.<sup>97</sup> Como en nuestro caso se empleó un exceso elevado de captador (150 eq.), no es probable que el grupo guanidino compita en la captura del complejo  $\pi$ -alilo por su mayor carácter nucleófilo. Una posible explicación para la formación del subproducto de alilación es que la captura del

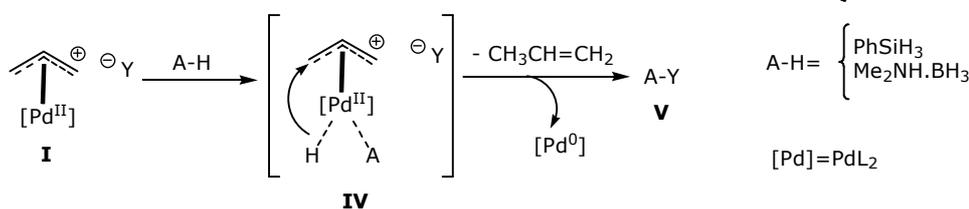
complejo  $\pi$ -alilo por parte del formiato no sea lo suficientemente rápida como para evitar la condensación descarboxilativa que se ilustra en la **Fig. 1.34**.

**Figura 1.35 Eliminación de Alloc catalizada por Pd con donadores de hidruro como capturadores**

**A) HCOOH/BuNH<sub>2</sub>**



**B) PhSiH<sub>3</sub> y Me<sub>2</sub>NH·BH<sub>3</sub>**



En los ensayos llevados a cabo sobre PENT(2) y PENT(3) se han utilizado como capturadores PhSiH<sub>3</sub> y Me<sub>2</sub>NH·BH<sub>3</sub> (véase **Tabla 1.7**). La captura del complejo Y- $\pi$ -alilo inicial posiblemente transcurre según un proceso de adición oxidativa sobre el paladio para generar un complejo hidruro- $\pi$ -alilo **IV**. Este intermedio descompone para dar propeno y regenerar el complejo tipo PdL<sub>2</sub> inicial. En la desprotección del grupo amino se describe<sup>119-121</sup> que no se obtiene directamente la amina libre, sino que se obtienen derivados silil- o boro-carbamatos según sea el caso, los cuales en presencia de agua experimentan hidrólisis y pérdida de CO<sub>2</sub> para dar la amina. Probablemente, por analogía al grupo amino, seguramente tampoco se obtiene directamente el grupo guanidino, sino los derivados silil- o boro-carbamatos **V** (**Fig. 1.35, B**).

En los dos ensayos sobre PENT(2) y PENT(3) (véase **Tabla 1.7**) se empleó un exceso de capturador (40 eq), por lo que es posible que no se libere directamente el grupo guanidino y se descarta que éste compita en la captura del complejo  $\pi$ -alilo. Igual que en el ensayo realizado sobre PENT(4), la explicación más razonable vuelve a ser que la captura del complejo  $\pi$ -alilo no sea suficientemente rápida como para evitar la condensación descarboxilativa por el mayor carácter nucleófilo del grupo guanidino. En experimentos posteriores (véase apartado 4.2, capítulo 2) se pudo comprobar que empleando una concentración mayor de capturador la reacción secundaria disminuía considerablemente hasta prácticamente desaparecer.

## **7. Resumen de los resultados obtenidos**

En el capítulo que aquí se resume, se ha ensayado la síntesis de un derivado morfolinocarbonimidoinucleósido como modelo de un dímero con unión guanidina con el objetivo de desarrollar una metodología adecuada que permita sintetizar oligonucleótidos en los que se alternen las unidades de morfolino-amidina y 3'-ribosil-fosfato. Para sintetizar esta molécula se ha escogido una ruta sintética en la que se emplean como precursores una tiourea y una amina. Según este esquema se ensayaron diversos reactivos que convierten la tiourea en una especie electrófila en el propio medio de reacción o bien en intermedios aislables como ácidos sulfónicos o isotiureas. De todos los reactivos ensayados tan sólo se consiguió obtener el grupo guanidino utilizando 1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno, el cual transformaba la tiourea en una especie intermedia aislable.

Dado que la presencia de un grupo guanidino podría interferir en las reacciones de fosfitilación y de síntesis de oligonucleótidos, se hizo un estudio de diferentes grupos protectores. Se ha conseguido sintetizar la guanidina modelo con los siguientes grupos protectores: benzoílo, *p*-nitrobenzoílo, *p*-bromobenzoílo, 2,5-difluorobenzoílo, fenoxiacetilo y aliloxicarbonilo. De todos ellos, tan sólo el grupo aliloxicarbonilo se pudo eliminar en condiciones compatibles con la síntesis de oligonucleótidos. En los ensayos de desprotección realizados con los demás derivados los resultados se pueden resumir de la siguiente forma: i) no se observó eliminación del grupo protector (derivados con el grupo benzoílo y *p*-bromobenzoílo), ii) había eliminación parcial del grupo protector (derivados con el grupo protector *p*-nitrobenzoílo, 2,5-difluorobenzoílo y fenoxiacetilo), o bien había descomposición del producto en las condiciones ensayadas (fenoxiacetilo).

Una vez se dispuso de un grupo protector adecuado, se ensayó la síntesis del dímero morfolinouridina y timidina con unión guanidino **12**. Se escogió la timidina como precursor del aminonucleósido y la uridina como precursor del morfolinonucleósido porque ambas nucleobases no precisan de grupo protector, lo cual simplifica el estudio. La metodología adecuada para obtener un morfolinonucleósido a partir de un ribonucleósido se encuentra ampliamente descrita en la literatura. Para sintetizar este producto se ha seguido el mismo procedimiento utilizado para la síntesis del modelo de guanidina. Se ha de comentar que la metodología de síntesis debe ser optimizada, ya que el rendimiento obtenido en la etapa de formación del enlace guanidino se sitúa en el mejor de los casos alrededor del 40%.

Con el objeto de evaluar su posible aplicación a la síntesis en fase sólida de oligonucleótidos, se preparó el fosforamidito correspondiente y se sintetizó el pentámero T(<sup>m</sup>Ug<sub>(Alloc)</sub>T)TC. La síntesis del producto se llevó a cabo en un sintetizador de oligonucleótidos según la metodología habitual descrita en la bibliografía. Se realizaron diversos ensayos variando el tiempo de reacción y el número de acoplamientos realizados, pero el rendimiento del acoplamiento del fosforamidito derivado del dímero de guanidina no superó el 78% en el mejor de los casos.

La desprotección y el desanclaje del oligonucleótido se llevaron a cabo en dos etapas. En la primera de ellas, se eliminó el grupo aliloxycarbonilo mediante catálisis de paladio. En la segunda etapa se eliminaron el resto de grupos protectores y se desancló el producto de resina por tratamiento con amoniaco acuoso concentrado en caliente. Los ensayos de desprotección de los pentámeros sobre resina no fueron del todo satisfactorios, ya que se detectó entre otros un subproducto cuya formación era debida a la alilación del grupo guanidino.

Por los resultados obtenidos se concluye que, a pesar de los esfuerzos realizados, la metodología aquí ensayada para obtener oligonucleótidos con subunidades morfolino-amidina dista aún de ser satisfactoria. Los dos principales problemas observados, los bajos rendimientos de incorporación de la unidad dinucleosídica en una cadena oligonucleotídica y una vez concluida la síntesis, las reacciones secundarias en la etapa de eliminación del grupo protector de guanidina, limitan enormemente la obtención de este tipo de oligonucleótidos modificados. Entre las posibles soluciones, se optó por evaluar una metodología sintética alternativa para sintetizar este tipo de oligonucleótidos modificados, que no precisa de la preparación previa de la unidad dinucleosídica y que permite formar los enlaces guanidino en fase sólida. Los resultados obtenidos se resumen en el próximo capítulo de esta memoria.

## **8. Bibliografía**

- (1) Yamamoto, T.; Hori, M.; Watanabe, I.; Harada, K.; *Chem. Pharm. Bull.*, 48, 843-849, (2000)
- (2) Chalina, E. G.; Charakova, L.; *Eur. J. Med. Chem.*, 33, 975-983, (1998)
- (3) Ekelund, S.; Nygren, P.; Larsson, R.; *Biochem. Pharmacol.*, 61, 1183-1193, (2001)
- (4) Zepik, H. H.; Benner, S. A.; *J. Org. Chem.*, 64, 8080-8083, (1999)
- (5) Katritzky, A. R.; Khashab, N. M.; Bobrov, S.; *Helvetica Chimica Acta*, 88, 1664-1674 (2005)
- (6) Goodman, M.; Zapf, C.; Rew, Y.; *Biopolymers*, 60, 229-245 (2001)
- (7) *Science of Synthesis: Houben-Weyl Methods of Molecular Transformations*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, (2005)
- (8) Katritzky, A. R.; Taylor, R. K.; *Comprehensive Organic. Functional Group Transformations II*. Vol. 6, Elsevier, Pergamon, Oxford, (2005)
- (9) Sychala, J.; *Synth. Commun.* 27 (11), 1943-1949 (1997)
- (10) Dempcy, R. O.; Almarsson, Ö.; Bruice, T. C.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 7864-7868 (1994)
- (11) Sandin, H.; Swanstein, M.-L.; Wellner, E.; *J. Org. Chem.*, 69, 1571-1580 (2004)
- (12) Lammin, S. G.; Pedgrift, B. L.; Ratcliffe, A. J.; *Tetrahedron Lett.*, 37, 6815-6818 (1996)
- (13) Manimala, J. C.; Anslyn, E. V.; *Tetrahedron Lett.*, 43, 656-667 (2002)
- (14) Manimala, J. C.; Anslyn, E. V.; *Eur. J. Org. Chem.*, 3909-3922 (2002)
- (15) Robinson, S.; Roskamp, E. J.; *Tetrahedron Lett.*; 53, 19, 6697-6705, (1997)
- (16) Estep, K. G.; Neipp, C. E.; Stephens Stramiello, L. M.; Adam, M. D.; Allen, M. P.; Robinson, S.; Roskamp, E.; *J. Org. Chem.*, 63, 5300-5301, (1998)
- (17) Shey, J.-Y.; Sun, CH.-M.; *Synlett*, 1423-1425, (1998)
- (18) Ho, K.-C.; Sun, C.-M.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 9, 1517-1520, (1999)
- (19) Li, M.; Wilson, L. J.; *Tetrahedron Lett.*, 42, 1455-1458, (2001)
- (20) Li, M.; Wilson, L. J.; Portlock, D. E.; *Tetrahedron Lett.*, 42, 2273-2275, (2001)
- (21) Zhang, Z.; Carter, T.; Fan, E.; *Tetrahedron Lett.*, 44, 3063-3066, (2003)
- (22) Poss, M. A.; Iwanowicz, E.; Reid, J. A.; Lin, J.; Gu, Z.; *Tetrahedron Lett.*, 33, 40, 5933-5936, (1992)
- (23) Schneider, S. E.; Bishop, P. A.; Salazar, M. A.; Bishop, O. A.; Anslyn, E. V.; *Tetrahedron*, 54, 15063-15086, (1998)
- (24) Linton, B. R.; Carr, A. J.; Orner, B. P.; Hamilton, A. D.; *J. Org. Chem.*, 65, 1566-1568, (2000)
- (25) Zhang, J.; Shi, Y.; Stein, P.; Atwal, K.; Li, Ch.; *Tetrahedron Lett.*, 43, 57-59, (2002)
- (26) Manimala, J. C.; Anslyn, E.V.; *Tetrahedron Lett.*, 43, 565-567, (2002)
- (27) Bowser, A. M.; Madalengoitia, J. S.; *Org. Lett.*, 6, 19, 3409-3412, (2004)
- (28) Guisado, O.; Martínez, S.; Pastor, J.; *Tetrahedron Lett.*, 43, 7105-7109, (2002)
- (29) Mukaiyama, T.; Usui, M.; Shimada, E.; Saigo, K.; *Chem. Lett.*, 1045-1048, (1975)
- (30) Mukaiyama, T.; *Angew. Chem. Int. Eng. Ed.*, 18, 707-721, (1979)
- (31) Li, P.; Xu, J. C.; *Tetrahedron*, 56, 8119-8131, (2000)

- (32) Nagashima, T.; Petro, M.; Lu, Y.; Zhang, W.; *Tetrahedron Asymm.*, 46, 6585-6588, (2005)
- (33) Crosignani, S.; Gonzalez, J.; Swinnen, D.; *Org. Lett.*, 6, 24, 4579-4582, (2004)
- (34) Yong, Y. F.; Kowalski, J. A.; Lipton, M. A.; *J. Org. Chem.*; 62, 1540-1542, (1997)
- (35) Drewry, D. H.; Ghiron, Ch.; *Tetrahedron Lett.*, 41, 6989-6992, (2000)
- (36) Linkletter, B. A.; Szabo, I. E.; Bruice, T. C.; *J. Am. Chem. Soc.*, 121, 3888-3896, (1999)
- (37) Le, V.-D.; Wong, Ch.-H.; *J. Org. Chem.*; 65, 2399-2409, (2000)
- (38) Cunha, S.; de Lima, B. R.; de Souza, A. P.; *Tetrahedron Lett.*, 43, 49-52, (2002)
- (39) Nguyen-Ba, N.; Lee, N.; Chan, L.; Zacharie, B.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 10, 2223-2226, (2000)
- (40) *Handbook of Chemistry and Physics*, 56th Edition, CRC PRESS, Inc., p. B-93 a B-139, (1975-1976)
- (41) Kilburn, J.P.; Lau, J.; Jones, C.F.; *Tetrahedron Lett.*, 58, 1739-1743, (2002)
- (42) Kurzer, F.; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 311-314, (1985)
- (43) Maryanoff, C. A.; Stanzione, R. C.; Plampin, J. N.; Mills, J. E.; *J. Org. Chem.*, 51, 1882-1884, (1986)
- (44) Kim, K.; Lin, Y.-T.; Mosher, H. S.; *Tetrahedron Lett.*, 29, 3183-3186, (1988)
- (45) Dempcy, R. O.; Browne, K. A.; Bruice, T. C.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 6097-6101, (1995)
- (46) Nishikawa, T.; Ohyabu, M.; Yamamoto, N.; Isobe, M.; *Tetrahedron*, 55, 4325-4340, (1999)
- (47) Nishikawa, T.; Asai, M.; Isobe, M.; *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 7847-7852, (2002)
- (48) Crosignani, S.; White, P. D.; Linclau, B.; *J. Org. Chem.*, 69, 5897-5905, (2004)
- (49) Hopkins, T. P.; Dener, J. M.; Boldi, A. M.; *J. Comb. Chem.*, 4, 167-174, (2002)
- (50) Molina, P.; Vilaplana, M. J.; *Synthesis*, 1197-1218, (1994)
- (51) Wamhoff, H.; Richardt, G.; Stölben, S.; *Adv. Heterocycl. Chem.*, 64, 159-204, (1995)
- (52) Drewry, D. H.; Gerritz, S. W.; Linn, J. A.; *Tetrahedron Lett.*, 38, 19, 3377-3380 (1997)
- (53) Wang, F.; Hauske, J. R.; *Tetrahedron Lett.*, 38, 50, 8651-8654, (1997)
- (54) Ding, M.-W.; Tu, H.-Y.; Liu, Z.-J.; *Synth. Comm.*, 27, 20, 3657-3662, (1997)
- (55) Merckx, R.; Rijkers, D. T. S.; Kemmink, J.; Liskamp, R. M. J.; *Tetrahedron Lett.*, 44, 4515-4518, (2003)
- (56) Wang, CH. C.-Y.; Seo, T. S.; Li, Z.; Ruparel, H.; Ju, J.; *Bioconjugate Chem.*, 14, 697-701, (2003)
- (57) Debaene, F.; Winssinger, N.; *Org. Lett.*, 5, 23, 4445-4447, (2003)
- (58) Epple, R.; Kudirka, R.; Greenberg, W. A.; *J. Comb. Chem.*, 5, 292-310, (2003)
- (59) Miller, G. P.; Kool, E. T.; *J. Org. Chem.*, 69, 2404-2410, (2004)
- (60) Zapf, C. W.; Goddman, M.; *J. Org. Chem.*, 68, 10092-10097, (2003)
- (61) Pátek, M.; Smrcina, M.; Nakanishi, E.; Izawa, H.; *J. Comb. Chem.*, 2, 370-377, (2002)
- (62) Musiol, H.-J.; Moroder, L.; *Org. Lett.*, 3, 24, 3859-3861, (2001)
- (63) Katritzky, A. R.; Rogovoy, B.V.; Chassaing, Ch.; Vvedensky, V.; *J. Org. Chem.*, 65, 808-882, (2000)

- (64) Katritzky, A. R.; Rogovoy, B. V.; Cai, X.; Kirichenko, N.; Kovalenko, K. V.; *J. Org. Chem.*, 69, 309-313, (2004)
- (65) Wu, Y.-Q.; Hamilton, S. K.; Wilkinson, D. E.; Hamilton, G. S.; *J. Org. Chem.*, 67, 7553-7556, (2002)
- (66) Barakwar, D. A.; Bruice, T. C.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 11047-11052, (1998)
- (67) Linkletter, B. A.; Bruice, T. C.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 8, 1285-1290, (1998)
- (68) Barakwar, D. A.; Linkletter, B.; Bruice, T. C.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 8, 1517-1520, (1998)
- (69) Barakwar, D. A.; Kwok, Y.; Bruice, T. W.; Bruice, T. C.; *J. Am. Chem. Soc.*, 122, 5244-5250, (2000)
- (70) Linkletter, B. A.; Bruice, T. C.; *Bioorg. Med. Chem.*, 8, 1893-1901, (2000)
- (71) Linkletter, B. A.; Szabo, I. E.; Bruice, T. C.; *Nucleic Acids Res.* 29, 11, 2370-2376, (2001)
- (72) Reddy, P. M.; Bruice, T. C.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 13, 1281-1285, (2003)
- (73) Challa, H.; Bruice, T. C.; *Bioorg. Med. Chem.*, 12, 1475-1481, (2004)
- (74) Reddy, P. M.; Bruice, T. C.; *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 3736-3747, (2004)
- (75) Szabo, I. E.; Bruice, T. C.; *Bioorg. Med. Chem.*, 12, 4233-4244, (2004)
- (76) Kojima, N.; Bruice, T. C.; *Org. Lett.*, 2, 1, 81-84, (2000)
- (77) Kojima, N.; Szabo, I. E.; Bruice, T. C.; *Tetrahedron*, 58, 867-879, (2002)
- (78) Noroña, A.; Damha, M. J.; *Nucleic Acids Res.*, 26, 11, 2665-2671, (1998)
- (79) Summerton, J.; Weller, D.; *US Patent*, 5, 217, 866, (1993)
- (80) Summerton, J.; Weller, D.; *US Patent*, 5, 185, 444, (1993)
- (81) Beaucage, S. L.; Iyer, R. P.; *Tetrahedron*, 48, 12, 2223-2311, (1992)
- (82) Debéthune, L.; *Nucleopéptidos que mimetizan la unión topoisomerasa 1-DNA: síntesis y utilización como sustratos de la tirosina-DNA fosfodiesterasa*, Tesis Doctoral, Departamento de Química Orgánica, Universitat de Barcelona, p. 49-50, (2001)
- (83) Alguacil Blanco, J.; *Síntesis de guanidinas en fase sólida destinada a la preparación de oligonucleótidos modificados*, Master experimental en Química Orgánica, Universidad de Barcelona (UB), (2006)
- (84) Mungall, W. S.; Greene, G. L.; Heavner, G. A.; Letsinger, R. L.; *J. Org. Chem.*, 40, 11, 1659-1662, (1975)
- (85) Yamamoto, I.; Sekine, M.; Hata, T.; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 90, 306-310, (1980)
- (86) DeStevens, G.; Smolinsky, B.; Dorfman, L.; *J. Org. Chem.*, 29, 1115, (1964)
- (87) Kearney, P. C.; Fernández, M.; Flygare, J. A.; *J. Org. Chem.*, 63, 196-200, (1998)
- (88) Lukyanenko, N. G.; Kirichenko, T. I.; Scherbakov, S. V.; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 2347-2351, (2002)
- (89) Pirrung, M. C.; Pansare, S. V.; *J. Comb. Chem.*, 3, 90-96, (2001)
- (90) Gothe, R.; Seyfarth, L.; Schumann, C.; Agricola, I.; Reissmann, S.; *J. Prakt. Chem.*, 341, 4, 369-377, (1999)
- (91) Schumann, C.; Seyfarth, L.; Greiner, G.; Reissmann, S.; *J. Peptide Res.*, 55, 428-435, (2000)
- (92) Dixon, A. E.; Taylor, J.; *J. Chem. Soc.*, 93, 684, (1908)

- (93) Smith, P. A. S.; Kan, R. O.; *J. Org. Chem.*, 29, 2261, (1964)
- (94) Reeves, W. P.; Simmons Jr, A.; Rudis, J. A.; Bothwell, T. C.; *Synth. Commun.*, 11, 10, 781-785, (1981)
- (95) Bannwarth, W.; *Helvetica Chim. Acta*, 71, 1517-1527, (1988)
- (96) Hu, X.; Tierney, M. T.; Grinstaff, M. W.; *Bioconj. Chem.*, 13, 83-89, (2002)
- (97) Guibé, F.; *Tetrahedron*, 54, 2967-3042, (1998)
- (98) Hayakawa, Y.; Kato, H.; Uchiyama, M.; Kojino, H.; Noyori, R.; *J. Org. Chem.*, 51, 2402-2404, (1986)
- (99) Hayakawa, Y.; Wakabayashi, S.; Kato, H.; Noyori, R.; *J. Am. Chem. Soc.*, 112, 1691-1696, (1990)
- (100) Hayakawa, Y.; Hirose, M.; Noyori, R.; *J. Org. Chem.*, 58, 5551-5555, (1993)
- (101) Sakakura, A.; Hayakawa, Y.; *Tetrahedron*, 56, 4427-4435, (2000)
- (102) Khym, J. X.; *Biochemistry*, 2, 344, (1963)
- (103) Brown, D. M.; Read, A. P.; *J. Chem. Soc.*, 5072-5074, (1965)
- (104) Stirchak, E. P.; Summerton, J. E.; Weller, D. D.; *Nucleic acids res.*, 17, 15, 6129-6141, (1989)
- (105) Summerton, J.; Weller, D.; *Nucleosides Nucleotides*, 16, 889-898, (1997)
- (106) Matteucci, M. D.; Caruthers, M. H.; *J. Am. Chem. Soc.*, 103, 3185-3191, (1981)
- (107) Caruthers, M. H.; *Acc. Chem. Res.*, 24, 278-284, (1991)
- (108) Blackburn, G. M.; Gait, M. J.; *Nucleic acids in chemistry and biology*, Oxford University Press, Oxford UK, (1996)
- (109) Ti, G. S.; Gattney, B. L.; Jones, R. A.; *J. Am. Chem. Soc.*, 104, 1316-1319, (1982)
- (110) Nurminen, E. J.; Mettinen, J. K.; Lönnberg, H.; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 2159-2165, (2001)
- (111) Nurminen, E., Lönnberg, H.; *J. Phys. Chem.*, 17, 1-17, (2004)
- (112) Sanghvi, Y. S.; Guo, Z.; Pfundheller, H. M.; Converso, A.; *Org. Process Res. Dev.*, 4, 3, 175-181, (2000)
- (113) Barone, A. D.; Tang, J. Y.; Caruthers, M. H.; *Nucleic. Acids Res.*, 12, 4051, (1984)
- (114) Dahl, B. H.; Nielsen, J.; Dahl, O.; *Nucleic. Acids Res.*, 15, 1729, (1987)
- (115) Krotz, A.H.; Rentel, C.; Gorman, D.; Olsen, P.; Gaus, H. J.; McArdle, J. V.; Scozzari, A. N.; *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, 23, 5, 767-775, (2004)
- (116) Robles, J.; Pedroso, E.; Grandas, A.; *J. Org. Chem.*, 59, 2482-2486, (1994)
- (117) Wright, P.; Lloyd, D.; Rapp, W.; Andrus, A.; *Tetrahedron Lett.*, 34, 3373, (1993)
- (118) Hayakawa, Y.; Kataoka, M.; Noyori, R.; *J. Org. Chem.*, 61, 7996-7997, (1996)
- (119) Thieriet, N.; Alsina, J.; Giralt, E.; Guibé, F.; Albericio, F.; *Tetrahedron Lett.*, 38, 41, 7275-7278, (1997)
- (120) Gomez-Martinez, P.; Dessolin, M.; Guibé, F.; Albericio, F.; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2871-2874, (1999)
- (121) Fernández-Fórner, D.; Casals, G.; Navarro, E.; Ryder, H.; Albericio, F.; *Tetrahedron Lett.*, 42, 4471-4474, (2001)

*Capítulo 2. Síntesis de oligonucleótidos que incorporan unidades morfolino-  
amidina por formación de enlaces guanidino en fase sólida*

---

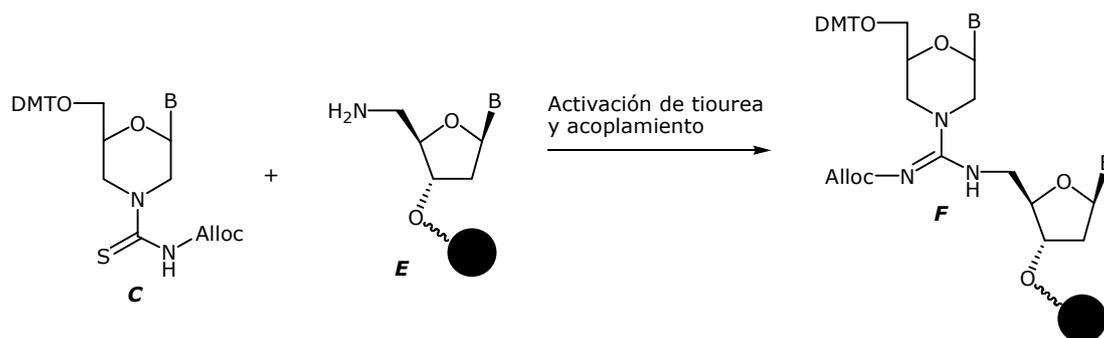


## 1 Introducción

En el anterior capítulo se ha estudiado la síntesis de oligonucleótidos en los que se alternan las uniones guanidino y fosfato. Para ello, era necesaria la preparación del dinucleósido **B** (véase capítulo 1, apartado 2, **Fig. 1.3**), conveniente funcionalizado como derivado de P(III) para llevar a cabo la síntesis de oligonucleótidos en fase sólida. Para facilitar el desarrollo de la metodología sintética a emplear, se trabajó con un modelo de la molécula a sintetizar. Sobre este modelo se evaluaron diferentes metodologías de síntesis del grupo guanidino en solución, así como la elección de un grupo protector compatible con la síntesis de oligonucleótidos. Como ya se ha comentado, una de las principales dificultades en el conjunto de estos ensayos fue la eliminación del grupo protector en fase sólida.

Dados los resultados anteriores, que ponían de manifiesto la dificultad de obtener los derivados guanidina en solución y la posterior incorporación en cadenas de oligonucleótido, se quiso ensayar la formación de la guanidina en fase sólida según el esquema de la **Fig. 2.1**, adaptando la metodología del capítulo 1.

**Figura 2.1 Síntesis de guanidinas en fase sólida**



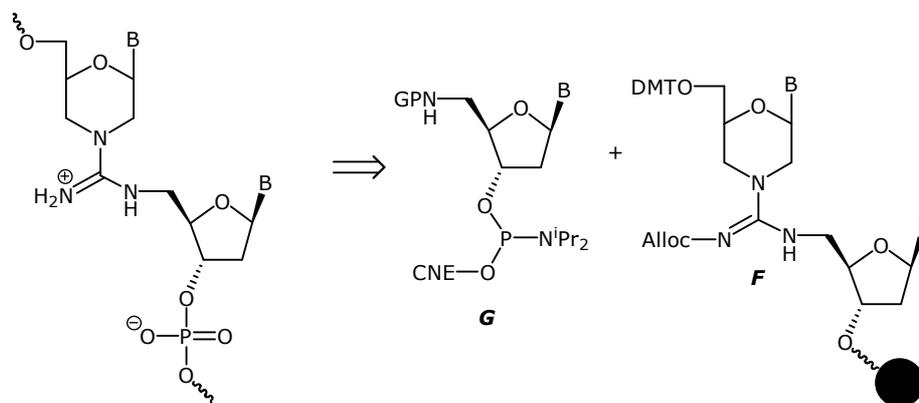
Para obtener la guanidina **F**, se parte de nuevo de una tiourea derivada de un morfolinonucleósido, que convenientemente activada formaría el enlace guanidino con el aminonucleósido anclado a un soporte sólido **E** (ver siguiente apartado). Esta estrategia contaría con las ventajas habituales asociadas a la realización de reacciones en fase sólida como son la separación de reactivos y subproductos mediante una simple filtración o poder modular el resultado de la reacción mediante la utilización de excesos y combinación de diferentes reactivos.

Por tanto, en este capítulo, aparte de proceder al estudio de la posible adaptación a la fase sólida de la metodología empleada para la síntesis del grupo guanidino en solución, que consistía en obtener un intermedio aislable por reacción entre la tiourea y el reactivo de Sanger, también se ensayaron otras metodologías mencionadas en el capítulo 1.

Esta nueva estrategia permitiría sintetizar análogos de DNA en los que se alternan las unidades de morfolino-amidina y 3'-ribosil-fosfato como se pretendía en el anterior capítulo (**Fig. 2.2**). Para ello, sería necesario disponer del derivado fosfitilado **G** de un 5'-

aminonucleósido. La principal limitación de este planteamiento consistiría en tener que alternar dos químicas diferentes, la que se emplea para formar enlaces fosfato y la que se emplea para formar enlaces guanidino, obligando a sintetizar el oligonucleótido por etapas.

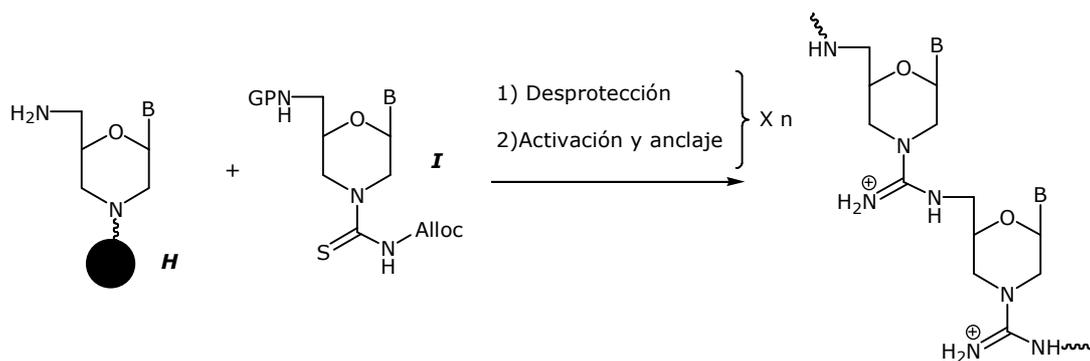
**Figura 2.2 Esquema retrosintético de oligonucleótidos formados por unidades de morfolino-amidina y 3'-ribosil-fosfato en posiciones alternadas**



No obstante, esta limitación sería mínima en el caso de introducir un único grupo guanidino en la cadena oligonucleotídica, e incluso facilitaría el procedimiento empleado para ello en el anterior capítulo, en el que se precisaba disponer de un dímero **A**. Así, para introducir una modificación en un oligonucleótido con sólo pirimidinas, para cubrir todas las posibilidades de la secuencia sería necesario disponer de hasta cuatro dímeros (<sup>m</sup>Ug<sub>(Alloc)</sub>T, <sup>m</sup>Ug<sub>(Alloc)</sub>C, <sup>m</sup>Cg<sub>(Alloc)</sub>T y <sup>m</sup>Cg<sub>(Alloc)</sub>C), mientras que realizando la síntesis de la guanidina en fase sólida los precursores necesarios serían el derivado de P(III) de los 5'-aminonucleósidos de citidina y timidina y las tioureas derivadas de morfolinouridina y morfolinocitidina.

La síntesis de guanidinas en fase sólida también permite abordar la preparación de análogos de DNA que contengan segmentos ininterrumpidos de unidades de morfolino-amidina (**Fig. 2.3**). Para ello sería necesario un único intermedio, un derivado tiourea de 5'-amino-5'-desoximorfolinonucleósido, que debería permitir la síntesis del oligómero modificado mediante un ciclo de desprotección y anclaje por formación de un enlace guanidino. Esta alternativa ha sido ensayada recientemente en nuestro grupo por J. Alguacil.<sup>1</sup>

**Figura 2.3 Síntesis de oligonucleótidos formados por segmentos de morfolino-amidinas**



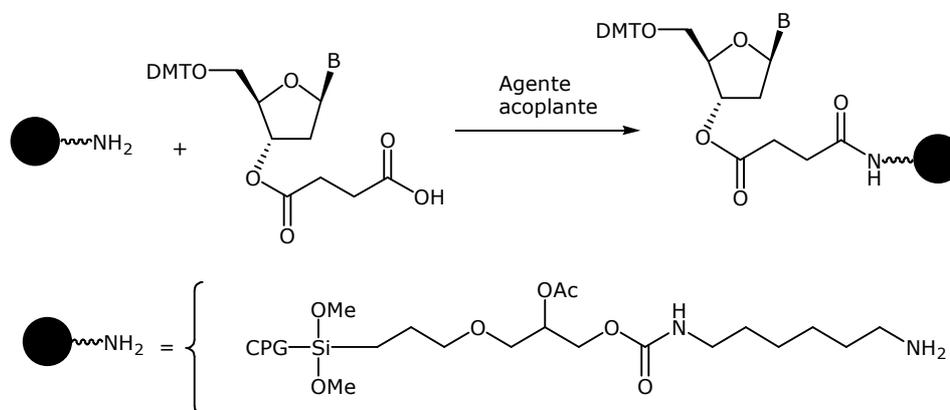
En el presente capítulo se resumen los ensayos realizados para obtener oligonucleótidos que contienen unidades de morfolino-amidina, en los que la formación del enlace guanidino internucleosídico se produce en fase sólida por reacción de un derivado morfolinocarbotoiámidico (tiourea) y un 5'-aminonucleósido.

## 2. Síntesis de la aminonucleosidilresina 23

### 2.1 Consideraciones preliminares

En este apartado se detalla la preparación de la aminonucleosidilresina sobre la que se llevará a cabo la síntesis de oligonucleótidos modificados. El soporte con el que se ha trabajado es LCAA-CPG, que es el que se utiliza habitualmente en la síntesis de oligonucleótidos. La manera estándar de incorporar el primer nucleósido a un soporte sólido consiste en formar un enlace amida entre el grupo carboxilo de un 3'-*O*-succinilnucleósido y el grupo amino del soporte sólido empleando carbodiimidas como agente acoplante, como por ejemplo, la *N,N*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) o la *N,N*-diisopropilcarbodiimida (DIP)<sup>2,3</sup> (**Fig. 2.4**). En nuestro caso, este mismo procedimiento puede ser empleado para incorporar el 5'-aminonucleósido.

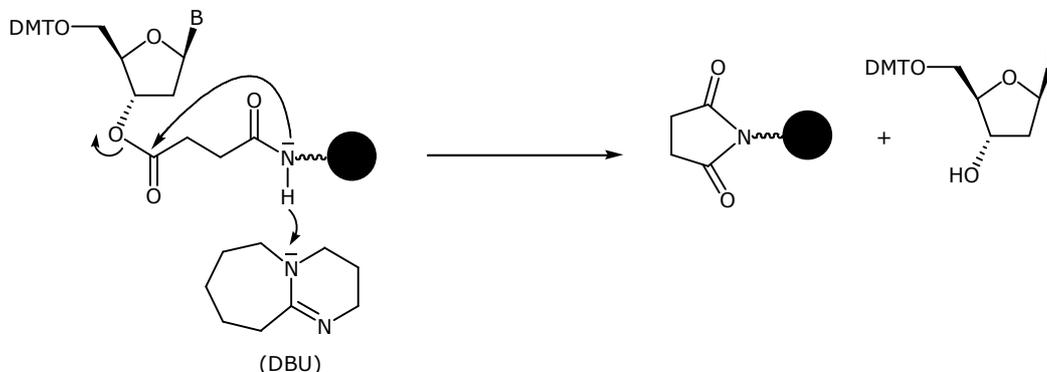
**Figura 2.4 Incorporación de un 3'-*O*-succinilnucleósido a un soporte sólido**



Aunque la preparación de la aminonucleosidilresina no revestía dificultad adicional respecto a las nucleosidilresinas habituales, se tuvo en cuenta la posibilidad de que en las etapas de formación de guanidinas se pudieran emplear bases fuertes, por lo que se decidió variar ligeramente su estructura. Cabe recordar que en la síntesis del dinucleósido **12** se empleó DBU, por lo que pudiera ser el caso que hubiera que utilizarla en los nuevos ensayos en fase sólida. En la bibliografía se ha descrito que la unión succinato entre el soporte sólido y un nucleósido no es estable en presencia de DBU.<sup>3</sup> Se ha comprobado que al tratar con una solución de DBU al 10% en diclorometano durante 1 hora un nucleósido o un oligonucleótido se desancla parcialmente del soporte sólido. La rotura de la unión succinato probablemente se inicia con la desprotonación de la amida seguida de un ataque nucleófilo intramolecular

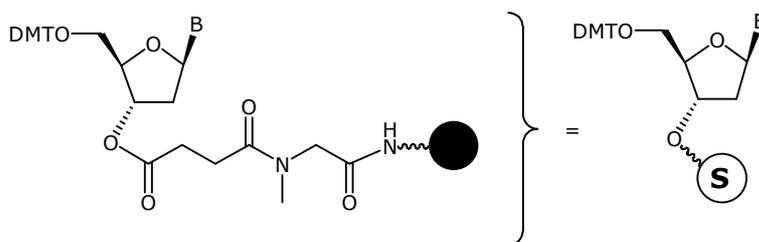
sobre el carbonilo del éster (**Fig.2.5**) para formar el anillo de succinimida sobre resina y liberando el nucleósido o el oligonucleótido.

**Figura 2.5 Rotura de la unión succinato en presencia de DBU**



Para paliar esta reacción secundaria, se ha descrito<sup>4,5</sup> la introducción de un residuo de sarcosina antes de incorporar el 3'-O-succinilnucleósido para evitar desanclajes prematuros en presencia de DBU (**Fig. 2.6**). Los autores han comprobado que al tratar este tipo de nucleosidilresinas con una solución de DBU al 10% en diclorometano durante una noche se observa menos del 5% de desanclaje del nucleósido. Por tanto, dada la posibilidad que en nuestros ensayos se fueran a emplear bases fuertes, se tomó la precaución de introducir el residuo de sarcosina para evitar desanclajes no deseados.

**Figura 2.6 Nucleósido unido al soporte sólido mediante una unión succinil-sarcosina**

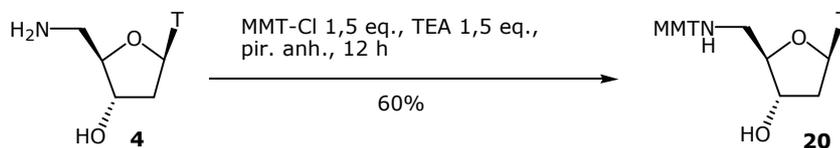


## **2.2 Síntesis de 3'-O-succinil-5'-N-(4-monometoxitritil)amino-2',5'-didesoxitimidina**

Siguiendo el mismo razonamiento empleado en los ensayos de obtención del dímero **12**, el derivado escogido para incorporar al soporte sólido fue la 5'-amino-2',5'-didesoxitimidina, ya que la nucleobase no precisa de protección. Para ello, en primer lugar se ha de proteger el grupo amino para después derivatizar el hidroxilo 3' con el grupo succinilo. Para proteger el grupo amino se empleó el grupo 4-monometoxitritilo (MMT), (**Fig. 2.7**) ya que es probable que el grupo DMT, que es el utilizado habitualmente en la síntesis de oligonucleótidos, sea demasiado lábil como protector de aminas en las condiciones de

síntesis de oligonucleótidos. El grupo MMT no produce cambio alguno en el esquema de protección de un derivado oligonucleotídico, dado que se puede eliminar en condiciones similares al grupo DMT con una solución de ácido tricloroacético en diclorometano al 3%.

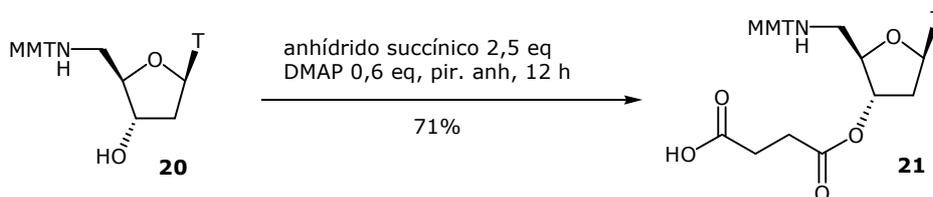
**Figura 2.7 Síntesis de 5'-N-(4-monometoxitritil)amino-2',5'-didesoxitimidina**



Basándonos en metodologías descritas en la literatura<sup>6-10</sup> se llevó a cabo la protección del grupo amino de la 5'-amino-2',5'-dideoximidina por tratamiento con cloruro de 4-monometoxitritilo en piridina en presencia de TEA. El derivado **20** se aisló con un 60% de rendimiento tras realizar la purificación por cromatografía en columna.

El siguiente paso sintético consistía en obtener el derivado succinilado en el hidroxilo 3' del nucleósido. Para obtener derivados succinilados de nucleósidos, una práctica habitual en síntesis de oligonucleótidos es llevar a cabo la acilación del hidroxilo 3' con anhídrido succínico catalizada por 4-(dimetilamino)piridina (DMAP). Para la obtención del 3'-O-succinilnucleósido protegido se hizo reaccionar el producto **20** con un exceso de anhídrido succínico en presencia de cantidades catalíticas de DMAP, (**Fig. 2.8**). Después de 12 horas a temperatura ambiente el análisis por CCF indicaba que aún quedaban trazas del producto de partida, por lo que se añadió más anhídrido succínico y DMAP y se dejó evolucionar hasta que no se detectaba la presencia del producto de partida. Una vez finalizada la reacción, el producto **21** se aisló tras una decantación con un 71% de rendimiento sin que fuera necesaria una posterior purificación cromatográfica.

**Figura 2.8 Síntesis de 3'-O-succinil-5'-N-(4-monometoxitritil)amino-5'-desoximidina**

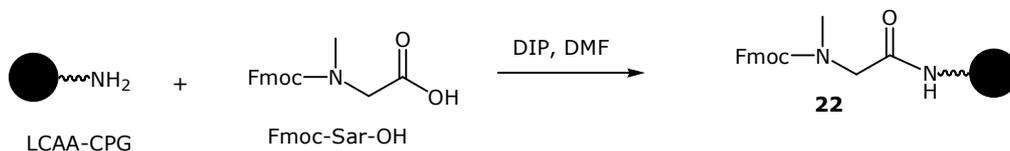


### **2.3 Síntesis de Fmoc-Sarcosinil-LCAA-CPG**

El acoplamiento de Fmoc-Sar-OH al soporte sólido es una reacción de formación de un enlace amida entre el grupo carboxilo del aminoácido que se incorpora y el grupo amino que se encuentra sobre la resina (**Fig. 2.9**). En la química de péptidos la activación del grupo carboxilo se realiza *in situ* con agentes de acoplamiento como las carbodiimidas, que

transforman el grupo ácido en un derivado más electrófilo. De esta forma, al reaccionar con la amina se genera el enlace amida y una urea como subproducto.

**Figura 2.9 Síntesis de Fmoc-Sar-LCAA-CPG**



Antes de proceder a la incorporación del aminoácido protegido es conveniente realizar un acondicionamiento del soporte sólido (véase apartado 1.3 de la sección experimental). Una vez lavada y secada la resina se incorpora el residuo de Fmoc-Sar-OH en presencia de DIP. Después del anclaje de Fmoc-Sar-OH al soporte se ha de realizar la cuantificación para poder determinar la nueva funcionalización. Ésta debería encontrarse alrededor de 40  $\mu\text{mol/g}$ , por tratarse del valor óptimo en la síntesis de oligonucleótidos, y en caso de ser demasiado baja se tendría que repetir el acoplamiento del aminoácido.

En la **Tabla 2.1** se recogen los valores de funcionalización obtenidos. Después del acoplamiento con 1 equivalente de cada reactivo se obtuvo un rendimiento de incorporación demasiado bajo, por lo que se repitió el acoplamiento dos veces más incrementando la cantidad de aminoácido y de carbodiimida, hasta lograr la funcionalización de 42  $\mu\text{mol/g}$ .

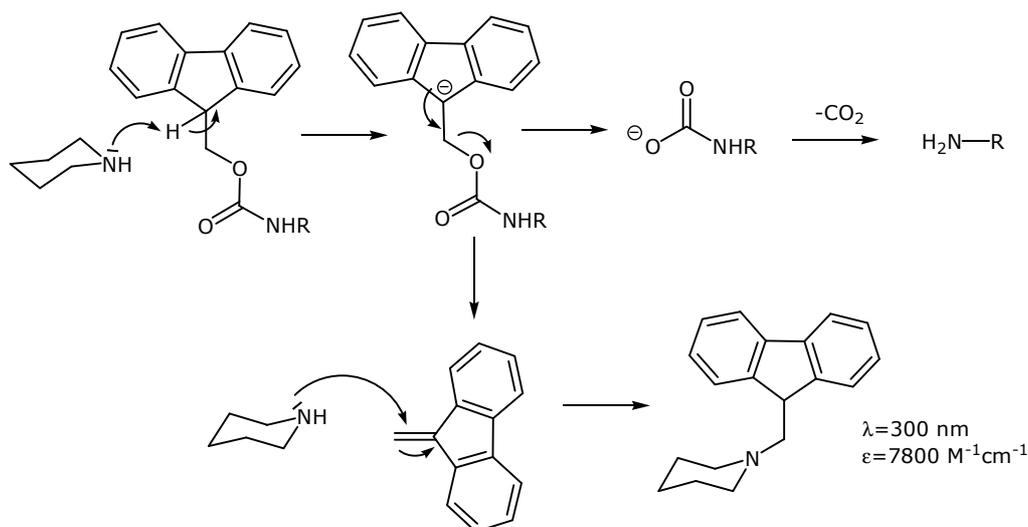
**Tabla 2.1 Rendimientos de incorporación de Fmoc-Sar-OH**

Acoplamiento	Fmoc-Sar-OH	DIP	f ( $\mu\text{mol/g}$ )
1	1 eq	1 eq	8
2	3 eq	10 eq	27
3	3 eq	10 eq	42

Para conocer el rendimiento de incorporación, se determinó la funcionalización en grupos Fmoc de la resina, cuantificando el producto de eliminación del grupo Fmoc.<sup>11</sup> Para ello, se eliminó el grupo protector con una disolución de piperidina en DMF al 20%. Al tratar una alcuota de **22** con la solución básica en primer lugar se genera la especie dibenzofulveno mediante un proceso de  $\beta$ -eliminación, el cual reacciona a su vez con piperidina para formar *N*-(9-fluorenilmetil)piperidina (**Fig. 2.10**).

El producto formado presenta un máximo de absorción en el espectro de UV-vis a  $\lambda=300$  nm con un coeficiente de extinción molar de 7800  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . De este modo, mediante la medida de absorbancia de la disolución de piperidina utilizada para eliminar el grupo Fmoc, se puede determinar la funcionalización de la resina. Una vez se obtuvo la resina con un grado de funcionalización adecuado, se realizó el bloqueo por acetilación de los grupos amino libres de la resina para evitar el anclaje no deseado sobre estos grupos.

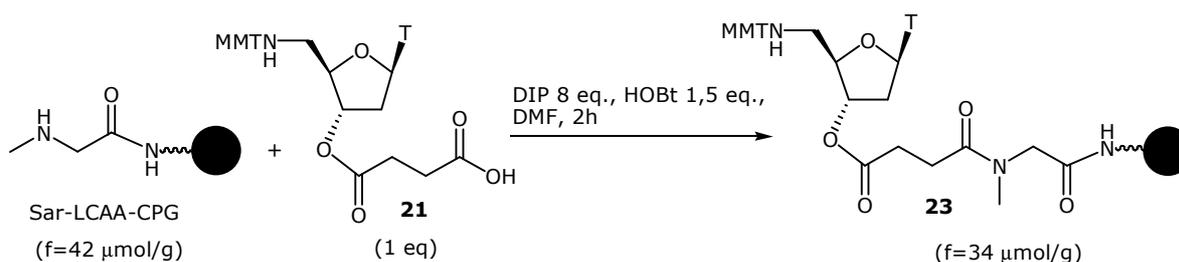
**Figura 2.10 Mecanismo de eliminación del grupo Fmoc con piperidina**



## **2.4 Síntesis de MMT-5'-amino-2',5'-didesoxitimidinil-3'-succinilsarcosinil-LCAA-CPG**

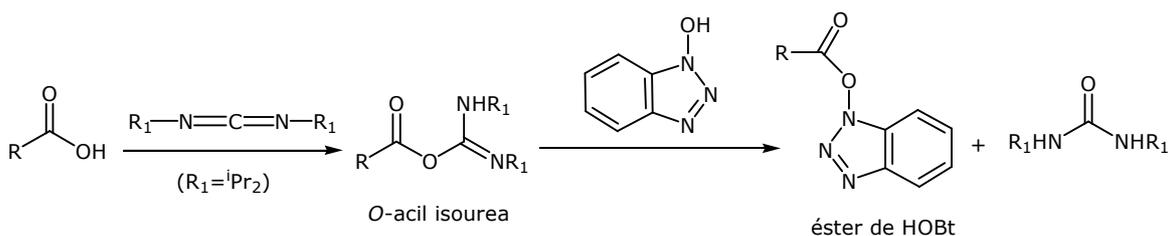
Una vez obtenida la resina con la funcionalización deseada y después de haber eliminado el grupo Fmoc con piperidina, se llevó a cabo la incorporación del primer nucleósido. La incorporación al soporte sólido se realizó por formación de un enlace amida entre el grupo amino de la sarcosina y el derivado 3'-O-succinilo del nucleósido en cuestión, según se muestra a continuación (**Fig.2.11**).

**Figura 2.11 Síntesis de MMT-5'-amino-2',5'-didesoxitimidinil-3'-succinilsarcosinil-LCAA-CPG**



Para llevar a cabo la etapa de acoplamiento se empleó como agente acoplante DIP en presencia de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt). El carboxilo del 3'-O-succinilnucleósido en presencia de DIP da lugar a la formación de un derivado O-acilisourea, que a su vez reacciona con HOBt para dar un éster activo y la urea derivada de la carbodiimida (**Fig. 2.12**). El éster activo reacciona finalmente con la amina para formar la amida.

**Figura 2.12** Secuencia de reacciones en la formación de una amida por activación de un ácido carboxilo con DIP y HOBt

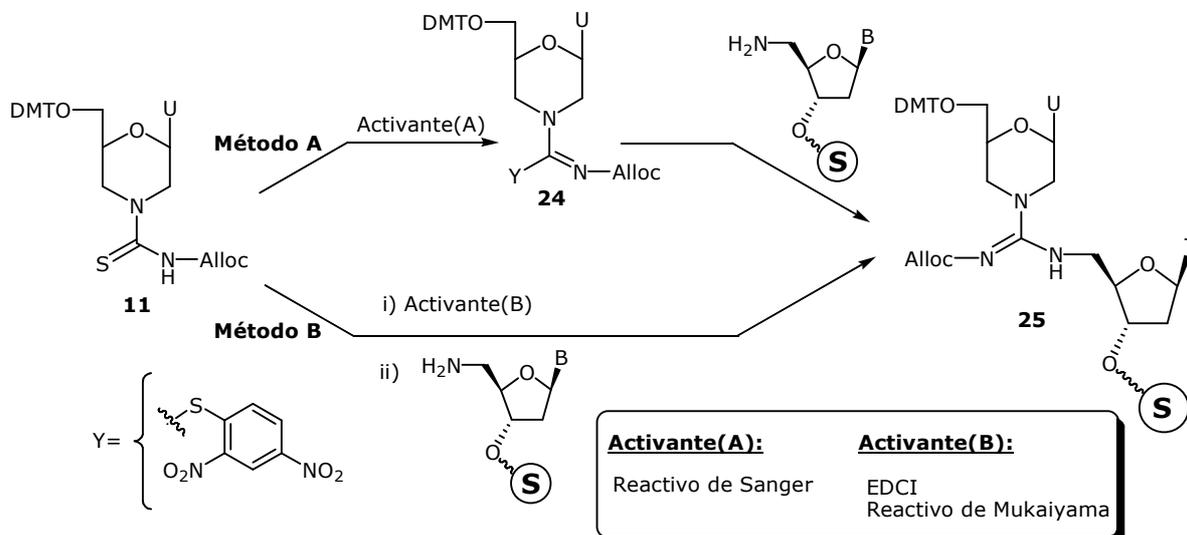


Después del anclaje de **21** se ha de realizar la cuantificación para poder determinar la nueva funcionalización. Ésta debería encontrarse entre 30-40  $\mu\text{mol/g}$  y en caso de ser demasiado baja se tendría que repetir el acoplamiento del 3'-O-succinilnucleósido. Para evaluar la eficacia del proceso síntesis se cuantificó el producto de eliminación del grupo MMT.<sup>12</sup> Este grupo protector se puede eliminar con una disolución de TCA al 3% en DCM, generando el catión monometoxitritilo (color amarillo), que presenta un máximo de absorción en el espectro de UV-vis a  $\lambda=473$  nm con un coeficiente de extinción molar de 53000  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Después de realizar un acoplamiento en las condiciones de la **Fig. 2.11**, se obtuvo una resina con una funcionalización de 34  $\mu\text{mol/g}$ , por lo que no fue necesario volver a repetir el proceso. Finalmente, se realizó el bloqueo por acetilación de los grupos amino libres de la resina para evitar reacciones secundarias durante la formación de la guanidina.

### 3. Síntesis de guanidina en fase sólida: preparación de DMT-(<sup>m</sup>Ug<sub>(Alloc)</sub>T)-succinilsarcosinil-LCAA-CPG

A fin de conocer el mejor procedimiento para formar una guanidina en fase sólida, se ensayaron diferentes procedimientos, que se resumen en la **Fig. 2.13**. Cabe señalar que algunas de estas reacciones habían sido evaluadas anteriormente en disolución en los ensayos de obtención de las guanidinas **5a-5g** (véase el apartado 3.3 del capítulo 1).

**Figura 2.13** Ensayos de obtención de guanidinas en fase sólida



Esencialmente, se ensayaron dos rutas. En primer lugar, se empleó el reactivo de Sanger (**método A**) para activar la tiourea **11**, ya que esta fue la metodología empleada para obtener guanidinas en disolución. En segundo lugar se emplearon reactivos que activan la tiourea en el medio de reacción (**método B**) para obtener el dinucleósido anclado a un soporte sólido.

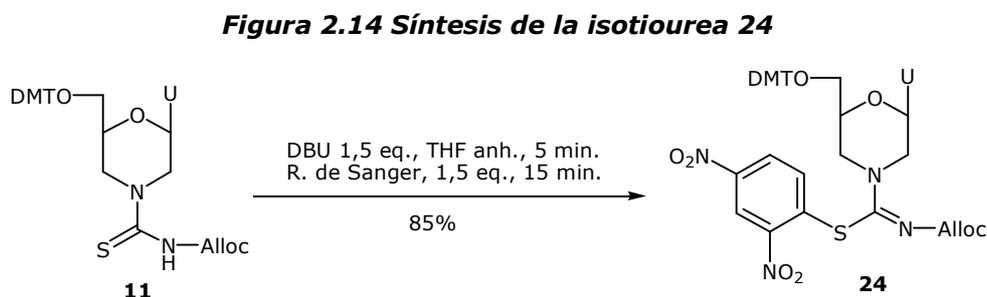
### **3.1 Método A (mediante el reactivo de Sanger)**

En el capítulo 1 se ensayó la síntesis del derivado guanidino **12** en solución a partir de 5'-amino-2',5'-didesoximidina y la isotiourea derivada de la tiourea **11** (véase apartado 5.3 del capítulo 1). Se ha de recordar que este intermedio se decidió no aislarlo porque era poco estable por lo que, una vez asegurada su formación por CCF, se empleaba directamente en la siguiente etapa.

En este caso, lo que se pretendió fue adaptar la metodología en disolución a la síntesis en fase sólida, por lo que se realizaron diferentes ensayos de acoplamiento de la isotiourea llevando a cabo la formación de la guanidina sobre el soporte sólido **23**. A pesar de la poca estabilidad de la isotiourea **24**, se pensó que resultaría mucho más conveniente aislarla con el objeto de fijar en lo posible las concentraciones de reactivo a emplear en los ensayos.

#### **3.1.1 Obtención de la isotiourea 24**

Para la obtención de la isotiourea **24** se modificó ligeramente el procedimiento descrito en el capítulo 1 (véase apartado 5.3). Se preparó una solución de la tiourea **11** y DBU en THF anhidro y a continuación, se utilizó un exceso de este reactivo (**Fig. 2.14**) para evitar que quedara producto de partida sin reaccionar. Pasados 15 minutos el análisis por CCF indicaba que la tiourea de partida se había consumido completamente.

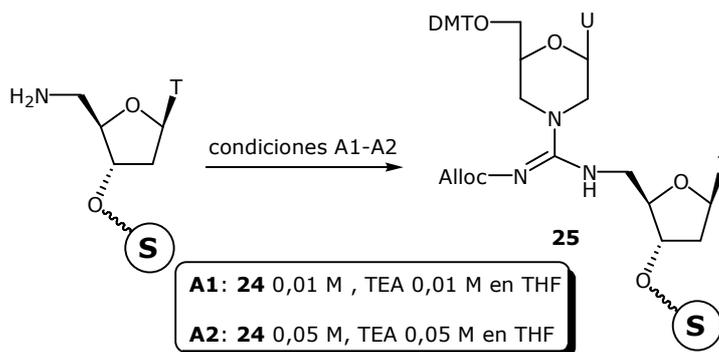


El exceso de reactivo de Sanger se pudo eliminar precipitando la mezcla de reacción sobre una mezcla hexano/éter 1:1, obteniendo de este modo la isotiourea **24** con un 85% de rendimiento. El producto obtenido se guardó en nevera bajo atmósfera de argón hasta su utilización.

### 3.1.2 Ensayos de acoplamiento de la isotiourea **24** sobre resina

Una vez eliminado el grupo MMT y neutralizada la resina con una solución de TEA en DCM al 10%, se ensayó la incorporación del derivado isotiourea **24** (**Fig. 2.15**) variando la concentración de la isotiourea **24**, el número de acoplamientos y el tiempo de reacción. La **Tabla 2.2** resume los resultados obtenidos en cada uno de los ensayos realizados.

**Figura 2.15 Ensayos de acoplamiento de 24 sobre resina**



**Tabla 2.2 Ensayos de acoplamiento del derivado isotiourea 24 sobre resina**

Ensayo	Condiciones	nº acopl.	t reacción/acopl. (horas)	% acopl. (DMT)	% acopl. (% area 26)
1	A1	1	1	8	10
2	A1	2	1	11	12
3	A1	3	1	15	17
4	A1	1	12	16	17
5	A2	1	1	17	21
6	A2	3	1	37	41
7	A2	1	12	31	37

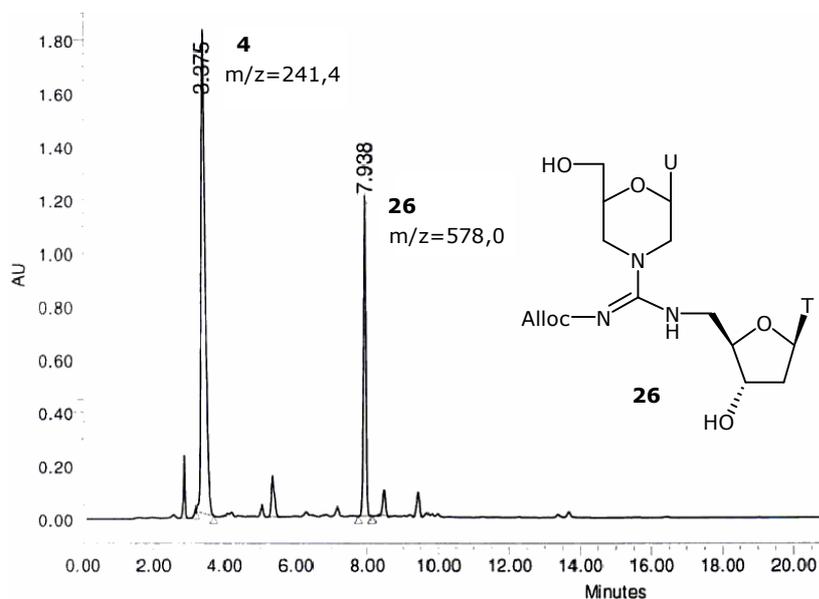
El porcentaje de incorporación del morfolinonucleósido se determinó a partir de las medidas de absorbancia de la disolución resultante de eliminar el grupo DMT. En primer lugar, se realizaron cuatro ensayos de acoplamiento con las condiciones **A1**, que consisten en emplear 3 equivalentes de isotiourea y 3 equivalentes de TEA como base, en disolución de THF. Como se puede observar, el rendimiento de incorporación aumentó con el número de acoplamientos realizados o bien con el tiempo de reacción.

Al utilizar una solución más concentrada (condiciones **A2**), aumentó ligeramente el porcentaje de incorporación después de un acoplamiento. También en este caso el rendimiento aumentó con el número de acoplamientos realizados y con el tiempo de reacción. Aún cuando la reacción se llevaba a cabo en 12 horas, o en tres tandas de 1 hora (ensayos 6-7), el rendimiento de incorporación no superó en el mejor de los casos un 37%. Cabe deducir que la reacción tenía lugar con una cinética lenta, o bien, dado que los

experimentos con tres acoplamientos mostraban rendimientos semejantes o ligeramente superiores a los de un único acoplamiento de 12 horas, que la eficacia de isotiourea disminuya con el tiempo por ser inestable en las condiciones de reacción.

Para analizar más detalladamente el resultado de los ensayos de acoplamiento, una vez eliminado el grupo DMT, se procedió a desanclar el producto del acoplamiento con una solución acuosa de  $\text{NH}_3$  a T ambiente. El análisis por HPLC (**Fig. 2.16**) indicaba en todos los casos analizados la presencia de dos productos a  $t_R=3,4$  y  $t_R=7,9$  minutos, respectivamente. Después de aislar ambos productos, el análisis por espectrometría de masas (MALDI-TOF, modo positivo) indicaba que la masa del producto colectado a  $t_R=3,4$  minutos correspondía a 5'-amino-2',5'-didesoxitimidina y el de  $t_R=7,9$  minutos al dinucleósido **26**.

**Figura 2.16 Cromatograma de HPLC del crudo correspondiente al ensayo 5 de la Tabla 2.2. (A:  $\text{AcONH}_4$  0,01M, B: ACN, 5-100% de B en 30 min.)**



Se calculó también el porcentaje de incorporación a partir de las áreas de los productos **4** y **26** en los cromatogramas. Como la suma de las áreas de ambos productos era prácticamente del 100%, se dividió el área de cada producto por su correspondiente coeficiente de extinción molar a 260 nm (8,7 y 18,8  $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  para **4** y **26**, respectivamente). Tal y como se puede observar en la **Tabla 2.2**, los valores obtenidos prácticamente coinciden con aquellos que se habían calculado a partir de las medidas de absorbancia de la disolución resultante de eliminar el grupo DMT.

Dados los resultados obtenidos, con porcentajes de formación de guanidina situados entre el 10 y el 40%, se creyó conveniente ensayar otras alternativas para la formación del grupo guanidino en fase sólida.

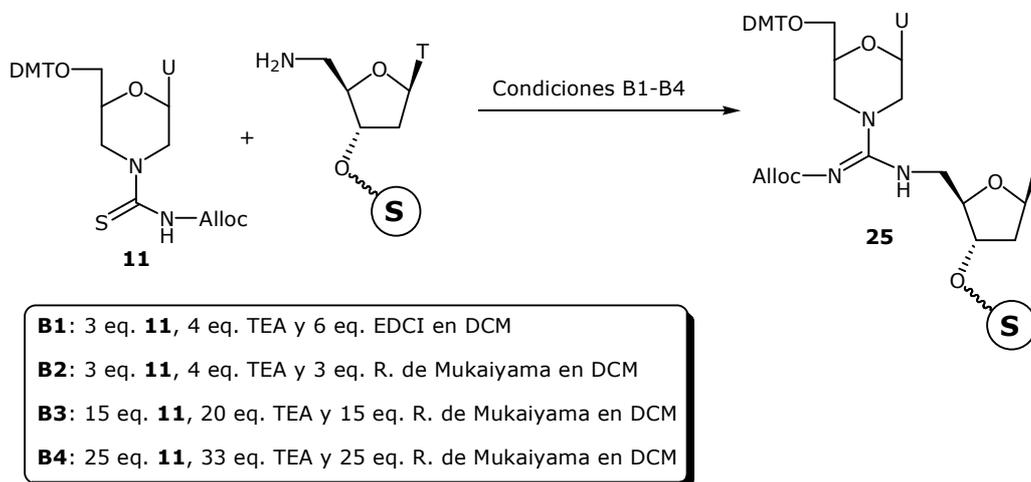
### 3.2 Método B : activación de la tiourea **11** *in situ*

Como alternativa al uso del reactivo de Sanger para la activación de tioureas se decidió ensayar la síntesis del grupo guanidino en fase sólida con reactivos que transforman *in situ* la tiourea en un intermedio electrófilo más reactivo.

En el capítulo 1 (véase apartado 3.3) ya se ensayó esta estrategia utilizando reactivos como  $\text{HgCl}_2$ ,  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , EDCI o el reactivo de Mukaiyama. El uso de sales de Hg(II) o Bi(III) en la síntesis de guanidinas conduce a la formación de sulfuros como subproductos que precipitan en el medio de reacción, lo cual dificulta la síntesis en fase sólida. Finalmente, se optó por ensayar el acoplamiento de la tiourea **11** con EDCI y el reactivo de Mukaiyama, ya que los subproductos que se generan durante la reacción son solubles en disolventes orgánicos, por lo que una vez terminada la reacción pueden separarse de la resina por simple filtración.<sup>13-16</sup>

Los ensayos de acoplamiento empleando EDCI o el reactivo de Mukaiyama se realizaron una vez eliminado el grupo MMT del 5'-aminonucleósido anclado y neutralizada la resina con una solución de TEA en DCM al 10% (**Fig. 2.17**). Los resultados obtenidos en los ensayos así como las condiciones empleadas se resumen en la **Tabla 2.3**. Como en los ensayos descritos en el anterior apartado, se muestran los rendimientos de incorporación del morfolinonucleósido sobre resina por cuantificación UV-vis de la disolución resultante de la eliminación del grupo DMT.

**Figura 2.17 Síntesis de guanidinas en fase sólida activando la tiourea **11** *in situ***



Basándonos en metodologías descritas en la literatura<sup>13,14</sup> y en los ensayos de síntesis de guanidinas en disolución (véase apartado 3.3 del capítulo 1), el acoplamiento de la tiourea **11** se llevó a cabo utilizando como activante EDCI en las condiciones que se indican en la **Fig. 2.17**. Como se resume en la **Tabla 2.3** (ensayo 1.1), después de 1 hora de reacción el porcentaje de incorporación tan sólo era del 8%, por lo que se descartó seguir empleando este reactivo.

**Tabla 2.3 Ensayos de acoplamiento activando la tiourea in situ**

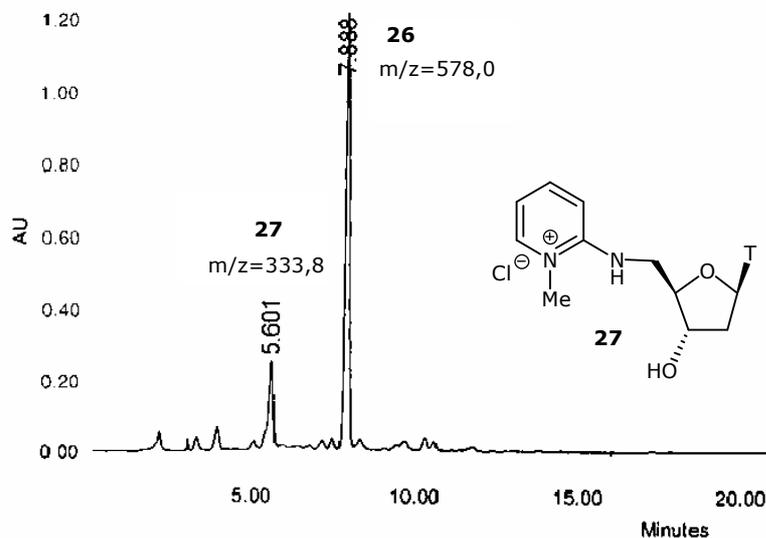
Ensayo	Activante	Condiciones	nº acopl.	t reacción/acopl. (horas)	% acopl. (DMT)	% acopl. (% 26)
1.1	EDCI	B1	1	1	8	11
2.1	Mukaiyama	B2	1	1	67	64
2.2	Mukaiyama	B3	1	1	75	72
2.3	Mukaiyama	B3	2	1	69	67
2.4	Mukaiyama	B3	3	1	72	69
2.5	Mukaiyama	B4	1	1	78	74
2.6	Mukaiyama	B4	1	12	74	71

Se realizó un primer ensayo empleando como agente activante el reactivo de Mukaiyama (yoduro de 2-cloro-*N*-metilpiridinio) (ensayo 2.1) adaptando un procedimiento descrito en la literatura.<sup>15</sup> En primer lugar se añadió una solución de tiourea y TEA sobre la resina, se agitó durante 15 minutos a T ambiente y a continuación se añadió la solución del reactivo de Mukaiyama. Después de 1 hora de reacción a T ambiente el porcentaje de incorporación resultó ser del 67%, por lo que se decidió realizar más ensayos de acoplamiento variando la concentración de reactivos, el tiempo de reacción y el número de acoplamientos para intentar mejorar el resultado obtenido. Tal y como se puede observar en la **Tabla 2.3** el rendimiento de incorporación no se ve afectado al aumentar la concentración de reactivos aplicados a la resina, el número de acoplamientos realizados o el tiempo de reacción, ya que en todos los casos se han obtenido resultados muy similares, entre 67 y 78% de rendimiento.

Tal y como se había realizado en los ensayos del anterior apartado, después de eliminar el grupo DMT y desanclar el producto de la resina, se analizaron por HPLC los crudos resultantes de los ensayos realizados con el reactivo de Mukaiyama. Todos los ensayos presentaban el mismo perfil (**Fig. 2 18**): un producto mayoritario a  $t_R=7,9$  minutos, otro a  $t_R=5,6$  minutos y en todos ellos la ausencia del 5'-aminonucleósido de partida. Después de aislar los dos productos, el análisis por espectrometría de masas (MALDI-TOF, modo positivo) indicaba que el producto mayoritario era el dinucleósido **26** deseado ( $m/z=578,0$ ) y el producto minoritario, que presentaba una  $m/z=333,8$ , correspondía a la sal de 2-(5'-amino-2',5'-didesoxitimidinil)-1-metilpiridinio **27**.

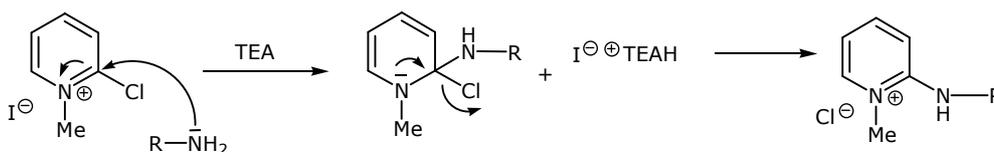
En todos los casos también se calculó el porcentaje de incorporación de la tiourea **11** a partir de las áreas de los cromatogramas. Como la suma de las áreas de los productos **26** y **27** era prácticamente del 100%, se dividió el área de cada producto por su correspondiente coeficiente de extinción molar a 260 nm asumiendo que el valor del coeficiente de extinción molar del producto **27** equivalía al de timidina, o sea,  $8,7 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Tal y como se puede observar en la **Tabla 2.3**, la proporción de los productos en el cromatograma coincidía con los porcentajes de incorporación determinados a partir de los grupos DMT sobre resina.

**Figura 2.18 Cromatograma de HPLC del crudo correspondiente al ensayo 2.3 de la Tabla 2.3. (A: AcONH<sub>4</sub> 0,01 M, B: ACN, 5-100% de B en 30 min.)**



Una posible explicación a la formación del subproducto **27** podría ser que el reactivo de Mukaiyama, además de activar la tiourea, también reaccione con el grupo amino del 5'-aminonucleósido anclado al soporte sólido según un mecanismo de adición-eliminación (**Fig.2.19**). Según esta hipótesis, una manera de evitar esta reacción secundaria sería mezclar previamente la tiourea **11** con el reactivo de Mukaiyama en presencia de TEA y luego tratar la resina con esta solución para evitar al máximo un exceso del reactivo de Mukaiyama.\*

**Figura 2.19 Posible mecanismo de formación de la sal de aminopiridinio 27**

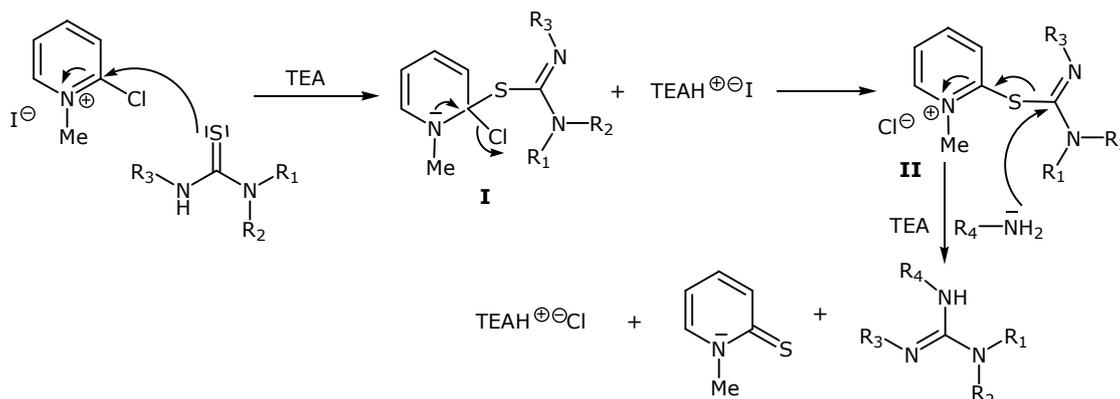


En la literatura se describe el uso del reactivo de Mukaiyama y otras sales de piridinio<sup>15-18</sup> en la obtención del grupo guanidino a partir de tioureas *N,N'*-disustituidas. En este caso se cree que la especie intermedia que se genera es una carbodiimida. Una evidencia de ello es que al hacer reaccionar una tiourea *N,N'*-disustituida con el reactivo de Mukaiyama el análisis por IR indica que la banda correspondiente a C=S (*st.* 1340 cm<sup>-1</sup>) desaparece paulatinamente para dar la correspondiente a N=C=N (*st.* 2132 cm<sup>-1</sup>).<sup>16</sup> Sin embargo, este mecanismo no se aplica en el caso de tioureas *N,N,N'*-trisustituidas ya que no pueden formar carbodiimidas. Por ello, el mecanismo propuesto es que el se esquematiza en

\* Posteriormente se pudo comprobar en el trabajo presentado por J. Alguacil Blanco<sup>1</sup> que se podía minimizar de este modo la formación de la sal de 2-(5'-amino-2',5'-didesoxitimidinil)-1-metilpiridinio.

la **Fig. 2.20**. La primera etapa consistiría en la formación del intermedio **II** por reacción entre la tiourea y la sal de piridinio según un mecanismo de adición-eliminación. En la siguiente etapa probablemente tendría lugar un ataque nucleófilo del grupo amino sobre este intermedio para formar la guanidina y la 1-metil-2-tiopiridona como subproducto de reacción.

**Figura 2.20 Mecanismo propuesto para la formación del grupo guanidino partiendo de tioureas *N,N,N'*-trisustituidas por activación con el reactivo de Mukaiyama**



## **4. Eliminación del grupo Alloc en fase sólida**

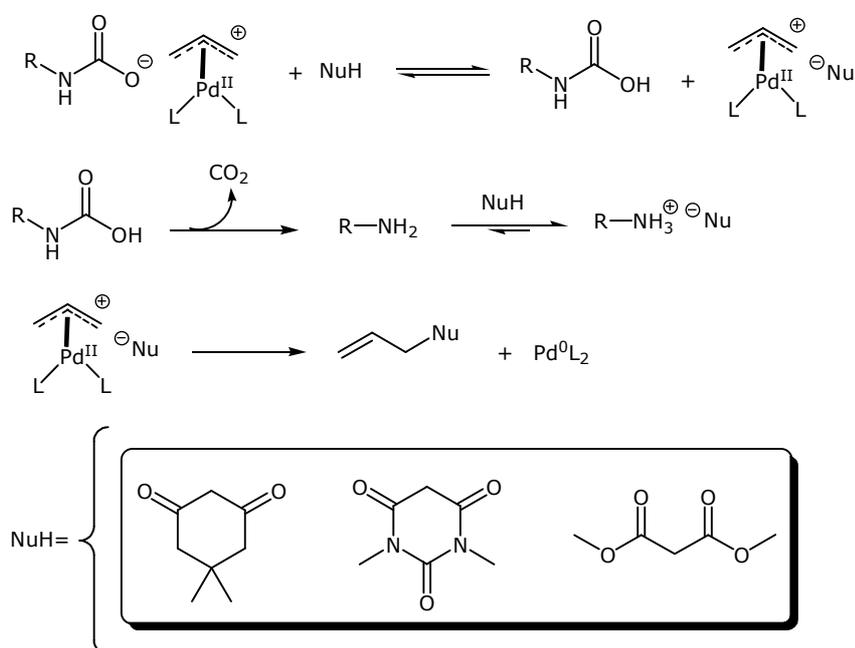
### **4.1 Consideraciones preliminares: métodos para minimizar la formación de alilaminas durante la eliminación del grupo Alloc**

En el capítulo 1 se ensayó la eliminación del grupo Alloc sobre el pentámero T(<sup>m</sup>Ug<sub>(Alloc)</sub>)TC en fase sólida (véase apartado 6.5). Los resultados obtenidos no fueron del todo satisfactorios, ya que se detectó un subproducto de masa M+41 originado por la alilación del grupo guanidino. Para evitar esta reacción secundaria se ensayaron otras dos condiciones de eliminación variando el tipo de capturador (PhSiH<sub>3</sub> o Me<sub>2</sub>NH·BH<sub>3</sub> en lugar de HCOOH/butilamina). Tal y como se verá en el apartado 4.2, esta reacción secundaria se puede suprimir aumentando la concentración de capturador.

En la literatura se han descrito otros tipos de capturadores, como compuestos de tipo β-dicarbonílicos<sup>19-22</sup> o sililaminas<sup>23-25</sup> para evitar la formación de alilaminas durante la eliminación del grupo Alloc como protector de aminas. La 5,5-dimetil-1,3-ciclohexanodiona (dimedona) y el ácido *N,N*-dimetilbarbitúrico son compuestos β-dicarbonílicos de relativa acidez (pK<sub>a</sub>=5,3 y 4,7 respectivamente), que fueron introducidos por H. Kunz<sup>19-21</sup> y colaboradores como capturadores del complejo π-alilo en la eliminación del grupo Alloc. También se ha utilizado malonato de dimetilo<sup>22</sup>, que es otro compuesto β-dicarbonílico de menor acidez (pK<sub>a</sub>=13).

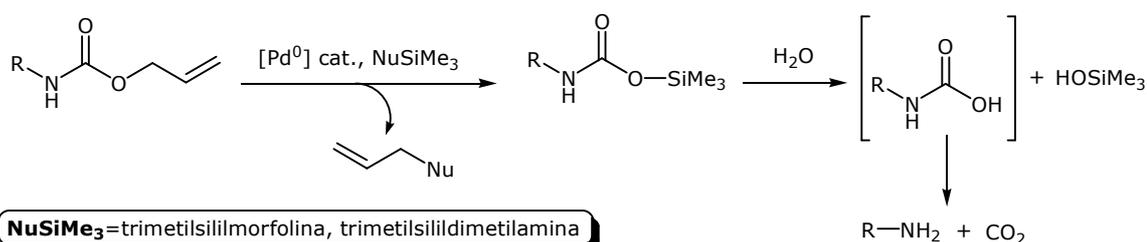
En presencia de estos compuestos, el mecanismo de eliminación del grupo Alloc es el que se indica en la **Fig. 2.21**. En una primera etapa se produce un intercambio ácido-base entre el intermedio carbamato  $\pi$ -alil-Pd y el compuesto  $\beta$ -dicarbonílico (NuH) conduciendo a la formación del enolato Nu<sup>-</sup> y al ácido carbámico, el cual experimenta seguidamente descarboxilación para dar la amina libre. La adición irreversible del enolato sobre el complejo  $\pi$ -alil-Pd permite la regeneración del catalizador completando de este modo el ciclo. A medida que la reacción avanza, la concentración de enolato en el medio va aumentando debido a la reacción ácido-base entre la amina liberada y el capturador. Gracias a la naturaleza irreversible del proceso, su relativa rapidez y a que la amina liberada está protonada por el exceso de capturador, se minimiza la formación de alilaminas.

**Figura 2.21** Compuestos  $\beta$ -dicarbonílicos como capturadores en la eliminación de Alloc catalizada por Pd



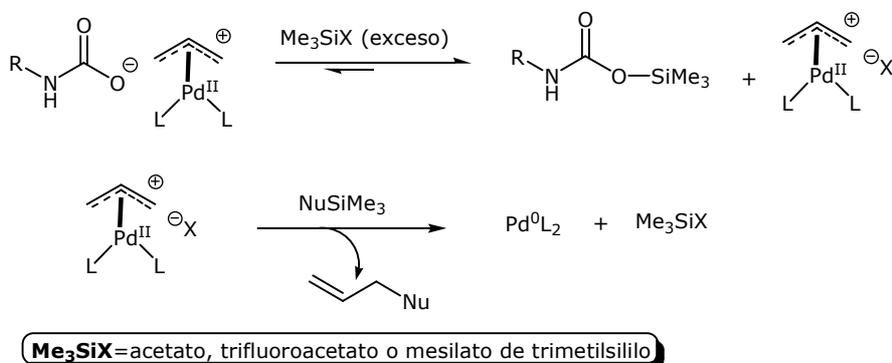
También se han descrito otros procedimientos de desprotección de carbamatos libres de reacciones secundarias utilizando derivados *N*-trimetilsililados de aminas secundarias como capturadores.<sup>23,24</sup> En este caso, los productos de la reacción son los correspondientes carbamatos de trimetilsililo, que se hidrolizan rápidamente en un medio acuoso (**Fig. 2.22**). Como el producto de la reacción es un carbamato de trimetilsililo en vez de la amina libre, se enmascara la nucleofilia del grupo amino y se evita la formación de alilaminas.

**Figura 2.22** Derivados sililaminas como capturadores en la eliminación de Alloc catalizada por Pd



Aún así, dado que los carbamatos de trimetilsililo no se convierten directamente en la amina libre sino que se hidrolizan primero para dar el ácido carbámico y trimetilsilanol, pueden formarse alilaminas en algunos casos como resultado de una condensación descarboxilativa entre el complejo  $\pi$ -alilo y el contraión carbamato.<sup>25</sup> Esta reacción secundaria se puede suprimir llevando a cabo la reacción en presencia de agentes sililantes como acetato, trifluoroacetato o mesilato de trimetilsililo junto al capturador a modo de aditivos.<sup>23-25</sup> El papel que juega el agente sililante es el de eliminar el contraión carbamato antes de que se produzca la condensación descarboxilativa que conduce a la formación de alilaminas (**Fig. 2.23**). El capturador sililamina reacciona entonces sobre el par iónico  $[\pi\text{-alil-Pd}]+X^-$  para regenerar el catalizador de paladio.

**Figura 2.23 Agentes sililantes como aditivos para evitar la formación de alilaminas durante la eliminación del grupo Alloc**



## 4.2 Ensayos de eliminación del grupo Alloc sobre la resina 23

Se llevaron a cabo diversos ensayos de eliminación del grupo ailliloxicarbonilo sobre la resina **23** a una escala de trabajo de 0,1  $\mu\text{mol}$ . Los resultados de estos ensayos de desprotección se recogen en la **Tabla 2.4**. En todos los casos, para limitar la formación de alilaminas se tomó la precaución de trabajar a una concentración mayor de capturador que la utilizada para los ensayos de desprotección del pentámero T(<sup>m</sup>Ug<sub>(Alloc)</sub>)TC, siendo 0,6 M.

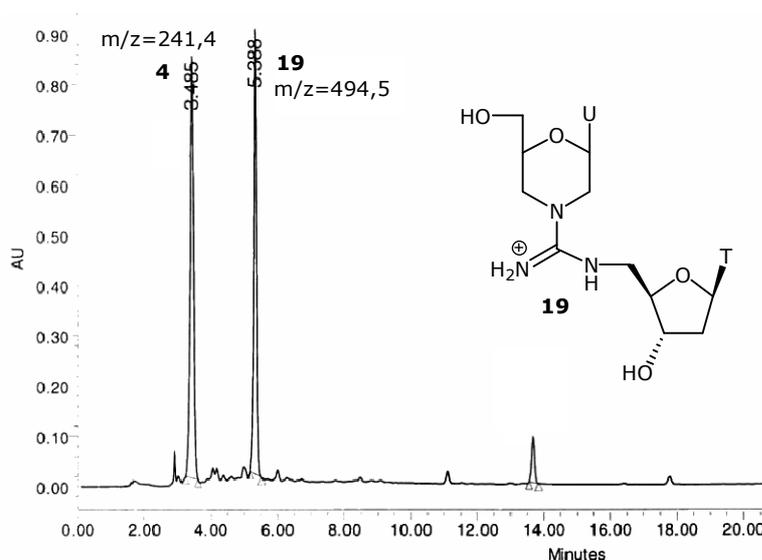
**Tabla 2.4 Ensayos de eliminación del grupo Alloc sobre la resina 25**

Ensayo	Capturador*	Condiciones	Resultado
1	malonato de dimetilo	30 min.	desprotección completa
2	trimetilsililmorfolina/AcOSiMe <sub>3</sub> (1:1)	10 min.	desprotección completa
3	HCOOH/BuNH <sub>2</sub> 1:1	1 h	desprotección completa
4	PhSiH <sub>3</sub>	(10 min.)x2	desprotección completa
5	Me <sub>2</sub> NH.BH <sub>3</sub>	(10 min.)x2	desprotección completa

\*En todos los casos se trabajó con una solución 0,6 M de capturador y 0,01 M de Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> en THF anhidro.

En primer lugar se ensayó la eliminación del grupo aliloxicarbonilo con capturadores del complejo  $\pi$ -alilo que evitan la formación de alilaminas. Basándonos en los procedimientos comentados anteriormente, se ensayó la eliminación del grupo protector con catálisis de paladio en presencia de capturadores como malonato de dimetilo<sup>22</sup> (ensayo 1) y trimetilsililmorfolina empleando acetato de trimetilsililo como aditivo<sup>23</sup> (ensayo 2). Después de realizar el desanclaje de resina por tratamiento con amoniaco acuoso concentrado, se analizó el producto resultante por HPLC (**Fig. 2.24**).

**Figura 2.24** Cromatograma de HPLC del crudo correspondiente al ensayo 1 de la Tabla 2.4. (A: AcONH<sub>4</sub> 0,01 M, B: ACN, 5-100% de B en 30 min.)



Tal y como se ha indicado anteriormente, en los ensayos de desprotección se han utilizado resinas en las que el rendimiento de incorporación de la isotiourea **24** estaba entre el 31-37% (**Tabla 2.2**) por tanto, el producto que eluye a  $t_R=3,5$  minutos corresponde a 5'-amino-2',5'-didesoxitimidina (**4**). En ambos casos no se observó la presencia del producto sin desproteger y se observó que se había formado el mismo producto a  $t_R=5,4$  minutos. Después de purificarlo, el análisis por espectrometría de masas (MALDI-TOF, modo positivo), indicaba que se trataba del producto de desprotección **19**. En ninguno de los dos casos se detectó el producto correspondiente a la alilación del grupo guanidino.

También se ensayaron los capturadores empleados en la desprotección de T<sup>(m)Ug</sup><sub>(Alloc)</sub>TTC (véase apartado 6.5 del capítulo 1), HCOOH/BuNH<sub>2</sub>, PhSiH<sub>3</sub> y MeNH<sub>2</sub>.BH<sub>3</sub> (**Tabla 2.4**, ensayos 3, 4 y 5 respectivamente). Se ha de destacar que el ensayo realizado con HCOOH/BuNH<sub>2</sub> se realizó a temperatura ambiente debido a la dificultad que suponía llevar a cabo la reacción en una columna de síntesis de oligonucleótidos y calentar a 55°C. No obstante, después de llevar a cabo el desanclaje y analizar el resultado por HPLC se observó en todos los casos que la eliminación del grupo protector era completa y en ningún caso se detectó la formación del derivado guanidino alilado. Dado que todos los tratamientos

realizados conducían al mismo resultado satisfactorio, cabe pensar que cualquiera de ellos es adecuado para desproteger la guanidina. En este caso, la ausencia del subproducto de N-alilación, el cual se había observado en la obtención del pentámero **17**, cabe atribuirla a haber empleado un mayor exceso de capturador.

## **5. Síntesis y purificación de los oligonucleótidos modificados con unidades de morfolino-amidina, 14E1 y 14E2**

Disponiendo de una metodología para incorporar convenientemente una unidad de morfolino-amidina en un oligonucleótido por formación de un enlace guanidino en fase sólida y para llevar a cabo la desprotección de la guanidina, se pasó a sintetizar oligonucleótidos con qué ensayar el efecto de la modificación en la formación de dobles y triples hélices. Las secuencias de los oligonucleótidos sintetizados se indican en la **Tabla 2.5**.

***Tabla 2.5 Secuencias de los oligonucleótidos modificados sintetizados***

ODN	Secuencia
14E1	5'CTTTCTTCTCTT( <sup>m</sup> UgT)
14E2	5'CTTTC( <sup>m</sup> UgT)CTCTTT

### **5.1 Síntesis del oligonucleótido modificado 14E1**

Para la síntesis del oligonucleótido modificado con la unidad <sup>m</sup>UgT en el extremo 3' se siguió la metodología descrita en los anteriores apartados. En primer lugar, se incorporó la tiourea **11** sobre la resina **23** (escala 4 µmol), utilizando el reactivo de Mukaiyama como agente acoplante, siguiendo el procedimiento mencionado en el apartado 3.2.1 (**Tabla 2.3**, ensayo 2.5). El rendimiento de formación de la guanidina fue en este caso del 75%, por lo que la funcionalización de la resina obtenida era de 25 µmol/g.

Una vez preparada la resina **25**, el resto de la cadena puede sintetizarse mediante el ciclo de síntesis estándar de los oligonucleótidos fosfato. En este caso, la elongación de la misma cadena se llevó a cabo en cuatro ocasiones en un sintetizador Applied Biosystems Expedite™, a una escala de 0,5 µmol (20 mg de nucleosidilresina), con un rendimiento de síntesis que oscilaba entre el 75% y el 82% y un rendimiento medio por acoplamiento alrededor del 98%.

### **5.2. Eliminación del grupo Alloc y purificación de 14E1**

Antes de desanclar el oligonucleótido del soporte y eliminar los grupos protectores de las nucleobases y de los grupos fosfodiéster, se llevó a cabo la eliminación del grupo protector Alloc sobre la guanidina.

En el apartado 4.2 se ha descrito la eliminación del grupo aliloxycarbonilo en fase sólida con diferentes capturadores del complejo  $\pi$ -alilo. En aquel caso, la escala de trabajo era de 0,1  $\mu\text{mol}$  con una funcionalización de grupos aliloxycarbonilo de 11-13  $\mu\text{mol/g}$ . Para llevar a cabo la desprotección, la concentración de capturador fue 0,6 M y la de catalizador 0,01 M en THF. Por lo que respecta a 14E1, la escala de trabajo fue de 0,5  $\mu\text{mol}$ , y la cantidad presente de grupos aliloxycarbonilo era de 25  $\mu\text{mol/g}$ . En todas las desprotecciones se empleó malonato de dimetilo como capturador, siendo las concentraciones de capturador y de catalizador las mismas que para desproteger la resina **23**. Para llevar a cabo la eliminación del grupo Alloc, se ensayaron las condiciones resumidas en la **Tabla 2.6**. Las variables ensayadas fueron dos: el tiempo de tratamiento y, dado que el catalizador podía perder eficacia con el tiempo, el número de tratamientos.

**Tabla 2.6 Tratamientos de desprotección de 14E1(I)-(IV) con paladio**

Ensayo	ODN	t reacción	nº tratamientos	% eliminación Alloc
1	14E1(I)	30 min.	1	28%
2	14E1(II)	1h	1	42%
3	14E1(III)	1h	2	57%
4	14E1(IV)	1h	3	83%

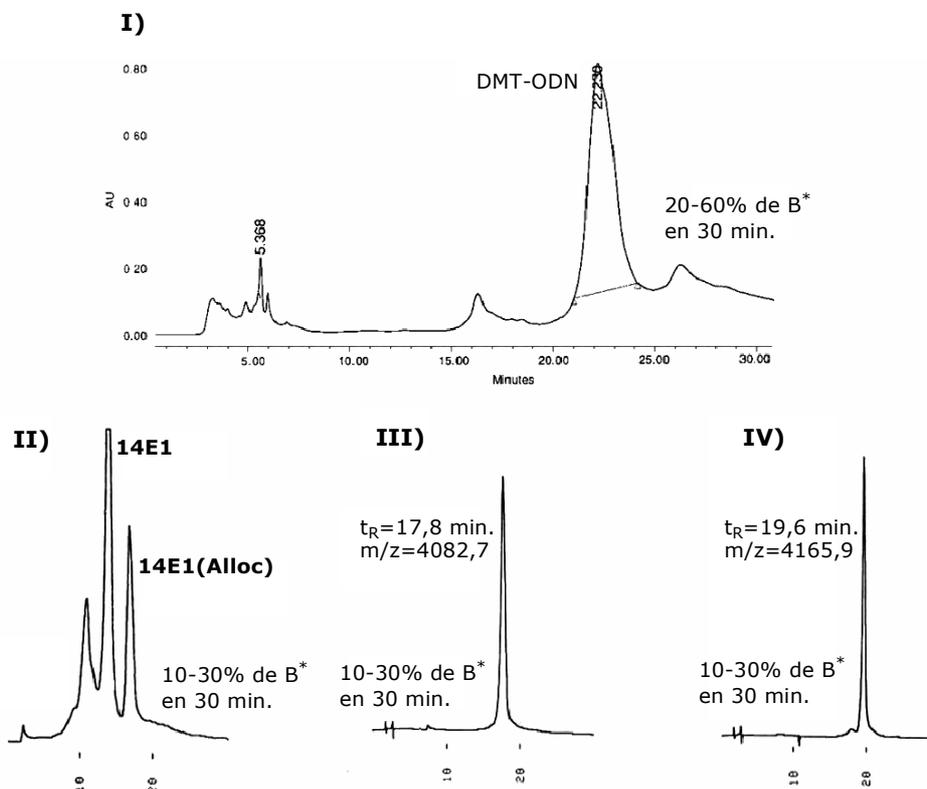
Una vez llevado a cabo el tratamiento de eliminación del grupo Alloc, se completó la eliminación del resto de grupos protectores y se liberó el producto de la resina por tratamiento con una disolución de amoníaco concentrado a 55°C durante 6 horas. Se mantuvo protegido el hidroxilo primario 5' para facilitar la purificación.

Tras aislar el DMT-oligonucleótido por cromatografía líquida semipreparativa y eliminar el grupo DMT, el análisis por HPLC indicaba que la fracción purificada al menos contenía tres productos. Tras volver a purificar por cromatografía líquida semipreparativa, el análisis por espectrometría de masas (MALDI-TOF, modo negativo), indicaba que la primera fracción correspondía a oligómeros con secuencias de delección, probablemente generados durante la síntesis. La segunda fracción recogida correspondía al producto esperado y la tercera al oligómero sin desproteger. En la **Tabla 2.6** se indica el porcentaje de desprotección calculado a partir del área a 260 nm del análisis por HPLC. La **Fig. 2.25** muestra a modo de ejemplo los cromatogramas de HPLC semipreparativo de los crudos de síntesis de los oligonucleótidos con y sin el grupo DMT y los cromatogramas de HPLC analítico correspondientes a 14E1 y 14E1(Alloc) una vez purificados.

En la eliminación del grupo aliloxycarbonilo se observó que al prolongar el tiempo de tratamiento hasta 1 hora aumentaba el porcentaje de desprotección, aunque distaba aún de ser cuantitativo (ensayo 2, **Tabla 2.6**). Dado que era probable que la eficacia del catalizador disminuyera paulatinamente con el tiempo, se consideró aumentar el número de tratamientos. Efectivamente, el porcentaje de oligonucleótido desprotegido aumentó hasta prácticamente un valor cuantitativo cuando se realizaron tres tratamientos de eliminación del grupo Alloc de forma consecutiva (ensayo 4, **Tabla 2.6**). Para determinar el rendimiento se

llevó a cabo la cuantificación de los oligonucleótidos obtenidos, (véase apartado C.4 de Materiales y Métodos). En la **Tabla 2.7** se indica la cantidad y el rendimiento obtenido para cada uno de ellos así como el coeficiente de extinción molar calculado.

**Figura 2.25 Cromatogramas de HPLC obtenidos en la purificación de 14E1 (ensayo 4 de la Tabla 2.6)**



I) crudo 14E1 DMT-ON, II) crudo 14E1 DMT-OFF, III) 14E1, IV) 14E1(Alloc)

\*eluyentes: A: AcONH<sub>4</sub> 0,05 M, B: H<sub>2</sub>O/ACN 1:1

**Tabla 2.7 Rendimiento global obtenido**

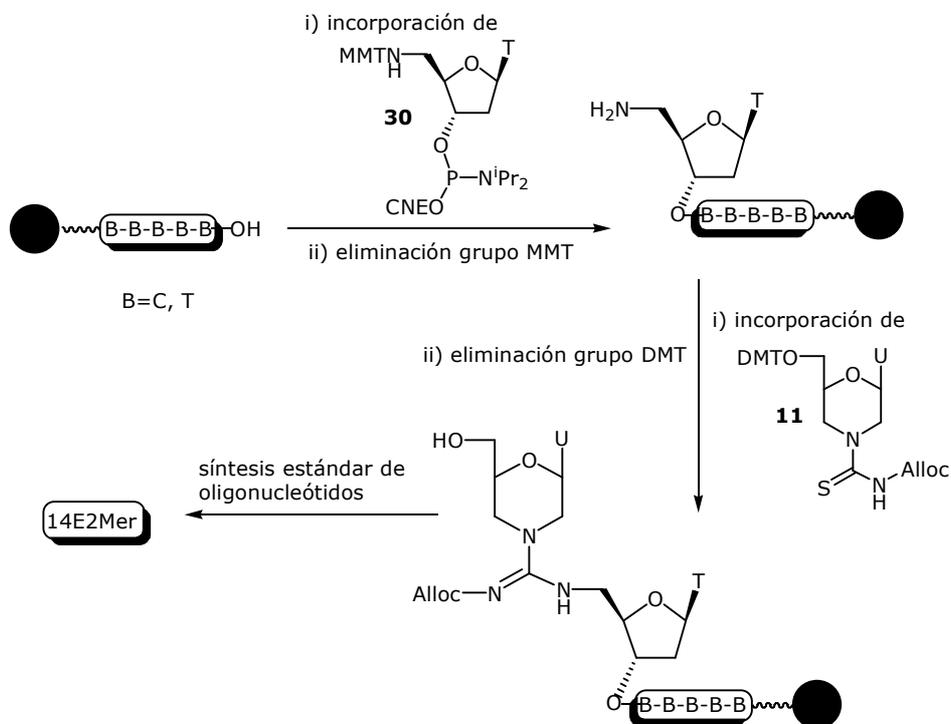
ODN	$\epsilon_{260}$ (mM <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )	OD <sub>260</sub> (teórico)	OD <sub>260</sub>	Rdto.
14E1(I)	106,2	53,1	2,7	5%
14E1(II)			3,7	7%
14E1(III)			3,2	6%
14E1(IV)			7,0	13%

### 5.3 Síntesis del oligonucleótido modificados 14E2

Para llevar a cabo a síntesis del oligonucleótido modificado 14E2 (**Fig. 2.26**), que contiene una unidad de guanidina en una posición interna de la secuencia, era necesario disponer del derivado fosforamidito de 5'-N-(4-monometoxitritil)amino-5'-didesoxitimidina. Este derivado se incorporó en el punto requerido de la cadena en crecimiento según la metodología estándar de síntesis de oligonucleótidos. Una vez liberado el grupo MMT, se

incorporó la tiourea **11** por reacción con el grupo amino sobre resina en presencia del reactivo de Mukaiyama para formar la unión guanidina. Finalmente, se continuó con la elongación de la cadena hasta tener el oligonucleótido modificado con la secuencia requerida mediante la metodología estándar.

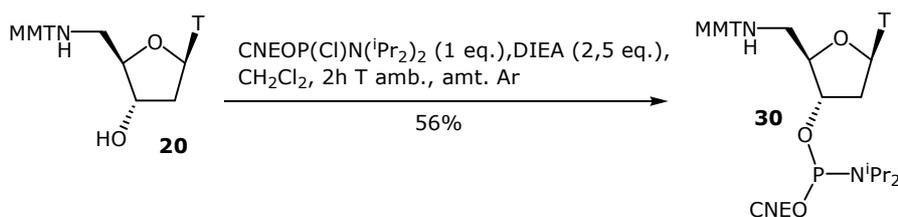
**Figura 2.26 Esquema de síntesis del oligonucleótido 14E2Mer**



### 5.3.1 Síntesis del derivado fosforamidito de 5'-N-(4-monometoxitritil)amino-5'-didesoxitimidina

El derivado fosforamidito **30** se preparó empleando 2-cianoetil-*N,N*-clorodiisopropilfosfina en presencia de DIEA (**Fig. 2.27**). Como después de 2 horas de reacción a temperatura ambiente aún quedaba producto de partida se volvió a añadir más fosfina (0,5 eq.) y DIEA (1,2 eq.) y se dejó reaccionar una 1 hora más. Pasado este tiempo, el análisis por CCF indicaba que el nucleósido de partida se había consumido.

**Figura 2.27 Síntesis del derivado 5'-N-(4-monometoxitritil)amino-5'-didesoxitimidina**



El crudo de reacción resultante se purificó por cromatografía en columna. Para acabar de secar el producto obtenido se disolvió en benceno anhidro (secado sobre Na) y se liofilizó,

obteniéndose de este modo un sólido blanco, con un rendimiento del 56%. El análisis por RMN <sup>31</sup>P (CDCl<sub>3</sub>, 81 MHz) indicaba la presencia de dos señales a δ=150,05 y 150,30 (mezcla de dos diastereómeros) correspondientes al producto deseado **30**.

### 5.3.2 Síntesis de 14E2

La síntesis del oligonucleótido con la unidad <sup>m</sup>UgT en la parte central de la cadena se ha realizado partiendo de una resina de origen comercial con el primer nucleósido ya incorporado al soporte sólido por el extremo 3', a una escala de trabajo de 1 μmol, y con una funcionalización inicial alrededor de 40 μmol/g.

La síntesis del oligonucleótido 14E2 se ha llevado a cabo en diversas etapas para conseguir introducir la unidad de guanidina en una posición intermedia de la secuencia. En primer lugar se llevó a cabo la elongación de la cadena hasta el residuo de citosina justo antes de incorporar el fosforamidito **30**. Según se recoge en la **Tabla 2.8**, el rendimiento de esta primera etapa fue del 69%, según se pudo determinar de las disoluciones de destrilación. En una segunda etapa, se incorporó el derivado fosforamidito **30** mediante la misma metodología de los nucleósidos no modificados. El rendimiento de incorporación de este nucleósido fue del 91%.

**Tabla 2.8 Rendimiento de síntesis de 14E2 por tramos**

CTTTC( <sup>m</sup> UgT)CTCTTTT		
Tramo	Rdto. acoplamiento	Rdto. Síntesis acumulado
CTCTTTT	-----	69%
NH <sub>2</sub> -TCTCTTTT	91%	63%
( <sup>m</sup> UgT)CTCTTTT	78%	49%
DMT-CTTTC( <sup>m</sup> UgT)CTCTTTT	-----	41%

En la siguiente etapa se pasó a formar la guanidina. En primer lugar, se eliminó el grupo MMT que protegía el grupo amino 5', para luego incorporar la subunidad de morfolinouridina por formación de la guanidina, empleando la metodología del apartado 3.2.1, que consistía en activar el grupo tiourea de la morfolinouridina con el reactivo de Mukaiyama. El rendimiento de formación de guanidina determinado mediante la absorbancia de la disolución de destrilación llevada a cabo después del acoplamiento fue del 78%. Aunque netamente inferior a los porcentajes de incorporación de los nucleósidos fosforamidito, permitió continuar con la síntesis del oligonucleótido.

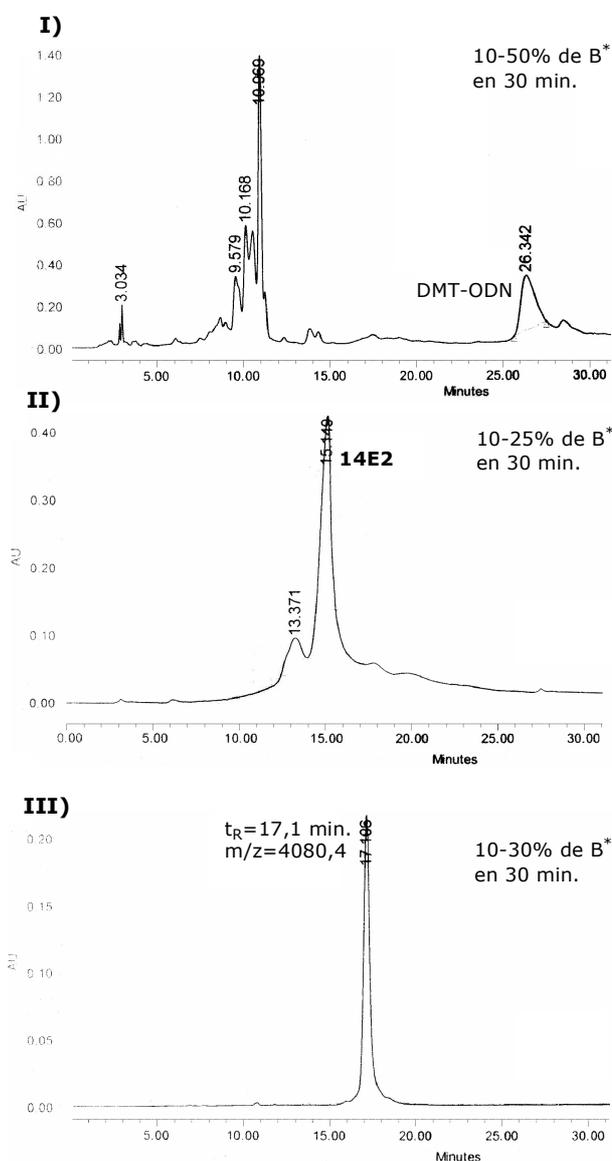
Finalmente, se realizó la elongación de la cadena, completando de este modo la síntesis mediante la metodología estándar del fosfito-triéster. El rendimiento de síntesis acumulado hasta la incorporación del penúltimo nucleósido fue del 41% (el porcentaje de

incorporación del último nucleósido no se pudo determinar porque se decidió mantener el grupo DMT para facilitar la purificación del oligonucleótido).

### 5.3.3 Eliminación del grupo Alloc y purificación de 14E2

Para llevar a cabo la desprotección del oligonucleótido se procedió de la misma manera que con el oligonucleótido 14E1, el cual contenía la unidad guanidino en el extremo 3'. En primer lugar se eliminó en fase sólida el grupo protector Alloc empleando el tratamiento de la **Tabla 2.6** ( $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  0,01 M, malonato de dimetilo 0,6 M en THF, 4X1h). A continuación, se trató la resina con una disolución de amoniaco acuoso concentrado a 55°C durante 6 horas para eliminar el resto de grupos protectores y liberar el oligonucleótido. El crudo fue analizado por HPLC analítico tal y como se muestra en la **Fig. 2.28**.

**Figura 2.28** Cromatogramas de HPLC obtenidos en la purificación de 14E2



I) crudo de 14E2 DMT-ON, II) crudo de 14E2 DMT-OFF, III) 14E2

\*eluyentes:  $\text{AcONH}_4$  0,05M, B:  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$  1:1

El DMT-oligonucleótido ( $t_R=26,3$  minutos) fue convenientemente aislado por HPLC en condiciones semipreparativas. Tras eliminar el grupo DMT por tratamiento con HAcO al 80% a 0°C, se analizó nuevamente por HPLC para mostrar el cromatograma II de la **Fig. 2.28**, en el que se observaban dos productos ( $t_R=13,4$  y 15,1 minutos, respectivamente). Ambos productos fueron separados por cromatografía líquida semipreparativa.

El análisis por espectrometría de masas (MALDI-TOF, modo negativo), indicaba que la fracción de menor  $t_R$  correspondía a una mezcla de oligómeros de deleción. La fracción de mayor  $t_R$ , era mayoritaria, y correspondía al producto esperado ( $m/z=4080,4$ ). En este caso no se detectó el oligómero protegido aún con el grupo Alloc. Una vez purificado se obtuvieron 10,1 OD<sub>260</sub>, lo que supone un rendimiento global del 9,5%. En la **Fig. 2.28** se muestran los cromatogramas correspondientes a la purificación de 14E2 (I y II) y el cromatograma correspondiente a 14E2 una vez purificado (III).

## **6. Resumen de los resultados obtenidos**

En el capítulo que aquí se resume se ha adaptado la metodología empleada en solución para la síntesis de guanidinas a la síntesis en fase sólida. Esta metodología consistía en emplear el reactivo de Sanger para obtener un intermedio reactivo tipo isotiourea, el cual por reacción con un derivado 5'-aminonucleósido daba lugar a un dinucleósido de tipo guanidino.

Para ello era necesario disponer de un derivado tiourea de un morfolinonucleósido protegido y de un derivado 5'-aminonucleósido anclado a un soporte sólido. Ya que en un principio no se descartó llevar a cabo la activación del derivado tiourea y la etapa de acoplamiento en presencia de DBU, se decidió incorporar un residuo de sarcosina entre el soporte y el nucleósido para evitar desanclajes prematuros del nucleósido. Inicialmente, se realizaron diversos ensayos de acoplamiento empleando esta metodología variando el número de acoplamientos, el tiempo de reacción y el número de equivalentes de los reactivos, pero en ningún caso se logró superar el 40% de incorporación sobre el soporte sólido. Probablemente, el bajo rendimiento de la reacción fuera debido a que la reacción en fase sólida era demasiado lenta, por lo que se decidió ensayar otras metodologías.

Como alternativa al uso del reactivo de Sanger para la activación de tioureas, se decidió ensayar la síntesis del grupo guanidino en fase sólida con reactivos que transforman tioureas en intermedios electrófilos más reactivos en el medio de reacción. Según esta estrategia, se ensayó la EDCI como reactivo activante, pero al obtener una incorporación del derivado tiourea al soporte sólido inferior al 10% se descartó. Cuando se empleó el reactivo de Mukaiyama se obtuvo un porcentaje de incorporación alrededor del 70%, por lo que se decidió explorar más detalladamente el uso de este reactivo. También en este caso, se realizaron diversos ensayos, pero el porcentaje de incorporación se mantenía alrededor del

70%. El análisis de los crudos de reacción indicaba que en todos los casos se había formado sólo el producto esperado y un producto secundario que correspondía al producto de reacción entre el reactivo de Mukaiyama y el 5'-aminonucleósido anclado al soporte. Se vió que una manera de reducir esta reacción secundaria era mezclar previamente el derivado tiourea y el reactivo de Mukaiyama y para luego tratar la resina con esta solución.

Se ensayó luego la eliminación del grupo Alloc en fase sólida sobre el dímero  ${}^m\text{Ug}_{(\text{Alloc})}\text{T}$ -succinilsarcosinil-resina. Se ensayaron diferentes reactivos para tratar de obtener unas condiciones óptimas que evitaran la reacción secundaria de formación de alilaminas. Se emplearon reactivos ya utilizados con anterioridad ( $\text{PhSiH}_3$ ,  $\text{Me}_2\text{NH}\cdot\text{BH}_3$  y  $\text{HCOOH}/\text{BuNH}_2$ ), así como reactivos nuevos (malonato de dimetilo y trimetilsililmorfolina/trimetilsililacetato). En todos ellos se comprobó que empleando una concentración elevada de reactivo se consiguió la desprotección completa del grupo guanidino y la supresión de la reacción secundaria.

Una vez se dispuso de la metodología adecuada se sintetizaron dos análogos de DNA 14mer, cada uno con una unidad  ${}^m\text{Ug}_{(\text{Alloc})}\text{T}$  en dos posiciones diferentes de la secuencia. Con el objetivo de estudiar el efecto de la modificación en la estabilidad de dobles y triples hélices, se sintetizó el oligonucleótido con una unidad morfolino-amidina en el extremo 3' de la cadena (14E1), y otro en la parte central (14E2). Para la síntesis de 14E1 tan sólo se necesitaba preparar la resina  ${}^m\text{Ug}_{(\text{Alloc})}\text{T}$ -succinilsarcosinil-LCAA-CPG y proceder luego a la elongación de la cadena en un sintetizador automático. En cambio, para la síntesis de 14E2 se necesitaba disponer de un derivado fosforamidito del correspondiente 5'-MMT-aminonucleósido, incorporarlo sobre la cadena en crecimiento en un sintetizador automático y después incorporar el derivado morfolinonucleósido formando el enlace guanidino para finalmente proseguir con la elongación de la cadena en un sintetizador. El análogo 14E1 se sintetizó en cuatro ocasiones con un rendimiento global de síntesis que se situaba entre el 80 y el 85%. El análogo 14E2 se sintetizó tan sólo una vez, siendo la incorporación del derivado fosforamidito del 91% y la incorporación del derivado tiourea del 78%. En este caso, se obtuvo un rendimiento global de síntesis alrededor del 40%. Una vez obtenidos los análogos de DNA modificados se procedió a la eliminación del grupo Alloc en fase sólida. Al realizar la eliminación con las condiciones ya ensayadas anteriormente (empleando malonato de dimetilo como capturador), tan sólo se obtuvo un 28% de eliminación del grupo Alloc. Al aumentar el número de tratamientos a cuatro y el tiempo de reacción (una hora por cada tratamiento), se obtuvo la eliminación completa del grupo protector. En ningún caso se detectaron productos de alilación del grupo guanidino. Los oligonucleótidos así sintetizados se emplearon en los experimentos de formación de dobles y triples hélices que se describen en el próximo capítulo.

## **7. Bibliografía**

- (1) Alguacil Blanco, J.; *Síntesis de guanidinas en fase sólida destinada a la preparación de oligonucleótidos modificados*, Máster Experimental en Química Orgánica, Universidad de Barcelona, (2006)
- (2) Blackburn, G.M; Gait, M. J.; *Nucleic acids in Chemistry and Biology*, Oxford University Press, Oxford UK, (1996)
- (3) Beaucage, S. L.; Iyer, R. P.; *Tetrahedron*, 48, 12, 2223-2311, (1992)
- (4) Brown, T; Pritchard, C. E.; Turner, G.; Salisbury, S. A.; *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 891-893, (1989)
- (5) Palom, Y.; Grandas, A.; Pedroso, E.; *Nucleosides Nucleotides*, 17, 7, 1177-1182, (1998)
- (6) Bannwarth, W.; *Helv. Chim. Acta*, 71, 1517-1527, (1988)
- (7) Linkletter, B. A.; Szabo, I. E.; Bruice, T. C.; *Nucleic Acids Res.*, 29, 11, 2370-2376, (2001)
- (8) Reddy, P. M.; Bruice, T. C.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 13, 1281-1285, (2003)
- (9) Challa, H.; Bruice, T. C.; *Bioorg. Med. Chem.*, 12, 1475-1481, (2004)
- (10) Szabo, I. E.; Bruice, T. C.; *Bioorg. Med. Chem.*, 12, 4233-4244, (2004)
- (11) Ma, Y.; Sonveaux, E.; *Biopolymers*, 28, 965-973, (1989)
- (12) Damha, M. J.; Giannaris, P. A.; *Nucleic Acids Res.*, 18, 3813-3821, (1990)
- (13) Schneider, S. E.; Bishop, P. A.; Salazar, M. A.; Bishop, O. A.; Anslyn, E. V.; *Tetrahedron*, 54, 15063-15086, (1998)
- (14) Linton, B. R.; Carr, A. J.; Orner, B. P.; Hamilton, A. D.; *J. Org. Chem.*, 65, 1566-1568, (2000)
- (15) Yong, Y. F.; Kowalski, J. A.; Lipton, M. A.; *J. Org. Chem.*; 62, 1540-1542, (1997)
- (16) Drewry, D. H.; Ghiron, Ch.; *Tetrahedron Lett.*, 41, 6989-6992, (2000)
- (17) Katritzky. A. R.; Taylor, R. J. K.; *Comprehensive Organic. Functional group transformations II*, Vol.6, Elsevier, Pergamon, Oxford, (2005)
- (18) *Science of Synthesis: Houben-Weyl Methods of Molecular Transformations*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, (2005)
- (19) Kunz, H.; Unverzagt, C.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 23, 6, 436-437, (1984)
- (20) Kunz, H.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 26, 294-308, (1987)
- (21) Kunz, H.; März, J.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 27, 1375-1377, (1987)
- (22) Schultz, M.; Hermann, P.; Kunz, H.; *Synlett*, 37-38, (1992)
- (23) Merzouk, A.; Guibé, F.; *Tetrahedron Lett.*, 33, 4, 477-480, (1992)
- (24) Garro-Helion, F.; Merzouk, A.; Guibé, F.; *J. Org. Chem.*, 58, 22, 6109-6113, (1993)
- (25) Guibé, F.; *Tetrahedron*, 54, 2967-3042, (1998)



*Capítulo 3. Estudio de dobles y triples hélices que contienen la unidad  $mUgT$*

---



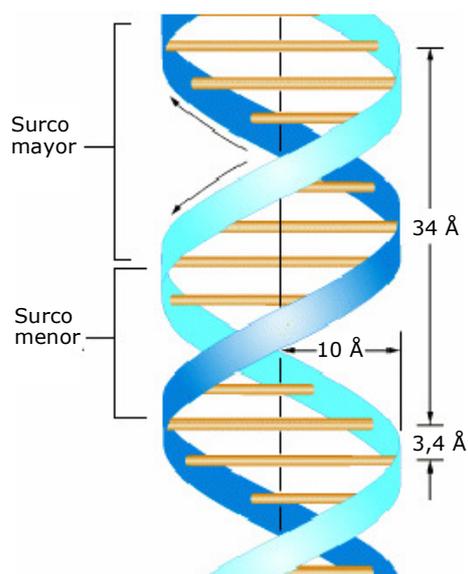
## **1. Introducción**

En el presente capítulo se describen los resultados de los estudios de hibridación de los oligonucleótidos que contienen la unidad morfolino-amidina (<sup>m</sup>UgT), cuya síntesis se ha descrito en el anterior capítulo. Antes de ello, se ha creído conveniente incluir un breve resumen sobre la estructura de dobles y triples hélices, cuya formación se estudiará en los experimentos de hibridación y también, recopilar los datos existentes en la bibliografía o que se han publicado durante la realización del presente trabajo sobre las propiedades de hibridación y de estructura de los oligonucleótidos guanidino.

### **1.1 Estructura de la doble hélice de B-DNA**

La elucidación de la estructura del DNA por J. D. Watson y F. Crick<sup>1</sup> fue la culminación de numerosos resultados experimentales previos aportados por un gran número de investigadores. Entre otros, la equivalencia A-T y C-G entre las nucleobases en el DNA fue establecida por E. Chargaff,<sup>2</sup> y A. R. Todd y colaboradores<sup>3</sup> determinaron que el DNA estaba formado por desoxirribonucleótidos unidos mediante un enlace fosfato entre el hidroxilo 5' de un nucleósido y el hidroxilo 3' del nucleósido adyacente. En la **Fig. 3.1** se representa de forma esquemática la forma B de una doble hélice de DNA: las dos cintas representan el esqueleto ribosa-fosfato y las líneas horizontales los pares de bases.

**Figura 3.1 Modelo de la forma B de una doble hélice de DNA**



En una doble hélice típica de DNA en su forma B las dos cadenas se disponen antiparalelamente, de manera que los pares de bases se colocan en un plano perpendicular al eje de la hélice, mientras que el esqueleto azúcar-fosfato está orientado hacia el exterior, de forma que las cargas negativas de los fosfatos quedan expuestas al disolvente. Las nucleobases se encuentran enfocadas hacia el interior estableciendo entre ellas enlaces de

hidrógeno siguiendo el modelo descrito por Watson y Crick,<sup>1</sup> que mantienen unidas las dos cadenas complementarias. Las parejas de bases se disponen unas sobre otras en diferentes pisos perpendiculares al eje de la hélice, estableciéndose interacciones dipolo-dipolo inducido y de van der Waals, que en conjunto se denominan interacciones de apilamiento.<sup>4,5</sup>

Los enlaces glicosídicos que conectan los pares de bases a sus anillos de ribosa no se disponen opuestos uno respecto a otro y por lo tanto, los esqueletos ribosa-fosfato de la doble hélice no están igualmente espaciados a lo largo del eje de la hélice, dando lugar a surcos de diferente tamaño llamados surco mayor y surco menor (**Fig. 3.1**). El DNA es altamente flexible y puede adoptar una gran variedad de estructuras helicoidales dependiendo de la secuencia, el entorno iónico, la temperatura, el disolvente o la unión de ligandos.<sup>5</sup> Se cree que la forma B es la conformación predominante en los organismos vivos<sup>6</sup> (**Fig. 3.1**), y se caracteriza por ser una doble hélice antiparalela y dextrógira con una periodicidad de 10 bases por giro y una distancia de aproximadamente 3,4 Å entre los pares de bases.

Como se ha comentado anteriormente, el DNA no sólo adopta dobles hélices sino que en función de la secuencia puede también formar estructuras con más de dos cadenas, denominadas por ello motivos multicadena, como son las triples hélices, que implican la participación de hasta tres cadenas oligonucleotídicas y las denominadas cuádruplex de guanina y los motivos *i* de citosina, formadas por la interacción de hasta cuatro cadenas. Por relación con el trabajo que expone el presente capítulo, se resumen en el próximo apartado las propiedades de las triples hélices.

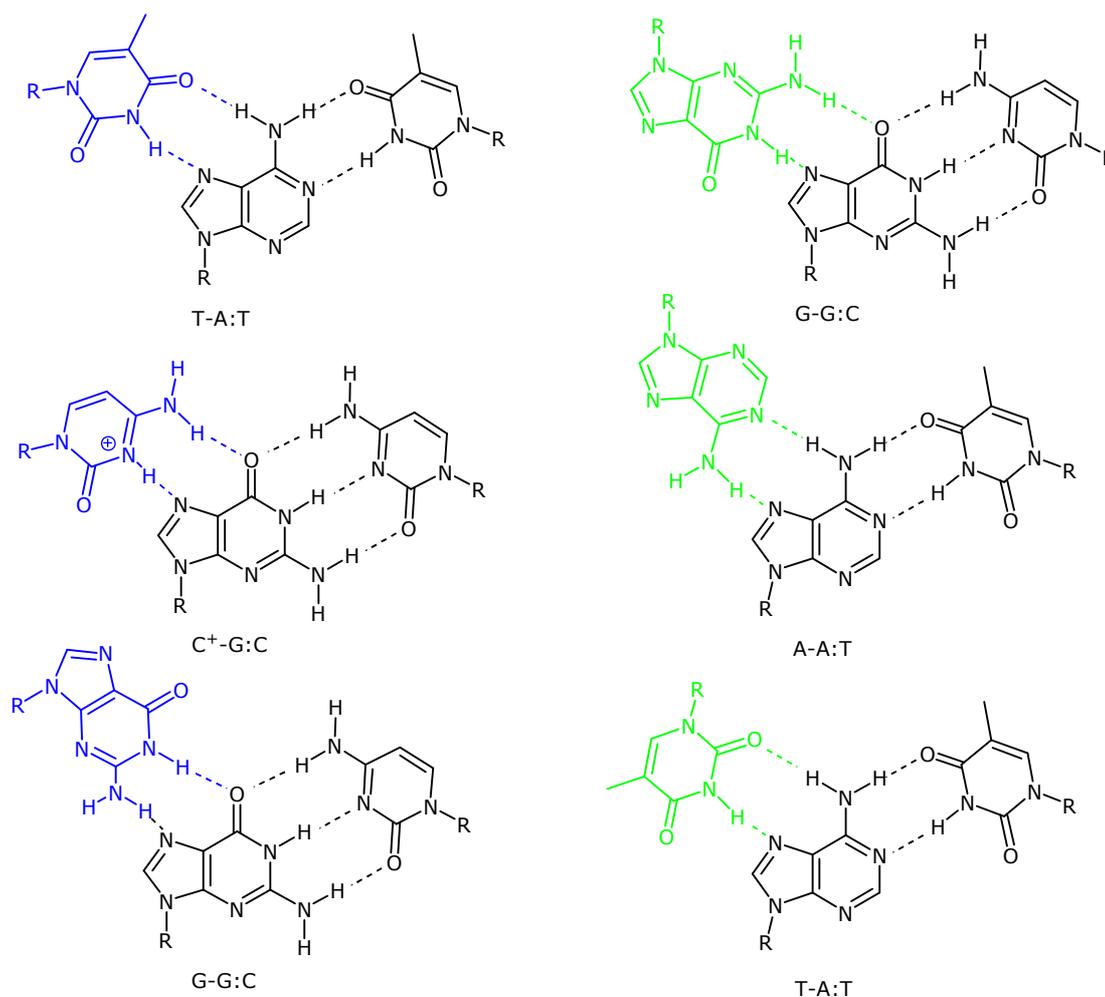
## **1.2 Triples hélices de DNA**

En 1957 se descubrió<sup>7</sup> que el DNA y del RNA podían adoptar también triples hélices en que participan hasta tres cadenas. Consideradas durante mucho tiempo una singularidad estructural sin relevancia biológica, las triples hélices permanecieron poco estudiadas hasta que en 1987 cobraron especial relevancia al considerarse que podrían ser un vehículo para el diseño de agentes específicos de secuencia del DNA.<sup>8,9</sup> Tal y como se comentó en la introducción (véase apartado 1.3), el descubrimiento del H-DNA demostró que las triples hélices podían estar implicadas en la regulación génica.<sup>10-13</sup>

Como el propio nombre sugiere, las triples hélices se forman por unión de tres cadenas oligonucleotídicas, bien por replegamiento de una misma molécula (intramolecular) o bien por participación de moléculas diferentes (intermolecular). Formalmente, la estructura se establece cuando una de las tres cadenas, denominada habitualmente tercera cadena, interacciona con el segmento purínico de una doble hélice de DNA por el surco mayor, mediante la formación de enlaces por puente de hidrógeno específicos entre las nucleobases.

Las triples hélices habitualmente se clasifican en dos grandes grupos según sea la orientación y composición de la tercera cadena respecto al dúplex Watson-Crick. En las triples hélices en las que la tercera cadena adopta una orientación paralela se establecen puentes de hidrógeno tipo Hoogsteen con las purinas de la doble hélice, mientras que si la orientación es antiparalela se establecen interacciones Hoogsteen reversas.<sup>14,15</sup> En la **Fig. 3.2** se representan las diferentes combinaciones de nucleobases que conducen a tríadas estables. Las interacciones Watson-Crick se representan en negro y las interacciones Hoogsteen y Hoogsteen reversas que establece la nucleobase de la tercera cadena con la purina central se representan en azul y verde, respectivamente. En la figura también se indica la nomenclatura de las tríadas, de manera que, la primera letra hace referencia a la nucleobase Hoogsteen, los dos puntos a interacciones tipo Watson-Crick y la línea a interacciones Hoogsteen y Hoogsteen reversas.

**Figura 3.2 Tríadas de nucleobases en las triples hélices por el motivo paralelo (columna izquierda) y motivo antiparalelo (columna derecha). Las interacciones Hoogsteen se representan en azul y las Hoogsteen reversas en verde**



Las triples hélices paralelas se caracterizan por tener habitualmente una tercera cadena rica en pirimidinas, por lo que también se denominan triples hélices de motivo pirimidínico. No obstante, según la composición de la tercera cadena, se pueden clasificar en

tres grupos: i) triples hélices homopirimidínicas, ii) triples hélices GT y iii) triples hélices mixtas TCG. En las triples hélices homopirimidínicas se forman los motivos T-A:T y C<sup>+</sup>-G:C. Las triples hélices GT contienen tríadas T-A:T y tríadas G-G:C. Finalmente, en las triples hélices mixtas TCG se pueden formar los tres tipos de tríadas. Tal y como se observa en la **Fig. 3.2**, para la formación del motivo C<sup>+</sup>-G:C se requiere que la citosina esté protonada en el nitrógeno N3. La protonación de la citosina está desfavorecida en solución acuosa a pH neutro, ya que su pK<sub>a</sub> está alrededor de 4,2. Sin embargo, se ha observado un aumento aparente del pK<sub>a</sub> de la citosina en la triple hélice debido a la interacción electrostática favorable de la tríada con los grupos fosfato.<sup>16-18</sup>

Las triples hélices antiparalelas normalmente se caracterizan por tener una tercera cadena rica en purinas. Según la naturaleza de las tríadas formadas se pueden clasificar en tres grupos: i) triples hélices GA, ii) triples hélices GT\* y iii) triples hélices mixtas GTA. En las triples GA se forman tríadas G-G:C y A-A:T. Las triples hélices GT\* contienen tríadas G-G:C, y T-A:T. Estas triples hélices están formadas por las mismas tríadas que en las triples hélices GT, pero en este caso las interacciones con la tercera nucleobase son de tipo Hoogsten reverso. Se ha observado que las triples hélices serán del tipo GT o GT\* en función de la proporción de G y T en la cadena Hoogsteen. Si las timinas predominan la triple hélice adoptará una orientación paralela (tipo GT), mientras que adoptará una orientación antiparalela (tipo GT\*) si hay más guaninas que timinas.<sup>19</sup> Finalmente, en las triples hélices mixtas GTA coexisten los tres tipos de tríadas Hoogsten reversas.

### **1.3 Espectroscopía de UV-visible como método de estudio de la estabilidad de dobles y triples hélices**

La estabilidad térmica de una doble hélice puede determinarse mediante un experimento de desnaturalización térmica. Al calentar se produce la rotura de los enlaces de hidrógeno (no covalentes) que mantienen unidas las dos cadenas. En el caso de las proteínas la desnaturalización es habitualmente irreversible. Por el contrario, en el caso de los ácidos nucleicos es reversible, ya que al enfriar se produce la renaturalización de la estructura.

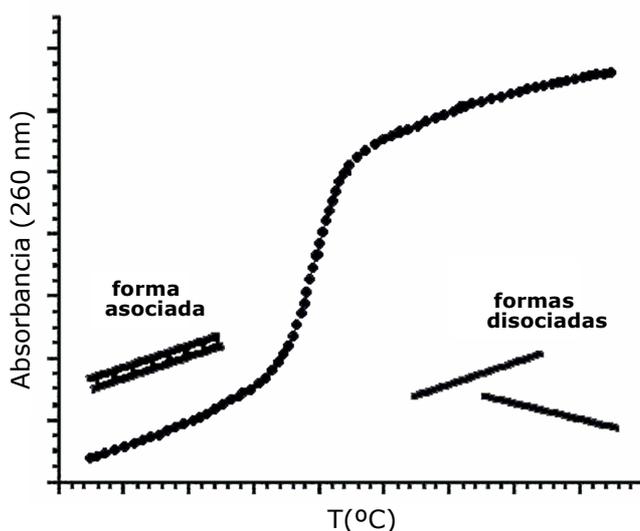
En principio, de este modo se puede obtener una curva de desnaturalización térmica midiendo cualquier propiedad física que varíe durante el proceso, como la absorción en el UV-vis, la emisión de fluorescencia, la intensidad de una señal de RMN, la variación del espectro de dicroísmo circular o una señal de Raman.<sup>20</sup> De entre todos ellos, para estudiar las hibridaciones entre cadenas de ácidos nucleicos el método más utilizado y más sencillo consiste en medir la absorbancia de UV-vis. Para llevar a cabo el experimento se necesita una cantidad de muestra muy pequeña, los cambios de absorbancia reflejan de manera directa cambios en la estructura de las hélices y sólo se precisa como instrumentación de un espectrofotómetro de UV-visible equipado para poder registrar espectros a diferentes temperaturas.

Los sistemas  $\pi$  de las nucleobases desempeñan un papel importante en las interacciones por apilamiento, por lo que las transiciones electrónicas en que intervienen al ser irradiadas con una determinada longitud de onda se ven alteradas. De este modo, es habitual que la hibridación de dos cadenas complementarias produzca un efecto hipocrómico en su espectro de UV-vis. Es decir, la absorbancia de una doble hélice es inferior a la suma de las absorbancias de las dos cadenas por separado. Como los oligonucleótidos presentan un máximo de absorbancia alrededor de 260 nm, se pueden llevar a cabo experimentos de desnaturalización térmica utilizando un espectrofotómetro de UV-vis registrando la variación de absorbancia con la temperatura a esta longitud de onda.

A medida que se va aumentando la temperatura de una solución que contiene un dúplex de DNA se produce una transición de la estructura de dúplex a las dos cadenas separadas. Si la disociación del motivo estructural es cooperativa se establece un equilibrio entre la forma asociada y las cadenas disociadas, el cual se va desplazando a medida que aumenta la temperatura del sistema. De este modo, al representar la variación de la absorbancia frente a la temperatura se obtiene una curva sigmoideal como la que se muestra en la **Fig. 3.3**.

El punto medio de la transición define la denominada temperatura de fusión ( $T_m$ , por *melting temperature*), y es a la temperatura en la que hay un 50% de cadenas estructuradas y un 50% de cadenas libres. La temperatura de fusión proporciona información sobre la estabilidad térmica de la doble hélice ya que, cuanto más estable sea el dúplex formado, a mayor temperatura tendrá lugar la separación de las cadenas.

**Figura 3.3** Curva de desnaturalización térmica de una doble hélice



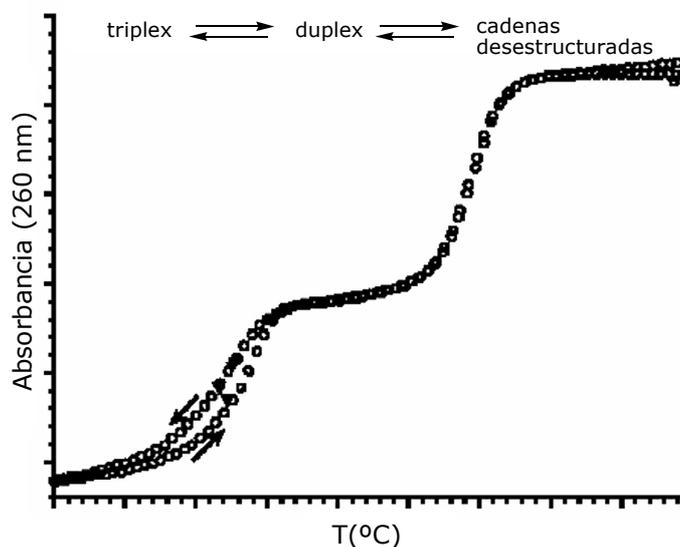
Las curvas de fusión también pueden registrarse partiendo de una temperatura en la que las cadenas se encuentran desorganizadas y poco a poco ir disminuyendo la temperatura para favorecer la formación del complejo. En este caso se trata de un experimento de

renaturalización. Cuando las curvas de los experimentos de desnaturalización y renaturalización coinciden entonces la transición es cinéticamente reversible. Si las cinéticas de asociación y disociación son diferentes, las dos curvas no coinciden, y se habla de histéresis.

La fuerza iónica modula el valor de la temperatura de fusión de un dúplex de DNA.<sup>21</sup> Los cationes juegan un papel esencial en este caso, ya que condensan alrededor de los ácidos nucleicos, que son polielectrolitos aniónicos. El incremento de la fuerza iónica conduce a la paulatina neutralización de la carga negativa de los grupos fosfato, por lo que disminuyen las interacciones electrostáticas desfavorables entre las cadenas y aumenta la estabilidad de la doble hélice.<sup>22</sup>

Del mismo modo que ocurre con una doble hélice, la formación de una triple hélice da como resultado un cambio hipocrómico en la banda de absorción de UV-vis alrededor de 260 nm. De este modo, la asociación y la disociación en función de la temperatura puede ser monitorizada registrando la absorbancia a esta longitud de onda. La **Fig. 3.4** muestra un ejemplo de curvas de desnaturalización y renaturalización térmica de una triple hélice (las flechas indican si se trata de la curva de desnaturalización o renaturalización).

**Figura 3.4 Curvas de desnaturalización y renaturalización térmica de una triple hélice**



En este caso, normalmente se observan dos transiciones. La que tiene lugar a temperatura más alta corresponde a la desnaturalización de la doble hélice y es reversible. Por el contrario, la transición que tiene lugar a temperatura más baja corresponde a la desnaturalización de la triple hélice y es una transición más compleja. Las curvas de desnaturalización y renaturalización normalmente no coinciden dando lugar a un fenómeno de histéresis. Aunque se utilicen gradientes de temperatura bajos (0,5-2°C/min) para asegurar que se alcanza el equilibrio, en cada punto de la curva las cinéticas de los procesos de asociación y disociación en triples hélices difieren significativamente, ya que se caracterizan por mostrar cinéticas de disociación rápidas y velocidades de asociación lentas.

Así, se observa que la formación de triples hélices puede ser entre 100 y 1000 veces más lenta que la formación de una doble hélice.<sup>21,23</sup> Por tanto, al calentar la muestra, la disociación de la triple hélice ocurre tan rápido que, el análisis de la curva de fusión puede conducir a una sobreestimación de la T<sub>m</sub>, y al enfriar la muestra, la renaturalización de la triple hélice ocurre lentamente y puede conducir a una subestimación de la T<sub>m</sub>. Cuanto mayor sea el gradiente de temperatura empleado mayor será la diferencia entre ambas curvas y por tanto, mayor el error en la medida de las temperaturas de fusión.

## **2. Precedentes en el estudio de hibridación de análogos de DNA o RNA en los que se han reemplazado total o parcialmente grupos fosfato por grupos guanidino**

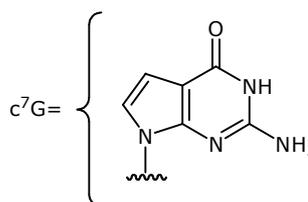
En la bibliografía, se han descrito numerosos estudios de hibridación realizados con análogos en los que se ha reemplazado el grupo fosfato por el grupo guanidino tanto en DNA<sup>24-33</sup> (DNG, *deoxynucleic guanidine*) como en RNA<sup>34,35</sup> (RNG, *ribonucleic guanidine*). Los análogos de DNA y RNA estudiados son oligómeros de cadena corta (entre 3 y 8 residuos), con secuencias homopoliméricas o bien mixtas (formadas por T y A). También se han estudiado las propiedades de quimeras DNG/DNA formadas por segmentos polifosfato y poliguanidino.<sup>36</sup> Se resumen a continuación los resultados más relevantes.

### **2.1 Estudios de hibridación de oligonucleótidos DNG y RNG**

La **Fig. 3.5** muestra las secuencias que se han sintetizado y estudiado hasta la finalización del presente trabajo. Todas las secuencias se han representado empezando por el extremo 5'. El subíndice "g" indica que el enlace internucleosídico es un grupo guanidino en lugar de ser un grupo fosfato. La **Tabla 3.1** resume la información disponible de los experimentos de hibridación realizados hasta el momento con oligonucleótidos DNG y RNG. En color azul se indican los experimentos realizados con oligonucleótidos sin modificar y en negro con oligonucleótidos modificados.

**Figura 3.5 Oligonucleótidos DNG y RNG empleados en estudios de hibridación**

<b>DNG I</b>	HO-T <sub>g</sub> T <sub>g</sub> T <sub>g</sub> T <sub>g</sub> T-N <sub>3</sub>
<b>DNG II</b>	(HO-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>g</sub> T <sub>g</sub> T <sub>g</sub> T <sub>g</sub> T <sub>g</sub> T <sub>g</sub> T <sub>g</sub> T-NH <sub>2</sub>
<b>DNG III</b>	H <sub>2</sub> N-A <sub>g</sub> A <sub>g</sub> A <sub>g</sub> A <sub>g</sub> T-OH
<b>DNG IV</b>	HO-B <sub>g</sub> B <sub>g</sub> B <sub>g</sub> B <sub>g</sub> B <sub>g</sub> B-OH (B=A o T)
<b>DNG V</b>	H <sub>2</sub> N-C <sub>g</sub> C <sub>g</sub> C <sub>g</sub> C <sub>g</sub> C <sub>g</sub> C <sub>g</sub> C <sub>g</sub> C-OH
<b>DNG VI</b>	H <sub>2</sub> N-(c <sup>7</sup> G) <sub>g</sub> (c <sup>7</sup> G) <sub>g</sub> (c <sup>7</sup> G) <sub>g</sub> -OH
<b>RNG I</b>	HO-U <sub>g</sub> U <sub>g</sub> U <sub>g</sub> U <sub>g</sub> U-OH



**Tabla 3.1 Datos de hibridación de los oligonucleótidos guanidino descritos en la bibliografía**

<b>HO-T<sub>g</sub>T<sub>g</sub>T<sub>g</sub>T<sub>g</sub>T-N<sub>3</sub> (DNG I)</b>							
	<b>Diana</b>	<b>Estequiometría</b>	<b>C<sub>KCl</sub> (mM)</b>	<b>C<sub>DNG</sub></b>	<b>T<sub>m1</sub></b>	<b>T<sub>m2</sub></b>	<b>ref.</b>
<b>1.1</b>	poli(dA)	2:1	120-1200	42 μmol/base	85-36°C	>95-71°C	(24)
<b>1.2</b>	poli(rA)	2:1	120-1200	42 μmol/base	>95-44,4°C	>95-82,4°C	(25)
<b>1.3</b>	d(pA) <sub>5-10</sub>	2:1	30-220	42-126 μmol/base	48-32°C		(26)
<b>1.4</b>	d(pA) <sub>12-18</sub>	2:1	60	42 μmol/base	55°C		(26)
<b>1.5</b>	A <sub>5</sub> G <sub>3</sub> A <sub>5</sub>	2:1	60-240	42-126 μmol/base	54-37°C		(27)
<b>1.6</b>	GA <sub>4</sub> G <sub>3</sub> A <sub>4</sub> G	2:1	60-240	42-126 μmol/base	53,5-36°C		(27)
<b>1.7</b>	G <sub>2</sub> A <sub>3</sub> G <sub>3</sub> A <sub>3</sub> G <sub>2</sub>	2:1	60-120	42-126 μmol/base	52-46°C		(27)
<b>1.8</b>	G <sub>2</sub> A <sub>2</sub> G <sub>5</sub> A <sub>2</sub> G <sub>2</sub>	2:1	60-120	42-126 μmol/base	nd		(27)
<b>d(pT)<sub>16</sub></b>							
	<b>Diana</b>	<b>Estequiometría</b>	<b>C<sub>KCl</sub> (mM)</b>	<b>C<sub>DNA</sub></b>	<b>T<sub>m</sub></b>		<b>ref.</b>
<b>2.1</b>	poli(dA)	1:1	120-1200	42 μmol/base	39-56°C		(24)
<b>2.1</b>	poli(rA)	1:1	120-1200	42 μmol/base	36-49°C		(25)
<b>d(pT)<sub>5</sub></b>							
	<b>Diana</b>	<b>Estequiometría</b>	<b>C<sub>KCl</sub> (mM)</b>	<b>C<sub>DNA</sub></b>	<b>T<sub>m</sub></b>		<b>ref.</b>
<b>3</b>	d(pA) <sub>5</sub>	nr	100	2 μM	<5°C		(34)
<b>(HOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>g</sub>T<sub>g</sub>T<sub>g</sub>T<sub>g</sub>T<sub>g</sub>T<sub>g</sub>T<sub>g</sub>T<sub>g</sub>T-NH<sub>2</sub> (DNG II)</b>							
	<b>Diana</b>	<b>Estequiometría</b>	<b>C<sub>KCl</sub> (mM)</b>	<b>C<sub>DNG</sub></b>	<b>T<sub>m1</sub></b>		<b>ref.</b>
<b>4.1</b>	poli(rA)	2:1	600	nr	>95°C		(28)
<b>4.2</b>	d(pA) <sub>8</sub>	2:1	100-300	2,5 μM	62,8-56,3°C		(29)
<b>4.3</b>	A <sub>7</sub> C	2:1	100-300	2,5 μM	59,7-52°C		(29)
<b>4.4</b>	CA <sub>6</sub> C	2:1	100-300	2,5 μM	55,1-47°C		(29)
<b>4.5</b>	C <sub>2</sub> A <sub>4</sub> C <sub>2</sub>	2:1	100-300	2,5 μM	nd		(29)
<b>4.6</b>	A <sub>4</sub> CA <sub>3</sub>	2:1	100-300	2,5 μM	48-46,1°C		(29)
<b>4.7</b>	A <sub>3</sub> C <sub>2</sub> A <sub>3</sub>	2:1	100-300	2,5 μM	nd		(29)
<b>H<sub>2</sub>N-A<sub>g</sub>A<sub>g</sub>A<sub>g</sub>A<sub>g</sub>T-OH (DNG III)</b>							
	<b>Diana</b>	<b>Estequiometría</b>	<b>C<sub>KCl</sub> (mM)</b>	<b>C<sub>DNG</sub></b>	<b>T<sub>m1</sub></b>		<b>ref.</b>
<b>5.1</b>	d(pT) <sub>5</sub>	1:2	100	2 μM	69°C		(30)
<b>5.2</b>	d(pT) <sub>8</sub>	1:2	100	2 μM	79°C		(30)
<b>AAAAAT</b>							
	<b>Diana</b>	<b>Estequiometría</b>	<b>C<sub>KCl</sub> (mM)</b>	<b>C<sub>DNA</sub></b>	<b>T<sub>m</sub></b>		<b>ref.</b>
<b>6</b>	d(pT) <sub>5</sub>	nr	100	2 μM	nd		(30)
<b>HO-A<sub>g</sub>T<sub>g</sub>A<sub>g</sub>T<sub>g</sub>T<sub>g</sub>A-OH (DNG IVa)</b>							
	<b>Diana</b>	<b>Estequiometría</b>	<b>C<sub>KCl</sub> (mM)</b>	<b>C<sub>DNG</sub></b>	<b>T<sub>m</sub></b>		<b>ref.</b>
<b>7</b>	TAATAT	1:1	100	3 μM	40°C		(31)

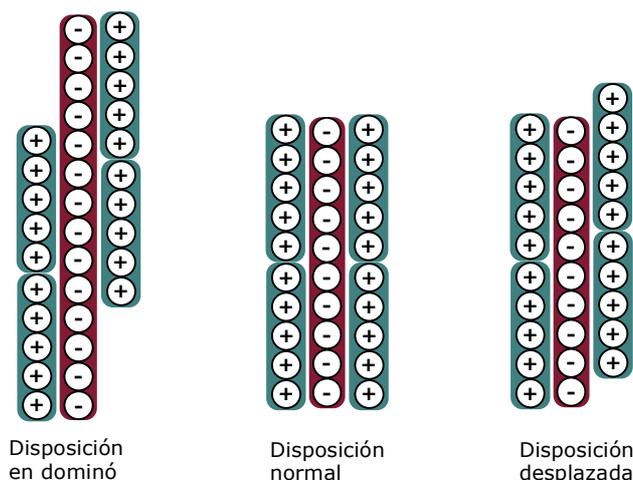
HO-T <sub>9</sub> A <sub>9</sub> A <sub>9</sub> T <sub>9</sub> A <sub>9</sub> T-OH (DNG IVb)							
	Diana	Estequiometría	C <sub>KCl</sub> (mM)	C <sub>DNG</sub>	T <sub>m</sub>		ref.
8.1	ATATTA	1:1	100	3 μM	41°C		(31)
8.2	DNG IVa	nr	100	3 μM	dd		(31)
8.3	DNG IVa	nr	750	3 μM	dd		(31)
TAATAT							
	Diana	Estequiometría	C <sub>KCl</sub> (mM)	C <sub>DNG</sub>	T <sub>m</sub>		ref.
9	ATATTA	nr	100	3 μM	nd		(31)
H <sub>2</sub> N-C <sub>9</sub> C <sub>9</sub> C <sub>9</sub> C <sub>9</sub> C <sub>9</sub> C <sub>9</sub> C-OH (DNG V)							
	Diana	Estequiometría	C <sub>KCl</sub> (mM)	C <sub>DNG</sub>	T <sub>m</sub>		ref.
10.1	d(pG) <sub>8</sub>	1:1	100	7,5 μM	>90°C		(32)
10.2	d(pG) <sub>8</sub>	nr	130-530	7,5 μM	nd		(32)
d(pC) <sub>8</sub>							
	Diana	Estequiometría	C <sub>KCl</sub> (mM)	C <sub>DNG</sub>	T <sub>m</sub>		ref.
11.1	d(pG) <sub>8</sub>	1:1	100	7,5 μM	38°C		(32)
11.2	d(pG) <sub>8</sub>	nr	130-530	7,5 μM	nd		(32)
HO-(c <sup>7</sup> G) <sub>9</sub> (c <sup>7</sup> G) <sub>9</sub> (c <sup>7</sup> G)-OH (DNG VI)							
	Diana	Estequiometría	C <sub>KCl</sub> (mM)	C <sub>DNG</sub>	T <sub>m</sub>		ref.
12	d(pC) <sub>5</sub>	1:1	nr	nr	nr		(33)
HO-U <sub>9</sub> U <sub>9</sub> U <sub>9</sub> U <sub>9</sub> U-OH (RNG I)							
	Diana	Estequiometría	C <sub>KCl</sub> (mM)	C <sub>RNG</sub>	T <sub>m</sub>		ref.
13.1	d(pA) <sub>5</sub>	1:1	100	2 μM	62°C		(34)
13.2	AAAAT	1:1	100	2 μM	55°C		(34)
13.3	r(pA) <sub>5</sub>	1:1	100	2 μM	<5°C		(35)
r(pU) <sub>5</sub>							
	Diana	Estequiometría	C <sub>KCl</sub> (mM)	C <sub>RNG</sub>	T <sub>m</sub>		ref.
14.1	d(pA) <sub>5</sub>	1:1	100	2 μM	<5°C		(34)
14.2	r(pA) <sub>5</sub>	1:1	100	2 μM	<5°C		(35)

\*[K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>]=10mM, pH=7 en todos los análisis

nd: no se detecta; nr: no reportado; dd: dato desconocido

Los estudios de hibridación realizados con **DNG I** y las cadenas complementarias de poli(dA),<sup>24,26</sup> d(pA)<sub>x</sub><sup>26</sup> (x=5-18) y poli(rA)<sup>25</sup> indican que la estequiometría de unión es de 2:1, lo que quiere decir que la cadena poliguanidino **DNG I** forma triples hélices DNG.DNA.DNG o DNG.RNA.DNG. Como la cadena **DNG I** empleada es de menor longitud que las cadenas de poliadenina, los autores postulan la formación de triples hélices poliméricas como las que se muestran en la **Fig. 3.6.**<sup>26</sup>

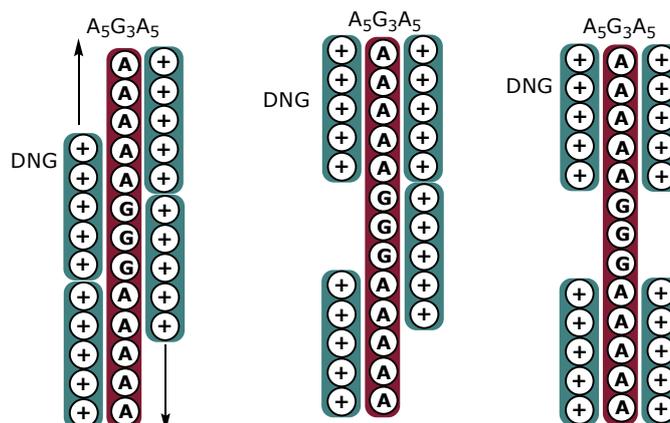
**Figura 3.6 Disposición de DNG I en los complejos formados con poli(dA), d(pA)<sub>x</sub> o poli(rA)**



Los estudios de desnaturalización térmica realizados con poli(dA) y poli(rA) en el rango de temperatura de 5-95°C dan como resultado dos transiciones. La de menor temperatura ( $T_{m1}$ ) corresponde a la disociación  $DNG.DNA.DNG \rightarrow DNG+DNA.DNG$ , y la de mayor temperatura ( $T_{m2}$ ) a  $DNA.DNG \rightarrow DNG+DNA$  (entradas 1.1 y 1.2). Este resultado contrasta con la desnaturalización de los complejos formados por  $d(Tp)_{16}$  y poli(dA) o poli(rA), en los que se observa una única transición (entradas 2.1 y 2.2). En cualquier caso, las dobles hélices que forma **DNG I** (entradas 1.1-1.8) son extraordinariamente más estables que las que forma  $d(pT)_{16}$  con poli(dA) o poli(rA). A una concentración de 120 mM de KCl,  $d(pT)_{16}$  forma una doble hélice con poli(dA) ( $T_m=39^\circ C$ ) y con poli(rA) ( $T_m=36^\circ C$ ), mientras que los complejos formados por **DNG I** y poli(dA) o poli(rA) son tan estables que no se disocian incluso en agua a ebullición. Cabe suponer que debido a las interacciones electrostáticas favorables, **DNG I** presenta una afinidad de unión por cadenas de DNA y RNA complementarias mucho mayor que las cadenas polifosfato. Prueba de ello, es que la estabilidad de los complejos formados por **DNG I** queda atenuada al incrementar la concentración de sales.

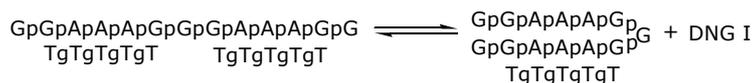
El aumento de la estabilidad de los complejos formados por **DNG I** no es a costa de la pérdida de especificidad. No se observa cambio alguno en la absorbancia en los experimentos de hibridación de **DNG I** con las cadena homopoliméricas de C, G, T o U. Relacionado con ello, también se ha estudiado la fidelidad de unión de **DNG I** a cadenas homopurínicas cortas con apareamientos no favorables (entradas 1.5-1.8).<sup>27</sup> En general, **DNG I** también se asocia con estas cadenas con estequiometría 2:1, aunque formando complejos de menor estabilidad. La formación de las triples hélices se pone de manifiesto en los fenómenos de histéresis de las curvas de fusión y renaturalización. Dado que la cadena de **DNG I** es de menor longitud que las cadenas purínicas, se supone que las triples hélices formadas son poliméricas, formando estructuras tipo "dominó" según los autores.<sup>27</sup> En la **Fig. 3.7** se muestra un ejemplo de los posibles complejos formados entre **DNG I** y  $A_5G_3A_5$ .

**Figura 3.7 Disposición de DNG I en los complejos formados con A<sub>5</sub>G<sub>3</sub>A<sub>5</sub>**



La hipocromicidad y los valores de T<sub>m</sub> de las curvas de desnaturalización de estos complejos aumentan con la concentración de oligonucleótidos y disminuyen con el número de apareamientos no favorables. La secuencia que contiene el mayor número de guaninas muestra, a diferencia de las otras dos, una curva de fusión con dos transiciones, la de menor temperatura atribuible a la fusión de la triple hélice, y la de mayor temperatura con una menor hipocromicidad. Aunque por la presencia de un gran número de guaninas se podría pensar en la formación de complejos de agregación de guanina, tipo cuádruplex, los autores lo atribuyen a la formación de complejos con estructura tríplex pir.pur.pur con la cadena de poliguanidina autorreplegada (**Fig. 3.8**), en relación con complejos minoritarios de estequiometría 1:2 observados en los experimentos de Job.<sup>27</sup>

**Figura 3.8 Formación de complejos de estequiometría 1:2 entre DNG I y G<sub>2</sub>A<sub>3</sub>G<sub>3</sub>A<sub>3</sub>G<sub>2</sub>**



En cuanto al efecto de la longitud de las cadenas en la estabilidad de las triples hélices, la desnaturalización térmica de los complejos formados por **DNG I** con d(pA)<sub>x</sub> (entradas 1.3 y 1.4), indica que la constante de formación del complejo aumenta con la longitud de la cadena complementaria mientras que la constante de disociación disminuye. El aumento de la fuerza iónica tiene el mismo efecto en los valores de las constantes de formación y disociación del complejo. En las mismas condiciones, no se observa transición alguna en el experimento de hibridación realizado entre d(pT)<sub>5</sub> y d(pA)<sub>5</sub> (entrada 3).

El oligonucleótido **DNG II** formado por ocho residuos de T también se une a poli(rA)<sup>28</sup> y d(pA)<sub>8</sub><sup>29</sup> (entradas 4.1 y 4.2) con una estequiometría de 2:1, formando triples hélices. En el tríplex formado con poli(rA) no se puede observar la disociación del complejo en el rango de temperaturas de 5-95°C por ser extremadamente estable, incluso con una concentración de KCl de 600 mM, concentración a la que la afinidad de **DNG I** por sus cadenas complementarias empezaba a disminuir. La desnaturalización térmica del tríplex

formado con d(pA)<sub>8</sub> en ese mismo rango de temperaturas muestra una única transición. De forma similar a **DNG I**, al aumentar la concentración de sales, los valores de T<sub>m</sub> y de hipercromicidad disminuyen.

También en este caso se ha estudiado la fidelidad de unión de **DNG II** a segmentos parcialmente complementarios, sustituyendo A por C en los extremos y en posiciones centrales (entradas 4.3-4.7). Por cada C introducida en el extremo de la cadena se reduce la T<sub>m</sub> 4-5°C y se atenúa la hipercromicidad de la transición. Al sustituir cuatro residuos de A en los extremos de la cadena, la estabilidad de la triple hélice resultante es muy baja. La presencia de apareamientos desfavorables en posiciones centrales de la cadena tiene un efecto mucho más pronunciado, ya que no se detecta la formación de la triple hélice.

El hexámero **DNG III**, que contiene un tramo pentaadenílico en su secuencia, se une a d(pT)<sub>5</sub> y d(pT)<sub>8</sub> (entradas 5.1 y 5.2) con estequiometría 1:2,<sup>30</sup> y por tanto, forma una triple hélice paralela (véase apartado 1.2). Las curvas de fusión muestran en este caso una única transición. Al aumentar la longitud de las cadenas complementarias de DNA, aumenta el valor de T<sub>m</sub>. En este caso, no se observa transición alguna en la desnaturalización térmica de la mezcla de **DNG III** y d(pC)<sub>8</sub>, indicando que las interacciones electrostáticas favorables con el esqueleto polianiónico no comprometen la selectividad de unión entre pares de bases. Al realizar el experimento de hibridación con el hexámero sin modificar y d(pT)<sub>5</sub> (entrada 6) no se observa ninguna transición en el rango de temperatura estudiado, indicando que no hay formación de triple ni doble hélice por encima de 5°C.

Por otra parte, los oligonucleótidos **DNG IVa** y **DNG IVb**,<sup>31</sup> con alternancia de timidinas y adenosinas en la secuencia (entradas 7 y 8.1), se unen a sus respectivas cadenas complementarias de DNA con estequiometría 1:1 formando una doble hélice con una estabilidad mucho mayor (40°C y 41°C, respectivamente), que sus correspondientes oligonucleótidos sin modificar (entrada 9), que no forman dobles hélices en estas condiciones. Los autores señalan que las secuencias mixtas **DNG IVa** y **DNG IVb** muestran menor afinidad respecto a las cadenas complementarias de DNA que la cadena politimidínica octamérica **DNG II** o la cadena pentaadenílica hexamérica **DNG III** (en las mismas condiciones, T<sub>m</sub>=62°C y 69°C, respectivamente), y lo atribuyen a la menor longitud de **DNG IVa** y **DNG IVb** o a apilamientos menos favorables.<sup>31</sup> Al estudiar la formación de dúplex entre **DNG IVa** y **DNG IVb** (entradas 8.2 y 8.3), de secuencia complementaria, la curva de fusión no muestra transición observable, aunque si se mide la absorción de la mezcla a 4°C se puede deducir que el dúplex sí se forma, porque se observa una disminución en la absorbancia alrededor del 7%.<sup>31</sup>

Los estudios realizados con análogos DNG homopirimidínicos y homopurínicos compuestos por C o G son menos extensos. El oligonucleótido **DNG V**, que contiene ocho residuos de C, se une a d(pG)<sub>8</sub> con una estequiometría de unión de 1:1 (entrada 10.1)<sup>32</sup>, formando una doble hélice cuya T<sub>m</sub> es mayor de 90°C. En las mismas condiciones, d(pC)<sub>8</sub>.d(pG)<sub>8</sub> (entrada 11.1) muestra T<sub>m</sub>=38°C. Analizando los valores termodinámicos que

se calculan a partir de las curvas de fusión, se obtiene  $\Delta\Delta G^0 = -4,8$  Kcal/mol a favor del complejo **DNG V**.d(pG)<sub>8</sub>, o sea, una unión 1000 veces más estable. Sin embargo, la deconvolución de las curvas de fusión permite apreciar en las condiciones estudiadas que la cadena complementaria d(pG)<sub>8</sub> se estructura autoasociándose incluso en presencia del oligonucleótido **DNG V**. Prueba de ello, al aumentar la concentración de KCl (entrada 10.2) no se observa un incremento en la absorbancia al incrementar la temperatura, es decir, no se forman dobles hélices. En estas condiciones, el oligonucleótido d(pG)<sub>8</sub> se agrega formando cuartetos de guanina, que impiden la hibridación con **DNG V**. Con el objeto de evitar la formación de estructuras tipo cuartetos de G, típicas de las secuencias ricas en G, se ha ensayado la hibridación con una secuencia formada por 7-desazaguaninas (c<sup>7</sup>G), en que se reemplaza el N7 de la guanina por un carbono. Para ello, se ha descrito la síntesis del oligonucleótido **DNG VI**, que contiene tres residuos de la purina modificada.<sup>33</sup> Se sabe que este oligómero se une a d(pC)<sub>5</sub> (entrada 12) con una estequiometría de 1:1, aunque se desconoce el valor de T<sub>m</sub>.

Finalmente, también se han realizado estudios de hibridación del análogo ribonucleotídico **RNG I** y las cadenas complementarias d(pA)<sub>5</sub><sup>34</sup> y r(pA)<sub>5</sub><sup>35</sup> (entradas 13.1 y 13.3 respectivamente). En ambos casos, la estequiometría de unión es 1:1 formando un dúplex, pero la estabilidad de las dobles hélices resultantes es sin embargo, muy diferente. Mientras que el complejo formado por **RNG I** y d(pA)<sub>5</sub> muestra T<sub>m</sub>=62°C, mucho más estable que el dúplex formado por cadenas no modificadas (valores extrapolados en ambos casos, r(pU)<sub>5</sub>.d(pA)<sub>5</sub> T<sub>m</sub>=0°C y d(pT)<sub>5</sub>.d(pA)<sub>5</sub> T<sub>m</sub>=-10°C)<sup>34</sup>, para el complejo formado por **RNG I** y r(pA)<sub>5</sub> los autores estiman que T<sub>m</sub><5°C. Esta inestabilidad se atribuye a la alteración que probablemente se produce en la conformación natural del RNA al formarse el complejo RNG.RNA. El estudio por dicroísmo circular del dúplex **RNG I**.d(pA)<sub>5</sub> permite deducir una estructura de tipo B-DNA (máximo positivo a 275 nm y negativo a 245 nm).<sup>35</sup> Estos datos concuerdan con la estructura calculada por modelado molecular de RNG.<sup>37</sup> El orden de estabilidad térmica que se deduce de los experimentos de fusión es: **RNG I** d(pA)<sub>5</sub> > r(pU)<sub>5</sub>.r(pA)<sub>5</sub> > **RNG I** r(pA)<sub>5</sub> > r(pU)<sub>5</sub>.d(pA)<sub>5</sub> > d(pT)<sub>5</sub> d(pA)<sub>5</sub>. También se ha comprobado la fidelidad de unión de **RNG I** al hibridarse con cadenas de DNA (entrada 13.2), siendo capaz de discriminar entre bases complementarias y no complementarias. Por ejemplo, al sustituir una A por una T en el extremo de la cadena en d(pA)<sub>5</sub>, se observa una disminución de 7°C en la T<sub>m</sub>.

## **2.2 Estructura de los complejos formados por los oligonucleótido guanidino**

Los únicos datos de que se dispone sobre la estructura de las dobles y triples hélices formadas por los oligonucleótidos guanidino provienen del modelado mediante mecánica y dinámica molecular y de dicroísmo circular.

El modelado mediante mecánica molecular CHARMM<sup>38</sup> de d(Tg)<sub>10</sub>.d(Ap)<sub>10</sub> muestra una doble hélice en la que el fragmento de DNA presenta conformaciones C2'-endo, que son

típicas del B-DNA, mientras que las ribosas del fragmento guanidino tienden a una estructura O4'-endo, producto de enlaces de hidrógeno entre N(5')H y O(4'). Las dos cadenas se encuentran a distancias menores que en el DNA, producto de las interacciones electrostáticas entre grupos guanidino y fosfato. También se ha estudiado la doble hélice DNG.RNA (d(Tg)<sub>9</sub>TN<sub>3</sub>r(Ap)<sub>9</sub>A).<sup>39,40</sup> La estructura minimizada muestra una estructura C3'-endo de las ribosas, excepto en la unidad 3'-terminal de la cadena de guanidina. Esta conformación del anillo de ribosa es indicativa de una conformación de A-DNA. Si se comparan las dimensiones de los surcos con los de una doble hélice RNA.RNA canónica, se observa que en este caso el surco mayor es más ancho (+2,5 Å), mientras que el surco menor es más estrecho (-1,4 Å), lo que probablemente tiene relación con las interacciones electrostáticas favorables entre las cadenas.

El estudio por dinámica molecular de la doble hélice DNG.DNA (d(Tg)<sub>8</sub>.d(Ap)<sub>8</sub>)<sup>41</sup> en una caja de agua, neutralizada con NaCl muestra una estructura que mantiene los enlaces Watson-Crick a lo largo de la simulación. Los ángulos de torsión se mantienen en los valores típicos de la forma A, pero son más estables en la cadena de poliguanidina que en la de polifosfato, muy probablemente por la mayor flexibilidad de la cadena polianiónica. Por lo que respecta a los enlaces por puente de hidrógeno entre las nucleobases, y contrariamente a lo que cabría esperar para una doble hélice con un segmento A.T, sólo se observa un enlace de hidrógeno bifurcado cerca del extremo 5'. Los enlaces de hidrógeno bifurcados son típicos de las secuencias (A.T)<sub>n</sub> porque maximizan las interacciones de apilamiento entre las purinas de pisos contiguos. Por tanto, los autores señalan que la escasa formación de estos enlaces en la estructura del híbrido explica que sólo se llegue a formar la triple hélice DNG.(DNA.DNG) y no se detecte la doble hélice DNG.DNA.

La doble hélice RNG.RNA (r(Ug)<sub>12</sub>.r(Ap)<sub>12</sub>) también ha sido estudiada por dinámica molecular, mostrando la tendencia típica de las secuencias formadas por unidades guanidino, es decir, adoptando una conformación a medio camino entre la forma A y la B.<sup>42</sup> Ambas cadenas muestran conformaciones de las ribosas próximas a C3'-endo. El ángulo de torsión glicosídico y las distancias fosfato-fosfato en la cadena de RNA son típicas de la forma A, mientras que la distancia entre grupos guanidino en la cadena RNG (6,6 ± 0,2 Å) es típica de la forma B. Como la planaridad del grupo guanidino fuerza a una elongación de la cadena RNG, el dúplex RNG.RNA muestra una forma más alargada que los típicos dúplex de RNA.

Los cálculos de dinámica molecular han permitido también comparar estructuras que no se han estudiado experimentalmente, como por ejemplo, las dobles hélices d(Ag)<sub>12</sub>.d(Tg)<sub>12</sub> y d(Gg)<sub>12</sub>.d(Cg)<sub>12</sub>.<sup>43</sup> Los dos dodecámeros adoptan estructuras próximas a la forma B, aunque la rigidez del grupo guanidino pueda explicar que algunos de los parámetros helicoidales muestren valores poco corrientes en cadenas oligonucleotídicas, como por ejemplo, que las distancias entre grupos guanidino intercadena sean relativamente más cortas que entre fosfato en DNA. Los surcos mayor y menor, aunque inferiores, muestran

dimensiones comparables a las de las cadenas de DNA, a excepción de d(Gg)<sub>12</sub>.d(Cg)<sub>12</sub>, cuyo surco menor tiene una anchura a medio camino entre las formas A y B.

La estructura de triples hélices formadas por cadenas oligonucleotídicas guanidino también ha sido modelada.<sup>38,40,41,44</sup> En general, se repiten las características comentadas para las dobles hélices. La estructura muestra esencialmente parámetros típicos de la forma B por lo que respecta al esqueleto Watson-Crick, pero con mayor tendencia hacia la forma A en la cadena Hoogsten. En general, la distancia entre grupos guanidino de una cadena y los grupos fosfato de otra es menor que entre cadenas fosfato, lo que es prueba de las interacciones electrostáticas favorables. Las interacciones electrostáticas también acercan las cadenas guanidino y fosfato, provocando que los surcos mayor y menor sean más estrechos que en una estructura de DNA canónica.<sup>38</sup> Por lo que respecta a la triple hélice d(Tg)<sub>8</sub>.d(Ap)<sub>8</sub>.d(Tg)<sub>8</sub>, se observa un mayor número de enlaces bifurcados entre A y T que en el dúplex d(Tg)<sub>8</sub>.d(Ap)<sub>8</sub>, lo que corrobora que la triple hélice sea más estable y la única estructura observada experimentalmente al mezclar d(Tg)<sub>8</sub> y d(Ap)<sub>8</sub>.<sup>41</sup>

También se ha estudiado por modelación la estructura de la triple hélice (Up)<sub>9</sub>U.r(Ag)<sub>9</sub>A.(Up)<sub>9</sub>U.<sup>44</sup> Las ribosas de la cadena RNG adoptan una conformación O4'-endo y C1'-exo. Por lo que se refiere al esqueleto ribosa-fosfato, la conformación de las ribosas es C1'-exo, lo que unido a otros parámetros helicoidales, sugiere una forma B. Como en otras estructuras, los surcos mayor y menor son más estrechos que en una estructura de DNA canónica, como resultado de las interacciones electrostáticas favorables entre grupos guanidino y fosfato.

### **2.3 Estudios de hibridación de quimeras DNG/DNA**

En la bibliografía se ha descrito también la síntesis y las propiedades de hibridación de quimeras DNG/DNA,<sup>36</sup> es decir, cadenas oligonucleotídicas en las que se combinan tramos polifosfato y guanidino. La **Fig. 3.9** muestra las secuencias mixtas sintetizadas, donde el subíndice "g" indica que el enlace internucleosídico es un grupo guanidino, así como la secuencia de DNA sin modificar y las secuencias complementarias de DNA y RNA utilizadas.

**Figura 3.9 Secuencias empleadas en estudios de hibridación con quimeras DNG/DNA**

TTGTTAGTT <sub>g</sub> TTCTTGTTT	TTGTTAGTTTTCTTGTTT
<b>DNG/DNA I</b>	<b>DNA I</b>
<b>T<sub>g</sub></b> TGTTAGTTTTCTTG <b>T<sub>g</sub></b> TT	AAACAAGAAAACAA
<b>DNG/DNA II</b>	<b>DNA II</b>
<b>T<sub>g</sub></b> TGTTAGTT <sub>g</sub> TTCTTG <b>T<sub>g</sub></b> TT	AAACAAGAAAACUAACAA
<b>DNG/DNA III</b>	<b>RNA I</b>

La **Tabla 3.2** resume la información disponible de los experimentos realizados hasta el momento con oligonucleótidos mixtos DNG/DNA.

**Tabla 3.2 Resultados de los experimentos de hibridación con quimeras DNG/DNA**

Dúplex	T <sub>m</sub> (°C)		
	no NaCl	10 mM NaCl	100 mM NaCl
(DNA I)·(DNA II)	34,8	48,6	58,5
(DNG/DNA I)·(DNA II)	34,8	47,6	56,5
(DNG/DNA II)·(DNA II)	36,8	48,6	57,5
(DNG/DNA III)·(DNA II)	34,8	46,6	53,5
(DNA I)·(RNA I)	34,0	49,7	59,9
(DNG/DNA I)·(RNA I)	31,2	43,9	54,0
(DNG/DNA II)·(RNA I)	34,2	45,9	57,1
(DNG/DNA III)·(RNA I)	30,1	41,8	50,9

\*[Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>]=10mM, pH=7 en todos los análisis

Los oligonucleótidos mixtos DNG/DNA sintetizados presentan una unidad guanidino en la parte central de la cadena (**DNG/DNA I**), dos uniones guanidino, una a cada extremo de la cadena (**DNG/DNA II**) y tres uniones guanidino, una a cada extremo y una en una posición central de la cadena (**DNG/DNA III**). Los oligonucleótidos mixtos DNG/DNA y el oligonucleótido sin modificar **DNA I** son secuencias no autocomplementarias y sólo pueden formar dobles hélices antiparalelas con sus secuencias complementarias de DNA y RNA.

En la **Tabla 3.2** se puede observar que los valores de T<sub>m</sub> para los dúplex de DNA.DNA y DNA.RNA aumentan al aumentar la concentración de NaCl. En los experimentos de desnaturalización térmica realizados con oligonucleótidos mixtos DNG/DNA y DNA se producen efectos diferenciados al aumentar la concentración de sales, según la posición en que se ha realizado la modificación. Así, el dúplex formado por **DNG/DNA II** y **DNA II** en ausencia de NaCl presenta una T<sub>m</sub> ligeramente mayor que el dúplex formado por **DNA I** y **DNA II** (dúplex control), y al aumentar la concentración de NaCl a 100 mM se observa una T<sub>m</sub> ligeramente inferior a la del dúplex control. Según estos datos, una sola modificación en la parte central de la cadena no afecta a la estabilidad del dúplex formado. Sin embargo, al aumentar la concentración de NaCl a 10 mM, el valor de T<sub>m</sub> disminuye respecto al dúplex control. El oligonucleótido **DNG/DNA III** forma un dúplex de T<sub>m</sub> igual al dúplex control en ausencia de sales, pero al aumentar la concentración de sales es el que presenta mayor desestabilización respecto al dúplex control.

En los experimentos de desnaturalización térmica realizados con RNA se puede observar que el dúplex formado por **DNG/DNA II** y **RNA I** en ausencia de sales presenta un valor de T<sub>m</sub> similar al dúplex control de DNA.RNA, mientras que con los otros dos análogos los valores de T<sub>m</sub> son inferiores. Al aumentar la concentración de sales también se puede

observar la misma tendencia, aunque en este caso las diferencias en los valores de T<sub>m</sub> son algo mayores.

Se concluye por tanto, que las dobles hélices formadas por los oligonucleótidos quiméricos muestran prácticamente la misma estabilidad que las dobles hélices no modificadas o aumentan la estabilidad de las dobles hélices en ausencia de NaCl, mientras que son ligeramente desestabilizantes en medios de mayor fuerza iónica, tanto en dobles hélices DNA.DNA como en DNA.RNA.

### **3. Síntesis de oligonucleótidos no modificados**

En este apartado se va a describir la síntesis y purificación de oligonucleótidos no modificados. En la **Tabla 3.3** se enumeran las secuencias oligonucleotídicas que se diseñaron para llevar a cabo los experimentos de hibridación descritos en los apartados 4 y 5.

**Tabla 3.3 Secuencias de los oligonucleótidos no modificados sintetizados**

<b>ODN</b>	<b>Secuencia</b>
14C	<sup>5'</sup> CTTTCTTCTCTTT
14D	<sup>5'</sup> AAAAGAGAAGAAAG
23A	<sup>5'</sup> CTCTGAAAGAAGAGAAAAGTCTC
23B	<sup>5'</sup> GAGACTTTTCTCTTTTCAGAG

Con el objetivo de realizar experimentos de hibridación de dobles y triples hélices con oligonucleótidos modificados que incorporan una unidad de <sup>m</sup>UgT, en el diseño de los oligonucleótidos a sintetizar se tuvieron en cuenta las siguientes consideraciones:

- i) Ya que se realizarían experimentos de hibridación de triples hélices, el oligonucleótido ha de poseer una secuencia rica en purinas o bien en pirimidinas. Como los ensayos de acoplamiento sobre resina han sido realizados con un derivado 5'-aminotimidina anclado a resina y un derivado tiourea de morfolinouridina, se decidió sintetizar una cadena polipirimidínica. Para evaluar el efecto de la modificación, se decidió estudiar su efecto en un extremo de la cadena (secuencia 14E1) y en la zona central (secuencia 14E2).
- ii) El oligonucleótido ha de tener una longitud suficiente para poder formar una doble hélice suficientemente estable que permita determinar la temperatura de fusión y que no se autoestructure compitiendo con la formación de dobles o triples hélices. Para ello, la secuencia debe presentar baja o nula autocomplementariedad con el propósito de evitar la formación de otras posibles

dobles hélices y no deben presentarse más de tres guaninas consecutivas para evitar la formación de agregados tipo cuádruplex.

Siguiendo estas indicaciones, se diseñaron las secuencias 14C, y el oligonucleótido de cadena complementaria 14D. El oligonucleótido 23A presenta la misma secuencia que 14D en la parte central, y se han añadido en los extremos 5' y 3' cuatro y cinco nucleósidos respectivamente. El oligonucleótido de secuencia 23B es complementario a 23A, y constituyen el dúplex sobre el que se realizaran experimentos de hibridación de triples hélices.

Para la síntesis y purificación de los oligonucleótidos no modificados se ha seguido el mismo procedimiento para todos ellos. Por lo que respecta a los oligonucleótidos modificados, la síntesis y purificación se ha comentado en el apartado 5 del segundo capítulo. Para obtener los oligonucleótidos 14C, 14D, 23A y 23B se ha seguido el procedimiento ya descrito en el capítulo 1 (véase apartado 6.2). La síntesis de los oligonucleótidos se ha llevado a cabo indistintamente en dos sintetizadores, Applied Biosystems PCR-MATE o Expedite<sup>TM</sup>. En la **Tabla 3.4** se indica en cada caso el rendimiento de síntesis obtenido y el rendimiento medio por acoplamiento.

**Tabla 3.4 Rendimiento de síntesis de los oligonucleótidos**

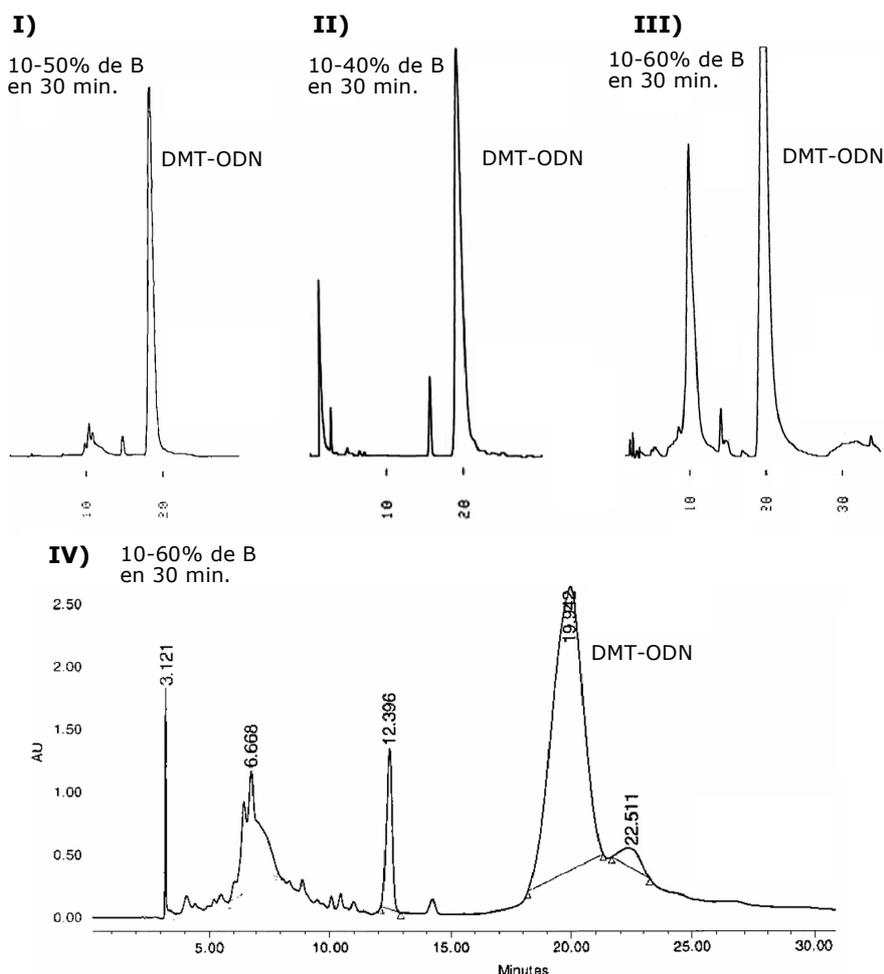
ODN	Rdto. síntesis	Rdto. medio/acop.
14C	88%	99%
14D	79%	98%
23A	71%	98%
23B	51%	97%

Una vez sintetizados se procedió a la desprotección y desanclaje por tratamiento con amoniaco acuoso concentrado a 55°C durante 6 horas si se trata de una secuencia que sólo contiene pirimidinas y 12 horas si la secuencia contiene purinas. Para facilitar la purificación, se mantiene el grupo protector DMT en el extremo 5' de los oligonucleótidos. El crudo obtenido se purificó mediante HPLC semipreparativo en fase reversa C<sub>18</sub>, empleado gradientes lineales de acetato de amonio 0,05 M y acetonitrilo, los cuales se fueron variando en función del crudo a purificar. La **Fig. 3.10** muestra los cromatogramas de HPLC semipreparativo de los crudos de síntesis de los oligonucleótidos con el extremo 5' protegido por el grupo DMT obtenidos en su purificación.

En estas condiciones el tiempo de retención aumenta cuanto más apolar es un compuesto, por lo que en el caso de los oligonucleótidos el tiempo de retención suele aumentar con la longitud de la cadena. De este modo, se incrementa la dificultad para separar cromatográficamente oligonucleótidos de longitud similar, especialmente las secuencias truncadas generadas hacia el final de la síntesis, ya que son las que presentan un comportamiento cromatográfico más similar al oligonucleótido que se quiere purificar. Es por

ello que, para facilitar la separación cromatográfica, se suele mantener el grupo DMT de los oligonucleótidos al término de la síntesis sobre el extremo 5' (síntesis DMT-ON), ya que el DMT-oligonucleótido presenta un tiempo de retención superior al de las secuencias truncadas.

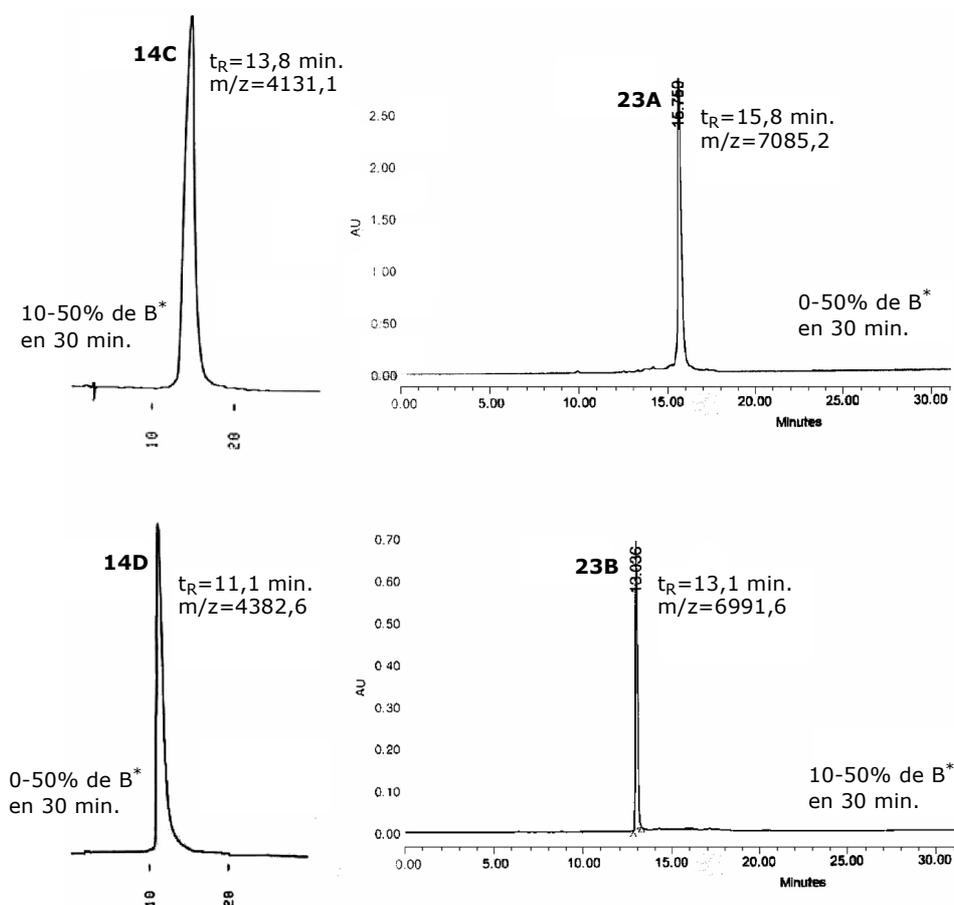
**Figura 3.10 Cromatogramas de HPLC de los crudos de síntesis de I) 14C, II) 14D, III) 23B y IV) 23A. (A: AcONH<sub>4</sub> 0,05 M, B: ACN:H<sub>2</sub>O 1:1)**



Una vez purificado el DMT-oligonucleótido, el grupo protector se eliminó mediante un tratamiento con ácido acético (80%) a 0°C durante 15 minutos. La disolución de ácido acético se eliminó por liofilización, se redisolvió el residuo obtenido en agua calidad Milli-Q y se realizaron extracciones con éter etílico para eliminar los subproductos generados en la eliminación del grupo DMT. La **Fig. 3.11** muestra el análisis por HPLC de los oligonucleótidos una vez purificados y completamente desprotegidos.

Para la purificación y análisis de los oligonucleótidos se han empleado gradientes lineales de acetato de amonio 0,05 M (14C y 14D) o acetato de trietilamonio 0,05 M (23A y 23B) y acetonitrilo. Estos gradientes se fueron variando en función del oligonucleótido a analizar. El análisis por espectrometría de masas (MALDI-TOF, modo negativo), de cada uno de los productos purificados confirmó que se trataba de los productos esperados.

**Figura 3.11 Cromatogramas de HPLC de los oligonucleótidos no modificados una vez purificados**



\*eluyentes: A: AcONH<sub>4</sub> 0,05 M(14C y 14D) ó 0,05 M AcOTEa (23A y 23B)

B: H<sub>2</sub>O/ACN 1:1

Los oligonucleótidos obtenidos se cuantificaron por absorción en UV-vis, en unidades de OD<sub>260</sub> (véase el apartado C.4 de la sección de Materiales y Métodos). En la **Tabla 3.5** se indica la cantidad y el rendimiento obtenido para cada uno de ellos, así como el coeficiente de extinción molar calculado en cada caso.

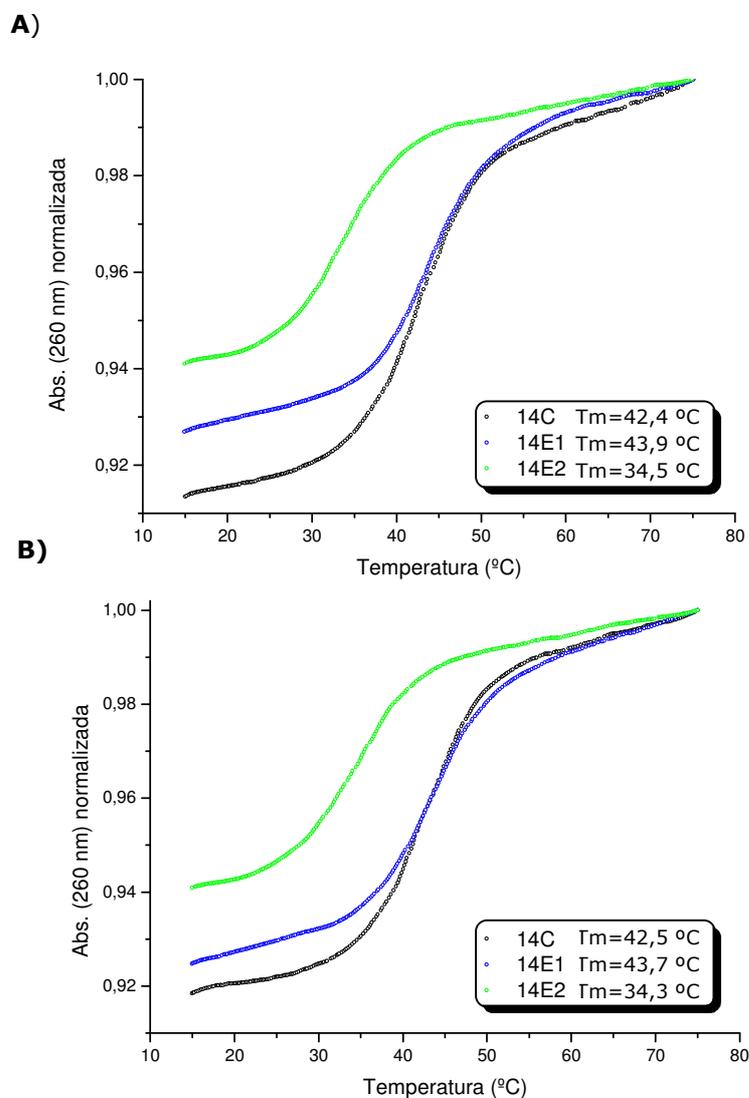
**Tabla 3.5 Datos de los oligonucleótidos sintetizados**

ODN	$\epsilon_{260}$ (mM <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )	OD <sub>260</sub> (teórico)	OD <sub>260</sub>	Rdto.
14C	109,7	109,7	34	31%
14D	166,9	166,9	89	53%
23A	237,3	237,3	112	47%
23B	210,8	210,8	81	38%

#### **4. Análisis de desnaturalización térmica de dobles hélices que contienen la unidad <sup>m</sup>UgT**

Para registrar las curvas de fusión de los diferentes productos se ha seguido la metodología descrita en los apartados D.1 y D.2 de Materiales y Métodos. En la **Fig. 3.12** se muestra un ejemplo de las curvas de fusión obtenidas. En la gráfica superior (**A**) se muestran las curvas de fusión correspondientes a los dúplex formados por 14C (en negro), 14E1 (en azul) y 14E2 (en verde) y su cadena complementaria en ausencia de MgCl<sub>2</sub>, y en la parte inferior (**B**) se muestran las curvas de fusión para los mismos dúplex en presencia de 1mM de MgCl<sub>2</sub>.

**Figura 3.12** Curvas de fusión de dobles hélices modificadas y no modificadas. Condiciones experimentales: 140 mM, 40 mM fosfato, pH=7, A) 0 mM MgCl<sub>2</sub>, B) 1 mM MgCl<sub>2</sub>



El tampón empleado estaba formado por NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (40 mM) (a pH=7), NaCl (140 mM) y MgCl<sub>2</sub> (1 mM) o bien sólo NaCl (140 mM). Las concentraciones se eligieron para reproducir la composición salina de los medios fisiológicos. Tal y como se indica en la **Fig. 3.12**, se realizaron experimentos en ausencia y presencia de MgCl<sub>2</sub> (1 mM), ya que estaba previsto realizar experimentos de hibridación de triples hélices con estos mismos oligonucleótidos, y en los que es indispensable la presencia de Mg(II) para observar la formación de estas estructuras. También se quería comprobar si la presencia de cationes divalentes podría enmascarar el efecto del grupo guanidino.

Todos los experimentos se han realizado con una concentración de 1,5 µmol de oligonucleótido, registrando la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm y con una variación de temperatura de 0,5°C por minuto. Para cada dúplex se han registrado como mínimo dos veces las curvas de desnaturalización y renaturalización. Los datos obtenidos del espectrofotómetro se trataron según se indica en el apartado D.3 de Materiales y Métodos para obtener la representación correspondiente de absorbancia frente a temperatura. Los valores de T<sub>m</sub> se han obtenido a partir del máximo de la derivada de la curva de absorbancia frente a temperatura, con una diferencia máxima en la temperatura de fusión de ±1°C. En la **Tabla 3.6** se resumen los valores de T<sub>m</sub> y el porcentaje promediado del cambio de absorbancia de las transiciones.

**Tabla 3.6 Resultados de las curvas de fusión**

Dúplex	C MgCl <sub>2</sub> (mM)	T <sub>m</sub> (°C)	ΔT <sub>m</sub> (°C)	ΔA (%)
14C.14D	0	42,4	----	19,2
14E1.14D	0	43,9	+1,7	17,4
14E2.14D	0	34,5	-7,9	13,5
14C.14D	1	42,5	----	19,5
14E1.14D	1	43,7	+1,2	17,6
14E2.14D	1	34,3	-8,2	13,2

T<sub>m</sub>±0,5°C; ΔA ±0,4

En primer lugar se registraron las curvas de fusión correspondientes a los dúplex formados por 14C y 14D en ausencia y en presencia de MgCl<sub>2</sub> (1 mM), a modo de referencia. Como se observa en la **Tabla 3.6**, la presencia de MgCl<sub>2</sub> no proporcionaba una estabilidad adicional en los dúplex formados por oligonucleótidos no modificados, ya que los valores de T<sub>m</sub> y de hipercromicidad prácticamente coinciden.

Al analizar los datos obtenidos de los dúplex formados por 14E1 y 14D y compararlos con los de los dúplex formados por oligonucleótidos sin modificar se pueden extraer diversas conclusiones. En primer lugar se puede decir que MgCl<sub>2</sub> no afecta a la estabilidad de los dúplex formados, ya que los valores de T<sub>m</sub> y de hipercromicidad obtenidos prácticamente no se ven alterados. En cambio, si se comparan con los obtenidos en los oligonucleótidos sin modificar, sí que se observaron diferencias de T<sub>m</sub> y de hipercromicidad.

Al comparar los valores de T<sub>m</sub> obtenidos para 14E1 se observó un incremento entre 1,2-1,7°C respecto a 14C, lo que en principio llevaría a concluir que los dúplex formados por 14E1 y su cadena complementaria son ligeramente más estables que los formados por 14C en esas condiciones. Sin embargo, al analizar los valores de hipercromicidad se observó claramente que la variación de absorbancia asociada a la curva de fusión era mayor para los dúplex formados por 14C.

De estos resultados se podrían deducir las siguientes conclusiones:

- (i) Como el dúplex formado por 14E1 muestra un valor de T<sub>m</sub> ligeramente superior, indicaría que introducir un grupo con carga positiva en el extremo de la cadena aporta una cierta estabilidad por interacción electrostática favorable con los grupos fosfato.
- (ii) El valor de hipercromicidad para el dúplex formado por 14E1 es menor, indicando que las interacciones por apilamiento o el apareamiento entre nucleobases son probablemente más débiles, lo cual indicaría que el grupo <sup>m</sup>UgT localizado en el extremo de la cadena produce una cierta distorsión estructural.

Al analizar los datos obtenidos de los dúplex formados por 14E2 y 14D en ausencia y en presencia de MgCl<sub>2</sub> se observa la misma tendencia que en los casos anteriores. La presencia de Mg(II) no afecta sensiblemente a la estabilidad de los dúplex formados, ya que prácticamente no varían los valores de T<sub>m</sub>. La comparación de los resultados obtenidos para 14E2 con los obtenidos para 14C resulta en este caso mucho más sencilla. Los valores de T<sub>m</sub> (entre 7,9-8,2°C) y de hipercromicidad (13%) son significativamente inferiores. De estos datos se desprende que la distorsión provocada en la estructura al introducir la modificación en una posición central de la cadena es mucho mayor que la estabilización producida por la interacción electrostática favorable del grupo guanidino con los grupos fosfato.

## **5. Triples hélices que contienen la unidad <sup>m</sup>UgT**

### **5.1 Consideraciones preliminares**

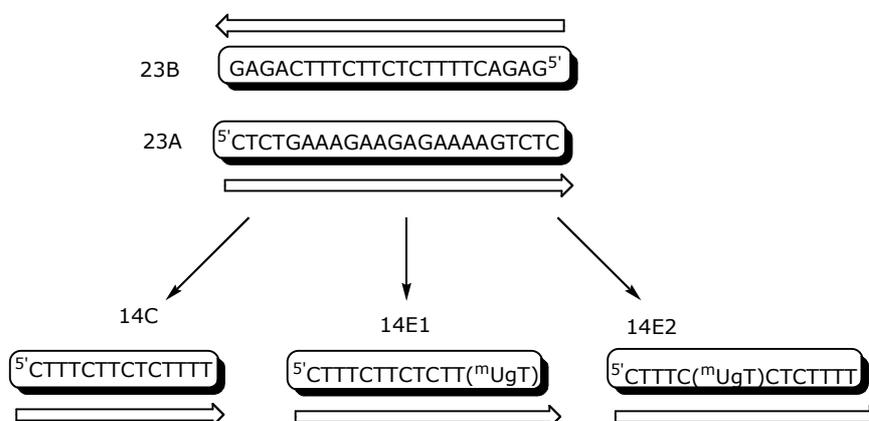
En la bibliografía se describe<sup>45</sup> que la formación de una doble hélice se inicia cuando dos o tres pares de bases se aparean y desaparean en un equilibrio rápido y poco favorable. Cuando a este intermedio crítico se le añaden nuevos pares de bases se forma el núcleo de la hélice, que promueve rápidamente la formación de la estructura a modo de cremallera. Este modelo también se puede aplicar a la formación de triples hélices, pero aquí se requieren de tres a cinco pares de bases para que se dé la nucleación. La nucleación se puede dar en cualquier punto de la secuencia, siempre y cuando las nucleobases se encuentren alineadas adecuadamente. Para ello, las dos cadenas han de adoptar una configuración favorable y envolverse una sobre la otra para que se puedan dar estas primeras interacciones entre pares de bases. Este paso puede ser más sencillo en el caso de

una doble hélice, donde las dos cadenas oligonucleotídicas son relativamente flexibles en solución, mientras que en el caso de la triple hélice una cadena oligonucleotídica (la cadena Hoogsteen o tercera cadena) ha de enrollarse alrededor del surco mayor de la doble hélice previamente formada, que es más rígida. Además, cuando la triple hélice se forma, la doble hélice experimenta un cambio conformacional.

En la formación de una doble hélice las repulsiones electrostáticas entre los grupos fosfato es el factor determinante en el apareamiento de las primeras nucleobases antes de que la estructura se pueda estabilizar por interacciones por apilamiento y por la formación de los enlaces de hidrógeno entre las nucleobases. Estas repulsiones electrostáticas son mucho más importantes en la formación de una triple hélice, ya que la cadena Hoogsteen ha de entrar en contacto con la doble hélice que presenta el doble de densidad de carga que una cadena sola.<sup>23</sup> Por todo ello, la formación de triples hélices está mucho menos favorecida que la de dobles hélices.

La introducción de modificaciones que reemplazan los grupos fosfato por grupos con carga positiva favorece la formación de triples hélices (véanse apartados 2.1-2.3), ya que disminuyen las repulsiones electrostáticas entre grupos fosfato. Los oligonucleótidos 14C y 14E1 y 14E2, ambos modificados con un grupo guanidino, pueden formar triples hélices con el dúplex constituido por 23A y 23B. En este caso, las triples hélices se formarán por el motivo pirimidínico con tríadas T-A:T y C<sup>+</sup>-G:C, con una orientación paralela de la cadena Hoogsteen con respecto al tramo purínico central (23A) (**Fig. 3.13**) Por tanto, en los experimentos que a continuación se describen, se estudiará qué efecto produce sobre la estabilidad de la triple hélice la sustitución de un único grupo fosfato de la cadena Hoogsteen por un grupo guanidino. Como ya se ha comentado anteriormente, la formación de las triples hélices paralelas formadas por tríadas C<sup>+</sup>-G:C depende del pH, por ello, se han realizado experimentos de desnaturalización térmica a diferentes valores de pH (7,0, 6,5 y 6,0). Los resultados se resumen a continuación.

**Figura 3.13 Triples hélices formadas por 14C, 14E1 o 14E2 con el dúplex 23A.23B**

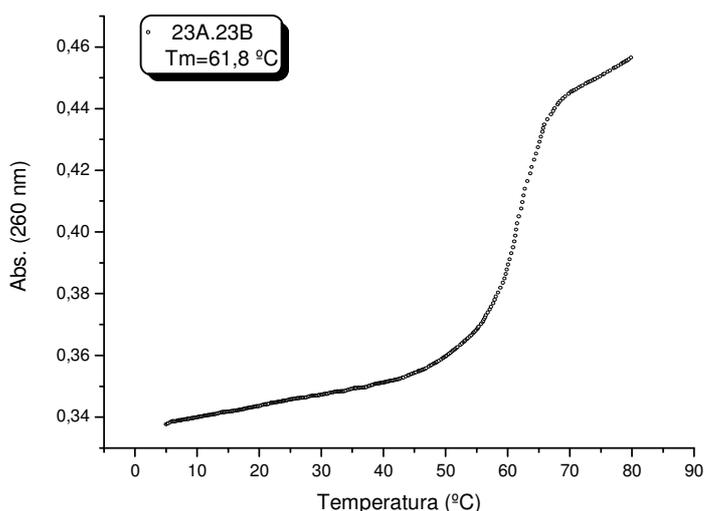


## 5.2 Curvas de fusión de triples hélices que contienen la unidad <sup>m</sup>UgT

Los experimentos se han realizado con una concentración de 1  $\mu$ mol de cada oligonucleótido, registrando la absorbancia a 260 nm y con una variación de temperatura de 0,5°C por minuto. Para cada experimento se han registrado como mínimo dos veces las curvas de desnaturalización.

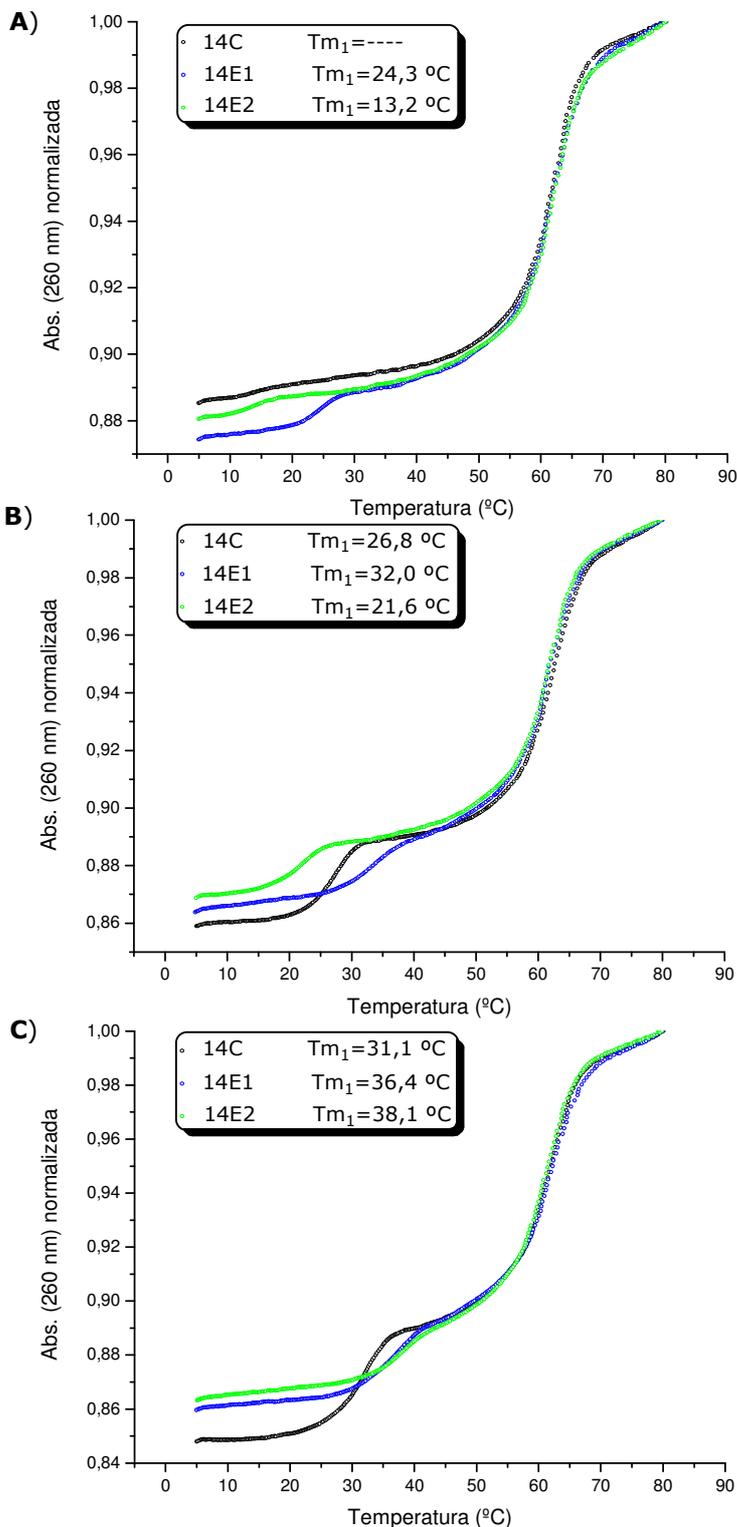
En primer lugar, antes de realizar experimentos de fusión con tres cadenas oligonucleotídicas, se registraron las curvas de fusión correspondientes al dúplex formado por 23A y 23B. En este caso, dado que la  $T_m$  de la doble hélice no depende del pH, se registraron las curvas sólo a pH=7. El valor de  $T_m$  calculado para el dúplex fue de 61,8°C, que como se verá, no interfiere con las transiciones de las triples hélices. La **Fig. 3.14** muestra un ejemplo de las curvas de fusión que han sido estudiadas.

**Figura 3.14 Curva de fusión de la doble hélice 23A.23B.**  
**Condiciones experimentales: 140 mM,**  
**40 mM fosfato, pH=7, 1 mM MgCl<sub>2</sub>**



Una vez registradas las curvas de fusión de la doble hélice diana, se registraron las curvas de fusión de las triples hélices con 14C, 14E1 y 14E2 a diferentes valores de pH (7,0, 6,5 y 6,0). Para preparar las muestras y registrar las curvas se ha seguido la metodología descrita en los apartados D.1 y D.2 de Materiales y Métodos. En la **Fig. 3.15** se muestran las gráficas con las curvas de fusión de las muestras en las que la tercera cadena corresponde a 14C (en negro), 14E1 (en azul) y 14E2 (en verde). Los valores de  $T_m$  en cada caso se han obtenido a partir del máximo de la derivada de la curva de absorbancia frente a la temperatura. La **Tabla 3.7** resume los valores de la temperatura de fusión correspondiente a la disociación de la cadena Hoogsteen y que caracteriza la estabilidad de las triples hélices.

**Figura 3.15** Curvas de fusión de las triples hélices estudiadas. Condiciones experimentales: 140 mM, 40 mM fosfato, 1 mM MgCl<sub>2</sub> A) pH=7,0, B) pH=6,5, C) pH=6,0



Como se puede observar en la **Fig. 3.15**, el perfil de las curvas indica que se dan dos transiciones, siendo la que tiene lugar a temperatura más alta la correspondiente a la desnaturalización de la doble hélice y las más baja a la desnaturalización de la triple hélice.

Los valores de T<sub>m</sub> y de hipercromicidad calculados se promediaron para obtener los resultados que se indican en la **Tabla 3.7**.

**Tabla 3.7 Resultados obtenidos de las curvas de fusión de las triples hélices**

Cadena Hoogsteen	pH	T <sub>m1</sub> (°C)	ΔA (%)
14C	7	nd	----
14E1	7	24,3	2,1
14E2	7	13,2	1,1
14C	6,5	26,8	6,3
14E1	6,5	32,0	4,5
14E2	6,5	21,6	3,9
14C	6	31,1	9,4
14E1	6	36,4	6,5
14E2	6	38,1	4,8

T<sub>m</sub>±0,5°C; ΔAbs ±0,4

nd: no detectado

Tal y como cabía esperar para este tipo de triples hélices, las curvas de fusión muestran una clara dependencia con el pH. En las curvas registradas a pH=7,0 para 14C se observó un ligero cambio en la absorbancia entre 11 y 17°C, que se podría atribuir a la formación de la triple hélice, pero al ser tan poco intensa, no fue posible calcular el valor de T<sub>m1</sub> de esta transición. En este caso se podría concluir que la estructura formada es muy poco estable. Al disminuir el pH a 6,5, se observó que esta primera transición mostraba un cambio en la absorbancia del 6,3% y un valor de T<sub>m1</sub> de 26,8°C. A pH 6,0, el aumento en la hipercromicidad (9,4%) y en la T<sub>m1</sub> fue aún mayor (31,1°C).

Los resultados obtenidos para las triples hélices formadas por 14E1 en el rango de pH estudiado presentaban la misma tendencia que las muestras analizadas con 14C al disminuir el pH, pero con algunas diferencias. En primer lugar, a pH=7,0 se observó una transición con un cambio hipercrómico alrededor del 2% y T<sub>m</sub>=24,3°C. Al disminuir el pH, la T<sub>m</sub> y la hipercromicidad fueron aumentando paulatinamente (4,5% y 32,0°C a pH=6,5 y 6,5% y 36,4°C a pH=6). En comparación con las triples hélices formadas por el oligonucleótido no modificado 14C, el aumento en la hipercromicidad con la disminución de pH fue menor. Sin embargo, los valores de T<sub>m1</sub> siempre fueron mayores en cualquiera de los tres valores de pH. Analizando estos resultados, se puede concluir que al sustituir una carga negativa por una carga positiva en el extremo de la cadena favorece extraordinariamente la formación de la triple hélice a pH=7,0, ya que se observa una transición clara (T<sub>m1</sub>=24,3°C), mientras que con 14C apenas se observa. No obstante, los valores de hipercromicidad obtenidos para 14E1 eran menores en comparación con 14C a pH=6,5 y 6,0, lo que induce a pensar que la modificación también altera estructuralmente la triple hélice.

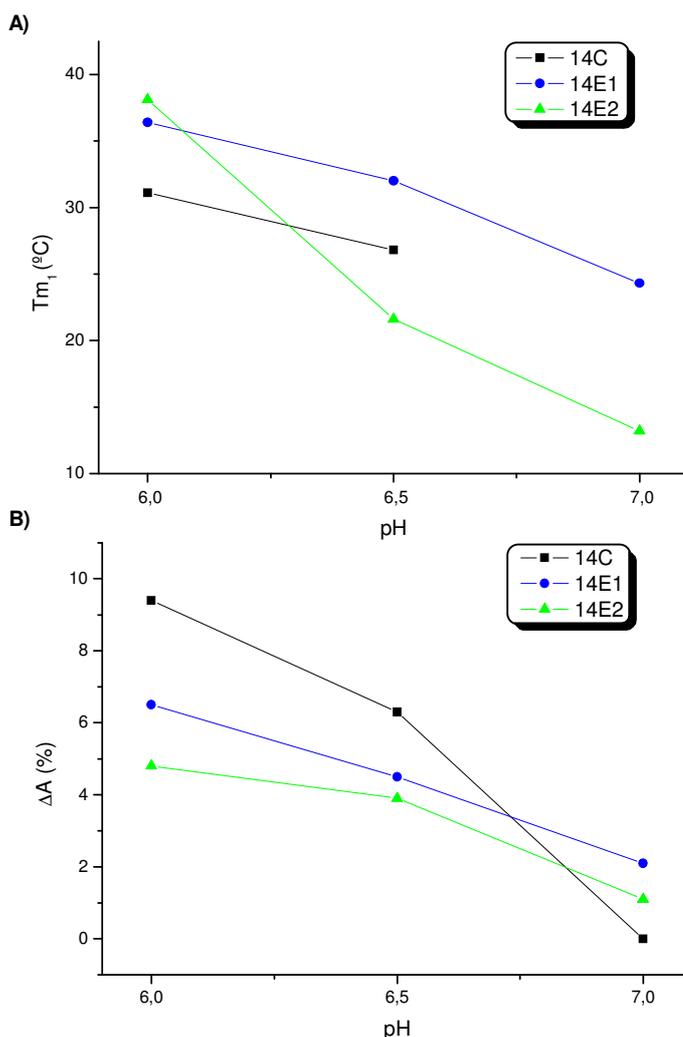
Por lo que respecta a las triples hélices formadas por 14E2, en el rango de pH estudiado presentaban la misma tendencia que las formadas por 14E1. Es decir, los valores de  $T_{m1}$  aumentaban al disminuir el pH, pero de manera diferente. A pH=7,0 se detectó un ligero aumento en la absorbancia alrededor del 1% respecto al valor inicial, suficiente como para poder asignar un valor de  $T_{m1}$  a esa transición (13,2°C). Al disminuir el pH, la  $T_{m1}$  y la hipercromicidad aumentaron ( $T_{m1}=21,6^{\circ}\text{C}$  y  $\Delta A=3,9\%$  a pH=6,5), pero eran inferiores a los valores obtenidos para 14C y 14E1 a ese pH. A pH=6,0 la hipercromicidad aumentó ( $\Delta A=4,8\%$ ), aunque seguía siendo inferior a los valores obtenidos para 14C y 14E1. En cambio, el valor de la temperatura de fusión de la triple hélice ( $T_{m1}=38,1^{\circ}\text{C}$ ), es el mayor para los casos estudiados. Comparando estos resultados con los obtenidos para 14C y 14E1, se puede concluir que la presencia de una carga positiva en la parte central de la cadena favorece ligeramente la formación de la triple hélice a pH=7,0, ya que el cambio en la absorbancia y el valor de  $T_{m1}$  es menor que para 14E1. En cambio, se puede decir que a pH=6,5 la desestabilización producida por haber situado la modificación en la parte central de la cadena es mayor que la estabilización que pueda aportar la carga positiva, resultando en una estructura menos estable que la formada por 14C. Sin embargo, a pH=6,0 el valor de  $T_{m1}$  es mayor en comparación con 14C, por lo que se podría concluir que a ese pH la estabilidad introducida por la carga positiva es mucho mayor y compensa el efecto de distorsión de la estructura por el grupo guanidino.

Del conjunto de resultados se puede concluir lo siguiente:

- i) los oligonucleótidos modificados con un grupo guanidino estabilizan notablemente la formación de la triple hélice a pH=7,0 (14E1  $T_{m1}=24,3^{\circ}\text{C}$ , 14E2  $T_{m1}=13,2^{\circ}\text{C}$ ), condiciones en las que la triple hélice no modificada prácticamente no se forma. Muy probablemente la interacción electrostática favorable del grupo guanidino con los grupos fosfato adyacentes compensa la desestabilización del complejo provocado por el bajo porcentaje de protonación de las citosinas, que de esta forma no pueden formar tríadas  $\text{C}^+-\text{G}:\text{C}$  estables. El efecto de estabilización es mucho mayor para el oligonucleótido modificado en el extremo 3' (14E1) que para aquel en el que el grupo guanidino se encuentra en una posición central de la cadena (14E2). Aquí probablemente la estabilización es menor porque a pesar del efecto electrostático estabilizante, la introducción de la subunidad <sup>m</sup>UgT produce una mayor distorsión estructural en una posición central que en un extremo.
- ii) A pH=6,5 la estabilización aumenta para las tres triples hélices, aunque el incremento de  $T_{m1}$  es mayor para la no modificada y es mucho más moderado para las modificadas. Aún así, la triple hélice 14E1 es también la más estable. Al disminuir el pH, aumenta la protonación de las citosinas de la cadena Hoogsteen, y por tanto, la estabilidad de la triple aumenta como resultado del mayor número de tríadas  $\text{C}^+-\text{G}:\text{C}$  formadas. En estas condiciones es lógico pensar que el efecto estabilizante de la interacción de los grupos guanidino pierda peso en la estabilización del complejo.

- iii) A pH=6,0 la estabilidad de las triples hélices modificadas prácticamente se iguala, siendo 14E2 la más estable. En estas condiciones, la estabilización provocada por el grupo guanidino sigue siendo importante, situándose en  $\Delta T_m=5-6^\circ\text{C}$  con respecto a la triple hélice no modificada.
- iv) La introducción de la subunidad <sup>m</sup>UgT produce por tanto la estabilización de la triple hélice, siendo máxima a pH=7,0, condiciones en que la triple hélice no modificada prácticamente no se forma, y cuando la modificación se sitúa en el extremo 3' (**Fig. 3.16, A**). Por los datos de que se dispone, esta estabilización cabe atribuirla a la interacción electrostática favorable del grupo guanidino con los fosfatos, que disminuye al disminuir el pH, ya que en medios ácidos la triple hélice está perfectamente formada. Con independencia del efecto estabilizante, la subunidad <sup>m</sup>UgT produce una distorsión estructural de la triple hélice, que se manifiesta en los menores porcentaje de  $\Delta A$  con respecto a la no modificada a pH=6,5 y 6,0 (**Fig. 3.16, B**). La distorsión es menor en un extremo de la secuencia que en una posición central.

**Figura 3.16 Variación en función del pH de los valores de A)  $T_{m1}$  y B)  $\Delta A$  obtenidos de las curvas de fusión de triples hélices**



## **6. Resumen de los resultados obtenidos**

Los resultados obtenidos en los experimentos de hibridación, aunque preliminares, permiten deducir algunas pautas sobre el efecto de introducir subunidades morfolino-amidina (<sup>m</sup>UgT) en la estabilidad de dobles y triples hélices. Se concluye que una sola guanidina no es suficiente para estabilizar una doble hélice de DNA. Si la modificación se sitúa en un extremo de una de las cadenas hibridadas, la estabilidad es prácticamente idéntica a la no modificada pero el efecto es claramente desestabilizante si se modifica una posición central. No obstante, la introducción de las subunidades guanidino aumenta la estabilidad química y enzimática de las cadenas oligonucleotídicas. Cabe recordar que ambas son propiedades deseables en cualquiera de las aplicaciones de los oligonucleótidos, ya sea en la detección de secuencias biológicamente relevantes y en el diagnóstico médico, en el cribado de bibliotecas químicas mediante *arrays* de DNA o en la construcción de nanoestructuras.

Como ya se había visto en los numerosos estudios de hibridación con oligonucleótidos guanidino, la introducción de las subunidades morfolino-amidina produce una estabilización significativa de las triples hélices. Con una sola subunidad guanidino, se observa la formación de triples hélices estables a pH neutro, condiciones en que la triple hélice no modificada no se forma. No obstante, el efecto de estabilización depende del pH (disminuye con el aumento de pH) y de la posición modificada en la secuencia oligonucleotídica. A la vista de algunos de los resultados, la subunidad morfolino-amidina puede producir una cierta distorsión estructural en las dobles y triples hélices. Esto explica que la mayor estabilización se consiga modificando el extremo de unas de las cadenas. No obstante, la limitación se convierte en ventaja ya que es mucho más fácil llevar a cabo la síntesis química de tramos modificados en los extremos que introduciendo modificaciones en una zona central de la secuencia. En determinadas aplicaciones, como los oligonucleótidos antisentido o en RNA de interferencia, resulta conveniente precisamente que las modificaciones químicas se sitúen sólo en los extremos para evitar la disminución de la actividad. Además, la previsible mayor estabilidad en condiciones fisiológicas de las triples hélices así modificadas permitiría abordar determinadas aplicaciones hasta el momento prohibitivas.

Aunque aún no suficientemente optimizada, la síntesis de los oligonucleótidos modificados en fase sólida permite facilitar notablemente su obtención, en especial, si se compara con la de los análogos guanidino previamente descritos por T. C. Bruice. De modo paralelo a lo aquí expuesto, también se ha estado trabajando en la síntesis de oligonucleótidos que contienen un tramo de unidades morfolino-amidina, adaptando la metodología en fase sólida aquí descrita. El objetivo sería poder obtener oligonucleótidos parcial o totalmente modificados. Posiblemente, entre diversas posibles aplicaciones, los oligonucleótidos formados por subunidades morfolino-amidina podrían mejorar las propiedades de internación celular de los análogos morfolino, los cuales deben conjugarse a péptidos policatiónicos para mostrar una buena actividad biológica.

## **7. Bibliografía**

- (1) Watson, J. D.; Crick, F. H.C.; *Nature*, 171, 737-738, **(1953)**
- (2) Zamenhof, S.; Brawerman, G.; Chargaff, E.; *Biochim. Biophys. Acta*, 9, 402-405, **(1952)**
- (3) Dekker, C. A.; Michelson, A. M.; Todd, A. R.; *J. Chem. Soc.*, 947-951, **(1953)**
- (4) Hanlon, S.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 23, 861-867, **(1966)**
- (5) Saenger, W., *Principles of Nucleic Acids Structure*, Springer-Verlag, New York, **(1984)**
- (6) Arnott, S.; Hukins, D. W. L.; *J. Mol. Biol.*, 81, 93, **(1973)**
- (7) Felsenfeld, G.; Davies, R. D.; Rich, A.; *J. Am. Chem. Soc.*, 79, 2023-2024, **(1957)**
- (8) Le Doan, T.; Perrouault, L.; Praseuth, D.; Habhouh, N.; Decout, J. L.; Thuong, N. T.; Lhomme, J.; Hélène, C.; *Nucleic Acids Res.*, 15, 7749-7760, **(1987)**
- (9) Moser, H. E.; Dervan, P. B.; *Science*, 238, 645-650, **(1987)**
- (10) Lyamichev, V. I.; Mirkin, S. M.; Frank-Kamenetskii, M. D.; *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 3, 667-669, **(1986)**
- (11) Kohwi, Y.; Kohwi-Shigematsu, T.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 3781-3785, **(1988)**
- (12) Kinniburgh, A. J.; *Nucleic Acids Res.*, 17, 7771-7778, **(1989)**
- (13) Pestov, D. G.; Dayn, A.; Siyanova, E.; George, D. L.; Mirkin, S. M.; *Nucleic Acids Res.*, 19, 6527-6532, **(1991)**
- (14) Mills, M.; Arimondo, P. B.; Lacroix, L.; Garestier, T.; Hélène, C.; Klump, H.; Mergny, J.-L.; *J. Mol. Biol.*; 291, 1035-1054, **(1999)**
- (15) Robles, J.; Grandas, A.; Pedrosa, E.; Luque, F. J.; Eritja, R.; Orozco, M.; *Curr. Org. Chem.*, 6, 14, 1333-1368, **(2002)**
- (16) Radhakrishnan, I.; Patel, D. J.; *Structure*, 2, 395, **(1994)**
- (17) Rajagopal, P.; Feigon, J.; *Nature*, 22, 637, **(1989)**
- (18) Rajagopal, P.; Feigon, J.; *Biochemistry*, 28, 7859, **(1989)**
- (19) Hélène, C.; *Pure & Appl. Chem.*, 66, 4, 663-669, **(1994)**
- (20) Mergny, J.-L.; Lacroix, L.; *Oligonucleotides*, 13, 515-537, **(2003)**
- (21) Schildkraut, C.; *Biopolymers*, 3, 195-208, **(1965)**
- (22) Manning, G. S.; Ray, J.; *J. Biomol. Struct.*, 16, 461-476, **(1998)**
- (23) Rougée, M.; Faucon, B.; Mergny, J. L.; Barcelo, F.; Giovannangeli, C.; Garestier, T.; Hélène, C.; *Biochemistry*, 31, 9269-9278, **(1992)**
- (24) Dempcy, R. O.; Browne, K. A.; Bruice, T. C.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 6097-6101, **(1995)**
- (25) Browne, K. A.; Dempcy, R. O.; Bruice, T. C.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 7051-7055, **(1995)**
- (26) Blaskó, A.; Dempcy, R. O.; Minyat, E. E.; Bruice, T. C.; *J. Am. Chem. Soc.*, 118, 7892-7899, **(1996)**
- (27) Blaskó, A.; Minyat, E. E.; Dempcy, R. O.; Bruice, T. C.; *Biochemistry*, 36, 7821-7831, **(1997)**
- (28) Linkletter, B. A.; Bruice, T. C.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 8, 1285-1290, **(1998)**
- (29) Linkletter, B. A.; Szabo, I. E.; Bruice, T. C.; *J. Am. Chem. Soc.*, 121, 3888-3896, **(1999)**

- (30) Linkletter, B. A.; Szabo, I. E.; Bruice, T. C.; *Nucleic Acids Res.*, 29, 11, 2370-2376, **(2001)**
- (31) Reddy, P. M.; Bruice, T. C.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 13, 1281-1285, **(2003)**
- (32) Szabo, I. E.; Bruice, T. C.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 12, 4233-4244, **(2004)**
- (33) Jain, M. L.; Bruice, T. C.; *Bioorg. Med. Chem.*, 14, 7333-7346, **(2006)**
- (34) Park, M.; Bruice, T. C.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 15, 3247-3251, **(2005)**
- (35) Park, M.; Toporowski, J. W.; Bruice, T. C.; *Bioorg. Med. Chem.*, 14, 1743-1749, **(2006)**
- (36) Barawkar, D. A.; Bruice, T. C.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 11047-11052, **(1998)**
- (37) Luo, J.; Bruice, T. C.; *J. Am. Chem. Soc.*, 119, 6693-6701, **(1997)**
- (38) Dempcy, R. O. et al.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 7864-7868, **(1994)**
- (39) Dempcy, R. O.; et al.; *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 6190-6191, **(1995)**
- (40) Browne, K. A.; et al.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 7051-7055 **(1995)**
- (41) Luo, J.; Bruice, T. C.; *J. Am. Chem. Soc.*, 1115-1121, **(1998)**
- (42) Parte, M.; et al.; *Bioorg. Med. Chem.*, 14, 1743-1749, **(2006)**
- (43) Toporowski, J. W.; Reddy, A. Y.; Bruice, T. C.; *Bioorg. Med. Chem*, 13, 3691-3698, **(2005)**
- (44) Dempcy, R. O.; Luo, J.; Bruice, T. C.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 4326-4330, **(1996)**
- (45) Craig, M. E.; Crothers, D. M.; Doty, P.; *J. Mol. Biol.*, 62, 383-401, **(1971)**





## **Conclusiones**

En la presente Tesis Doctoral se han ensayado diferentes metodologías para la obtención de un nuevo análogo oligonucleotídico con unidades catiónicas en su esqueleto, formadas por morfolinonucleósidos que se unen mediante enlaces guanidino (morfolino-amidinas). Mediante la metodología así desarrollada, se han conseguido preparar dos oligonucleótidos que contienen una unidad morfolino-amidina en el extremo 3' y en una posición central de la cadena y se han estudiado sus propiedades de hibridación mediante curvas de fusión.

La síntesis de los oligonucleótidos que contienen la unidad morfolino-amidina se ha ensayado mediante dos rutas. La primera consiste en sintetizar la unidad dinucleosídica morfolino-amidina, para luego, convenientemente funcionalizada como derivado fosforamidito, actuar como sintón de la síntesis de oligonucleótidos. La segunda estrategia ensayada se basa en la formación del enlace guanidino en fase sólida por acoplamiento entre el derivado tiourea de un morfolinonucleósido y un aminonucleósido anclado a resina.

Por lo que respecta a la primera estrategia, para preparar la subunidad dinucleosídica morfolino-amidina, se ensayaron diversos métodos de formación de guanidina. La elección de la metodología se realizó preparando un derivado modelo, por condensación de un derivado tiourea de morfolina y 5'-amino-2',5'-didesoxitimidina. Los ensayos concluyeron que la mejor opción consistía en preparar un intermedio activado de la tiourea por reacción con el reactivo de Sanger, que por reacción con el aminonucleósido daba lugar a la formación de la guanidina. En estos ensayos, también se estudiaron diversos grupos para proteger el grupo guanidino, resultando ser la mejor opción el grupo aliloxicarbonilo, ya que se podía eliminar cuantitativamente en condiciones compatibles con la estabilidad de los oligonucleótidos mediante la catálisis de paladio.

Concluidos los ensayos, esta metodología se empleó en la síntesis de un dímero guanidino de morfolinouridina y aminodesoxitimidina, que convenientemente funcionalizado como derivado fosforamidito, se empleó para preparar el pentámero  ${}^5\text{T}(\text{mUg}_{(\text{Alloc})}\text{T})\text{TC}$ , con rendimientos de incorporación que no superaban el 78%, valor bastante inferior a lo considerado óptimo para llevar a cabo una síntesis habitual. La baja incorporación del dinucleósido se puede atribuir a efectos estéricos del propio dinucleósido que dificultan la reacción de formación del enlace fosfita, que a la vez facilita la reacción de hidrólisis que compete con la de acoplamiento. Por tanto, se optó por evaluar una metodología sintética alternativa que no precisara de la preparación previa de la unidad dinucleosídica. También se observó que en la etapa de eliminación del grupo aliloxicarbonilo, que se realizaba sobre fase sólida, daba lugar, además del producto deseado, a una reacción secundaria de *N*-alilación de guanidina.

Por lo que respecta a la segunda ruta, para llevar a cabo la síntesis de guanidinas en fase sólida, se ensayaron nuevamente diversos procedimientos. Inicialmente se ensayó la

metodología ya ensayada en disolución, pero la pre-activación de la tiourea derivada de morfolinouridina con el reactivo de Sanger, para luego llevar a cabo el anclaje sobre 5'-amino-2',5'-didesoxitimidina anclada a la resina, en ninguno de los casos logró superar el 40% de incorporación. Como alternativa se decidió ensayar la activación *in situ* del derivado tiourea. Se obtuvieron los mejores resultados empleando el reactivo de Mukaiyama, obteniéndose un porcentaje de incorporación alrededor del 70%. El análisis de los crudos de reacción indicaba que en todos los casos se formaba el producto esperado y un producto secundario de la reacción entre el reactivo de Mukaiyama y el 5'-aminonucleósido anclado al soporte. Posteriormente, se comprobó que esta reacción secundaria podía ser minimizada mezclando previamente el derivado tiourea y el reactivo de Mukaiyama, para luego tratar la resina con esta solución.

Posteriormente, se ensayó la eliminación del grupo Alloc en fase sólida sobre  ${}^m\text{Ug}_{(\text{Alloc})}\text{T}$ -succinilsarcosinil-resina. Se ensayaron diferentes tratamientos para conseguir una eliminación cuantitativa y minimizar la reacción secundaria de alilación del grupo guanidino. Por los ensayos realizados, se comprobó que se minimizaba la reacción secundaria empleando una concentración elevada de captador.

Mediante la metodología así desarrollada, se sintetizaron dos oligonucleótidos polipirimidínicos 14mer, que contenían una unidad morfolino-amidina ( ${}^m\text{Ug}_{(\text{Alloc})}\text{T}$ ), el primero en el extremo 3' de la cadena (14E1), y el segundo en una posición central (14E2). En estos casos se observó que para poder eliminar el grupo Alloc era necesario realizar más de un tratamiento con paladio para conseguir una eliminación cuantitativa.

Los oligonucleótidos así sintetizados se emplearon en los experimentos de formación de dobles y triples hélices, con el fin de explorar de forma preliminar las propiedades de hibridación de los oligonucleótidos que contienen unidades de morfolino-amidina. Los resultados obtenidos en los experimentos de hibridación, aunque preliminares, permiten deducir algunas pautas sobre el efecto de introducir subunidades morfolino-amidina ( ${}^m\text{UgT}$ ) en la estabilidad de dobles y triples hélices. Se concluye que una sola guanidina no es suficiente para estabilizar una doble hélice de DNA. Si la modificación se sitúa en un extremo de una de las cadenas hibridadas, la estabilidad es prácticamente idéntica a la no modificada pero el efecto es claramente desestabilizante si se modifica una posición central. No obstante, la introducción de las subunidades guanidino aumenta la estabilidad química y enzimática de las cadenas oligonucleotídicas. Con una sola subunidad guanidino, se observa la formación de triples hélices estables a pH neutro, condiciones en que la triple hélice no modificada no se forma. No obstante, el efecto de estabilización depende del pH (disminuye con el aumento de pH) y de la posición modificada en la secuencia oligonucleotídica. A la vista de algunos de los resultados, la subunidad morfolino-amidina puede producir una cierta distorsión estructural en las dobles y triples hélices, ya que la mayor estabilización se consigue modificando el extremo de unas de las cadenas.





## **A. Disolventes y disoluciones tampón**

### **A.1 Disolventes**

**AcOEt anhidro:** se guarda sobre piedras de CaH<sub>2</sub> y bajo atmósfera de argón.

**ACN anhidro:** se destila ACN calidad HPLC sobre CaH<sub>2</sub> en polvo y se guarda sobre piedras de CaH<sub>2</sub> bajo atmósfera de argón.

**Agua calidad Millipore:** se hace circular agua desionizada a través de un sistema *Milli-Q Plus* hasta que presenta una resistividad superior a 18,2 Ω<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>.

**DCM anhidro:** se destila sobre CaH<sub>2</sub> en polvo y se guarda sobre piedras de CaH<sub>2</sub> y bajo atmósfera de argón. Si se va a emplear para disolver un producto lábil a ácidos, como los productos protegidos con DMT o MMT, antes de destilarlo se neutraliza eluyéndolo por una columna de alúmina básica.

**DIEA anhidra:** se guarda sobre piedras de CaH<sub>2</sub> y bajo atmósfera de argón.

**DMF anhidra:** se vierte sobre tamiz molecular activado de 4 Å. Antes de utilizarla se burbujea enérgicamente con nitrógeno para eliminar las impurezas volátiles.

**Piridina anhidra:** se destila sobre ninhidrina y se guarda sobre piedras de CaH<sub>2</sub> y bajo atmósfera de argón.

**TEA anhidra:** se destila sobre CaH<sub>2</sub> en polvo y anhídrido benzoico. Se guarda sobre lentejas de KOH bajo atmósfera de argón.

**THF anhidro:** se destila sobre sodio en presencia de benzofenona. Se guarda sobre piedras de CaH<sub>2</sub> y bajo atmósfera de argón.

### **A.2 Preparación de disoluciones tampón**

#### **A.2.1 Acetato de amonio (AcONH<sub>4</sub>), 2M, pH=7,0**

Se disuelven 71 g de acetato de amonio en 400 mL de agua calidad Milli-Q, se ajusta el pH a 7 (con ácido acético glacial o con una solución acuosa de NH<sub>3</sub> al 33% según sea el caso) y se enrasa a 500 mL. La disolución final se filtra a través de un filtro de nylon con un tamaño de poro de 0,45 μm y se guarda en la nevera.

#### **A.2.2 Acetato de trietilamonio (AcOTEA), 2M, pH=7,0**

Se mezclan 140 mL de TEA, 58 mL de AcOH glacial y 250 mL de agua calidad Milli-Q agitando vigorosamente. Una vez se ha enfriado la disolución se ajusta el pH a 7 (con TEA o ácido acético glacial según sea el caso) y se enrasa el volumen a 500 mL con agua calidad

Milli-Q. La disolución final se filtra a través de un filtro de nylon de 0,45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro y se guarda en la nevera.

### **A.2.3 Tris-HCl, 0,1 M, pH=8,0**

Para preparar 100 mL de esta solución tampón se disuelven 1,21 g de Tris-HCl en 80-90 mL de agua calidad Milli-Q, se ajusta el pH con HCl y se enrasa a 100 mL en un matraz aforado.

### **A.2.4 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,1 M, pH=7,0, 6,5 y 6,0**

Para preparar la solución tampón de fosfato a pH=7,0 se mezclan 30,5 mL de una solución acuosa 0,2 M de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 19,5 mL de una solución acuosa 0,2 M de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Se ajusta el pH (con la solución de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> o de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> según sea necesario), y se enrasa a 100 mL en un matraz aforado.

Para preparar la solución tampón de fosfato a pH=6,5 se mezclan 41,5 mL de una solución acuosa 0,2 M de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 8,5 mL de una solución acuosa 0,2 M de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Se ajusta el pH (con la solución de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> o de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> según sea necesario), y se enrasa a 100 mL en un matraz aforado.

Para preparar la solución tampón de fosfato a pH=6,0 se mezclan 47,0 mL de una solución acuosa 0,2 M de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 3,0 mL de una solución acuosa 0,2 M de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Se ajusta el pH (con la solución de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> o de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> según sea necesario), y se enrasa a 100 mL en un matraz aforado.

## **B. Instrumentación y técnicas generales**

### **B.1 Técnicas espectroscópicas**

Los espectros de resonancia magnética nuclear de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C se han realizado en equipos Gemini-200 MHz y Mercury-400 MHz y los espectros de <sup>31</sup>P se registraron en un equipo Varian Unity-300 MHz de la Unitat d'RMN d'Alt Camp de los Servicios Científico-Técnicos de la UB. Los valores de desplazamiento químico ( $\delta$ ) en los espectros de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C se expresan en ppm respecto a la señal de protón y carbono del tetrametilsilano. ( $\delta=0$  ppm). En los espectros de <sup>31</sup>P se indica el desplazamiento químico en ppm respecto a una referencia externa de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (85%,  $\delta=0$  ppm). En este caso, los espectros se registraron introduciendo un capilar de vidrio cerrado que contiene la referencia dentro del tubo que contiene la muestra.

Los espectros de absorción de Ultravioleta-Visible (UV-vis) se han registrado en espectrofotómetros Perkin-Elmer Lambda 5 y Jasco V-550, provisto de un Peltier ETC-505T

(Jasco) como controlador de la temperatura. Las cubetas utilizadas son de cuarzo con un camino óptico de 1 cm y una capacidad de 1,5 mL.

Los espectros de infrarrojo (IR) se han adquirido en un espectrofotómetro Nicolet 510 FT-IR.

## **B.2 Espectrometría de masas**

Los espectros de masas se han realizado en el Servicio de Espectrometría de masas de la Facultad de Química. Los espectros obtenidos mediante las técnicas de ionización en electrospray (ES) y por bombardeo de átomos rápidos (FAB) se han realizado en un equipo VG-Quattro (Fison Instruments), utilizando un voltaje capilar de 3.5 kV y 10kV, respectivamente.

Los espectros adquiridos mediante la técnica de desorción iónica por láser asistida por matriz y detección de tiempo de vuelo (MALDI-TOF) se han registrado en un equipo de Perseptive Biosystems Voyager DE<sup>TM</sup>RP, con un láser de N<sub>2</sub> de 337 nm y pulsos de 3 ns, y se han empleado las siguientes matrices: ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico (ACH) (10mg/mL en ACN/H<sub>2</sub>O 1:1), 9-nitroantraceno (10 mg/mL en ACN) y 2,4,6-trihidroxiacetofenona (THAP) (10mg/mL en ACN/H<sub>2</sub>O 1:1), y en los casos que ha sido necesario se ha empleado la co-matriz citrato amónico (CA) (50 mg/ml H<sub>2</sub>O).

La preparación de las muestras depende de su naturaleza. Por lo que respecta a los intermedios de síntesis de nucleósidos la matriz se prepara de la siguiente manera: a 1  $\mu$ L de una solución del compuesto en ACN/H<sub>2</sub>O 1:1 (10-50 pmol/ $\mu$ L) se añade 1  $\mu$ L de ACH, se homogeneiza y se deposita 1  $\mu$ L de la mezcla sobre la placa. Antes de realizar las medidas se deja evaporar el disolvente. Si el producto no es estable en agua, se utiliza como disolvente ACN y como matriz 9-nitroantraceno. Si la muestra a analizar se trata de un oligonucleótido, ésta se disuelve en ACN/H<sub>2</sub>O 1:1 (10-50 pmol/ $\mu$ L), se toma 1  $\mu$ L y se mezcla con 1  $\mu$ L de CA. Se toma 1  $\mu$ L y se añade a 1  $\mu$ L de THAP. Se homogeneiza y a continuación se deposita 1  $\mu$ L de la mezcla sobre la placa. Antes de realizar las medidas se deja evaporar el disolvente. En todos los casos la mezcla de muestra y matriz se deposita en una placa metálica "well plate" provista de 100 posiciones y se deja secar antes de introducirla en el equipo para registrar el espectro de masas.

## **B.3 Técnicas cromatográficas**

### **B.3.1 Análisis por cromatografía en capa fina (CCF)**

La cromatografía en capa fina (CCF) se ha realizado sobre cromatofolios de gel de sílice con soporte de aluminio e indicador de fluorescencia a 254 nm (60 F, 0,2 mm, Merck). Como fase móvil se han utilizado mezclas de DCM, MeOH, TEA y AcOEt en diferentes

proporciones según el compuesto analizado. Para el revelado se han empleado diferentes procedimientos en función del tipo de compuesto analizado.

- Revelado por UV (grupos aromáticos/cromóforos): el revelado de las capas finas se ha realizado exponiendo la placa cromatográfica directamente bajo una lámpara de ultravioleta a  $\lambda=254$  nm.
- Revelado de grupos protectores DMT y MMT: el revelado de los compuestos que contienen los grupos protectores DMT y MMT se ha llevado a cabo sometiendo la placa cromatográfica a vapores ácidos o bien calentando en una estufa a 55°C durante 5 minutos. La coloración naranja (DMT) o amarilla (MMT) indica la presencia del catión tritilo.
- Revelado de azúcares (detección del anillo de ribosa y 2'-desoxirribosa): para preparar la solución de revelado se añaden 50 mL de ácido acético glacial y 1,5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado a 90 mL de EtOH. Finalmente se disuelven 0,5 g de difenilamina. La placa cromatográfica se moja con el revelador y se deja secar. A continuación se calienta en una estufa a 110°C durante 3 minutos. La presencia de compuestos que contienen el anillo de ribosa o 2'-desoxirribosa se pone de manifiesto por la aparición de coloración marrón oscuro.
- Revelado con ninhidrina (detección de grupos amino libres): se pulveriza la placa cromatográfica con una disolución de ninhidrina (0,5% en acetona) y se calienta en una estufa a 110°C durante 3 minutos. La presencia de grupos amino se pone de manifiesto por la aparición de coloración violeta.
- Revelado con nitrato de plata (detección de fosfinas): para preparar la solución de revelado se añade 5 mg de nitrato de plata a 15 mL de etanol. La placa cromatográfica se moja con el revelador y se deja secar. A continuación se calienta en una estufa a 110°C durante 3 minutos. La presencia de compuestos que contienen fósforo se pone de manifiesto por la aparición de coloración marrón oscuro.

### **B.3.2 Cromatografía en columna**

La cromatografía en columna se ha realizado sobre gel de sílice (Chromatogel 60 Å, 35-70 micrones, SDS). Se utilizan 60 g de sílice por gramo de crudo a purificar. Los eluyentes utilizados se indican en cada caso. Si el crudo es soluble en la fase móvil éste se aplica disuelto en ella. En caso contrario, se disuelve en un disolvente adecuado y se añade la cantidad de sílice necesaria (5 g de sílice por cada gramo de crudo a purificar). Posteriormente, se evapora el disolvente a sequedad y se procede a aplicar la carga sólida obtenida a la columna.

### **B.3.3 Análisis por cromatografía líquida de elevada eficacia (HPLC)**

La cromatografía líquida de elevada eficacia a escala analítica se ha realizado en tres cromatógrafos de las casas comerciales *Shimadzu* y *Waters* compuestos por:

- Shimadzu I: dos bombas LC-6A con un mezclador de alta presión, sistema de control y programación de gradiente SCL-6B, autoinyector SIL-6B, detector de UV-vis de longitud de onda variable SPD-6A y registrador integrador Chromatopac C-R6A.
- Shimadzu II: dos bombas LC-10AS con un mezclador de alta presión, sistema de control y programación de gradiente SCL-6B, autoinyector SIL-9A, detector de UV-vis de longitud de onda variable SPD-10A y registrador integrador Chromatopac C-R5A.
- Waters: cromatógrafo compuesto por una unidad de Separations Module 2695 y un detector PDA 2996.

En todos los casos se ha trabajado con columnas de cromatografía líquida en fase reversa y siempre con el mismo tipo de columna, Kromasil C<sub>18</sub> (Tracer) de 250x4 mm con tamaño de partícula de 10 µm. Los sistemas de elución utilizados (flujo=1 mL/min) se han basado en gradientes lineales de los eluyentes diferentes. Los eluyentes y gradientes utilizados se especifican en cada caso. En todos los casos la detección se ha realizado a  $\lambda=260$  nm. Para evitar obstrucciones en el equipo de HPLC, antes de inyectar las muestras éstas se filtran a través de un filtro de nylon de tamaño de poro de 0,45 µm.

### **B.3.4 Purificación por cromatografía de elevada eficacia a escala semipreparativa**

Se ha llevado a cabo en los mismos cromatógrafos en los que se han realizado los análisis, aunque se ha adaptado para poder llevar a cabo la purificación. En este caso las columnas empleadas son Kromasil C<sub>18</sub> (Tracer) de 250x10 mm y de 10 µm de tamaño de partícula y se ha trabajado con un flujo de 3 mL/min.

## **C. Síntesis de oligonucleótidos en fase sólida**

### **C.1 Cálculo de la funcionalización de una resina**

#### **C.1.1 Fmoc-resinas**

En una jeringa de polipropileno de 2 mL equipada con un disco filtrante de polipropileno se pesa una alícuota de 7-10 mg de resina y se trata con 0,3 mL de una solución de piperidina en DMF al 20% durante 1 minuto (x3). La solución resultante se va recogiendo en un matraz aforado de 10 mL. Una vez acabado el tratamiento para eliminar el grupo protector se enrasa con DCM. A continuación se registra la absorbancia entre 220 y 320 nm. El producto resultante de los tratamientos (*N*-9-fluorenilmetilpiperidina) tiene un

máximo de absorbancia a 300 nm ( $\epsilon=7800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). La disolución de referencia contiene las mismas cantidades de DCM, piperidina y DMF (0,9 mL de la solución de piperidina en DMF al 20% y 9,1 mL de DCM). Mediante la siguiente ecuación se calcula la funcionalización:

$$f(\mu\text{mol/g})=(A_{300} \times V \times 10^6)/(\epsilon_{300} \times l \times m)$$

donde **A** es la absorbancia a 300 nm, **V** es el volumen del matraz aforado (10 mL),  $\epsilon$  es el coeficiente de absor tividad molar a 300 nm ( $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), **l** es el paso de luz a través de la cubeta (1 cm) y **m** es la cantidad de resina depositada (mg).

### **C.1.2 MMT-resinas**

En una jeringa de polipropileno de 2 mL equipada con un disco filtrante de polipropileno se pesa una alícuota de 7-10 mg de resina y se trata con 0,5 mL de una solución de ácido tricloroacético (TCA) al 3% en diclorometano durante 3 minutos (x3). A continuación se lavan las muestras con 1 mL DCM (x3). Los filtrados se recogen en un balón y se elimina el disolvente en el rotavapor. El residuo obtenido se redisuelve en una solución de EtOH/HClO<sub>4</sub> 2:3 y se transfiere a un matraz aforado de 25 mL. Se calcula la funcionalización midiendo la absorbancia a 473 nm, correspondiente al catión 4-monometoxitritilo ( $\epsilon=53000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) según la siguiente ecuación:

$$f(\mu\text{mol/g})=(A_{473} \times V \times 10^6)/(\epsilon_{473} \times l \times m)$$

donde **A** es la absorbancia a 473 nm, **V** es el volumen del matraz aforado (25 mL),  $\epsilon$  es el coeficiente de absor tividad molar a 473 nm ( $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), **l** es el paso de luz a través de la cubeta (1 cm) y **m** es la cantidad de resina depositada (mg).

### **C.1.3 DMT-resinas**

Para determinar la funcionalización se trata la resina resultante con 1 mL de una solución de ácido tricloroacético (TCA) al 3% en diclorometano durante 3 minutos (x3). A continuación se lavan las muestras con 1 mL de DCM (x3). Los filtrados se recogen en un balón y se elimina el disolvente en el rotavapor. El residuo obtenido se redisuelve en una solución de EtOH/HClO<sub>4</sub> 2:3 y se transfiere a un matraz aforado de 50 mL. Se calcula el porcentaje de acoplamiento midiendo la absorbancia a 498 nm, correspondiente al catión 4,4'-dimetoxitritilo ( $\epsilon=71700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) según la siguiente ecuación:

$$f(\mu\text{mol/g})=(A_{498} \times V \times 10^6)/(\epsilon_{498} \times l \times m)$$

donde **A** es la absorbancia a 498 nm, **V** es el volumen del matraz aforado (50 mL),  $\epsilon$  es el coeficiente de absor tividad molar a 498 nm ( $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), **l** es el paso de luz a través de la cubeta (1 cm) y **m** es la cantidad de resina depositada (mg).

## C.2 Instrumentación y reactivos generales

La síntesis de oligonucleótidos se ha realizado en tres sintetizadores diferentes de Applied Biosystems (modelo 308B, PCR-MATE y Expedite™) según el método del fosfito-triéster implementado en cada sintetizador. Los reactores son cartuchos de Applied Biosystems que contienen el soporte sólido (CPG), con el primer nucleósido anclado al soporte por el extremo 3' mediante un enlace succinilo y con una funcionalización aproximada de 40  $\mu\text{mol/g}$  (*Glenn Research* o *Applied Biosystems*). Los reactivos y las soluciones utilizadas en cada tipo de sintetizador se resumen en la **Tabla I**.

**Tabla I Reactivos y soluciones utilizados en síntesis de oligonucleótidos**

	308B/PCR-MATE	Expedite™
<b>fosforamidito</b>	0,1 M en ACN	0,05 M en ACN
<b>1H-tetrazol</b>	0,45 M en ACN	0,45 M en ACN
<b>oxidante</b>	<sup>t</sup> BuOOH 1M en DCM	I <sub>2</sub> 0,05 M en THF/H <sub>2</sub> O/piridina
<b>acetilación</b>	Ac <sub>2</sub> O/lutidina/THF 1:1:8	Ac <sub>2</sub> O/lutidina/THF 1:1:8
	1-metilimidazol 6,5% en THF	1-metilimidazol 6,5% en THF
<b>eliminación DMT</b>	TCA 3% en DCM	TCA 3% en DCM

Los derivados 3'-O-(2-cianoetil)-N,N-diisopropilaminofosforamidito de los 5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)desoxirribonucleósidos (DMT-dA<sup>Bz</sup>, DMT-dG<sup>iBu</sup>, DMT-dT, DMTdC<sup>Bz</sup>) han sido suministrados por *Glenn Research*. La solución de activante (1H-tetrazol sublimado 0,5 M en acetonitrilo) fue proporcionada por *Glenn Research*. Las soluciones de acetilación (Ac<sub>2</sub>O/lutidina/THF 1:1:8 y 1-metilimidazol 6.5 % en THF) y de desprotección (TCA 3% en DCM) se han adquirido de *Applied Biosystems*, *Cruachem* o *Glenn Research*. La solución de agente oxidante (<sup>t</sup>BuOOH 5-6 M en tolueno) fue proporcionado por *Fluka* y la de yodo fue proporcionada por *Glenn Research*.

Todo el material a utilizar se seca a 110°C y al utilizarlo se deja atemperar en un desecador. Los fosforamiditos utilizados se pesan el día anterior, se secan en los respectivos viales en un desecador durante 1 hora y se dejan toda la noche en el desecador. El acetonitrilo anhidro utilizado para disolver los fosforamiditos es de origen comercial adecuado para la síntesis de oligonucleótidos (*J. T. Baker*).

## C.3 Cálculo de la eficiencia de acoplamiento y rendimiento global en la síntesis automática

En los sintetizadores Applied Biosystems 308B y PCR-MATE, los rendimientos individuales de cada acoplamiento se determinan por comparación de las medidas de absorbancia de las disoluciones obtenidas en la etapa de eliminación del grupo protector DMT. Para que la medida de absorbancia sea adecuada se diluyen con una disolución de ácido *p*-toluensulfónico 0,1 M en ACN (19 g de ácido *p*-toluensulfónico monohidrato en 1 L de

ACN). Se adiciona la solución de ácido *p*-toluensulfónico a las disoluciones que provienen del sintetizador hasta llegar a un volumen total aproximado de 25 mL para cada fracción a analizar. La medida de absorbancia se realiza a 498 nm y el rendimiento se calcula mediante la expresión:

$$R(\%) = (A_n/A_{n-1}) \times 100$$

siendo **A<sub>n</sub>** la medida de absorbancia a 498 nm de la disolución de destrilación del nucleósido *n* y **A<sub>n-1</sub>** la de la disolución de destrilación del nucleósido *n-1*.

El rendimiento global se calcula según la siguiente expresión:

$$R(\%)_{\text{global}} = (A_p/A_u) \times 100$$

siendo **A<sub>p</sub>** la medida de absorbancia a 498 nm de la disolución de destrilación del primer nucleósido incorporado y **A<sub>u</sub>** la medida de absorbancia a 498 nm de la disolución de destrilación del último nucleósido incorporado si la síntesis es DMT-OFF y del penúltimo si la síntesis es DMT-ON.

En el sintetizador *Applied Biosystems Expedite*<sup>TM</sup> los rendimientos individuales de cada acoplamiento son determinados por el propio instrumento, ya que lleva incorporado un detector Ultravioleta-Visible que mide automáticamente la absorbancia de las disoluciones resultantes de la eliminación del grupo DMT.

#### **C.4. Cuantificación de oligonucleótidos**

La cuantificación de oligonucleótidos se realiza determinando su absorbancia a  $\lambda=260$  nm y se indica en unidades de absorbancia OD<sub>260</sub>. Cada una de las nucleobases de un oligonucleótido presenta un máximo de absorbancia cercano a  $\lambda=260$  nm. Una OD (densidad óptica) es una unidad de medida normalizada que se define como la cantidad de oligonucleótido que, contenida en 1 mL de disolución y en una cubeta de 1 cm de paso de luz da una absorbancia unidad. De este modo, para cuantificar un oligonucleótido, se liofiliza y se disuelve en una cantidad conocida de agua calidad Milli-Q, (1-2 mL). A continuación se toma una alícuota de esta disolución y se añade un volumen conocido de agua calidad Milli-Q de tal modo que la absorbancia a  $\lambda=260$  nm se encuentre entre 0,2 y 0,8. La cantidad de oligonucleótido se obtiene a partir de la siguiente ecuación:

$$OD_{260} = A \times V \times d$$

siendo **A** la absorbancia, **V** el volumen en que se ha disuelto el oligonucleótidos y **d** la dilución realizada.

La relación entre la unidad OD<sub>260</sub> con la cantidad de oligonucleótido a que corresponde se hace matemáticamente empleando la ley de Beer:

$$A = \epsilon l c$$

donde **A** es la absorbancia, **c** es la concentración, **l** es el camino óptico y  **$\epsilon$**  es el coeficiente de extinción. El coeficiente de extinción tiene en cuenta los efectos de vecindad de las nucleobases así como la absorbancia individual de cada nucleobase, por lo que es único para cada oligonucleótido. Hay diferentes maneras de determinar el coeficiente de extinción de un oligonucleótido. El método de *nearest neighbour* es el que proporciona mayor precisión y el más ampliamente utilizado<sup>1</sup>. En la página web de *TriLink* se puede encontrar un programa (*Oligo calculator*) que permite calcular fácilmente el coeficiente de extinción de oligonucleótidos no modificados (<http://www.trilinkbiotech.com>).

A continuación, se muestra la ecuación que permite calcular el coeficiente de extinción de un oligonucleótido a partir de los valores tabulados de los coeficientes de extinción de mono- y dinucleótidos (**Tabla II**). Por ejemplo, para calcular  $\epsilon_{260}$  de un oligonucleótido de secuencia 5'DpEp...KpL3':

$$\epsilon_{260}(\text{DpEpFpGp} \dots \text{KpL}) = [2(\epsilon_{\text{DpE}} + \epsilon_{\text{EpF}} + \epsilon_{\text{FpG}} + \dots + \epsilon_{\text{KpL}}) - \epsilon_{\text{E}} - \epsilon_{\text{F}} - \epsilon_{\text{G}} - \dots - \epsilon_{\text{K}}]$$

**Tabla II  $\epsilon$  ( $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) de mono- y dinucleótidos de DNA y RNA**

	$\epsilon_{260}$		$\epsilon_{260}$
pdA	15,4	dCpdG	9,0
pdC	7,4	dCpT	7,6
pdG	11,5	dGpdA	12,6
pT	8,7	dGpdC	8,8
dApdA	13,7	dGpdG	10,8
dApdC	10,6	dGpT	10,0
dApdG	12,5	TpdA	11,7
dApT	11,4	TpdC	8,1
dCpdA	10,6	TpdG	9,5
dCpdC	7,3	TpT	8,4

Otra manera de determinar de forma aproximada el coeficiente de extinción de un oligonucleótido consiste en considerar que la absorción global del oligonucleótido es debida al efecto acumulado de la absorción individual de cada una de las diferentes nucleobases que lo componen. En esta aproximación se realiza una corrección en la que se considera el fenómeno de apilamiento que sufren las nucleobases. En este caso el coeficiente de extinción de un oligonucleótido se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\epsilon_{\text{oligo}} = (\sum \epsilon_{\text{base}}) \times f$$

donde  $\epsilon_{\text{base}}$  corresponde a los coeficientes de extinción de cada nucleótido y **f** al factor de corrección (0,9 para oligonucleótidos de cadena única y 0,8 para oligonucleótidos autocomplementarios o de doble cadena)<sup>2</sup>.

Como el valor del coeficiente de extinción de la uridina es conocido ( $10,1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) pero el valor del coeficiente de extinción del dímero  ${}^m\text{UgT}$  no es conocido, se ha aplicado esta última aproximación para el cálculo del coeficiente de extinción de los oligonucleótidos modificados con unidades de morfolinouridina. Para el cálculo del coeficiente de extinción de los oligonucleótidos no modificados se ha aplicado el método más exacto del *nearest neighbour*.

### **C.5 Composición en nucleósidos de un oligonucleótido**

La determinación de la proporción de nucleósidos se realiza por digestión enzimática del oligonucleótido. Los enzimas empleados son:

- Fosfodiesterasa de veneno de serpiente (SVPD), que escinde el oligonucleótido por el extremo 3' libre, generando nucleósidos 5'-fosfato. Se ha empleado la fosfodiesterasa de *Crotalus Atrox* de *Sigma*. Se ha empleado una disolución 1,5 U/500  $\mu\text{L}$ ).
- Fosfatasa alalina (AP), que hidroliza los fragmentos 3'- o 5'-fosfato. Se ha empleado fosfatasa alcalina de *Sigma* (0,23 U/  $\mu\text{L}$ ).

En todos los casos, la digestión se ha realizado sobre una alícuota de producto liofilizado (0,05-0,2  $\text{OD}_{260}$ ). A la muestra así preparada se le añaden 1  $\mu\text{L}$  de SVPD, 5  $\mu\text{L}$  de AP, 50  $\mu\text{L}$  de tampón 0,1 M Tris-HCl (pH=8), 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  0,1 M y 34  $\mu\text{L}$  de agua (volumen total 100  $\mu\text{L}$ ). La muestra se digiere en un eppendorf que se mantiene a  $37^\circ\text{C}$  durante 6 horas.

Las soluciones resultantes se analizan por HPLC en fase reversa (A:  $\text{AcONH}_4$  0,01 M, B:  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$  1:1, 10% de B 5 min., 10-25% de B en 15 min., 25-100% de B en 5 min.). Los diferentes nucleósidos se identifican por comparación con los tiempos de retención de los nucleósidos naturales ( $t_R=3,0$  min. dC, 4,7 min. dG, 6,6 min. dT y 9,4 min. dA). Las correspondientes proporciones se calculan a partir de los coeficientes de extinción molar a 260 nm. En primer lugar se calcula el valor medio de la relación área/coeficiente de extinción molar **X** según la siguiente expresión:

$$X = (\sum(\text{área}_i/\epsilon_i))/N$$

donde el subíndice "i" indica el nucleósido, **área<sub>i</sub>** es al área del cromatograma correspondiente al nucleósido i,  **$\epsilon_i$**  es el coeficiente de extinción molar del correspondiente nucleósido y **N** es el número de nucleósido teóricos. Una vez conocido el valor de X, se calcula la proporción del nucleósido i mediante la siguiente expresión:

$$n_i = (\text{área}_i/\epsilon_i)/N$$

donde **n<sub>i</sub>** es el valor experimental calculado para cada nucleósido.

## **D. Estudios de desnaturalización térmica**

### **D.1 Preparación de las muestras**

Para la preparación de las muestras se añadieron los volúmenes necesarios de las disoluciones de oligonucleótidos de manera que la composición resultante de las muestras de trabajo fue 140 mM de NaCl, 40 mM de tampón ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$  a pH=7, 6,5 o 6,0 según se requiera) y 1 mM de  $\text{MgCl}_2$  en los casos necesarios. Antes de utilizar las soluciones tampón se comprobó el pH y se ajustó al valor deseado cuando fue necesario. En la preparación de las muestras siempre se trabajó con agua calidad Milli-Q. Antes de llevar a cabo la medida se burbujeó la disolución con helio durante 10 minutos para evitar la formación de burbujas durante el experimento. Para la preparación de las muestras de dúplex y triplex se siguieron metodologías diferentes.

La preparación de los dúplex se realizó mezclando las soluciones acuosas de las cadenas oligonucleotídicas en relación molar 1/1 a temperatura ambiente en que la concentración de cada cadena era 1,5  $\mu\text{M}$ . Las muestras se calentaron en un baño de agua a 90°C durante 5 minutos, se dejaron enfriar hasta T ambiente y se guardaron en la nevera durante una noche antes de realizar las medidas.

Para la preparación de los tríplex se empleó una solución concentrada del dúplex diana 23A.23B. Esta solución se preparó mezclando soluciones acuosas de las cadenas oligonucleotídicas en relación molar 1/1 a temperatura ambiente en que la concentración de cada cadena era 1  $\mu\text{M}$ . Una vez preparada se calentó en un baño de agua a 90°C durante 5 minutos. A continuación se dejó enfriar lentamente hasta 4°C. Las soluciones preparadas se guardan en la nevera a esa temperatura. Para la preparación de las muestras se mezclaron las soluciones acuosas de las cadenas oligonucleotídicas (14C, 14E1 o 14E2), con la solución preparada anteriormente del dúplex en una relación molar 1/1 y añadiendo la cantidad necesaria de las soluciones de NaCl, tampón y  $\text{MgCl}_2$  para obtener las soluciones finales con la concentración adecuada. Una vez preparadas las muestras se guardaron en la nevera durante una noche antes de realizar las medidas.

### **D.2 Curvas de fusión**

Los experimentos de desnaturalización y renaturalización se realizaron en un espectrofotómetro Jasco modelo V-550 equipado con un Peltier controlador de temperatura. Se utilizaron cubetas de cuarzo de 1 cm de paso de luz provistas de tapón. Para evitar la evaporación durante el experimento se acabaron de ajustar los tapones con tiras de teflón. Antes de empezar a registrar la curva de fusión se mantuvieron las muestras a la temperatura inicial del experimento durante 15 minutos. Las curvas de fusión se registraron monitorizando la absorbancia a 260 nm aplicando un gradiente de 0,5°C/minuto tanto en los experimento de desnaturalización como en los de renaturalización. Cuando se registraron

valores de absorbancia por debajo de 15°C se hizo pasar una corriente suave de N<sub>2</sub> a través del compartimento que contenía la cubeta para prevenir la condensación del vapor de agua.

### **D.3 Análisis de los datos**

Los datos obtenidos del espectrofotómetro se exportaron en formato ASCII y fueron sometidos a un proceso de "smoothing" con el programa Origin 7.0 para obtener la representación correspondiente de absorbancia frente a temperatura. Se ha asignado como T<sub>m</sub> el máximo de la derivada de la curva de absorbancia frente a temperatura. En ambos casos los valores obtenidos para un mismo complejo se promediaron para obtener asignar un valor de variación de absorbancia y de T<sub>m</sub>.

### **Bibliografía**

- (1) Cantor, C.R.; Warshaw, C. R.; Shapiro, M. M.; *Biopolymers*, 9, 1059-1077, (1970)
- (2) Brown, T.; Brown, D.J.; *Modern machine-aided methods of oligodeoxyribonucleotide synthesis. Oligonucleotides and analogues. A practical approach.*, IRL Press, Oxford Univ. Press, pág. 1-24, (1991)





## **1. Síntesis de los isotiocianatos 1a, 1c, 1d, 1e y 1g**

### **1.1 Método 1 (isotiocianatos 1a, 1c, 1e y 1g)**

Los isotiocianatos se obtienen a partir de tiocianato de potasio y los correspondientes cloruros de ácido o anhídridos. En los casos en que estos reactivos sean sólidos se secan antes de utilizarlos en un desecador al vacío durante 1 hora. Por otra parte, el tiocianato de potasio se coevapora con ACN (X2) y también se seca en un desecador durante 1 hora.

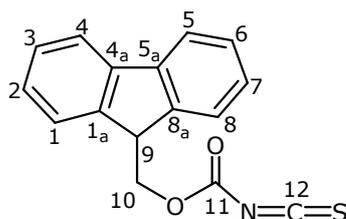
Se suspenden 12,4 mmol (1,2 equivalentes respecto al agente acilante) de tiocianato de potasio seco en 20 mL de acetato de etilo anhidro. Una vez preparada la suspensión ésta se purga con N<sub>2</sub> y se enfría con un baño de hielo. A continuación se prepara una solución con 10 mmol de agente acilante en 20 mL de acetato de etilo anhidro y se añade gota a gota sobre la suspensión preparada anteriormente. La reacción se deja evolucionar bajo atmósfera de argón y a T ambiente durante 3 horas. Se observa que a medida que transcurre el tiempo se va formando un sólido muy fino de color amarillo. Pasado este tiempo el sólido formado se elimina por filtración con placa filtrante y Celite. El filtrado se transfiere a un embudo de decantación y se lava la fase orgánica con 40 mL de una solución saturada de NaCl. Se seca la fase orgánica con MgSO<sub>4</sub> anhidro y se elimina el disolvente en el rotavapor. Según sea el derivado se obtiene un sólido o un aceite viscoso.

### **1.2 Método 2 (isotiocianato 1d)**

Se disuelven 10,0 mmol de agente acilante y 0,4 mmol de bromuro de tetrabutilamonio en 5 ml de tolueno. Se disuelven 26 mmol de tiocianato de potasio en agua y se añaden gota a gota sobre la solución preparada anteriormente. La reacción se deja evolucionar con agitación durante 3 horas a T ambiente. Pasado este tiempo se añaden 30 mL de acetato de etilo y 15 mL de agua y se transfiere el contenido del matraz a un embudo de decantación. Se decanta la fase acuosa y se limpia la fase orgánica con 15 mL de agua y 15 mL de una solución saturada de NaCl. La fase orgánica resultante se seca con MgSO<sub>4</sub> anhidro y se elimina el disolvente en el rotavapor. Como los isotiocianatos son inestables y se hidrolizan con facilidad, éstos se guardan en frío y bajo atmósfera inerte.

#### **Caracterización:**

##### **(1a) 9-fluorenilmetiloxycarbonilisotiocianato:**



Rdto.: 80%

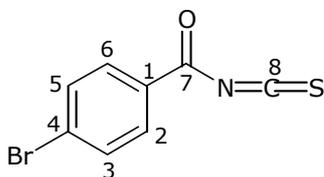
<sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz): δ (ppm) J(Hz) 7,78 (2H, d, J=7,8, H<sub>4</sub> y H<sub>5</sub>), 7,59 (2H, d, J=7,2, H<sub>1</sub> y H<sub>8</sub>), 7,43-7,33 (4H, m, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>6</sub> y H<sub>7</sub>), 4,46 (1H, d, J=7,0, H<sub>9</sub>), 4,27 (2H, t, J=7,0, H<sub>10</sub>)

<sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 50MHz): δ(ppm) 150,41 (C<sub>1a</sub>, C<sub>8a</sub>), 140,83 (C<sub>4a</sub>, C<sub>5a</sub>), 127,62 (C<sub>3</sub> y C<sub>6</sub>), 127,11 (C<sub>2</sub> y C<sub>7</sub>), 125,14 (C<sub>1</sub> y C<sub>8</sub>), 120,12 (C<sub>4</sub> y C<sub>5</sub>), 65,50 (C<sub>10</sub>), (46,74 (C<sub>9</sub>))

IR (Film) ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2050-1950 (-N=C=S) st.

Rf.(DCM/hexano 1:1): 0,51 (DCM/MeOH 10:0,5): 0,9

**(1c) p-bromobenzoilisotiocianato:**



Rdto.: 93%

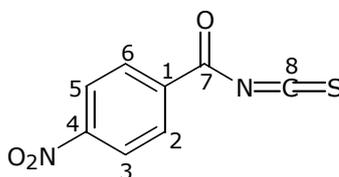
$^1\text{H}$  RMN (DMSO- $d_6$ , 200 MHz):  $\delta$ (ppm) 8,05-7,62 (4H, m, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>5</sub> y H<sub>6</sub>)

$^{13}\text{C}$  RMN (DMSO- $d_6$ , 50MHz):  $\delta$  (ppm) 167,44 (C<sub>7</sub>), 133,41 (C<sub>1</sub>), 131,94 y 131,26 (C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>5</sub> y C<sub>6</sub>), 127,05 (C<sub>4</sub>)

IR (KBr) ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2050-1950 (-N=C=S) st.

Rf.(DCM/MeOH 10:0,2): 0,8

**(1d) p-nitrobenzoilisotiocianato**



Rdto.: 93%

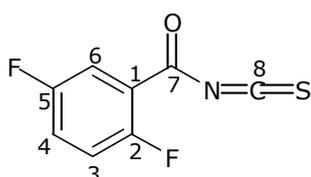
$^1\text{H}$  RMN (DMSO- $d_6$ , 200 MHz):  $\delta$ (ppm) 8,51-8,31 (4H, m, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>5</sub> y H<sub>6</sub>)

$^{13}\text{C}$  RMN (DMSO- $d_6$ , 50MHz):  $\delta$ (ppm) 169,99 (C<sub>7</sub>), 148,92,92 (C<sub>4</sub>), 145,83 (C<sub>8</sub>), 137,75 (C<sub>1</sub>), 128,56 (C<sub>2</sub> y C<sub>6</sub>), 122,36 (C<sub>3</sub> y C<sub>5</sub>)

IR (KBr) ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2050-1950 (-N=C=S) st, 1520 y 1350 (NO<sub>2</sub>) st.

Rf.(DCM/MeOH 10:0,2): 0,7

**(1e) 2,5-difluorobenzoilisotiocianato**



Rdto.: 88%

$^1\text{H}$  RMN (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz):  $\delta$ (ppm) 7,68-7,58 (1H, m, H<sub>6</sub>), 7,36-7,10 (2H, m, H<sub>3</sub> y H<sub>4</sub>)

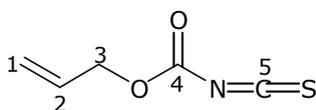
$^{13}\text{C}$  RMN (CDCl<sub>3</sub>, 50MHz):  $\delta$ (ppm) J(Hz) 158,41 (dd, J=241,4; 1,8, C<sub>5</sub>), 157,94 (dd, J=238,5; 2,2, C<sub>2</sub>), 157,08 (d, J=2,1, C<sub>7</sub>), 148,33 (s, C<sub>8</sub>), 123,33 (dd, J=24,1; 9,1, C<sub>4</sub>), 120,82 (dd, J=13,2; 7,1, C<sub>1</sub>), 118,51 (dd, J=20,4; J=1,7, C<sub>3</sub> o C<sub>6</sub>), 118,12, (dd, J=25,3; 7,8, C<sub>3</sub> o C<sub>6</sub>)

IR (KBr) ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2000-1950 (-N=C=S) st.

Rf.(DCM/MeOH 10:0,5): 0,8

**(1g) aliloxycarbonilisotiocianato**

Rdto.: 76%



$^1\text{H}$  RMN (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz):  $\delta$ (ppm) 6,02-5,82 (1H, m, H<sub>2</sub>), 5,40 (1H, dd, J=16,3; 1,2, H<sub>1TRANS</sub>), 5,33 (1H, dd, J=8,1; 1,2, H<sub>1CIS</sub>), 4,69 (2H, d, J=5,8, H<sub>3</sub>)

$^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 50MHz)  $\delta$ : 130,38 ( $\text{C}_2$ ), 120,13 ( $\text{C}_1$ ), 69,34 ( $\text{C}_3$ ).

IR (KBr): 2050-1950  $\text{cm}^{-1}$  (-N=C=S) st.

Rf (DCM/MeOH 10:0,2): 0,8

## **2. Síntesis de las tioureas 2a-2g**

### **2.1 Método 1 (tioureas 2a-2e y 2g)**

Se disuelven 5 mmol de isotiocianato en 10 ml de diclorometano destilado y anhidro. A continuación se diluyen 4 mmol de morfolina en 10 mL del mismo disolvente y se añaden gota a gota sobre la solución preparada anteriormente. La reacción se deja evolucionar durante 2 horas a T ambiente. Pasado este tiempo se añaden 60 mL de diclorometano y se transfiere la mezcla de reacción a un embudo de decantación. Para eliminar la morfolina que pueda quedar, se lava la fase orgánica con 40 mL de una solución acuosa de ácido cítrico al 10% (X2). La fase orgánica resultante se limpia con 40 mL de una solución saturada de NaCl, se seca con  $\text{MgSO}_4$  y se elimina el disolvente en el rotavapor. Los productos así obtenidos se emplean directamente en la siguiente etapa sin necesidad de mayor purificación.

### **2.1 Método 2 (tiourea 2f)**

Se pesan 13,2 mmol de ácido fenoxiacético y se añaden 10 mL de  $\text{SOCl}_2$  y se deja reaccionar durante 30 minutos a 75°C. Pasado este tiempo se deja a T ambiente y se elimina el exceso de  $\text{SOCl}_2$  mediante la succión por trompa de agua. El sólido resultante se lava con hexano y se elimina con una trompa de agua. Se repite esta operación hasta eliminar por completo el  $\text{SOCl}_2$ . El sólido resultante se disuelve en 10 mL de acetato de etilo anhidro. A continuación se añaden 15,8 mmol de KSCN previamente secado. La reacción se deja evolucionar bajo atmósfera de argón y a T ambiente durante 3 horas. Pasado este tiempo el sólido formado se elimina por filtración con placa filtrante y Celite. El filtrado se transfiere a un embudo de decantación y se lava la fase orgánica con 40 mL de una solución saturada de NaCl. Se seca la fase orgánica con  $\text{MgSO}_4$  anhidro y se elimina el disolvente en el rotavapor. Para sintetizar la tiourea utilizando este crudo se sigue el procedimiento descrito en el método 1.

Se obtienen 2 productos que se separan por cromatografía en columna ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). Un producto resultó ser la tiourea y el otro la amida resultante de reaccionar el cloruro de ácido y morfolina (tiourea/amida 73:27).

#### **Caracterización:**

#### **(2a) N-(9-fluorenilmetiloxicarbonil)morfolinocarbottioamida**

Rdto.: 81%.

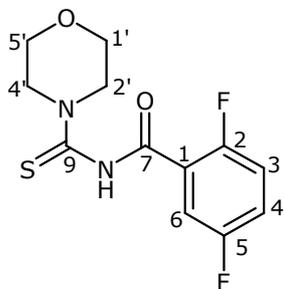


65, 13 (C<sub>1'</sub> y C<sub>5'</sub>), 50,42 (C<sub>2'</sub> o C<sub>4'</sub>), 49,85 (C<sub>2'</sub> o C<sub>4'</sub>)

EM (ES, modo positivo) m/z: [M+H]<sup>+</sup>=296,6 (PM=295,32 uma)

R<sub>f</sub>(DCM/MeOH 10:0,5): 0,7

**(2e) N-(2,5-difluorobenzoi)morfolinocarbotioamida**



Rdto.: 75%

<sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz): δ(ppm) 8,83 (1H, s, NH), 7,83-7,67 (1H, m, H<sub>6</sub>), 7,33-7,10 (2H, m, H<sub>3</sub> y H<sub>4</sub>), 4,23-3,69 (8H, m, H<sub>1'</sub>, H<sub>2'</sub>, H<sub>4'</sub> y H<sub>5'</sub>)

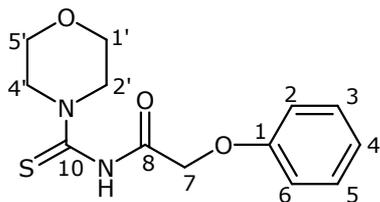
<sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 50MHz): δ(ppm) J(Hz) 177,97 (1C, s, C<sub>9</sub>), 158,69 (dd, J=243,9; 1,6, C<sub>5</sub>), 157,98 (d, J=2,3, C<sub>7</sub>), 156,41 (dd, J=244,5; 2,3, C<sub>2</sub>), 121,61 (dd, J=24,3; 9,8, C<sub>4</sub>), 120,93 (dd,

J=13,6; 7,3, C<sub>1</sub>), 118,60 (dd, J=25,9; 1,4, C<sub>3</sub> o C<sub>6</sub>), 118,01 (dd, J=27,5; 7,9, C<sub>3</sub> o C<sub>6</sub>), 66,31 (C<sub>1'</sub> y C<sub>5'</sub>), 53,03 (C<sub>2'</sub> o C<sub>4'</sub>), 52,24 (C<sub>2'</sub> o C<sub>4'</sub>)

EM (ES, modo positivo) m/z: [M+H]<sup>+</sup>=287,5 (PM=286,30 uma)

R<sub>f</sub>(DCM/MeOH 10:0,5): 0,7

**(2f) N-fenoxiacetilmorfolinocarbotioamida**



Rdto.: 26% (rendimiento de dos etapas)

<sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>, 200 MHz): δ(ppm) 10,68 (1H, s, NH), 7,32-7,24 (2H, m, H<sub>3</sub> y H<sub>5</sub>), 6,98-6,86 (3H, m, H<sub>2</sub>, H<sub>6</sub> y H<sub>4</sub>), 4,71 (1H, s, H<sub>7</sub>), 4,13-3,54 (8H, m, H<sub>1'</sub>, H<sub>2'</sub>, H<sub>4'</sub> y H<sub>5'</sub>)

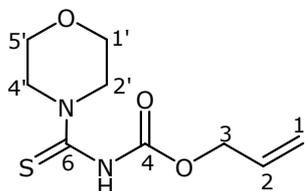
<sup>13</sup>C RMN (DMSO-d<sub>6</sub>, 50MHz): δ(ppm) 179,23 (C<sub>10</sub>), 172,72

(C<sub>8</sub>), 157,38 (C<sub>1</sub>), 128,78 (C<sub>3</sub> y C<sub>5</sub>), 120,28 (C<sub>4</sub>), 114,01 (C<sub>2</sub> y C<sub>6</sub>), 60,98 (C<sub>7</sub>), 65,53 (C<sub>1'</sub> y C<sub>4'</sub>), 44,27 (C<sub>2'</sub> o C<sub>4'</sub>), 41,10 (C<sub>2'</sub> o C<sub>4'</sub>)

EM (ES, modo positivo) m/z: [M+H]<sup>+</sup>=281,6 (PM=280,34 uma)

R<sub>f</sub>(DCM/MeOH 10:0,2): 0,7

**(2g) N-aliloxycarbonilmorfolinocarbotioamida**



Rdto.: 89%

<sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz): δ(ppm) J(Hz) 7,48 (1H, s, NH), 6,02-5,83 (1H, m, H<sub>2</sub>), 5,37 (1H, dd, J=16,0; 1,3, H<sub>1TRANS</sub>), 5,29 (1H, dd, J=7,2; 1,3, H<sub>1CIS</sub>), 4,61 (2H, d, J=4,7, H<sub>3</sub>), 4,08-3,60 (8H,

m, H<sub>1'</sub>, H<sub>3'</sub>, H<sub>4'</sub> y H<sub>5'</sub>)

<sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 50MHz): δ(ppm) 179,42 (C<sub>6</sub>), 150,08 (C<sub>4</sub>), 131,25 (C<sub>2</sub>), 119,12 (C<sub>1</sub>), 66,99 (C<sub>1'</sub> y C<sub>5'</sub>), 66,16 (C<sub>3</sub>), 52,05 (C<sub>2'</sub> y C<sub>4'</sub>)

EM (ES, modo positivo) m/z: [M+H]<sup>+</sup>=230,8 (PM=230,29 uma)

R<sub>f</sub>(DCM/MeOH 10:0,2): 0,5

### **3 Síntesis de 5'-amino-2',5'-didesoxitimidina**

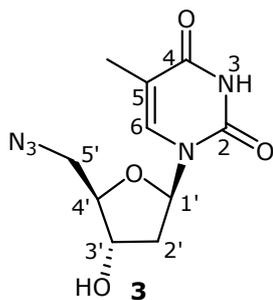
#### **3.1 Azida de litio**

En 130 mL de agua se disuelven 20g (308 mmol) de  $\text{NaN}_3$  y 40 g (313 mmol) de  $\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ . Pasados 20 minutos se van añadiendo poco a poco 400 mL de etanol, de manera que la precipitación se produzca de manera gradual. El sólido se separa por filtración con una placa filtrante y se lava con 100 mL de etanol para separar las sales insolubles. El filtrado obtenido se concentra en el rotavapor a sequedad quedando un sólido de color blanco. Éste se vuelve a disolver en 50 mL de etanol para poder eliminar por filtración los restos de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y el filtrado resultante se vuelve a concentrar en el rotavapor a sequedad. El sólido obtenido se seca en un desecador. Se aíslan 14,8 g de  $\text{LiN}_3$  (303 mmol, Rdto.: 98%).

#### **3.2 Síntesis de 5'-azido-2',5'-didesoxitimidina**

Se pesan 2,0 g (8,2 mmol) de timidina, 3,2 g (12,3 mmol) de trifenilfosfina y 1,2 g (24,6 mmol) de azida de litio. Los sólidos se juntan en un matraz y se secan por coevaporación con ACN anhidro (X2). A continuación se dejan en un desecador durante 1 hora aproximadamente a vacío de bomba. Pasado este tiempo los reactivos se disuelven en 20 mL de DMF anhidra. Una vez disueltos se añade a la mezcla de reacción 4,0 g (12,3 mmol) de tetrabromuro de carbono. Se deja evolucionar la reacción durante 1 hora bajo atmósfera de argón. Pasado este tiempo se elimina el disolvente en el rotavapor y se purifica el crudo resultante por cromatografía en columna ( $\text{CHCl}_3/\text{metanol}$  5-10%). Se obtienen 2,1 g de producto (7,8 mmol, Rdto.: 94%).

#### **Caracterización:**



$^1\text{H}$  RMN ( $\text{DMSO-d}_6$ , 200 MHz):  $\delta$ (ppm) 11,38 (1H, s, H<sub>3</sub>), 7,47 (1H, s, H<sub>6</sub>), 6,18 (1H, t, J=6,8, H<sub>1'</sub>), 5,39 (1H, d, J=4,0, HO-C<sub>3'</sub>), 4,18 (1H, m, H<sub>3'</sub>), 3,81 (1H, m, H<sub>4'</sub>), 3,53 (2H, d, J=5,2, H<sub>5'</sub>), 2,33-1,99 (2H, m, H<sub>2A'</sub> y H<sub>2B'</sub>), 1,76 (3H, s, CH<sub>3</sub>-C<sub>5</sub>)

$^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{DMSO-d}_6$ , 50MHz):  $\delta$ (ppm) 164,26 (C<sub>4</sub>), 151,03 (C<sub>2</sub>), 136,74 (C<sub>6</sub>), 110,19 (C<sub>5</sub>), 84,71 (C<sub>4'</sub>), 83,82 (C<sub>1'</sub>), 70,92 (C<sub>3'</sub>), 51,68 (C<sub>5'</sub>), 38,74 (C<sub>2'</sub>), 12,80 (CH<sub>3</sub>-C<sub>5</sub>)

EM (ES, modo negativo) m/z:  $[\text{M}-\text{H}]^- = 266,6$  (PM=267,4 uma)

Rf ( $\text{Cl}_3\text{CH}/\text{MeOH}$  10:0,8): 0,18

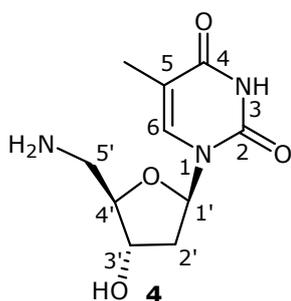
Pf: 164-167°C

#### **3.2. Síntesis de 5'-amino-2',5'-didesoxitimidina**

Se disuelven 1,8 g (6,9 mmol) de 5'-azido-2',5'-dideoximetiluridina en 35 mL de piridina anhidra previamente purgada con  $\text{N}_2$ . A continuación se añaden 2,2 g (8,4 mmol) de trifenilfosfina, se purga con  $\text{N}_2$  y se deja reaccionar durante 1 hora a T ambiente. Pasado este

tiempo se añaden con un embudo de adición y gota a gota 47 mL de una solución acuosa de amoníaco al 32%. A medida que se va añadiendo esta solución va apareciendo un precipitado blanco. Se mantiene la reacción con agitación durante 2 horas más. Pasado este tiempo se elimina el disolvente en el rotavapor. Para acabar de eliminar la piridina se coevapora con ACN (X2). Una vez no queda piridina se añaden 200 mL de agua para poder eliminar por filtración la trifenilfosfina restante y los óxidos de trifenilfosfina. La solución resultante se lava con 60 mL de CHCl<sub>3</sub> (X3) para acabar de eliminar los restos de trifenilfosfina que puedan quedar y se concentra a sequedad. Se obtienen 1,6 g de producto (6,7 mmol, Rdto.: 97%). Este producto es un sólido blanco-amarillento que da positivo en el test de ninhidrina tras ser analizado por CCF. Para evitar que el producto se estropee se ha de guardar en congelador.

### Caracterización:



<sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>, 200 MHz): δ(ppm) J(Hz) 7,62 (1H, s, H<sub>6</sub>), 6,11 (1H, t, J=6,8, H<sub>1'</sub>), 5,73 (s, OH-C<sub>3'</sub>), 4,18 (1H, m, H<sub>3'</sub>), 3,62 (1H, m, H<sub>4'</sub>), 2,71 (2H, d, J=5,2, H<sub>5'</sub>), 2,21-1,98 (2H, m, H<sub>2A'</sub> y H<sub>2B'</sub>), 1,76 (s, CH<sub>3</sub>-C<sub>5</sub>)

<sup>13</sup>C RMN (DMSO-d<sub>6</sub>, 50MHz): δ(ppm) 164, 29 (C<sub>4</sub>), 151,03 (C<sub>2</sub>), 136,78 (C<sub>6</sub>), 110,15 (C<sub>5</sub>), 88,28 (C<sub>4'</sub>), 84,00 (C<sub>1'</sub>), 71,35 (C<sub>3'</sub>), 44,22 (C<sub>5'</sub>), 39,69 (C<sub>2'</sub>), 12,81 (CH<sub>3</sub>-C<sub>5</sub>)

EM (ES, modo positivo) m/z: 242,6 [M+H]<sup>+</sup> (PM=241,24 uma)

HPLC: (A: H<sub>2</sub>O/0,045 %TFA, B: ACN/H<sub>2</sub>O 1:1/0,036 %TFA, 0 a 50% en 20min.), t<sub>R</sub>=8,3min.

Pf: 177-181°C

## **4. Ensayos de obtención de 5'-(N-morfolinocarbonimidoyl)amino-2',5'-dideoxitimidas**

### **4.1 Método A (activación in situ)**

#### **4.1.1 Empleando yoduro de 2-cloro-1-metilpiridinio (tioureas 2a y 2b)**

Se disuelven 0,5 mmol de **4**, 0,4 mmol de tiourea (**2a** o **2b**) y 0,88 mmol de TEA en 5 mL de DMF anhidra, (secada con CaH<sub>2</sub>). Antes de usar la DMF se burbujea durante 20 minutos con N<sub>2</sub>. A continuación se disuelven 0,5 mmol de yoduro de 2-cloro-1-metilpiridinio (reactivo de Mukaiyama) en 5 mL de DMF anhidra y se añaden sobre la solución preparada. La reacción se deja evolucionar bajo atmósfera de Ar a T ambiente. El proceso se sigue por CCF. Pasadas 24 h de reacción, se observa que la tiourea **2a** se consume en parte y se va formando un nuevo producto, mientras que en el ensayo realizado con la tiourea **2b** no se observa ningún cambio. Se añaden 0,4 mmol más del reactivo de Mukaiyama y se eleva la T a 70°C. Se deja evolucionar el proceso durante 1 día. Pasado este tiempo, en ambos casos se forma una mezcla de productos. El disolvente se elimina en el rotavapor, y el crudo obtenido se disuelve en 50 mL de CHCl<sub>3</sub> y se transfiere a un embudo de decantación. La fase orgánica

resultante se lava con 25 mL de H<sub>2</sub>O (x2) y con 25 mL de una solución saturada de NaCl. A continuación se seca con MgSO<sub>4</sub> y se elimina el disolvente en el rotavapor. Se realiza purificación por cromatografía en columna de los crudos obtenidos, (DCM/MeOH 2-20%). El análisis por RMN <sup>1</sup>H de las fracciones aisladas del ensayo 1.1 revela que, el producto que se iba generando cuando la reacción transcurría a T ambiente corresponde a la pérdida del grupo protector. En ninguno de los dos ensayos se identifica el producto esperado en las diferentes fracciones obtenidas.

#### **4.1.2 Empleando EDCI (tioureas 2a y 2b)**

Se disuelven 0,6 mmol de **4**, 0,4 mmol de tiourea (**2a** o **2b**) y 0,4 mmol de trietilamina en 5 mL de DMF anhidra, (secada con CaH<sub>2</sub>). Antes de usar la DMF se burbujea durante 20 minutos con N<sub>2</sub>. A continuación, bajo atmósfera de Ar, se añaden 0,8 mmol de EDCI disueltos en 5 mL de DMF anhidra y se deja evolucionar a T ambiente durante 1 día. Pasado este tiempo, el análisis por CCF del ensayo realizado con la tiourea **2a** muestra un perfil similar al ensayo realizado con el reactivo de Mukaiyama, por tanto, se concluye que estas condiciones se está dando la pérdida del grupo protector y no se sigue con este ensayo. Por otra parte, no se observa ningún avance en el ensayo realizado con la tiourea **2b**. Se añaden 0,4 mmol de EDCI y se eleva la T a 70°C. Se deja evolucionar el proceso durante 1 día más. Pasado este tiempo, el análisis por CCF indica que se ha formado una mezcla de productos. El disolvente se elimina en el rotavapor, y el crudo obtenido se disuelve en 50 mL de CHCl<sub>3</sub> y se transfiere a un embudo de decantación. La fase orgánica resultante se lava con 25 mL de H<sub>2</sub>O (x2) y con 25 mL de una solución saturada de NaCl. A continuación se seca con MgSO<sub>4</sub> y se elimina el disolvente en el rotavapor. Se realiza purificación por cromatografía en columna del crudo obtenido, (DCM/MeOH 2-20%). El análisis por RMN <sup>1</sup>H de las fracciones aisladas indica que ninguna corresponde al producto esperado.

#### **4.1.3 Empleando HgCl<sub>2</sub> (tiourea 2a)**

Se disuelven 0,4 mmol de **4** y 0,4 mmol de tiourea **2a** en 5 mL de DMF anhidra, (secada con CaH<sub>2</sub>). Antes de usar la DMF se burbujea durante 20 minutos con N<sub>2</sub>. A continuación, se añaden 0,5 mmol de HgCl<sub>2</sub> suspendidos en 5 mL de DMF anhidra y 1,0 mmol de *N,N*-diisopropiletilamina anhidra (DIEA) a la solución preparada anteriormente. La reacción se deja evolucionar durante 1 día a T ambiente y bajo atmósfera de Ar. El proceso se va siguiendo por CCF. Pasado este tiempo tiene lugar una eliminación parcial, ya que el perfil es similar al observado en los ensayos realizados con el reactivo de Mukaiyama y con EDCI.

#### **4.1.4 Empleando Bi(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O (tiourea 2b)**

Se disuelven 0,4 mmol de **4** y 0,4 mmol de tiourea **2b** en 5 mL de DMF. A continuación se añaden 1,6 mmol de trietilamina y se enfría con un baño de hielo. Se suspenden 0,4 mmol de Bi(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O en 5 mL de DMF y se añaden a la solución preparada

anteriormente. La reacción se deja evolucionar durante 1 día a T ambiente. Durante este tiempo se sigue la reacción por CCF, observando que los reactivos de partida no se consumen. Pasado este tiempo se eleva la T a 70°C. A los pocos minutos de haber elevado la T se observa el oscurecimiento paulatino de la suspensión. La reacción se deja evolucionar durante 1 día más. El análisis por CCF revela que se ha formado una mezcla de productos. El disolvente se elimina en el rotavapor, y el crudo obtenido se disuelve en 50 mL de CHCl<sub>3</sub> y se transfiere a un embudo de decantación. La fase orgánica resultante se lava con 25 mL de H<sub>2</sub>O (x2) y con 25 mL de una solución saturada de NaCl. A continuación se seca con MgSO<sub>4</sub> y se elimina el disolvente en el rotavapor. Se realiza purificación por cromatografía en columna del crudo obtenido, (DCM/MeOH 2-20%). El análisis por RMN <sup>1</sup>H de las fracciones aisladas indica que ninguna corresponde al producto esperado.

## **4.2 Método B**

### **4.2.1 Ensayo de obtención del ácido N-benzoilmorfolinocarbonimidóilsulfónico**

En un matraz se disuelven 0,5 mmol de tiourea **2b** en 50 mL de H<sub>2</sub>O/Metanol 1:1. A continuación se añaden 0,2 mmol de NaCl y 0,09 mmol de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O y se enfría la mezcla de reacción con un baño de hielo. Una vez frío, se diluyen 1,8 mmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (solución al 35%) en 10 mL de H<sub>2</sub>O y se va añadiendo gota a gota sobre la mezcla preparada anteriormente. Durante este proceso se ha de procurar que la T no supere los 5°C. A continuación, se retira el baño de hielo y se deja reaccionar a T ambiente durante 3 horas. Pasado este tiempo se observa que la tiourea de partida se ha consumido y se ha formado mayoritariamente un producto. Se elimina el disolvente en el rotavapor y se disuelve el residuo en 80 mL de cloroformo. La fase orgánica se lava con 40 mL de H<sub>2</sub>O (X2). Finalmente se acaba de lavar con 100 mL de una solución saturada de NaCl y se seca con MgSO<sub>4</sub> anhidro. El producto obtenido se analiza por RMN <sup>1</sup>H, pero no corresponde al producto esperado, ya que tan sólo aparecen señales en la zona aromática.

### **4.2.2 Ensayos de obtención de S-2,4-dinitrofenilmorfolinoisocarbotoamidas (ensayos realizados sobre las tioureas 2a-2f)**

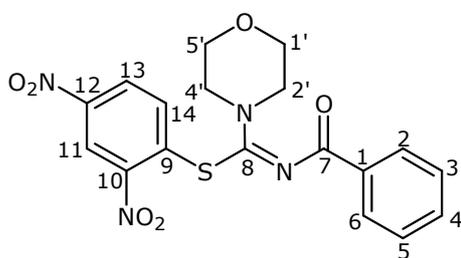
Se disuelven 0,4 mmol de tiourea en 30 mL de ACN anhidro y 0,3 mmol de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. A continuación se añaden 0,3 mmol de 2,4-dinitrofluorobenceno, (reactivo de Sanger) y se deja evolucionar a T ambiente. Se sigue la reacción por CCF. Pasadas 3 h de reacción el disolvente se elimina en el rotavapor, obteniéndose un aceite muy viscoso de color naranja. El crudo obtenido se disuelve en 50 mL de acetato de etilo y se transfiere a un embudo de decantación. La fase orgánica se limpia con 25 mL de H<sub>2</sub>O (x2), y con 25 mL de una solución saturada de NaCl. Finalmente, la fase orgánica resultante se seca con MgSO<sub>4</sub> y se elimina el disolvente en el rotavapor. Se obtiene un aceite muy denso de color naranja ligeramente impurificado con tiourea de partida. El intento de purificación por cromatografía en columna (DCM/MeOH 0-20%). de la isotiourea **2b''** da como resultado la descomposición del producto,

por tanto, se decide no realizar purificación en columna, ya que el producto es inestable y las impurezas no interfieren en el siguiente paso sintético.

Mediante este procedimiento no se consigue obtener la isotiourea **2a''** después de 24 horas de reacción a T ambiente. Si se calienta durante 1 hora a T=55°C, el reactivo de Sanger tampoco se consume y se observa la formación de subproductos debidos a la pérdida del grupo protector de la tiourea. En el ensayo realizado con la tiourea **2f** se consume completamente el reactivo de Sanger después de 12 h de reacción a T ambiente. En las mismas condiciones, la tiourea **2g** no reacciona después de 3 h de reacción a T ambiente y 1 h a T=55°C, pero se observa la desaparición completa del reactivo de Sanger al añadir 1 eq de DBU y después de 15 minutos de reacción a T ambiente.

### Caracterización:

#### (2b'') *N*-benzoil-*S*-2,4-dinitrofenilmorfolinoisocarbotioamida



Rdto.: 92%.

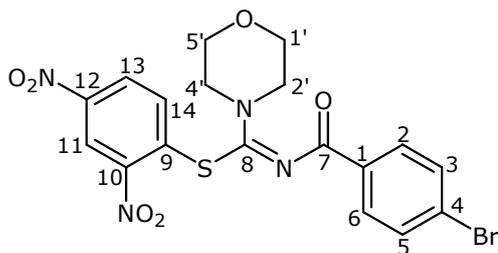
$^1\text{H RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz):  $\delta$ (ppm) J(Hz) 8,76 (1H, d, J=2,9, H<sub>11</sub>), 8,14 (1H, dd, J=8,9; 2,9, H<sub>13</sub>), 7,78 (2H, dd, J=8,4; 1,4, H<sub>2</sub> y H<sub>6</sub>), 7,58-7,26 (4H, m, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub> y H<sub>14</sub>), 3,96-3,76 (8H, m, H<sub>1'</sub>, H<sub>2'</sub>, H<sub>4'</sub> y H<sub>5'</sub>)

$^{13}\text{C RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 50MHz):  $\delta$ (ppm) 174,36 (C<sub>7</sub>),

155,72 (C<sub>10</sub>), 146,28 (C<sub>12</sub>), 137,07 (C<sub>1</sub>), 134,85 (C<sub>14</sub>), 134,45 (C<sub>9</sub>), 132,57 (C<sub>4</sub>), 128,99 (C<sub>3</sub> y C<sub>5</sub>), 127,95 (C<sub>2</sub> y C<sub>6</sub>), 126,73 (C<sub>13</sub>), 120,84 (C<sub>11</sub>), 66,41 (C<sub>1'</sub> y C<sub>5'</sub>), 48,26 (C<sub>2'</sub> y C<sub>4'</sub>)

Rf (DCM/MeOH 10:0,2): 0,3

#### (2c'') *N*-(*p*-bromobenzoyl)-*S*-2,4-dinitrofenilmorfolinoisocarbotioamida



Rdto.: 90%.

$^1\text{H RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz):  $\delta$ (ppm) J(Hz) 8,75 (1H, d, J=2,8, H<sub>11</sub>), 8,15 (1H, dd, J=8,9; 2,8, H<sub>13</sub>), 7,76-7,44 (5H, m, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>, y H<sub>14</sub>), 3,91-3,73 (8H, m, H<sub>1'</sub>, H<sub>2'</sub>, H<sub>4'</sub> y H<sub>5'</sub>)

$^{13}\text{C RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 50MHz):  $\delta$ (ppm) 134,44 (C<sub>14</sub>),

131,26 (C<sub>3</sub> y C<sub>5</sub>), 130,57 (C<sub>2</sub> y C<sub>6</sub>), 126,78 (C<sub>13</sub>), 120,93 (C<sub>11</sub>), 66,37 (C<sub>1'</sub> y C<sub>5'</sub>), 48,75 (C<sub>2'</sub> y C<sub>4'</sub>)

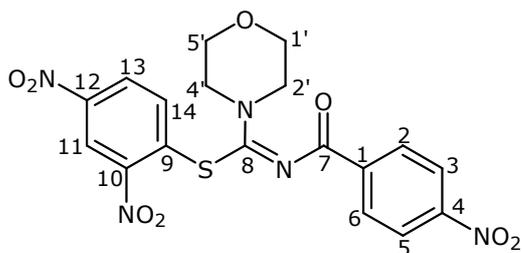
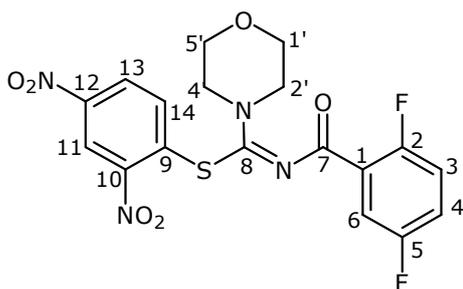
Rf (DCM/MeOH 10:0,2): 0,3

#### (2d'') *N*-(*p*-nitrobenzoyl)-*S*-2,4-dinitrofenilmorfolinoisocarbotioamida

Rdto.: 90%.

$^1\text{H RMN}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ , 200 MHz):  $\delta$ (ppm) 8,71 (1H, d, J=2,8, H<sub>11</sub>), 8,34-7,75 (6H, m, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>13</sub> y H<sub>14</sub>), 3,89-3,63 (8H, m, H<sub>1'</sub>, H<sub>2'</sub>, H<sub>4'</sub>, H<sub>5'</sub>)

Rf (DCM/MeOH 10:0,2): 0,6

**(2e'') N-(2,5-difluorobenzoyl)-S-2,4-dinitrofenilmorfolinoisocarbotioamida**

Rdto.: 88%

$^1\text{H}$  RMN (DMSO- $d_6$ , 200 MHz):  $\delta$ (ppm) J(Hz) 8,74 (1H, d,  $J=2,8$ ,  $H_{11}$ ), 8,14 (1H, dd,  $J=8,5$ ;  $2,8$ ,  $H_{13}$ ), 7,82 (1H, d,  $J=8,5$ ,  $H_{14}$ ), 7,79-7,67 (1H, m,  $H_6$ ), 7,24-7,14 (2H, m,  $H_3$  y  $H_4$ ), 3,88-3,67 (8H, m,  $H_{1'}$ ,  $H_{2'}$ ,  $H_{4'}$ ,  $H_{5'}$ )

Rf (DCM/MeOH 10:0,2): 0,3

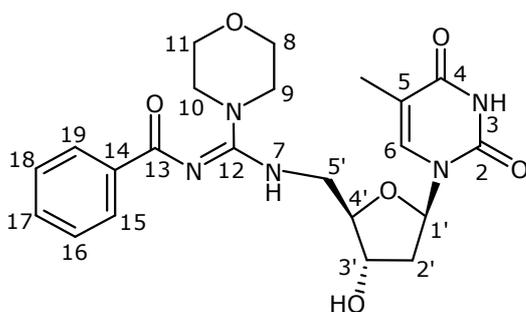
**4.3 Síntesis de 5'-N-morfolinocarbonimidoilamino-2',5'-didesoxitimidinas protegidas 5b-5g**

Se disuelven 0,24 mmol de la isotiurea y 0,29 mmol de **4** en 15 mL de THF destilado. A continuación se añaden 0,24 mmol de TEA y se deja evolucionar la mezcla a T ambiente. El proceso se va siguiendo por CCF. La mezcla de reacción, inicialmente de color naranja, a medida que va pasando el tiempo se va oscureciendo hasta quedar de color rojo oscuro por formación del 2,4-dinitro-1-tiofenol como subproducto de reacción. Al cabo de 2 horas, el análisis por CCF indica la formación de un producto mayoritario que da positivo al aplicar un reactivo revelador de azúcares. El disolvente se elimina en el rotavapor. El residuo resultante se disuelve en 50 mL de acetato de etilo. La fase orgánica se lava en primer lugar con 25 mL de agua y finalmente con 25 mL de una solución saturada de NaCl. Se seca la fase orgánica con  $\text{MgSO}_4$  y se concentra a sequedad. El producto obtenido se purifica por cromatografía en columna (DCM/MeOH 2-15%). Los análisis por  $^1\text{H}$  RMN,  $^{13}\text{C}$  RMN y espectrometría de masas (MALDI-TOF) indican que en todos los casos se han obtenido los productos esperados.

**Caracterización:****5'-N-benzoilmorfolinocarbonimidoilamino-2',5'-didesoxitimidina (5b)**

Rdto.: 80%

$^1\text{H}$  RMN (DMSO- $d_6$ , 200 MHz):  $\delta$ (ppm) J(Hz) 11,30 (1H, s, NH,  $H_3$ ), 7,98 (2H, d,  $J=7,6$ ,  $H_{15}$  y  $H_{19}$ ), 7,42-7,33 (4H, m,  $H_6$ ,  $H_{16}$ ,  $H_{17}$  y  $H_{18}$ ), 6,09 (1H, t,  $J=6,91$ ,  $H_{1'}$ ), 5,31 (1H, d,  $J=4,01$ , HO- $C_3'$ ), 4,18 (1H, m,  $H_{3'}$ ), 3,81 (1H, m,  $H_{4'}$ ), 3,59 (2H, m,  $H_{5'}$ ), 3,41-3,26 (8H, m,  $H_8$ ,  $H_9$ ,  $H_{10}$  y  $H_{11}$ ), 2,06-2,05 (2H, m,  $H_{2A'}$  y  $H_{2B'}$ ), 1,74 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{-C}_5$ )



$^{13}\text{C}$  RMN (DMSO- $d_6$ , 50MHz):  $\delta$ (ppm) 169,32 ( $\text{C}_{13}$ ), 164,25 ( $\text{C}_4$  o  $\text{C}_{12}$ ), 163,18 ( $\text{C}_4$  o  $\text{C}_{12}$ ), 150,98 ( $\text{C}_2$ ), 139,03 ( $\text{C}_{14}$ ), 136,80 ( $\text{C}_6$ ), 130,97 ( $\text{C}_{17}$ ), 129,11 ( $\text{C}_{15}$  y  $\text{C}_{19}$ ), 128,18 ( $\text{C}_{16}$  y  $\text{C}_{18}$ ), 110,46 ( $\text{C}_5$ ), 84,84 ( $\text{C}_1'$  o  $\text{C}_4'$ ) 84,43 ( $\text{C}_1'$  o  $\text{C}_4'$ ), 71,42 ( $\text{C}_3'$ ), 66,33 ( $\text{C}_8$  y  $\text{C}_{11}$ ), 46,76 ( $\text{C}_9$  y  $\text{C}_{10}$ ), 41,40-38,90 ( $\text{C}_2'$  y  $\text{C}_5'$  solapados con el disolvente), 12,72 ( $\text{CH}_3$ - $\text{C}_5$ )

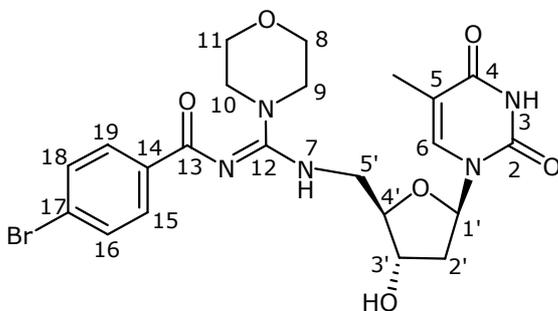
EM (MALDI-TOF, ACH, modo positivo), m/z:  $[\text{M}+\text{H}]^+=458,1$  (PM=457,5 uma)

HPLC (A:  $\text{H}_2\text{O}$ , B: ACN, 0-75% de B en 20 min):  $t_R$ : 13,6 min.

Rf (DCM/MeOH 10:1): 0,3

Pf: 103-107°C

### 5'-N-(p-bromobenzoyl)morfolinocarbonimidoilamino-2',5'-didesoxitimidina (5c)



Rdto.: 51%

$^1\text{H}$  RMN (DMSO- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  (ppm) J(Hz) 7,90, (2H, d, J=8,4,  $\text{H}_{15}$  y  $\text{H}_{19}$ ), 7,53 (2H, d, J=8,4,  $\text{H}_{16}$  y  $\text{H}_{18}$ ), 7,40 (1H, s,  $\text{H}_6$ ), 6,08 (1H, t, J=6,80,  $\text{H}_1'$ ), 5,28 (1H, d, J=4,40, HO- $\text{C}_3'$ ), 4,20-4,15 (1H, m,  $\text{H}_3'$ ), 3,83-3,79 (1H, m,  $\text{H}_4'$ ), 3,60-3,27 (10H, m,

$\text{H}_5'$ ,  $\text{H}_8$ ,  $\text{H}_9$ ,  $\text{H}_{10}$  y  $\text{H}_{11}$ ), 2,11-2,03 (2H, m,  $\text{H}_{2A}'$  y  $\text{H}_{2B}'$ ), 1,74 (3H, s,  $\text{CH}_3$ - $\text{C}_5$ )

$^{13}\text{C}$  RMN (DMSO- $d_6$ , 100MHz):  $\delta$ (ppm) 164,37 ( $\text{C}_4$  o  $\text{C}_{12}$ ), 163,30 ( $\text{C}_4$  o  $\text{C}_{12}$ ), 151,11 ( $\text{C}_2$ ), 138,42 ( $\text{C}_6$  o  $\text{C}_{14}$ ), y 136,92 ( $\text{C}_6$  o  $\text{C}_{14}$ ), 131,34 y 131,28 ( $\text{C}_8$ ,  $\text{C}_9$ ,  $\text{C}_{10}$  y  $\text{C}_{11}$ ), 124,54 ( $\text{C}_{17}$ ), 110,45 ( $\text{C}_5$ ), 84,81 y 84,49 ( $\text{C}_1'$  y  $\text{C}_4'$ ), 71,47 ( $\text{C}_3'$ ), 66,36 ( $\text{C}_8$  y  $\text{C}_{11}$ ), 46,75 ( $\text{C}_9$  y  $\text{C}_{10}$ ), 40,83-38,92 ( $\text{C}_2'$  y  $\text{C}_5'$  solapados con el disolvente), 12,71 ( $\text{CH}_3$ - $\text{C}_5$ )

EM (MALDI-TOF, ACH, modo positivo), m/z:  $[\text{M}+\text{H}]^+=538,3$  (PM=536,4 uma)

HPLC (A: $\text{H}_2\text{O}$ , B:ACN, 10-50% de B en 20 min):  $t_R$ =16,9 min; (0-100% de B en 20 min):  $t_R$ =13,3 min.

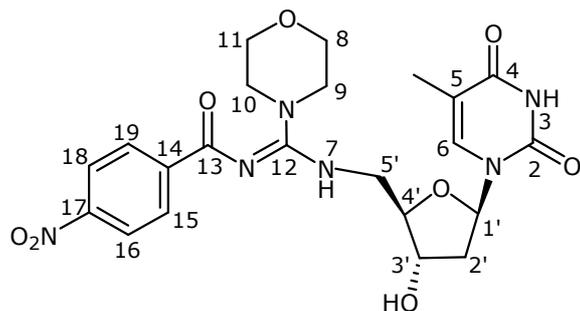
Rf (DCM/MeOH 10:1): 0,2

Pf: 131-134°C

### 5'-N-(p-nitrobenzoyl)morfolinocarbonimidoilamino-2',5'-didesoxitimidina (5d)

Rdto.: 53%

$^1\text{H}$  RMN (DMSO- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$ (ppm) J(Hz) 8,21-8,16 (4H, m,  $\text{H}_{15}$ ,  $\text{H}_{16}$ ,  $\text{H}_{18}$  y  $\text{H}_{19}$ ), 7,40 (1H, s,  $\text{H}_6$ ), 6,07 (1H, t, J=6,8,  $\text{H}_1'$ ), 5,28 (1H, d, J=4,40, HO- $\text{C}_3'$ ), 4,18-4,16 (1H, m,  $\text{H}_3'$ ), 3,82-3,81 (1H, m,  $\text{H}_4'$ ), 3,62-3,30 (10H, m,  $\text{H}_8$ ,  $\text{H}_9$ ,  $\text{H}_{10}$ ,  $\text{H}_{11}$  y  $\text{H}_5'$ ), 2,11-2,04 (2H, m,  $\text{H}_{2A}'$  y  $\text{H}_{2B}'$ ), 1,74 (3H, s,  $\text{CH}_3$ - $\text{C}_5$ )



<sup>13</sup>C RMN (DMSO-d<sub>6</sub>, 100MHz):  
 δ(ppm) 167,81 (C<sub>13</sub>), 165,82 (C<sub>4</sub> o C<sub>12</sub>),  
 164,90 (C<sub>4</sub> o C<sub>12</sub>), 152,54 (C<sub>17</sub>), 150,54  
 (C<sub>2</sub>), 146,68 (C<sub>14</sub>), 138,46 (C<sub>6</sub>), 131,77  
 (C<sub>15</sub> y C<sub>19</sub>), 125,04 (C<sub>16</sub> y C<sub>18</sub>), 111,87  
 (C<sub>5</sub>), 86,21 (C<sub>1'</sub> o C<sub>4'</sub>), 85,00 (C<sub>1'</sub> o C<sub>4'</sub>),  
 72,93 (C<sub>3'</sub>), 67,77 (C<sub>8</sub> y C<sub>11</sub>), 48,09 (C<sub>9</sub> y  
 C<sub>10</sub>), 42,06-40,32 (C<sub>2'</sub> y C<sub>5'</sub> solapados

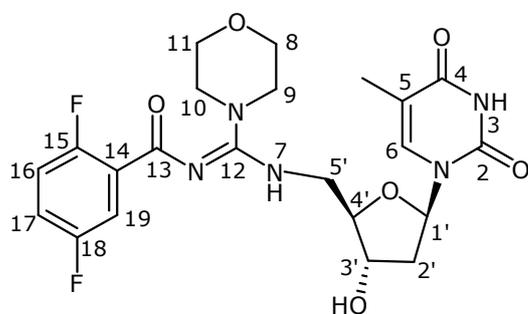
con el disolvente), 14,15 (CH<sub>3</sub>-C<sub>5</sub>)

EM (MALDI-TOF, ACH, modo positivo), m/z: [M+H]<sup>+</sup>=503,0 (PM=502,5 uma)

HPLC (A:H<sub>2</sub>O, 0,045% TFA, B:ACN, 0,036% TFA, 10-50% de B en 20 min): t<sub>R</sub>=12,3 min.

R<sub>f</sub> (DCM/MeOH 10:1): 0,3

### 5'-N-(2,5-difluorobenzoyl)morfolinocarbonimidoilamino-2',5'-didesoxitimidina (5e)



Rdto.: 30%

<sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>, 200 MHz): δ(ppm) J(Hz)  
 11,28 (1H, s, NH, H<sub>3</sub>), 7,72-7,68 (1H, m, H<sub>19</sub>),  
 7,42 (1H, s, H<sub>6</sub>), 7,26-7,09 (2H, m, H<sub>16</sub> y H<sub>17</sub>),  
 6,10 (1H, t, J=6,8, H<sub>1'</sub>), 4,25-4,13 (1H, m,  
 H<sub>3'</sub>), 3,87-3,71 (1H, m, H<sub>4'</sub>), 3,59-3,25 (10H,  
 m, H<sub>5'</sub>, H<sub>8</sub>, H<sub>9</sub>, H<sub>10</sub> y H<sub>11</sub>), 2,12-2,03 (2H, H<sub>2A'</sub> y

H<sub>2B'</sub>), 1,71 (3H, s, CH<sub>3</sub>-C<sub>5</sub>)

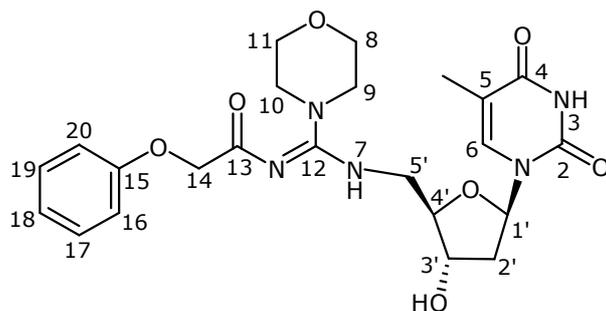
<sup>13</sup>C RMN (DMSO-d<sub>6</sub>, 100MHz): δ(ppm) J(Hz) 166,60 (C<sub>4</sub> o C<sub>12</sub>), 165,73 (d, J=5,3, C<sub>13</sub>), 163,76  
 (C<sub>4</sub> o C<sub>12</sub>), 159,57 (dd, J=242,0; 3,8 Hz, C<sub>18</sub>), 158,13 (dd, J=246,14; 2,7, C<sub>15</sub>), 152,52 (C<sub>2</sub>),  
 138,32 (C<sub>6</sub>), 131,68 (dd, J=15,81; 3,9, C<sub>14</sub>), 119,76 (dd, J=22,8; 11,4 Hz, C<sub>16</sub>, C<sub>17</sub> o C<sub>19</sub>),  
 119,32 (dd, J=23,7; 9,9 Hz, C<sub>16</sub>, C<sub>17</sub> o C<sub>19</sub>), 118,67 (dd, J=22,9; 4,6 Hz, C<sub>16</sub>, C<sub>17</sub> o C<sub>19</sub>),  
 112,33 (C<sub>5</sub>), 84,64 (C<sub>1'</sub> o C<sub>4'</sub>), 84,46 (C<sub>1'</sub> o C<sub>4'</sub>), 71,39 (C<sub>3'</sub>), 66,22 (C<sub>8</sub> y C<sub>11</sub>), 46,69 (C<sub>9</sub> y  
 C<sub>10</sub>), 40,92-38,84 (C<sub>2'</sub> y C<sub>5'</sub> solapados con el disolvente), 12,58 (CH<sub>3</sub>-C<sub>5</sub>)

EM (MALDI-TOF, ACH, modo positivo), m/z: [M+H]<sup>+</sup>=494,3 (PM=492,47 uma)

HPLC (A:H<sub>2</sub>O, B:ACN, 10-50% de B en 20 min): t<sub>R</sub>=11,8 min.

R<sub>f</sub> (DCM/MeOH 10:1): 0,1

### 5'-N-fenoxiacetilmorfolinocarbonimidoilamino-2',5'-dideoxythymidine (5f)



Rdto.:46%

<sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>, 200 MHz): δ(ppm)  
 J(Hz) 11,30 (1H, s, NH, H<sub>3</sub>), 7,75 (1H, s,  
 NH, H<sub>7</sub>), 7,42 (1H, s, H<sub>6</sub>), 7,21-7,17  
 (2H, m, H<sub>17</sub> y H<sub>19</sub>), 6,87-6,83 (3H, m,  
 H<sub>16</sub>, H<sub>18</sub> y H<sub>20</sub>), 6,08 (1H, t, J=6,8, H<sub>1'</sub>),  
 5,34 (1H, d, J=4,0, HO-C<sub>3'</sub>), 4,45 (2H,

s, H<sub>14</sub>), 4,17-4,05 (1H, m, H<sub>3</sub>'), 3,83-3,75 (1H, m, H<sub>4</sub>'), 3,54-3,14 (10H, H<sub>8</sub>, H<sub>9</sub>, H<sub>10</sub>, H<sub>11</sub> y H<sub>5</sub>'), 2,04-2,0 (2H, m, H<sub>2A</sub>' y H<sub>2B</sub>'), 1,78 (3H, s, CH<sub>3</sub>-C<sub>5</sub>)

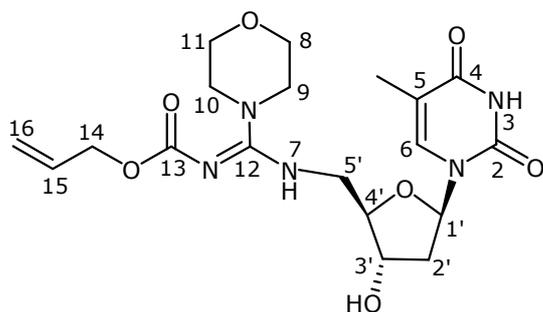
<sup>13</sup>C RMN (DMSO-d<sub>6</sub>, 100MHz): δ(ppm) 151,13 (C<sub>2</sub>), 136,94 (C<sub>6</sub>), 129,91 (C<sub>16</sub> y C<sub>18</sub>), 120,80 (C<sub>18</sub>), 116,07 (C<sub>16</sub> y C<sub>20</sub>), 84,79 (C<sub>1</sub>' o C<sub>4</sub>'), 84,51 (C<sub>1</sub>' o C<sub>4</sub>'), 71,55 (C<sub>3</sub>'), 60,96 (C<sub>14</sub>), 66,33 (C<sub>8</sub> y C<sub>11</sub>), 46,55 (C<sub>9</sub> y C<sub>10</sub>), 40,84-39,60 (C<sub>2</sub>' y C<sub>5</sub>' solapados con el disolvente), 12,73 (CH<sub>3</sub>-C<sub>5</sub>)

EM (MALDI-TOF, ACH, modo positivo), m/z: [M+H]<sup>+</sup>=488,0 (PM=487,5 uma)

HPLC (A:H<sub>2</sub>O, B:ACN, 10-50% de B en 20 min): t<sub>R</sub>=13,2 min.

Rf (DCM/MeOH 10:1): 0,2

### 5'-N-aliloxycarbonilmorfolinocarbonimidoilamino-2',5'-didesoxitimidina (5g)



Rdto.: 21%

<sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>, 200 MHz): δ(ppm) J(Hz)  
 11,3 (1H, s, NH, H<sub>3</sub>), 7,54 (1H, s, NH, H<sub>7</sub>),  
 7,45 (1H, s, H<sub>6</sub>), 6,10 (1H, t, J=6,8, H<sub>1</sub>'),  
 5,91 (1H, m, H<sub>15</sub>), 5,33 (1H, d, J=4,0, HO-C<sub>3</sub>'),  
 5,21 (1H, dd, J=16,7; 1,1 H<sub>16</sub>TRANS),  
 5,09 (1H, dd, J=9,2; 1,1, H<sub>16</sub>CIS), 4,39 (2H,

d, J=5,0 Hz, H<sub>14</sub>), 4,20-4,05 (1H, m, H<sub>3</sub>'), 3,80-3,75 (1H, m, H<sub>4</sub>'), 3,55-3,13 (10H, m, H<sub>8</sub>, H<sub>9</sub>, H<sub>10</sub>, H<sub>11</sub> y H<sub>5</sub>'), 2,09-2,02 (2H, m, H<sub>2A</sub>' y H<sub>2B</sub>'), 1,78 (3H, s, CH<sub>3</sub>-C<sub>5</sub>)

<sup>13</sup>C RMN (DMSO-d<sub>6</sub>, 50MHz): δ(ppm) 161,67 (C<sub>4</sub> o C<sub>12</sub>), 148,75 (C<sub>2</sub>), 134,17 (C<sub>6</sub>), 132,50 (C<sub>15</sub>), 114,58 (C<sub>16</sub>), 108,08 (C<sub>5</sub>), 82,50 (C<sub>4</sub>' o C<sub>1</sub>'), 81,75 (C<sub>4</sub>' o C<sub>1</sub>'), 69,17 (C<sub>3</sub>'), 63,72 (C<sub>8</sub> y C<sub>11</sub>), 62,54 (C<sub>14</sub>), 44,83 (C<sub>9</sub> y C<sub>10</sub>), 38,78-36,29 (C<sub>2</sub>' y C<sub>5</sub>' solapados con el disolvente), 10,09 (CH<sub>3</sub>-C<sub>5</sub>)

EM (MALDI-TOF, ACH, modo positivo), m/z: [M+H]<sup>+</sup>=438,1 (PM=437,45 uma)

HPLC (A:H<sub>2</sub>O, 0,045% TFA, B:ACN, 0,036% TFA, 10-50% de B en 20 min): t<sub>R</sub>=9,6 min.

Rf (DCM/MeOH 10:1): 0,3

## 5. Ensayos de desprotección de los productos 5b-5g

### 5.1 Empleando NH<sub>3</sub> acuoso (ensayos sobre 5b-5f)

Se pesan 0,01 mmol de 5'-N-morfolinocarbonimidoil-2',5'-didesoxitimidina protegida y se disuelven en 3mL de dioxano/NH<sub>3</sub> (32%) 1:1. Se deja evolucionar a T ambiente. Pasadas 24 horas el seguimiento por CCF y HPLC revela que el protector no se elimina. La T se eleva a 55°C y se deja evolucionar el proceso durante 8 h más, pero no se llega a eliminar por completo el grupo protector.

### **5.2 Empleando LiOH (ensayos sobre 5b-5f)**

Se pesan 0,01 mmol de 5'-*N*-morfolinocarbonimidoil-2',5'-didesoxitimidina protegida y se disuelven en 3 mL de una solución de LiOH 0,10 M en MeOH/dioxano/H<sub>2</sub>O 1,5:1,5:1. El proceso se deja evolucionar a T ambiente durante 1 día. El seguimiento realizado por CCF y HPLC revela que no se elimina el grupo protector en ninguno de los dos casos. Se eleva la T a 55°C y se deja evolucionar durante 8 horas más, pero no se llega a eliminar por completo el grupo protector.

### **5.3 Empleando K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (ensayos sobre 5b-5f)**

Se pesan 0,01 mmol de 5'-*N*-morfolinocarbonimidoil-2',5'-didesoxitimidina protegida y se disuelven en 3 mL de una solución de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,05 M en MeOH/dioxano 1:1. A continuación se deja evolucionar el proceso durante 1 día a T ambiente haciendo el seguimiento por CCF y HPLC. Pasado este tiempo no se observan cambios significativos en los productos. La T se eleva a 55°C y se deja evolucionar durante 8 h más. Pasado este tiempo tampoco se produce la eliminación completa del grupo protector.

### **5.4 Empleando metilamina (ensayos sobre 5c-5f)**

Se pesan 0,01 mmol de 5'-*N*-morfolinocarbonimidoil-2',5'-didesoxitimidina protegida y se disuelven en 3 mL de metilamina/MeOH 1:1. A continuación se deja evolucionar el proceso durante 1 día a T ambiente, haciendo el seguimiento por CCF y HPLC. Pasado este tiempo no se observan cambios significativos en los productos. A continuación el proceso se deja evolucionar a T=55°C durante 8 horas. El análisis por CCF y HPLC revela que no se elimina completamente el grupo protector en ninguno de los ensayos realizados, y en el ensayo realizado con el derivado **5f** se va formando una mezcla de productos.

### **5.5 Empleando etilendiamina, (productos 5c-5f)**

Se pesan 0,01 mmol de 5'-*N*-morfolinocarbonimidoil-2',5'-didesoxitimidina protegida y se disuelven en 3 mL de etilendiamina/MeOH 1:1. A continuación se deja evolucionar el proceso durante 1 día a T ambiente haciendo el seguimiento por CCF y HPLC. Pasado este tiempo no se observan cambios significativos en los productos. A continuación el proceso se deja evolucionar a T=55°C durante 8 horas. El análisis por CCF y HPLC revela que no se elimina completamente el grupo protector en ninguno de los ensayos realizados, y en el ensayo realizado con el derivado **5f** se va formando una mezcla de productos.

### **5.6 Empleando hidrazina (ensayo sobre 5c)**

Se pesan 0,01 mmol de **5c** y se disuelven en 3 mL de hidrazina/MeOH 1:1. El proceso se deja evolucionar a 55°C durante 8 h. El análisis por CCF y HPLC revela que en esas

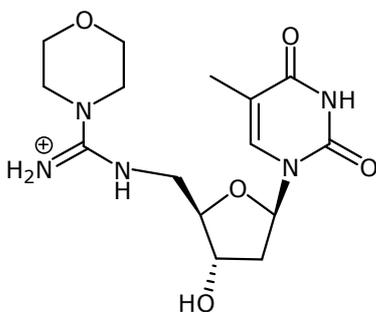
condiciones se forma una mezcla compleja de productos, seguramente debido a la descomposición del producto **5c**.

### **5.7 Empleando HCOOH, butilamina, PPh<sub>3</sub> y Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, (ensayo sobre 5g)**

Se pesan 0,005 mmol de **5g** y se disuelven en 2 mL de THF destilado y anhidro. A continuación se añaden 10 eq de HCOOH, 10 eq de butilamina y 0,2 eq de PPh<sub>3</sub>. Se deja agitar durante 2-3 minutos y se añaden 0,05 eq de Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>. Se deja evolucionar a T ambiente y atmósfera de Ar durante 40 minutos. El control realizado por CCF y HPLC revela que el grupo protector se ha eliminado completamente. Se purifica por HPLC el producto y se analiza por EM, espectro que corresponde a 5'-N-morfolinocarbonimidoil-2',5'-didesoxitimidina, **8**.

#### **Caracterización:**

#### **5'-(morfolinocarbonimidoil)amino-2',5'-didesoxitimidina (8)**



HPLC (A:H<sub>2</sub>O, 0,045% TFA, B:ACN, 0,036% TFA, 10-50% de B en 20 min): t<sub>R</sub>=4,7 min.

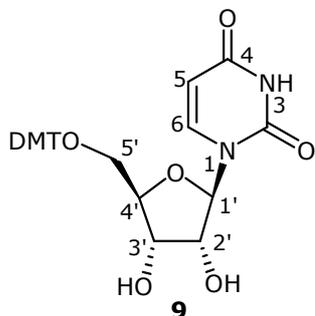
EM: (MALDI-TOF, ACH, modo positivo), m/z:  
[M+H]<sup>+</sup>=354,1 (PM=354,38 uma)

## **6. Síntesis del derivado guanidina de morfolinouridina y timidina (12)**

### **6.1 Síntesis de 5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)uridina (9)**

Se pesan 11,0 mmol de cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo y se guardan durante 1 h aproximadamente en un desecador. Mientras, se pesan 10 mmol de uridina y se seca por coevaporación con 30 mL de ACN (x2) para acabar de eliminar la humedad que pueda retener el nucleósido. A continuación se disuelve la uridina en 40 mL de piridina anhidra y bajo atmósfera de Ar se añade el cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo sobre la solución preparada anteriormente. La reacción se deja evolucionar a T ambiente durante 1 noche bajo atmósfera de Ar. Pasado este tiempo se añaden 5 mL de MeOH para parar la reacción y el disolvente se elimina en el rotavapor. El crudo obtenido se coevapora con 30 mL de ACN (x2) para acabar de eliminar la piridina. El crudo se disuelve en 120 mL de acetato de etilo y se transfiere a un embudo de decantación. La fase orgánica se lava con 120 mL de una solución de ácido cítrico al 10%. La fase orgánica resultante se lava con 70 mL de una solución de NaHCO<sub>3</sub> al 10% (x2), y con 70 mL de una solución saturada de NaCl. Finalmente, la fase orgánica se seca con

MgSO<sub>4</sub> y se elimina el disolvente en el rotavapor. Se aísla el producto **9** con un 81% de rendimiento mediante cromatografía en columna (DCM/MeOH 0-10%, y 1% de TEA), en forma de un sólido blanco.

**Caracterización:**

<sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz): δ(ppm) J(Hz) 7,42 (1H, d, J=7,7, H<sub>6</sub>), 7,30-7,26 (9H, m, arom. DMT), 6,83 (4H, d, J=8,8, arom. DMT), 5,91 (1H, d, J=2,6, H<sub>1'</sub>), 5,37 (1H, d, J=7,7, H<sub>5</sub>), 4,42 (1H, m, H<sub>3'</sub>), 4,31 (1H, m, H<sub>2'</sub>), 4,18 (1H, m, H<sub>4'</sub>), 3,79 (6H, s, O-CH<sub>3</sub> DMT), 3,53 (2H, m, H<sub>5'</sub>)

EM (ES, modo negativo), m/z: [M+1H]<sup>-</sup>=545,4 (M=547,4uma)

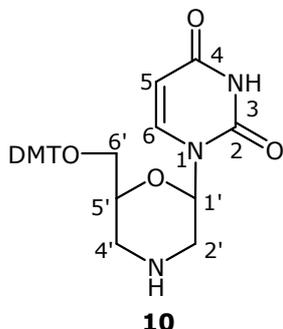
Rf (DCM/MeOH 10:1): 0,4

Pf: 93-96°C

**5.2 Síntesis de (2R,6S)-6-(4,4'-dimetoxitritil)-2-(uracil-1-il)morfolina (10)**

Se disuelven 3,5 mmol de **9** en 100 mL de MeOH. A continuación se añaden 3,8 mmol de NaIO<sub>4</sub> y 7,0 mmol de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>. La reacción se deja evolucionar a T ambiente. Poco a poco va apareciendo un precipitado blanco. Después de 1 h el precipitado se elimina por filtración. A la solución resultante se añaden 8,7 mmol de NaBH<sub>3</sub>CN y se deja evolucionar a T ambiente durante 2 h. Pasado este tiempo se va añadiendo gota a gota una solución de ácido cítrico al 10% hasta llegar a pH=5. A medida que se va añadiendo ácido se va formando un precipitado de color blanco. El disolvente se elimina en el rotavapor. El crudo resultante se disuelve en 100 mL de acetato de etilo y se transfiere a un embudo de decantación. La fase orgánica se lava con 50 mL de H<sub>2</sub>O y con 50 mL de una solución saturada de NaCl. A continuación, la fase orgánica resultante se seca con MgSO<sub>4</sub> y se elimina el disolvente en el rotavapor. El crudo obtenido se purifica por cromatografía en columna, (DCM/MeOH, 0-10%, y 1% de TEA), obteniendo un sólido blanco.

Rdto.: 60%.

**Caracterización:**

<sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ(ppm) J(Hz) 7,45 (1H, d, J=7,6, H<sub>6</sub>), 7,33-7,21 (9H, m, arom. DMT), 6,82 (4H, d, J=8,8 Hz, arom. DMT), 5,77 (1H, d, J=7,6, H<sub>5</sub>), 5,68 (1H, dd, J=9,7; 2,4, H<sub>1'</sub>), 3,96 (1H, m, H<sub>5'</sub>), 3,78 (6H, s, O-CH<sub>3</sub> DMT), 3,24 (1H, dd, J=9,5; 4,9 Hz, H<sub>6A'</sub>), 3,15 (1H, dd, J=12,1; 2,4, H<sub>2'(EC)</sub>), 3,07 (1H, dd, J=9,5; 5,1, H<sub>6B'</sub>), 3,01 (1H, dd, J=12,7; 2,3, H<sub>4'(EC)</sub>), 2,58 (1H, dd, J=12,7; 10,7, H<sub>4'(AX)</sub>), 2,54 (1H, dd, J=12,1; 9,7, H<sub>2'(AX)</sub>)

<sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz): δ(ppm) 162,7 (C<sub>4</sub>), 158,46 (arom. DMT), 149,97(C<sub>2</sub>), 144,2 (C<sub>6</sub>), 139,8 (arom. DMT), 135,7 (arom. DMT), 129,94 (arom. DMT), 128,03, (arom. DMT), 127, 73

(arom. DMT), 126,31 (arom. DMT), 113,04 (arom. DMT), 102,01 (C<sub>5</sub>), 85,98 (C<sub>1</sub>'), 80,03 (C<sub>5</sub>'), 64,01 (C<sub>6</sub>'), 55,14 (O-CH<sub>3</sub> DMT), 49,11 (C<sub>2</sub>' o C<sub>4</sub>'), 46,35 (C<sub>2</sub>' o C<sub>4</sub>')

EM (ES, modo positivo), m/z: [M+H]<sup>+</sup>=530,3 (M=529,6 uma)

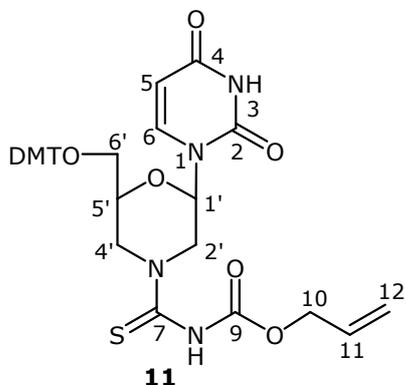
Rf (DCM/MeOH 10:1): 0,4

Pf: 111-115°C

### **6.3 Síntesis de (2R,6S)-N-aliloxicarbonil-6-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2-(uracil-1-il)morfolinocarbotioamida (11)**

Se suspenden 2,4 mmol de tiocianato de potasio en 5 mL de acetato de etilo anhidro y se añaden gota a gota 2 mmol del cloruro de aliloxicarbonilo en 5 mL de acetato de etilo anhidro. Después de 3 horas de reacción a T ambiente y bajo atmósfera de Ar, se disuelven 2 mmol de **10** y 2 mmol de TEA en 5 mL del mismo disolvente y se añaden gota a gota por canulación sobre la mezcla de reacción. La reacción se deja evolucionar durante 2 horas más a T ambiente y bajo atmósfera de Ar. Pasado este tiempo se detecta por CCF la presencia de un solo producto. El disolvente se elimina en el rotavapor y el crudo de reacción resultante se redissuelve en 100 mL de diclorometano y se transfiere a un embudo de decantación. La fase orgánica se lava con 35 mL de una solución al 10% de NaHCO<sub>3</sub> (X2) y con 35 mL de una solución saturada de NaCl. Finalmente se seca con MgSO<sub>4</sub> y se elimina el disolvente en el rotavapor, obteniéndose un sólido blanco con un 98% de rendimiento.

#### **Caracterización:**



<sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ(ppm) J(Hz) 7,42 (1H, d, J=7,6, H<sub>6</sub>), 7,31-7,24 (9H, m, arom. DMT), 6,82 (4H, d, J=8,8 Hz, arom. DMT), 5,92-5,82 (2H, m, H<sub>1</sub>' y H<sub>11</sub>), 5,79 (1H, d, J=7,6, H<sub>5</sub>), 5,30 (1H, d, J=17,1, H<sub>12</sub>TRANS), 5,22 (1H, d, J=8,8, H<sub>12</sub>CIS), 4,63 (1H, dd, J=12,2 Hz y J=4,4 Hz H<sub>10A</sub>), 4,57 (1H, dd, J=12,2 Hz, J=4,8, H<sub>10B</sub>), 4,15-4,12 (1H, m, H<sub>5</sub>'), 3,77 (6H, s, O-CH<sub>3</sub> DMT), 3,29-3,08 (6H, m, H<sub>2A</sub>', H<sub>2B</sub>', H<sub>4A</sub>', H<sub>4B</sub>', H<sub>6A</sub>' y H<sub>6B</sub>')

<sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ(ppm) 178,4 (C<sub>7</sub>), 163,6 (C<sub>4</sub>), 160,2 (arom. DMT), 150,09 (C<sub>9</sub>), 149,9 (C<sub>2</sub>), 144,3 (C<sub>6</sub>), 139,6 (arom. DMT), 135,4 (arom. DMT), 131,2 (C<sub>11</sub>), 129,7 (arom. DMT), 128,5 (arom. DMT), 127,6 (arom. DMT), 126,2 (arom. DMT), 119,2 (C<sub>12</sub>), 113,3 (arom. DMT), 102,2 (C<sub>5</sub>), 85,7 (C<sub>1</sub>'), 80,2 (C<sub>5</sub>'), 67,5 (C<sub>10</sub>), 64,5 (C<sub>6</sub>'), 55,2 (O-CH<sub>3</sub> DMT), 49,7 (C<sub>2</sub>' y C<sub>4</sub>')

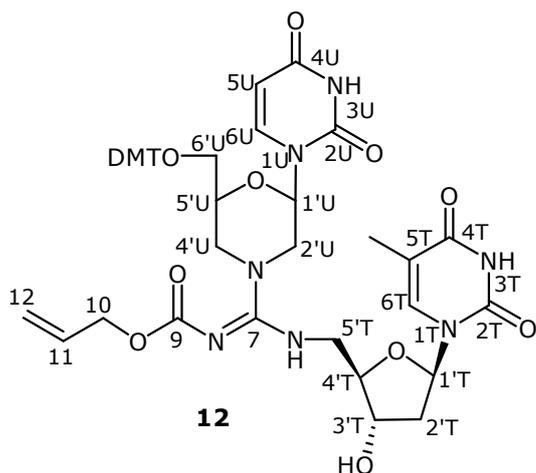
EM (ES, modo negativo), m/z: [M+H]<sup>-</sup>=671,2 (M=672,8 uma)

Rf (diclorometano/MeOH/TEA 10:0,2:0,1): 0,3

### **6.4 Síntesis de (2R,6S)-5'-(N-aliloxicarbonil)-5'-[6-(4,4'-dimetoxitritil)-2-(uracil-1-il)]morfolinocarbonimidoilamino-2',5'-didesoxitimidina (12)**

En un matraz se pesan 1,8 mmol de **11** y se disuelven en 80 mL de THF destilado y anhidro. A continuación se añaden 1,8 mmol de DBU y 1,44 mmol de reactivo de Sanger. Se purga con Ar y se deja a T ambiente y con atmósfera de Ar durante 15 minutos. Sin aislar el intermedio formado se añaden 2,2 mmol de 5'-amino-2',5'-didesoxitimidina y 1,8 mmol de TEA. Para poder acabar de disolver la 5'-amino-2',5'-didesoxitimidina se añaden 10 mL de DMF anhidra (sobre CaH<sub>2</sub>). Se purga nuevamente con Ar y se deja evolucionar a T ambiente y con atmósfera de Ar durante 2 horas. Pasado este tiempo se elimina el disolvente en el rotavapor. El residuo se disuelve en 200 mL de acetato de etilo. La fase orgánica se lava en primer lugar con 100 mL de agua y finalmente con 100 mL de una solución saturada de NaCl. Se seca la fase orgánica con MgSO<sub>4</sub> y se concentra a sequedad. El producto obtenido se purifica por cromatografía en columna (DCM/MeOH 0-10%, y 1% de TEA). El producto obtenido se disuelve en 4 mL de diclorometano y se precipita sobre 100 mL de éter/hexano 1:1. Se obtiene un sólido blanco con un 42% de rendimiento.

#### **Caracterización:**



<sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ(ppm) J(Hz) 7,50 (d, 1H, J=7,6, H<sub>6(U)</sub>), 7,45 (1H, s, H<sub>6(T)</sub>), 7,37-7,19 (9H, m, arom. DMT), 6,83 (4H, d, J=8,9, arom. DMT), 5,98-5,85 (2H, m, H<sub>11</sub> y H<sub>1'(T)</sub>), 5,81-5,77 (2H, m, H<sub>5(U)</sub> y H<sub>1'(U)</sub>), 5,27 (1H, d, J=18,6, H<sub>12TRANS</sub>), 5,13 (1H, d, J=9,7, H<sub>12CIS</sub>), 4,58 (2H, d, J=5,9, H<sub>10</sub>), 4,49-4,45 (1H, m, H<sub>3'(T)</sub>), 4,20-4,15 (1H, m, H<sub>4'(T)</sub>), 4,07-3,98 (1H, m, H<sub>5'(U)</sub>), 3,78 (6H, s, O-CH<sub>3</sub> DMT), 3,69-3,56 (4H, m, H<sub>4A'(U)</sub>, H<sub>2A'(U)</sub> y H<sub>5'(T)</sub>), 3,29-3,15 (2H, m, H<sub>6'(U)(A)</sub> y H<sub>6'(U)(B)</sub>), 3,01-2,85 (2H, m,

H<sub>4B'(U)</sub> y H<sub>2B'(U)</sub>), 2,44-2,35 (2H, m, H<sub>2A'(T)</sub> y H<sub>2B'(T)</sub>), 1,80 (3H, s, CH<sub>3</sub>-C<sub>5</sub>)

EM (FAB, modo negativo, Magic Bullet), m/z: [M-H]<sup>-</sup>=878,2 (M=878,90 uma)

Rf (diclorometano/MeOH/TEA 10:0,5:0,1): 0,2

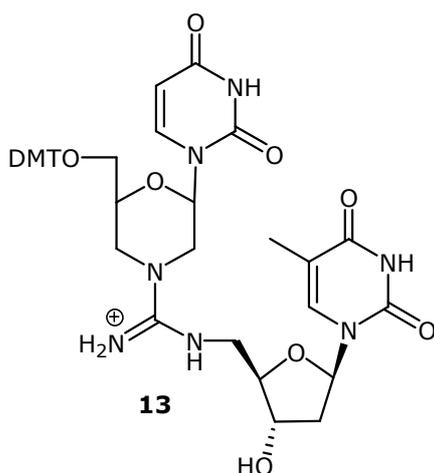
## **7. Ensayo de desprotección del producto 12 mediado por paladio.**

### **Tratamiento con Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, PPh<sub>3</sub>, HCOOH y butilamina**

Se pesan 0,023 mmol (20 mg) de **12** y se disuelven en 5 mL de THF destilado y anhidro. A continuación se añaden 10 eq de HCOOH, 10 eq de butilamina y 0,2 eq de PPh<sub>3</sub>. Se deja agitar durante 2-3 minutos y se añaden 0,05 eq de Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>. Se deja evolucionar a T ambiente y en atmósfera de argón. Después de 2 horas de reacción el control por CCF revela que no avanza la reacción. Se añaden 0,05 equivalentes más de catalizador y se deja

evolucionar 30 minutos a T ambiente. Pasado este tiempo el reactivo de partida **12** se consume completamente. El disolvente se elimina en el rotavapor. La mitad del crudo de reacción se intenta purificar por cromatografía en columna (DCM/MeOH 0-20%, y 1% de TEA), pero al llegar al 20% de MeOH el producto aún no eluye. La otra mitad del crudo de reacción se purifica por CCF semipreparativa, (diclorometano/MeOH/TEA 100:15:1). Mediante este método se consiguen recuperar 5,5 mg (0,0063 mmol), lo que supone un 55% de rendimiento en la purificación.

#### Caracterización:



EM (MALDI-TOF, modo positivo, THAP), m/z:

$[M+H]^+ = 796,3$  (M=794,8 uma)

HPLC (A:H<sub>2</sub>O, B:ACN, 10-75% de B en 30 min):

$t_R = 14,7$  min.

R<sub>f</sub> (diclorometano/MeOH/TEA 10:1:0,1): 0,18

## 8. Síntesis en fase sólida de un pentámero T(<sup>m</sup>Ug<sub>(Alloc)</sub>T)TC

### 8.1 Ensayos de obtención del derivado fosforamidito 14

#### 8.1.1 Empleando cianoetil-*N,N,N',N'*-tetraisopropilfosforodiamidito y 1*H*-tetrazol

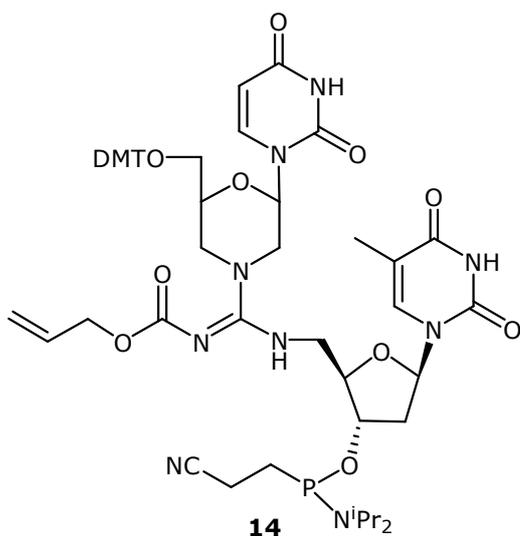
Se pesan 0,20 mmol de **12** y se disuelven en 10 mL de diclorometano destilado y anhidro. A continuación se añaden 0,24 mmol de cianoetil-*N,N,N',N'*-tetraisopropilfosforodiamidito y 0,24 mmol de 1*H*-tetrazol. La mezcla de reacción se purga con Ar y se deja reaccionar a T ambiente y con atmósfera de Ar durante 3 horas. Pasado este tiempo prácticamente no se ha consumido el producto de partida. Se añaden 0,24 mmol adicionales de cianoetil-*N,N,N',N'*-tetraisopropilfosforodiamidito y se deja evolucionar durante 2 horas más. Pasado este tiempo el análisis por CCF indica que el producto **12** es mayoritario. Se añade a la mezcla de reacción 0,20 mmol de 2-cianoetil-cloro-*N,N*-diisopropilaminofosfina y 0,5 mmol de DIEA y se deja evolucionar a T ambiente durante 2 horas más. Pasado este tiempo, el producto de partida ya no se detecta por CCF. Se añaden 2 mL de MeOH para parar la reacción y el disolvente se elimina en el rotavapor procurando que no quede muy concentrado en DIEA. Se hacen 2-3 coevaporaciones con ACN para acabar de secar el producto. El crudo resultante se disuelve en 50 mL de diclorometano

pasado por  $\text{Al}_2\text{O}_3$  y se lava la fase orgánica con 15 mL de una solución de  $\text{NaHCO}_3$  al 10%. Finalmente se lava con 25 mL de una solución saturada de  $\text{NaCl}$  y se seca la fase orgánica con  $\text{MgSO}_4$ . El producto se purifica por cromatografía en columna, (diclorometano/hexano 50-0%, siempre con 5% TEA). El producto obtenido de la purificación en columna se disuelve en 1,5 mL de diclorometano pasado por  $\text{Al}_2\text{O}_3$  y precipitarlo sobre 40 mL de hexano a  $-10^\circ\text{C}$ . Se obtiene un sólido de color blanco con un 65% de rendimiento.

### 8.1.2 Empleando 2-cianoetil-cloro-*N,N*-diisopropilaminofosfina

Se pesan 0,50 mmol de **12** y se disuelven en 35 mL de diclorometano destilado y anhidro. A continuación, se añaden 1,25 mmol de DIEA anhidra y 0,50 mmol de 2-cianoetil-cloro-*N,N*-diisopropilaminofosfina. La mezcla de reacción se purga con Ar y se deja reaccionar a T ambiente y con atmósfera de Ar durante 2 horas. Pasado este tiempo si aún queda algo de reactivo de partida se añaden 0,63 mmol de DIEA y 0,25 mmol más de 2-cianoetil-cloro-*N,N*-diisopropilaminofosfina y se deja reaccionar en las mismas condiciones durante 1 hora más. Pasado este tiempo la reacción se para añadiendo 2 mL de MeOH. El disolvente se elimina en el rotavapor procurando que no quede muy concentrado en DIEA. Se hacen 2-3 coevaporaciones con ACN para acabar de secar el producto. El crudo resultante se disuelve en 100 mL de diclorometano pasado por  $\text{Al}_2\text{O}_3$  y se lava la fase orgánica con 30 mL de una solución de  $\text{NaHCO}_3$  al 10%. Finalmente se lava con 50 mL de una solución saturada de  $\text{NaCl}$  y se seca la fase orgánica con  $\text{MgSO}_4$ . Para acabar de purificar el producto se disuelve en 3 mL de diclorometano pasado por  $\text{Al}_2\text{O}_3$  y se precipita sobre 40 mL de hexano a  $-10^\circ\text{C}$ . Se obtiene un sólido de color blanco con un 82% de rendimiento.

#### Caracterización:



$^{31}\text{P}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 81 MHz):  $\delta$ (ppm) 149,03 y 148,83, mezcla de diastereómeros  
Rf (AcOEt/DCM/TEA 4,5:4,5:1): 0,2 y 0,15

## 8.2 Ensayos de obtención del pentámero T(<sup>m</sup>Ug<sub>(ALLOC)</sub>T)TC

### 8.2.1 Síntesis en fase sólida del pentámero T(<sup>m</sup>Ug<sub>(ALLOC)</sub>T)TC

La síntesis del pentámero se lleva a cabo según la metodología estándar de síntesis de oligonucleótidos en sintetizadores automáticos (*Applied Biosystems 308B* o *PCR-MATE*), según se indica en el apartado C.2 de la sección de Materiales y Métodos, siendo la escala de trabajo de 0,2 μmol. Todas las síntesis realizadas son DMT-OFF. Se han realizado diversos ensayos de incorporación del fosforamidito **14** variando el tiempo de reacción (30 o 300 segundos), el número de acoplamientos (1 o 2 acoplamientos) y el reactivo activante (1*H*-tetrazol, 5-(*o*-nitrofenil)-1*H*-tetrazol, 5-etiltio-1*H*-tetrazol o triflato de benzimidazolonio) (**Tabla 1**). Se emplea ACN para preparar las soluciones 0,4 M de 1*H*-tetrazol y 5-etiltio-1*H*-tetrazol y THF para preparar las soluciones de 5-(*o*-nitrofenil)-1*H*-tetrazol y triflato de benzimidazolonio.

**Tabla 1 Ensayos de obtención del pentámero T(<sup>m</sup>Ug<sub>(ALLOC)</sub>T)TC**

Ensayo	Resina	Activante	nº acopl.	t acopl. (s)	<sup>m</sup> Ug <sub>(ALLOC)</sub> T	Rdto. síntesis
1	PENT(1)	1 <i>H</i> -tetrazol <sup>a</sup>	1	30	61%	59%
2	PENT(2)	1 <i>H</i> -tetrazol <sup>a</sup>	1	300	66%	65%
3	PENT(3)	1 <i>H</i> -tetrazol <sup>a</sup>	2	30	71%	70%
4	PENT(4)	1 <i>H</i> -tetrazol <sup>a</sup>	2	300	78%	76%
5	PENT(5)	5-( <i>o</i> -nitrofenil)-1 <i>H</i> -tetrazol <sup>b</sup>	2	300	70%	68%
6	PENT(6)	5-etiltio-1 <i>H</i> -tetrazol <sup>a</sup>	2	300	69%	67%
7	PENT(7)	Triflato de benzimidazolonio <sup>b</sup>	2	300	77%	75%

<sup>a</sup> en ACN, <sup>b</sup> en THF. Todas las soluciones de activante son 0,4 M.

El rendimiento de la síntesis del oligonucleótido en cada caso se ha calculado según se indica en el apartado C.3 de la sección de Materiales y Métodos. En la **Tabla 1** se indica el rendimiento de incorporación del fosforamidito **14** y rendimiento de síntesis obtenido. Los rendimientos de incorporación del fosforamidito **14** oscilan entre 61-78% y los rendimientos de síntesis del oligómero oscilan entre el 59-76%.

### 8.2.2 Obtención del pentámero 15

El desanclaje de resina y la eliminación de los grupos protectores de las nucleobases y de los grupos fosfato se realiza todo en un solo paso. La resina obtenida se transfiere a un vial y se trata con una solución acuosa de NH<sub>3</sub> a 55°C. Como la cadena sólo tiene pirimidinas, se mantiene a esa temperatura durante 6 horas. Pasado este tiempo se elimina la resina por filtración y la solución se transfiere a un balón. A continuación se diluye con 5-10 mL de H<sub>2</sub>O y se elimina el NH<sub>3</sub> en el rotavapor. La solución resultante se liofiliza.

Se purifica el oligómero **15** por HPLC semipreparativa (véase apartado B.3.4 de Materiales y Métodos). Los eluyentes utilizados son A: AcONH<sub>4</sub> 0,01 M y B: H<sub>2</sub>O/ACN 1:1, y el gradiente empleado es 5-30% de B en 30 minutos. La fracción recogida correspondiente al producto **15** se liofiliza. Para determinar el rendimiento obtenido se ha seguido el procedimiento descrito en el apartado C.4 de Materiales y Métodos. Para el producto **15** ( $\epsilon_{260}=43,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) se han obtenido 3,6 OD<sub>260</sub>. Como la escala de trabajo es de 0,2  $\mu\text{mol}$ , el rendimiento teórico sería 8,7 OD<sub>260</sub>. Por tanto, se ha obtenido el producto **15** con un 41% de rendimiento.

**Caracterización:**

$\begin{array}{c} \text{Alloc} \\   \\ 5'\text{T}(\text{mUgT})\text{TC} \\ \mathbf{15} \end{array}$	<p><u>HPLC (A: AcONH<sub>4</sub> 0,01 M, B: H<sub>2</sub>O/ACN 1:1, 5-30% de B en 30 minutos):</u>  <math>t_R=23,1 \text{ min.}</math></p> <p><u>EM (MALDI-TOF, modo negativo, THAP), m/z: [M+H]<sup>-</sup>=1472,2 (M=1474,3 uma)</u></p>
---	--

**9. Ensayos de eliminación del grupo del grupo Alloc en fase sólida**

**9.1 Tratamiento con Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, PPh<sub>3</sub>, HCOOH y butilamina (ensayo 1)**

Se lava la resina con THF anhidro durante 30 segundos(X3) y se seca. Se transfiere a un vial y se añaden 100  $\mu\text{L}$  de una solución de HCOOH/BuNH<sub>2</sub> 0,26M y PPh<sub>3</sub> 0,04M en THF. Se deja en contacto con la resina durante 5 minutos y se añaden 100  $\mu\text{L}$  de una solución de Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> 0,004M en THF. Se purga con Ar y se deja reaccionar durante 1 hora a 55°C. Pasado este tiempo se transfiere la mezcla a una jeringa provista de fritado y se lava la resina con THF durante 30 segundos (X3) y se deja secar. A continuación, se trata durante 15 minutos con una disolución de dietilditiocarbamato de sodio 0,1 M en agua. Pasado este tiempo se lava con agua (X2) y se vuelve a repetir la operación. A continuación se lava con agua (X2), THF (X3) y con diclorometano pasado por Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (X3).

Después del tratamiento para eliminar el grupo Alloc, se desancla el producto de la resina y se elimina el grupo protector de la citosina y de los grupos fosfato en una sola etapa por tratamiento con una solución acuosa de NH<sub>3</sub> a 55°C durante 6 horas. Pasado este tiempo, el amoniaco se elimina en el rotavapor y la solución resultante se liofiliza. El crudo obtenido se purifica por HPLC semipreparativa (A: AcONH<sub>4</sub> 0,01 M y B: H<sub>2</sub>O/ACN 1:1, 5-30% de B en 30 minutos). En todos los ensayos realizados (véase también apartado 9.2) se aíslan dos productos, **16** (producto de alilación del grupo guanidino) y **17** (producto de desprotección). Para determinar el rendimiento obtenido en cada caso (**Tabla 2**) se ha seguido el procedimiento descrito en el apartado C.4 de Materiales y Métodos.

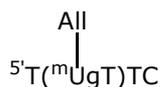
## 9.2 Tratamiento con Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> y PhSiH<sub>3</sub> o Me<sub>2</sub>NH.BH<sub>3</sub> (ensayos 2 y 3)

Se lava la resina con diclorometano anhidro durante 30 segundos (X3). A continuación, se seca la resina, se purga con Ar y se añaden 200 µL de una solución 0,1 M de PhSiH<sub>3</sub> o Me<sub>2</sub>NH.BH<sub>3</sub> en diclorometano. Se mantiene durante 5 minutos con atmósfera de Ar. Pasado este tiempo se añaden 200 µL de una solución 0,01 M de Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> en diclorometano y se purga con Ar. Se deja reaccionar durante 10 minutos. A continuación se lava la resina con diclorometano durante 30 segundos (X3) y se vuelve a repetir la operación. A continuación, se sigue el mismo procedimiento que en el ensayo 1

**Tabla 2. Rendimientos de obtención del producto 16**

Ensayo	Resina	OD <sub>260</sub> (17)	OD <sub>260</sub> (16)	Rdto. 17
1	PENT(4)	3,5	1,8	40%
2	PENT(2)	2,9	1,7	33%
3	PENT(3)	2,8	2,2	32%

### Caracterización:



**16**

uma)

HPLC (A: AcONH<sub>4</sub> 0,01 M, B: H<sub>2</sub>O/ACN 1:1, 5-30% de B en 30 minutos):  
t<sub>R</sub>=19,0 min.

EM (MALDI-TOF, modo negativo, THAP), m/z: [M+H]<sup>-</sup>=1432,4 (M=1428,4



**17**

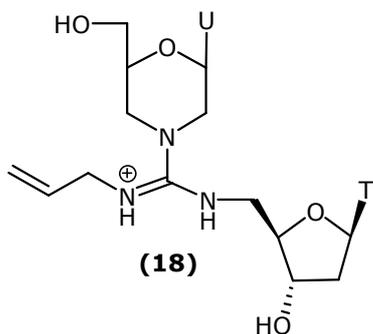
uma)

HPLC (A: AcONH<sub>4</sub> 0,01 M, B: H<sub>2</sub>O/ACN 1:1, 5-30% de B en 30 minutos):  
t<sub>R</sub>=20,2 min.

EM (MALDI-TOF, modo negativo, THAP), m/z: [M+H]<sup>-</sup>=1389,5 (M=1388,3

## 10. Análisis de nucleósidos de los productos 16 y 17

La determinación de los nucleósidos que forman los oligómeros **16** y **17** se realiza según se indica en el apartado C.5 de la sección de Materiales y Métodos. La digestión enzimática del producto **16** da como resultado tres productos, dC, dT y el dinucleósido de morfolinouridina y timidina con el grupo guanidino alilado **18**. La digestión enzimática de **17** da como resultado tres productos: dC, dT y el dinucleósido de morfolinouridina y timidina **19**.



### Caracterización:

HPLC (A: AcONH<sub>4</sub> 0,01 M, B: H<sub>2</sub>O/ACN 1:1, 10% de B 5 min., 10-25% de B en 15 min., 25-100% de B en 5 min.):  
t<sub>R</sub>=15,7 min.







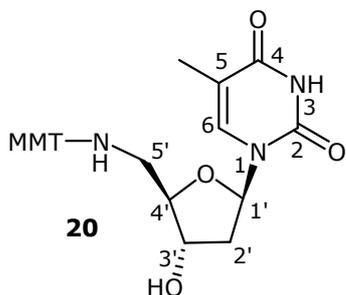


## **1. Síntesis de la aminonucleosidilresina 23**

### **1.1 Síntesis de 5'-N-(4-monometoxitritil)amino-2',5'-didesoxitimidina (20)**

Se pesan 4,7 mmol de 5'-amino-2',5'-didesoxitimidina (**4**) y 7,05 mmol de cloruro de 4-monometoxitritilo. El nucleósido se coevapora con acetonitrilo (x2) y ambos reactivos se guardan en un desecador durante aproximadamente 1 hora. Se disuelve el nucleósido en 40 mL de piridina anhidra, se añaden 7,05 mmol de TEA anhidra (sobre CaH<sub>2</sub>) y se purga con argón. A continuación se añade el cloruro de 4-monometoxitritilo sobre la solución y se vuelve a purgar con argón. La reacción se deja evolucionar a T ambiente durante 1 noche bajo atmósfera de Ar. Pasado este tiempo se añaden 5 mL de MeOH para finalizar la reacción y el disolvente se elimina en el rotavapor. El sólido obtenido se coevapora con 15 mL de ACN (x2) para acabar de eliminar la piridina. El crudo se disuelve en 100 mL de diclorometano y se transfiere a un embudo de decantación. La fase orgánica se lava con 50 mL de una solución de ácido cítrico al 10%. La fase orgánica resultante se lava con 50 mL de una solución de NaHCO<sub>3</sub> al 10% (x2), y con 50 mL de una solución saturada de NaCl. Finalmente, la fase orgánica se seca con MgSO<sub>4</sub> y se elimina el disolvente en el rotavapor. Se aísla el producto **20** mediante cromatografía en columna, (DCM/MeOH 0-5%, y 1% de TEA), obteniendo un sólido blanco con un 60% de rendimiento.

#### **Caracterización:**



<sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz): δ(ppm) J(Hz) 7,47-7,22 (13H, m, arom. MMT y H<sub>6</sub>), 6,82 (2H, d, J=8,7, arom. MMT), 6,26 (1H, t, J=6,5, H<sub>1'</sub>), 4,33-4,31 (1H, m, H<sub>3'</sub>), 4,04-3,99 (1H, m, H<sub>4'</sub>), 3,78 (3H, s, O-CH<sub>3</sub> MMT), 2,42-2,29 (2H, m, H<sub>5A'</sub> y H<sub>5B'</sub>), 2,14-1,98 (2H, m, H<sub>2A'</sub> y H<sub>2B'</sub>), 1,83 (3H, s, CH<sub>3</sub>-C<sub>5</sub>)

EM (ES, modo positivo), m/z: [M+H]<sup>+</sup>=513,8 (M=513,2 uma)

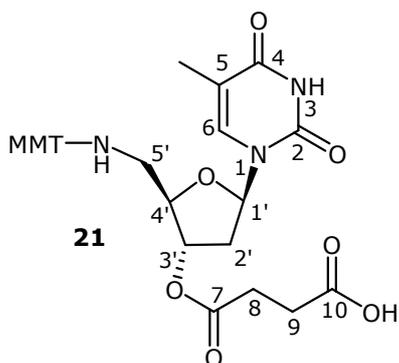
HPLC, (A: AcONH<sub>4</sub> 0,05 M, B: ACN, 5-100% de B en 30 minutos): t<sub>R</sub>: 20,5 min.

R<sub>f</sub> (DCM/MeOH/TEA 10:1:0,1): 0,4

### **1.2 Síntesis de 3'-O-succinil-5'-N-(4-monometoxitritil)amino-2',5'-didesoxitimidina (21)**

Se pesan 1,0 mmol del nucleósido **20** y se coevapora con ACN anhidro dos veces para acabar de eliminar los restos de humedad. A continuación se disuelve **20** en 10 mL de piridina anhidra y se añaden 2,5 mmol de anhídrido succínico y 0,6 mmol de DMAP. Se purga con argón y se deja reaccionar a T ambiente y atmósfera de argón durante 12 horas. Se va siguiendo la evolución de la reacción por CCF. Si aún queda producto de partida se añaden 0,5 mmol de anhídrido succínico y 0,5 mmol de DMAP y se deja reaccionar hasta que se haya consumido todo el producto de partida. Una vez completado el proceso se elimina el disolvente en el rotavapor y el sólido resultante se coevapora con 10 mL de ACN (x2) para

acabar de eliminar la piridina. El crudo se disuelve en 100 mL diclorometano y se transfiere a un embudo de decantación. La fase orgánica se lava con 50 mL de una solución de ácido cítrico al 10% (x3) y con 50 mL de una solución saturada de NaCl. Finalmente, la fase orgánica se seca con MgSO<sub>4</sub> y se elimina el disolvente en el rotavapor obteniéndose un sólido blanco. El producto **21** se aísla con un grado de pureza aceptable y con un 71% de rendimiento, sin que sea necesaria una purificación cromatográfica.

**Caracterización:**

<sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz): δ(ppm) J(Hz) 7,47-7,24 (13H, arom. MMT y H<sub>6</sub>), 6,82 (2H, d, J=8,8, arom. MMT), 6,28 (1H, t, J=6,4, H<sub>1'</sub>), 5,21-5,16 (1H, m, H<sub>3'</sub>), 4,20-4,13 (1H, m, H<sub>4'</sub>), 3,78 (3H, s, O-CH<sub>3</sub> MMT), 2,75-2,54 (4H, m, H<sub>8</sub> y H<sub>9</sub>), 2,42-2,30 (2H, m, H<sub>5A'</sub> y H<sub>5B'</sub>), 2,20-2,04 (2H, m, H<sub>2A'</sub> y H<sub>2B'</sub>), 1,82 (3H, s, CH<sub>3</sub>-C<sub>5</sub>)

EM (ES, modo negativo), m/z: [M+H]<sup>-</sup>=612,7 (M=613,2 uma)

R<sub>f</sub> (diclorometano/MeOH/TEA 10:1:0,1): 0,3

**1.3 Síntesis de Fmoc-Sarcosinil-LCAA-CPG (22)**

El soporte polimérico utilizado para la síntesis en fase sólida han sido bolas de vidrio de poro controlado funcionalizadas con brazos aminoalquilo de cadena larga (LCAA-CPG, 500 Å, 80-120 mm, *Sigma*). Su funcionalización aproximada es 40-50 μmol de NH<sub>2</sub>/g resina. Antes de su utilización es conveniente lavar bien el soporte. Partiendo de 1 g de resina, depositada en una jeringa provista de un filtro de propileno, se sigue el protocolo de lavados que se resume en la **Tabla 1**. Una vez acondicionado el soporte, éste se seca manteniéndolo al vacío durante una noche en un desecador con P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> y KOH.

**Tabla 1 Protocolo del tratamiento del soporte polimérico**

Etapa	Reactivos	Tiempo (min)
1	4xDCM	1
2	4xTHF	1
3	2x(HCl acuoso 0,01 M)	10
4	4xTHF	1
5	2xDMF	1
6	2x(piperidina(20%)/DMF)	1
7	2x(TCA(20%)/DCM)	10
8	2x(DIEA(5%)/DCM)	1
9	4xDCM	1
10	2xMeOH	1
11	2xACN	1

Para incorporar el residuo de Fmoc-Sar-OH al soporte sólido (LCAA-CPG), una vez acondicionada la resina, se añade DMF hasta que el disolvente empiece a cubrir el soporte. Se pesan en un eppendorf 50  $\mu\text{mol}$  (1 eq) de Fmoc-Sar-OH y 50  $\mu\text{mol}$  (1 eq) de DIP, se disuelven en 400  $\mu\text{L}$  de DMF y se depositan sobre la resina. La mezcla se agita durante 30 minutos a T ambiente. Pasado este tiempo se filtra y se lava la resina con DMF (x4), DCM (x4) y MeOH (x4). Una vez lavada se seca en un desecador. Para medir la eficacia del acoplamiento se cuantifica el producto de eliminación del grupo Fmoc (véase apartado C.1.1 de la sección de Materiales y Métodos). Como la funcionalización de la resina es aún muy baja (8  $\mu\text{mol/g}$ ), se repite dos veces la operación de acoplamiento, añadiendo en cada una de ellas 150  $\mu\text{mol}$  (3 eq) de Fmoc-Sar-OH y 500  $\mu\text{mol}$  (10 eq) de DIP. De esta manera, se obtiene una resina con una funcionalización de 42  $\mu\text{mol/g}$ .

A continuación, se acetilan los grupos amino de LCAA-CPG que no han reaccionado. Se añaden 25 equivalentes de  $\text{Ac}_2\text{O}$  (solución de  $\text{Ac}_2\text{O}/\text{DMF}$  1:1), y si es necesario, se añade DMF hasta que empiece a cubrir la resina y se deja la mezcla agitando durante 30 minutos. Pasado este tiempo se filtra y se lava la resina con DMF (x4), DCM (x4) y ACN (x4). Se seca a vacío y se realiza el ensayo de ninhidrina para comprobar que no quedan grupos aminos libres. Si la prueba da positiva (coloración azul), hay que volver a acetilar.

#### **1.4 Síntesis de 5'-N-(4-monometoxitritil)amino-2',5'-didesoxitimidinil-3'-succinilsarcosinil-LCAA-CPG (23)**

Para incorporar el residuo de 5'-N-(4-monometoxitritil)amino-3'-O-succinil-2',5'-didesoxitimidina sobre la resina **22** se han llevado a cabo las siguientes etapas:

##### **1.4.1 Eliminación del grupo Fmoc**

Partiendo de 1 g de resina **22** depositada en una jeringa provista de un filtro de propileno se trata con una solución de piperidina en DMF al 20% durante 5 minutos. Pasado este tiempo se filtra y se lava con DMF (x4). Se vuelve a repetir el tratamiento con la disolución de piperidina y el lavado con DMF. Finalmente se lava la resina con diclorometano pasado por  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (x4) y se seca primero en una trompa de vacío y después en un desecador.

##### **1.4.2 Anclaje del 3'-O-succinilnucleósido 21**

Se pesan 63  $\mu\text{mol}$  (1,5 eq) de **21** en un eppendorf y se guardan en un desecador durante 1 hora. Pasado este tiempo se añade DMF hasta que el disolvente empiece a cubrir la resina. El 3'-O-succinilnucleósido se disuelve en 300  $\mu\text{L}$  de DMF y se deposita sobre la resina. A continuación se disuelven 63  $\mu\text{mol}$  de HOBt en 100  $\mu\text{L}$  de DMF y 336  $\mu\text{mol}$  de DIP en 100  $\mu\text{L}$  de DMF y se añaden a la resina. La mezcla se agita a T ambiente durante 2 horas. Pasado este tiempo se filtra y se lava la resina con DMF (x4), DCM (x4) y MeOH (x4). Una vez lavada, se seca en un desecador a vacío de bomba. Para determinar la eficacia del acoplamiento se cuantifica el producto de eliminación del grupo MMT (véase apartado C.1.2

de la sección de Materiales y Métodos). Si es necesario, se repite el acoplamiento de nucleósido hasta obtener una resina con una funcionalización entre 30-40  $\mu\text{mol/g}$ .

Los grupos amino libres sobre la resina se acetilan añadiendo DMF hasta que el disolvente empiece a cubrir la resina y después 25 equivalentes de  $\text{Ac}_2\text{O}$  y 25 equivalentes de DIEA disueltos en la mínima cantidad de DMF. La mezcla se deja agitando durante 30 minutos. Pasado este tiempo se filtra y se lava la resina con DMF (x4), DCM (x4) y ACN (x4). Se seca a vacío y se realiza el ensayo de ninhidrina para comprobar que no quedan grupos aminos libres. Si la prueba da positiva (coloración azul), hay que volver a acetilar. La resina obtenida presenta una funcionalización de 34  $\mu\text{mol/g}$ .

### **1.4.3 Desanclaje de 5'-amino-2',5'-didesoximidina de la resina 23.**

Para comprobar que el 5'-aminonucleósido se ha anclado correctamente al soporte de síntesis se pesa una alícuota de 10 mg y se elimina el grupo MMT con tal y como se ha descrito en el anterior apartado. A continuación, se trata la resina con una solución acuosa de  $\text{NH}_3$  al 32% durante 30 minutos (x2). El amoníaco se elimina en el rotavapor y la solución resultante se liofiliza. El residuo se redissuelve en 50  $\mu\text{L}$  de agua calidad Milli-Q y se purifica por HPLC. Las fracciones recogidas se liofilizan y se analizan por EM.

HPLC, (A:  $\text{AcONH}_4$  0,01 M, B:  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$  1:1, 0-25% de B en 30 minutos):  $t_R$ : 9,6 min.

HPLC, (A:  $\text{AcONH}_4$  0,01 M, B: ACN, 5-100% de B en 30 minutos):  $t_R$ : 3,5 min.

EM (MALDI-TOF, modo positivo, ACH), m/z:  $[\text{M}+\text{H}]^+=241,4$  ( $\text{M}=241,2$  uma)

## **2. Síntesis de DMT-<sup>m</sup>Ug<sub>(Alloc)</sub>-T-succinilsarcosinil-LCAA-CPG . Ensayos de acoplamiento**

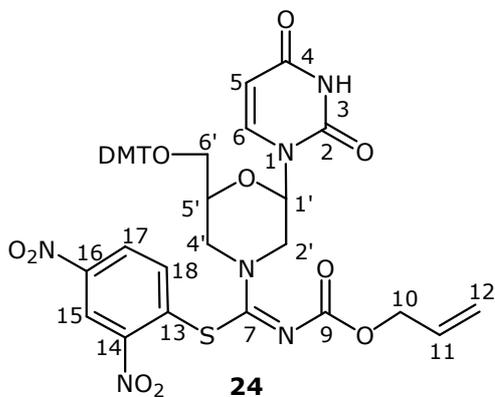
### **2.1 Método A (empleando el reactivo de Sanger)**

#### **2.1.1 Síntesis del derivado isotiurea 24**

Se disuelven 0,50 mmol de tiourea **11** y 0,75 mmol de DBU en 10 mL de THF destilado y anhidro. Se purga con argón y se deja reaccionar durante 5 minutos. A continuación se añaden 0,75 mmol de reactivo de Sanger y se deja reaccionar a T ambiente y bajo atmósfera de argón. Pasados 15 minutos el análisis por CCF indica que apenas queda tiourea de partida. El disolvente se elimina en el rotavapor y el residuo resultante se disuelve en 100 mL de diclorometano neutralizado on  $\text{Al}_2\text{O}_3$  básica. La fase orgánica se lava con 50 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  (x2) y después con 50 mL de una solución saturada de NaCl. La fase orgánica resultante se seca con  $\text{MgSO}_4$  anhidro y se elimina el disolvente en el rotavapor. El residuo se disuelve en 3 mL de diclorometano pasado por  $\text{Al}_2\text{O}_3$  y se precipita gota a gota sobre 40 mL de hexano/éter 1:1. El sólido obtenido se va lavando con hexano/éter 1:1 hasta que no quede reactivo de Sanger según el análisis por CCF. Finalmente, se seca en un desecador.

Dada la poca estabilidad del producto, no se lleva a cabo una posterior purificación. Se aísla un sólido amarillo con un 85% de rendimiento.

### Caracterización:



$^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$ (ppm) J(Hz) 8,79 (1H, d,  $J=2,6$ ,  $H_{15}$ ), 8,20 (1H, dd,  $J=8,6$ ; 2,6,  $H_{17}$ ), 7,75 (1H, d,  $J=8,6$ ,  $H_{18}$ ), 7,42 (1H, d,  $J=7,3$ ,  $H_6$ ), 7,33-7,21 (9H, m, arom. DMT), 6,84 (4H,d,  $J=8,7$ , arom. DMT), 5,97-5,83 (2H, m,  $H_1$  y  $H_{11}$ ), 5,78 (1H, d,  $J=7,3$ ,  $H_5$ ), 5,31 (1H, dd,  $J=16,0$  Hz y  $J=1,1$  Hz,  $H_{12\text{TRANS}}$ ), 5,24 (1H, dd,  $J=8,7$  Hz,  $J=1,1$  Hz,  $H_{12\text{CIS}}$ ), 4,64-4,56 (2H, m,  $H_{10}$ ), 4,07-3,99 (1H, m,  $H_{5'}$ ), 3,79 (6H, s, O-CH<sub>3</sub> DMT),

3,28-3,05 (6H,  $H_{2A'}$ ,  $H_{2B'}$ ,  $H_{4A'}$ ,  $H_{4B'}$ ,  $H_{6A'}$  y  $H_{6B'}$ )

EM (MALDI-TOF, modo negativo, nitroantraceno), m/z:  $[\text{M}-\text{H}]^- = 835,8$ , ( $\text{M} = 838,2$  uma)

R<sub>f</sub> (diclorometano/MeOH/TEA 10:0,2:0,1): 0,3

### 2.1.2. Ensayos de acoplamiento del derivado isotiourea 24 sobre resina

Se han llevado a cabo diferentes ensayos, variando en cada uno de ellos la concentración de la solución del derivado isotiourea, el tiempo de reacción y el número de acoplamientos realizados (véase capítulo 2, **Tabla 2.2**). En una jeringa provista de un filtro de propileno se depositan 29 mg (1  $\mu\text{mol}$ ) de resina **23**. Sobre esta resina se llevan a cabo las siguientes etapas:

#### 2.1.2.1 Eliminación del grupo MMT

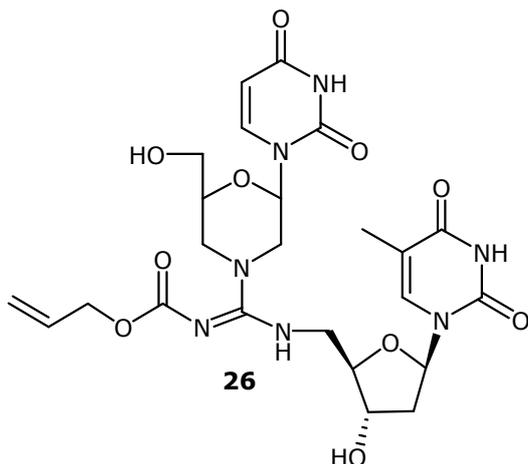
Se elimina el grupo MMT sobre resina, añadiendo a la resina 1 mL de una solución de TCA en DCM al 3% durante 3 minutos (x3). A continuación se lava la resina con de DMF (x4) y se neutraliza la resina con una solución de TEA en DCM al 10%. Finalmente se lava la resina con DCM (x4) y se seca en un desecador.

#### 2.1.2.2 Acoplamiento de la isotiourea 24

Para llevar a cabo los acoplamientos, se preparan disoluciones 0,01 M de isotiourea **24** y 0,01 M de TEA (condiciones A1), y 0,05 M de isotiourea **24** y 0,05 M de TEA en THF destilado y anhidro (condiciones A2). Se aplican sobre la resina 300  $\mu\text{L}$  de la solución de isotiourea, se purga con Ar y se deja la mezcla agitando a T ambiente. En los casos en los que se ha realiza más de un acoplamiento se lava la resina con DMF (x4) y DCM (x4) antes de realizar un nuevo acoplamiento. Una vez se ha dado por concluido el ensayo se lava la resina de la misma manera y se realiza la cuantificación de la funcionalización según se indica en el apartado C.1.3 de la sección de Materiales y Métodos.

**2.1.2.3 Desanclaje de resina del dinucleósido 26**

Después de eliminar el grupo DMT tal y como se ha descrito en el apartado anterior, se toma una alícuota de 5 mg y se trata con una solución acuosa de  $\text{NH}_3$  al 32% durante 30 minutos (x2) a T ambiente. El amoniaco se elimina en el rotavapor y la solución resultante se liofiliza. El residuo se redisuelve en 50  $\mu\text{L}$  de agua calidad Milli-Q y se purifica por HPLC. Las fracciones recogidas se liofilizan y se analizan por EM.

**Caracterización:**

HPLC, (A:  $\text{AcONH}_4$  0,01 M, B: ACN, 5-100% de B en 30 minutos):  $t_R$ : 7,9 min.

EM (MALDI-TOF, modo positivo, ACH), m/z:  $[M+H]^+ = 578,0$  (PM=577,54 uma)

**2.2 Método B (activación de la tiourea 11 *in situ*)****2.2.1 Utilizando EDCI como agente activante**

En una jeringa provista de un filtro de propileno se depositan 29 mg (1  $\mu\text{mol}$ ) de resina **23**. En primer lugar se elimina el grupo MMT siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 2.1.2.1.

Para llevar a cabo el acoplamiento, se preparan disoluciones 0,02 M de tiourea **11** y 0,027 M de TEA en DCM anhidro y se aplican 150  $\mu\text{L}$  sobre la resina. A continuación se prepara una solución 0,04 M de EDCI en el mismo disolvente, se aplican 150  $\mu\text{L}$  sobre la resina y se deja reaccionar a T ambiente y con agitación durante 1 hora. Finalmente se lava el soporte con DMF (x4) y DCM (x4). Una vez se ha secado la resina se determina la funcionalización según se indica en el apartado C.1.3 de la sección de Materiales y Métodos.

**2.2.2 Utilizando el reactivo de Mukaiyama como agente activante**

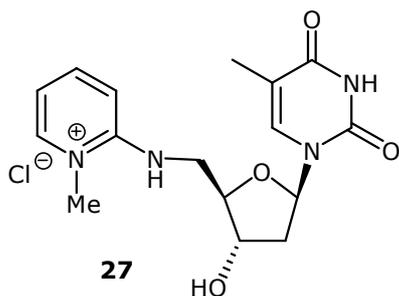
Se han hecho diferentes ensayos, variando en cada uno de ellos la concentración de los reactivos, el tiempo de reacción y el número de acoplamientos realizados, (capítulo 2, **Tabla 2.3**). En una jeringa provista de un filtro de propileno se depositan 29 mg (1  $\mu\text{mol}$ ) de

resina **23**. En primer lugar se elimina el grupo MMT siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 2.1.2.1.

Para llevar a cabo los acoplamientos, se preparan disoluciones 0,02 M, 0,1 M o 0,16 M de tiourea **11** y 0,027 M, 0,13 M o 0,22 M de TEA en DCM anhidro. En cada uno de los ensayos, se aplican 150  $\mu$ L sobre la resina y se deja a T ambiente y con agitación durante 15 minutos. Pasado este tiempo se aplican 150  $\mu$ L de una solución 0,02M, 0,1M o 0,16 M del reactivo de Mukaiyama en el mismo disolvente. A continuación se deja reaccionar a T ambiente y con agitación. En los casos en los que se ha realizado más de un acoplamiento se lava la resina con DMF (x4) y DCM (x4) antes de realizar un nuevo acoplamiento. Una vez se ha dado por concluido el ensayo se lava la resina de la misma manera y se determina la funcionalización según se indica en el apartado C.1.3 de la sección de Materiales y Métodos.

Después de eliminar el grupo DMT tal y como se ha descrito en el apartado 2.1.2.2, para analizar los crudos de reacción resultantes se tratan 5 mg de resina según se ha descrito en el apartado 2.1.2.3. El análisis por HPLC muestra como producto mayoritario el dinucleósido **26** acompañado de **27** como subproducto de reacción.

#### Caracterización:



HPLC, (A: AcONH<sub>4</sub> 0,01 M, B: ACN, 5-100% de B en 30 minutos): t<sub>R</sub>: 5,6 min.

EM (MALDI-TOF, modo positivo, ACH), m/z:  
[M+H]<sup>+</sup>=333,8 (M=333,16 uma)

### 3. Ensayos de eliminación del grupo Alloc en fase sólida: Síntesis del derivado guanidino 19

En un reactor de polipropileno para síntesis de oligonucleótidos se deposita entre dos filtros de teflón la cantidad necesaria de (<sup>m</sup>Ug<sub>(Alloc)</sub>T)-succinilsarcosinil-LCAA-CPG para trabajar a escala 0,1  $\mu$ mol. Una vez introducida, se cierra con tapas de plástico y se sella con anillas de aluminio. Para llevar a cabo los ensayos de desprotección, se acoplaron dos jeringas con émbolo de polipropileno (*Aldrich*) a modo de tapones. Los reactivos se añadieron mediante una de las jeringas. El movimiento simultáneo de los dos émbolos permitía agitar el contenido del reactor.

Se han efectuado diferentes ensayos de desprotección variando en cada uno de ellos el tipo de capturador del complejo  $\pi$ -alilo, el tiempo de reacción y el número de tratamientos (véase **Tabla 2.4**, capítulo 2). En estos ensayos, se añade 250  $\mu$ L de una solución 1,2 M de capturador en THF destilado y anhidro sobre (<sup>m</sup>Ug<sub>(Alloc)</sub>T)-succinilsarcosinil-LCAA-CPG y se

deja reaccionar durante 5 minutos a T ambiente y bajo atmósfera de argón. En el caso en el que se utiliza como capturador HCOOH/BuNH<sub>2</sub>, la disolución contiene también PPh<sub>3</sub> 0,2 M. Pasado este tiempo se añaden 250 µL de una solución 0,02 M de Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> en THF y se deja reaccionar a T ambiente y con atmósfera de argón durante 10 minutos, 30 minutos o 1 hora según sea el caso. En los casos en los que se ha realiza más de un tratamiento se lava la resina con THF (x4), DMF (x4) y DCM (x4), y antes de realizar un nuevo tratamiento, se acaba de secar la resina en un desecador.

Una vez finalizado el ensayo de desprotección se lava la resina con THF (x4) y con acetona (x4). A continuación se aplica una solución de dietilditiocarbamato de sodio 0,1 M en agua durante 15 minutos. Pasado este tiempo se lava con acetona (x4) y con agua (x4) y se vuelve a repetir el lavado con la solución de dietilditiocarbamato de sodio. Finalmente se lava con acetona (x4), agua (x4), DMF (x4) y DCM (x4) y se seca la resina.

Se desancla el producto formado tratando la resina con una solución acuosa de NH<sub>3</sub> al 32% durante 30 minutos (x2) a T ambiente. El NH<sub>3</sub> se elimina en el rotavapor y la solución resultante se liofiliza. El residuo se redissuelve en 50 µL de agua calidad Milli-Q y se purifica por HPLC. Las fracciones recogidas se liofilizan y se analizan por EM.

#### **Caracterización:**

HPLC, (A: AcONH<sub>4</sub> 0,01 M, B: ACN, 5-100% de B en 30 minutos): t<sub>R</sub>: 5,4 min.

EM (MALDI-TOF, modo positivo, ACH), m/z: [M+H]<sup>+</sup>=494,5 (M=494,5 uma)

## **4. Síntesis de los oligonucleótidos 14E1 y 14E2**

### **4.1 Oligonucleótido modificado 14E1**

#### **4.1.1 Síntesis del oligonucleótido 14E1(Alloc)**

Para llevar a cabo la síntesis del oligonucleótido modificado que contiene una unidad morfolino-amidina en el extremo 3', se parte de la resina **23** descrita en el apartado 1.4 de esta sección experimental. En una jeringa provista de un filtro de polipropileno se depositan 118 mg (4 µmol) de resina **23**. Después de eliminar el grupo MMT tal y como se ha descrito en el apartado 2.1.2.1 se procede a la incorporación de la tiourea **11**. En primer lugar, se preparan una disolución 0,16 M de tiourea **11** y 0,22 M de TEA en DCM anhidro y se añaden 600 µL sobre la resina **23**. La mezcla así preparada se deja reaccionar a T ambiente y con agitación durante 15 minutos. A continuación, se añaden 600 µL de una disolución 0,16 M del reactivo de Mukaiyama en el mismo disolvente, y se deja reaccionar a T ambiente y con agitación durante 1 hora. Pasado este tiempo se filtra y se lava la resina con DMF (x4) y DCM (x4). Para cuantificar la incorporación, una vez se ha secado la resina se toma una alícuota de 10 mg y se sigue el procedimiento descrito en el apartado C.1.3 de la sección de Materiales y Métodos. El rendimiento de incorporación resulta ser del 74%, por lo que se ha

obtenido una resina con una funcionalización de 25  $\mu\text{mol/g}$ . Antes de realizar la elongación de la cadena se realiza la acetilación de la resina según el procedimiento descrito en el apartado 1.4.2.

Una vez incorporado el morfolinonucleósido por formación de un enlace guanidina, la síntesis del segmento fosfato del oligonucleótido se llevó a cabo en un sintetizador Applied Biosystems (modelo Expedite<sup>TM</sup>), empleando la metodología estándar que emplea nucleósidos fosforamidito implementada en el sintetizador, siendo en este caso la escala de trabajo 0,5  $\mu\text{mol}$ . La preparación de la síntesis y de los correspondientes reactivos se ha llevado a cabo según se indica en el apartado C.2 de la sección de Materiales y Métodos. Todas las síntesis se han realizado manteniendo el protector DMT en el extremo 5' del oligonucleótido para facilitar la purificación. El rendimiento de la síntesis automática para cada oligonucleótido se ha determinado según se indica en el apartado C.3 de la sección de Materiales y Métodos. El rendimiento de síntesis obtenido al elongar la cadena oscilaba entre el 75% y el 82% y el rendimiento medio por acoplamiento de los derivados fosforamidito se situaba entre el 97,5% y el 98,5%.

#### **4.1.2 Desprotección y desanclaje**

Para eliminar el grupo Alloc que protege la guanidina, se preparan 250  $\mu\text{L}$  de una solución 1,2 M de malonato de dimetilo en THF anhidro y se añaden a la resina, bajo atmósfera de argón. Al cabo de cinco minutos se añaden 250  $\mu\text{L}$  de una solución 0,02 M de  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  en THF y se deja reaccionar a T ambiente bajo atmósfera de argón durante 30 minutos o 1 hora según sea el caso (véase la **Tabla 2.6** del capítulo 2). En los casos en los que se ha realiza más de un tratamiento se lava la resina con THF (x4), DMF (x4) y DCM (x4). Antes de realizar un nuevo tratamiento se acaba de secar la resina en un desecador. Completado el tratamiento de eliminación del grupo Alloc, se lava la resina según se indica en el apartado 3.

El desanclaje de resina y la eliminación de los grupos protectores de las nucleobases y de los grupos fosfato se realiza mediante un único tratamiento. Para ello, se transfiere la resina a un vial y se trata con una solución acuosa de  $\text{NH}_3$  a 55°C durante 6 horas. Pasado este tiempo se elimina la resina por filtración y la solución se transfiere a un balón. A continuación se diluye con 5-10 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  y se elimina el  $\text{NH}_3$  en el rotavapor. La solución resultante se liofiliza.

#### **4.1.3 Purificación y caracterización del oligonucleótido 14E1**

Se ha purificado el oligonucleótido 14E1 protegido con el grupo DMT en el hidroxilo 5' por HPLC semipreparativo (véase apartado B.3 de la sección de Materiales y Métodos). Los eluyentes utilizados han sido A:  $\text{AcONH}_4$  0,05 M y B:  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$  1:1, y el gradiente empleado 20-60% de B en 30 minutos. El oligonucleótido DMT-ON eluye en estas condiciones con

$t_R=22,2$  minutos. La fracción resultante de la purificación se liofiliza. Para eliminar el grupo DMT se trata el producto con 3 mL de una solución al 80% de ácido acético a 0°C durante 15 minutos. Pasado este tiempo se liofiliza de nuevo para eliminar el ácido acético. A continuación se redissuelve en agua y se lava con éter con el fin de eliminar los restos de tritilos.

El oligonucleótido purificado fue reanalizado por HPLC en fase reversa. El análisis por HPLC de la fracción purificada indica que el oligonucleótido no está suficientemente puro, ya que se detectan tres productos. El crudo así obtenido se vuelve a purificar por HPLC semipreparativo empleando los mismos eluyentes ya mencionados, siendo el gradiente utilizado en este caso de 10-30% de B en 30 minutos. Las fracciones así separadas se liofilizan y se analizan por espectrometría de masas (MALDI-TOF, modo negativo, THAP+CA). La fracción de  $t_R=11,1$  minutos corresponde probablemente a una mezcla de oligómeros de deleción, la fracción de  $t_R=14,0$  minutos corresponde al oligonucleótido 14E1 y la fracción de  $t_R=16,9$  minutos pertenece al oligonucleótido aún protegido con el grupo aliloxicarbonilo (14E1(Alloc)).

Para poder determinar el rendimiento final se ha liofilizado la disolución que contiene el oligonucleótido y se ha realizado la cuantificación mediante la absorción en UV-vis como se indica en el apartado C.4 de la sección de materiales y métodos. Preparado en diversas ocasiones, se obtuvieron entre 2,7 y 7,0 OD<sub>260</sub> del oligonucleótido 14E1, lo que supone un rendimiento entre el 5% y el 13%, respectivamente (véase **Tabla 2.7**, capítulo 2).

#### **Caracterización:**

14E1

HPLC (A: AcONH<sub>4</sub> 0,05 M, B: H<sub>2</sub>O/ACN) 10-30% de B en 30 minutos):  $t_R=17,8$  min.

EM (MALDI-TOF, modo negativo, THAP+CA):  $[M-H]^- = 4082,7$  (PM=4084,8 uma)

14E1 (Alloc)

HPLC (A: AcONH<sub>4</sub> 0,05 M, B: H<sub>2</sub>O/ACN) 10-30% de B en 30 minutos):  $t_R=19,6$  min.

EM (MALDI-TOF, modo negativo, THAP+CA):  $[M-H]^- = 4082,7$  (PM=4165,9 uma)

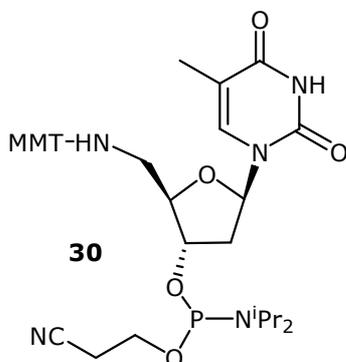
## **4.2 Oligonucleótido modificado 14E2**

### **4.2.1 Síntesis del derivado fosforamidito de 5'-N-(4-monometoxitritil)amino-2',5'-didesoxitimidina (30)**

Se pesan 0,39 mmol del nucleósido **20** y se disuelven en 10 mL de diclorometano anhidro bajo atmósfera de argón. A continuación, se añaden 0,98 mmol de DIEA anhidra, y 0,39 mmol de 2-cianoetoxi-cloro-*N,N*-diisopropilaminofosfina. La mezcla de reacción se purga con Ar y se deja reaccionar a T ambiente durante 2 horas. Pasado este tiempo si aún queda reactivo de partida se añaden 0,47 mmol de DIEA y 0,20 mmol más de agente

fosfitilante y se deja reaccionar en las mismas condiciones durante 1 hora más. Se repite la operación hasta conseguir la completa desaparición del producto de partida. Cuando no queda reactivo de partida, se consume el exceso de clorofosfina añadiendo 2 mL de MeOH. El disolvente se elimina en el rotavapor procurando que no quede muy concentrado en DIEA y se realizan 2-3 coevaporaciones con ACN para acabar de secar el producto. El crudo resultante se disuelve en 50 mL de diclorometano pasado por  $\text{Al}_2\text{O}_3$  y se lava la fase orgánica con 15 mL de una solución de  $\text{NaHCO}_3$  al 10%. Finalmente se lava con 30 mL de una solución saturada de NaCl y se seca la fase orgánica con  $\text{MgSO}_4$ . Como el revelado de la capa fina con una disolución de  $\text{AgNO}_3$  en etanol demuestra la presencia de subproductos de la fosfina, el crudo obtenido se purifica por cromatografía en columna (acetato de etilo + 5% de TEA). Para acabar de secar el producto así obtenido se disuelve en 5 mL de benceno anhidro (secado sobre Na) y se liofiliza. Se obtiene un sólido blanco con un rendimiento del 56%.

#### Caracterización:



$^{31}\text{P}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 81 MHz):  $\delta(\text{ppm})$  150,1 y 150,3 (mezcla de diastereómeros)

Rf (AcOEt/DCM/TEA 4,5:4,5:1): 0,55 y 0,6

#### 4.2.2 Síntesis del oligonucleótido 14E2(Alloc)

Como el oligonucleótido contiene la unidad de morfolino-amidina en una posición central de la secuencia, la síntesis consta de cuatro etapas: i) síntesis del segmento fosfato 3'; ii) incorporación de 5'-amino-2',5'-didesoxitimidina por medio del fosforamidito **30**; iii) incorporación de morfolinouridina por formación de guanidina; iv) elongación de la secuencia oligonucleotídica con el segmento fosfato 5'.

En primer lugar, la elongación del segmento fosfato 3' se lleva a cabo en el sintetizador automático (*Applied Biosystems Expedite*<sup>TM</sup>). Se parte de una nucleosidil-resina de origen comercial con una escala de trabajo de  $1\ \mu\text{mol}$  y una funcionalización aproximada de  $40\ \mu\text{mol/g}$ . La elongación de la cadena se ha llevado a cabo según la metodología estándar, como en el apartado 4.1.1. A su término, se lleva a cabo el acoplamiento del derivado fosforamidito **30** en las mismas condiciones que el resto de nucleósidos. Para este derivado el rendimiento de incorporación es del 91%.

Para acoplar la tiourea **11** se sigue el procedimiento descrito en el apartado 4.1.1. Nuevamente, se añaden los reactivos con jeringas de polipropileno. Para llevar a cabo el acoplamiento se emplean 150  $\mu\text{L}$  de una solución 0,16 M de tiourea **11** y 0,22 M de TEA y 150  $\mu\text{L}$  0,16 M del reactivo de Mukaiyama en DCM. Se obtuvo un rendimiento de incorporación del 78%.

Finalmente, se prolonga el segmento fosfato 5' siguiendo el procedimiento estándar de síntesis de oligonucleótidos. Al final de la síntesis, en la que se mantiene protegido el extremo 5' para facilitar la purificación, se determinó el rendimiento global de síntesis mediante la determinación de grupos DMT en fase sólida (véase apartado C.3 de la sección de Materiales y Métodos), resultando ser del 41%.

#### **4.2.3 Desprotección y desanclaje**

Para la eliminación del grupo Alloc se llevaron a cabo cuatro tratamientos según la metodología descrita en el apartado 4.1.2. Para desanclar el producto de la resina y eliminar los grupos protectores se ha seguido el habitual procedimiento con amoníaco a 55°C descrito en el apartado 4.1.2.

#### **4.2.4 Purificación, caracterización y cuantificación del oligonucleótido 14E2**

Se ha purificado el oligonucleótido 14E2 según el procedimiento descrito en el apartado 4.1.3. Los eluyentes utilizados han sido A:  $\text{AcONH}_4$  0,05 M y B:  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$  1:1, y el gradiente empleado 10-50% de B en 30 minutos. El oligonucleótido DMT-ON eluye en estas condiciones con  $t_R=26,3$  minutos. La fracción resultante de la purificación se liofiliza. Para eliminar el grupo DMT se sigue el procedimiento descrito en el apartado 4.1.3. Como el análisis por HPLC de la fracción así aislada indica que contiene dos productos, se repite la purificación por HPLC semipreparativo empleando los mismos eluyentes ya mencionados, siendo el gradiente en este caso 10-25% de B en 30 minutos. Las fracciones se liofilizan y se analizan por espectrometría de masas (MALDI-TOF, modo negativo, THAP+CA). La fracción de  $t_R=13,4$  minutos corresponde a una mezcla de oligómeros deleción y la fracción que eluye a  $t_R=15,0$  minutos corresponde al oligonucleótido 14E2. La cuantificación por UV indica que se han obtenido 10,1  $\text{OD}_{260}$ , lo que supone un rendimiento final del 9,5%.

Caracterización:

14E2

HPLC (A:  $\text{AcONH}_4$  0,05 M, B:  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ ) 10-30% de B en 30 minutos):  $t_R=17,1$  min.

EM (MALDI-TOF, modo negativo, THAP+CA):  $[\text{M-H}]^- = 4080,4$  (PM=4084,8 uma)





## **1. Síntesis de los oligonucleótidos 14C, 14D, 23A y 23B**

### **1.1 Oligonucleótidos no modificados 14C, 14D, 23A y 23B**

La obtención de los oligonucleótidos no modificados se ha llevado a cabo mediante un protocolo estandarizado tal y como se detalla a continuación:

#### **1.1.1 Síntesis de los oligonucleótidos**

La síntesis de los oligonucleótidos se ha llevado a cabo en dos sintetizadores *Applied Biosystems* (modelo PCR-MATE y Expedite™). El primer nucleósido se encuentra anclado a un soporte sólido (CPG), por el extremo 3' mediante un enlace succinilo. La escala de trabajo es 1  $\mu\text{mol}$  y la funcionalización inicial de nucleósido es aproximadamente 40  $\mu\text{mol/g}$ . En todos los casos se ha llevado a cabo mediante la metodología estándar que emplea nucleósidos fosforamidito implementada en cada sintetizador para esa escala de trabajo. La preparación de la síntesis y de los correspondientes reactivos se ha llevado a cabo según se indica en el apartado C.2 de la sección de Materiales y Métodos. Todas las síntesis se han realizado manteniendo el protector DMT en el extremo 5' del oligonucleótido para facilitar la purificación. El rendimiento de la síntesis automática para cada oligonucleótido se ha determinado según se indica en el apartado C.3 de la sección de Materiales y Métodos. En la **Tabla 3.4** (capítulo 3) se resumen los valores de los rendimientos medio por etapa y globales.

El desanclaje de resina y la eliminación de los grupos protectores de las nucleobases y de los grupos fosfato se realiza mediante un único tratamiento. Para ello, se transfiere la resina a un vial y se trata con una solución acuosa de  $\text{NH}_3$  a 55°C. Si la cadena sólo tiene pirimidinas se mantiene a esa temperatura durante 6 horas y si contiene purinas el tratamiento es de 12 horas. Pasado este tiempo se elimina la resina por filtración y la solución se transfiere a un balón. A continuación se diluye con 5-10 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  y se elimina el  $\text{NH}_3$  en el rotavapor. La solución resultante se liofiliza.

#### **1.1.2 Purificación y caracterización de los oligonucleótidos**

Los oligonucleótidos protegidos con el grupo DMT en el hidroxilo 5' se purifican por HPLC semipreparativo (véase apartado B.3 de la sección de Materiales y Métodos). Los eluyentes utilizados han sido A:  $\text{AcONH}_4$  0,05 M, B:  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$  1:1. Los gradientes utilizados en cada caso se especifican en la **Tabla 1**. Las fracciones purificadas se liofilizan.

Para eliminar el grupo DMT se trata el producto con 3 mL de una solución al 80% de ácido acético a 0°C durante 15 minutos. Pasado este tiempo se liofiliza de nuevo para eliminar el ácido acético. A continuación se redissuelve en agua y se lava con éter con el fin de eliminar los restos de tritilos.

**Tabla 1 Purificación y caracterización de los oligonucleótidos 14C, 14D, 23A y 23B**

ODN	HPLC semipreparativo	t <sub>R</sub> (min.)	HPLC analítico	t <sub>R</sub> (min.)	[M-H] <sup>-</sup> observada	PM (uma)
14C	10-50% B 30 min.	18,4	10-50% B 30 min	13,8	4131,1	4136,8
14D	10-40% B 30 min.	19,4	0-50% B 30 min	11,1	4382,6	4387,0
23A	10-60% B 30 min.	19,9	0-50% B 30 min	15,8	7085,2	7089,7
23B	10-60% B 30 min.	19,5	10-50% B 30 min	13,1	6991,9	6995,6

Todos los oligonucleótidos sintetizados y purificados fueron reanalizados por HPLC en fase reversa y caracterizados por espectrometría de masas (MALDI-TOF, THAP+CA, modo negativo). Los datos se resumen en la **Tabla 1**. El gradiente empleado en los análisis por HPLC se indica en la **Tabla 1**, empleándose AcONH<sub>4</sub> 0,05 M como eluyente A y H<sub>2</sub>O/ACN 1:1 como eluyente B en el análisis de 14C y 14D y AcOTEA 0,05 M como A y H<sub>2</sub>O/ACN 1:1 como B para analizar 23A y 23B.

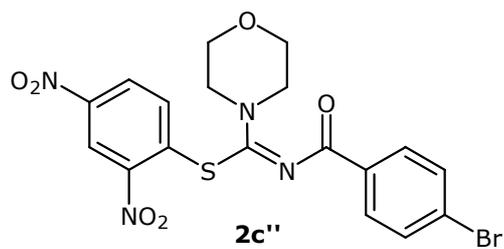
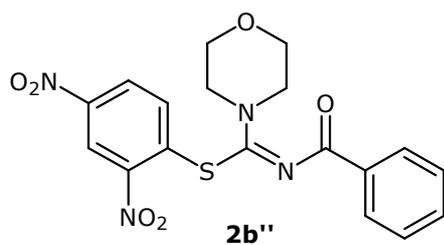
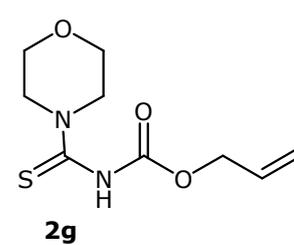
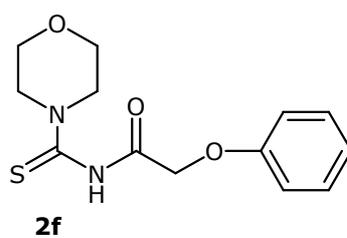
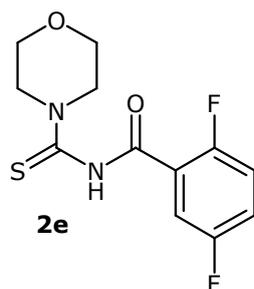
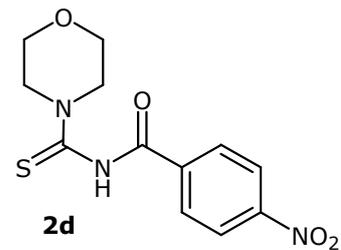
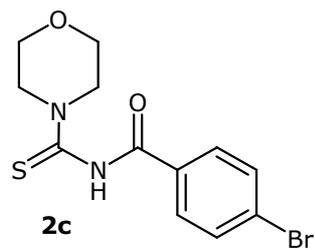
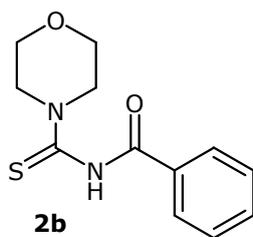
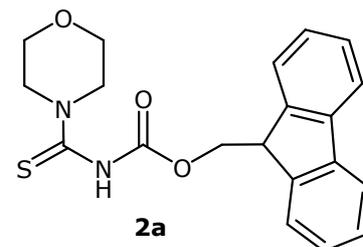
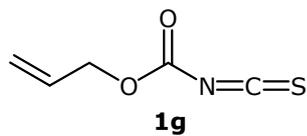
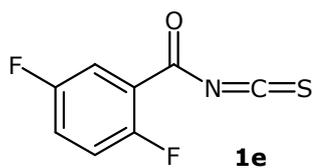
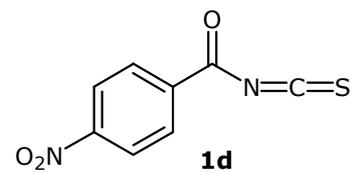
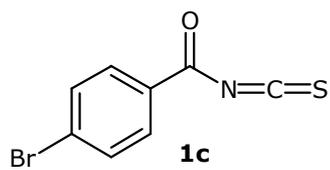
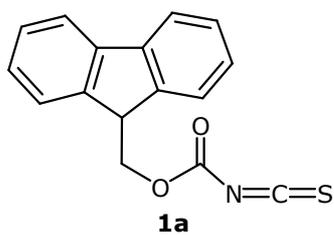
Para poder determinar el rendimiento final se ha liofilizado la disolución que contiene el oligonucleótido y se ha realizado la cuantificación mediante la absorción en UV-vis como se indica en el apartado C.4 de la sección de Materiales y Métodos. Los rendimientos finales oscilan entre el 31 y el 53% (véase **Tabla 3.5** capítulo 3).

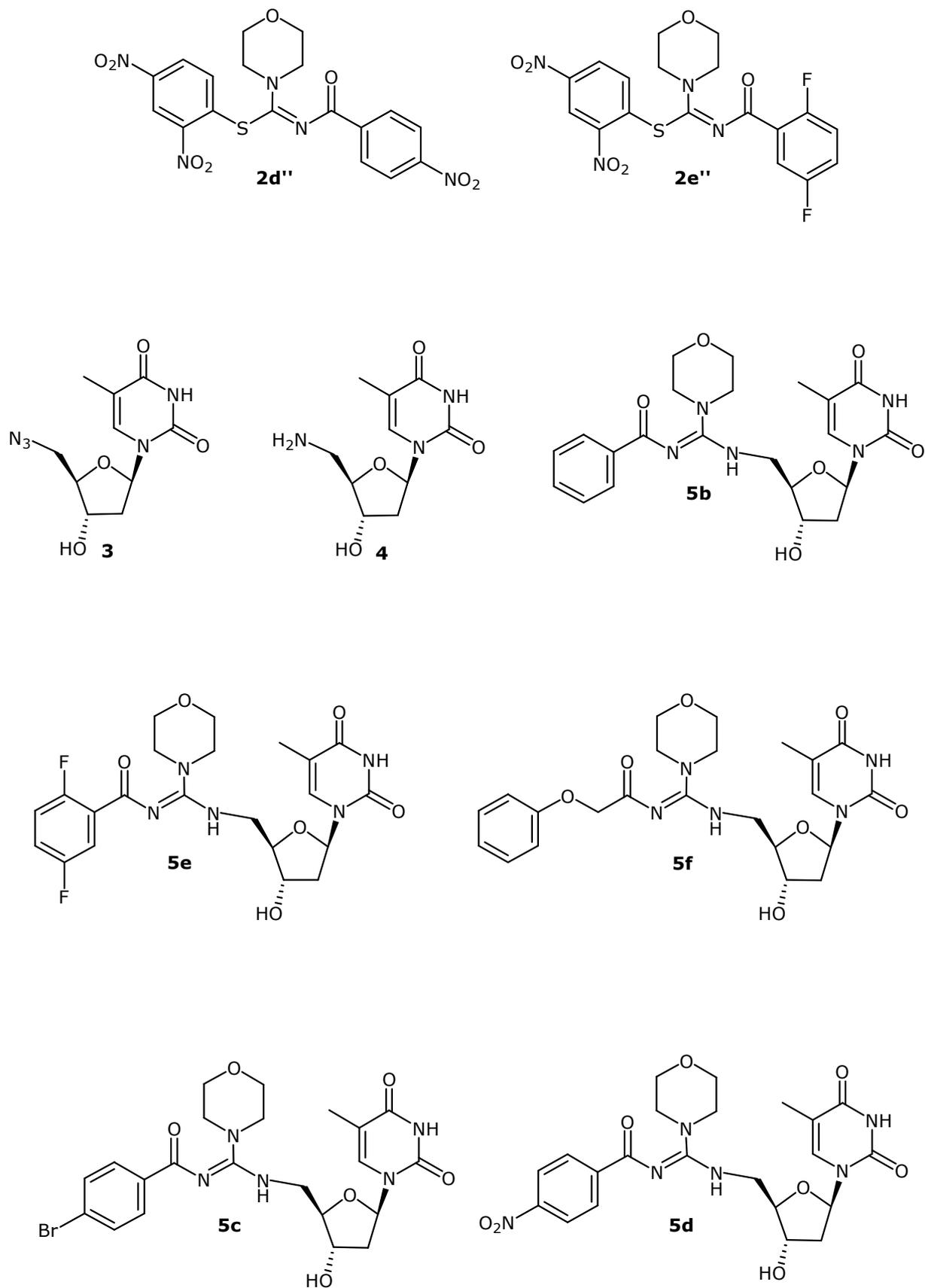
## **2. Experimentos de fusión**

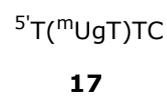
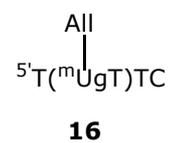
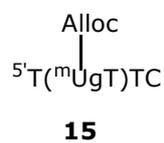
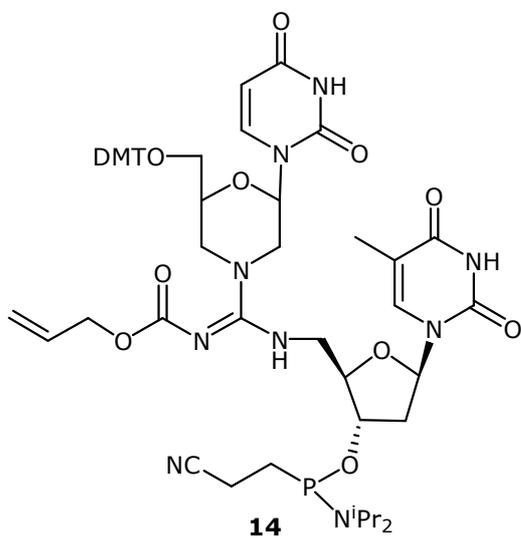
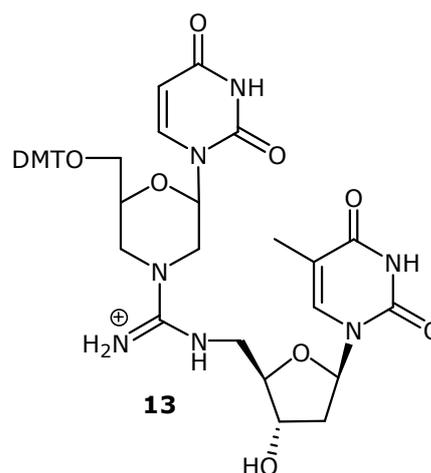
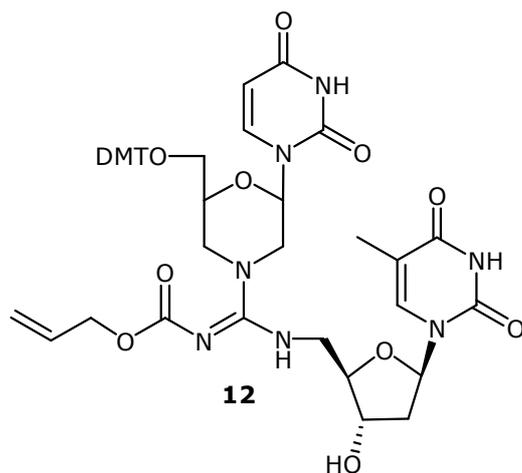
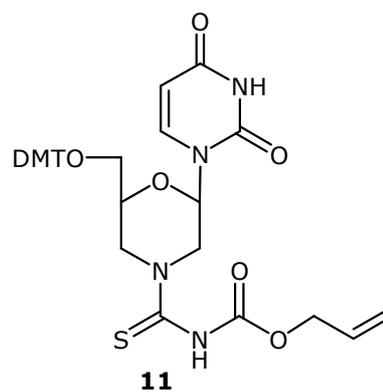
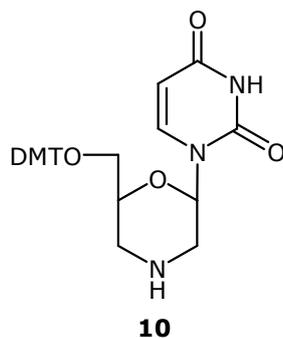
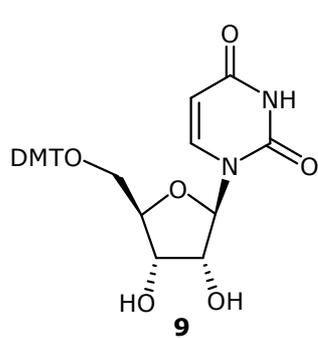
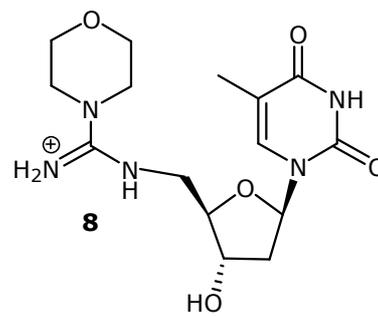
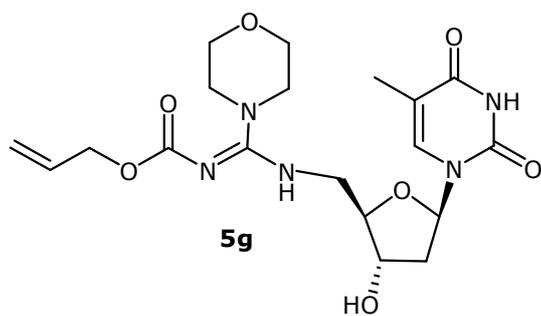
Los experimentos de desnaturalización térmica de dobles y triples hélices se realizaron en un espectrofotómetro Jasco V-550, provisto de un Pelltier ETC-505T. En todos los casos se utilizaron cubetas de 1 cm de paso de luz. Para llevar a cabo los experimentos de fusión de dobles y triples hélices se prepararon las muestras tal y como se indica en el apartado D.1 de la sección de Materiales y Métodos. Los experimentos se realizaron según se indica en el apartado D.2 de la sección de Materiales y Métodos y el tratamiento de los datos se realizó según se indica en el apartado D.3 de la misma sección.

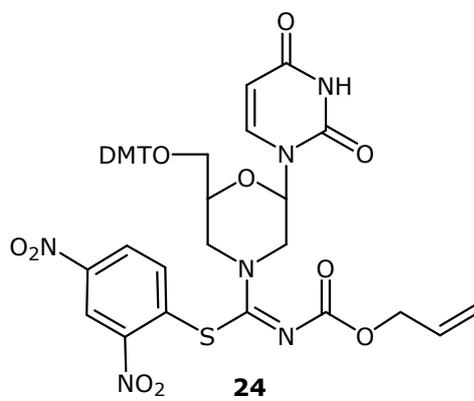
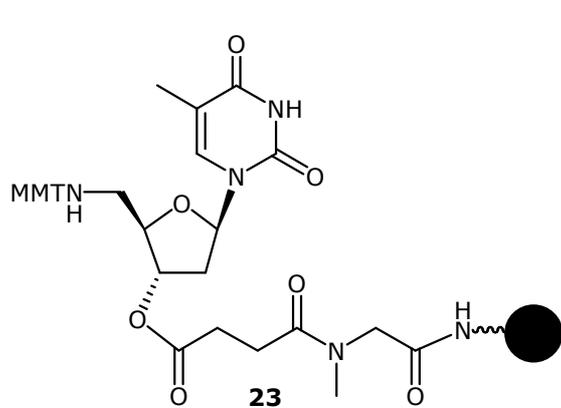
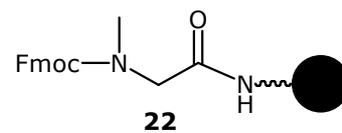
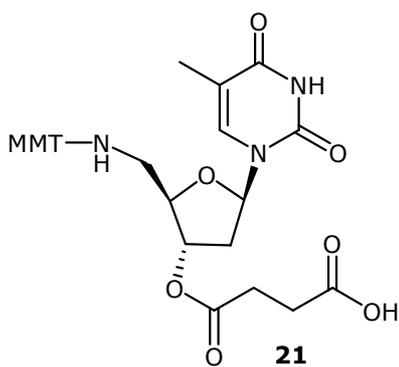
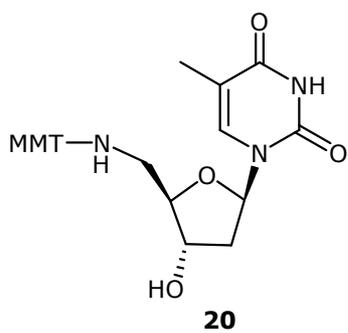
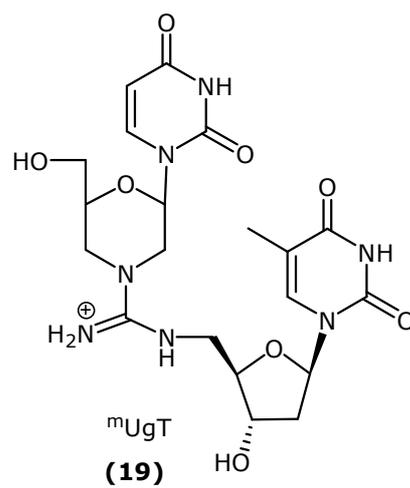
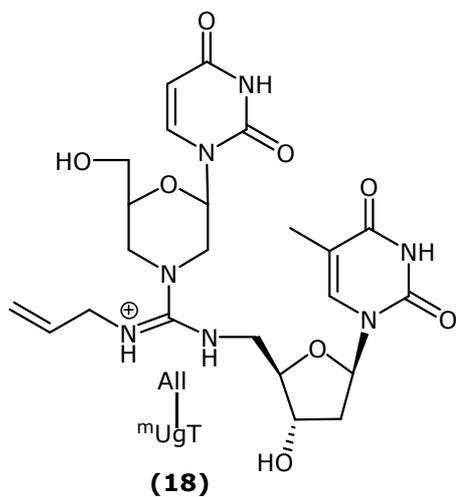


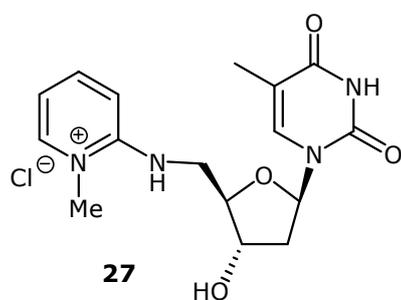
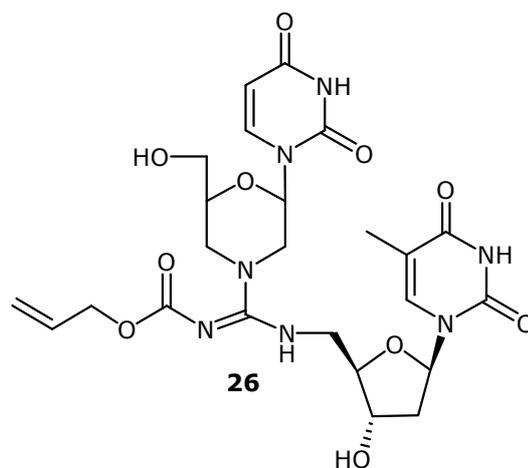
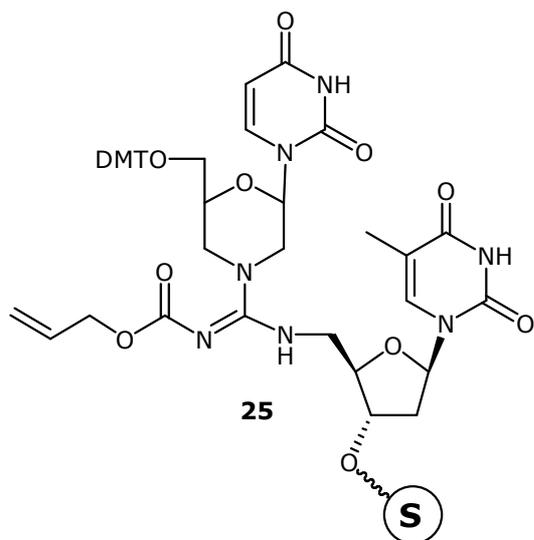


**Índice de figuras**







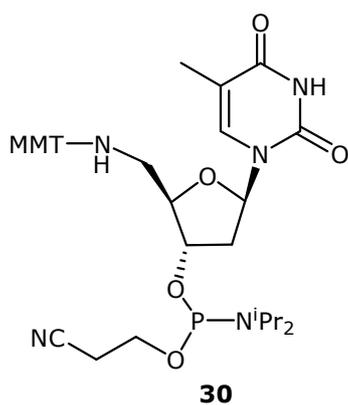


5'CTTTCTTCTCTT(<sup>m</sup>UgT)

**14E1**  
**(28)**

5'CTTTCTTCTCTT(<sup>m</sup>UgT)  
|  
Alloc

**14E1(Alloc)**  
**(29)**



5'CTTTC(<sup>m</sup>UgT)CTCTTTT

**14E2**  
**(31)**

5'CTTTCTTCTCTTTT

**14C**  
**(32)**

5'AAAAGAGAAGAAAG

**14D**  
**(33)**

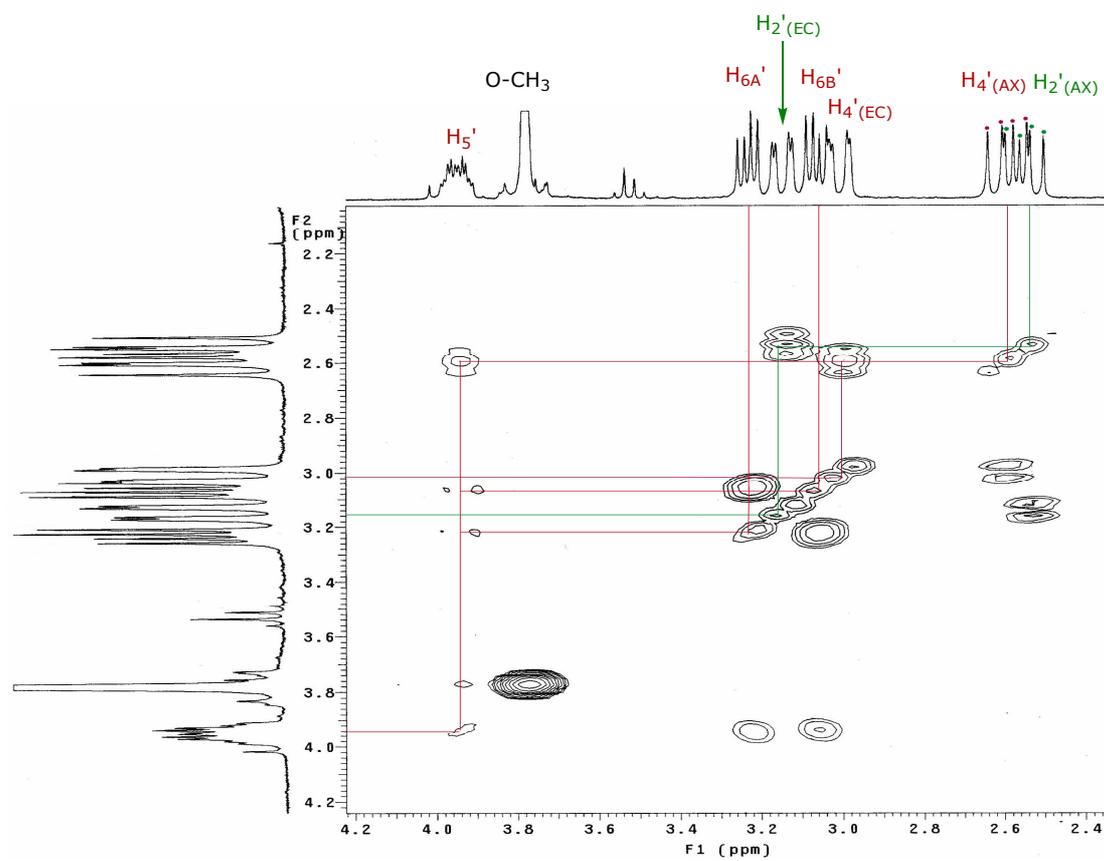
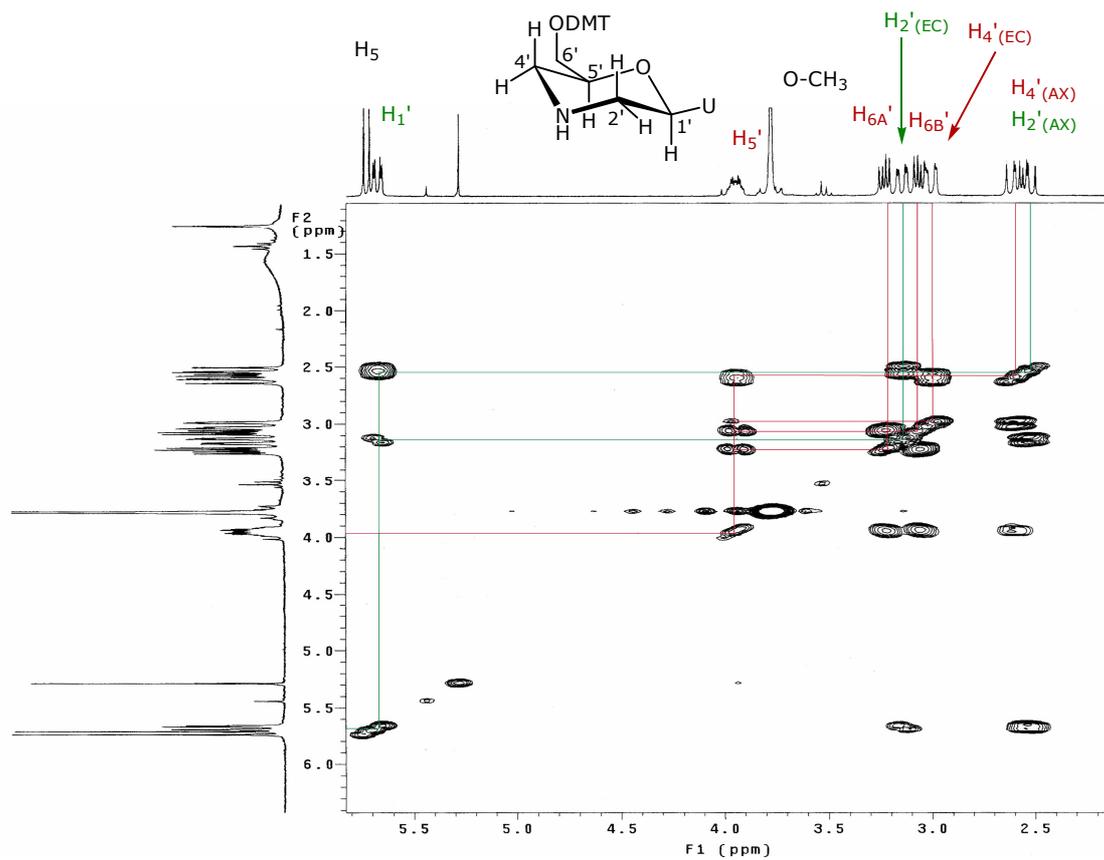
5'CTCTGAAAGAAGAGAAAAGTCTC

**23A**  
**(34)**

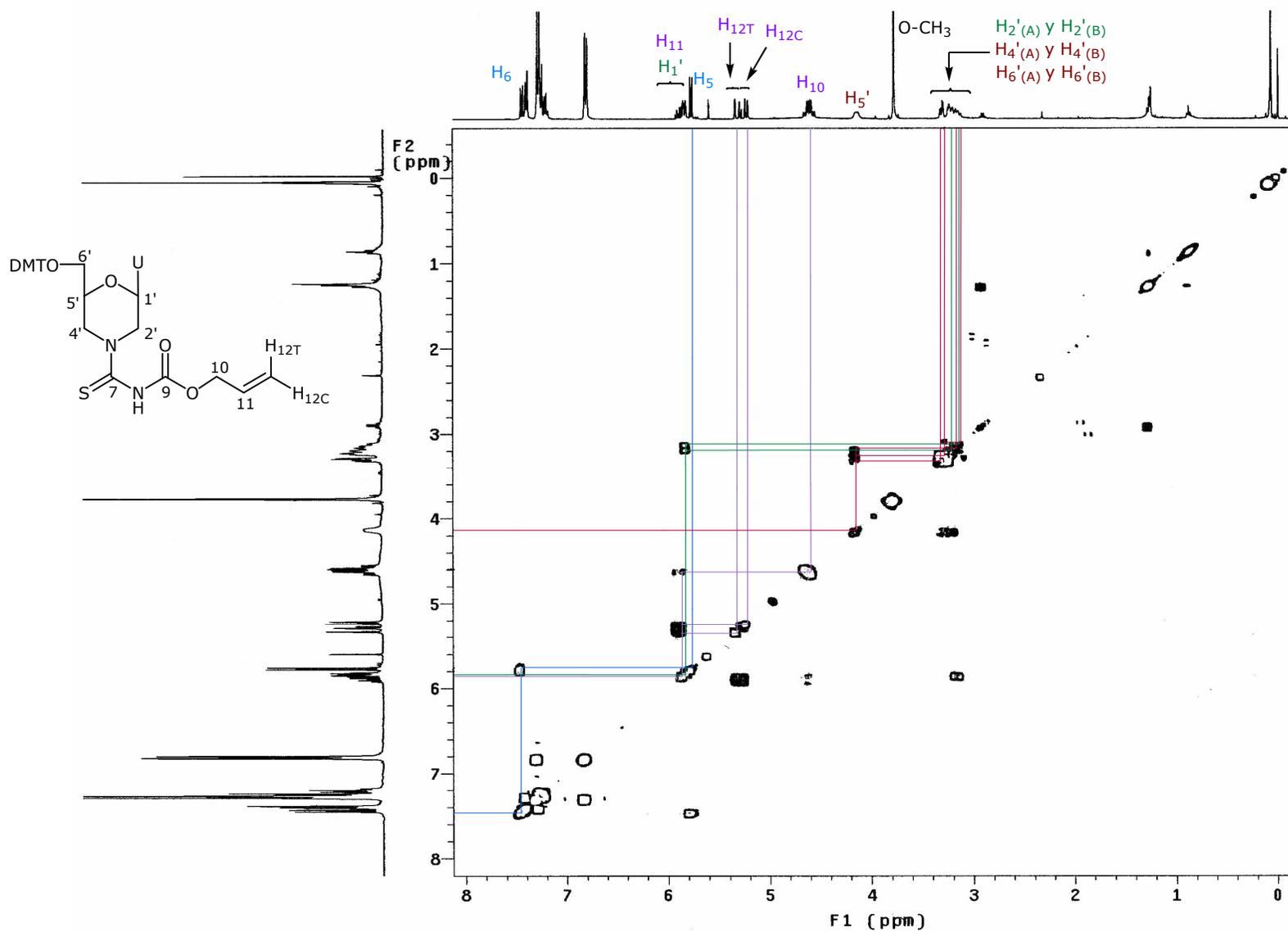
5'GAGACTTTTCTCTTCTTTTCAGAG

**23B**  
**(35)**

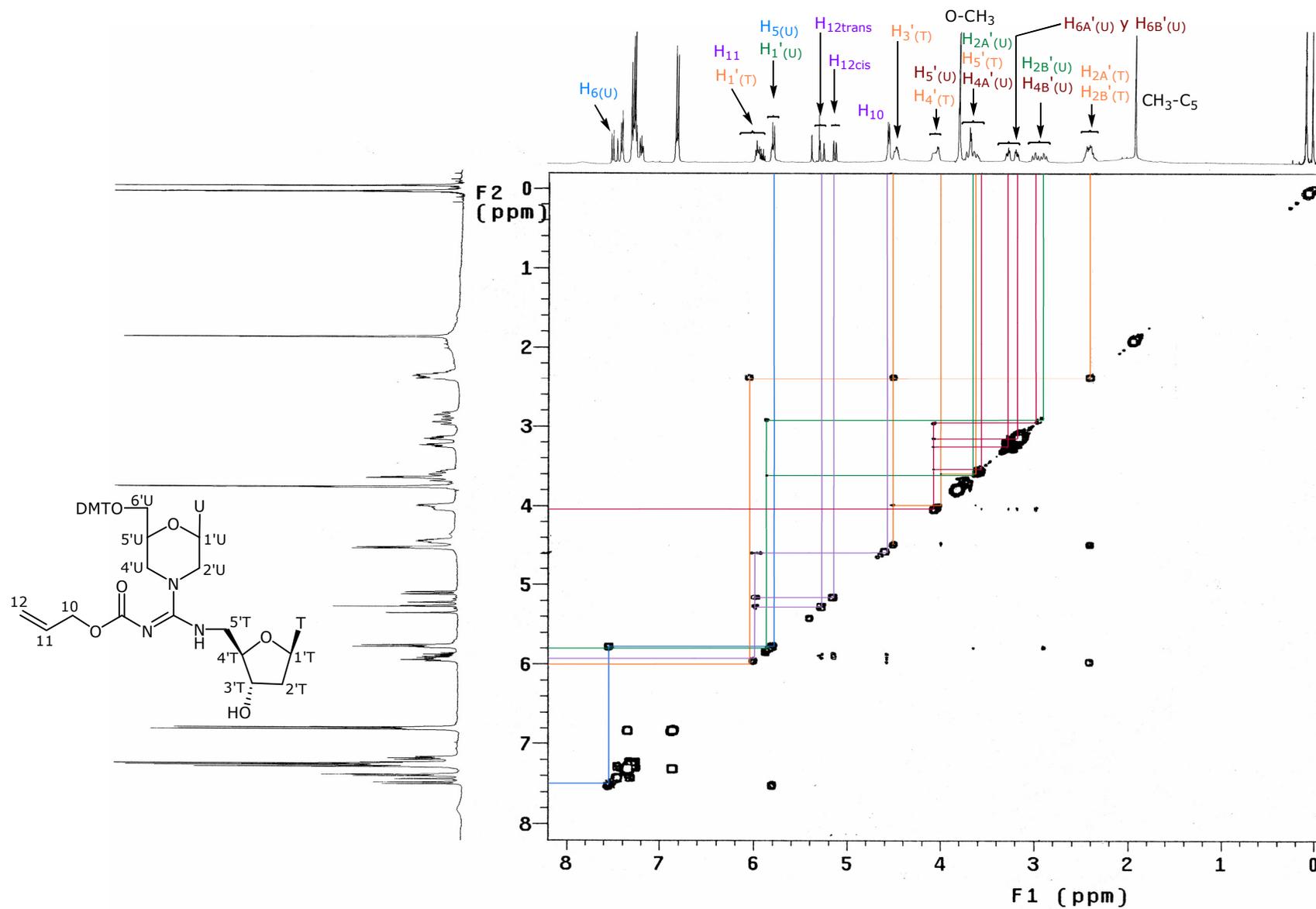
### Espectro COSY- $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ del producto 10



**Espectro COSY-<sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H del producto 11**



**Espectro COSY-<sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H del producto 12**



## Programas de síntesis empleados en los sintetizadores Applied Biosystems 308B y PCR-MATE

Programa empleado en las síntesis del pentámero T(<sup>m</sup>Ug<sub>(Alloc)</sub>T)TC, en el que se realiza un acoplamiento de 30 segundos (modelo 308B).

SYNTHESIS CYCLE  
VERSION 1.34

CYCLE NAME: MORF30s  
NUMBER OF STEPS: 65  
DATE:  
TIME:

STEP NUMBER	FUNCTION # NAME	STEP TIME	STEP ACTIVE FOR BASES							SAFE STEP
			A	G	C	T	5	6	7	
1	10 #18 To Waste	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
2	9 #18 To Column	60	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
3	2 Reverse Flush	20	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
4	1 Block Flush	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
5	28 Phos Prep	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
6	+45 Group 1 On	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
7	90 TET to column	2	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
8	19 B+TET To Col 1	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
9	90 TET to column	2	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
10	19 B+TET To Col 1	2	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
11	4 Wait	30	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
12	-46 Group 1 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
13	9 #18 To Column	2	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
14	16 Cap Prep	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
15	10 #18 To Waste	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
16	2 Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
17	1 Block Flush	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
18	+45 Group 1 On	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
19	22 Cap To Col 1	15	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
20	-46 Group 1 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
21	4 Wait	30	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
22	10 #18 To Waste	7	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
23	2 Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
24	1 Block Flush	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
25	81 #15 To Waste	7	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
26	13 #15 To Column	15	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
27	4 Wait	30	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
28	10 #18 To Waste	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
29	2 Reverse Flush	20	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
30	1 Block Flush	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
31	9 #18 To Column	20	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
32	2 Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
33	9 #18 To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
34	2 Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
35	9 #18 To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
36	2 Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
37	9 #18 To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
38	2 Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
39	1 Block Flush	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
40	33 Cycle Entry	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
41	10 #18 To Waste	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
42	9 #18 To Column	20	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
43	2 Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
44	1 Block Flush	6	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
45	6 Waste-Port	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
46	5 Advance FC	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
47	82 #14 To Waste	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
48	14 #14 To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
49	2 Reverse Flush	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
50	14 #14 To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
51	2 Reverse Flush	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
52	14 #14 To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
53	2 Reverse Flush	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
54	14 #14 To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
55	2 Reverse Flush	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
56	14 #14 To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
57	1 Block Flush	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
58	10 #18 To Waste	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
59	9 #18 To Column	30	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
60	2 Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
61	10 #18 To Waste	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
62	9 #18 To Column	30	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
63	2 Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
64	1 Block Flush	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
65	7 Waste-Bottle	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes

Programa empleado en las síntesis del pentámero T(<sup>m</sup>Ug<sub>(Alloc)</sub>)TC, en el que se realiza un acoplamiento de 300 segundos (modelo 308B).

**SYNTHESIS CYCLE  
VERSION 1.34**

**CYCLE NAME:** MORF300s  
**NUMBER OF STEPS:** 65  
**DATE:**  
**TIME:**

STEP NUMBER	FUNCTION # NAME	STEP TIME	STEP ACTIVE FOR BASES							SAFE STEP
			A	G	C	T	5	6	7	
1	10 #18 To Waste	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
2	9 #18 To Column	60	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
3	2 Reverse Flush	20	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
4	1 Block Flush	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
5	28 Phos Prep	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
6	+45 Group 1 On	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
7	90 TET to column	2	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
8	19 B+TET To Col 1	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
9	90 TET to column	2	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
10	19 B+TET To Col 1	2	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
11	4 Wait	300	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
12	-46 Group 1 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
13	9 #18 To Column	2	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
14	16 Cap Prep	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
15	10 #18 To Waste	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
16	2 Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
17	1 Block Flush	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
18	+45 Group 1 On	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
19	22 Cap To Col 1	15	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
20	-46 Group 1 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
21	4 Wait	30	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
22	10 #18 To Waste	7	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
23	2 Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
24	1 Block Flush	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
25	81 #15 To Waste	7	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
26	13 #15 To Column	15	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
27	4 Wait	30	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
28	10 #18 To Waste	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
29	2 Reverse Flush	20	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
30	1 Block Flush	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
31	9 #18 To Column	20	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
32	2 Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
33	9 #18 To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
34	2 Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
35	9 #18 To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
36	2 Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
37	9 #18 To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
38	2 Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
39	1 Block Flush	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
40	33 Cycle Entry	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
41	10 #18 To Waste	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
42	9 #18 To Column	20	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
43	2 Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
44	1 Block Flush	6	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
45	6 Waste-Port	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
46	5 Advance FC	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
47	82 #14 To Waste	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
48	14 #14 To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
49	2 Reverse Flush	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
50	14 #14 To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
51	2 Reverse Flush	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
52	14 #14 To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
53	2 Reverse Flush	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
54	14 #14 To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
55	2 Reverse Flush	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
56	14 #14 To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
57	1 Block Flush	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
58	10 #18 To Waste	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
59	9 #18 To Column	30	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
60	2 Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
61	10 #18 To Waste	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
62	9 #18 To Column	30	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
63	2 Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
64	1 Block Flush	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
65	7 Waste-Bottle	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes

Programa empleado en las síntesis del pentámero T(<sup>m</sup>Ug<sub>(Alloc)</sub>)TC, en el que se realizan dos acoplamientos de 30 segundos cada uno (modelo 308B).

SYNTHESIS CYCLE  
VERSION 1.34

CYCLE NAME: MORF30d  
NUMBER OF STEPS: 70  
DATE:  
TIME:

STEP NUMBER	FUNCTION # NAME	STEP TIME	STEP ACTIVE FOR BASES							SAFE STEP
			A	G	C	T	5	6	7	
1	10 #18 To Waste	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
2	9 #18 To Column	60	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
3	2 Reverse Flush	20	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
4	1 Block Flush	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
5	28 Phos Prep	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
6	+45 Group 1 On	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
7	90 TET to column	2	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
8	19 B+TET To Col 1	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
9	90 TET to column	2	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
10	19 B+TET To Col 1	2	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
11	4 Wait	30	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
12	90 TET to column	2	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
13	19 B+TET To Col 1	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
14	90 TET to column	2	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
15	19 B+TET To Col 1	2	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
16	4 Wait	30	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
17	-46 Group 1 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
18	9 #18 To Column	2	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
19	16 Cap Prep	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
20	10 #18 To Waste	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
21	2 Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
22	1 Block Flush	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
23	+45 Group 1 On	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
24	22 Cap To Col 1	15	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
25	-46 Group 1 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
26	4 Wait	30	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
27	10 #18 To Waste	7	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
28	2 Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
29	1 Block Flush	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
30	81 #15 To Waste	7	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
31	13 #15 To Column	15	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
32	4 Wait	30	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
33	10 #18 To Waste	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
34	2 Reverse Flush	20	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
35	1 Block Flush	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
36	9 #18 To Column	20	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
37	2 Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
38	9 #18 To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
39	2 Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
40	9 #18 To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
41	2 Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
42	9 #18 To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
43	2 Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
44	1 Block Flush	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
45	33 Cycle Entry	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
46	10 #18 To Waste	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
47	9 #18 To Column	20	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
48	2 Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
49	1 Block Flush	6	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
50	6 Waste-Port	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
51	5 Advance FC	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
52	82 #14 To Waste	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
53	14 #14 To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
54	2 Reverse Flush	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
55	14 #14 To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
56	2 Reverse Flush	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
57	14 #14 To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
58	2 Reverse Flush	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
59	14 #14 To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
60	2 Reverse Flush	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
61	14 #14 To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
62	1 Block Flush	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
63	10 #18 To Waste	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
64	9 #18 To Column	30	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
65	2 Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
66	10 #18 To Waste	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
67	9 #18 To Column	30	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
68	2 Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
69	1 Block Flush	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
70	7 Waste-Bottle	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes

Programa empleado en las síntesis del pentámero T<sup>(m)</sup>Ug<sub>(Alloc)</sub>TTC, en el que se realizan dos acoplamientos de 300 segundos cada uno (modelo 308B).

SYNTHESIS CYCLE  
VERSION 1.34

CYCLE NAME: MORF300d  
NUMBER OF STEPS: 70  
DATE:  
TIME:

STEP NUMBER	FUNCTION # NAME	STEP TIME	STEP ACTIVE FOR BASES							SAFE STEP	
			A	G	C	T	5	6	7		
1	10 #18 To Waste	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
2	9 #18 To Column	60	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
3	2 Reverse Flush	20	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
4	1 Block Flush	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
5	28 Phos Prep	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
6	+45 Group 1 On	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
7	90 TET to column	2	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
8	19 B+TET To Col 1	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
9	90 TET to column	2	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
10	19 B+TET To Col 1	2	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
11	4 Wait	300	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
12	90 TET to column	2	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
13	19 B+TET To Col 1	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
14	90 TET to column	2	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
15	19 B+TET To Col 1	2	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
16	4 Wait	300	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
17	-46 Group 1 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
18	9 #18 To Column	2	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
19	16 Cap Prep	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
20	10 #18 To Waste	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
21	2 Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
22	1 Block Flush	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
23	+45 Group 1 On	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
24	22 Cap To Col 1	15	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
25	-46 Group 1 Off	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
26	4 Wait	30	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
27	10 #18 To Waste	7	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
28	2 Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
29	1 Block Flush	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
30	81 #15 To Waste	7	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
31	13 #15 To Column	15	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
32	4 Wait	30	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
33	10 #18 To Waste	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
34	2 Reverse Flush	20	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
35	1 Block Flush	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
36	9 #18 To Column	20	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
37	2 Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
38	9 #18 To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
39	2 Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
40	9 #18 To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
41	2 Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
42	9 #18 To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
43	2 Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
44	1 Block Flush	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
45	33 Cycle Entry	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
46	10 #18 To Waste	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
47	9 #18 To Column	20	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
48	2 Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
49	1 Block Flush	6	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
50	6 Waste-Port	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
51	5 Advance FC	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
52	82 #14 To Waste	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
53	14 #14 To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
54	2 Reverse Flush	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
55	14 #14 To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
56	2 Reverse Flush	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
57	14 #14 To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
58	2 Reverse Flush	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
59	14 #14 To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
60	2 Reverse Flush	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
61	14 #14 To Column	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
62	1 Block Flush	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
63	10 #18 To Waste	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
64	9 #18 To Column	30	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
65	2 Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
66	10 #18 To Waste	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
67	9 #18 To Column	30	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
68	2 Reverse Flush	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
69	1 Block Flush	4	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
70	7 Waste-Bottle	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes

Programa empleado en las síntesis del pentámero T(<sup>m</sup>Ug<sub>(Alloc)</sub>)TC, en el que se realizan dos acoplamientos de 300 segundos cada uno (modelo PCR-MATE).

391 CYCLE/PROCEDURE

NAME: MF2A  
 NUMBER OF STEPS: 71  
 TIME:  
 DATE:

STEP NUMBER	FUNCTION # NAME	STEP TIME	ACTIVE FOR BASES				
			A	G	C	T	X
1	10 #18 TO WASTE	2	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
2	9 #18 TO COLM	15	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
3	2 REVERSE FLUSH	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
4	1 BLOCK FLUSH	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
5	28 PHOS PREP	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
6	90 TET TO COLUMN	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
7	19 B+TET TO COLM	2	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
8	90 TET TO COLUMN	2	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
9	19 B+TET TO COLM	2	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
10	90 TET TO COLUMN	2	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
11	19 B+TET TO COLM	2	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
12	90 TET TO COLUMN	2	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
13	4 WAIT	300	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
14	90 TET TO COLUMN	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
15	19 B+TET TO COLM	2	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
16	90 TET TO COLUMN	2	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
17	19 B+TET TO COLM	2	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
18	90 TET TO COLUMN	2	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
19	19 B+TET TO COLM	2	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
20	90 TET TO COLUMN	2	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
21	4 WAIT	300	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
22	16 CAP PREP	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
23	2 REVERSE FLUSH	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
24	1 BLOCK FLUSH	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
25	22 CAP TO COLUMN	20	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
26	4 WAIT	30	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
27	10 #18 TO WASTE	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
28	2 REVERSE FLUSH	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
29	1 BLOCK FLUSH	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
30	81 #15 TO WASTE	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
31	13 #15 TO COLUMN	20	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
32	10 #18 TO WASTE	30	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
33	4 WAIT	15	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
34	2 REVERSE FLUSH	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
35	1 BLOCK FLUSH	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
36	10 #18 TO WASTE	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
37	9 #18 TO COLM	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
38	2 REVERSE FLUSH	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
39	9 #18 TO COLM	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
40	2 REVERSE FLUSH	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
41	9 #18 TO COLM	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
42	2 REVERSE FLUSH	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
43	1 BLOCK FLUSH	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
44	33 CYC ENTRY	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
45	10 #18 TO WASTE	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
46	9 #18 TO COLM	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
47	2 REVERSE FLUSH	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
48	1 BLOCK FLUSH	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
49	5 ADVANCE FC	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
50	6 WASTE PORT	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
51	80 #14 TO WASTE	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
52	14 #14 TO COLUMN	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
53	108 FLUSH TO TRIT	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
54	14 #14 TO COLUMN	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
55	108 FLUSH TO TRIT	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
56	14 #14 TO COLUMN	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
57	108 FLUSH TO TRIT	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
58	14 #14 TO COLUMN	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
59	108 FLUSH TO TRIT	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
60	14 #14 TO COLUMN	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
61	108 FLUSH TO TRIT	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
62	14 #14 TO COLUMN	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
63	108 FLUSH TO TRIT	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
64	9 #18 TO COLM	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
65	108 FLUSH TO TRIT	6	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
66	7 WASTE BOTTLE	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
67	1 BLOCK FLUSH	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
68	9 #18 TO COLM	20	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
69	2 REVERSE FLUSH	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
70	1 BLOCK FLUSH	3	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
71	34 CYC END	1	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes