

Tesi doctoral presentada per En/Na

Berta ALGUERÓ CAMA

amb el títol

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

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

QUÍMICA

Barcelona, 13 de gener de 2006.

Facultat de Química
Departament de Química Orgànica



UNIVERSITAT DE BARCELONA



MATERIALS I MÈTODES

1 DISSOLVENTS, REACTIUS I SOLUCIONS TAMPONADES

1.1 Dissolvents i reactius

ACN anhidre: és de qualitat HPLC (Panreac o sds) i es destil·la sobre CaH_2 en pols. S'utilitza directament o es guarda sobre pedres de CaH_2 sota atmosfera inert d'argó.

Aigua desionitzada ($18.2 \text{ M}\Omega\text{cm}^{-1}$): s'obté mitjançant un sistema Milli-Q plus de Millipore.

Amoníac: dissolució aquosa comercial al 33 % extrapura de Merck.

DCM: és de qualitat Normasolv de Scharlau i se n'eliminen les traces d'àcid fent-lo passar per una columna d'alúmina bàsica.

DCM anhidre: es destil·la el DCM sense traces d'àcid sobre P_2O_5 i s'utilitza directament o es guarda en una ampolla opaca a la llum sobre pedres de CaH_2 en atmosfera inert d'argó.

DMF: de sds (qualitat per a síntesi de pèptids), es guarda sobre tamís molecular de 4Å. Abans de ser utilitzada s'hi bombolleja N_2 durant unes hores, per tal d'eliminar-ne les amines volàtils.

Hexà: és de Merck, qualitat LiChrosolv.

Piridina anhidra: de Panreac per a síntesi. Es destil·la sobre ninhidrina i es guarda sobre pedres de CaH_2 sota atmosfera d'argó.

THF anhidre: s'obté directament per destil·lació sobre sodi metall en presència de benzofenona i sota atmosfera de nitrogen. Prèviament s'eliminen els peròxids fent-lo passar per una columna d'alúmina bàsica.

Els següents reactius comercials s'han utilitzat sense cap purificació o tractament addicional: MTBE (qualitat per a síntesi, sds); TBAF· $3\text{H}_2\text{O}$, *tert*-butildimetilclorosilà, 1,2,4-triazole, dimetilsulfòxid, 2-(metiltio)etilamina, histamina, *N*-metilmercaptoacetamida i acetat d'amoni (Fluka); DIEA (Merck); TEA (Panreac); TFA, *N*-trimetilsilimidazole i oxiclòrid de fòsfor (Aldrich); àcid acètic glacial i imidazole (Scharlau); DMT-T (Syngen, Inc); (2-cianoetoxi)cloro(*N,N*-diisopropilamino)fosfina i (2-cianoetoxi)bis(*N,N*-diisopropilamino)fosfina (Peninsula Laboratories).

Les cases comercials dels reactius necessaris per a les síntesis oligonucleotídiques (apartat 3.1), de les matrius emprades per EM MALDI-TOF (apartat 3.8) i dels reactius per a les electroforesis en gel de poliacrilamida (apartat 2.3.4) s'especifiquen en cada cas.

1.2 Solucions tampó

- **Tampó d'acetat d'amoni NH_4OAc 2 M pH 7**

Per preparar 1 L d'aquest tampó, es pesen 154.2 g d'acetat d'amoni i es dissolen en aigua, ajustant el pH a 7 amb NH_3 o AcOH segons convingui. S'enrasa en un matràs aforat de 1 L i es filtra la solució a través d'un filtre de 0.45 μm de mida de porus.

- **Tampó d'acetat de trietilamoni TEAAc 2 M pH 7**

Per preparar 500 mL d'aquest tampó, s'addicionen 140 mL (1 mol) de trietilamina i 58 mL d'àcid acètic glacial (1 mol) a un erlenmeyer amb 200 mL d'aigua amb agitació magnètica vigorosa. Un cop es refreda la solució, s'ajusta el pH a 7 (amb TEA o AcOH segons convingui) i s'enrasa amb aigua fins a un volum de 500 mL. El tampó es filtra a través d'un filtre de 0.45 μm de mida de porus.

- **Tampó de bicarbonat de trietilamoni TEAB 2 M pH 8**

Per preparar 1 L d'aquest tampó, prèviament s'enrasa amb aigua a 1 L una proveta que conté 278 mL de TEA. Aquesta barreja de dues fases es diposita en un erlenmeyer de 2 L. En un altre recipient s'introdueix neu carbònica, que sublima i el corrent de CO_2 resultant es fa bombollear a través d'un capil·lar de vidre sobre la barreja anterior, agitant constantment. Quan desapareixen les dues fases, es continua bombollejant fins a ajustar el pH a un valor entre 7 i 8.

- **Tampó $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0.1 M pH 7**

Es mesclen 30.5 mL d'una solució aquosa 0.2 M de Na_2HPO_4 amb 19.5 mL d'una solució aquosa 0.2 M de NaH_2PO_4 . S'enrasa amb aigua fins a un volum total de 100 mL, comprovant el pH resultant.

- **Tampó Na_2Pipes 100 mM pH 7**

Per preparar 100 mL d'aquest tampó, es dissolen 3.76 g de Na_2Pipes en 80-90 mL d'aigua, ajustant el pH amb HCl i enrasant a 100 mL en un matràs aforat.

- **Tampó Tris·HCl 100 mM pH 8**

Per preparar 100 mL d'aquest tampó es dissolen 1.21 g de Tris·HCl en 80-90 mL d'aigua, s'agita vigorosament, s'ajusta el pH a 8 amb unes gotes de dissolució de HCl concentrat i s'enrasa a 100 mL en un matràs aforat.

- **Tampó 100 mM $\text{NaClO}_4/40$ mM NH_4OAc pH 5.3**

Per preparar 100 mL d'aquest tampó es dissolen 1.40 g de NaClO_4 i 0.31 g de NH_4OAc en 80-90 mL d'aigua, ajustant el pH a 5.3 amb AcOH i NH_3 i enrasant amb aigua a 100 mL en un matràs aforat.

2 INSTRUMENTACIÓ I TÈCNIQUES GENERALS

2.1 Tècniques espectroscòpiques

2.1.1 Ressonància magnètica nuclear (RMN)

Els espectres de rutina de ressonància magnètica nuclear s'han realitzat en aparells de la Unitat de RMN d'Alt Camp, adscrita als Serveis Científic-Tècnics de la UB. Els espectres de ^1H i ^{13}C s'han enregistrat en un aparell Varian Gemini de 200 MHz. Els desplaçaments químics (δ) s'expressen en ppm respecte a la referència interna de tetrametilsilà (δ : 0 ppm). Els espectres de ^{31}P s'han realitzat en un aparell Varian Unity-300 Plus i els desplaçaments químics s'expressen en ppm respecte la referència externa de H_3PO_4 al 85 % en D_2O (δ : 0 ppm) o fosfat de trimetil en CDCl_3 (δ : 141.6 ppm).

2.1.2 Espectroscòpia UV

Els espectres d'absorció de UV-visible s'han enregistrat en un aparell Perkin Elmer Lambda 5 UV-Vis. Les corbes de fusió per UV s'han obtingut en un aparell Jasco V-550, proveït d'un Pelltier ETC-505T (Jasco) com a controlador de temperatura. Les cubetes emprades han estat de quars, de 0.1 o 1 cm de pas de llum, i de diferents capacitats de volum (300 μL -1.5 mL).

2.2 Espectrometria de masses

Els espectres de masses s'han realitzat al Servei d'Espectrometria de Masses dels Serveis Científic-Tècnics de la UB. Els espectres adquirits per bombardeig d'àtoms ràpids (EM FAB) i per ionització en electrospray (EM ES) s'han realitzat en un aparell VG-Qattro (Fison Instruments), utilitzant un voltatge del capil·lar de 10 kV i 3.5 kV respectivament. Els espectres de masses adquirits mitjançant la tècnica de desorció iònica provocada per làser assistida per matriu i amb detecció de temps de vol (EM MALDI-TOF) s'han obtingut en un aparell PerSeptive Biosystems Voyager-DETMRP, amb un làser de N_2 de 337 nm i polsos de 3 ns.

2.3 Tècniques cromatogràfiques

2.3.1 Cromatografia en capa fina (CCF)

La cromatografia en capa fina s'ha realitzat sobre cromatofolis de gel de sílice amb indicador de fluorescència a 254 nm sobre suport d'alumini (60 F, 0.2 mm, Merck), amb unes mesclures d'elució que s'indiquen en cada cas particular. El revelat de les capes fines s'ha realitzat de forma diferent segons la naturalesa dels compostos a analitzar:

- *revelat per UV*: detecció de grups aromàtics/cromòfors. El revelat es fa directament sota la làmpada ultraviolada.

- *revelat amb ninhidrina*: detecció de grups amino lliures. El reactiu emprat consisteix en una dissolució de ninhidrina al 0.5 % en acetona. La placa es polvoritza amb aquesta solució i s'escalfa a 110 °C durant 2-3 minuts. La presència de grups amino es manifesta per l'aparició d'una coloració violada. En el cas que el grup amino es trobi bloquejat per un grup protector làbil als àcids com el Boc, aquest s'elimina prèviament tractant la capa fina amb vapors àcids o bé escalfant-la breument en una placa calefactors.
- *revelat del grup protector DMT*: per al revelat de capes fines de compostos amb el grup protector DMT, aquestes se sotmeten a vapors àcids o bé s'escalfen breument en una placa calefactors, de manera que una coloració ataronjada indica la presència del catió dimetoxitritil.
- *reactiu universal de revelat*: en el cas de productes que no poden ser revelats amb cap de les tècniques anteriors, s'utilitza el reactiu universal, 7 g d'àcid fosfomolibdic en 100 mL d'etanol absolut. El revelat s'obté submergint la capa fina en el reactiu, i posteriorment escalfant a 110 °C en una estufa o directament en una placa calefactors fins a l'aparició d'unes taques de color verdós.

2.3.2 Cromatografia en columna

La cromatografia en columna s'ha realitzat sobre gel de sílice (Chromatogel 60 Å CC, 35-70 microns, SDS). S'empren 60 g de sílice per cada gram de cru a purificar. En el cas de l'addició de mostres en forma de càrrega sòlida, aquesta es prepara per eliminació dels dissolvent d'una mescla que conté 5 g de sílice per cada gram de producte. Els eluents utilitzats s'indiquen en cada cas.

2.3.3 Cromatografia líquida

2.3.3.1 Cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC)

L'anàlisi i purificació per cromatografia líquida d'alta resolució s'ha dut a terme en un sistema Waters (Separations Module 2695 i Photodiode Array Detector 2996) o bé en diferents sistemes Shimadzu, compostats per:

-dues bombes LC-10AS amb mesclador d'alta pressió, autoinjector SIL-9A, detector UV-vis de longitud d'ona variable SPD-10A i registrador integrador Chromatopac C-R5A.

-dues bombes LC-6A amb mesclador d'alta pressió, controlador SCL-6B, autoinjector SIL-6B, detector UV-vis de longitud d'ona variable SPD-6A i registrador integrador Chromatopac C-R6A.

-dues bombes LC-10AD amb mesclador d'alta pressió, autoinjector SIL-10Axi, detector UV-vis de longitud d'ona variable SPD-M10AVP6A, impressora Hewlett-Packard, mòdul de comunicació CBM-10A i ordinador COMPAQ DESKPRO (Diode-Array).

- **Condicions analítiques**

Per a la **cromatografia en fase reversa** a escala analítica, s'han emprat columnes Kromasil 100 C₁₈ de Teknokroma de 250 x 4 mm (mida de partícula 10 µm) o de 100 x 4 mm (mida de partícula 5 µm), treballant sempre a un flux de 1 mL/min. Per a l'anàlisi de derivats nucleosídics fosforamidit, s'ha utilitzat una columna C₈ Nucleosil de Scharlau de 250 x 4 mm (mida de partícula 10 µm), treballant a flux de 1 mL/min.

Els sistemes d'elució emprats s'han basat en gradients lineals de dos dissolvents, i s'especifica en cada cas particular.

L'anàlisi per **cromatografia de bescanvi aniònic** s'ha dut a terme amb una columna NucleoPac PAX100 de Dionex (de 250 x 4 mm). S'ha utilitzat un gradient lineal (flux 1 mL/min) de NH₄OAc 25 mM aquós en un 10 % de ACN amb quantitats creixents de NaCl (de 0.25 a 0.5 M en 30 min).

- **Condicions semipreparatives**

Per purificació a escala semipreparativa en fase reversa, s'han utilitzat columnes Kromasil C₁₈ (250 x 10 mm, 10 µm, flux 3 mL/min) de Phase Separations o Hamilton PRP-I de poli(estirè-divinilbenzè) (305 x 7 mm, 10 µm, flux 2 mL/min). S'han emprat com a sistemes d'elució: dissolvent A: NH₄OAc 0.05 M; dissolvent B: ACN/H₂O 1:1 (v/v).

2.3.3.2 Cromatografia líquida de mitja resolució (MPLC)

La purificació per cromatografia líquida de mitja resolució s'ha realitzat en sistemes compostos d'una bomba de pistó Duramat de cfg ProMinent, un detector de UV-Vis Uvicord SII de Pharmacia Biotech, un col·lector de fraccions automàtic Ultrorac 7000 de LKB i un enregistrator REC 101 de Pharmacia Biotech. S'ha emprat una columna de fase reversa C₁₈ (Vydac, 22 x 2 cm, 15-20 µm de diàmetre de partícula i 300 Å de mida de porus), eluint a un flux de 2-3 mL/min i col·lectant fraccions cada 2-3 min. Com a eluents s'han utilitzat els mateixos que per HPLC a escala semipreparativa i per crear el gradient s'ha emprat com a gradientòmetre un sistema de vasos comunicants: en un s'hi col·loca una solució de NH₄OAc 0.05 M (0 % de B) i en l'altre la mescla d'eluents de NH₄OAc 0.05 M (A) i ACN/H₂O 1:1 (B) a la qual es vol arribar. En general, es comença el gradient amb un percentatge de B inferior a l'emprat en condicions de HPLC.

2.3.3.3 Cromatografia d'exclusió molecular

El dessalatge de l'adducte bifuncional intercadena aïllat en quantitats importants s'ha realitzat mitjançant la filtració molecular a través d'una columna de Sephadex G-10 (12 x 2 cm, Pharmacia). El sistema està format per una bomba peristàtica Pharmacia P-1 (LKB), un detector de UV-Vis de longitud d'ona fixa Uvicord SII (Pharmacia Biotech), un col·lector de fraccions automàtic Ultrorac 7000 (LKB) i un enregistrator REC 101 (Pharmacia Biotech).

L'oligonucleòtid es dissol en la mínima quantitat d'aigua i com a eluent s'utilitza una solució de TEAB 50 mM pH 8.

2.3.3.4 Dessalatge amb columnes NAP

Per a l'eliminació de sals o de productes orgànics de baix pes molecular s'han utilitzat unes petites columnes comercials farcides amb Sephadex G-25 DNA Grade (Farmacia NAP 10), amb unes dimensions de llit de gel: 1.3 x 2.6 cm. El procediment a seguir és el que es descriu a continuació.

- i) eliminar l'excés de líquid sobrenedant
- ii) equilibrar amb 15 mL de tampó 0.01 M NH₄OAc
- iii) carregar la mostra dissolta en 1 mL de tampó 0.01 M NH₄OAc
- iv) afegir 1.5 mL de tampó 0.01 M NH₄OAc, recollir el volum en un tub de centrifuga i liofilitzar, ja que és on es troba el producte
- v) rentar la resina amb aigua per eluir les impureses retingudes a la columna

2.3.3.5 Dessalatge amb columnes Sep-Pak C18

Aquestes columnes Sep-Pak C18 (Classic-short body, Waters) s'han emprat per a dessalar els productes aïllats per cromatografia de bescanvi aniònic. El protocol seguit és el que es descriu:

- i) rentat: 10 mL ACN
- ii) equilibrat: 10 mL H₂O
- iii) 2 mL NH₄AcO 2 M
- iv) càrrega de la mostra dissolta en 2 mL H₂O
- v) rentat: 30 mL H₂O
- vi) elució del producte amb aproximadament 5 mL ACN:H₂O 1:1, fins que ja no absorbeixi a 260 nm.

2.3.4 Electroforesi en gel de poliacrilamida¹

Les electroforesis en gel de poliacrilamida s'han realitzat en un aparell Hoefer 660series d'Amersham Pharmacia Biotech, que es compon d'una cubeta d'electroforesi vertical, plaques de vidre (18 x 24.5 cm), pintes i espaiadors de diferent gruix (0.75 i 1 cm). S'ha utilitzat una font de voltatge LKB 2197 BROMMA.

Els reactius emprats són: acrilamida (de SERVA), bisacrilamida (d'Amersham Biosciences), urea (de Merck), *N,N,N',N'*-tetrametiletildiamina (TEMED, de SERVA) i persulfat amònic (també de SERVA). El tampó TBE 10x (Tris, àcid bòric i EDTA) és de BioRad. La formamida i el *Stains-all-dye* són de Sigma.

- **Realització d'un gel de poliacrilamida analític**

Per a la realització d'un gel analític s'utilitza un gel de gruix entre 0.75 i 1 cm i es carreguen 0.01-0.1 OD₂₆₀ de l'oligonucleòtid a analitzar.

Les electroforesis s'han realitzat usant un gel d'acrilamida al 20 % en condicions desnaturalitzants (urea 7 M). Es prepara una dissolució de 450 g d'urea, 190 g d'acrilamida, 10 g de bisacrilamida i 100 mL de TBE 10x, enrasant a 1 L amb aigua. La polimerització del gel es porta a terme addicionant, a 40 mL de l'anterior dissolució, 400 µL de persulfat amònic al 10 % en aigua i 40 µL de TEMED, agitant i ràpidament introduint-ho entre els dos vidres on es vol polimeritzar (30-60 min). A continuació, es renten els pouets amb TBE 0.5x i es fa funcionar el sistema sense carregar les mostres durant 2 h per tal d'homogeneïtzar el gel. Com a medi conductor s'utilitza TBE 0.5x, que es prepara per dilució de la dissolució comercial.

Les mostres, prèviament liofilitzades, es dissolen en 20 µL de H₂O/formamida 1:1 (v/v). Com a indicadors s'utilitzen cianoxilenol, la migració lenta del qual correspondria a un oligonucleòtid 22mer lineal, i bromofenol, que migra més ràpidament i equivaldria a un 6mer lineal. Es carreguen 2 µL d'una mescla d'indicadors (0.25 % bromofenol i 0.25 % cianoxilenol en 30 % de glicerol en aigua).

Les electroforesis s'han realitzat aplicant un voltatge de 500-800 V durant unes 3-4 h.

- **Tinció d'un gel de poliacrilamida analític**

Per a la tinció del gel s'ha utilitzat el reactiu *Stains-all-dye*, que tenyeix les taques de DNA i RNA de color blau. La solució colorant emprada es prepara dissolent 20 mg de *Stains-all-dye* en 30 mL de formamida, i diluint amb aigua fins a 200 mL. Es col·loca el gel en una safata amb aigua durant 10 min per tal d'eliminar restes d'urea i facilitar una tinció més homogènia. S'elimina l'aigua i s'afegeix la solució colorant, deixant-lo tenyir durant uns 30 min. A continuació es renta amb aigua, destenyint les parts del gel que no tenen producte sota làmpada de llum infraroja.

Es digitalitza el gel i s'asseca, col·locant-lo en un suport de paper porós i cobrint-lo amb una membrana de celofana humida (cicle d'assecat de 2 h, Gel Dryer model 583 de BioRad).

2.3.5 Altres tècniques

Les centrifugacions s'han realitzat en una centrífuga termostatitzada Beckman GS-15R. Les liofilitzacions de les solucions aquoses s'han dut a terme en aparells Virtis, models Freezemobile QD6 o Freezemobile 12EL. Les mesures de pH s'han portat a terme en un pHmetre Crison micropH Basic 02.

3 SÍNTESI D'OLIGONUCLEÒTIDS EN FASE SÒLIDA²

3.1 Instrumentació i reactius generals

Les síntesis d'oligonucleòtids s'han realitzat en sintetitzadors d'Applied Biosystems 380B o ExpediteTM, utilitzant el mètode del fosfit triester, que empra derivats nucleosídics fosforamidit com a sintons. Existeixen diferents cicles per dur a terme la síntesi automàtica d'oligonucleòtids, que varien bàsicament en funció del suport polimèric i de l'escala de treball.

El suport sòlid emprat ha estat el de CPG (*controlled pore glass*, suport de boles de vidre de porus controlat), funcionalitzat amb el primer nucleòsid (DMT-dN-succinil-*lcaa*-CPG, funcionalització 40-50 µmol/g), de Glen Research, Applied Biosystems o PE Biosystems.

Els (2-cianoetil)-*N,N*-diisopropilfosforamidits de 3'-O-[5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)]-2'-desoxiribonucleòsids (DMT-dA^{Bz}, DMT-dG^{iBu}, DMT-dC^{Bz}, DMT-T) són de Glen Research.

Els reactius habituals per a la síntesi d'oligonucleòtids també s'han adquirit a Glen Research:

-solució activadora: tetrazole sublimat 0.5 M en ACN anhidre

-solució de bloqueig: Ac₂O/2,6-lutidina/THF 1:1:8 (Cap Mix A); 1-metilimidazole 10 % en THF (Cap Mix B).

-solució destrilant: TCA en DCM al 2 %.

Com a solució oxidant s'ha preparat tBuOOH 1 M en DCM anhidre partint de solucions 5-6 M en decà/hexà sobre tamís molecular (Fluka o Aldrich), que es filtra prèviament amb filtres Pro-XTM de niló, de 25 mm de diàmetre i 45 µm de porus (Teknokroma).

Els fosforamidits (assecats durant una nit al dessecador de buit amb P₂O₅ i KOH) s'han dissolt en ACN anhidre a una concentració de 0.1 M, treballant sota atmosfera inert d'argó. Tot el material de vidre o metàl·lic que s'utilitza ha d'haver estat assecat a l'estufa de 110 °C i temperat en un dessecador de buit. L'acetonitril utilitzat pel propi sintetitzador és d'elevada qualitat (*for DNA/RNA synthesis 'Baker bio-analyzed'*, 15 ppm H₂O, de J.T. Baker). L'argó que empra el sintetitzador és de qualitat 5.0, amb menys de 3 ppm/v d'aigua.

3.2 Elongació de la cadena oligonucleotídica

S'ha treballat a una escala de síntesi de 0.2 µmol o 1 µmol, en reactors de tefló de 400 µL de capacitat. En els reactors es pesa la quantitat de CPG necessària per a l'escala de treball i es tanquen amb filtres de tefló (Applied Biosystems) i taps foradats, segellant-los amb anelles d'alumini (sovint s'han emprat reactors comercials que ja estan preparats per a una escala de treball determinada). Es preparen els reactius que han d'anar a les diferents posicions del sintetitzador i es dissolen els fosforamidits en ACN anh. i sota atmosfera d'argó.

A la Taula 1, es resumeix el cicle estàndard de síntesi a escala petita (0.2 µmol), *ssce102a* pel sintetitzador 380B, sobre suport de boles de vidre (CPG).

etapa	operació	reactiu o dissolvent	temps (s)*
1	rentat	ACN	20
2	destritilació	TCA 2 % en DCM	5x10
3	rentat	ACN	2x60
4	assecat	argó	20
5	acoblament	0.1 M amidit en ACN + 0.5 M tetrazole en ACN 1:1 (v/v)	5+30
6	bloqueig	Ac ₂ O/NMI	10
7	oxidació	<i>t</i> BuOOH 1 M en DCM	15+30
8	rentat	ACN	5x10

Taula 1. Cicle de síntesi estàndard a petita escala (0.2 µmol) sobre CPG. * Temps d'entrada contínua del reactiu o dissolvent, o temps d'entrada més temps d'espera.

El cicle de síntesi estàndard emprat per a una escala de 1 µmol i sobre suport de boles de vidre és el *ce102a* (pel sintetitzador 380B) i es troba resumit a la Taula 2.

etapa	operació	reactiu o dissolvent	temps (s)*
1	rentat	ACN	20
2	destritilació	TCA 2 % en DCM	50
3	rentat	ACN	180
4	assecat	argó	20
5	acoblament	0.1 M amidit en ACN + 0.5 M tetrazole en ACN 1:1 (v/v)	10+30
6	bloqueig	Ac ₂ O/NMI	20
7	oxidació	<i>t</i> BuOOH 1 M en DCM	23+30
8	rentat	ACN	5x10

Taula 2. Cicle de síntesi estàndard a escala 1 µmol sobre CPG. * Temps d'entrada contínua del reactiu o dissolvent, o temps d'entrada + temps d'espera.

3.3 Avaluació de l'eficiència d'acoblament de la síntesi

Els rendiments individuals d'acoblament dels nucleòtids es determinen per comparació de les mesures d'absorbància en el visible de les solucions que provenen de l'etapa d'eliminació del grup DMT diluïdes en una solució d'àcid *p*-toluensulfònic 0.1 M en ACN (19 g d'àcid tòxic monohidrat en 1 L de ACN). Es dilueixen tots els filtrats procedents de les destritilacions a un mateix volum i es mesura l'absorbància deguda al catió DMT⁺ al voltant de 498 nm. Per al càlcul del rendiment d'incorporació del nucleòtid *n*, s'aplica l'equació següent:

$$Rdt_n = A_{498}(n)/A_{498}(n-1)$$

on $A_{498}(n)$ és l'absorbància a 498 nm de la solució provinent de la destil·lació del nucleòtid n i $A_{498}(n-1)$ l'equivalent al nucleòtid anterior ($n-1$).

3.4 Desprotecció i escissió de l'oligonucleòtid

Un cop sintetitzats els oligonucleòtids sobre el suport de boles de vidre (CPG), es procedeix a una etapa de desprotecció i escissió, mitjançant un tractament amb NH_3 aquós conc. a 55°C durant una nit. Transcorregut aquest temps, es deixa refredar la solució, es filtra i s'evapora (evitant arribar a sequedat, sobretot en síntesis amb l'últim nucleòtid encara protegit amb DMT).

En el cas d'oligonucleòtids sintetitzats deixant l'últim nucleòtid incorporat amb el grup protector de l'hidroxil 5' (DMT), per tal d'afavorir una millor purificació, cal treballar amb certa cura, un cop escindit l'oligonucleòtid del suport de CPG. Després de l'evaporació de l'amoniac al rotavapor, s'afegeixen unes gotetes de trietilamina, per evitar la possible desprotecció accidental de l'oligonucleòtid (ja que el grup DMT és molt làbil als àcids). Després de l'anàlisi del cru per HPLC, es procedeix a la purificació si s'escau. La fracció amb el producte desitjat amb DMT es liofilitza, i es procedeix a la desprotecció de l'extrem 5' per tractament amb uns 10 mL de AcOH aquós al 80 % en un bany a 0°C durant 15 min. Posteriorment, es dilueix amb aigua fins a uns 30 mL i es liofilitza. Finalment, s'afegeix aigua, es renta la fase aquosa amb èter per tal d'eliminar les traces de DMT i es liofilitza.

3.5 Purificació d'oligonucleòtids

La purificació dels oligonucleòtids es realitza emprant tècniques de cromatografia líquida (bàsicament MPLC i/o HPLC, veure apartat 2.3.3). En cada cas, s'especifiquen els eluents i gradient lineal emprats. Les fraccions corresponents al producte pur s'ajunten i es liofilitzen.

3.6 Quantificació d'oligonucleòtids per absorció al UV

La quantificació dels oligonucleòtids es realitza mesurant la seva absorbància a 260 nm, longitud d'ona al voltant de la qual presenten un màxim d'absorció. La quantitat d'oligonucleòtid s'indica en unitats d'absorbància: OD_{260} .

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

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

L'equivalència molar o màssica d'aquesta unitat es pot calcular tenint en compte que l'absorció de l'oligonucleòtid es deu a les contribucions individuals dels diferents nucleòsids (veure Taula 3), corregit per un factor relacionat amb el fenomen d'apilament o *stacking*. Així, doncs, el coeficient d'extinció molar de l'oligonucleòtid es calcula:

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

on, per a cadenes oligonucleotídiques simples, f_a és un factor de 0.9, ja que les interaccions per apilament de les bases fan disminuir l'absorbància del DNA respecte d'aquella mesurada pels nucleòsids individuals. Si es tracta d'una seqüència autocomplementària o d'una doble cadena, el factor de correcció f_a és de 0.8. Aquests factors han estat estimats per seqüències típiques de DNA.³

nucleòsid	dA	dG	dC	T
$\epsilon_{260}(\text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1})$	15200	11500	7700	8830

Taula 3. Coeficients d'extinció molar dels nucleòsids.

3.7 Composició en nucleòsids dels oligonucleòtids

La determinació de la proporció de nucleòsids es realitza per digestió enzimàtica total dels oligonucleòtids. Els enzims utilitzats han estat:

- fosfodiesterasa de verí de serp (SVPD, EC 3.1.4.1), que escindeix l'oligonucleòtid per l'extrem 3' lliure, generant nucleòsids 5'-fosfat. S'ha emprat la fosfodiesterasa de *Crotalus atrox* de la casa Sigma (s'ha dissolt per tal que 1.5 U/500 μL).
- fosfodiesterasa de melsa de bou (SpPD, EC 3.1.16.1), que escindeix l'oligonucleòtid per l'extrem 5' lliure, generant nucleòsids 3'-fosfat. S'ha emprat la fosfodiesterasa de melsa de bou de Sigma (s'ha dissolt en NH_4OAc 0.2 M pH 5.4 per tal que fos 0.0337 U/ μL).
- fosfatasa alcalina (AP, EC 3.1.3.1), que hidrolitza els nucleòsids 3'- o 5'-fosfat, generant els nucleòsids lliures. S'ha emprat la fosfatasa alcalina de la casa Sigma (0.23 U/ μL).

En tots els casos, la digestió s'ha realitzat sobre una alíquota de producte liofilitzat (0.05-0.2 OD_{260}) en un eppendorf, durant tota una nit (mínim 6 h) a 37 °C, a la qual se li afegeix la solució enzimàtica tal i com es descriu a continuació:

- Mètode 1: quan s'utilitza SVPD (3'-exonucleasa), a la mostra liofilitzada s'afegeixen 1 μL de SVPD, 5 μL de AP, 50 μL de tampó 0.1 M Tris·HCl pH 8, 10 μL de MgCl_2 0.1 M i 34 μL d'aigua (volum total 100 μL).
- Mètode 2: quan s'utilitza SpPD (5'-exonucleasa), es prepara la mescla enzimàtica dissolent 30 μL de SpPD en 100 μL d'una solució 0.2 M NH_4OAc pH 5.4. S'afegeixen 50 $\mu\text{L}/\text{OD}_{260}$ a la mostra liofilitzada i es manté a 37 °C durant una nit. Posteriorment se sotmet al tractament amb fosfatasa alcalina segons el mètode 1 (eliminant la SVPD i ajustant volums en cas necessari).

Les solucions de nucleòsids resultants s'analitzen per HPLC en fase reversa, utilitzant NH_4OAc 0.01 M com a eluent A i ACN/ H_2O 1:1 com a eluent B i realitzant el gradient indicat a la Taula 4.

temps (min)	percentatge de solvent B
0	10 %
5	10 %
20	30 %
25	100 %

Taula 4. Gradient per a l'anàlisi de nucleòsids.

Els diferents nucleòsids s'identifiquen per comparació amb els temps de retenció dels nucleòsids naturals analitzats en el mateix sistema (t_R dC: 3.1, dG: 5.3, T: 7.5 i dA: 11.4 min). Els nucleòsids modificats, en aquest sistema, presenten un t_R X^S : 24.7 min, X^I : 13.0 min, i s'ha assumit per als dos derivats un coeficient d'extinció molar del mateix valor que dC. Les corresponents proporcions es calculen mitjançant els coeficients d'extinció molar coneguts a 260 nm^4 , tal i com s'indica a continuació:

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

$$X = \sum (\text{àrea}/\epsilon)_i / N$$

i: nucleòsid

àrea: àrea del pic corresponent al nucleòsid i

ϵ : coeficient d'extinció molar de i (Taula 3, apartat 3.6)

N: número de nucleòsids teòrics

- Càlcul de la proporció de nucleòsids:

$$n_i = (\text{àrea} / \epsilon)_i / X$$

on n_i és el valor experimental calculat per al nucleòsid i.

3.8 Caracterització per espectrometria de masses MALDI-TOF⁵

Els oligonucleòtids analitzats han estat de petita llargària (menys de 15 nucleòtids), de manera que s'han caracteritzat emprant citrat d'amoni i THAP⁶ com a matriu. Aquestes solucions es preparen al moment o bé es conserven a 5°C .

Citrat d'amoni, CA (Aldrich, >98 %, 50 mg/mL en H_2O).

2,4,6-Trihidroxiacetofenona, THAP (Aldrich, 98 %, 10 mg/mL en $\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}$ 1:1).

- **Preparació de les mostres**

La mostra es prepara mesclant $1 \mu\text{L}$ de solució d'oligonucleòtid en H_2O (10-50 mM) amb $1 \mu\text{L}$ de solució de citrat d'amoni (CA), a la qual s'hi afegeix $1 \mu\text{L}$ de THAP. De la mescla, se n'agafa $1 \mu\text{L}$, que es diposita sobre el porta-mostres, deixant un temps fins que s'asseca abans de l'anàlisi.

- **Condicions experimentals**

Els espectres de masses s'han enregistrat en un aparell PerSeptive Biosystems Voyager-DE™RP amb làser de N₂ de 337 nm i polsos de 3 ns, treballant en diferents condicions experimentals, en funció de la naturalesa de la mostra a analitzar i de la seva massa.

Per a oligonucleòtids (platinats o no) de massa inferior a 3500 unitats de massa s'ha pogut treballar en mode reflector, mentre que per damunt d'aquesta massa ha estat necessari l'ús del mode lineal, que és més sensible però menys resolutiu (els pics observats solen ser la massa mitjana entre els diferents isòtops possibles). El mode lineal, i sobretot per a masses grans, dóna valors de m/z menys exactes, tot i aplicar el calibratge corresponent. En ambdós casos s'ha treballat amb polaritat negativa. En el cas dels productes platinats (experimental capítols 2 i 3), tan sols es dóna el valor de m/z del pic més intens dins del conjunt de pics que deriven dels diferents isòtops del platí.

- **Dessalatge amb puntes ZipTip**

Per a mostres amb elevat contingut en sals, com seria el cas de les provinents de l'anàlisi per HPLC en condicions de bescanvi aniònic, s'han utilitzat les puntes de pipeta comercials ZipTipC18 de Millipore per dessalar de manera ràpida, prèviament a l'anàlisi mitjançant EM MALDI-TOF per a determinar-ne la massa. La punta s'adapta a una micropipeta P-10 (que permet aspirar volums de 10 µL) i se segueix el procediment següent:

- i) tres rentats amb 10 µL d'una solució de ACN/H₂O 1:1
- ii) tres equilibrats amb 10 µL d'una solució de TEAAc 0.1 M, pH 7
- iii) unió de l'oligonucleòtid al reblliment de C₁₈ de la punta, realitzant uns 8-10 cicles d'aspiració i expulsió de la mostra (prèviament dissolta o ressuspena en 10 µL de TEAAc 0.1 M, pH 7)
- iv) tres rentats amb 10 µL de TEAAc 0.1 M, pH 7
- v) tres rentats amb 10 µL d'aigua Milli-Q
- vi) elució de la mostra en 1-5 µL de ACN:H₂O 1:1

Seguidament, es pot analitzar la mostra dessalada mitjançant EM MALDI-TOF, preparant la mostra tal i com s'ha indicat anteriorment.

4 DETERMINACIÓ DE LES TEMPERATURES DE FUSIÓ (UV)

La temperatura de fusió d'un dúplex de DNA (T_m) es defineix com la temperatura a la qual només el 50 % de la mostra es troba en la forma de doble cadena.

En aquest treball, s'han determinat les T_m de dúplexs obtinguts per mescla equimolar de dues cadenes senzilles. D'aquesta manera, s'han liofilitzat les quantitats corresponents de cada cadena i posteriorment s'han dissolt en el tampó aquós desitjat. Les mesures s'han realitzat en

un espectrofotòmetre Jasco, dotat de controlador de temperatura que permet la variació de la temperatura de la cubeta respecte al temps, segons un programa prèviament establert.

Las corbes de fusió s'han realitzat a una concentració de dúplex 2 μ M, utilitzant cubetes de 1 o 0.1 cm de pas de llum, en funció de les necessitats específiques de cada mostra. Pel que fa a la solució tamponada, també s'han utilitzat diferents tipus de sals depenent del cas.

Un cop dissoltes les mostres en el tampó, se sotmeten a un escalfament ràpid a 90 °C durant 5 min i, a continuació, es deixen refredar lentament a temperatura ambient, guardant-les a la nevera (4 °C) fins al moment de la seva utilització.

Per a determinar les corbes de fusió dels dúplex, es mesura la variació d'absorció a 260 nm, des de 5 °C fins a 90 °C, amb increments de temperatura de 0.5 °C/min. La T_m del dúplex correspon al punt on es produeix un canvi en el pendent de la corba enregistrada. El valor d'aquesta temperatura s'obté per tractament matemàtic de la corba, ja que la T_m ha de correspondre a un màxim a la primera derivada de la corba i a un zero a la segona derivada de la mateixa. El possible error en el valor de T_m és de ± 0.5 °C.

5 BIBLIOGRAFIA

¹ Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, **1989**.

² Caruthers, M.H.; Barone, A.D.; Beaucage, S.L.; Dodds, D.R.; Fisher, E.F.; McBride, L.J.; Matteucci, M.; Stabinsky, Z.; Tang, J-Y. *Methods in Enzimology*, Wu, R.; Grossman, L., Eds., Academic Press, **1987**, 154, pp. 287-313.

³ Brown, T.; Brown, D.J.S. In *Oligonucleotides and Analogs: a Practical Approach*, Eckstein, F., Ed., IRL Press: Oxford, **1991**, pp. 20.

⁴ *Oligonucleotide Synthesis: a Practical Approach*, Gait, M.J., Ed., IRL Press: Oxford, **1984**, pp. 126.

⁵ Chau-Wen Chou, Patrick A. Limbach. In *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, John Wiley & Sons, Inc, **2000**, 10.1-10.1.25.

⁶ a) Pieves, U.; Zürcher, W.; Moser, H.E. *Nucleic Acids Res.* **1993**, 21, 3191-3196. b) Zhu, Y.F.; Chung, C.N.; Taranenko, N.I.; Allman, S.L.; Martin, S.A.; Haff, L.; Chen, C.H. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1996**, 10, 383-388.

EXPERIMENTAL CAPÍTOL 1

1.1 OBTENCIÓ DELS DERIVATS FOSFORAMIDIT DELS NUCLEÒSIDS MODIFICATS

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

Per a l'obtenció del derivat fosforamidit modificat amb un penjoll amb un grup tioèter, han estat necessàries cinc etapes de síntesi, amb un rendiment global del 48 %. Primerament s'ha realitzat un intent de "triazolilació", prèvia protecció de l'hidroxil 3' amb el grup TMS, que no ha donat bons resultats.

1.1.1.1 Intent d'obtenció de 5'-O-dimetoxitritil-3'-O-trimetilsilil-1-[5-metil-4-(1,2,4-triazolil)pirimidin-2(1H)-onil]-β-D-2'-desoxiribofuranòsid

S'han coevaporat 1.0 g de DMT-T (1.84 mmol) amb ACN anh. (2x10 mL). Sota atmosfera inert d'argó, s'han resuspès en 40 mL de ACN anh. i a continuació s'han afegit 0.6 mL de trimetilsilil-1,2,4-triazole (3.89 mmol, 2.1 eq), observant-se la dissolució de gran part del reactiu inicial. La reacció s'ha escalfat a 50 °C fins que s'ha dissolt tot el sòlid i, a continuació, s'ha deixat refredar la solució a temperatura ambient.

D'altra banda, s'han dissolt 1.27 g de 1,2,4-triazole (18.4 mmol, 10 eq) en 32 mL de ACN anh. i s'ha refredat a 0 °C. Tot seguit, s'han afegit pràcticament de cop 0.39 mL de POCl₃ (4.2 mmol, 2.3 eq) i 2.79 mL de TEA (20 mmol, 10.9 eq), formant-se ràpidament una pasta blanca que s'ha mantingut en agitació i a 0 °C durant 30 min.

A continuació, amb agitació constant, s'ha afegit via cànula la solució que conté el nucleòsid protegit. La mescla ha adquirit una tonalitat marronosa. Després de 3 h de reacció, s'ha eliminat el dissolvent al rotavapor. Per anàlisi del cru per ¹H-RMN i EM ES (+), s'ha determinat la presència de producte "triazolilat" entre d'altres productes secundaris de natura nucleosídica.

1.1.1.2 3'-O-*t*-butildimetilsilil-5'-O-dimetoxitritiltimidina (DMT-T-TBDMS)

S'han dissolt 2.0 g de 5'-O-dimetoxitritiltimidina (3.67 mmol), prèviament coevaporats amb ACN anh. (2x10 mL), en 25 mL de piridina anh. sota atmosfera inert d'argó. S'han afegit 830 mg de

clorur de *t*-butildimetilsilil (5.50 mmol, 1.5 eq) i 375 mg d'imidazole (5.50 mmol, 1.5 eq), i s'ha deixat reaccionar a temperatura ambient. Al cap de 6 h, s'han afegit 1.5 eq més de clorur de *t*-butildimetilsilil i d'imidazole i s'ha mantingut la reacció tota una nit. Una vegada consumit el reactiu inicial (control per CCF, DCM/MeOH 9:1), s'han afegit 10 mL de metanol per tal d'hidrolitzar l'excés d'agent sililant. Al cap de 10 min s'ha evaporat el residu a sequedat i s'ha redissolt en AcOEt. La fase orgànica resultant s'ha rentat successivament amb una solució aquosa d'àcid tartàric al 10 % (2x), amb una solució aquosa de bicarbonat de sodi al 10 % (2x) i amb una solució saturada de NaCl. Finalment s'ha assecat amb Na₂SO₄ anh., filtrat i evaporat a sequedat. S'han obtingut 2,29 g d'un sòlid blanc (rendiment: 95 %).

En alguns casos, degut a la presència de restes de reactiu inicial, el producte desitjat s'ha aïllat per cromatografia en gel de sílice. S'ha empaquetat la columna amb hexà/DCM 1:1, s'ha mantingut un 2 % de trietilamina constant al llarg de tota la cromatografia, i s'ha eluït amb quantitats creixents de DCM per tal d'augmentar la polaritat de la fase mòbil (fins al 100 % de DCM). En aquests casos, el rendiment global del procés ha estat del 89 %.

Caracterització del producte:

R_f (DCM/MeOH 9:1): 0.79.

¹H RMN (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 9.69 (s, 1H; H-N3), 7.70 (s, 1H; H-C6), 7.46-7.21 (m, 9H; H-fenil), 6.87 (d, ³J(H, H)=8.8 Hz, 4H; H-fenil), 6.40 (m, 1H; H-C1'), 4.55 (m, 1H; H-C3'), 4.00 (m, 1H; H-C4'), 3.81 (s, 6H; CH₃O), 3.51 (m, 1H; H-C5'), 3.30 (m, 1H; H'-C5'), 2.30 (m, 2H; H, H'-C2'), 1.53 (s, 3H; CH₃-C5), 0.86 (s, 9H; CH₃-CSi), 0.06 (s, 3H; CH₃-Si), 0.00 (s, 3H; CH₃-Si).

¹³C RMN (50 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 164.3 (C4), 158.7 (Cfenil), 150.6 (C2), 144.4 (Cfenil), 135.7 (C6), 135.5, 135.4 (Cfenil), 130.1, 128.2, 128.0, 127.2, 113.3 (Cfenil-H), 111.1 (C5), 86.8, 84.9 (Cq, C1', C4'), 72.1 (C3'), 63.0 (C5'), 55.3 (CH₃O), 41.7 (C2'), 25.9 (CH₃-CSi), 18.1 (CqSi), 12.1 (CH₃-C5), -4.5, -4.7 (CH₃Si).

EM FAB (NBA, mode positiu): 659.3 [M+H]⁺, 681.4 [M+Na]⁺ (pes molecular teòric M: 658.4).

1.1.1.3 3'-O-*t*-butildimetilsilil-5'-O-dimetoxitritil-1-[5-metil-4-(1,2,4-triazolil)pirimidin-2(1*H*)-onil]-β-D-2'-desoxiribofuranòsid (DMT-T^{triaz}-TBDMS)

S'han afegit 735 mg de 1,2,4-triazole (10.64 mmol, 7 eq) a 30 mL de ACN anh. a 0 °C. A la suspensió resultant, s'han addicionat 3.2 mL de TEA anh. (22.80 mmol, 15 eq) i, un cop dissolt el 1,2,4-triazole, s'han afegit 300 μL de POCl₃ (3.04 mmol, 2 eq). El precipitat blanc format s'ha anat enfosquant a poc a poc, fins a obtenir una pasta marronosa, i s'ha mantingut en agitació i a 0 °C durant 30 min més.

En el mínim volum de ACN anh. s'han dissolt, sota atmosfera inert d'argó, 1.0 g de 3'-O-*t*-butildimetilsilil-5'-O-dimetoxitritilimidina (1.52 mmol), prèviament assecats per coevaporació

amb ACN anh. (2x10 mL). Aquesta solució s'ha afegit gota a gota sobre la pasta marronosa i s'ha deixat reaccionar amb agitació i a temperatura ambient al llarg d'una nit. Un cop finalitzada la reacció (control per CCF, AcOEt), la mescla de reacció s'ha refredat a 0 °C i s'han afegit 5 mL de TEAB 1 M, observant-se la dissolució total del precipitat. Després de 10 min en agitació a 0 °C, la solució marronosa s'ha concentrat al rotavapor. A continuació s'ha addicionat AcOEt i TEAB 1 M, s'han separat les fases i s'ha rentat la fase orgànica amb TEAB 1 M (2x) i amb una solució saturada de NaCl (2x). La fase orgànica s'ha assecat amb Na₂SO₄ anh., filtrat i evaporat a sequedat en el rotavapor. S'han obtingut 1.06 g d'un sòlid de color marró clar de puresa suficient per dur a terme la següent reacció (rendiment: 98 %).

Caracterització del producte:

R_f (AcOEt): 0.55 (fluorescent).

¹H RMN (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 9.34 (s, 1H; H5-triazolil), 8.52 (s, 1H; H-C6), 8.13 (s, 1H; H3-triazolil), 7.49-7.27 (m, 9H; H-fenil), 6.89 (d, ³J(H, H)= 9 Hz, 4H; H-fenil), 6.35 (m, 1H; H-C1'), 4.57 (m, 1H; H-C3'), 4.14 (m, 1H; H-C4'), 3.84 (s, 6H; CH₃O), 3.67 (m, 1H; H-C5'), 3.37 (m, 1H; H'-C5'), 2.72 (m, 1H; H-C2'), 2.38 (m, 1H; H'-C2'), 2.00 (s, 3H; CH₃-C5), 0.86 (s, 9H; CH₃-CSi), 0.07 (s, 3H; CH₃-Si), 0.00 (s, 3H; CH₃-Si).

¹³C RMN (50 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 158.4 (Cfenil), 157.7 (C4), 153.5 (C2), 152.9, 146.4 (CH-triazolil), 144.6 (C6), 143.8, 134.8 (Cfenil), 129.7, 127.8, 127.7, 126.8, 112.9 (Cfenil-H), 105.3 (C5), 87.3, 86.8 (C1', C4'), 86.5 (Cq), 70.4 (C3'), 61.7 (C5'), 54.9 (CH₃O), 50.0 (C2'), 25.4 (CH₃-CSi), 17.6 (CqSi), 16.2 (CH₃-C5), -4.8, -5.2 (CH₃Si).

EM ES (mode positiu): 710.3 [M+H]⁺, 732.0 [M+Na]⁺, 303.1 [DMT]⁺ (pes molecular teòric M: 709.4).

1.1.1.4 3'-O-*t*-butildimetilsilil-5'-O-dimetoxitritil-1-[5-metil-N⁴-(2-metiltioetil)]-2'-desoxicitidina (DMT-T^{tioèter}-TBDMS)

S'han dissolt 1.0 g de DMT-T^{triaz}-TBDMS (1.41 mmol), prèviament assecats per coevaporació amb ACN anh., en 20 mL de DMF lliure d'amines (la qual s'ha fet bombollejar amb un corrent de N₂, i sobre tamís molecular). A continuació s'han afegit 1.2 mL de DIEA (7.05 mmol, 5 eq) i 200 µL de 2-(metiltio)etilamina (2.11 mmol, 1.5 eq) sota atmosfera inert d'argó i s'ha deixat reaccionar a 100 °C durant 3 h (el matràs s'adapta a un refrigerant Dimroth per evitar l'evaporació de l'amina reaccionant). S'ha seguit la reacció per CCF (AcOEt).

Després d'eliminar part del dissolvent al rotavapor, el residu resultant s'ha repartit entre AcOEt i una solució aquosa d'àcid tartàric al 10 %. La fase orgànica separada s'ha rentat successivament amb una solució aquosa d'àcid tartàric al 10 % (3x), una solució aquosa de bicarbonat de sodi al 10 % (3x) i una solució saturada de NaCl. Finalment la fase orgànica s'ha assecat amb Na₂SO₄ anh., filtrat i evaporat a sequedat. El producte desitjat s'ha aïllat per

cromatografia en columna de gel de sílice, utilitzant com a eluent una mescla d'hexà/AcOEt 1:1 amb un 2 % de TEA, i augmentant la polaritat amb quantitats creixents de AcOEt fins a eluir amb la mescla AcOEt + 2 % de TEA. S'han obtingut 835 mg de producte (rendiment: 81 %).

Caracterització del producte:

R_f (AcOEt): 0.60.

$^1\text{H RMN}$ (200 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.78 (s, 1H; H-C6), 7.48-7.25 (m, 9H; H-fenil), 6.87 (d, $^3J(\text{H}, \text{H}) = 6$ Hz, 4H; H-fenil), 6.41 (m, 1H; H-C1'), 5.75 (m, 1H; NH-C4), 4.53 (m, 1H; H-C3'), 3.98 (m, 1H; H-C4'), 3.81 (s, 6H; CH_3O), 3.76 (m, 2H; $\text{CH}_2\text{-N}$), 3.57 (m, 1H; H-C5'), 3.28 (m, 1H; H'-C5'), 2.78 (m, 2H; $\text{CH}_2\text{-S}$), 2.47 (m, 1H; H-C2'), 2.25 (m, 1H; H'-C2'), 2.13 (s, 3H; $\text{CH}_3\text{-S}$), 1.56 (s, 3H; $\text{CH}_3\text{-C5}$), 0.84 (s, 9H; $\text{CH}_3\text{-CSi}$), 0.03 (s, 3H; $\text{CH}_3\text{-Si}$), -0.03 (s, 3H; $\text{CH}_3\text{-Si}$).

$^{13}\text{C RMN}$ (50 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 163.1 (C4), 158.6 (Cfenil), 156.2 (C2), 144.5, 135.6 (Cfenil), 137.1 (C6), 130.1, 128.2, 127.9, 127.0, 113.2 (Cfenil-H), 101.9 (C5), 86.5 (Cq), 86.1, 85.7 (C1', C4'), 71.2 (C3'), 62.5 (C5'), 55.2 (CH_3O), 42.1 (C2'), 38.8, 33.5 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 25.7 ($\text{CH}_3\text{-CSi}$), 17.9 (CqSi), 14.8 ($\text{CH}_3\text{-S}$), 12.5 ($\text{CH}_3\text{-C5}$), -4.6, -5.0 (CH_3Si).

EM ES (mode positiu): 732.9 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 303.4 $[\text{DMT}]^+$ (pes molecular teòric M: 731.5).

1.1.1.5 5'-O-dimetoxitritil-1-[5-metil- N^4 -(2-metiltioetil)]-2'-desoxicitidina (DMT-T^{tioèter})

S'han dissolt 655 mg de DMT-T^{tioèter}-TBDMS (0.90 mmol) en 10 mL de THF anh. i, sota atmosfera inert d'argó, s'han afegit 570 mg de TBAF·3H₂O (1.79 mmol, 2 eq). La reacció s'ha mantingut en agitació constant a temperatura ambient durant 2 h, seguint-se l'evolució per CCF (AcOEt/MeOH 10:0.2). Un cop finalitzada, s'han afegit 2 mL de metanol i al cap de 5 min el residu s'ha evaporat a sequedat. El cru s'ha purificat per cromatografia en columna de gel de sílice amb un 2 % constant de TEA), carregant el producte en sec i eluint amb AcOEt i quantitats creixents de metanol, fins a una mescla de AcOEt/MeOH 94:6. Per evaporació de les fraccions corresponents, s'han obtingut 464 mg de producte desitjat (rendiment: 84 %).

Caracterització del producte:

R_f (DCM/MeOH 9:1): 0.27.

$^1\text{H RMN}$ (200 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.73 (s, 1H; H-C6), 7.44-7.21 (m, 9H; H-fenil), 6.83 (d, $^3J(\text{H}, \text{H}) = 8$ Hz, 4H; H-fenil), 6.48 (m, 1H; H-C1'), 5.42 (m, 1H; NH-C4), 4.60 (m, 1H; H-C3'), 4.15 (m, 1H; H-C4'), 3.79 (s, 6H; CH_3O), 3.73 (m, 2H; $\text{CH}_2\text{-N}$), 3.41 (m, 2H; H, H'-C5'), 2.74 (m, 2H; $\text{CH}_2\text{-S}$), 2.64 (m, 1H; H-C2'), 2.23 (m, 1H; H'-C2'), 2.10 (s, 3H; $\text{CH}_3\text{-S}$), 1.49 (s, 3H; $\text{CH}_3\text{-C5}$).

$^{13}\text{C RMN}$ (50 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 163.0 (C4), 158.6 (Cfenil), 156.4 (C2), 144.6, 135.6 (Cfenil), 137.6 (C6), 130.1, 128.2, 128.0, 127.0, 113.3 (Cfenil-H), 102.3 (C5), 86.7 (Cq), 86.1 (C1', C4'),

72.1 (C3'), 63.8 (C5'), 55.4 (CH₃O), 42.2 (C2'), 38.6, 33.6 (CH₂-CH₂), 14.9 (CH₃-S), 12.5 (CH₃-C5).

EM ES (mode positiu): 618.2 [M+H]⁺, 303.1 [DMT]⁺ (pes molecular teòric M: 617.3).

1.1.1.6 (2-cianoetil)-*N,N*-diisopropilfosforamidit de 3'-O-{5'-O-dimetoxitritil-1-[5-metil-*N*⁴-(2-metiltioetil)]}-2'-desoxicitidina

S'han dissolt 475 mg de DMT-T^{tioèter} (0.77 mmol), prèviament coevaporats amb ACN anh. (3x5 mL), en 3 mL de DCM anh. sota atmosfera inert d'argó. A continuació s'han afegit 392 µL de DIEA (2.31 mmol, 3 eq), 218 µL de cloro(2-cianoetoxi)-*N,N*-diisopropilaminofosfina (0.92 mmol, 1.2 eq) i 1-2 mL de DCM anh., i s'ha deixat reaccionar a temperatura ambient amb agitació constant. La reacció s'ha seguit per HPLC en fase reversa i, un cop desaparegut el producte de partida (típicament 1-2 h), s'ha aturat per addició de 3 mL de metanol. La mescla resultant s'ha evaporat a sequedat i l'oli groc obtingut s'ha redissolt en AcOEt i s'ha extret amb una solució aquosa de bicarbonat de sodi al 10 % (2x) i amb una solució saturada de NaCl. La fase orgànica s'ha assecat amb Na₂SO₄ anh., filtrat i evaporat a sequedat, obtenint-se una escuma groga. Finalment el fosforamidit s'ha precipitat sobre 10 mL d'hexà fred (dissolent-lo en 0.5 mL de DCM) i s'ha recuperat després de centrifugar i eliminar el dissolvent per decantació. El residu sòlid, de color groguenc, s'ha assecat al buit i s'ha guardat sota atmosfera inert d'argó a -20 °C. S'han obtingut 520 mg de producte (rendiment: 83 %).

Caracterització del producte:

R_f (DCM/AcOEt/TEA 45:45:10): 0.49, 0.56.

³¹P RMN (81 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 146.7, 146.1.

HPLC (columna Nucleosil C₈, 10 µm, eluent A: NH₄OAc 0.01 M, eluent B: ACN; gradient lineal de 50 a 100 % de B en 30 min): t_R = 22.5 i 23.5 min.

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

Per a l'obtenció del derivat fosforamidit modificat amb un penjoll amb un grup imidazole, han estat necessàries cinc etapes de síntesi, amb un rendiment global del 77 %. Les dues primeres etapes són comunes a la ruta sintètica d'obtenció del derivat fosforamidit amb un grup tioèter.

1.1.2.1 3'-O-*t*-butildimetilsilil-5'-O-dimetoxitritil-1-{5-metil-*N*⁴-[2-(4-imidazolil)etil]}-2'-desoxicitidina (DMT-T^{imidazole}-TBDMS)

S'han dissolt 1.0 g de DMT-T^{triaz}-TBDMS (1.41 mmol), prèviament assecats per coevaporació amb ACN anh., en 20 mL de DMF anh. lliure d'amines. S'han afegit 1.2 mL de DIEA (7.05

mmol, 5 eq) i 235 mg d'histamina (2.11 mmol, 1.5 eq) sota atmosfera inert d'argó i s'ha deixat reaccionar a 100 °C durant 4 h. A continuació s'ha eliminat parcialment el dissolvent al rotavapor i la barreja s'ha repartit entre AcOEt i una solució aquosa d'àcid tartàric al 10 %. La fase orgànica decantada s'ha rentat successivament amb una solució aquosa d'àcid tartàric al 10 % (3x), amb una solució aquosa de bicarbonat de sodi al 10 % (3x) i amb una solució saturada de NaCl. Finalment s'ha assecat amb Na₂SO₄ anh., filtrat i evaporat el residu a sequedat. S'han obtingut 1.05 g de producte amb un grau de puresa acceptable (rendiment: 99 %).

Caracterització del producte:

R_f (DCM/MeOH 8:2): 0.57.

¹H RMN (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.80 (s, 1H; H-C6), 7.67 (s, 1H; H2-Im), 7.54-7.30 (m, 9H; H-fenil), 6.92-6.88 (m, 5H; 4H-fenil, H5-Im), 6.45 (m, 1H; H-C1'), 4.56 (m, 1H; H-C3'), 4.05 (m, 1H; H-C4'), 3.86 (s, 6H; CH₃O), 3.78 (m, 2H; CH₂-N), 3.58 (m, 1H; H-C5'), 3.32 (m, 1H; H'-C5'), 2.95 (m, 2H; CH₂-Im), 2.45 (m, 1H; H-C2'), 2.30 (m, 1H; H'-C2'), 1.57 (s, 3H; CH₃-C5), 0.87 (s, 9H; CH₃-CSi), 0.06 (s, 3H; CH₃-Si), 0.00 (s, 3H; CH₃-Si).

¹³C RMN (50 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 163.3 (C4), 158.7 (Cfenil), 157.1 (C2), 144.8, 135.7 (Cfenil), 136.8 (C6), 135.4 (CH-Im), 130.2, 128.3, 128.0, 127.3, 113.3 (Cfenil-H), 102.8 (C5), 86.8 (Cq), 86.3, 85.8 (C1', C4'), 71.4 (C3'), 62.8 (C5'), 55.4 (CH₃O), 42.3 (C2'), 41.8 (CH₂-N), 26.4 (CH₂-Im), 25.9 (CH₃-CSi), 18.3 (CqSi), 12.8 (CH₃-C5), -4.6, -5.0 (CH₃Si).

EM ES (mode positiu): 752.7 [M+H]⁺, 303.5 [DMT]⁺ (pes molecular teòric M: 751.5).

1.1.2.2 5'-O-dimetoxitritil-1-{5-metil-N⁴-[2-(4-imidazolil)etil]}-2'-desoxicitidina (DMT-T^{imidazole})

S'han dissolt 1.08 g de DMT-T^{imidazole}-TBDMS (1.44 mmol) en el mínim volum de THF anh. i, sota atmosfera inert d'argó, s'han afegit 0.91 mg de TBAF·3H₂O (2.87 mmol, 2 eq). S'ha mantingut la reacció en agitació a temperatura ambient durant 3-4 h, seguint l'evolució per CCF (DCM/MeOH 8:2). Posteriorment, s'han afegit 4 mL de metanol, evaporant el residu a sequedat al cap de 5 min. El cru s'ha purificat per cromatografia en columna de gel de sílice (amb un 2 % de TEA constant), eluint amb DCM i quantitats creixents de metanol, fins a una mescla de DCM/MeOH 92:8. Per evaporació de les fraccions corresponents, s'han obtingut 779 mg del producte desitjat (rendiment: 85 %).

Caracterització del producte:

R_f (DCM/MeOH 8:2): 0.45.

¹H RMN (200 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 7.74 (s, 1H; H-C6), 7.63 (s, 1H; H2-Im), 7.48-7.26 (m, 9H; H-fenil), 6.89-6.85 (m, 5H; 4H-fenil, H5-Im), 6.39 (m, 1H; H-C1'), 4.56 (m, 1H; H-C3'), 4.05 (m,

^1H ; H-C4'), 3.77 (s, 6H; CH₃O), 3.69 (m, 2H; CH₂-N), 3.46 (m, 1H; H-C5'), 3.36 (m, 1H; H'-C5'), 2.91 (m, 2H; CH₂-Im), 2.36 (m, 2H; H-C2'), 1.48 (s, 3H; CH₃-C5).

^{13}C RMN (50 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 165.0 (C4), 160.2 (Cfenil), 159.0 (C2), 146.0, 138.2 (Cfenil), 136.9 (C6), 136.0 (C-Im), 135.0 (CH-Im), 131.4, 129.4, 128.9, 128.0, 114.2 (Cfenil-H), 119.0 (CH-Im), 105.0 (C5), 88.0 (Cq), 87.6, 87.1 (C1', C4'), 72.5 (C3'), 65.0 (C5'), 55.7 (CH₃O), 42.3 (C2'), 42.0 (CH₂-N), 27.1 (CH₂-Im), 12.9 (CH₃-C5).

EM ES (mode positiu): 638.0 [M+H]⁺, 303.1 [DMT]⁺ (pes molecular teòric M: 637.3).

1.1.2.3 (2-cianoetil)-*N,N*-diisopropilfosforamidit de 3'-O-{5'-O-dimetoxitritil-1-{5-metil-*N*⁴-[2-(4-imidazolil)etil]}}-2'-desoxicitidina

S'han suspès 500 mg de DMT-^{imidazole} (0.78 mmol), prèviament coevaporats amb ACN anh. (3x5 mL), en 0.5 mL de ACN anh. i sota atmosfera inert d'argó s'han addicionat 533 μL de DIEA (3.13 mmol, 4 eq) i 371 μL de cloro(2-cianoetoxi)-*N,N*-diisopropilaminofosfina (1.57 mmol, 2 eq). Per tal d'ajudar a solubilitzar el nucleòsid, s'han afegit 3 mL de DCM anh., deixant reaccionar a temperatura ambient amb agitació constant. La reacció s'ha seguit per HPLC i al cap de 1-2 h s'ha aturat, per addició de 3 mL de metanol i rotavaporant el residu a sequedat. L'oli groc obtingut s'ha redissolt en AcOEt i la fase orgànica s'ha extret amb una solució aquosa de bicarbonat de sodi al 10 % (3x) i amb una solució saturada de NaCl (3x). Finalment la fase orgànica s'ha assecat amb Na₂SO₄ anh., filtrat i evaporat a sequedat. El fosforamidit s'ha precipitat sobre 10 mL d'hexà fred (dissolent-lo en 0.5 mL de DCM) i s'ha recuperat després de centrifugar i eliminar el dissolvent per decantació. El residu sòlid, de color groguenc, s'ha assecat al buit i s'ha guardat sota atmosfera inert d'argó a -20 °C. S'han obtingut 624 mg de producte (rendiment: 98 %).

Caracterització del producte:

R_f (DCM/AcOEt/TEA 45:45:10): 0.40.

^{31}P RMN (81 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 146.6, 146.1.

HPLC (columna Nucleosil C₈, 10 μm , eluent A: NH₄OAc 0.01 M, eluent B: ACN; gradient lineal de 50 a 100 % de B en 30 min): t_R = 23.1 i 24.2 min.

1.2 OLIGONUCLEÒTIDS MODEL QUE INCORPOREN LES MODIFICACIONS X^S I/O X^I

L'elongació de les cadenes s'ha realitzat en un sintetitzador automàtic, seguint la metodologia del fosfit triester, tal i com s'indica a l'apartat 3 de Materials i Mètodes. Els nucleòsids 5'-dimetoxitritil-3'-fosforamidit (dA^{Bz}, dC^{Bz}, dG^{Bu}, T, X^{S*}, X^{I*}), prèviament assecats al dessecador, s'han dissolt en ACN anh. a una concentració de 0.1 M.

1.2.1 Síntesi de 5'dX^STTTT i 5'dTTX^STT

Les síntesis de 5'dX^STTTT i 5'dTTX^STT s'han realitzat a escala 0.2 μmol sobre suport de boles de vidre (CPG), emprant reactors comercials amb el primer nucleòsid ancorat a resina i utilitzant el cicle de síntesi estàndard a escala petita, resumit a l'apartat 3.2 de Materials i Mètodes (Taula 1).

1.2.1.1 Escissió i desprotecció dels oligonucleòtids

Per tal d'avaluar si el nucleòtid modificat és sensible a les condicions bàsiques de l'etapa d'escissió i desprotecció amb amoníac, s'han tractat tres alíquotes de cada lot d'oligonucleotidil-resina amb NH₃ conc. aquós a diferents temps i temperatura, tal i com s'indica a la Taula 1.1.

alíquota	temperatura	temps
1	ambient	1 h
2	ambient	7 h
3	55 °C	12 h

Taula 1.1. Diferents condicions d'escissió i desprotecció amb NH₃ conc. aquós.

L'anàlisi per HPLC dels corresponents crus ha indicat que no hi ha diferències significatives. El tret més característic és la presència dels oligonucleòtids amb el grup tioèter oxidat quantitativament a la forma sulfòxid. També s'han identificat alguns productes de delecó. Els diferents pics cromatogràfics s'han col·lectat, liofilitzat i caracteritzat per EM MALDI-TOF, tal i com s'indica a la Taula 1.2.

* X^S i X^I fan referència, en aquest cas, als corresponents nucleòsids modificats 5'-dimetoxitritil-3'-fosforamidit. Enmig d'una seqüència oligonucleotídica, s'entén que simbolitzen el nucleòtid modificat.

	compost	t _R (min)	[M-H] ⁻	problema
⁵ dX ^S TTTT	⁵ dX ^S TTTToxid.	22.3	1547.1	oxidació
	⁵ dX ^S TTTToxid.	22.3*	1243.2	bloqueig
	⁵ dTTTT	23.0	1153.4	acoblament X ^S
	⁵ dTTT	23.3	849.5	acoblament T
⁵ dTTX ^S TT	⁵ dTTX ^S TToxid.	18.6, 18.8	1547.5	oxidació
	⁵ dTTX ^S TTsobreoxid.	19.5	1563.4	oxidació
	⁵ dTX ^S TToxid.	19.9	1243.1	acoblament T

Taula 1.2. Masses detectades (MALDI-TOF) en els crus. * Està solapat amb el producte ⁵dX^STTTToxid.

1.2.1.2 Reducció de ⁵dX^STTTToxid. i ⁵dTTX^STToxid.

Per a la reducció del grup sulfòxid a tioèter s'ha dissolt el cru d'escissió corresponent (~3 OD₂₆₀) en aigua, de manera que la concentració fos 30 µM. A continuació, s'ha afegit un excés de *N*-metilmercaptoacetamida (60 eq, 5 µL) i s'ha mantingut la mescla de reacció a 37 °C i sota atmosfera d'argó. L'evolució de la reacció de reducció s'ha seguit per HPLC en fase reversa (columna Kromasil C₁₈, 10 µm, eluent A: NH₄OAc 0.01 M, eluent B: H₂O/ACN 1:1; gradient lineal de 5 a 35 % de B en 30 min) i per EM MALDI-TOF. La reacció s'ha aturat al cap de 5 dies, quan la comparació dels perfils cromatogràfics ha mostrat que s'ha arribat a una situació estacionària.

En el cas del cru de ⁵dX^STTTT, l'oligonucleòtid oxidat de t_R 18.8 min s'ha anat transformant en el pic corresponent al producte reduït de t_R 22.8 min. Per a ⁵dTTX^STT, l'oligonucleòtid oxidat de t_R 18.6 min i 18.8 min (doble pic, ja que en aquest cas se separen els dos diastereòmers), s'ha transformat en el producte reduït de t_R 22.3 min.

Un cop acabada la reducció, el cru s'ha concentrat al liofilitzador i les restes orgàniques de l'agent reductor s'han eliminat parcialment per purificació amb una columna NAP (apartat 2.3.3.3 de Materials i Mètodes).

1.2.1.3 Purificació de ⁵dX^STTTT i ⁵dTTX^STT

Un cop eliminades gran part de restes orgàniques de l'agent reductor, s'ha procedit a l'aïllament dels oligonucleòtids mitjançant HPLC de fase reversa (columna Kromasil C₁₈, 10 µm, eluent A: NH₄OAc 0.01 M, eluent B: H₂O/ACN 1:1; gradient lineal de 5 a 35 % de B en 30 min). Els oligonucleòtids purs s'han quantificat i s'ha calculat el rendiment total (síntesi, escissió, reducció i purificació). Els oligonucleòtids ⁵dX^STTTT i ⁵dTX^STT també han estat aïllats i caracteritzats, ja que han estat d'utilitat en els assajos enzimàtics posteriors. A la Taula 1.3 es mostren els resultats.

oligonucleòtid	quantitat	rendiment
$5'$ dX ^S TTTT	0.84 OD ₂₆₀	11 %
$5'$ dX ^S TTT	0.53 OD ₂₆₀	-
$5'$ dTTX ^S TT	1.37 OD ₂₆₀	18 %
$5'$ dTX ^S TT	0.65 OD ₂₆₀	-

Taula 1.3. Quantitats obtingudes dels diferents productes i rendiment total de les síntesis.

Caracterització de $5'$ dX^STTTT i $5'$ dTTX^STT

EM MALDI-TOF: matriu 2,4,6-THAP, mode negatiu, reflectró; m/z correspon a $[M-H]^-$. HPLC: columna Kromasil C₁₈, 10 μ m, eluent A: NH₄OAc 0.01 M, eluent B: H₂O/ACN 1:1; gradient lineal de 10 a 40 % de B en 30 min.

oligonucleòtid	pes molecular teòric	$[M-H]^-$	t_R (min)
$5'$ dX ^S TTTT	1532.2	1531.1	17.5
$5'$ dX ^S TTT	1228.0	1227.5	18.0
$5'$ dTTX ^S TT	1532.2	1530.9	17.3
$5'$ dTX ^S TT	1228.0	1227.6	17.7

Taula 1.4. Caracterització dels oligonucleòtids.

1.2.1.4 Digestió enzimàtica de $5'$ dX^STTT

L'oligonucleòtid $5'$ dX^STTT s'ha hidrolitzat enzimàticament, tant per tractament amb una 3'-SVPD) com amb una 5'-exonucleasa (SpPD), per tal d'avaluar si el nucleòtid modificat (X^S) és reconegut per aquests enzims. S'ha emprat 0.1 OD₂₆₀ d'oligonucleòtid i s'ha seguit el procediment descrit a l'apartat 3.7 de Materials i Mètodes. Mitjançant la fosfatasa alcalina, els nucleòtids obtinguts perden el grup fosfat, de manera que s'obté una mescla dels diferents nucleòsids de l'oligonucleòtid. L'anàlisi per HPLC ha mostrat la presència dels dos nucleòsids en la proporció esperada X^S/T: 1.03:2.90 (SVPD) i 1.02:2.95 (SpPD). En les condicions cromatogràfiques emprades, el patró de nucleòsid modificat amb el grup tioèter ha eluït a un t_R 24.7 min i ha presentat un màxim d'absorció a 277 nm.

1.2.2 Síntesi de $5'dX^S$ CCCC, $5'dX^S$ AAAA, $5'dX^S$ GGGG i $5'dX^S$ GGGGTT

S'han realitzat les síntesis automàtiques a escala 1 μ mol sobre boles de vidre (CPG), emprant reactors comercials i el cicle de síntesi estàndard resumit a l'apartat 3.2 de Materials i Mètodes (Taula 2).

Per a l'escissió i desprotecció dels oligonucleòtids, s'ha seguit el procediment descrit a l'apartat 3.4 de Materials i Mètodes. Posteriorment, s'han analitzat els crús resultants mitjançant EM MALDI-TOF i HPLC de fase reversa (columna Kromasil C₁₈, 10 μ m, eluent A: NH₄OAc 0.01 M, eluent B: H₂O/ACN 1:1; gradient lineal de 10 a 40 % de B en 30 min). En general, s'han obtingut uns crús de síntesi amb el producte desitjat en forma oxidada de manera majoritària.

La reducció dels oligonucleòtids s'ha realitzat amb un excés de *N*-metilmercaptoacetamida, seguint el mateix procediment que per a $5'dX^S$ TTTT (apartat 1.2.1.2), i analitzant per HPLC s'ha observat una reducció en tots els casos superior al 80 %.

Els crús de reducció s'han purificat mitjançant MPLC amb una columna de vidre (22 x 2 cm) farcida amb fase reversa de sílice C₁₈ Vydac. S'ha utilitzat un gradient d'elució de 0 a 35 % de B, essent A: 0.05 M NH₄OAc i B: 65 % 0.05 M NH₄OAc i 35 % ACN/H₂O 1:1 (v/v). La columna s'ha equilibrat prèviament amb 300 mL de tampó A i l'elució s'ha efectuat utilitzant un gradientòmetre, emprant 600 mL de cada dissolvent. Les fraccions corresponents al producte pur per HPLC en fase reversa s'han ajuntat i liofilitzat.

oligonucleòtid	quantitat	rendiment
$5'dX^S$ CCCC	8.03 OD ₂₆₀	23 %
$5'dX^S$ AAAA	3.29 OD ₂₆₀	5 %
$5'dX^S$ GGGG	-	no s'ha pogut aïllar, problemes de solubilitat
$5'dX^S$ GGGGTT	1.84 OD ₂₆₀	3 %

Taula 1.5. Quantitats obtingudes dels diferents oligonucleòtids i rendiment total de les síntesis.

Caracterització de $5'dX^S$ CCCC, $5'dX^S$ AAAA, $5'dX^S$ GGGG i $5'dX^S$ GGGGTT

EM MALDI-TOF: matriu 2,4,6-THAP, mode negatiu, reflectró; *m/z* correspon a [M-H].

HPLC: columna Kromasil C₁₈, 10 μ m, eluent A: NH₄OAc 0.01 M, eluent B: H₂O/ACN 1:1; gradient lineal de 5 a 35 % de B en 30 min.

Digestió enzimàtica: SVPD (3'-exonucleasa) i fosfatasa alcalina, seguint el mètode 1 de l'apartat 3.7 de Materials i Mètodes. A la Taula 1.6 s'expressen els resultats, on dN fa referència al nucleòsid dC o dA, en funció de l'oligonucleòtid.

oligonucleòtid	pes molecular teòric	[M-H] ⁻	t _R (min)*	X ^S :dN
⁵ dX ^S CCCC	1472.1	1470.2	19.3 (16.0 ox)	1.03:3.97
⁵ dX ^S AAAA	1568.2	1566.2	17.4 (13.9 ox)	1.22:3.78
⁵ dX ^S GGGG	1632.2	1629.7	17.0	-
⁵ dX ^S GGGGTT	2240.6	2239.0	16.1	-

Taula 1.6. Caracterització dels oligonucleòtids. * Entre parèntesis s'inclouen els t_R corresponents als oligonucleòtids en forma oxidada.

1.2.3 Síntesi de ⁵dX^ITTTT, ⁵dX^ITTCT, ⁵dX^ITTAT i ⁵dX^ITTGT

S'han realitzat les síntesis automàtiques en fase sòlida a escala 1 μmol sobre boles de vidre (CPG), emprant reactors comercials i el cicle de síntesi estàndard resumit a l'apartat 3.2 de Materials i Mètodes (Taula 2).

Per a l'escissió i desprotecció dels oligonucleòtids, s'ha seguit el procediment descrit a l'apartat 3.4 de Materials i Mètodes. Posteriorment, s'han analitzat els crus resultants mitjançant EM MALDI-TOF i HPLC de fase reversa (columna Kromasil C₁₈, 10 μm, eluent A: NH₄OAc 0.01 M, eluent B: H₂O/ACN 1:1; gradient lineal de 5 a 35 % de B en 30 min). La síntesi de ⁵dX^ITTTT ha donat lloc majoritàriament al producte desitjat, incorporant-se el nucleòsid modificat amb un anell imidazòlic de forma quantitativa. Les síntesis de ⁵dX^ITTNT (on N = dC, dA o dG) han donat majoritàriament el producte desitjat, tot i que la incorporació de X^I no ha estat quantitativa (de l'ordre del 50-60 %), i per tant s'han detectat els corresponents productes de delecció (⁵dTTNT).

Els crus d'escissió i desprotecció s'han purificat mitjançant MPLC amb una columna de vidre (22 x 2 cm) farcida amb fase reversa de sílice C₁₈ Vydac. S'ha utilitzat un gradient d'elució de 0 a 35 % de B, essent A: 0.05 M NH₄OAc i B: 65 % 0.05 M NH₄OAc i 35 % ACN/H₂O 1:1 (v/v). La columna s'ha equilibrat prèviament amb 300 mL de tampó A i el gradient s'ha efectuat mitjançant un gradientòmetre, emprant 600 mL de cada dissolvent. Les fraccions corresponents al producte pur per HPLC en fase reversa s'han ajuntat i liofilitzat.

oligonucleòtid	quantitat	rendiment
$5'dX^lTTTT$	10.92 OD ₂₆₀	28 %
$5'dX^lTTCT$	6.08 OD ₂₆₀	16 %
$5'dX^lTTAT$	10.30 OD ₂₆₀	23 %
$5'dX^lTTGT$	10.90 OD ₂₆₀	22 %

Taula 1.7. Quantitats obtingudes dels diferents oligonucleòtids i rendiment global de les síntesis.

Caracterització de $5'dX^lTTTT$, $5'dX^lTTCT$, $5'dX^lTTAT$ i $5'dX^lTTGT$

EM MALDI-TOF: matriu 2,4,6-THAP, mode negatiu, reflectró; m/z correspon a $[M-H]^-$.

HPLC: columna Kromasil C₁₈, 10 µm, eluent A: NH₄OAc 0.01 M, eluent B: H₂O/ACN 1:1; gradient lineal de 10 a 30 % de B en 20 min.

oligonucleòtid	pes molecular teòric	$[M-H]^-$	t_R (min)
$5'dX^lTTTT$	1552.1	1550.5	19.1*
$5'dX^lTTCT$	1537.1	1535.4	13.7
$5'dX^lTTAT$	1561.2	1559.4	11.2
$5'dX^lTTGT$	1577.1	1575.4	12.6

Taula 1.8. Caracterització dels oligonucleòtids. * Gradient lineal de 5 a 35 % de B en 30 min.

1.2.3.1 Digestió enzimàtica de $5'dX^lTTTT$

L'oligonucleòtid $5'dX^lTTTT$ s'ha hidrolitzat enzimàticament amb una 3'-exonucleasa (SVPD) i fosfatasa alcalina, per tal d'avaluar si el nucleòtid modificat (X^l) és reconegut per aquests enzims. S'ha seguit el mètode 1 descrit a l'apartat 3.7 de Materials i Mètodes i l'anàlisi per HPLC ha mostrat la presència dels dos nucleòsids en la proporció esperada X^l/T , 1.04:3.96 (t_R : 13.0 i 7.5 min). En les condicions cromatogràfiques emprades, el patró de nucleòsid modificat amb el grup imidazole ha eluït a un t_R 13.0 min.

1.2.4 Síntesi de $5'dX^sX^lTTTT$ i $5'dX^lX^sTTTT$

S'han realitzat les síntesis automàtiques a escala 1 µmol sobre boles de vidre (CPG), emprant reactors comercials i el cicle de síntesi estàndard resumit a l'apartat 3.2 de Materials i Mètodes (Taula 2).

Per a l'escissió i desprotecció dels oligonucleòtids, s'ha seguit el procediment descrit a l'apartat 3.4 de Materials i Mètodes. Posteriorment, s'han analitzat els crus resultants mitjançant EM MALDI-TOF i HPLC de fase reversa (columna Kromasil C₁₈, 10 µm, eluent A: NH₄OAc 0.01 M,

eluent B: H₂O/ACN 1:1; gradient lineal de 10 a 40 % de B en 30 min). En ambdós casos ha calgut una etapa de reducció del grup sulfòxid a tioèter, ja que s'ha oxidat quantitativament el penjoll de tioèter.

La reducció dels oligonucleòtids ^{5'}dX^SX^ITTTT i ^{5'}dX^IX^STTTT s'ha realitzat amb un excés de MMA, seguint el procediment descrit a l'apartat 1.2.1.2, i analitzant per HPLC s'ha observat una reducció en tots els casos superior al 80 %.

Els crús de reducció corresponents s'han purificat mitjançant MPLC amb una columna de vidre (22 x 2 cm) farcida amb fase reversa de sílice C₁₈ Vydac. S'ha utilitzat un gradient d'elució de 0 a 35 % de B, essent A: 0.05 M NH₄OAc i B: 65 % 0.05 M NH₄OAc i 35 % ACN/H₂O 1:1 (v/v). La columna s'ha equilibrat prèviament amb 300 mL de tampó A i el gradient s'ha efectuat mitjançant un gradientòmetre, emprant 600 mL de cada dissolvent. Les fraccions corresponents al producte pur per HPLC en fase reversa s'han ajuntat i liofilitzat.

oligonucleòtid	quantitat	rendiment
^{5'} dX ^S X ^I TTTT	5.56 OD ₂₆₀	12 %
^{5'} dX ^I X ^S TTTT	6.49 OD ₂₆₀	14 %

Taula 1.9. Quantitats obtingudes dels diferents oligonucleòtids i rendiment total de les síntesis.

Caracterització de ^{5'}dX^SX^ITTTT i ^{5'}dX^IX^STTTT

EM MALDI-TOF: matriu 2,4,6-THAP, mode negatiu, reflectró; *m/z* correspon a [M-H]⁻.

HPLC: columna Kromasil C₁₈, 10 μm, eluent A: NH₄OAc 0.01 M, eluent B: H₂O/ACN 1:1; gradient lineal de 5 a 35 % de B en 30 min.

Digestió enzimàtica: SVPD (3'-exonucleasa) i fosfatasa alcalina, seguint el mètode 1 de l'apartat 3.7 de Materials i mètodes. A la Taula 1.10 s'expressa la relació entre els diferents nucleòsids que componen cada oligonucleòtid.

oligonucleòtid	pes molecular teòric	[M-H] ⁻	t _R (min)*	X ^S :X ^I :T
^{5'} dX ^S X ^I TTTT	1929.5	1928.0	24.0 (20.8ox)	1.17:1.01:3.83
^{5'} dX ^I X ^S TTTT	1929.5	1927.6	23.5 (21.1ox)	1.07:1.02:3.91

Taula 1.10. Caracterització dels oligonucleòtids. * Entre parèntesis s'inclouen els t_R corresponents als oligonucleòtids en forma oxidada.

1.3 OLIGONUCLEÒTIDS DE CADENA LLARGA QUE INCORPOREN LES MODIFICACIONS X^S I/O X^I

1.3.1 Síntesi de ^{5'}dGCATXCAGC (X: dC, X^S, X^I) i ^{3'}dCGTAGGTCG

Les síntesis s'han realitzat a escala 1 µmol sobre boles de vidre (CPG), emprant el cicle de síntesi estàndard que es resumeix a l'apartat 3.2 de Materials i Mètodes (Taula 2).

Els oligonucleòtids s'han escindit i desprotegit per tractament amb NH₃ aq. conc. a 55 °C durant una nit, seguint el protocol descrit a l'apartat 3.4 de Materials i Mètodes.

S'han analitzat els crús resultants mitjançant EM MALDI-TOF i HPLC de fase reversa (columna Kromasil C₁₈, 10 µm, eluent A: NH₄OAc 0.01 M, eluent B: H₂O/ACN 1:1; gradient lineal de 5 a 35 % de B en 30 min).

Els crús d'escissió dels respectius oligonucleòtids s'han purificat mitjançant MPLC amb una columna de vidre (22 x 2 cm) farcida amb fase reversa de sílice C₁₈ Vydac. S'ha utilitzat un gradient d'elució de 0 a 35 % de B, essent A: 0.05 M NH₄OAc i B: 65 % 0.05 M NH₄OAc i 35 % ACN/H₂O 1:1 (v/v). La columna s'ha equilibrat prèviament amb 300 mL de tampó A i el gradient s'ha efectuat mitjançant un gradientòmetre, emprant 600 mL de cada dissolvent. Les fraccions corresponents al producte pur per HPLC en fase reversa s'han ajuntat i liofilitzats.

En el cas de l'oligonucleòtid amb X^S, ha estat necessària una etapa prèvia de reducció amb MMA (seguint el protocol descrit a l'apartat 1.2.1.2) abans de realitzar la purificació per MPLC.

oligonucleòtid	quantitat	rendiment
^{5'} dGCATCCAGC	11.7 OD ₂₆₀	14 %
^{5'} dGCATX ^S CAGC	4.8 OD ₂₆₀	6 %
^{5'} dGCATX ^I CAGC	30.7 OD ₂₆₀	37 %
^{3'} dCGTAGGTCG	24.8 OD ₂₆₀	29 %

Taula 1.11. Quantitats obtingudes dels diferents productes i rendiment total de les síntesis.

Caracterització de ^{5'}dGCATXCAGC (X: dC, X^S, X^I) i ^{3'}dCGTAGGTCG

EM MALDI-TOF: matriu 2,4,6-THAP, mode negatiu, lineal; *m/z* correspon a [M-H]⁻.

HPLC: columna Kromasil C₁₈, 10 µm, eluent A: NH₄OAc 0.01 M, eluent B: H₂O/ACN 1:1; gradient lineal de 5 a 35 % de B en 30 min.

Digestió enzimàtica: SVPD (3'-exonucleasa) i fosfatasa alcalina, seguint el mètode 1 de l'apartat 3.7 de Materials i Mètodes. A la Taula 1.12 s'expressa la relació entre els diferents nucleòsids que componen cada oligonucleòtid.

oligonucleòtid	pes molecular teòric	[M-H] ⁻	t _R (min)*	dC:dG:T:dA:X ^I :X ^S
⁵ dGCATCCAGC	2683.8	2683.0	14.0	4.01:2.19:1.04:1.76:-:-
⁵ dGCATX ^S CAGC	2772.0	2771.5	17.9 (15.6ox)	3.19:1.98:1.02:1.81:1.01:-
⁵ dGCATX ^I CAGC	2791.9	2791.0	15.6	3.16:2.03:0.98:1.81:-:1.02
³ dCGTAGGTCG	2754.8	2753.9	13.8	2.39:3.88:1.87:0.86:-:-

Taula 1.12. Caracterització dels oligonucleòtids. * Entre parèntesis s'inclou el t_R corresponent a l'oligonucleòtid en forma oxidada.

1.3.2 Síntesi de ⁵dXACGTTGAG (X: dC, X^S, X^I)

Sota aquest títol es presenten les síntesis dels oligonucleòtids següents: ⁵dCACGTTGAG, ⁵dX^SACGTTGAG, ⁵dX^IACGTTGAG.

S'han realitzat les síntesis automàtiques en fase sòlida a escala 1 µmol sobre boles de vidre (CPG), utilitzant el cicle de síntesi estàndard resumit a l'apartat 3.2 de Materials i Mètodes (Taula 2). L'única diferència amb les síntesis anteriors és que no s'ha eliminat el grup protector 4,4'-dimetoxitritil de l'extrem 5' (síntesis DMT ON) per tal de facilitar la posterior purificació dels oligonucleòtids.

És important destacar que a partir d'aquest moment s'ha emprat un ACN de més elevada qualitat per al funcionament del sintetitzador automàtic. Aquest acetonitril és molt sec (15 ppm H₂O) i especialment indicat per a síntesi de DNA/RNA. D'altra banda, els fosforamidits modificats s'han liofilitzats de benzè per assegurar el màxim de sequedat abans d'emprar-los en la síntesi automàtica. Aquests canvis, tal i com es discuteix a la part teòrica, han permès obtenir un millor percentatge d'incorporació dels derivats fosforamidit no comercials, així com també s'ha evitat l'oxidació del grup tioèter durant la síntesi oligonucleotídica.

Etapa de liofilització de benzè: Per tal d'eliminar traces d'humitat i de trietilamina dels derivats fosforamidit dels nucleòsids modificats sintetitzats, prèviament a la síntesi oligonucleotídica s'han resuspès en benzè anhidre (5 mL per 200 mg de fosforamidit), s'han congelat amb nitrogen líquid i s'ha eliminat el benzè per liofilització amb una bomba d'oli durant tota una nit.

Els oligonucleòtids s'han escindit i desprotegit per tractament amb NH₃ aq. conc. a 55 °C durant una nit, seguint el protocol descrit a l'apartat 3.4 de Materials i Mètodes. El residu obtingut no s'ha liofilitzat, per evitar la pèrdua del grup protector DMT en l'ambient àcid del liofilitzador.

S'han analitzat els crús resultants mitjançant EM MALDI-TOF i HPLC de fase reversa (columna PRP, eluent A: NH₄OAc 0.05 M, eluent B: H₂O/ACN 1:1; gradient lineal de 30 a 50 % de B en 30 min o bé de 40 a 60 % de B en 30 min quan l'oligonucleòtid conté algun nucleòtid modificat).

Els crús d'escissió dels respectius oligonucleòtids s'han purificat mitjançant HPLC (amb les condicions citades en el paràgraf anterior). Les fraccions corresponents al producte desitjat (amb el grup protector DMT a l'extrem 5') s'han ajuntat i liofilitzat. Posteriorment, i seguint el protocol de l'apartat 3.5 de Materials i Mètodes, s'ha eliminat el grup protector DMT. En general, l'anàlisi per HPLC en fase reversa (columna Kromasil C₁₈, 10 µm, eluent A: NH₄OAc 0.01 M, eluent B: H₂O/ACN 1:1; gradient lineal de 10 a 30 % de B en 30 min) ha donat lloc a un únic pic cromatogràfic que ha correspost al producte desitjat pur. Tot i així, per a oligonucleòtids que contenen X^S s'ha detectat aproximadament un 10 % d'oligonucleòtid en forma oxidada (degut a una possible presència de peròxids a l'èter dietílic, o bé oxidació espontània per l'oxigen atmosfèric). En aquests casos, s'ha repurificat mitjançant HPLC en fase reversa (columna Kromasil C₁₈ semipreparativa, 10 µm, eluent A: NH₄OAc 0.05 M, eluent B: H₂O/ACN 1:1; gradient lineal de 10 a 20 % de B en 30 min).

oligonucleòtid	quantitat	rendiment
⁵ dCACGTTGAG	45.8 OD ₂₆₀	52 %
⁵ dX ^S ACGTTGAG	25.2 OD ₂₆₀	29 %
⁵ dX ^L ACGTTGAG	40.8 OD ₂₆₀	46 %

Taula 1.13. Quantitats obtingudes dels diferents productes i rendiment total de les síntesis.

Caracterització dels oligonucleòtids

EM MALDI-TOF: matriu 2,4,6-THAP, mode negatiu, lineal; *m/z* correspon a [M-H]⁻.

HPLC: columna Kromasil C₁₈, 10 µm, eluent A: NH₄OAc 0.01 M, eluent B: H₂O/ACN 1:1; gradient lineal de 30 min (la variació en el percentatge de B està especificat entre claudàtors a la Taula 1.14 per a cada oligonucleòtid).

oligonucleòtid	pes molecular teòric	[M-H] ⁻	t _R (min)*
⁵ dCACGTTGAG	2738.9	2737.4	12.4 [5-35%]
⁵ dX ^S ACGTTGAG	2826.8	2826.0	15.1 (10.7ox) [10-20%]
⁵ dX ^L ACGTTGAG	2846.8	2846.0	13.9 [5-35%]

Taula 1.14. Caracterització dels oligonucleòtids. * Entre claudàtors s'especifica la variació del % de B en 30 min i entre parèntesis s'inclou el t_R corresponent a l'oligonucleòtid en forma oxidada.

1.3.3 Síntesi de $5' \text{dX}^{\text{S}}\text{X}^{\text{L}}\text{ACGTTGAG}$ i $5' \text{dX}^{\text{L}}\text{X}^{\text{S}}\text{ACGTTGAG}$

Aquestes dues seqüències oligonucleotídiques s'han sintetitzat de dues maneres diferents: eliminant l'últim grup protector DMT de l'extrem 5' de la cadena (síntesi DMT OFF) o bé mantenint-lo durant l'etapa d'escissió i desprotecció amb amoníac (síntesi DMT ON), per tal de facilitar la purificació per cromatografia líquida. En aquest apartat s'exposa el procediment experimental per a les síntesis DMT OFF. També es detallen els resultats obtinguts per a les síntesis DMT ON, que s'han realitzat seguint el procediment descrit a l'apartat 1.3.2.

S'han realitzat les síntesis automàtiques a escala 1 μmol sobre suport CPG, emprant el cicle de síntesi estàndard resumit a l'apartat 3.2 de Materials i Mètodes (Taula 2).

Els oligonucleòtids s'han escindit i desprotegit per tractament amb NH_3 aq. conc. a 55°C durant una nit, seguint el protocol descrit a l'apartat 3.4 de Materials i Mètodes.

S'han analitzat els crús resultants mitjançant EM MALDI-TOF i HPLC de fase reversa (columna Kromasil C_{18} , 5 μm (100 x 4 mm), eluent A: NH_4OAc 0.01 M, eluent B: $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ 1:1; gradient lineal de 5 a 35 % de B en 15 min). En ambdós casos, s'ha detectat com a producte majoritari l'oligonucleòtid desitjat amb el grup tioèter inalterat. La purificació dels crús d'escissió s'ha realitzat mitjançant MPLC amb una columna de vidre (22 x 2 cm) farcida amb fase reversa de sílice C_{18} Vydac. S'ha utilitzat un gradient d'elució de 0 a 30 % de B, essent A: 0.05 M NH_4OAc i B: 65 % 0.05 M NH_4OAc i 35 % $\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}$ 1:1 (v/v). La columna s'ha equilibrat prèviament amb 300 mL de tampó A i el gradient s'ha efectuat mitjançant un gradientòmetre, emprant 600 mL de cada dissolvent. Les fraccions corresponents al producte pur per HPLC en fase reversa s'han ajuntat i liofilitzat.

El rendiment global de les síntesis i les quantitats obtingudes es mostren a la Taula 1.15, juntament amb els resultats experimentals de les síntesis oligonucleotídiques realitzades de forma independent (seguint el procediment de l'apartat 1.3.2) i purificades amb el protector DMT a l'extrem 5' de la seqüència.

oligonucleòtid	quantitat*		rendiment*	
	DMT OFF	DMT ON	DMT OFF	DMT ON
$5' \text{dX}^{\text{S}}\text{X}^{\text{L}}\text{ACGTTGAG}$	21.6 OD ₂₆₀	12.8 OD ₂₆₀	23 %	14 %
$5' \text{dX}^{\text{L}}\text{X}^{\text{S}}\text{ACGTTGAG}$	19.3 OD ₂₆₀	26.9 OD ₂₆₀	20 %	28 %

Taula 1.15. Quantitats obtingudes dels oligonucleòtids i rendiment total de les síntesis. * Es detallen els resultats per a cada tipus de síntesi.

Els productes aïllats de les síntesis DMT OFF s'han oxidat per reacció amb l'oxigen atmosfèric durant l'etapa de purificació mitjançant MPLC i liofilització de les fraccions pures, donant lloc a un 5 % d'oligonucleòtid en forma sulfòxid.

Caracterització de $5'$ dX^SX^LACGTTGAG i $5'$ dX^LX^SACGTTGAG

EM MALDI-TOF: matriu 2,4,6-THAP, mode negatiu, lineal; m/z correspon a $[M-H]^-$.

HPLC: columna Kromasil C₁₈, 5 μ m (100 x 4 mm), eluent A: NH₄OAc 0.01 M, eluent B: H₂O/ACN 1:1; gradient lineal de 5 a 35 % de B en 15 min.

oligonucleòtid	pes molecular teòric	$[M-H]^-$	t_R (min)*
$5'$ dX ^S X ^L ACGTTGAG	3223.9	3222.7	9.8 (9.0ox)
$5'$ dX ^L X ^S ACGTTGAG	3223.9	3222.5	9.9 (9.2ox)

Taula 1.16. Caracterització dels oligonucleòtids. * Entre parèntesis s'inclouen els t_R corresponents als oligonucleòtids en forma oxidada.

1.3.4 Síntesi de cadenes complementàries

Sota aquest títol es presenta la síntesi dels oligonucleòtids següents: $3'$ dGTGCAACTC, $3'$ dGTTTGTGCAACTC, $3'$ dTGTTGTGCAACTC, $3'$ dTTGTGTGCAACTC, $3'$ dTTTGGTGTGCAACTC.

S'han realitzat les síntesis automàtiques en fase sòlida a escala 1 μ mol sobre boles de vidre (CPG), utilitzant el cicle de síntesi estàndard resumit a l'apartat 3.2 de Materials i Mètodes (Taula 2). Per a G2, G3 i G4 (veure Taula 1.17), les síntesis s'han realitzat a escala 0.2 μ mol, emprant el cicle de síntesi estàndard adequat, que es resumeix a l'apartat 3.2 de Materials i Mètodes (Taula 1). No s'ha eliminat el grup protector 4,4'-dimetoxitritil de l'extrem 5' (síntesis DMT ON) per tal de facilitar la posterior purificació dels oligonucleòtids.

Els oligonucleòtids s'han escindit i desprotegit per tractament amb NH₃ aq. conc. a 55 °C durant una nit, seguint el protocol descrit a l'apartat 3.4 de Materials i Mètodes. El residu obtingut no s'ha liofilitzat per evitar la pèrdua del grup protector DMT en l'ambient àcid del liofilitzador.

S'han analitzat els crús resultants mitjançant EM MALDI-TOF i HPLC de fase reversa (columna Kromasil C₁₈ semipreparativa, 10 μ m, eluent A: NH₄OAc 0.05 M, eluent B: H₂O/ACN 1:1; gradient lineal de 30 a 50 % de B en 30 min).

Els crús d'escissió dels respectius oligonucleòtids s'han purificat mitjançant HPLC (amb les condicions citades en el paràgraf anterior). Les fraccions corresponents al producte desitjat (amb el grup protector DMT a l'extrem 5') s'han ajuntat i liofilitzat. Posteriorment, i seguint el protocol de l'apartat 3.5 de Materials i Mètodes, s'ha eliminat el grup protector DMT. En general, l'anàlisi per HPLC en fase reversa (columna Kromasil C₁₈, 10 μ m, eluent A: NH₄OAc 0.01 M, eluent B: H₂O/ACN 1:1; gradient lineal de 10 a 45 % de B en 20 min) ha donat lloc a un únic pic cromatogràfic que ha correspost al producte desitjat pur.

nom	oligonucleòtid	quantitat	rendiment
complementari N	³ dGTGCAACTC	28.7 OD ₂₆₀	34 %
complementari G1	³ dGTTTGTGCAACTC	39.0 OD ₂₆₀	33 %
complementari G2	³ dTGTTGTGCAACTC	12.9 OD ₂₆₀	54 %
complementari G3	³ dTTGTGTGCAACTC	19.5 OD ₂₆₀	82 %
complementari G4	³ dTTTGGTGTGCAACTC	13.2 OD ₂₆₀	56 %

Taula 1.17. Quantitats obtingudes dels diferents productes i rendiment total de les síntesis.

Caracterització dels oligonucleòtids complementaris

EM MALDI-TOF: matriu 2,4,6-THAP, mode negatiu, lineal; m/z correspon a $[M-H]^-$.

HPLC: columna Kromasil C₁₈, 10 μ m, eluent A: NH₄OAc 0.01 M, eluent B: H₂O/ACN 1:1; gradient lineal de 10 a 45 % de B en 20 min.

oligonucleòtid	pes molecular teòric	$[M-H]^-$	t_R (min)
³ dGTGCAACTC	2698.8	2697.6	13.3*
³ dGTTTGTGCAACTC	3940.6	3939.6	9.1; 14.7*
³ dTGTTGTGCAACTC	3940.6	3939.3	8.1
³ dTTGTGTGCAACTC	3940.6	3939.3	8.7
³ dTTTGGTGTGCAACTC	3940.6	3939.8	9.1

Taula 1.18. Caracterització dels oligonucleòtids. * Gradient lineal de 5 a 35 % de B en 30 min.

1.4 DETERMINACIÓ DE LES TEMPERATURES DE FUSIÓ

La metodologia seguida és la que s'ha descrit a l'apartat 4 de Materials i Mètodes.

1.4.1 Avaluació de l'estabilitat tèrmica dels dúplexs [⁵dGCATXCAGC]·[³dCGTAGGTCG] (X: dC, X^S, X^L)

Per a la formació dels dúplexs s'han mesclat quantitats equimolars de cada oligonucleòtid amb la seqüència complementària. És a dir, s'ha dissolt la quantitat adequada de l'oligonucleòtid ⁵dGCATXCAGC (0.166 OD₂₆₀, on X = dC, X^S, X^L) i de l'oligonucleòtid complementari ³dCGTAGGTCG (0.170 OD₂₆₀) en un determinat volum de tampó 10 mM NaPipes pH 7, 100 mM NaCl i 10 mM MgCl₂, per tal que la concentració d'ambdós fos 2 μ M. Els resultats obtinguts es mostren a la Taula 1.19.

dúplex	T _m (°C)
^{5'} dGCATCCAGC ^{3'} dCGTAGGTCG	45.2
^{5'} dGCATX ^S CAGC ^{3'} dCGTAGGTCG	21.7
^{5'} dGCATX ^I CAGC ^{3'} dCGTAGGTCG	28.4

Taula 1.19. Valors de T_m obtinguts per als dúplexs [^{5'}dGCATXCAGC]:[^{3'}dCGTAGGTCG], on X = dC, X^S i X^I.

1.4.2 Mesura de les temperatures de fusió dels dúplex C+CN, IS+CN, C+G1 i IS+G1

Per a la formació dels dúplexs s'han mesclat quantitats equimolars de les mostres amb les seqüències complementàries. És a dir, s'ha dissolt la quantitat adequada de ^{5'}dCACGTTGAG (0.088 OD₂₆₀) i ^{3'}dGTGCAACTC (0.085 OD₂₆₀), de ^{5'}dX^IX^SACGTTGAG (0.095 OD₂₆₀) i ^{3'}dGTGCAACTC (0.085 OD₂₆₀), de ^{5'}dCACGTTGAG (0.088 OD₂₆₀) i ^{3'}dGTTTGTGCAACTC (0.119 OD₂₆₀), i finalment de ^{5'}dX^IX^SACGTTGAG (0.095 OD₂₆₀) i ^{3'}dGTTTGTGCAACTC (0.119 OD₂₆₀), en un determinat volum de tampó 10 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 7 i 100 mM NaCl, per tal que la concentració d'ambdós fos 2 μM. Els resultats obtinguts es mostren a la Taula 1.20.

codi	dúplex	T _m (°C)
C+CN	^{5'} dCACGTTGAG ^{3'} dGTGCAACTC	39.4
IS+CN	^{5'} dX ^I X ^S ACGTTGAG ^{3'} dGTGCAACTC	34.9
C+G1	^{5'} dCACGTTGAG ^{3'} dGTTTGTGCAACTC	37.5
IS+G1	^{5'} dX ^I X ^S ACGTTGAG ^{3'} dGTTTGTGCAACTC	32.0

Taula 1.20. Valors de T_m obtinguts per als dúplexs.

EXPERIMENTAL CAPÍTOL 2

2.1 DISSOLUCIÓ I ACTIVACIÓ DEL TRANSPLATÍ

Mètode 1: s'afegeixen 3 mg de *trans*-[PtCl₂(NH₃)₂] sòlid en 1 mL d'aigua per tal d'obtenir una concentració 10 mM del compost platinat. La suspensió s'escalfa a 90 °C durant 10 min, amb agitació vigorosa ocasional, per afavorir la solubilització del complex. La solució obtinguda s'ha d'utilitzar immediatament, ja que s'ha observat la seva descomposició amb el temps.

Mètode 2: es prepara una solució 0.5 M de transplatí en DMF i s'afegeix 1 eq de AgNO₃ sòlid, deixant reaccionar al llarg de 2 h, aïllat de la llum (per evitar la formació de Ag). Se centrifuga a 10000 rpm durant 3 min i es dilueix la mostra amb aigua per tal d'agafar 1 eq de [PtCl(H₂O)(NH₃)₂]⁺, provinent de l'aquatització del transplatí activat amb un lligand làbil (percentatge de DMF en el medi de reacció inferior al 6.3 %).

Mètode 3: es prepara una solució 0.5 M de transplatí en DMF i s'afegeixen 2 eq de AgNO₃ sòlid, deixant reaccionar al llarg de 2 h, aïllat de la llum (per evitar la formació de Ag). Se centrifuga a 10000 rpm durant 3 min i es dilueix la mostra amb aigua per tal d'agafar 1 eq de [Pt(H₂O)₂(NH₃)₂]²⁺, resultat de l'aquatització del transplatí activat amb dos lligands làbils (percentatge de DMF en el medi de reacció inferior al 6.3 %).

Si no s'indica el contrari, sempre s'ha utilitzat el mètode 1.

2.2 SEGUIMENT DE LES REACCIONS

Per a portar a terme les reaccions de complexació es disposa la quantitat liofilitzada adequada d'oligonucleòtid en un eppendorf o en un tub de centrífuga. Un cop dissolt en aigua o en el medi tamponat desitjat, s'afegeix el transplatí predissolt (el número d'equivalents s'especifica en cada cas particular). La concentració final d'oligonucleòtid també depèn del cas, així com la temperatura a la qual es realitza l'experiment (normalment 37 °C).

Es prenen alíquotes de la mescla de reacció al llarg del temps, les quals es tracten amb un excés de KCl sat. per tal d'aturar la reacció i assegurar la detecció dels possibles adductes monofuncionals. Es congelen immediatament a -196 °C en N₂ líquid i es mantenen congelades fins al moment de la seva anàlisi.

El seguiment de les reaccions de complexació es porta a terme mitjançant anàlisi per HPLC en fase reversa, amb una columna Kromasil C₁₈ de 250 x 4 mm i mida de partícula de 10 µm, enregistrant els cromatogrames a una longitud d'ona de 260 nm.

Els diferents pics identificats per HPLC en fase reversa es col·lecten i liofilitzen per a portar a terme la caracterització estructural dels adductes formats.

2.3 CARACTERITZACIÓ ESTRUCTURAL DELS ADDUCTES FORMATS

L'espectrometria de masses MALDI-TOF en mode negatiu ha estat la tècnica clau de caracterització estructural, principalment degut a la seva gran sensibilitat i resolució. En tots els casos, s'ha detectat la massa correcta juntament amb masses minoritàries corresponents a la pèrdua d'un i dos amoníacs, resultat típic d'aquest tipus de compostos. En tots els casos, el valor de m/z obtingut correspon a $[M-H]$. Per al càlcul del pes molecular s'ha tingut en compte la molècula en estat neutre, tenint present tant la càrrega de l'oligonucleòtid, com la de l'ió Pt^{2+} o la del lligand cloro (en els adductes monofuncionals). Per a oligonucleòtids de cadena curta (5-6 nucleobases), s'ha pogut observar la distribució isotòpica típica deguda a l'àtom de platí. Tot i així, només es dona m/z del pic majoritari.

La determinació dels punts de coordinació del transplatí en els diferents productes aïllats en les reaccions de complexació s'ha abordat, sobretot, estudiant el seu comportament enfront a enzims. L'ús d'enzims presenta dos avantatges importants: i) es pot treballar amb quantitats molt petites, ii) els enzims emprats (5'- i 3'-exonucleases) no reconeixen nucleòsids amb un àtom de platí en la nucleobase. Això fa que l'enzim sigui capaç de degradar l'oligonucleòtid (nucleòtid a nucleòtid) fins a trobar el punt en el qual apareix l'àtom de platí, i aleshores l'enzim s'atura. La caracterització per EM MALDI-TOF del fragment no degradat permet deduir a quina posició es troba l'àtom de platí. D'altra banda, un assaig molt útil per a determinar si hi ha coordinació al grup tioèter en el nucleòtid modificat X^S ha estat el tractament amb H_2O_2 . Si l'àtom de sofre intervé en la coordinació al metall, no té lloc l'oxidació a sulfòxid, de manera que per EM MALDI-TOF no s'observa cap increment de massa. Ara bé, si l'àtom de platí no coordina al tioèter, aquest grup s'oxida a sulfòxid, observant-se un increment de massa de +16 u.m.a.

Tractament amb fosfodiesterasa de verí de serp (SVPD, EC 3.1.4.1): a 5-8 μL de mostra platinada (0.001-0.01 OD_{260} d'adducte platinat en aigua) s'han afegit 0.5 μL de tampó Tris.HCl 0.1 M pH 8, 0.1 μL de $MgCl_2$ 0.1 M i 0.2 μL de solució d'enzim comercial. La mostra s'ha deixat reaccionar a temperatura ambient, seguint l'evolució a diferents temps (fins a un màxim de 1 h aproximadament) per anàlisi mitjançant EM MALDI-TOF.

Tractament amb fosfodiesterasa de melsa de bou (SpPD, EC 3.1.16.1): a 5-8 μL de mostra platinada (0.001-0.01 OD_{260} d'adducte platinat en aigua) s'han afegit 0.5 μL de mescla enzimàtica. La mostra s'ha deixat reaccionar a temperatura ambient, seguint l'evolució a diferents temps (fins a un màxim de 1 h aproximadament) per anàlisi mitjançant EM MALDI-TOF.

Tractament amb H_2O_2 : a 3 μL de mostra platinada (0.001-0.01 OD_{260} d'adducte platinat en aigua) s'afegeixen 0.5 μL d'una solució de H_2O_2 al 3.5 % en aigua. La mostra es manté a temperatura ambient durant 0.5-1 h (temps més que suficient per tal que la reacció tingui lloc).

Passat aquest temps, s'analitza la mostra per EM MALDI-TOF. Sovint la presència d'oligonucleòtid desplatinat s'empra com a patró per a avaluar si el tractament d'oxidació ha estat suficientment llarg per tal que l'adducte platinat s'oxidés en cas que el tioèter no estigui intervenint en la coordinació, alhora que serveix de referència interna per a determinar si hi ha o no un augment de 16 unitats.

2.4 REACCIÓ DE [PtCl(dien)]Cl AMB $^5\text{dX}^{\text{S}}\text{TTT}$

S'han dissolt 0.33 OD₂₆₀ de l'oligonucleòtid $^5\text{dX}^{\text{S}}\text{TTT}$ en 255.5 µL de H₂O i 13.4 µL de DMF. A continuació s'han addicionat 1.3 µL d'una solució aquosa 10 mM de [PtCl(dien)]Cl (0.95 eq), de manera que la concentració d'oligonucleòtid ha estat 0.05 mM. La mescla de reacció s'ha agitat i s'ha mantingut a 37 °C en un bany termostatitzat (pH ~ 5). El seguiment de la reacció s'ha portat a terme mitjançant anàlisi per HPLC en fase reversa (columna Kromasil C₁₈, 10 µm, eluent A: NH₄OAc 0.01 M, eluent B: H₂O/ACN 1:1; gradient lineal de 10 a 40 % de B en 30 min). En aquestes condicions d'anàlisi, el producte de partida ha eluït a un t_R 17.3 min. Al cap de 1 h, s'ha observat l'aparició d'un nou producte de t_R 12.9 min (35 % respecte a l'oligonucleòtid inicial). Per tal de forçar la reacció, s'han afegit 1.9 eq (2.6 µL) de la dissolució aquosa 10 mM de [PtCl(dien)]Cl. Al cap de 4.5 h, la platinació ha tingut lloc de forma quantitativa i s'ha deixat evolucionar al llarg d'una setmana. S'ha aïllat el producte platinat (t_R: 12.9 min), per tal de determinar-ne la posició de coordinació.

Caracterització de l'adducte platinat

$^5\text{dX}^{\text{S}}\text{TTT}\{\text{X}^{\text{S}}\text{-S-Pt(dien)}\}$, t_R: 12.9 min

Fórmula molecular: C₄₇H₇₁O₂₅N₁₂P₃SPt

Pes molecular teòric: 1524.2

- Espectrometria de masses:

EM MALDI-TOF (matriu THAP/CA, mode negatiu, reflectró): *m/z*: 1525.5.

- Masses trobades després de les digestions enzimàtiques:

-SVPD: no s'ha trobat la massa esperada (*M*_{teòrica}: 611.6 per al fragment {X^S-Pt(dien)}).

-SpPD: *m/z*: 1525.2.

- Tractament amb H₂O₂: estable al tractament oxidatiu, *m/z*: 1525.3.

2.5 REACCIONS DE COMPLEXACIÓ AMB TRANSPLATÍ

2.5.1 Reacció del transplatí amb $5' dX^S TTTT$

S'ha realitzat la reacció amb tres alíquotes diferents, per a determinar la manera òptima d'afegir el transplatí (prèviament activat per cadascun dels mètodes descrits a l'apartat 2.1).

Mètode 1) escalfant a 90°C , durant 10-15 min:

S'han dissolt 0.2 OD_{260} de l'oligonucleòtid $5' dX^S TTTT$ en $94.6 \mu\text{L}$ de H_2O i $6.4 \mu\text{L}$ de DMF (per tal que contingués el mateix percentatge de DMF que a les següents reaccions). A continuació s'han addicionat $1.5 \mu\text{L}$ d'una solució aquosa 10 mM de transplatí (3 eq), de manera que la concentració d'oligonucleòtid ha estat 0.05 mM . La mescla de reacció s'ha agitat i s'ha mantingut a 37°C en un bany termostatitzat ($\text{pH} \sim 5$). El seguiment de la reacció s'ha portat a terme mitjançant anàlisi per HPLC en fase reversa (columna Kromasil C_{18} , $10 \mu\text{m}$, eluent A: NH_4OAc 0.01 M , eluent B: $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ 1:1; gradient lineal de 10 a 40 % de B en 30 min). En aquestes condicions d'anàlisi, el producte de partida ha eluït a un t_R 18.6 min. Al cap de 30 min, s'ha observat l'aparició de tres complexos de t_R 9.0 min, 9.9 min i 11.2 min amb una relació 20:30:50, restant encara un 39 % d'oligonucleòtid inicial. A les 5 h, la relació entre els adductes formats era 30:30:40 i pràcticament s'havia complexat tot l'oligonucleòtid de partida ($< 1 \%$). A les 30 h, s'ha observat un 7 % d'oligonucleòtid inicial, amb una relació entre els tres adductes majoritaris 39:15:46. Al cap de 4 dies, s'ha observat un 15 % d'oligonucleòtid sense platinar i la relació entre adductes era 26:29:45, alhora que han aparegut d'altres productes que no han estat caracteritzats.

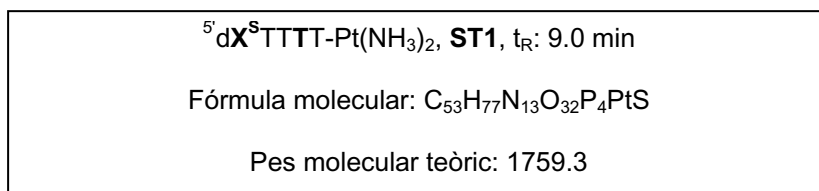
Mètode 2) per reacció amb 1 eq AgNO_3 :

S'han dissolt 0.2 OD_{260} de l'oligonucleòtid $5' dX^S TTTT$ en $94.6 \mu\text{L}$ de H_2O i s'han afegit $6.4 \mu\text{L}$ de $[\text{PtCl}(\text{H}_2\text{O})(\text{NH}_3)_2]^+$ 0.79 mM en $\text{H}_2\text{O}/\text{DMF}$ 94:6 (1 eq), de manera que la concentració d'oligonucleòtid ha estat 0.05 mM . La mescla de reacció s'ha agitat i s'ha mantingut a 37°C en un bany termostatitzat ($\text{pH} \sim 5$). El seguiment de la reacció s'ha portat a terme mitjançant anàlisi per HPLC com a l'apartat anterior. Al cap de 30 min, s'ha observat l'aparició dels mateixos tres complexos de t_R 9.0 min, 9.9 min i 11.2 min amb una relació 20:30:50, restant encara un 43 % d'oligonucleòtid sense reaccionar. A les 6 h, la relació entre els adductes formats era 31:26:43 i encara quedava un 7 % d'oligonucleòtid de partida. Al cap d'un dia, s'ha observat la presència d'un 14 % d'oligonucleòtid sense platinar i la relació entre adductes era 40:13:47, i als 4 dies, s'ha detectat un 39 % d'oligonucleòtid sense platinar i una relació entre els adductes de 37:16:47, alhora que han aparegut d'altres subproductes que no han estat caracteritzats.

Mètode 3) per reacció amb 2 eq AgNO₃:

S'han dissolt 0.1 OD₂₆₀ de l'oligonucleòtid ⁵dX^STTTT en 47.3 µL de H₂O i s'han afegit 3.2 µL de [Pt(H₂O)₂(NH₃)₂]²⁺ 0.79 mM en H₂O/DMF 94:6 (1 eq), de manera que la concentració d'oligonucleòtid ha estat 0.05 mM. La mescla de reacció s'ha agitat i s'ha mantingut a 37 °C en un bany termostatitzat (pH ~ 5). El seguiment de la reacció s'ha portat a terme mitjançant anàlisi per HPLC com a l'apartat anterior. Al cap de 30 min, s'ha observat l'aparició dels mateixos tres complexos de t_R 9.0 min, 9.9 min i 11.2 min amb una relació 21:29:50, però encara hi havia un 66 % d'oligonucleòtid inicial. S'han afegit 2 eq més de transplatí activat (en total 3 eq) i a les 7 h la relació entre els adductes formats era 33:25:42 i només restava un 4 % d'oligonucleòtid de partida. Al cap de 4 dies, s'ha detectat un 40 % d'oligonucleòtid sense platinar i una relació entre els adductes de 36:15:49, alhora que han aparegut nous pics cromatogràfics de subproductes que no s'han caracteritzat.

Els tres adductes majoritaris formats s'han aïllat per a determinar els punts de coordinació de l'àtom metàl·lic.

Caracterització dels adductes

- Espectrometria de masses:

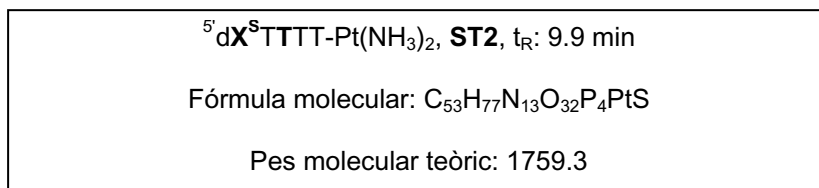
EM MALDI-TOF (matriu THAP/CA, mode negatiu, reflectró): *m/z*: 1760.0, 1743.2, 1726.2 (pèrdua d'un i dos amoníacs).

- Masses trobades després de les digestions enzimàtiques:

-SVPD: *m/z*: 1455.1, -pT (M_{teòrica}: 1455.1).

-SpPD: *m/z*: 1760.6. També s'observa 1473.9, que correspon a un augment de 18 unitats i una posterior pèrdua de pT (M_{teòrica}: 1470.1).

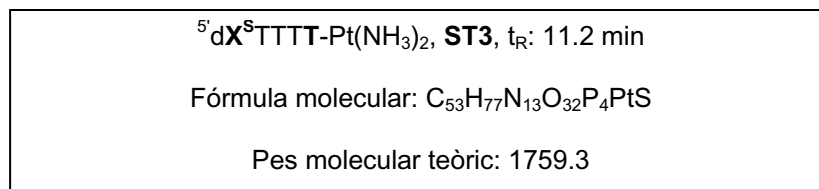
- Tractament amb H₂O₂: estable al tractament oxidatiu, *m/z*: 1760.3.



- Espectrometria de masses:

EM MALDI-TOF (matriu THAP/CA, mode negatiu, reflectró): *m/z*: 1760.2, 1743.3, 1726.5.

- Masses trobades després de les digestions enzimàtiques:
-SVPD: m/z : 1150.9, -pTpT ($M_{\text{teòrica}}$: 1150.9).
-SpPD: m/z : 1760.6. També s'observa 1778.6, que correspon a un augment de 18 u.m.a.
- Tractament amb H_2O_2 : estable al tractament oxidatiu, m/z : 1760.5.



- Espectrometria de masses:
EM MALDI-TOF (matriu THAP/CA, mode negatiu, reflectró): m/z : 1760.3, 1743.4, 1726.4.
- Masses trobades després de les digestions enzimàtiques:
-SVPD: m/z : 1760.5. Producte no degradat.
-SpPD: m/z : 1760.6. Producte no degradat.
- Tractament amb H_2O_2 : estable al tractament oxidatiu, m/z : 1760.5.

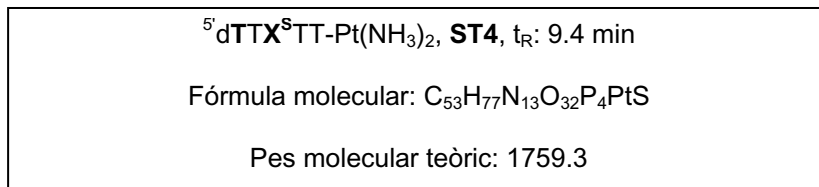
2.5.2 Reacció del transplatí amb $^5\text{dTTX}^{\text{S}}\text{TT}$

S'han dissolt 0.5 OD_{260} de l'oligonucleòtid $^5\text{dTTX}^{\text{S}}\text{TT}$ en 250 μL de H_2O i s'han addicionat 2.5 μL d'una solució aquosa 10 mM de transplatí (2 eq), de manera que la concentració d'oligonucleòtid ha estat 0.05 mM. La mescla de reacció s'ha agitat i s'ha mantingut a 37 °C en un bany termostatitzat (pH ~ 5). El seguiment de la reacció s'ha portat a terme mitjançant anàlisi per HPLC en fase reversa (columna Kromasil C_{18} , 10 μm , eluent A: NH_4OAc 0.01 M, eluent B: $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ 1:1; gradient lineal de 10 a 40 % de B en 30 min), de manera que les diferents alíquotes s'han barrejat amb una solució de KCl sat. per tal de capturar els possibles adductes monofuncionals i s'han congelat fins al moment de l'anàlisi. El producte de partida ha eluït a un t_{R} 17.8 min. Al cap de 30 min, s'ha observat l'aparició de tres complexos de t_{R} 9.4 min, 10.6 min i 11.4 min amb una relació 32:46:22, restant encara un 58 % d'oligonucleòtid inicial. A les 2.5 h, la relació entre els adductes formats era 37:37:26 i quedava un 9 % d'oligonucleòtid sense complexar. Al cap de 16 h, pràcticament no quedava oligonucleòtid de partida (< 3 %) i la relació entre els adductes era 52:14:34.

Els tres adductes majoritaris s'han aïllat mitjançant HPLC, liofilitzat i caracteritzat. Tot seguit, s'han guardat en solució aquosa al congelador a -20 °C i posteriorment s'ha comprovat la seva estabilitat mitjançant anàlisi per HPLC (en les mateixes condicions). Els dos adductes coordinats pel grup tioèter i una T de l'extrem 5' (**ST4** i **ST6**) s'han mostrat estables, mentre que

a partir del que coordina per la T de l'extrem 3' (**ST5**) s'ha format un 13 % d'oligonucleòtid desplatínat.

Caracterització dels adductes



- Espectrometria de masses:

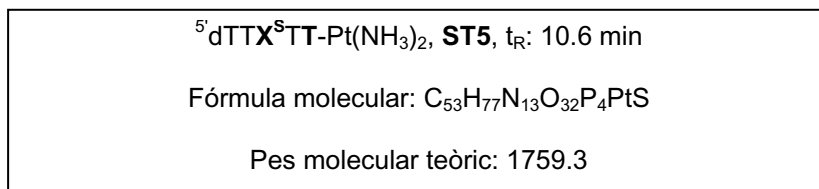
EM MALDI-TOF (matriu THAP/CA, mode negatiu, reflectró): m/z : 1759.9, 1742.9, 1726.1.

- Masses trobades després de les digestions enzimàtiques:

-SVPD: m/z : 1455.4, 1150.3, que corresponen a la pèrdua de pT ($M_{\text{teòrica}}$: 1455.1) i pTpT ($M_{\text{teòrica}}$: 1150.9).

-SpPD: m/z : 1759.7.

- Tractament amb H_2O_2 : estable al tractament oxidatiu, m/z : 1760.6.



- Espectrometria de masses:

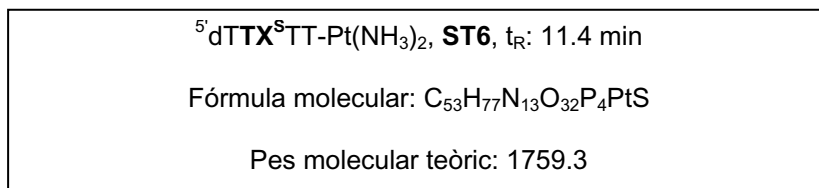
EM MALDI-TOF (matriu THAP/CA, mode negatiu, reflectró): m/z : 1760.1, 1743.2, 1726.3.

- Masses trobades després de les digestions enzimàtiques:

-SVPD: m/z : 1760.3.

-SpPD: m/z : 1151.7, que correspon a la pèrdua de TpTp ($M_{\text{teòrica}}$: 1150.9).

- Tractament amb H_2O_2 : estable al tractament oxidatiu, m/z : 1760.6.



- Espectrometria de masses:

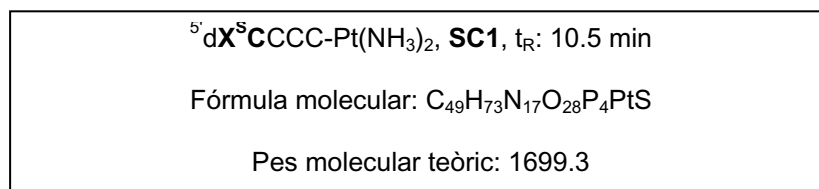
EM MALDI-TOF (matriu THAP/CA, mode negatiu, reflectró): m/z : 1760.2, 1743.3, 1726.4.

- Masses trobades després de les digestions enzimàtiques:
 - SVPD: m/z : 1150.9, que correspon a la pèrdua de pTpT ($M_{\text{teòrica}}$: 1150.9).
 - SpPD: m/z : 1455.1, que correspon a la pèrdua de Tp ($M_{\text{teòrica}}$: 1455.1).
- Tractament amb H_2O_2 : estable al tractament oxidatiu, m/z : 1760.5.

2.5.3 Reacció del transplatí amb $5'\text{dX}^{\text{S}}\text{CCCC}$

S'han dissolt 5 OD₂₆₀ de l'oligonucleòtid $5'\text{dX}^{\text{S}}\text{CCCC}$ en 2871.6 μL de H_2O i s'han addicionat 14.4 μL d'una solució aquosa 10 mM de transplatí (1 eq), de manera que la concentració d'oligonucleòtid ha estat 0.05 mM. La mescla de reacció s'ha agitat i s'ha mantingut a 37 °C en un bany termostatitzat (pH ~ 5). El seguiment de la reacció s'ha portat a terme mitjançant anàlisi per HPLC en fase reversa (columna Kromasil C₁₈, 10 μm , eluent A: NH_4OAc 0.01 M, eluent B: $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ 1:1; gradient lineal de 5 a 35 % de B en 30 min), barrejant les diferents alíquotes amb una solució de KCl sat. i congelant-les fins al moment de l'anàlisi. En aquestes condicions, el producte de partida ha eluït a un t_{R} 18.2 min. Al cap de 30 min, s'ha observat l'aparició de tres complexos de t_{R} 10.5 min, 11.2 min i 11.6 min amb una relació 36:36:28, restant encara un 72 % d'oligonucleòtid inicial. Al cap de 7 h, la relació entre els adductes formats era 15:45:40 i només quedava un 7 % d'oligonucleòtid sense complexar, valor que ha variat poc més al llarg de la reacció (s'ha aturat a les 55 h). La relació entre els adductes al final de la reacció era 12:44:44.

Caracterització dels adductes



- Espectrometria de masses:
EM MALDI-TOF (matriu THAP/CA, mode negatiu, reflectró): m/z : 1697.9, 1681.0, 1663.9.
- Masses trobades després de les digestions enzimàtiques:
 - SVPD: m/z : 799.0 (-pCpCpC i -2 NH_3 , $M_{\text{teòrica}}$: 797.7).
 - SpPD: m/z : 1697.2.
- Tractament amb H_2O_2 : estable al tractament oxidatiu, m/z : 1698.0.

$^5\text{dX}^{\text{S}}\text{CCCC-Pt}(\text{NH}_3)_2$, **SC2**, t_{R} : 11.2 min

Fórmula molecular: $\text{C}_{49}\text{H}_{73}\text{N}_{17}\text{O}_{28}\text{P}_4\text{PtS}$

Pes molecular teòric: 1699.3

- Espectrometria de masses:

EM MALDI-TOF (matriu THAP/CA, mode negatiu, reflectró): m/z : 1698.1, 1681.2, 1664.2.

- Masses trobades després de les digestions enzimàtiques:

-SVPD: m/z : 1409.1 (-pC, $M_{\text{teòrica}}$: 1410.1).

-SpPD: m/z : 1697.8. A temps llargs s'observa 1716.0 (guany de 18 unitats) i posterior pèrdua d'una Cp, 1427.0 (+18-Cp, $M_{\text{teòrica}}$: 1428.1).

- Tractament amb H_2O_2 : estable al tractament oxidatiu, m/z : 1698.4.

$^5\text{dX}^{\text{S}}\text{CCCC-Pt}(\text{NH}_3)_2$, **SC3**, t_{R} : 11.6 min

Fórmula molecular: $\text{C}_{49}\text{H}_{73}\text{N}_{17}\text{O}_{28}\text{P}_4\text{PtS}$

Pes molecular teòric: 1699.3

- Espectrometria de masses:

EM MALDI-TOF (matriu THAP/CA, mode negatiu, reflectró): m/z : 1698.1, 1681.2, 1665.0.

- Masses trobades després de les digestions enzimàtiques:

-SVPD: m/z : 1698.1.

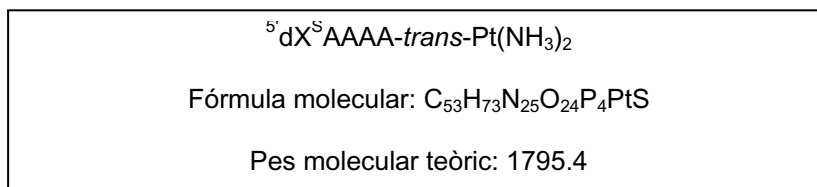
-SpPD: m/z : 1698.0. També s'observa 1716.2 (guany de 18 unitats) i posterior pèrdua d'una Cp, 1427.2 (+18-Cp, $M_{\text{teòrica}}$: 1428.1).

- Tractament amb H_2O_2 : estable al tractament oxidatiu, m/z : 1698.3.

2.5.4 Reacció del transplatí amb $^5\text{dX}^{\text{S}}\text{AAAA}$

S'han dissolt 1.5 OD₂₆₀ de l'oligonucleòtid $^5\text{dX}^{\text{S}}\text{AAAA}$ en 484.2 μL de H_2O i s'han addicionat 2.4 μL d'una solució aquosa 10 mM de transplatí (1 eq), de manera que la concentració d'oligonucleòtid ha estat 0.05 mM. La mescla de reacció s'ha agitat i s'ha mantingut a 37 °C en un bany termostatitzat (pH ~ 5). El seguiment de la reacció s'ha analitzat per HPLC en fase reversa (columna Kromasil C₁₈, 10 μm , eluent A: NH_4OAc 0.01 M, eluent B: $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ 1:1; gradient lineal de 5 a 35 % de B en 30 min). S'han format quatre adductes majoritaris (t_{R} : 12.1 min, 12.8 min, 13.7 min i 14.7 min). A les 5 h encara quedava un 44 % d'oligonucleòtid de partida (t_{R} : 17.3 min) i, a mesura que ha transcorregut el temps, aquest valor ha anat

augmentant, degut a la inestabilitat dels adductes platinats, que desplatinen en el propi medi de reacció. S'han aïllat els adductes per HPLC i liofilitzats, detectant-se desplatinació parcial. S'han realitzat els estudis de caracterització estructural, però no s'ha arribat a resultats concluent amb la 3'-exonucleasa. Tot i així, tant amb la 5'-exonucleasa com per tractament oxidatiu s'ha confirmat en tots els casos la coordinació del platí al sofre de X^S. Per a tots els adductes s'ha arribat a uns resultats similars, que es detallen tot seguit:



- Espectrometria de masses:

EM MALDI-TOF (matriu THAP/CA, mode negatiu, reflectró): m/z : 1794.2, 1777.3, 1761.2.

- Masses trobades després de les digestions enzimàtiques:

-SVPD: m/z : 1794.1 i 1480.2 (-pA, $M_{\text{teòrica}}$: 1482.2) masses majoritàries. També s'han detectat minoritàriament, i en algun cas, 1134.8 (-pApA-2NH₃, $M_{\text{teòrica}}$: 1134.9) i 823.1 (-pApApA-2NH₃, $M_{\text{teòrica}}$: 821.7).

-SpPD: m/z : 1794.1. A temps llargs també s'ha observat 1812.3 (guany de 18 unitats).

- Tractament amb H₂O₂: estables al tractament oxidatiu, m/z : 1794.1.

2.5.5 Reacció del transplatí amb $^5\text{dX}^{\text{S}}\text{GGGGTT}$

S'han dissolt 1.5 OD₂₆₀ de l'oligonucleòtid $^5\text{dX}^{\text{S}}\text{GGGGTT}$ en 464.8 µL de H₂O i s'han addicionat 2.3 µL d'una solució aquosa 10 mM de transplatí (1 eq), de manera que la concentració d'oligonucleòtid ha estat 0.05 mM. La mescla de reacció s'ha agitat i s'ha mantingut a 37 °C en un bany termostatitzat (pH ~ 5). La reacció s'ha seguit mitjançant anàlisi per HPLC en fase reversa (columna Kromasil C₁₈, 10 µm, eluent A: NH₄OAc 0.01 M, eluent B: H₂O/ACN 1:1; gradient lineal de 5 a 35 % de B en 30 min). Les alíquotes s'han barrejat amb una solució de KCl sat. i s'han congelat fins al moment de l'anàlisi. S'han obtingut perfils cromatogràfics molt complexos, amb solapament de pics. Per EM MALDI-TOF s'ha detectat la presència d'adductes amb una i amb dues unitats de Pt(NH₃)₂, així com producte de partida.

EM MALDI-TOF (matriu THAP/CA, mode negatiu, reflectró) a les 22 h de reacció:

m/z : 2693.0, que correspon a $^5\text{dX}^{\text{S}}\text{GGGGTT} + 2 \text{trans-Pt}(\text{NH}_3)_2$ ($M_{\text{teòrica}}$: 2694.9); 2465.2, que correspon a $^5\text{dX}^{\text{S}}\text{GGGGTT} + 1 \text{trans-Pt}(\text{NH}_3)_2$ ($M_{\text{teòrica}}$: 2467.7); 2239.0, que correspon a $^5\text{dX}^{\text{S}}\text{GGGGTT}$ ($M_{\text{teòrica}}$: 2240.6).

2.5.6 Reacció del transplatí amb $5^{\text{d}}\text{X}^{\text{l}}\text{TTTT}$

S'han dissolt 1.5 OD₂₆₀ de l'oligonucleòtid $5^{\text{d}}\text{X}^{\text{l}}\text{TTTT}$ en 770.9 μL de H₂O i s'han addicionat 7.8 μL d'una solució aquosa 10 mM de transplatí (2 eq), de manera que la concentració d'oligonucleòtid ha estat 0.05 mM. La mescla de reacció s'ha agitat i s'ha mantingut a 37 °C en un bany termostatitzat (pH ~ 5). El seguiment de la reacció s'ha portat a terme mitjançant anàlisi per HPLC en fase reversa (columna Kromasil C₁₈, 10 μm , eluent A: NH₄OAc 0.01 M, eluent B: H₂O/ACN 1:1; gradient lineal de 5 a 35 % de B en 30 min), de manera que les diferents alíquotes s'han barrejat amb una solució de KCl sat. i s'han congelat fins al moment de l'anàlisi. No s'ha observat la formació de cap adducte de forma majoritària. A les 51 h, s'han detectat dos pics de petita intensitat que no han estat aïllats, quedant encara un 92 % d'oligonucleòtid sense reaccionar.

2.5.7 Reacció del transplatí amb $5^{\text{d}}\text{X}^{\text{l}}\text{TTCT}$

a) a pH àcid (5.7-5.2)

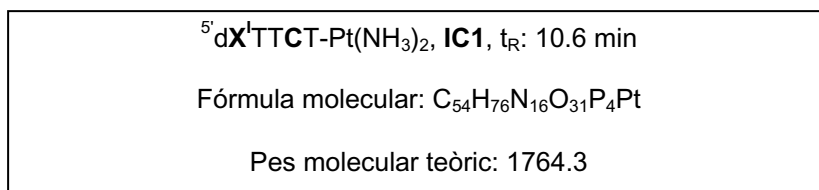
S'han dissolt 1.0 OD₂₆₀ de l'oligonucleòtid $5^{\text{d}}\text{X}^{\text{l}}\text{TTCT}$ en 524.7 μL de H₂O i s'han addicionat 5.3 μL d'una solució aquosa 10 mM de transplatí (2 eq), de manera que la concentració d'oligonucleòtid ha estat 0.05 mM. La mescla de reacció s'ha agitat i s'ha mantingut a 37 °C en un bany termostatitzat. S'ha mesurat el pH del medi a diferents temps, que ha anat decreixent de 5.7 a 5.2. El seguiment de la reacció s'ha realitzat per HPLC en fase reversa (columna Kromasil C₁₈, 10 μm , eluent A: NH₄OAc 0.01 M, eluent B: H₂O/ACN 1:1; gradient lineal de 10 a 30 % de B en 20 min). Les diferents alíquotes s'han barrejat amb una solució de KCl sat. i s'han congelat fins al moment de l'anàlisi. El producte de partida ha eluït a t_{R} 13.3 min. Al cap de 7 h, s'ha observat l'aparició d'un nou compost de t_{R} 14.8 min, restant encara un 83 % d'oligonucleòtid inicial. Al cap de 22 h, s'ha detectat la presència de dos nous adductes de t_{R} 10.6 min i 13.8 min. La reacció ha anat evolucionant, fins a obtenir dos adductes molt majoritaris, els de t_{R} 10.6 min i 13.8 min (després de 16 dies), amb una relació 36:64.

b) a pH bàsic (8.4-6.5)

S'han dissolt 1.0 OD₂₆₀ de l'oligonucleòtid $5^{\text{d}}\text{X}^{\text{l}}\text{TTCT}$ en H₂O, ajustant el pH a 8.0 amb una solució aquosa de NaOH 0.1 M. S'han addicionat 5.3 μL d'una solució aquosa 10 mM de transplatí (2 eq), de manera que la concentració d'oligonucleòtid ha estat 0.05 mM (volum total 530 μL). La mescla de reacció s'ha agitat i s'ha mantingut a 37 °C en un bany termostatitzat. En afegir el transplatí el pH ha disminuït fins a 7.2, i al llarg de la reacció aquest valor ha anat decreixent fins a 6.7 (al cap de 95 h). Llavors s'ha afegit més NaOH 0.1 M (0.4 μL), fins a obtenir un pH de 8.4, però un altre cop ha anat decreixent fins a 6.5 (al cap de 297 h), moment en què s'ha donat per acabada la reacció de complexació (només quedava un 5 % d'oligonucleòtid inicial). El seguiment de la reacció s'ha portat a terme en les mateixes condicions que en l'anterior experiment (a). En aquest cas, la reacció ha evolucionat molt més

lentament (a les 100 h encara queda més d'un 50 % d'oligonucleòtid inicial) i pràcticament no s'ha detectat l'adducte de t_R 14.8 min. S'han format tres adductes de t_R 9.8 min, 10.6 min i 13.8 min, que a mesura que ha transcorregut el temps s'han fet més presents, amb una relació entre ells de 14:35:51. La relació entre els adductes majoritaris, a la fi de la reacció, ha estat de 41:59. L'adducte de t_R 9.8 min no s'ha caracteritzat per digestió amb enzims, però per EM MALDI-TOF ha donat una massa corresponent a un adducte bifuncional del tipus $^5dX^lTTCT-trans-Pt(NH_3)_2$.

Caracterització dels adductes



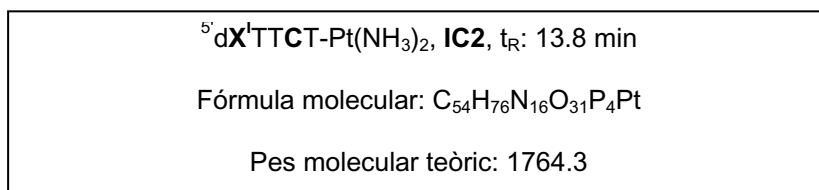
- Espectrometria de masses:

EM MALDI-TOF (matriu THAP/CA, mode negatiu, reflectró): m/z : 1763.1, 1746.2, 1729.2.

- Masses trobades després de les digestions enzimàtiques:

-SVPD: m/z : 1458.1 (-pT, $M_{teòrica}$: 1460.1).

-SpPD: m/z : 1762.1 (poc intens). Bàsicament s'observa 1477.0, que correspondria a un guany de 18 unitats (trencament d'un enllaç fosfodiester) i posterior pèrdua de Tp ($M_{teòrica}$: 1478.1).



- Espectrometria de masses:

EM MALDI-TOF (matriu THAP/CA, mode negatiu, reflectró): m/z : 1762.5, 1746.4, 1730.5.

- Masses trobades després de les digestions enzimàtiques:

-SVPD: m/z : 1459.5 (-pT, $M_{teòrica}$: 1460.1).

-SpPD: m/z : 1763.6 (poc intens). Bàsicament s'observa 1477.6, que correspondria a un guany de 18 unitats i posterior eliminació de Tp ($M_{teòrica}$: 1478.1).

$^5\text{dX}^{\text{I}}\text{TTCT-Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}$, **ICmonof**, t_{R} : 14.8 min

Fórmula molecular: $\text{C}_{54}\text{H}_{77}\text{ClN}_{16}\text{O}_{31}\text{P}_4\text{Pt}$

Pes molecular teòric: 1800.7

- Espectrometria de masses:

EM MALDI-TOF (matriu THAP/CA, mode negatiu, reflectró): m/z : 1799.5, 1782.4.

- Masses trobades després de les digestions enzimàtiques:

-SVPD: m/z : 1495.5 (-pT, $M_{\text{teòrica}}$: 1496.5).

-SpPD: no s'observa cap massa (tot i realitzar anàlisis a temps molt curts de digestió). $M_{\text{teòrica}}$: 795.0.

2.5.8 Reacció del transplatí amb $^5\text{dX}^{\text{I}}\text{TTAT}$

a) a pH àcid (5.3-5.0)

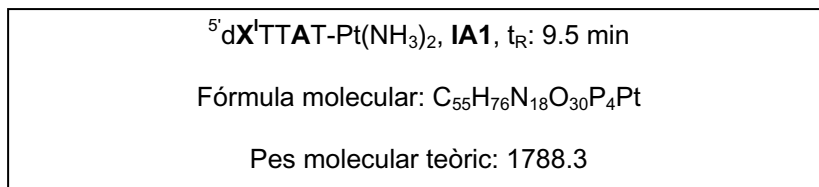
S'han dissolt 1.0 OD₂₆₀ de l'oligonucleòtid $^5\text{dX}^{\text{I}}\text{TTAT}$ en 445.5 μL de H_2O i s'han addicionat 4.5 μL d'una solució aquosa 10 mM de transplatí (2 eq), de manera que la concentració d'oligonucleòtid ha estat 0.05 mM. La mescla de reacció s'ha agitat i s'ha mantingut a 37 °C en un bany termostatitzat. S'ha mesurat el pH del medi a diferents temps, que ha anat variant dins d'un interval de 5.3-5.0. El seguiment de la reacció s'ha portat a terme mitjançant anàlisi per HPLC en fase reversa (columna Kromasil C₁₈, 10 μm , eluent A: NH_4OAc 0.01 M, eluent B: $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ 1:1; gradient lineal de 10 a 30 % de B en 20 min). Les diferents alíquotes s'han barrejat amb una solució de KCl sat. i s'han congelat fins al moment de l'anàlisi. En aquestes condicions, el producte de partida ha eluït a t_{R} 12.8 min. Al cap de 5 h, s'ha detectat la formació de tres adductes de t_{R} 9.5 min, 10.2 min i 12.3 min amb una relació 9:63:28, restant encara un 68 % d'oligonucleòtid inicial. Al cap de 12 dies, pràcticament no quedava producte de partida (3 %) i els adductes formats estaven en una relació 61:20:19, valor que als 16 dies s'ha situat en 56:19:25. Els dos adductes bifuncionals, en la situació estacionària, s'han trobat en una proporció **IA1/IA2** 75:25.

b) a pH bàsic (8.7-6.7)

S'han dissolt 1.0 OD₂₆₀ de l'oligonucleòtid $^5\text{dX}^{\text{I}}\text{TTAT}$ en H_2O , ajustant el pH a 8.7 amb una solució aquosa de NaOH 0.1 M. S'han addicionat 4.5 μL d'una solució aquosa 10 mM de transplatí (2 eq), de manera que la concentració d'oligonucleòtid ha estat 0.05 mM. La mescla de reacció s'ha agitat i s'ha mantingut a 37 °C en un bany termostatitzat. En afegir el transplatí, el pH ha disminuït fins a 7.9, i al llarg de la reacció aquest valor ha anat decreixent fins a 6.7 (al cap de 95 h). En afegir més NaOH 0.1 M (0.4 μL), s'ha arribat a un pH de 8.7, el qual ha anat variant però no ha baixat de 7.7. El seguiment de la reacció s'ha portat a terme en les mateixes condicions que en l'anterior experiment (a). La reacció de complexació ha estat més lenta, amb

una platinació del 50 % d'oligonucleòtid al cap de 4 dies. S'han format majoritàriament dos adductes bifuncionals, de t_R 9.5 min i 10.2 min, i no s'ha detectat adducte monofuncional. L'adducte majoritari ha estat en tot moment **IA1**, i s'ha arribat a una relació entre ells de 76:24.

Caracterització dels adductes



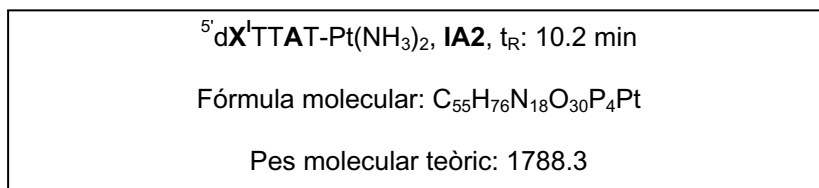
- Espectrometria de masses:

EM MALDI-TOF (matriu THAP/CA, mode negatiu, reflectró): m/z : 1787.9, 1770.8, 1753.8.

- Masses trobades després de les digestions enzimàtiques:

-SVPD: m/z : 1483.1 (-pT, $M_{teòrica}$: 1484.1).

-SpPD: m/z : 1501.6 (+18-Tp, $M_{teòrica}$: 1502.1).



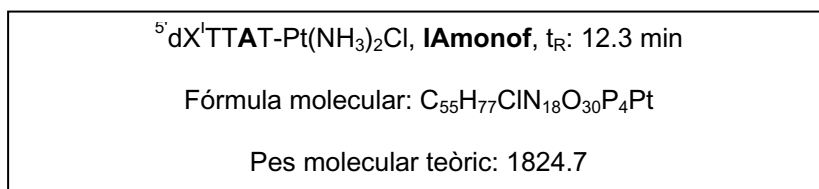
- Espectrometria de masses:

EM MALDI-TOF (matriu THAP/CA, mode negatiu, reflectró): m/z : 1787.2, 1770.2, 1754.2.

- Masses trobades després de les digestions enzimàtiques:

-SVPD: m/z : 1483.5 (-pT, $M_{teòrica}$: 1484.1).

-SpPD: m/z : 1787.6 (maj. als 5 min), 1501.6 (+18-Tp, més important als 15 min, $M_{teòrica}$: 1502.1).



- Espectrometria de masses:

EM MALDI-TOF (matriu THAP/CA, mode negatiu, reflectró): m/z : 1823.5.

- Masses trobades després de les digestions enzimàtiques:

-SVPD: m/z : 1519.6 (-pT, $M_{teòrica}$: 1520.5).

-SpPD: no s'observa cap massa (tot i realitzar anàlisis a temps molt curts de digestió). $M_{teòrica}$: 819.0.

2.5.9 Reacció del transplatí amb $^5dX^lTTGT$

a) a pH àcid (5.3-5.1)

S'han dissolt 1.0 OD₂₆₀ de l'oligonucleòtid $^5dX^lTTGT$ en 390.1 μ L de H₂O i s'han addicionat (3.9 μ L d'una solució aquosa 10 mM de transplatí (2 eq), de manera que la concentració d'oligonucleòtid ha estat 0.05 mM. La mescla de reacció s'ha agitat i s'ha mantingut a 37 °C en un bany termostatitzat. S'ha mesurat el pH del medi a diferents temps, que ha anat decreixent de 5.3 a 5.1. El seguiment de la reacció s'ha portat a terme mitjançant anàlisi per HPLC en fase reversa (columna Kromasil C₁₈, 10 μ m, eluent A: NH₄OAc 0.01 M, eluent B: H₂O/ACN 1:1; gradient lineal de 10 a 30 % de B en 20 min). Les diferents alíquotes s'han barrejat amb una solució de KCl sat. i s'han congelat fins al moment de l'anàlisi. En aquestes condicions, el producte de partida ha eluït a t_R 12.3 min. A les 5 h, no quedava producte de partida i s'ha observat l'aparició de quatre adductes de t_R 10.4 min, 11.5 min, 12.6 min i 13.6 min. La reacció ha anat evolucionant, fins a obtenir dos adductes majoritaris, els de t_R 11.5 min i 12.6 min (després de 16 dies), amb una relació 53:47.

b) a pH bàsic (8.2-7.1)

S'han dissolt 1.0 OD₂₆₀ de l'oligonucleòtid $^5dX^lTTGT$ en H₂O, ajustant el pH a 8.0 amb una solució aquosa de NaOH 0.1 M. S'han addicionat 5.3 μ L d'una solució aquosa 10 mM de transplatí (2 eq), de manera que la concentració d'oligonucleòtid ha estat 0.05 mM. La mescla de reacció s'ha agitat i s'ha mantingut a 37 °C en un bany termostatitzat. En afegir el transplatí el pH ha disminuït fins a 7.4, i al llarg de la reacció aquest valor ha anat decreixent fins a 7.1 (al cap de 95 h). En aquest punt s'ha afegit base, obtenint-se un pH de 8.0, el qual ha tornat a variar dins de l'interval 8.0-7.5. El seguiment de la reacció i la caracterització dels adductes s'ha portat a terme com a l'apartat (a). En aquest cas, la reacció ha estat més lenta i s'ha detectat el producte de partida fins a unes 100 h, alhora que també s'ha observat l'adducte monofuncional (tot i que en menor proporció). L'adducte de t_R 10.4 min ha estat minoritari en tot moment (< 9 %) i a la situació estacionària (13 dies) s'ha obtingut una mescla dels adductes de t_R 11.5 min i 12.6 min amb una relació 63:37.

Caracterització dels adductes

$^5\text{dX}^1\text{TTGT-Pt}(\text{NH}_3)_2$, **IG1**, t_R : 10.4 min

Fórmula molecular: $\text{C}_{55}\text{H}_{76}\text{N}_{18}\text{O}_{31}\text{P}_4\text{Pt}$

Pes molecular teòric: 1804.3

- Espectrometria de masses:

EM MALDI-TOF (matriu THAP/CA, mode negatiu, reflectró): m/z : 1803.4, 1786.3, 1770.3.

- Masses trobades després de les digestions enzimàtiques:

-SVPD: m/z : 1498.9 (-pT, $M_{\text{teòrica}}$: 1500.1).

-SpPD: m/z : 1803.0, 1517.1 (+18-Tp, majoritari als 15 min, $M_{\text{teòrica}}$: 1518.1).

$^5\text{dX}^1\text{TTGT-Pt}(\text{NH}_3)_2$, **IG2**, t_R : 11.5 min

Fórmula molecular: $\text{C}_{55}\text{H}_{76}\text{N}_{18}\text{O}_{31}\text{P}_4\text{Pt}$

Pes molecular teòric: 1804.3

- Espectrometria de masses:

EM MALDI-TOF (matriu THAP/CA, mode negatiu, reflectró): m/z : 1803.4, 1786.3, 1770.2.

- Masses trobades després de les digestions enzimàtiques:

-SVPD: m/z : 1499.4 (-pT, majoritari, $M_{\text{teòrica}}$: 1500.1), 1213.4 (-pT+18-pT, present als 15 min, $M_{\text{teòrica}}$: 1213.9).

-SpPD: m/z : 1517.4 (+18-Tp, $M_{\text{teòrica}}$: 1518.1).

$^5\text{dX}^1\text{TTGT-Pt}(\text{NH}_3)_2$, **IG3**, t_R : 12.6 min

Fórmula molecular: $\text{C}_{55}\text{H}_{76}\text{N}_{18}\text{O}_{31}\text{P}_4\text{Pt}$

Pes molecular teòric: 1804.3

- Espectrometria de masses:

EM MALDI-TOF (matriu THAP/CA, mode negatiu, reflectró): m/z : 1803.2.4, 1787.1, 1770.2.

- Masses trobades després de les digestions enzimàtiques:

-SVPD: m/z : 1499.5 (-pT, majoritari, $M_{\text{teòrica}}$: 1500.1), 1213.6 (-pT+18-pT, $M_{\text{teòrica}}$: 1213.9), present als 15 min.

-SpPD: m/z : 1803.7, 1821.7 (+18), 1517.6 (+18-Tp, majoritari, $M_{\text{teòrica}}$: 1518.1).

$$^5\text{dX}^{\text{I}}\text{TTGT-Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl, IGmonof, } t_{\text{R}}: 13.6 \text{ min}$$

Fórmula molecular: $\text{C}_{55}\text{H}_{77}\text{ClN}_{18}\text{O}_{31}\text{P}_4\text{Pt}$

Pes molecular teòric: 1840.7

- Espectrometria de masses:

EM MALDI-TOF (matriu THAP/CA, mode negatiu, reflectró): m/z : 1839.4, 1822.3.

- Masses trobades després de les digestions enzimàtiques:

-SVPD: m/z : 1536.5 (-pT, $M_{\text{teòrica}}$: 1536.5).

-SpPD: no s'observa cap massa (tot i realitzar anàlisis a temps molt curts de digestió). $M_{\text{teòrica}}$: 835.0.

2.5.10 Reacció del transplatí amb $^5\text{dX}^{\text{I}}\text{X}^{\text{S}}\text{TTTT}$

S'han dissolt 1.0 OD₂₆₀ de l'oligonucleòtid $^5\text{dX}^{\text{I}}\text{X}^{\text{S}}\text{TTTT}$ en 770.9 μL de H₂O i s'han addicionat 4.4 μL d'una solució aquosa 10 mM de transplatí (2 eq), de manera que la concentració d'oligonucleòtid ha estat 0.025 mM. La mescla de reacció s'ha agitat i s'ha mantingut a 37 °C en un bany termostatitzat (el pH ha fluctuat entre 3.8-3.9). El seguiment de la reacció s'ha portat a terme mitjançant anàlisi per HPLC en fase reversa (columna Kromasil C₁₈, 10 μm , eluent A: NH₄OAc 0.01 M, eluent B: H₂O/ACN 1:1; gradient lineal de 10 a 30 % de B en 20 min), de manera que les diferents alíquotes s'han barrejat amb una solució de KCl sat. i s'han congelat fins al moment de l'anàlisi. En aquestes condicions, el producte de partida ha eluït a t_{R} de 17.9 min. A les 7 h, pràcticament no s'ha detectat producte de partida (< 4 %) i s'ha obtingut un adducte platinat molt majoritari ($^5\text{dX}^{\text{I}}\text{X}^{\text{S}}\text{TTTT-Pt}(\text{NH}_3)_2$, t_{R} : 11.9 min), que s'ha mantingut estable al llarg de 24 h. També s'han detectat dos adductes minoritaris (t_{R} : 10.9 min, 12.4 min, en conjunt han representat un 13 % a les 7 h i un 6 % a les 24 h) que no s'han caracteritzat.

Caracterització de l'adducte

$$^5\text{dX}^{\text{I}}\text{X}^{\text{S}}\text{TTTT-Pt}(\text{NH}_3)_2, t_{\text{R}}: 11.9 \text{ min}$$

Fórmula molecular: $\text{C}_{68}\text{H}_{97}\text{N}_{18}\text{O}_{38}\text{P}_5\text{PtS}$

Pes molecular teòric: 2156.6

- Espectrometria de masses:

EM MALDI-TOF (matriu THAP/CA, mode negatiu, reflectró): m/z : 2155.6, 2138.6, 2122.6.

- Masses trobades després de les digestions enzimàtiques:

-SVPD: m/z : 939.2 (-pTpTpTpT, $M_{\text{teòrica}}$: 939.9).

-SpPD: m/z : 2155.8.

- Tractament amb H_2O_2 : estable al tractament oxidatiu: m/z : 2155.5.

2.5.11 Reacció del transplatí amb $5' dX^S X^L TTTT$

S'han dissolt 0.7 OD₂₆₀ de l'oligonucleòtid $5' dX^S X^L TTTT$ en 609.9 μ L de H_2O i s'han addicionat 6.2 μ L d'una dissolució aquosa 10 mM de transplatí (2 eq), de manera que la concentració d'oligonucleòtid ha estat 0.025 mM. La mescla de reacció s'ha agitat i s'ha mantingut a 37 °C en un bany termostatitzat (el pH ha fluctuat entre 4.8-5.2). El seguiment de la reacció s'ha portat a terme mitjançant anàlisi per HPLC en fase reversa (columna Kromasil C₁₈, 10 μ m, eluent A: NH_4OAc 0.01 M, eluent B: H_2O/ACN 1:1; gradient lineal de 10 a 30 % de B en 20 min). Les diferents alíquotes s'han barrejat amb una solució de KCl sat. i s'han congelat fins al moment de l'anàlisi. A les 2 h ja s'observava la formació de dos adductes majoritaris, quedant encara un 29 % d'oligonucleòtid inicial (t_R : 18.2 min). A les 20 h, bàsicament només s'han detectat aquests dos adductes majoritaris, **SI1** (t_R : 10.7 min) i **SI2** (t_R : 12.2 min), sense pràcticament variar la seva proporció relativa en aturar la reacció a les 48 h (49:51). A temps curts, s'han detectat tres adductes bifuncionals més, que en conjunt han arribat a representar un 24 % dels adductes platinats formats (a les 2 h), però que ràpidament s'han transformat en **SI1** i **SI2** (amb un percentatge residual de menys del 8 %).

Caracterització dels adductes

$5' dX^S X^L TTTT-Pt(NH_3)_2$, **SI1**, t_R : 10.7 min

Fórmula molecular: $C_{68}H_{97}N_{18}O_{38}P_5PtS$

Pes molecular teòric: 2156.6

- Espectrometria de masses:

EM MALDI-TOF (matriu THAP/CA, mode negatiu, reflectró): m/z : 2154.4, 2137.5, 2120.6.

- Masses trobades després de les digestions enzimàtiques:

-SVPD: no es detecta cap massa. $M_{teòrica}$: 939.9.

-SpPD: m/z : 2153.3.

- Tractament amb H_2O_2 : estable al tractament oxidatiu: m/z : 2154.1.

$^{51}\text{dX}^{\text{S}}\text{X}^{\text{I}}\text{TTTT-Pt}(\text{NH}_3)_2$, **SI2**, t_{R} : 12.2 min

Fórmula molecular: $\text{C}_{68}\text{H}_{97}\text{N}_{18}\text{O}_{38}\text{P}_5\text{PtS}$

Pes molecular teòric: 2156.6

- Espectrometria de masses:

EM MALDI-TOF (matriu THAP/CA, mode negatiu, reflectró): m/z : 2154.5, 2137.6, 2121.0.

- Masses trobades després de les digestions enzimàtiques:

-SVPD: m/z : als 5 min 1242.7 (-pTpTpT, $M_{\text{teòrica}}$: 1244.1), 937.9 (-pTpTpTpT, $M_{\text{teòrica}}$: 939.9).

-SpPD: m/z : 2154.2.

- Tractament amb H_2O_2 : estable al tractament oxidatiu: m/z : 2153.9.

EXPERIMENTAL CAPÍTOL 3

L'experimental d'aquest capítol es divideix en dos apartats. En primer lloc, s'exposen els diferents assajos de platinació amb transplatí i diverses cadenes modificades. Posteriorment, s'explica el protocol general per a les reaccions d'entrecruament, així com els experiments realitzats entre les cadenes modificades i les seves corresponents cadenes complementàries.

3.1 REACCIONS DE COMPLEXACIÓ ENTRE UNA CADENA OLIGONUCLEOTÍDICA MODIFICADA I TRANSPLATÍ

S'han realitzat les reaccions de complexació entre transplatí i les diferents cadenes oligonucleotídiques modificades (oligonucleòtids S, I, IS i SI). Tant el seguiment de les reaccions com la caracterització dels adductes s'ha realitzat seguint els protocols descrits en el capítol 2 per als oligonucleòtids model.

3.1.1 Reacció del transplatí amb $5'$ dX^SACGTTGAG

S'han dissolt 0.73 OD₂₆₀ de l'oligonucleòtid $5'$ dX^SACGTTGAG en 2.0 mL de H₂O i s'han addicionat 0.8 µL d'una solució aquosa 10 mM de transplatí (1 eq), de manera que la concentració d'oligonucleòtid ha estat 4 µM (pH ~ 5). La mescla de reacció s'ha agitat i s'ha mantingut a 37 °C en un bany termostatitzat. El seguiment de la reacció s'ha portat a terme mitjançant anàlisi per HPLC en fase reversa (columna Kromasil C₁₈, 10 µm, eluent A: NH₄OAc 0.01 M, eluent B: H₂O/ACN 1:1; gradient lineal de 5 a 35 % de B en 30 min), afegint a les diferents alíquotes una solució de KCl sat. i mantenint-les congelades fins al moment de l'anàlisi. Temps d'anàlisi: inicial, 20 min, 1.5 h, 2.5 h, 3.5 h, 7 h, 20 h, 4 dies.

S'ha repetit la reacció dissolent 0.93 OD₂₆₀ de $5'$ dX^SACGTTGAG en 2.5 mL de H₂O i addicionant 1.0 µL d'una solució aquosa 10 mM de transplatí (1 eq), de manera que la concentració d'oligonucleòtid ha estat 4 µM (pH ~ 5). Als 40 min, s'ha aturat la reacció afegint un excés de solució de KCl sat., i s'han col·lectat els diferents pics cromatogràfics, congelat i liofilitzat.

L'adducte majoritari de t_R 13.3 min (**S-Pt**) s'ha analitzat a mig liofilitzar, un cop liofilitzat i després de ser manipulats, observant per HPLC que el producte no és estable, tendint a donar lloc a nous adductes platinats que no han estat caracteritzats.

Caracterització de l'adducte S-Pt

$^5\text{dX}^{\text{S}}\text{ACGTTGAG-Pt}(\text{NH}_3)_2$, **S-Pt**, t_{R} : 13.3 min

Fórmula molecular: $\text{C}_{92}\text{H}_{123}\text{N}_{37}\text{O}_{52}\text{P}_8\text{PtS}$

Pes molecular teòric: 3054.1

- Espectrometria de masses:

EM MALDI-TOF (matriu THAP/CA, mode negatiu, lineal): m/z : 3050.7.

- Masses trobades després de les digestions enzimàtiques:

-SVPD: m/z : 3051.3, 2722.5 (-pG, $M_{\text{teòrica}}$: 2724.9), 2409.6 (-pApG, majoritari a 1 h, $M_{\text{teòrica}}$: 2411.7).

-SpPD: m/z : no es digereix.

- Tractament amb H_2O_2 : estable al tractament oxidatiu: m/z : 3050.2.

3.1.2 Reacció del transplatí amb $^5\text{dX}^{\text{I}}\text{ACGTTGAG}$

S'han dissolt 1.0 OD₂₆₀ de l'oligonucleòtid $^5\text{dX}^{\text{I}}\text{ACGTTGAG}$ en 1.13 mL de medi 10 mM NaClO_4 /4 mM NH_4OAc pH 5.3 i s'han addicionat 1.1 μL d'una solució aquosa 10 mM de transplatí (1 eq), de manera que la concentració d'oligonucleòtid ha estat 10 μM . La mescla de reacció s'ha agitat i s'ha mantingut a 37 °C en un bany termostatitzat. El seguiment de la reacció s'ha portat a terme mitjançant anàlisi per HPLC en fase reversa (columna Kromasil C₁₈, 10 μm , eluent A: NH_4OAc 0.01 M, eluent B: $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ 1:1; gradient lineal de 5 a 25 % de B en 40 min). Temps d'anàlisi: 7 h, 1 dia, 2 dies. Els perfils cromatogràfics han estat relativament complexos i al cap d'un dia ja s'ha observat la formació de majoritàriament 3 adductes bifuncionals de t_{R} 22.1 min (**I-Pt1**), 25.3 min (**I-Pt2**) i 28.7 min (**I-Pt3**), i petites quantitats d'adductes doblement platinats, de t_{R} inferiors. També s'ha detectat al llarg del temps el pic corresponent a oligonucleòtid de partida (t_{R} : 23.4 min, ~ 25 %), tot i que per EM MALDI-TOF s'ha observat també la massa corresponent a adducte monofuncional (oligonucleòtid amb una unitat de *trans*- $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}$). Als 2 dies, els tres adductes bifuncionals es trobaven en una relació 3:2:5.

S'ha realitzat en paral·lel la mateixa reacció, dissolent 1.0 OD₂₆₀ de l'oligonucleòtid $^5\text{dX}^{\text{I}}\text{ACGTTGAG}$ en 1.13 mL de tampó 10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ pH 7.0 i addicionant 1.1 μL d'una solució aquosa 10 mM de transplatí (1 eq). S'ha deixat evolucionar en les mateixes condicions que la reacció descrita per al medi perclorat i s'ha analitzat amb el mateix sistema d'elució. Al cap de 1 dia, degut al baix percentatge de platinació (~ 30 %, majoritàriament **I-Pt3**), s'ha afegit 1 eq més de transplatí. D'aquesta manera, als 2 dies s'ha detectat un perfil similar al de la reacció a pH 5.3, amb tres adductes bifuncionals majoritaris amb una relació aproximada

de 3:2:5, més un petit percentatge d'adductes doblement platinats a t_R baixos, i un pic a t_R 23.4 min que per EM MALDI-TOF s'ha vist que contenia oligonucleòtid inicial i adducte monofuncional (en conjunt, ~ 35 % d'àrea).

Caracterització dels adductes

$^5dX^1ACGTTGAG-Pt(NH_3)_2$, **I-Pt1**, t_R : 22.1 min

Fórmula molecular: $C_{94}H_{123}N_{39}O_{52}P_8Pt$

Pes molecular teòric: 3074.1

- Espectrometria de masses:

EM MALDI-TOF (matriu THAP/CA, mode negatiu, lineal): m/z : 3070.1.

- Masses trobades després de les digestions enzimàtiques:

-SVPD: m/z : 3070.5 (majoritari als 15 min); a temps llargs (1 h) també es detecta 2784.1 (+18-pT, $M_{teòrica}$: 2787.9).

-SpPD: m/z : 2365.5 (-X¹pAp, majoritari als 15 min, $M_{teòrica}$: 2363.6), i al cap de 1h també es detecta 2076.6 (-X¹pApCp, $M_{teòrica}$: 2074.4).

$^5dX^1ACGTTGAG-Pt(NH_3)_2$, **I-Pt3**, t_R : 28.7 min

Fórmula molecular: $C_{94}H_{123}N_{39}O_{52}P_8Pt$

Pes molecular teòric: 3074.1

- Espectrometria de masses:

EM MALDI-TOF (matriu THAP/CA, mode negatiu, lineal): m/z : 3071.8.

- Masses trobades després de les digestions enzimàtiques:

-SVPD: m/z : 2428.6 (-pApG, majoritari als 2 min, $M_{teòrica}$: 2431.7), i comencen a detectar-se 2446.7 (-pApG+18, $M_{teòrica}$: 2449.7) i 2142.9 (-pApG+18-pT, $M_{teòrica}$: 2145.5). A temps llargs (30 min), el pic majoritari és 2142.9 (-ApG+18-pT, $M_{teòrica}$: 2145.5), tot i que encara es poden detectar les altres dues masses.

-SpPD: m/z : 2365.2 (-X¹pAp, majoritari als 5 min, $M_{teòrica}$: 2363.6) i 2076.2 (-X¹pApCp, $M_{teòrica}$: 2074.4). Al cap de 1 h, 2076.2 és majoritària (-X¹pApCp, $M_{teòrica}$: 2074.4).

3.1.3 Reacció del transplatí amb $5^{\text{d}}\text{X}^{\text{l}}\text{X}^{\text{s}}\text{ACGTTGAG}$

3.1.3.1 Reaccions a petita escala

S'han dissolt 1.0 OD₂₆₀ de l'oligonucleòtid $5^{\text{d}}\text{X}^{\text{l}}\text{X}^{\text{s}}\text{ACGTTGAG}$ en 1.05 mL de medi 10 mM NaClO₄/4 mM NH₄OAc pH 5.3 i s'han addicionat 1.1 µL d'una solució aquosa 10 mM de transplatí (1 eq), de manera que la concentració d'oligonucleòtid ha estat 10 µM. La mescla de reacció s'ha agitat i s'ha mantingut a 37 °C en un bany termostatitzat. El seguiment de la reacció s'ha portat a terme mitjançant anàlisi per HPLC en fase reversa (columna Kromasil C₁₈, 10 µm, eluent A: NH₄OAc 0.01 M, eluent B: H₂O/ACN 1:1; gradient lineal de 5 a 25 % de B en 40 min), congelant les alíqüotes fins al moment de l'anàlisi. Temps d'anàlisi: inici reacció, 30 min, 5 h, 24 h, 48 h. A les 5 h, aproximadament un 52 % d'oligonucleòtid inicial s'ha platinat, donant lloc a un adducte bifuncional de t_R: 20.5 min (**IS-Pt1**). Al cap de 2 dies, s'ha detectat una disminució de l'adducte majoritari (32 %), per donar lloc, entre d'altres, a un nou adducte de t_R 24.0 min (**IS-Pt2**, 16 %). Per EM MALDI-TOF dels productes corresponents als diferents pics cromatogràfics, s'ha detectat la presència d'altres adductes bifuncionals (amb una i dues unitats de *trans*-Pt(NH₃)₂), però tots ells eren presents en un percentatge minoritari. L'oligonucleòtid de partida (t_R: 25.6 min) contenia un 7 % d'oligonucleòtid oxidat (tioèter en forma sulfòxid, t_R: 22.7 min), valor que s'ha mantingut al llarg de la reacció i que no s'ha tingut en compte en els percentatges globals.

S'ha realitzat en paral·lel la mateixa reacció, dissolent 1.0 OD₂₆₀ de l'oligonucleòtid $5^{\text{d}}\text{X}^{\text{l}}\text{X}^{\text{s}}\text{ACGTTGAG}$ en 1.05 mL de medi 10 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ pH 7.0 i addicionant 1.1 µL d'una solució aquosa 10 mM de transplatí (1 eq), de manera que la concentració d'oligonucleòtid ha estat 10 µM. La mescla s'ha mantingut a 37 °C i s'ha realitzat el seguiment de la reacció mitjançant HPLC (amb les mateixes condicions que en el cas anterior). Temps d'anàlisi: 3 h, 6 h, 48 h. A les 3 h, un 17 % d'oligonucleòtid inicial s'havia platinat en forma d'adducte bifuncional de t_R 20.5 min (**IS-Pt1**), valor que pràcticament no ha variat en l'alíqüota de 6 h. Al cap de 2 dies, s'ha detectat un nou pic cromatogràfic de t_R 24.0 min que ha correspost a l'adducte bifuncional (**IS-Pt2**), en un 15 %, mentre que l'adducte **IS-Pt1** estava present tan sols en un 12 %.

Caracterització dels adductes

$5'$ dX^lX^SACGTTGAG-Pt(NH₃)₂, **IS-Pt1**, t_R : 20.5 min

Fórmula molecular: C₁₀₇H₁₄₃N₄₂O₅₈P₉PtS

Pes molecular teòric: 3451.5

- Espectrometria de masses:

EM MALDI-TOF (matriu THAP/CA, mode negatiu, lineal): m/z : 3448.3.

- Masses trobades després de les digestions enzimàtiques:

-SVPD: m/z : 1251.5 (-pCpGpTpTpGpApG, $M_{teòrica}$: 1253.1). No s'ha pogut detectar la digestió de la A, hi ha una pèrdua de senyals amb el temps ($M_{teòrica}$: 939.9).

-SpPD: m/z : 3448.3 (no es digereix). A temps llargs (1 h) s'observa alguna massa poc intensa on hi ha digestió per l'extrem 3' (possible contaminació de l'enzim).

- Tractament amb H₂O₂: estable al tractament oxidatiu: m/z : 3447.1

$5'$ dX^lX^SACGTTGAG-Pt(NH₃)₂, **IS-Pt2**, t_R : 24.0 min

Fórmula molecular: C₁₀₇H₁₄₃N₄₂O₅₈P₉PtS

Pes molecular teòric: 3451.5

- Espectrometria de masses:

EM MALDI-TOF (matriu THAP/CA, mode negatiu, lineal): m/z : 3444.3.

- Masses trobades després de les digestions enzimàtiques:

-SVPD: m/z : 1871.4 (-pTpTpGpApG, $M_{teòrica}$: 1871.5).

-SpPD: m/z : 3447.3 (no digestió). Amb el temps es detecta 3463.6 (hidròlisi enllaç fosfat) i 3089.9 (+18-X^Sp, $M_{teòrica}$: 3092.1).

- Tractament amb H₂O₂: s'oxida: m/z : 3458.9 ($M_{teòrica}$: 3467.5).

3.1.3.2 Reacció a gran escala

S'han dissolt 3.0 OD₂₆₀ de l'oligonucleòtid $5'$ dX^lX^SACGTTGAG en 3.16 mL de medi 10 mM NaClO₄/4 mM NH₄OAc pH 5.3 i s'han addicionat 3.2 µL d'una solució aquosa 10 mM de transplatí (1 eq), de manera que la concentració d'oligonucleòtid ha estat 10 µM. La mescla de reacció s'ha agitat i s'ha deixat evolucionar a temperatura ambient al llarg d'un dia. S'ha analitzat el cru de reacció per HPLC en fase reversa (mateixes condicions que a petita escala) observant-se un 60 % d'oligonucleòtid en forma platinada (**IS-Pt1**). S'ha aïllat el producte mitjançant HPLC, liofilitzat i quantificat. S'han obtingut 0.5 OD₂₆₀ de l'adducte desitjat

(rendiment global 19 %). L'oligonucleòtid de partida contenia aproximadament un 10 % d'oligonucleòtid en forma oxidada que no s'ha tingut en compte en els càlculs de percentatges.

3.1.4 Reacció del transplatí amb $5'$ dX^SX^LACGTTGAG

3.1.4.1 Reaccions a petita escala

S'han dissolt 1.0 OD₂₆₀ de l'oligonucleòtid $5'$ dX^SX^LACGTTGAG en 1.05 mL de medi 10 mM NaClO₄/4 mM NH₄OAc pH 5.3 i s'han addicionat 1.1 µL d'una solució aquosa 10 mM de transplatí (1 eq), de manera que la concentració d'oligonucleòtid ha estat 10 µM. La mescla de reacció s'ha agitat i s'ha mantingut a 37 °C en un bany termostatitzat. El seguiment de la reacció s'ha portat a terme mitjançant anàlisi per HPLC en fase reversa (columna Kromasil C₁₈, 10 µm, eluent A: NH₄OAc 0.01 M, eluent B: H₂O/ACN 1:1; gradient lineal de 5 a 25 % de B en 40 min), congelant les alíquotes fins al moment de l'anàlisi. Temps d'anàlisi: inici reacció, 3 h, 6 h, 24 h, 48 h. A les 3 h, aproximadament un 42 % d'oligonucleòtid inicial s'ha platinat, donant lloc a un adducte bifuncional de t_R 20.6 min (**SI-Pt1**), valor que ha augmentat fins a un 48 % a les 6 h. Al cap de 1 dia, s'ha detectat una disminució de l'adducte majoritari i la presència de nous adductes (amb una i dues unitats de *trans*-Pt(NH₃)₂, tots ells en menor percentatge). Un dels adductes bifuncionals ha presentat un t_R 25.8 min (**SI-Pt2**), pràcticament idèntic al del producte inicial, dificultant la integració correcta dels pics cromatogràfics. L'oligonucleòtid inicial de partida (t_R: 26.0 min) contenia un 7 % d'oligonucleòtid oxidat (tioèter en forma sulfòxid, t_R: 23.3 min), valor que s'ha mantingut al llarg de la reacció i que no s'ha tingut en compte en els percentatges globals.

S'ha realitzat en paral·lel la mateixa reacció, dissolent 1.0 OD₂₆₀ de l'oligonucleòtid $5'$ dX^SX^LACGTTGAG en 1.05 mL de medi 10 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ pH 7.0 i addicionant 1.1 µL d'una solució aquosa 10 mM de transplatí (1 eq), de manera que la concentració d'oligonucleòtid ha estat 10 µM. La mescla s'ha mantingut a 37 °C i s'ha realitzat el seguiment de la reacció mitjançant HPLC (amb les mateixes condicions que en el cas anterior). Temps d'anàlisi: 6 h, 24 h, 48 h. A les 6 h, un 34 % d'oligonucleòtid inicial s'havia platinat en forma d'adducte bifuncional de t_R 20.6 min (**SI-Pt1**), valor que ha disminuït al 26 % al cap d'un dia. Al cap de 2 dies, s'ha detectat una esquena (t_R: 25.8 min) en el pic cromatogràfic corresponent a l'oligonucleòtid de partida, que ha correspost a l'adducte bifuncional (**SI-Pt2**). Aquest pic no s'ha pogut integrar correctament, mentre que ja només quedava un 8 % d'adducte **SI-Pt1**.

Caracterització dels adductes

$5'$ dX^SX^LACGTTGAG-Pt(NH₃)₂, **SI-Pt1**, t_R: 20.6min

Fórmula molecular: C₁₀₇H₁₄₃N₄₂O₅₈P₉PtS

Pes molecular teòric: 3451.5

- Espectrometria de masses:

EM MALDI-TOF (matriu THAP/CA, mode negatiu, lineal): *m/z*: 3445.9.

- Masses trobades després de les digestions enzimàtiques:

-SVPD: *m/z*: 939.6 (-pApCpGpTpTpGpApG, M_{teòrica}: 939.9).

-SpPD: *m/z*: 3445.1 (no digestió). A temps llargs es detecten alguns senyals de digestió anòmala com a 3'-exonucleasa.

- Tractament amb H₂O₂: estable al tractament oxidatiu: *m/z*: 3445.6.

$5'$ dX^SX^LACGTTGAG-Pt(NH₃)₂, **SI-Pt2**, t_R: 25.8 min

Fórmula molecular: C₁₀₇H₁₄₃N₄₂O₅₈P₉PtS

Pes molecular teòric: 3451.5

- Espectrometria de masses:

EM MALDI-TOF (matriu THAP/CA, mode negatiu, lineal): *m/z*: 3442.4.

- Masses trobades després de les digestions enzimàtiques:

-SVPD: *m/z*: 1868.6 (-pTpTpGpApG, M_{teòrica}: 1871.5).

-SpPD: *m/z*: 3068.5 (-X^Sp, M_{teòrica}: 3074.1).

- Tractament amb H₂O₂: s'oxida: *m/z*: 3456.9 (M_{teòrica}: 3467.5).

3.1.4.2 Reacció a gran escala

S'han dissolt 3.0 OD₂₆₀ de l'oligonucleòtid $5'$ dX^SX^LACGTTGAG en 3.16 mL de medi 10 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ pH 7.0 i addicionant 3.2 µL d'una solució aquosa 10 mM de transplatí (1 eq), de manera que la concentració d'oligonucleòtid ha estat 10 µM. La mescla de reacció s'ha agitat i s'ha deixat evolucionar a temperatura ambient al llarg d'un dia. S'ha analitzat el cru de reacció per HPLC en fase reversa (mateixes condicions que a petita escala) observant-se un 41 % d'oligonucleòtid en forma platinada (**SI-Pt1**). S'ha aïllat el producte mitjançant HPLC, liofilitzat i quantificat. S'han obtingut 0.8 OD₂₆₀ de l'adducte desitjat (rendiment global 27 %).

3.2 REACCIONS D'ENTRECREUAMENT

3.2.1 Protocol general per a les reaccions entre dues cadenes oligonucleotídiques i transplati

Es dissolen 1.0 OD₂₆₀ d'oligonucleòtid (modificat) i 1 eq de la cadena complementària corresponent en 1.05 mL de tampó 10 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ pH 7.0 i 100 mM NaCl, per tal que la concentració en dúplex sigui 10 µM. S'escalfa la mostra a 90 °C i es deixa refredar lentament al llarg d'una nit fins a temperatura ambient. Seguidament, s'addicionen 1.1 µL d'una solució aquosa 10 mM de transplati (1 eq), s'agita la mescla de reacció i es manté a 16 °C en un bany termostatitzat. El seguiment de la reacció es porta a terme mitjançant l'anàlisi d'alíquotes per EM MALDI-TOF, HPLC de bescanvi aniònic i electroforesi en gel de poliacrilamida en condicions desnaturalitzants.

3.2.1.1 Anàlisi dels crus de reacció i dels productes aïllats

- **EM MALDI-TOF**

Per a l'anàlisi directa del cru de reacció, es barregen 1 µL de mostra i 1 µL de CA, i finalment 1 µL de THAP. Degut al contingut salí de la mostra, la detecció de les masses es veu més o menys dificultada. Es pot detectar la massa corresponent a adducte d'entrecreuament, però no es pot assegurar la seva existència, ja que podria ser un artefacte de la pròpia tècnica.

Per a l'anàlisi dels productes col·lectats per HPLC de bescanvi aniònic, és necessari l'ús de puntes Zip Tip (veure apartat 3.8 de Materials i Mètodes), per tal de dessalar i concentrar el producte (per a mostres analítiques).

- **HPLC**

Condicions de HPLC de bescanvi aniònic: columna NucleoPac PAX100, eluint amb NH₄OAc 25 mM en una dissolució al 10 % de ACN en aigua, i quantitats creixents de NaCl (gradient de 0.25 a 0.5 M en 30 min, flux 1 mL/min). Es detecta la presència d'adductes d'entrecreuament a t_R majors, pel fet que queden més retinguts a la columna. Degut a l'elevada concentració de NaCl, les cadenes oligonucleotídiques sense platinar s'elueixen en forma de dúplex (en cas que hi hagi complementaritat), observant-se un pic ample que no permet una correcta integració dels pics cromatogràfics. Nogensmenys, aquesta tècnica ha permès d'aïllar els productes d'entrecreuament desitjats. A t_R baixos, s'ha detectat la presència d'adductes bifuncionals intracadena. Posteriorment a l'aïllament, cal una etapa de dessalatge mitjançant columnes Sep-Pak (veure apartat 2.3.3.5 de Materials i Mètodes) per a la caracterització estructural dels adductes.

L'altre sistema d'anàlisi mitjançant cromatografia líquida, que permet treballar més còmodament pel fet que no s'empra un contingut tan elevat de sals, fa ús de columnes de fase reversa (Kromasil C₁₈, 10 µm, eluent A: 0.05 M TEAAc, eluent B: H₂O/ACN 1:1; gradient lineal de 15 a 35 % de B en 30 min). Aquest sistema s'ha optimitzat posteriorment a l'ús de condicions de bescanvi aniónic i s'ha emprat per a la separació dels productes formats en una reacció realitzada a gran escala (apartat 3.2.7).

- **PAGE**

L'electroforesi en gel de poliacrilamida (20 %), en condicions desnaturalitzants (urea 7 M) i a temperatura ambient, permet visualitzar i confirmar la formació d'entrecreuaments entre cadenes oligonucleotídiques, pel fet que presenten una menor mobilitat que les cadenes senzilles. Com més nucleòtids conté una cadena, menor mobilitat electroforètica. Les cadenes modificades amb un grup tioèter i amb un grup imidazole presenten una menor mobilitat del que s'esperaria per a oligonucleòtids de la seva talla, fins al punt que presenten una mobilitat tan sols lleugerament major les cadenes de 13 nucleòtids que els oligonucleòtids modificats amb X^S i X^I (de 10 nucleòtids de llargària).

3.2.1.2 Estudis d'estabilitat

Prèviament a la caracterització, s'ha analitzat l'estabilitat dels adductes mitjançant HPLC de bescanvi aniónic. S'ha detectat la presència (en general inferior al 5 %) d'adducte oxidat en els productes on el grup tioèter no intervé en la coordinació a l'àtom metàl·lic. Tot i així, la presència d'aquest producte d'oxidació no ha afectat al procés de caracterització.

Com ja s'ha comentat, els adductes bifuncionals intercadena s'han mostrat estables a l'anàlisi per PAGE, mentre que els adductes bifuncionals intracadena no han resistit les condicions d'anàlisi de PAGE (s'observa majoritàriament la banda corresponent a l'oligonucleòtid modificat de partida). Aquest fet posa de manifest que durant l'anàlisi dels crús de reacció, la intensitat de les bandes d'entrecreuament és un indicatiu del percentatge de producte obtingut, però que l'observació lleu de banda corresponent a adducte intracadena no correspon a la seva presència en el cru de reacció (de manera que es detecta una banda més intensa d'oligonucleòtid modificat de partida).

3.2.1.3 Reacció d'entrecreuament entre IS i G1

S'han dissolt 1.0 OD₂₆₀ de l'oligonucleòtid IS i 1 eq de la cadena complementària G1 en 1.05 mL de medi 10 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ pH 7.0 i 100 mM NaCl, i s'han addicionat 1.1 µL d'una solució aquosa 10 mM de transplatí (1 eq), de manera que la concentració en dúplex ha estat 10 µM. La mescla s'ha mantingut a 16 °C en un bany termostatitzat (pH 6.8-6.9). S'ha seguit la reacció mitjançant HPLC de bescanvi aniónic (condicions descrites a l'apartat 3.2.1.1). Temps d'anàlisi: 9 dies i 12 dies. Als 12 dies s'ha detectat **IS-Pt1** (t_R: 2.9 min), pic que integrava un 11

% d'àrea, i **IS-G1-Pt** (t_R : 20.9 min), producte d'entrecreuament que ha integrat un 21 % de l'àrea total del cromatograma. S'ha aïllat l'adducte **IS-G1-Pt** mitjançant HPLC i, després de dessalar la mostra emprant una columna Sep-Pak i tornar-la a reanalitzar, s'ha detectat un 4 % d'adducte en forma oxidada.

3.2.1.4 Reacció d'entrecreuament entre SI i G1

S'han dissolt 1.0 OD₂₆₀ de l'oligonucleòtid SI i 1 eq de la cadena complementària G1 en 1.05 mL de medi 10 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ pH 7.0 i 100 mM NaCl, i s'han addicionat 1.1 µL d'una solució aquosa 10 mM de transplatí (1 eq), de manera que la concentració en dúplex ha estat 10 µM. La mescla s'ha mantingut a 16 °C en un bany termostatitzat (pH 6.8-6.9). S'ha seguit la reacció mitjançant HPLC, emprant les mateixes condicions que a l'apartat 3.2.1.1. Als 12 dies s'ha detectat per HPLC un únic pic corresponent als adductes bifuncionals intracadena **SI-Pt1** (t_R : 2.9 min, 15 % de l'àrea) i la formació d'un adducte d'entrecreuament amb una unitat de *trans*-Pt(NH₃)₂ (t_R : 20.5 min, 11 % de l'àrea), **SI-Pt-G1**, en forma de doble pic. L'anàlisi d'aquest producte aïllat ha mostrat un 3 % d'adducte oxidat.

3.2.2 Reaccions entre IS-Pt1 o SI-Pt1 i G1

3.2.2.1 Reacció d'entrecreuament entre IS-Pt1 i G1

S'han dissolt 0.45 OD₂₆₀ de l'adducte platinat **IS-Pt1** i 1 eq de la cadena complementària G1 en 0.47 mL de medi 10 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ pH 7.0 i 100 mM NaCl, de manera que la concentració en dúplex ha estat 10 µM. La mescla s'ha mantingut a 16 °C en un bany termostatitzat (pH 6.8-6.9). S'ha seguit la reacció mitjançant HPLC, emprant les mateixes condicions que a l'apartat 3.2.1.1 i s'ha observat que al cap de 12 dies l'adducte **IS-G1-Pt** integrava un 41 % de l'àrea total del cromatograma (t_R : 20.9 min). S'ha aïllat l'adducte **IS-G1-Pt** per HPLC, el qual ha presentat un 5 % d'adducte en forma oxidada (després de dessalar la mostra emprant una columna Sep-Pak).

3.2.2.2 Reacció d'entrecreuament entre SI-Pt1 i G1

S'han dissolt 0.50 OD₂₆₀ de l'adducte platinat **SI-Pt1** i 1 eq de la cadena complementària G1 en 0.53 mL de medi 10 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ pH 7.0 i 100 mM NaCl, de manera que la concentració en dúplex ha estat 10 µM. La mescla s'ha mantingut a 16 °C en un bany termostatitzat (pH 6.8-6.9). S'ha seguit la reacció mitjançant HPLC emprant les mateixes condicions que a l'apartat 3.2.1.1. Temps d'anàlisi: 2, 5 i 14 dies. S'ha detectat un doble pic a t_R 20.5 min (**SI-G1-Pt**), que als 14 dies ha representat un 26 % de l'àrea del cromatograma. S'ha aïllat l'adducte mitjançant HPLC i després de dessalar la mostra emprant una columna Sep-Pak s'ha detectat un 4 % d'adducte en forma oxidada.

A la Taula 3.1 es resumeixen els resultats obtinguts, tant pel que fa a proporció d'adducte d'entrecreuament com al percentatge d'adducte intracadena present a la fi de les 4 reaccions anteriors (apartats 3.2.1 i 3.2.2).

reacció	% àrea pic d'entrecreuament HPLC (12 dies)	% pic d'adducte intracadena HPLC (12 dies)
IS-Pt1+G1	41 %, t_R : 20.9 min	2 %, t_R : 3.0 min
IS+G1	21 %, t_R : 20.9 min	11 %, t_R : 2.9 min
SI-Pt1+G1	26 %, t_R : 20.5 min (14 dies)	no es detecta
SI+G1	11 %, t_R : 20.5 min	15 %, t_R : 2.9 min

Taula 3.1. Comparació dels percentatges obtinguts d'adductes bifuncionals intercadena i intracadena per a les 4 reaccions (determinats per comparació de les àrees dels pics corresponents).

3.2.3 Reaccions d'entrecreuament entre G1 i diferents cadenes modificades

Seguint el protocol general descrit a l'apartat 3.2.1, s'han realitzat en paral·lel 8 reaccions d'entrecreuament, emprant transplatí, la cadena G1 i variant la cadena oligonucleotídica modificada:

- 1) $5'$ dX^SACGTTGAG, cadena S
- 2) $5'$ dX^IACGTTGAG, cadena I
- 3) $5'$ dX^IX^SACGTTGAG, cadena IS
- 4) $5'$ dX^SX^IACGTTGAG, cadena SI
- 5) $5'$ dCACGTTGAG, cadena control C
- 6) $5'$ dX^{Soxid}ACGTTGAG, cadena Sox
- 7) $5'$ dX^IX^{Soxid}ACGTTGAG, cadena ISox
- 8) $5'$ dX^{Soxid}X^IACGTTGAG, cadena Slox

El seguiment de la reacció per HPLC de bescanvi aniònic s'ha realitzat als 2, 6 i 15 dies, moment en què s'han aturat les reaccions. També s'han analitzat els crus de reacció mitjançant PAGE als 6 i 13 dies. Excepte per a les reaccions amb S i IS (2 i 4), s'ha afegit 1 eq més de transplatí en els medis de reacció al cap de 9 dies, degut al baix percentatge de platinació detectat.

Per a la reacció CLS s'ha intentat aïllar l'adducte d'entrecreuament majoritari, que s'ha mostrat inestable, donant lloc per HPLC a una mescla de productes (adducte bifuncional intracadena, cadenes oligonucleotídiques de partida, adducte bifuncional intercadena majoritari i adducte

bifuncional intercadena minoritari). Per a la reacció CLIS s'ha aïllat l'adducte bifuncional intercadena **IS-G1-Pt**, que ha presentat un 5 % de l'adducte en forma oxidada per reacció amb l'oxigen atmosfèric.

reacció	% pic d'entrecruament, HPLC (15 dies)	detecció de banda d'entrecruament, PAGE (13 dies)
CLS	29 % (8 %), t_R : 19.8 min (21.2 min)	sí (poc intensa)
CLI	2 %, t_R : 19.4 min	no
CLIS	22 %, t_R : 20.9 min	sí
CLSI	7 %, t_R : 20.5 min (doble pic)	sí (poc intensa)
CLC	no es detecta	no
CLSox	1 %, t_R : 19.3 min	no
CLISox	2 %, t_R : 19.9 min	no
CLSoxI	5 %, t_R : 20.1 min	sí (molt poc intensa)

Taula 3.2. Comparació dels resultats de l'anàlisi de les reaccions d'entrecruament, per HPLC i PAGE.

3.2.4 Reaccions d'entrecruament entre IS i diferents cadenes complementàries

Emprant el protocol general descrit a l'apartat 3.2.1, s'han realitzat en paral·lel 5 reaccions, emprant la cadena modificada IS i variant la cadena complementària:

- 1) 3dGTGCAACTC , complementària llargària normal (CN)
- 2) 3dGTTTGTGCAACTC , complementària G1
- 3) 3dTGTTGTGCAACTC , complementària G2
- 4) 3dTTGTGTGCAACTC , complementària G3
- 5) 3dTTTGGTGTGCAACTC , complementària G4

El seguiment de la reacció per HPLC de bescanvi aniònic s'ha realitzat als 4, 7, 11, 14 i 19 dies, moment en què s'han aturat les reaccions. També s'han analitzat els crús de reacció mitjançant PAGE als 4 i 14 dies.

S'han aïllat per HPLC els productes d'entrecruament, s'han dessalat amb columnes Sep-Pak i s'han reanalitzat per HPLC abans de portar a terme la caracterització emprant enzims i tractament oxidatiu. Els productes d'entrecruament s'han mostrat estables, amb la presència d'adducte en forma oxidada en un percentatge del 3-5 % (excepte per a CCN, que ha estat de gairebé el 9 %).

reacció	% pic d'entrecruament HPLC (19 dies)	% pic d'adducte intracadena HPLC (19 dies)	detecció de banda d'entrecruament, PAGE (14 dies)
CCN	13 %, t _R : 15.5 min	no es detecta correctament	sí
CG1	26 %, t _R : 20.9 min	6 %, t _R : 2.9 min	sí
CG2	14 %, t _R : 20.5 min	37 %, t _R : 2.8 min	sí
CG3	20 %, t _R : 20.5 min	16 %, t _R : 2.9 min	sí
CG4	24 %, t _R : 20.4 min	9 %, t _R : 3.1 min	sí

Taula 3.3. Comparació dels resultats de l'anàlisi de les reaccions d'entrecruament, per HPLC i PAGE.

3.2.5 Reaccions entre IS, transplatí i cadenes no complementàries

S'han realitzat 3 reaccions en paral·lel, emprant la cadena modificada IS i tres seqüències oligonucleotídiques no complementàries de diferent llargària:

- 1) ³dGCCATATGGC (10mer)
- 2) ³dCGATGCTTACCA (12mer)
- 3) ³dTTTCAGAAAATCTAG (15mer)

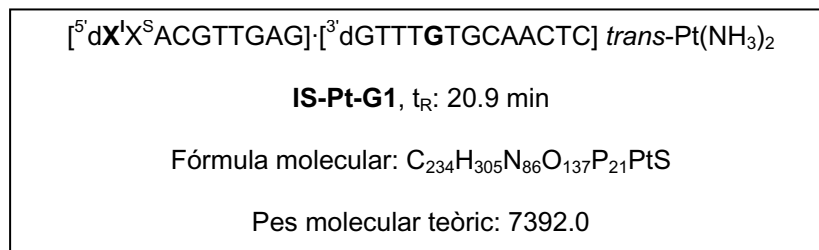
S'ha emprat el protocol general descrit a l'apartat 3.2.1. A la següent taula, es mostren els resultats.

reacció	% pic d'adducte intracadena HPLC (19 dies)	% pic d'entrecruament, HPLC (19 dies)	detecció de banda d'entrecruament, PAGE (14 dies)
C10mer	37 %, t _R : 2.8 min	no es detecta	no
C12mer	31 %, t _R : 2.9 min	no es detecta	no
C15mer	34 %, t _R : 2.9 min	no es detecta	no

Taula 3.4. Comparació dels resultats de l'anàlisi de les reaccions d'entrecruament, per HPLC i PAGE.

3.2.6 Caracterització dels adductes d'entrecreuament

3.2.6.1 Adducte IS-Pt-G1



- Espectrometria de masses:

EM MALDI-TOF (matriu THAP/CA, mode negatiu, lineal): m/z : 7386.0.

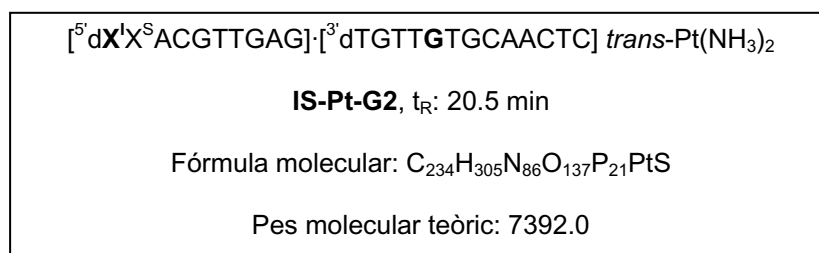
- Masses trobades després de les digestions enzimàtiques:

-SVPD: m/z : detecció de l'eliminació dels diferents nucleòtids pels extrems 3' fins que amb el temps es detecta un pic majoritari de 3632.2, que posteriorment desapareix per donar lloc a 3256.9, que correspon a la digestió de X^{S} ($M_{\text{teòrica}}$: 3261.3).

-SpPD: m/z : 5246.6 (digestió de pGpCpApApCpTpC), no detectant-se la digestió de la seqüent T de la seqüència ($M_{\text{teòrica}}$: 4960.5).

- Tractament amb H_2O_2 : s'oxida: m/z : 7408.6.

3.2.6.2 Adducte IS-Pt-G2



- Espectrometria de masses:

EM MALDI-TOF (matriu THAP/CA, mode negatiu, lineal): m/z : 7388.2.

- Masses trobades després de les digestions enzimàtiques:

-SVPD: m/z : 3630.5 i finalment 3254.9 ($M_{\text{teòrica}}$: 3261.3).

-SpPD: m/z : 5250.1 (digestió de pGpCpApApCpTpC). No s'observa digestió de la T següent ($M_{\text{teòrica}}$: 4960.5).

- Tractament amb H_2O_2 : s'oxida: m/z : 7404.2.

3.2.6.3 Adducte IS-Pt-G3



IS-Pt-G3, t_{R} : 20.5 min

Fórmula molecular: $\text{C}_{234}\text{H}_{305}\text{N}_{86}\text{O}_{137}\text{P}_{21}\text{PtS}$

Pes molecular teòric: 7392.0

- Espectrometria de masses:

EM MALDI-TOF (matriu THAP/CA, mode negatiu, lineal): m/z : 7385.5.

- Masses trobades després de les digestions enzimàtiques:

-SVPD: m/z : 3631.0, 3255.1 (majoritari amb el temps, $M_{\text{teòrica}}$: 3261.3).

-SpPD: m/z : 5251.9 (no s'observa la digestió de la T). $M_{\text{teòrica}}$: 4960.5.

- Tractament amb H_2O_2 : s'oxida: m/z : 7400.5.

3.2.6.4 Adducte IS-Pt-G4



IS-Pt-G4, t_{R} : 20.4 min

Fórmula molecular: $\text{C}_{234}\text{H}_{305}\text{N}_{86}\text{O}_{137}\text{P}_{21}\text{PtS}$

Pes molecular teòric: 7392.0

- Espectrometria de masses:

EM MALDI-TOF (matriu THAP/CA, mode negatiu, lineal): m/z : 7390.3.

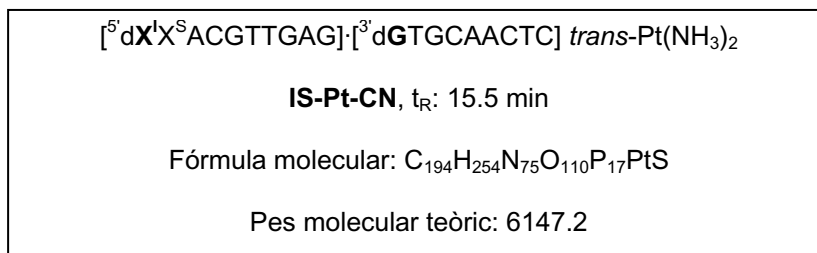
- Masses trobades després de les digestions enzimàtiques:

-SVPD: m/z : es van detectar totes les masses de digestió fins que s'arriba inicialment a una mescla de les masses 3961.1, 3632.9 (-G respecte el primer), 3585.0 (-X^S respecte al primer) i 3257.1 (-G o -X^S en funció de respecte quin pic es miri). Amb el temps, només es detecta 3256.3 ($M_{\text{teòrica}}$: 3261.3).

-SpPD: 5250.2 (digestió fins a la T anterior a la nucleobase esperada). $M_{\text{teòrica}}$: 4960.5.

- Tractament amb H_2O_2 : s'oxida: m/z : 7404.3.

3.2.6.5 Adducte IS-Pt-CN



- Espectrometria de masses:

EM MALDI-TOF (matriu THAP/CA, mode negatiu, lineal): m/z : 6143.2.

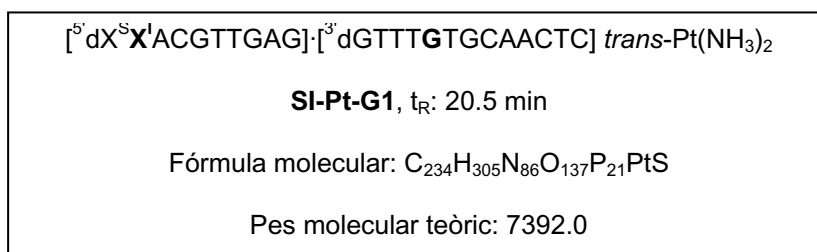
- Masses trobades després de les digestions enzimàtiques:

-SVPD: m/z : s'observen les masses corresponents a la digestió per l'extrem 3' de la cadena modificada fins a la detecció de 3631.1 (-pApCpGpTpTpGpApG, $M_{\text{teòrica}}$: 3638.7) i posteriorment és majoritària 3253.0 (el fragment -pX^S, $M_{\text{teòrica}}$: 3261.3).

-SpPD: m/z : 4013.0 (-CpTpCpApApCpGp, $M_{\text{teòrica}}$: 4022.9), però no es detecta la digestió de la T següent.

- Tractament amb H_2O_2 : s'oxida: m/z : 6160.6.

3.2.6.6 Adducte SI-Pt-G1



- Espectrometria de masses:

EM MALDI-TOF (matriu THAP/CA, mode negatiu, lineal): m/z : 7393.8.

- Masses trobades després de les digestions enzimàtiques:

-SVPD: m/z : 3632.4 ($M_{\text{teòrica}}$: 3638.7).

-SpPD: m/z : 4569.7 ($M_{\text{teòrica}}$: 4583.1).

- Tractament amb H_2O_2 : s'oxida: m/z : 7414.5.

3.2.7 Reacció d'entrecreuament entre IS i G1 a gran escala

S'han dissolt 18.0 OD₂₆₀ d'oligonucleòtid IS i 1 eq de cadena complementària G1 (22.5 OD₂₆₀) en 18.9 mL de medi 10 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ pH 7.0 i 100 mM NaCl, per tal que la concentració en dúplex fos 10 μM. S'ha escalfat la mostra a 90 °C, deixant refredar lentament al llarg d'una nit fins a temperatura ambient. Seguidament, s'han addicionat 18.9 μL d'una solució aquosa 10 mM de transplatí (1 eq), s'ha agitat la mescla de reacció i s'ha mantingut a 16 °C en un bany termostatitzat (pH 6.8-6.9). El seguiment de la reacció s'ha portat a terme mitjançant l'anàlisi d'alíquotes per HPLC en condicions de fase reversa (columna Kromasil C₁₈, 10 μm, eluent A: TEAAc 0.05 M, eluent B: H₂O/ACN 1:1; gradient lineal de 15 a 30 % de B en 30 min).

Primerament s'ha format l'adducte bifuncional intracadena **IS-Pt1** (t_R: 12.5 min), observant-se, en menor proporció, la presència de l'adducte bifuncional intercadena **IS-Pt-G1** (t_R: 24.5 min, 25.1 min). Amb el pas del temps, **IS-Pt1** ha anat decreixent (després d'un màxim als ~ 10 dies), mentre el producte d'entrecreuament ha anat augmentant, fins a una proporció relativa per HPLC de ~ 0.2. Al cap de 35 dies, s'ha congelat la reacció, tot i que encara no s'havia arribat a una situació estacionària (veure el gràfic de l'apartat 3.3.3 a la part teòrica).

S'han aïllat **IS-Pt1** i **IS-Pt-G1** per HPLC en fase reversa. L'adducte d'entrecreuament s'ha dessalat per filtració molecular a través de Sephadex G-10 (apartat 2.3.3.3 de Materials i Mètodes), per tal d'eliminar les sals (acetat de trietilamoni) i tenir la mostra a punt per a poder realitzar els experiments de RMN. S'han obtingut 12.1 OD₂₆₀ de **IS-Pt-G1**, que corresponen a un rendiment global del 31 %. També s'han obtingut 1.1 OD₂₆₀ de **IS-Pt1**, que representen un 6 % de l'adducte que s'hauria pogut formar en absència de G1.

3.3 Determinació de la T_m de l'adducte IS-Pt-G1

En general, per a la formació dels dúplex s'ha de mesclar quantitats equimolars de les dues cadenes. En aquest cas, l'adducte **IS-Pt-G1** ja conté les dues seqüències, de manera que només s'ha hagut de dissoldre la quantitat adequada de **IS-Pt-G1** (0.208 OD₂₆₀) en un determinat volum de tampó 10 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 7 i 100 mM NaCl, per tal que la concentració fos 2 μM. Per al dúplex control sense platinar [⁵dX¹X^SACGTTGAG]-[³dGTTTGTGCAACTC], s'ha seguit el mateix procediment descrit al capítol 1 (apartat 1.4.2). El procediment seguit per enregistrar les corbes de fusió és el que s'indica a l'apartat 4 de Materials i Mètodes. Els resultats obtinguts es mostren a la Taula 3.5.

codi	tècnica	dúplex	T _m (°C)
IS+G1	UV	[⁵ dX ¹ X ^S ACGTTGAG]-[⁵ dCTCAACGTGTTTG]	32.0
IS-Pt-G1	UV	[⁵ dX ¹ X ^S ACGTTGAG]-[³ dGTTT G TGCAACTC] <i>trans</i> -Pt(NH ₃) ₂	72.0

Taula 3.5. Valors de T_m "trobat" per als dúplex.

3.4 Estudi per RMN de l'adducte IS-Pt-G1

S'han realitzat els estudis per RMN de dues estructures en dissolució, del dúplex IS+G1 i de l'adducte intercadena **IS-Pt-G1**. Els espectres s'han fet a una concentració d'oligonucleòtid 200 μM en un volum de 500 μL de D_2O o $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1, tampó 10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH 7 i 100 mM NaCl.

Els espectres s'han adquirit en un espectròmetre Bruker DMX de 600 MHz, equipat amb criosonda, o Bruker Advance de 800 MHz, i s'han processat amb el software XWIN-NMR, al "Instituto de Química Física Rocasolano" (CSIC, Madrid).

S'ha emprat el mètode de pre-saturació en els espectres en D_2O per tal d'eliminar el senyal d'aigua residual. En els espectres bidimensionals en aigua, la supressió de H_2O s'ha assolit amb el mòdul WATERGATE en la seqüència de polsos d'adquisició. S'han adquirit espectres NOESY en D_2O a diferents temps de mescla de 100, 200 i 300 ms. L'espectre TOCSY s'ha adquirit amb la seqüència estàndard de bloqueig de spin MLEV-17 i un temps de mescla de 80 ms. També s'han enregistrat espectres DQF-COSY. L'assignació semi-automàtica dels pics de creuament NOESY i l'avaluació quantitativa de les intensitats NOE s'han portat a terme amb el programa d'anàlisi espectral SPARKY.

ABREVIATURES I ANNEXOS

ABREVIATURES

A, dA, Ap/pA	adenina, 2'-desoxiadenosina, àcid 2'-desoxi-3'/5'-adenílic
ACN	acetonitril
Ac₂O	anhídrid acètic
AcOEt	acetat d'etil
AcOH	àcid acètic
anh.	anhidre
AP	fosfatasa alcalina
ⁱBu	isobutiril
^tBuOOH	hidroperòxid de <i>tert</i> -butil
Bz	benzoïl
C, dC, Cp/pC	citocina, 2'-desoxicitidina, àcid 2'-desoxi-3'/5'-citidílic
CCF	cromatografia en capa fina
CNE	2-cianoetil
CPG	boles de vidre de porus controlat (<i>Controlled Pore Glass</i>)
d	doblet
DCM	diclorometà
DIEA	<i>N,N'</i> -diisopropiletilamina
DMF	<i>N,N'</i> -dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfòxid
DMT	4,4'-dimetoxitritil
DNA	àcid desoxiribonucleic
dN	2'-desoxiribonucleòsid
EDTA	àcid etilendiaminotetraacètic
EM	espectrometria de masses
EM ES	espectrometria de masses amb ionització per electrospai
EM FAB	espectrometria de masses amb ionització per bombardeig d'àtoms ràpids
eq	equivalent
G, dG, Gp/pG	guanina, 2'-desoxiguanosina, àcid 2'-desoxi-3'/5'-guanílic
HPLC	cromatografia líquida d'elevada resolució (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
Icaa	cadena llarga d'alquilamina (<i>long chain alkylamine</i>)
m	multiplet
MALDI-TOF	espectrometria de masses per desorció iònica provocada per làser, assistida per matriu, amb analitzador de temps de vol
MeOH	metanol
MMA	<i>N</i> -metil-mercaptoacetamida

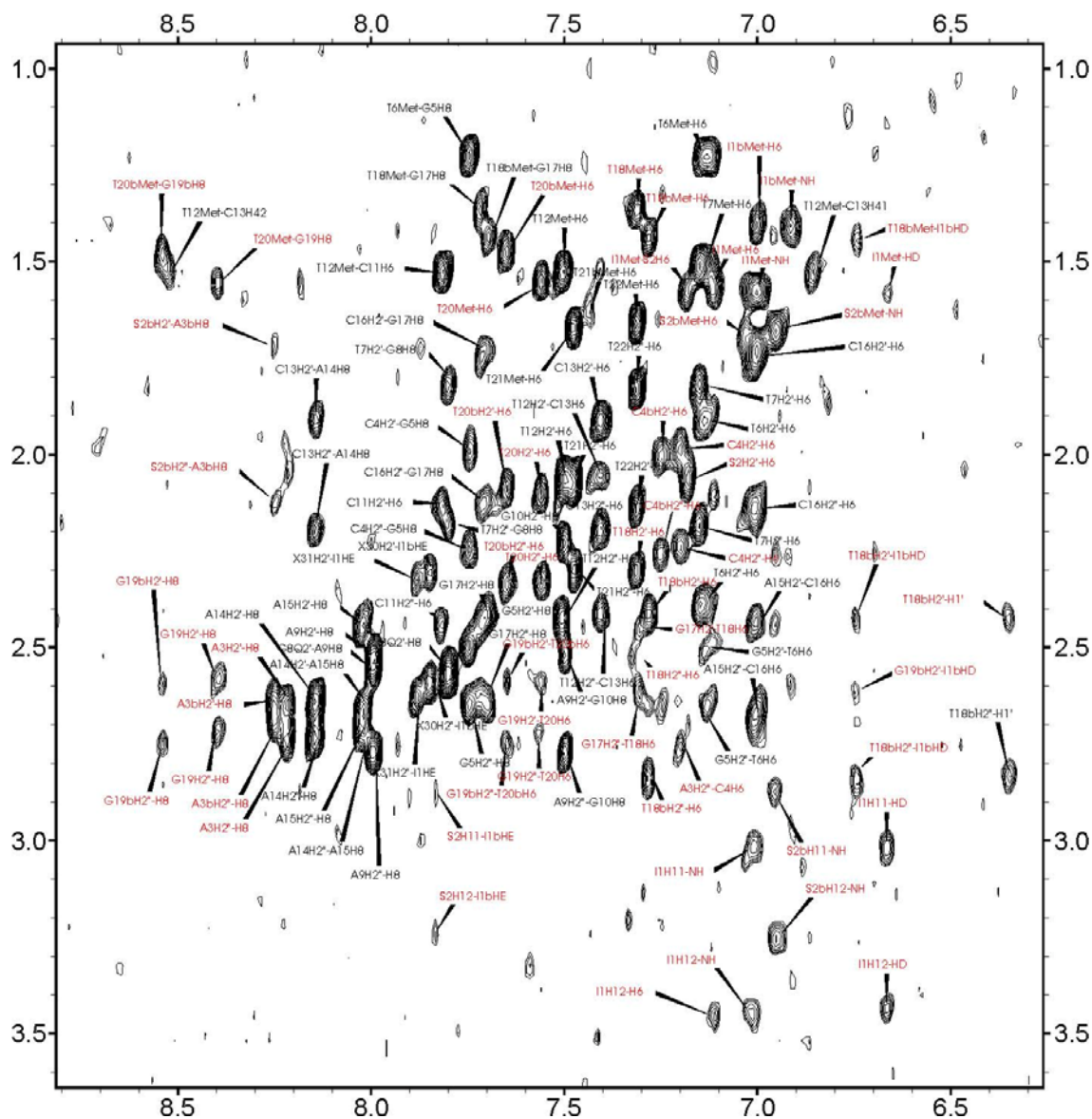
MPLC	cromatografia líquida de mitja resolució (<i>Medium Performance Liquid Chromatography</i>)
Np, pN	3'-nucleòtid, 5'-nucleòtid
Na₂Pipes	1,4-piperazina-bis-(etansulfonat) de sodi
NBA	nitrobenzoalcohol
NH₄OAc	acetat d'amoni
NMI	<i>N</i> -metilimidazole
OD₂₆₀	densitat òptica a 260 nm
PAGE	electroforesi en gel de poliacrilamida
ppm	parts per milió
pir	piridina
R_f	factor de retenció (cromatografia en capa fina)
RMN	espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear
RNA	àcid ribonucleic
s	singlet
SppD	fosfodiesterasa de melsa de bou (<i>Bovine Spleen Phosphodiesterase</i>)
Stains-all-dye	bromur de 1-etil-2- $\{$ (<i>E</i>)-3-[1-etilnafto[1,2-d][1,3]tiazol-2(1 <i>H</i>)-iliden]-2-metil-1-propenil $\}$ nafto[1,2-d][1,3]tiazol-1-i
SVPD	fosfodiesterasa de verí de serp (<i>Snake Venom Phosphodiesterase</i>)
T, Tp/pT	timina, timidina, àcid 3'/5'-timidílic
TBAF	fluorur de tetrabutilamoni
TBDMS	<i>tert</i> -butildimetilsilil
TBE	mescla de Tris, àcid bòric i EDTA
TCA	àcid tricloroacètic
TEA	triètilamina
TEAAc	acetat de triètilamoni
TEAB	bicarbonat de triètilamoni
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametiletildiamina
TFA	àcid trifluoroacètic
THAP	2,4,6-trihidroxiacetofenona
THF	tetrahidrofuran
T_m	temperatura de fusió d'una doble cadena de DNA
TMS	trimetilsilil
t_R	temps de retenció (cromatografia líquida)
Tris	tris(hidroximetil)aminoetà
UV-vis	espectroscòpia d'ultraviolat-visible
U	unitat
δ	desplaçament químic
ε	coeficient d'extinció molar
λ	longitud d'ona

ANNEX 1

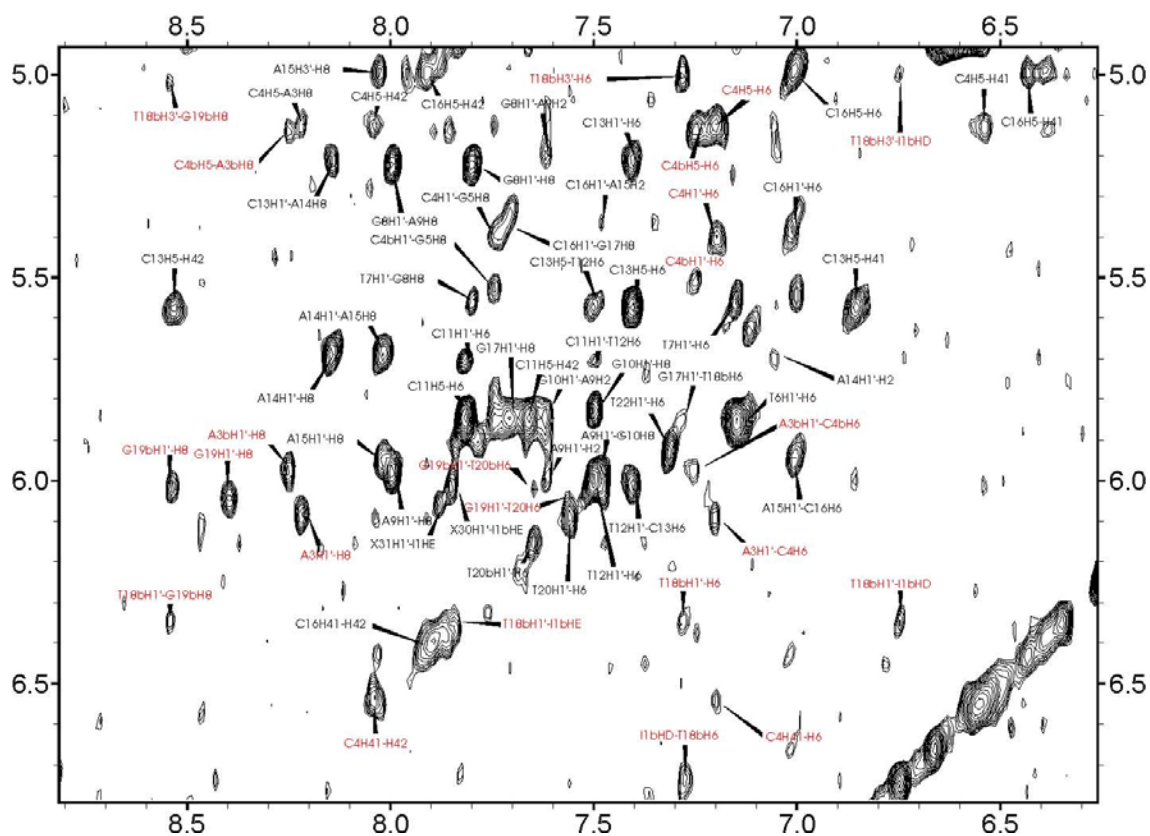
dNu	estructura i numeració	dNu	estructura i numeració
dA		dC	
dG		T	
X ^I		X ^S	

Abreviatura i estructura dels nucleòsids emprats en aquest treball, amb la numeració estàndard de les bases i els sucres.

ANNEX 2



Zona de l'espectre NOESY de l'adducte **IS-Pt-G1** en $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1), tampó 10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH 7 i 100 mM NaCl, on apareixen els pics de correlació entre els protons aromàtics i els 1', 2' i 2''. En vermell s'assenyalen aquells pics que involucren senyals amb dos desplaçaments químics corresponents als dos isòmers constitucionals d'unió a l'imidazole.



Zona de l'espectre NOESY de l'adducte **IS-Pt-G1** en $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1), tampó 10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH 7 i 100 mM NaCl, on apareixen els pics de correlació entre els protons aromàtics i els 5, 1' i 3'. En vermell s'assenyalen aquells pics que involucren senyals amb dos desplaçaments químics corresponents als dos isòmers constitucionals d'unió a l'imidazole.

