

1. SÍNTESI DE CONJUGATS ACRIDINA-OLIGONUCLEÒTID

1.1 Introducció

1.1.1 Objectius

En els darrers anys, un gran nombre de molècules han estat descrites per la seva capacitat d'inhibir la telomerasa via estabilització d'estructures quàdruplex de G als extrems telomèrics¹. D'entre aquestes cal destacar alguns derivats d'acridines², antraquinones^{3,4} i fluorenones⁵. Un dels principals inconvenients que presenten la majoria d'aquestes molècules per tal de poder ser utilitzades en un futur com a fàrmacs anticancerígens, és una elevada citotoxicitat inespecífica. Aquesta és deguda, en gran part, a la interacció amb el DNA doble cadena present al llarg del cromosoma⁶. En aquest context s'ha pensat en intentar minimitzar aquesta toxicitat mitjançant la conjugació d'aquestes molècules a oligonucleòtids de seqüència complementària bé al telòmer o bé a l'RNA de la telomerasa. D'aquesta manera, és d'esperar que l'oligonucleòtid del conjugat s'hibridi amb la seva cadena complementària, situada als telòmers o a la telomerasa, dirigint així la part aromàtica als extrems cromosòmics. Aquest fet comportaria una disminució de la interacció d'aquest sistema aromàtic amb el B-DNA present en altres zones del genoma, cosa que resultaria en una menor citotoxicitat. A la figura 1.1 es mostra esquemàticament la interacció d'un conjugat d'aquest tipus amb l'extrem d'un telòmer. En ella es pot observar la zona monocadena del telòmer estructurada en forma de quàdruplex de G. El sistema aromàtic (groc) interacciona amb aquesta estructura secundària, mentre que la part oligonucleotídica del conjugat (verd) es troba formant una doble cadena amb la seva seqüència complementària.

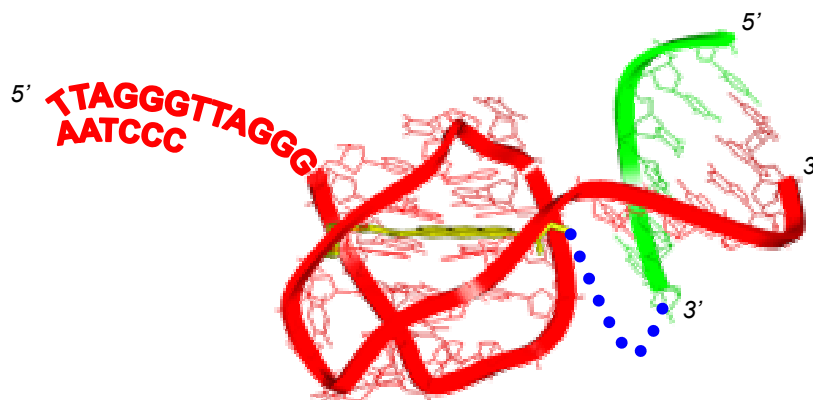


Figura 1.1 – Esquema de la interacció d'un conjugat amb l'extrem monocadena del telòmer.

En un primer moment, s'ha hagut de decidir de quina família de compostos es volen obtenir els conjugats. Per tal de prendre aquesta decisió, s'ha tingut en compte bàsicament els resultats dels estudis d'inhibició de la telomerasa realitzats i publicats a la literatura². Així doncs, s'han escollit les acridines, ja que al moment de començar aquesta tesi alguns derivats acridínics apareixien entre els inhibidors més potents de la telomerasa. Hi ha força estudis on s'evidencia una forta interacció dels sistemes acridínics amb estructures quàdruplex de G⁷, així com també estudis de modelat molecular on s'intenta explicar el perquè d'aquesta forta interacció⁸. Sembla ser que la presència del nitrogen de l'anell heteroaromàtic és força important en aquest sentit. Aquest té un pKa al voltant de 9 a la proflavina (3,6,-diaminoacridina), per tant, és d'esperar que en el pH fisiològic es trobi protonat. La protonació d'aquest nitrogen el faria electrodeficient afavorint-se així la interacció del sistema tant amb els carbonils de les tètades, com amb els grups fosfats dels *loops*.

L'objectiu plantejat en aquesta primera part de la tesi ha estat desenvolupar una metodologia sintètica general i versàtil per tal d'obtenir conjugats acridina-oligonucleòtid. En aquest sentit, s'ha proposat desenvolupar un mètode general que permeti en un futur obtenir conjugats d'altres famílies de molècules, com ara les antraquinones o les fluorenones. Tanmateix, versàtil fa referència al fet que el mètode a desenvolupar no només ha de permetre obtenir els conjugats desitjats amb un rendiment acceptable, sinó també introduir diversitat estructural en diferents punts a llarg de la síntesi, de manera que permeti sintetitzar gran quantitat de conjugats diferents mitjançant la simple introducció de reactius diferents en certes etapes.

Conjuntament amb el desenvolupament del mètode sintètic, un segon objectiu ha estat l'obtenció d'una primera família de conjugats acridina-oligonucleòtid per tal de posteriorment avaluar-ne les seves capacitats, tant d'interacció amb estructures quàdruplex de G, com d'inhibició de la telomerasa.

1.1.2 Conjugats acridina-oligonucleòtid a la literatura

La conjugació d'oligonucleòtids a altres tipus de molècules és un camp que ha despertat força interès en els últims anys. En aquest sentit, a una cadena nucleotídica s'hi han arribat a unir una gran varietat de molècules, que van des de pèptids⁹ fins a fulerens¹⁰.

Respecte als derivats acridínics, a la literatura hi ha descrita la síntesi d'uns quants conjugats acridina-oligonucleòtid^{11,12,13,14}, així com també acridina-PNA^{15,16} o fins i tot acridina-pèptid^{17,18} o acridina-ligand de solc menor¹⁹. En el cas dels conjugats amb oligonucleòtids, la part acridínica s'incorpora tant al mig de la cadena nucleotídica com a qualsevol dels extrems, utilitzant en la majoria de casos la química del fosfit triester, habitual en síntesi d'oligonucleòtids. Així, els monòmers acridínics que s'usen són bàsicament fosforamidits, però també altres derivats del sistema acridínic. La gran majoria dels derivats utilitzats, no obstant, són comercials i presenten el mateix patró de substitució de l'anell acridínic: un grup metoxi a la posició 2 i un àtom de clor a la 6 (fig. 1.2). Aquests tipus de monòmers, però, no són útils pel tipus de conjugats que s'han plantejat sintetitzar en aquest treball. L'objectiu final que es persegueix amb l'obtenció dels conjugats és dotar de selectivitat certes acridines que han estat descrites a la literatura per la seva forta interacció amb els quàdruplex de G. Així doncs, una part important del treball ha recaigut en el disseny estructural de la part acridínica que s'incorporarà a la cadena nucleotídica.

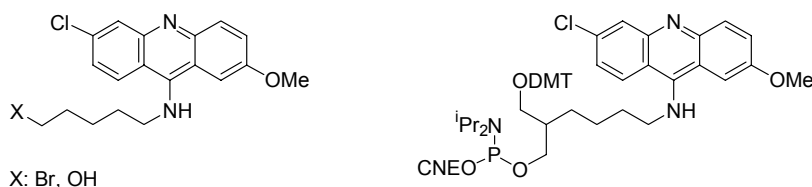


Figura 1.2 - Derivats acridínics comercials usats en la síntesi d'alguns conjugats acridina-oligonucleòtid.

1.1.3 Disseny dels conjugats

D'acord amb els objectius plantejats, s'obre un ventall enorme de possibilitats, ja sigui de molècules a sintetitzar com d'estratègies sintètiques a seguir. Així doncs, primerament s'ha plantejat com han de ser estructuralment els conjugats que es volen obtenir. S'ha decidit que el conjugat ha d'estar format per tres blocs bàsics: la part aromàtica (que interaccionarà amb els quàdruplex), la part oligonucleotídica (que s'hibridarà amb la seqüència complementària) i un espaiador (que permetrà unió de la les dues parts ja mencionades). A la figura 1.3 es mostra un esquema de l'esquelet dels conjugats que es volen obtenir.

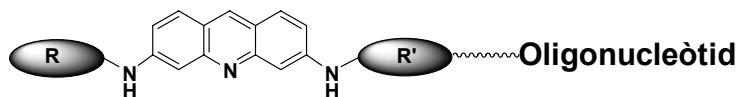


Figura 1.3 - Esquelet dels conjugats desitjats.

El primer que ha calgut fer, ha estat decidir quins tipus de derivats acridínics s'utilitzaran. En aquest context, ja que la finalitat és la d'intentar dotar de selectivitat certes acridines que estableixen estructures quàdruplex de G, s'ha considerat convenient l'ús de derivats acridínics estructuralment tan similars com sigui possible als ja descrits i avaluats. En tots els casos, però, les molècules descrites són derivats simètricament diacilats de la proflavina que contenen dos grup amino terciaris. A la figura 1.4 es mostren algunes de les acridines descrites amb els seus valors d'IC₅₀ (μM) corresponents.

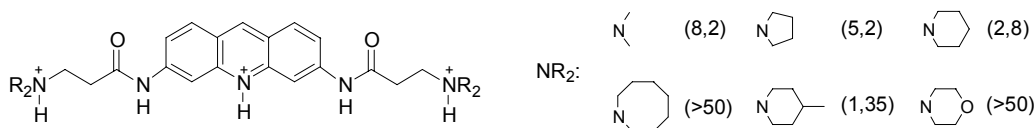


Figura 1.4 - Derivats acridínics descrits com a inhibidors de la telomerasa amb el seu valor d'IC₅₀ (μM).

S'han trobat diversos estudis a la literatura on es posen de manifest les característiques estructurals òptimes d'aquesta classe de compostos. Així, es postula que la distància òptima entre els grups amino terminal i els carbonils units a l'anell acridínic és la de dos metilens. A més a més és important el fet que l'amina terminal sigui terciària i cíclica (preferiblement anells de 5 o 6 baules). Tenint aquestes característiques en compte en el disseny dels conjugats, s'ha decidit que la part acridínica compleixi tants requisits d'aquests com sigui possible. Més concretament, el braç que no estarà conjugat a l'oligonucleòtid (R, vegeu fig. 1.3) haurà de ser idèntic a algun dels ja descrits (fig. 1.4). Referent a l'altre braç (R'), resulta evident que s'hauran d'introduir modificacions per tal d'unir-lo covalentment a l'oligonucleòtid. En aquest cas, l'estructura vindrà determinada per l'estratègia de conjugació. S'intentarà, no obstant, que aquest braç compleixi varies de les característiques mencionades anteriorment.

Un cop decidits els trets estructurals fonamentals de la part acridínica del conjugat, s'ha de decidir a quina posició de l'oligonucleòtid (5' o 3') s'unirà, així com també la naturalesa de l'espaiador a utilitzar. Inicialment, s'ha decidit unir l'acridina a l'extrem 5' de la cadena oligonucleotídica. Habitualment, en la síntesi estàndard d'oligonucleòtids en fase sòlida, l'elongació de la cadena oligonucleotídica es du a terme en la direcció 3' → 5', introduint-se en cada etapa un nou nucleòtid a l'extrem 5'. L'acoblament del nucleòsid en qüestió té lloc mitjançant la reacció del seu 3' fosforamidit sobre l'hidroxil 5' lliure de la cadena oligonucleotídica en creixement

ancorada sobre el suport sòlid. Aquest tipus de reacció està molt optimitzada pels derivats nucleosídics habituals, presentant rendiments gairebé quantitius. Així, i seguint el procediment estàndard de síntesi d'oligonucleòtids en fase sòlida, s'ha pensat que el derivat acridínic es podria introduir com a últim pas en la síntesi, just abans que tingui lloc el desancoratge de l'oligonucleòtid del suport sòlid. Per dur a terme la reacció de conjugació, doncs, serà necessària l'obtenció del fosforamidit d'un derivat acridínic (fig. 1.5).

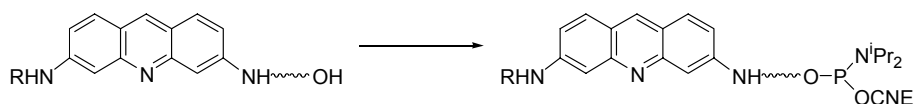


Figura 1.5 – Esquema d'obtenció d'un fosforamidit d'un derivat acridínic per tal d'incorporar-lo a una cadena oligonucleotídica.

Referent a la naturalesa de l'espaiador, aquesta estratègia és plenament compatible amb l'ús d'un derivat d'un diol prèviament protegit en un dels hidroxils i fosfilitat en l'altre. D'aquesta manera, s'ha pensat en introduir l'espaiador mitjançant la química habitual dels oligonucleòtids just abans d'unir el derivat acridínic (fig. 1.6). Ja que la missió de l'espaiador és bàsicament la de distanciar prudencialment el derivat acridínic de la cadena nucleotídica, s'ha pensat en utilitzar diols lineals, ja siguin completament alifàtics o bé derivats de polietilenglicol.

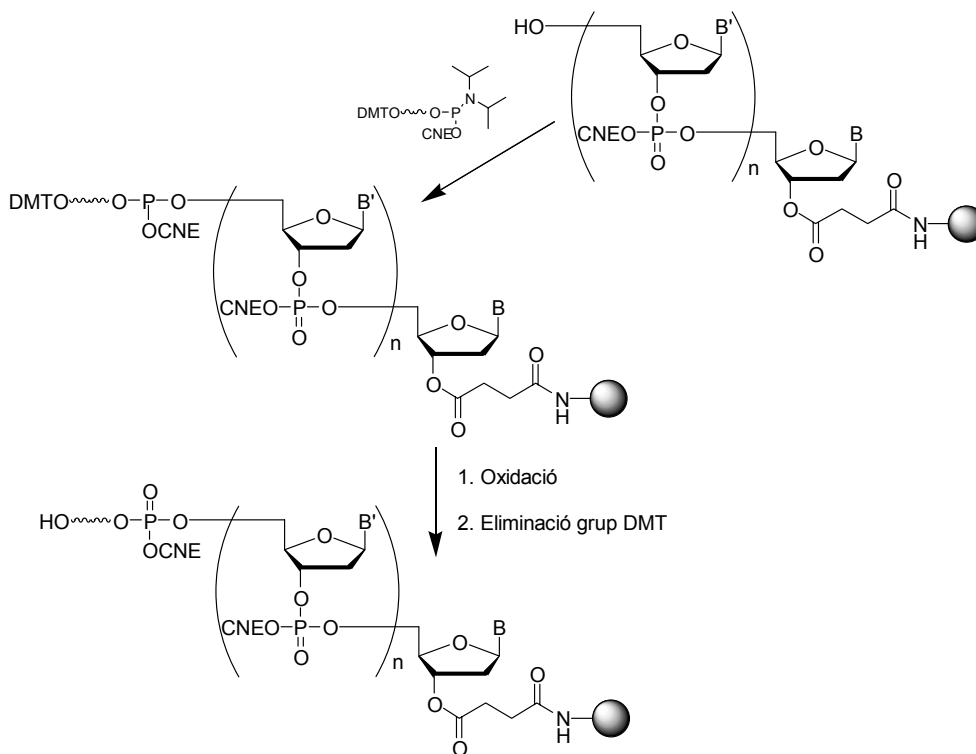


Figura 1.6 – Esquema d'introducció de l'espaiador un cop sintetitzada la cadena nucleotídica i abans d'introduir el derivat acridínic.

En resum, aquesta estratègia sintètica d'obtenció de conjugats no només és compatible amb la química i l'estabilitat dels oligonucleòtids, sinó que a més a més, els diferents blocs bàsics (oligonucleòtid, espaiador i part aromàtica) es van incorporant seqüencialment. Així, es podrà introduir diversitat estructural a diferents nivells simplement variant les seqüències oligonucleotídiques sintetitzades o introduint espaiadors o derivats acridínics diferents. Això ens permetrà obtenir una família de conjugats estructuralment força diversos utilitzant la mateixa ruta sintètica. A més a més, el fet que la introducció de l'acridina tingui lloc com a últim pas i amb l'oligonucleòtid encara ancorat sobre el suport sòlid, facilitarà la purificació final del conjugat obtingut. A la figura 1.7 es mostra esquemàticament com seran els conjugats obtinguts.

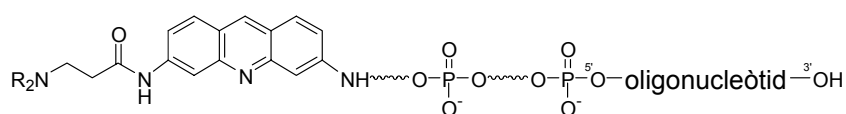


Figura 1.7 - Estructura esquemàtica dels conjugats desitjats.

1.2 Síntesi d'un derivat fosforamidit d'acridina

Un cop establertes les bases sobre les característiques generals del mètode sintètic a desenvolupar (ja siguin referents a l'estructura dels conjugats o a l'esquema sintètic a seguir), s'ha començat abordant la síntesi d'un primer derivat acridínic. Com s'ha comentat anteriorment, aquest ha de contenir, per una banda un braç dels descrits ja a la literatura, i per l'altra, un grup hidroxil lliure. A partir d'aquí, s'haurà de dur a terme la fosfitilació d'aquest hidroxil per tal de poder incorporar-lo com un nucleòsid més en l'últim pas de la síntesi. La primera molècula que s'ha plantejat sintetitzar ha estat l'acridina **A5** (fig. 1.8).

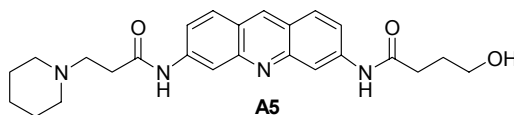


Figura 1.8 - Derivat acridínic que s'ha plantejat obtenir.

1.2.1 Intents d'obtenir el derivat 3-(4-hidroxibutiramido)-6-(3-N-piperidinopropionamido)acridina **A5**

La síntesi d'aquest derivat sembla accessible a través de poques etapes partint de la proflavina. L'anàlisi retrosintètic proposat ha estat el següent:

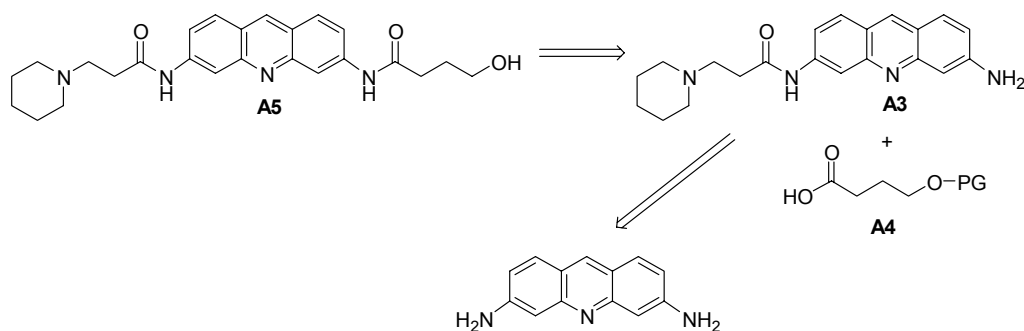


Figura 1.9 - Esquema retrosintètic proposat per a l'obtenció del derivat acridínic **A5** (PG: grup protector).

Com es pot observar, l'intermedi clau és el derivat monoacilat de la proflavina **A3**. A partir d'aquí, la reacció de l'àcid 4-hidroxibutíric degudament protegit amb el grup amino lliure de l'anell acridínic ha de permetre obtenir el derivat acridínic **A5**.

1.2.1.1 Síntesi del derivat 3-(3-*N*-piperidinopropionamido)-6-aminoacridina **A3**

1.2.1.1.1 Assaigs de monoacilació de la proflavina per reacció amb un clorur d'àcid

Per tal d'obtenir l'intermedi monoacilat **A3** s'ha planejat una ruta sintètica basada en el mètode descrit a la literatura pel grup del Prof. Neidle per a la síntesi dels compostos acridínics diacilats². Evidentment, s'hi han hagut d'introduir modificacions per tal d'evitar la diacilació de la proflavina. Aquesta ruta es mostra esquematitzada a la figura 1.10.

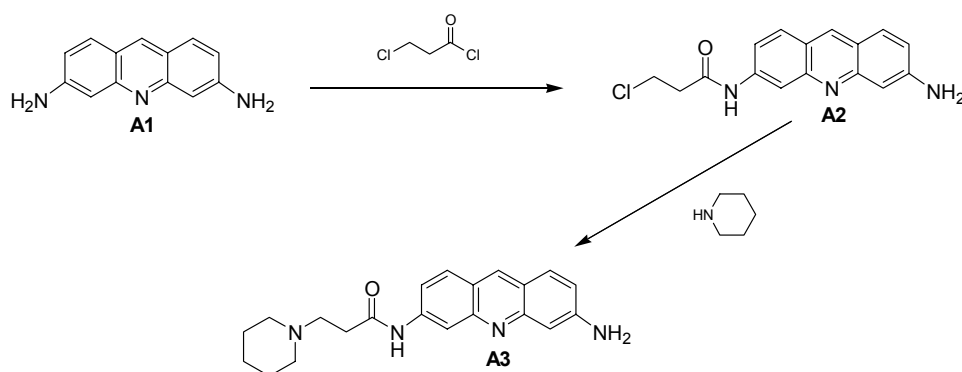


Figura 1.10 - Ruta sintètica proposada per a l'obtenció del derivat monoacilat **A3**.

La síntesi té lloc en dues etapes: primerament l'acilació de només un dels grups amino de la proflavina amb el clorur de l'àcid 3-cloropropiònic, i posteriorment la substitució del clor per la piperidina. Com a producte de partida s'utilitza la proflavina,

la qual es pot obtenir fàcilment a partir de qualsevol de les seves sals comercials (hemisulfat o hidrociorur). El pas previ a l'acilació, doncs, és l'alliberament de la base a partir de la seva sal (fig. 1.11).

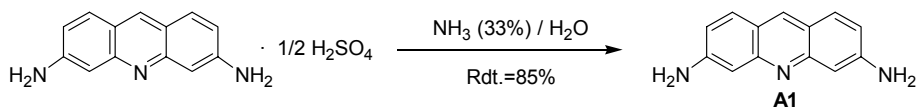


Figura 1.11 – Reacció d'alliberament de la proflavina a partir del seu hemisulfat.

La reacció s'ha dut a terme tal i com es troba descrita a la literatura²⁰, addicionant NH₃ (33%) a una dissolució aquosa d'hemisulfat de proflavina, i obtenint-se el producte desitjat per precipitació.

L'obtenció de derivats diacilats de la proflavina està descrita a la literatura emprant el mateix clorur d'àcid com a dissolvent i mantenint un reflux de 3 hores. No obstant, com que aquestes condicions semblen massa dràstiques per tal d'obtenir el derivat monoacilat **A2**, primerament s'ha intentat utilitzar algun dissolvent que no fos el mateix reactiu. Per tal d'intentar acilar selectivament només un dels dos grups amino també s'ha reduït, no només l'excés de clorur d'àcid, sinó també la temperatura a la qual té lloc la reacció. A la següent taula es resumeixen les diferents condicions assajades per tal d'obtenir **A2** seguint l'esquema mostrat a la figura 1.10.

Assaigs	Clorur d'àcid	Condicions de reacció	Rdt. A2
A	1 eq.	acetona, t.a., 1 nit	10%
B	1.5 eq.	acetona, t.a., 3 dies	15%
C	2 eq.	acetona, t.a., 5 dies	12%
D	2 eq.	acetona, reflux, 5 dies	12%
E	1.2 eq.	DIEA (2.2 eq.), acetona, t.a., 3 dies	Mescla de productes
F	1.2 eq.	DIEA (2.2 eq.), acetona, reflux, 3 dies	Mescla de productes
G	1.2 eq.	DMF, reflux, 2 hores	Mescla de productes
H	>100 eq.	t.a., 6 hores	< 5%

Taula 1.1 - Condicions assajades per tal d'obtenir el derivat monoacilat de la proflavina **A2**.

Després de realitzar els primers assaigs (condicions A-D) utilitzant acetona com a dissolvent, s'ha pensat que el baix rendiment obtingut podia ser degut a la protonació del nitrogen central de la proflavina en les condicions de reacció. Aquest fet comportaria que els grups amino exocíclics esdevinguessin menys reactius. És per això que s'ha assajat la reacció en condicions similars, però addicionant DIEA com a base per tal de neutralitzar l'àcid clorhídric generat en la reacció d'acilació (condicions E i F). De totes maneres, el rendiment de la reacció no ha millorat. Tot al contrari, ja que en aquestes condicions la purificació ha estat encara més complicada, sense poder-se aïllar l'intermedi **A2** amb la puresa desitjada.

Per tal d'intentar millorar els resultats obtinguts en els primers assaigs, s'ha pensat en un canvi de dissolvent. La insolubilitat que presenten aquests compostos en

la majoria de dissolvents habituals, però, ha permès dur a terme assaigs només en DMF (condicions G). El que s'ha obtingut en aquest cas ha estat una mescla intractable. Finalment, s'ha assajat la reacció de la proflavina amb el clorur d'àcid usant aquest mateix com a dissolvent, però mantenint la reacció a temperatura ambient (condicions H), per tal d'intentar evitar la diacilació. Aquest cop la purificació no ha presentat tants problemes, però el que s'ha obtingut molt majoritàriament ha estat proflavina inalterada i el producte resultat de la diacilació, amb un rendiment del derivat desitjat inferior al 5%.

Així doncs, només en les condicions A-D ha estat possible aïllar el producte desitjat **A2**, per bé que els rendiments han estat molt baixos i la puresa amb la que s'ha pogut obtenir, després de tedioses i laborioses purificacions, no sempre ha estat la desitjada. Cal destacar que el derivat monoacilat **A2** en dissolució descomposa al llarg del temps en diversos productes, cosa que dificulta encara més la seva purificació.

Analitzant els resultats obtinguts, cal destacar, per una banda la dificultat de fer reaccionar selectivament només un dels dos grups amino de la proflavina, i per l'altra, la dificultat que presenta la manipulació d'aquests productes. Totes les reaccions han estat seguides per CCF utilitzant diferents eluents i revelant les plaques a $\lambda=365$ nm per tal d'observar la fluorescència del cromòfor acridínic. El que s'ha observat en la majoria dels casos (excepte en les condicions H) és tot un reguitzell de taques allargades i poc definides que han fet molt difícil el control de la reacció. Aquest cromòfor és molt sensible, i petites impureses s'observen intensament, de manera que la interpretació de la CCF esdevé desesperant. Aquest fet ha dut molts problemes en les purificacions per cromatografia en columna dels productes obtinguts.

La següent reacció consisteix en la substitució del clor per la piperidina. Per a dur a terme aquesta reacció, s'ha emprat EtOH com a dissolvent i un excés de piperidina (6 eq.) per tal d'assegurar la conversió total (fig. 1.12). En la literatura es descriu l'ús de KI en quantitats catalítiques en aquesta transformació. Així, s'ha dut a terme la reacció en presència i en absència de KI, sense observar-se cap canvi rellevant entre ambdós assaigs, de manera que s'ha optat per prescindir-ne d'ara en endavant.

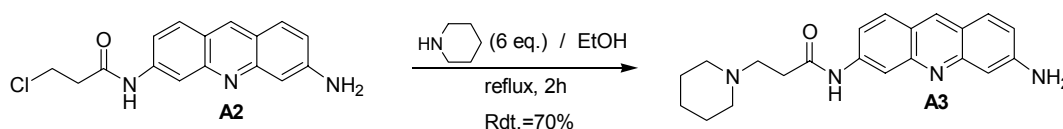


Figura 1.12 - Reacció de substitució del clor per l'anell de piperidina.

Aquesta reacció és ràpida i en 2 hores s'ha obtingut el producte desitjat amb un rendiment del 70%. En resum, es pot concloure que seguint l'esquema proposat (fig. 1.10) és possible obtenir el derivat desitjat **A3**, per bé que les purificacions dels productes són extremadament costoses i el rendiment global des de la proflavina **A1**

és força baix (<10 %). Com que aquest producte sembla que pot ser l'intermedi clau a partir del qual obtenir diferents derivats que continguin un hidroxil lliure, s'ha intentat buscar rutes alternatives per tal d'obtenir-lo amb millors rendiments. Paral·lelament, també s'ha continuat endavant amb la síntesi plantejada assajant la reacció d'acilació de l'altre grup amino exocíclic amb l'àcid 4-hidroxi-butíric per tal d'obtenir el derivat **A5**.

1.2.1.1.2 Intents d'hidròlisi parcial de la 3,6-bis(3-*N*-piperidino-propionamido)acridina **A7**

Com a via alternativa per obtenir l'intermedi **A3** amb millor rendiment, s'ha pensat en la possibilitat d'una hidròlisi parcial del derivat acridínic **A7**, la síntesi del qual està descrita a la literatura amb molt bons rendiments (fig. 1.13).

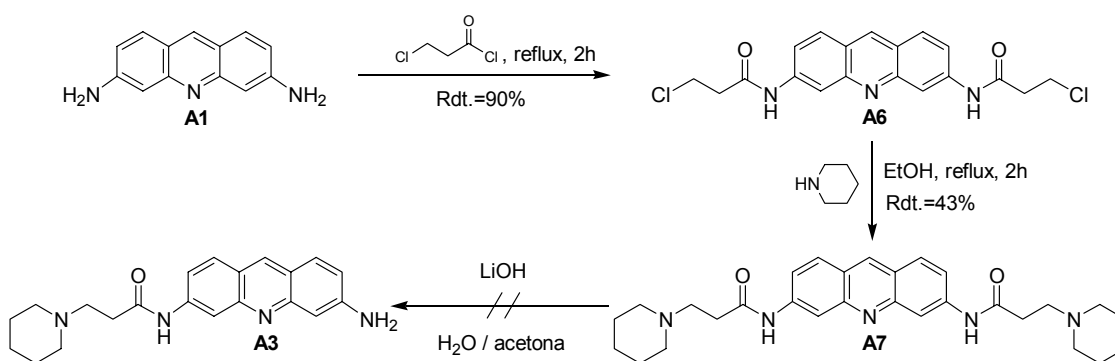


Figura 1.13 – Intent d'obtenir l'acridina **A3** mitjançant una hidròlisi parcial del derivat diacilat **A7**.

Partint de la proflavina **A1**, es du a terme l'acilació dels dos grups amino exocíclics amb el clorur de l'àcid 3-cloropropiònic usant aquest mateix reactiu com a dissolvent i mantenint un reflux de 2 hores. Un cop obtingut l'intermedi diacilat **A6**, la substitució dels clors per la piperidina té lloc en un reflux d'EtOH. Ambdues reaccions han presentat bons rendiments i ambdós productes s'han pogut purificar per recristal·lització en mesclades DMF/EtOH.

Un cop obtingut el derivat **A7**, s'ha assajat la reacció d'hidròlisi parcial d'aquest amb LiOH en una mescla H₂O/acetona. Aquesta s'ha dut a terme usant 1 i 1.5 eq. de LiOH respectivament i seguint les reaccions per CCF. Aquestes condicions han estat descrites amb èxit en el nostre grup en reaccions similars d'hidròlisi parcial de diamides²¹. En cap d'ambdues proves, però, no s'ha observat cap transformació, de manera que s'ha descartat aquest mètode i s'ha continuat buscant altres rutes alternatives.

1.2.1.1.3 Síntesi del derivat monoacilat A3 en fase sòlida

Fent una ullada als resultats obtinguts fins al moment, es pot concloure que els grups amino de la proflavina són molt poc reactius, segurament degut a la deslocalització del parell d'electrons no enllaçant a través del sistema aromàtic. Així doncs, per tal que reaccionin és necessari forçar les condicions (excés de reactiu i/o temperatures elevades), de manera que és molt difícil fer reaccionar selectivament només un dels dos grups per tal de trencar la simetria de la proflavina i obtenir derivats monoacilats. A més a més, s'ha observat que la manipulació d'aquests derivats acridínics és força difícil en les condicions habituals utilitzades en síntesi orgànica clàssica:

- La majoria dels derivats no són gaire solubles en la majoria de dissolvents orgànics habituals, fent difícil el control de la relació estequiomètrica entre el derivat acridínic i el reactiu en qüestió.
- Les purificacions per cromatografia en columna de sílica són tedioses i no sempre s'aconsegueix el producte amb la puresa desitjada.
- L'anàlisi rutinària dels productes per CCF és extremadament complexa, ja que s'observen múltiples taques fluorescents difícils d'interpretar.

És per això que s'ha plantejat un nou esquema d'obtenció de l'intermedi **A3** treballant en fase sòlida. La resina escollida ha estat la funcionalitzada amb el grup cloro-triril (fig. 1.14), ja que permet l'ancoratge de nucleòfils i el desancoratge es duu a terme en condicions àcides suaus (TFA 5% en DCM), en les quals els derivats acridínics són estables. Aquesta nova estratègia presenta, *a priori*, dues grans avantatges respecte la síntesi en solució. La primera és que si s'aconsegueix tenir la proflavina unida al suport sòlid per un dels grups amino, llavors, es poden forçar les condicions de reacció per tal d'acilar l'altre, obtenint com a resultat el derivat monoacilat. La segona gran avantatge és l'eliminació d'etapes de purificació, que per aquests productes són extremadament costoses.

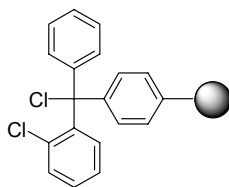


Figura 1.14 - Resina cloro-triril.

L'esquema sintètic proposat es mostra a la figura 1.15. Primerament, s'ha dut a terme l'ancoratge de la proflavina sobre la resina, que té una funcionalització inicial d'1.6 mmol/g. Seguidament, un tractament amb una mescla MeOH/DIEA permet bloquejar les posicions de la resina que no han reaccionat mitjançant la formació d'un éter metílic, i així evitar possibles interferències en les reaccions posteriors. A partir

d'aquí, s'ha tractat la resina **A8** amb el clorur de l'àcid 3-cloropropiònic per tal d'acilar els grups amino lliures de la proflavina. Posteriorment, la reacció amb la piperidina ha de permetre obtenir la resina **A10**, el desancoratge de la qual es du a terme mitjançant un tractament àcid (TFA 5% en DCM). Després de cada reacció s'ha separat una petita alíquota de resina i s'ha fet un desancoratge per tal de poder analitzar cada reacció en concret i així anar seguint l'evolució general. El mètode d'anàlisi en aquest cas ha estat l'enregistrament d'espectres de RMN de cada cru de desancoratge.

El primer acoblament ha funcionat bé i després del desancoratge només s'ha observat la presència de proflavina de partida. Després de la reacció amb el clorur d'àcid, però, s'ha obtingut un cru força més complex, en el qual s'ha pogut identificar majoritàriament la presència de dos compostos diferents: proflavina de partida i un derivat acridínic que per RMN presenta senyals de protons a la zona típica de dobles enllaços no aromàtics. El derivat esperat **A2** només s'ha observat en proporcions ínfimes. Tanmateix, en l'anàlisi del cru provinent de la resina **A10**, s'ha observat només la presència del producte desitjat **A3** i de proflavina **A1**, pràcticament en la mateixa proporció. Així, no s'ha observat la presència del derivat aparegut anteriorment en el desancoratge de la resina **A9**.

En vista dels resultats, en primer lloc, s'ha intentat augmentar el rendiment de l'acilació de la resina **A8** usant el doble d'equivalents de clorur d'àcid (mantenint la proporció de DIEA). No obstant això, al duplicar la quantitat de clorur d'àcid, s'ha obtingut un cru pràcticament idèntic a l'anterior. Aquest fet ens ha fet pensar que potser la

presència de la proflavina en el cru de desancoratge no és deguda a un baix rendiment de la reacció d'acilació de la resina **A8** amb el clorur d'àcid, sinó a l'existència d'entrecruament en la reacció inicial d'acoblament de la proflavina (fig. 1.16). Aquesta hipòtesi s'ha intentat confirmar realitzant un altre assaig amb proflavina prèviament protegida en un dels grups amino pel grup Fmoc. D'aquesta manera, no només s'evitarà el possible entrecruament que pot tenir lloc a l'acoblar-se la proflavina **A1**

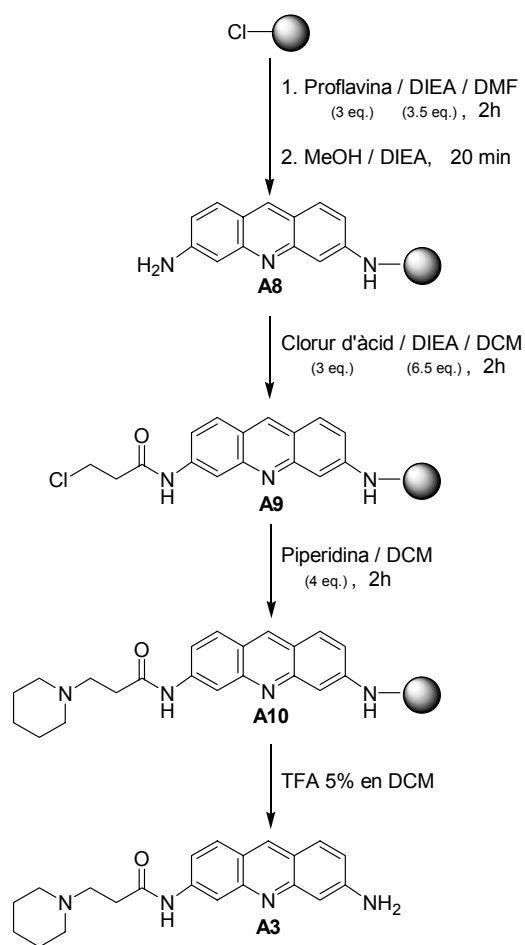


Figura 1.15 - Síntesi del derivat **A3** en fase sòlida.

sense protegir, sinó que a més a més ens permetrà calcular la funcionalització de la resina **A8**.

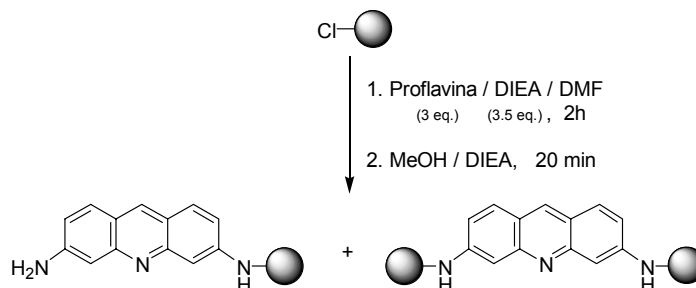


Figura 1.16 - Entrecruament de la proflavina.

La síntesi de la Fmoc-proflavina **A11** s'ha dut a terme per tractament de la proflavina amb FmocCl usant piridina anh. com a dissolvent (fig. 1.17). La seva obtenció ha estat força costosa, sobretot en l'etapa de purificació, però finalment s'ha pogut obtenir amb un rendiment acceptable.

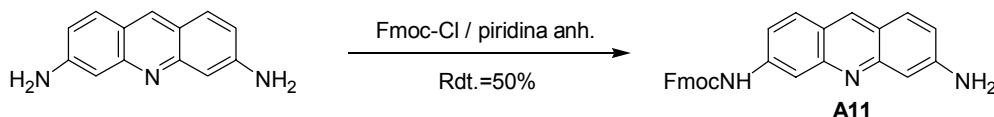


Figura 1.17 - Síntesi de la Fmoc-proflavina **A11**.

Un cop obtinguda la Fmoc-proflavina, s'ha seguit l'esquema descrit anteriorment (fig. 1.15) emprant el mateix tipus de resina (cloro-trítol, $f=1,6$ mmol/g), però incorporant-hi ara el derivat protegit (fig. 1.18). S'ha calculat la funcionalització de la resina obtinguda després de l'acoblament de la proflavina protegida **A11**, observant-se una important disminució de la funcionalització ($f=0,8$ mmol/g). Aquesta anàlisi s'ha realitzat seguint el protocol estàndard de quantificació de grups Fmoc (apartat D.2.1 de Materials i mètodes). El valor de funcionalització obtingut ens indica que caldrà optimitzar les condicions d'aquesta reacció de cara el futur. S'ha procedit, però, primerament amb el tractament amb MeOH/DIEA i posteriorment amb la introducció del clorur d'àcid (3 eq. respecte la funcionalització inicial) en DCM i en presència de DIEA (2 eq. respecte el clorur d'àcid). S'ha deixat reaccionar 2 hores i s'ha dut a terme el desancoratge. En el cru es continua observant proflavina de partida que no ha reaccionat, per bé que en força menys proporció que en l'assaig anterior. A l'haver acoblat proflavina protegida, la presència de proflavina inalterada demostra que la reacció d'acilació no té lloc de forma quantitativa en aquestes condicions, ja que ara l'entrecruament no hauria de tenir lloc (fig. 1.18).

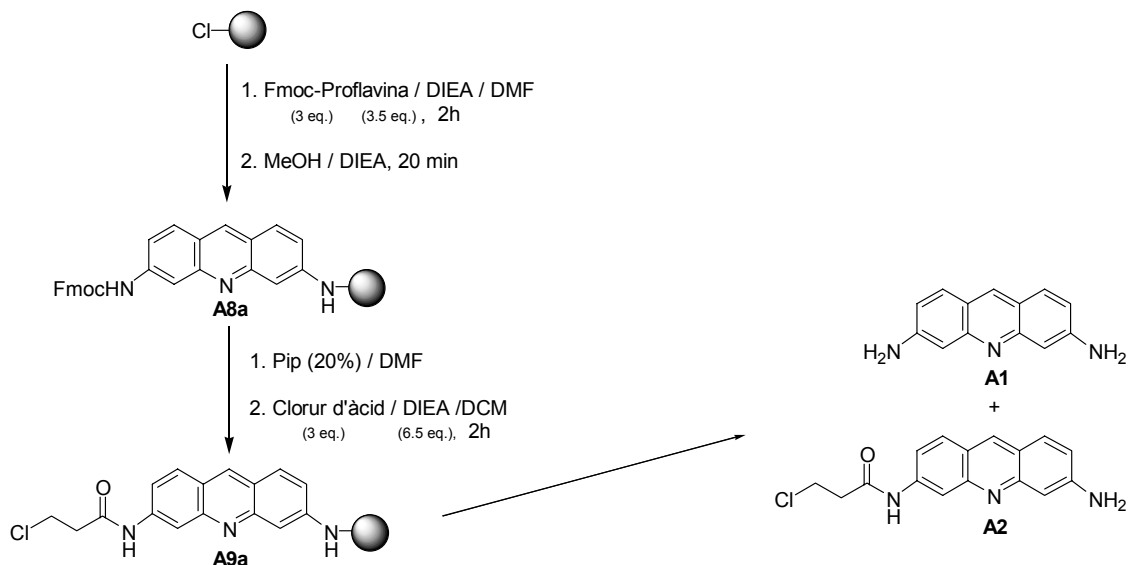


Figura 1.18 - Assaig en fase sòlida usant proflavina protegida.

Per altra banda, es continua observant la presència del producte que conté protons olefínics en el cru procedent del desancoratge de la resina **A9a** (fig. 1.19). S'ha observat la presència d'aquest producte després de la reacció de la resina **A8** (o **A8a**) amb el clorur d'acid en presència de DIEA, però aquest producte ha desaparegut després del posterior tractament amb piperidina. Aquestes observacions ens han conduït a pensar que aquest producte podria ser el derivat **A12** (fig. 1.19), format durant la síntesi com a conseqüència d'una reacció d'eliminació d'HCl per part de la DIEA present en el medi de reacció. Aquesta hipòtesi concorda amb el fet que després de la reacció de la resina **A9a** amb la piperidina aquests senyals desapareixen com a conseqüència de l'addició conjugada de la piperidina sobre l'amida α,β -insaturada. Per acabar de confirmar l'estructura del derivat **A12** i la seva formació, s'ha realitzat un assaig consistent en tractar la resina **A9a** amb una base forta no nucleòfila (DBU). La posterior anàlisi del cru de desancoratge per RMN i per EM ha confirmat l'estructura proposada per a l'acridina **A12**.

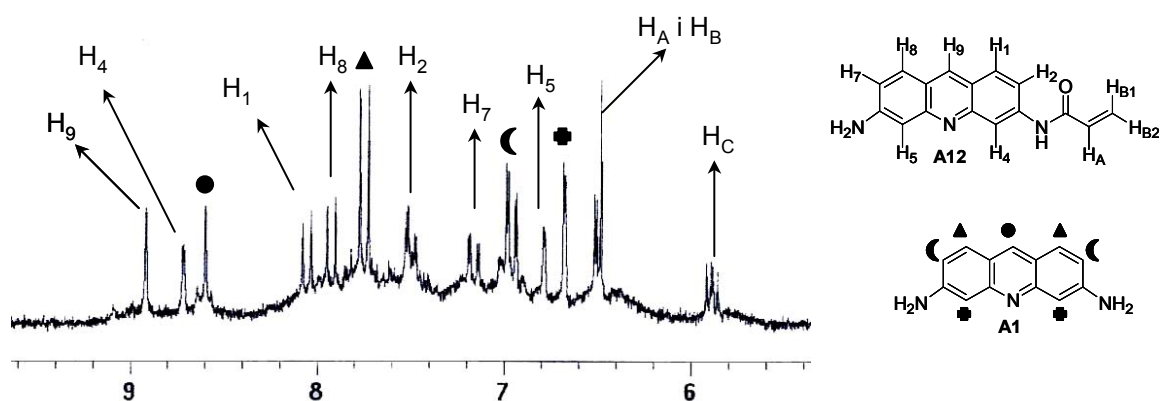


Figura 1.19 – Espectre d'RMN de ^1H obtingut del cru de desancoratge de la resina **A9a** i estructura proposada dels productes.

En general, doncs, aquesta estratègia en fase sòlida, ha permès obtenir el derivat desitjat **A3** però en molt baix rendiment global (<15%), ja que la reacció d'acilació ha presentat un rendiment força baix, la qual cosa obliga a dur a terme una purificació posterior al desancoratge. Aquestes dues reaccions es podrien intentar optimitzar, però de moment s'ha continuat amb la ruta sintètica plantejada amb anterioritat per tal d'obtenir el derivat amb el grup hidroxil **A5**.

1.2.1.2 Intents d'acilació del derivat **A3** per tal d'obtenir el producte desitjat **A5**

1.2.1.2.1 Assaigs de la reacció del derivat **A3** amb l'àcid 4-hidroxibutíric protegit

Paral·lelament als assaigs infructuosos per tal d'obtenir el derivat monoacilat **A3** amb millor rendiment, s'ha intentat dur a terme l'acilació d'aquest (obtingut en les condicions A-D de la taula 1.1), amb l'àcid 4-hidroxibutíric, per tal d'obtenir la molècula objectiu **A5**. Per tal d'evitar possibles interferències en la reacció d'acilació, s'ha hagut de protegir prèviament el grup hidroxil de l'hidroxiàcid en qüestió. Com a grup protector s'ha escollit el grup tritil, làbil en condicions àcides suaus. La reacció de protecció s'ha dut a terme a partir de la sal sòdica de l'àcid 4-hidroxibutíric en piridina anh. i usant excés de clorur de tritil, tal i com es mostra a la figura 1.20.

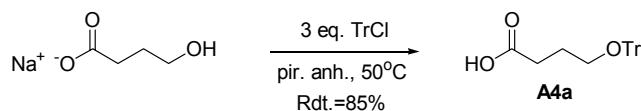


Figura 1.20 - Protecció del grup hidroxil de l'àcid 4-hidroxibutíric amb el grup tritil.

Posteriorment, s'ha assajat la reacció d'acilació del derivat **A3** amb l'hidroxiàcid protegit **A4a** usant agents acoblants força potents, com ara les sals de fosfoni PyBOP²² o PyAOP²³ (fig. 1.21). Aquests agents acoblants són àmpliament usats en química de pèptids, i permeten obtenir enllaços amida difícils d'obtenir mitjançant l'ús d'agents acoblants més suaus com ara les carbodiimides.

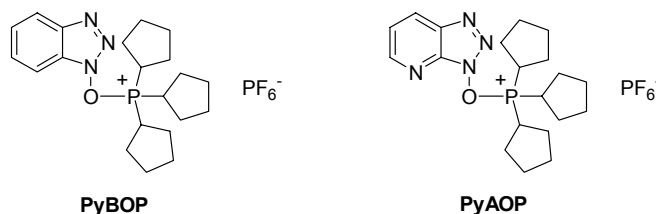
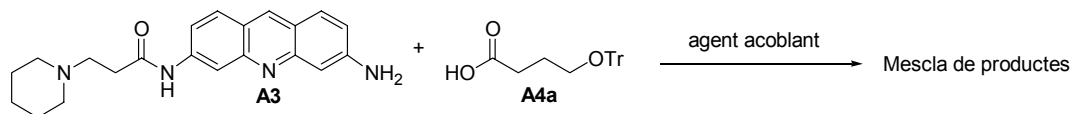


Figura 1.21 – Estructura dels agents acoblants PyBOP i PyAOP.

A la taula 1.2 es troben resumides les condicions en les quals s'ha assajat la reacció d'acilació del grup amino lliure del derivat acridínic **A3**.



Assaig	Hidroxiàcid	Agent acoblant	DIEA	Dissolvent
A	1 eq.	PyBOP (1 eq.)	2 eq.	DCM anh. i DMF anh.
B	2 eq.	PyBOP (2 eq.)	4 eq.	DCM anh. i DMF anh.
C	5 eq.	PyBOP (5 eq.)	10 eq.	DCM anh. i DMF anh.
D	5 eq.	PyAOP (5 eq.)	15 eq.	DMF anh.

Taula 1.2 - Intents d'acilació de l'acridina **A3** amb l'hidroxiàcid protegit **A4a**.

En tots els casos s'han obtingut crús de reacció molt bruts que no han pogut ser purificats ni caracteritzats cap dels productes.

1.2.1.2.2 Intents d'obtenir el clorur de l'àcid 4-hidroxi-butíric

Veient que en les condicions assajades d'acilació no ha estat possible obtenir el producte desitjat, s'ha pensat en la possibilitat de convertir l'hidroxiàcid en una espècie més reactiva com ara un clorur d'àcid. Fins ara s'ha observat que els grups amino de la proflavina o dels seus derivats són tan poc reactius que en les úniques condicions en que s'han pogut acilar ha estat per reacció amb clorurs d'àcid. El problema principal, però, és veure si el grup protector usat en aquest cas (Tr) serà estable en les condicions necessàries per dur a terme la reacció. A la bibliografia s'han trobat descrits diferents mètodes d'obtenció de clorurs d'àcids en substrats que contenen grups làbils en condicions àcides^{24,25}. En dos d'aquests s'usa clorur de tionil com a reactiu en la presència d'una base (TEA o piridina), usant en ambdós DCM com a dissolvent a 0°C.

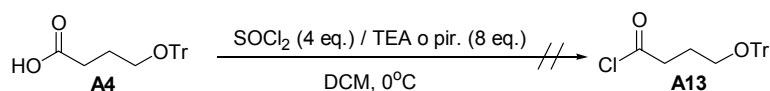


Figura 1.22 - Intents d'obtenir el clorur d'àcid **A13**.

S'ha assajat la reacció en ambdues condicions (fig. 1.22), però en cap cas ha estat possible obtenir el clorur d'àcid desitjat **A13**, sinó que s'ha obtingut com a producte majoritari la butirolactona. La seva formació es pot explicar per l'atac del grup hidroxil (desprotegit en les condicions de reacció) al grup carbonil activat, tal i com es mostra a la figura 1.23. La gran estabilitat d'aquest cicle afavoreix la reacció, impossibilitant així l'obtenció del producte desitjat.

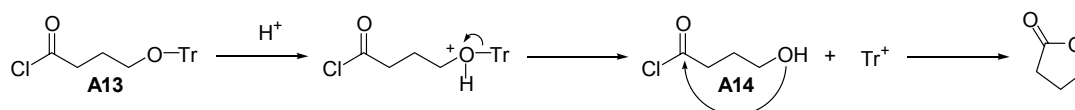


Figura 1.23 - Mecanisme de formació de la butirolactona

Arribats a aquest punt i en vista de les dificultats que ens planteja la introducció de l'àcid hidroxibutíric al derivat **A3**, degut en gran part a la poca reactivitat de les amines dels derivats proflavínics (conjugades amb el sistema acridínic), s'ha decidit canviar la molècula objectiu **A5** per un altre derivat acridínic hidroxilat, que permeti seguir una estratègia sintètica diferent.

1.2.2 Síntesi del derivat 3-(3-*N*-(3-amino-1-propanol)-propionamido)-6-(3-piperidinopropionamido)acridina **A19**

Després de varis nombrosos intents d'obtenir el derivat monoacilat **A5** sense aconseguir-ho, s'ha pensat en un canvi d'estratègia. Aprofitant l'experiència acumulada fins ara en les propietats dels derivats acridínics, s'ha plantejat abordar la síntesi d'una altra molècula objectiu **A19** (fig. 1.24) a partir d'un esquema sintètic diferent. Aquest nou derivat compleix tots els requisits plantejats en l'apartat 1.1.3, ja que conté un hidroxil primari susceptible de ser fosfitilat en un dels braços, mentre que en l'altre manté l'estructura del derivat **A5**. És més, aquest derivat conté un grup amino en posició β al carbonil al mateix braç que l'hidroxil.

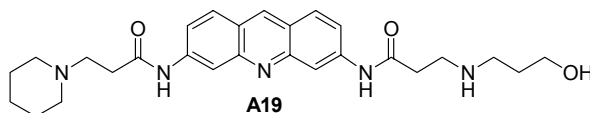


Figura 1.24 – Segon derivat acridínic objectiu.

L'esquema sintètic proposat (fig. 1.25) comença amb l'acilació de tots dos grups amino (reacció ja realitzada amb èxit en anterioritat). El pas clau de l'esquema, que ha de permetre el trencament de la simetria del sistema, és la substitució nucleòfila d'un dels clors per una amina. Aquest tipus de reaccions no requereixen condicions massa extremes, de manera que sembla factible el fet de poder obtenir el derivat **A15** per reacció de l'acridina **A6** amb un defecte estequiomètric de piperidina. Posteriorment, la reacció amb un aminoalcohol, ens hauria de conduir a l'obtenció del derivat desitjat.

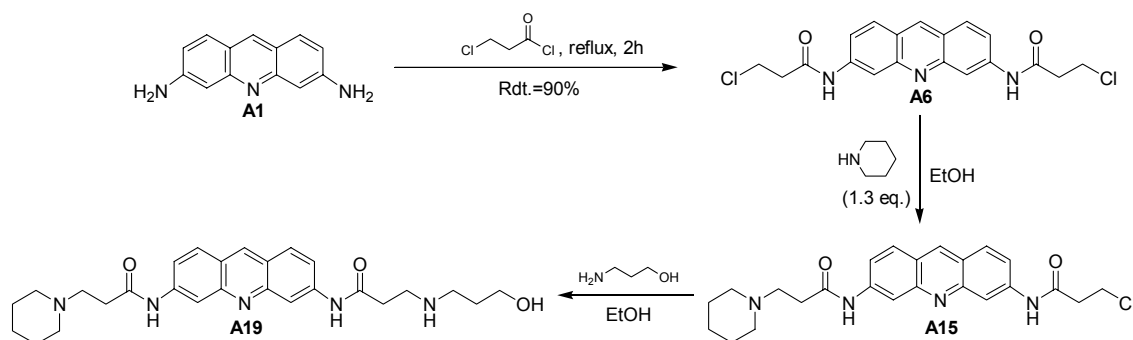


Figura 1.25 - Ruta sintètica plantejada per tal d'obtenir el derivat **A19**.

S'ha assajat la reacció de substitució de només un dels clors de l'acridina **A6** per un anell de piperidina. La reacció, però, no ha permès l'obtenció del producte esperat **A15**, sinó que ha donat lloc a múltiples productes secundaris, dels quals s'ha analitzat el majoritari per RMN i s'ha observat, que sí bé presenta un anell de piperidina, també conté protons olefínics no aromàtics. A la figura 1.26 es mostra l'espectre d'RMN obtingut, així com també l'estructura proposada pel producte en qüestió.

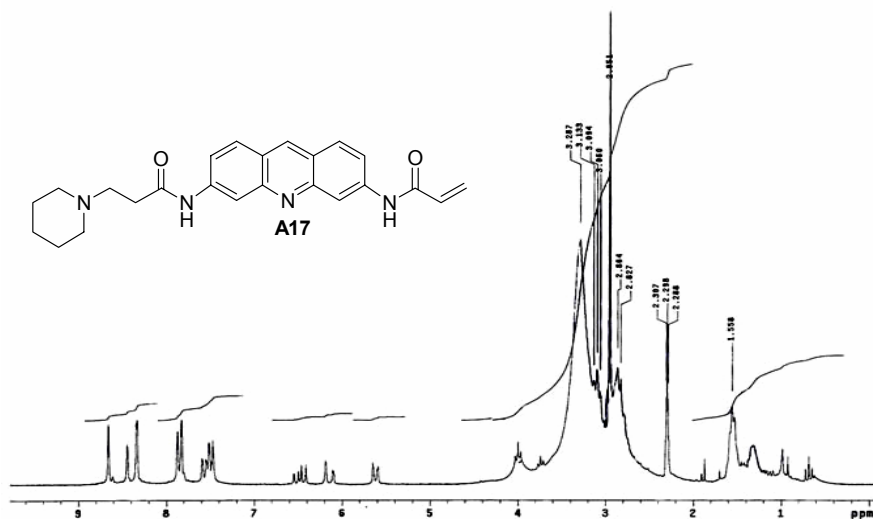


Figura 1.26 - Espectre d'RMN de ^1H i estructura de l'acridina **A17**.

Aquest resultat, ràpidament s'ha relacionat amb l'obtingut en un dels assaigs precedents realitzats en fase sòlida (apartat 1.2.1.1.3). Així, s'ha deduït que la reacció de substitució del clor per la piperidina, que es pensava que era una substitució nucleòfila normal, segurament deu tenir lloc mitjançant un mecanisme més complex. Primerament hi hauria una eliminació d' HCl , i seguidament tindria lloc una addició

conjugada de l'amina al sistema carbonílic α,β -insaturat. Així doncs, en primera instància, la piperidina actuarà de base, per posteriorment donar una addició conjugada de Michael (fig. 1.27). Aquesta observació permet canviar l'enfoc de l'estratègia sintètica abordada fins ara, i dissenyar una nova estratègia sintètica, on l'etapa clau de trencament de simetria tingui lloc a través d'una reacció d'addició conjugada.

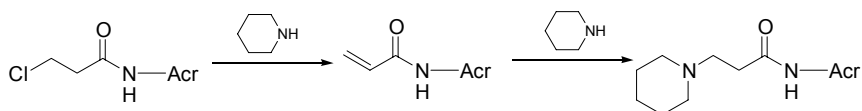


Figura 1.27 – Mecanisme probable de la substitució del clor per una molècula de piperidina.

Així doncs, s'ha plantejat la següent ruta sintètica mostrada en la figura 1.28. Aquesta potser no varia aparentment gaire de l'última proposada, però té l'avantatge que totes les reaccions a partir de l'intermedi **A16** tindran lloc a través del mecanisme d'addició. Aquest tipus de reaccions es donen en condicions força suaus, de manera que és d'esperar que sigui més fàcil trencar la simetria del sistema mitjançant aquest mecanisme. A més a més, no caldrà protegir el 3-amino-1-propanol, ja que les amines donen la reacció d'addició de Michael molt més ràpidament que els alcohols.

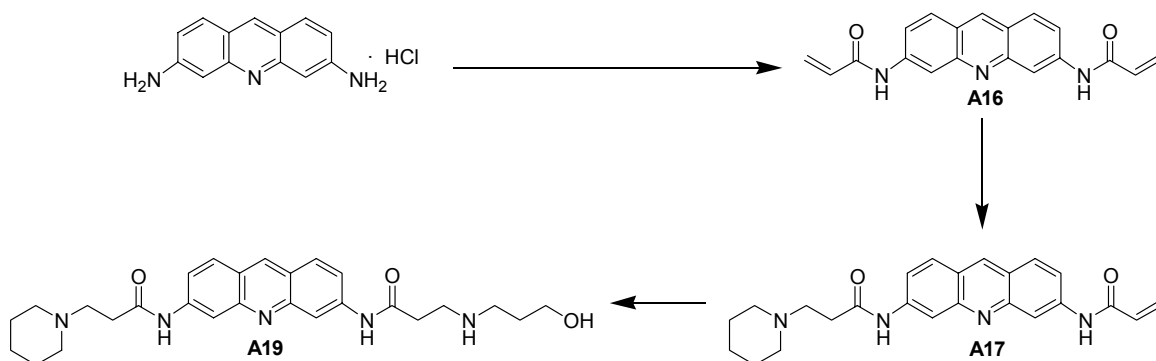


Figura 1.28 - Ruta sintètica alternativa per a l'obtenció del derivat **A19**.

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

Per intentar obtenir aquest intermedi, s'ha fet reaccionar la proflavina **A1** amb el clorur d'acriloil, usant aquest últim com a dissolvent i mantenint un reflux de 3 hores (fig. 1.29). Com que el derivat diacriloilat de la proflavina **A16** és el primer precursor de la síntesi i se'n requerirà força quantitat, s'ha provat també la reacció usant directament l'hidroclorur de proflavina. La reacció ha funcionat amb un rendiment similar (71%), així doncs, a partir d'ara s'utilitzarà directament l'hidroclorur, eliminant així el pas d'alliberament de la base a partir de la sal, cosa que farà augmentar el rendiment global de la síntesi.

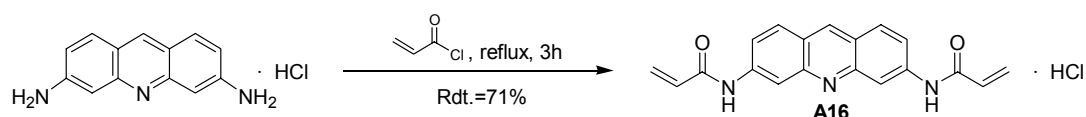
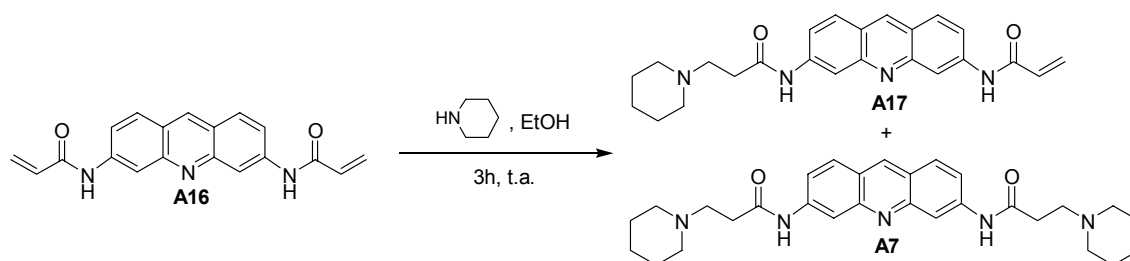


Figura 1.29 - Reacció d'obtenció del diacriloil derivat de la proflavina.

1.2.2.2 Addició d'una molècula de piperidina al derivat A16

Aquesta reacció s'ha dut a terme en EtOH i variant el nombre d'equivalents de piperidina respecte el derivat acridínic **A16** des de 0.5 fins a 1.3 amb la idea de minimitzar la quantitat de producte de doble addició. La reacció té lloc fàcilment a temperatura ambient. En la següent taula es mostra la relació entre els productes obtinguts en cada una de les condicions assajades.



Equivalents de piperidina	Rdt. A16	Rdt. A17	Rdt. A7
0.5 eq.	55%	~ 40%	< 5%
0.7 eq.	40%	50%	10%
1 eq.	30%	30%	40%
1.3 eq.	25%	< 5%	70%

Taula 1.3 - Proporció dels diferents productes aïllats en funció del número d'equivalents de piperidina respecte el derivat **A16**.

Com es mostra a la taula 1.3, quan la reacció es du a terme amb menys d'un equivalent de piperidina, els rendiments d'obtenció de **A17** són moderats (40-50%), però en la purificació posterior es pot recuperar un cert percentatge de producte de partida **A16**, el qual es pot reciclar i utilitzar en posteriors síntesis. Un lleuger augment en el nombre d'equivalents de piperidina, per contra, facilita la formació del producte **A7** resultant de la doble addició, fa disminuir el rendiment d'obtenció de **A17** i permet una menor recuperació del reactiu de partida **A16**.

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

Un cop obtingut el derivat **A17**, només cal introduir un aminoalcohol sobre el doble enllaç conjugat per tal d'obtenir la molècula plantejada com a objectiu (fig. 1.30). El derivat **A17**, a més a més, resulta ser de molta importància perquè hauria de permetre la introducció de qualsevol aminoalcohol de manera específica per la funció amina, sense la necessitat de protegir la funció alcohol. Així doncs, a partir d'aquesta molècula s'haurien de poder sintetitzar una gran varietat de productes anàlegs al desitjat **A19** simplement variant l'aminoalcohol usat.

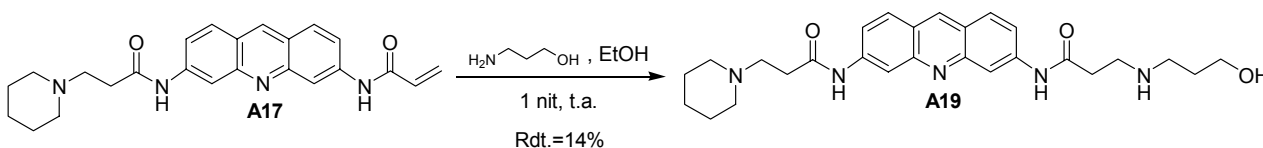


Figura 1.30 - Addició conjugada de l'aminoalcohol per tal d'obtenir el derivat **A19**.

Aquesta reacció s'ha dut a terme usant 1.5 equivalents d'aminoalcohol, però no s'ha observat pràcticament gens de transformació. Així doncs, s'ha tornat a assajar la reacció d'addició de l'aminoalcohol sobre el derivat **A17** però usant un excés més gran de reactiu (10 eq.). Aquest cop sí que s'ha pogut obtenir com a producte majoritari el derivat esperat **A19**, però hi ha hagut molts problemes en la seva posterior purificació, degut al gran excés d'aminoalcohol present en el cru de reacció. Primerament, s'han dut a terme varies coevaporacions amb DCM i ACN, per tal d'eliminar part d'aquest excés, i posteriorment, s'han dut a terme dues cromatografies en columna de gel de sílice. Finalment s'han pogut obtenir 60 mg del derivat **A19** amb la puresa adequada. Ara, l'últim escull abans procedir amb la síntesi d'un conjugat acridina-oligonucleòtid és la fosfitilació d'aquest derivat.

Aquest tipus de reacció està ben optimitzada per a derivats nucleosídics, però al canviar de substrat no sempre funciona de la forma desitjada. Convé remarcar certes dificultats afegides que presenta el nostre cas concret, com ara la solubilitat del derivat abans de fosfitilar. Anteriorment s'ha fet esment de la poca solubilitat que han mostrat els derivats acridínics obtinguts en la majoria de dissolvents emprats habitualment en química orgànica. Així, el derivat **A19** presenta una solubilitat pràcticament nul·la tant en diclorometà com en acetonitril, els dos dissolvents usats normalment en les reaccions de fosfitilació, i només presenta solubilitats acceptables en metanol, aigua i dimetilformamida (dissolvents en els quals no es pot dur a terme la reacció). Per altra banda, ha estat molt difícil la seva purificació i petites proporcions de l'aminoalcohol de partida podrien competir pel reactiu fosfitilant disminuint els rendiments.

Simultàniament, al nostre grup s'ha intentat sense èxit la fosfitilació d'un altre derivat acridínic similar. Així doncs, en vista de les poques possibilitats que

s'entreveuen d'obtenir el fosforamidit, s'ha decidit reservar el derivat **A19** per a futures avaluacions biofísiques i biològiques, i plantejar una altra estratègia general de conjugació.

1.3 Replantejament de l'estratègia: conjugació a través de la formació d'un enllaç amida

Arribats en aquest punt, s'ha cregut convenient replantejar l'estratègia sintètica per tal d'obtenir els conjugats desitjats.

Mantenint la idea d'introduir la part acridínica com a últim pas de la síntesi tenint l'oligonucleòtid ancorat en el suport sòlid, s'ha pensat en la formació d'un enllaç amida entre un derivat acridínic que contingui un grup carboxílic i un oligonucleòtid modificat en 5' de manera que contingui una amina primària (fig. 1.31). A priori, ambdós precursors semblen assequibles. Per una banda, i aprofitant que la síntesi del derivat **A17** té lloc amb rendiments acceptables, la introducció d'un aminoàcid ens conduiria a l'obtenció d'un derivat acridínic a punt per ser conjugat. Per altra banda, l'obtenció de 5'-amino-oligonucleòtids es pot aconseguir canviant la naturalesa de l'espaiador a utilitzar. En aquest cas s'haurien d'utilitzar fosforamidits d'aminoalcohols protegits en el grup amino. La introducció d'aquests espaiadors pot tenir lloc seguint un cicle estàndard de síntesi d'oligonucleòtids, com si d'un altre nucleòsid es tractés.

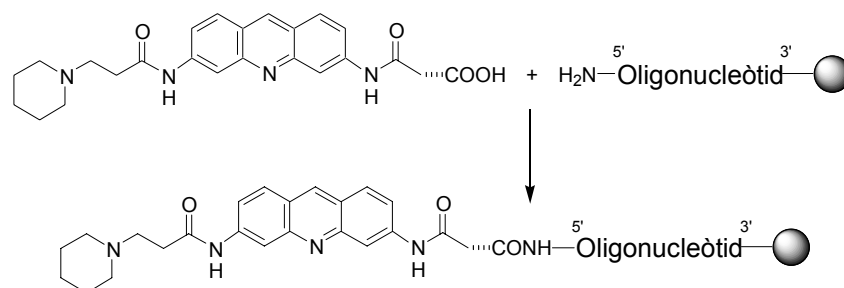


Figura 1.31 – Reacció de conjugació entre un derivat acridínic amb funcionalització àcida i un oligonucleòtid 5'-amino modificat ancorat a resina.

1.3.1 Síntesi de derivats acridínics funcionalitzats amb un àcid carboxílic

Per a la seva síntesi s'ha seguit l'esquema que es mostra a la figura 1.32, a partir del derivat **A17** obtingut anteriorment. S'ha cregut convenient, utilitzar la prolina com a aminoàcid, ja que la seva estructura permet al derivat final contenir una amina terciària i cíclica a cada braç, característica que sembla ser molt important de cara a l'activitat biològica del producte final. A més a més, conté un cicle de cinc baules que és la mida idònia juntament amb els cicles de sis baules. Un altre avantatge que té el fet d'utilitzar prolina, i que és extensible a tots els altres aminoàcids amb cadenes laterals alifàtiques, és la manca d'etapes extremes de protecció i desprotecció.

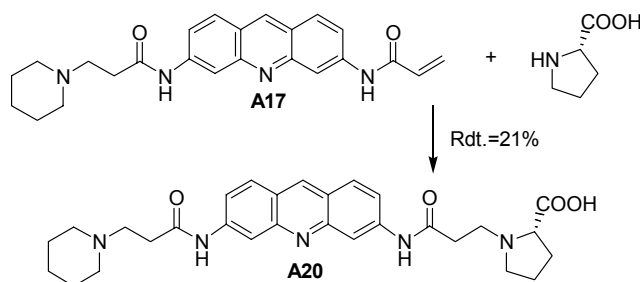


Figura 1.32 - Reacció d'addició conjugada de la L-prolina al doble enllaç del derivat **A17**.

S'ha assajat la reacció (fig. 1.32) emprant un excés de prolina i el principal problema amb que s'ha topat ha estat el control de la mateixa. Fins ara, totes les reaccions havien estat seguides per CCF, però això en aquest cas no ha estat possible degut a l'elevada polaritat d'ambdós derivats acridínics presents (**A17** i **A20**). En aquest sentit s'ha decidit utilitzar la tècnica d'espectrometria de masses de desorció iònica per làser assistida per matriu (MALDI-TOF) per tal de seguir l'evolució de la reacció. El resultat ha estat força bo, ja que usant àcid 2,5-dihidroxibenzòic (DHB) com a matriu, s'han obtingut espectres de masses de bona qualitat i gran sensibilitat. S'ha considerat acabada la reacció d'obtenció del derivat **A20** en el moment d'obtenir un espectre de masses del cru on no s'hi observa la massa del producte de partida, o on la intensitat d'aquesta senyal no evoluciona més. Llavors, s'ha procedit amb la purificació del derivat acridínic obtingut. Aquesta no ha estat gens fàcil i s'han hagut de dur a terme 3 cromatografies en columna per tal d'obtenir el derivat **A20** lliure de prolina. La presència o absència de prolina en el producte eluït per la columna s'ha controlat mitjançant el test de la ninhidrina (apartat D.1 de Materials i mètodes) realitzat sobre un cromatofoli de gel de sílice.

L'espectrometria de masses MALDI-TOF, s'ha convertit, a partir d'aquest moment, en la tècnica emprada de forma rutinària tant en el control de les reaccions, com en l'anàlisi de les diferents fraccions provinents de les purificacions, fet que ha permès millorar enormement ambdós processos. Una altra tècnica introduïda en aquest punt ha estat la cromatografia líquida d'alta pressió en fase reversa (HPLC), tant per a la purificació dels derivats acridínics com per a comprovar la puresa dels productes obtinguts. Degut a les diferents polaritats exhibides pels compostos acridínics, no ha estat possible establir unes condicions generals, sinó que s'ha decidit abordar cada problema per separat pel que fa als sistemes d'elució, gradients o rebliments de columnes (C_4 , C_8 i C_{18}). La incorporació d'aquestes dues tècniques (MALDI-TOF i HPLC) ha estat de vital importància en l'esdevenir del present treball.

Un cop s'ha aconseguit obtenir un primer derivat acridínic que conté un grup carboxílic amb un rendiment acceptable, s'ha decidit sintetitzar-ne uns quants més per tal de tenir una primera família de derivats acridínics a punt per ser conjugats.

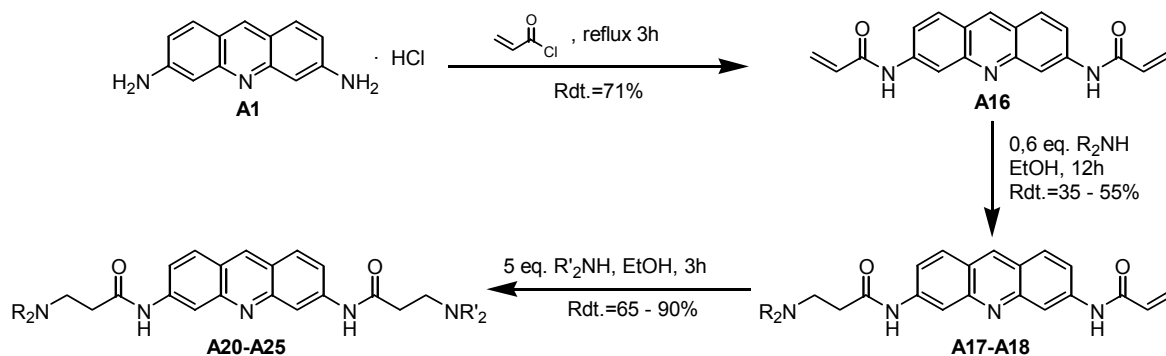


Figura 1.33 – Ruta sintètica seguida per a l'obtenció d'acridines a punt per ser conjugades.

Seguint l'esquema sintètic de la figura 1.33 s'han obtingut uns quants derivats més (fig. 1.34). Tots ells compleixen els requisits estructurals imposats al principi del capítol, ja que contenen amines terciàries i cícliques amb anells de 5 o 6 baules als extrems: pirrolidina i prolina (**A21**), pirrolidina i àcid isonipecòtic (àcid 4-piperidincarboxílic) (**A22**) i, piperidina i àcid isonipecòtic (**A23**). També s'han obtingut dos derivats simètrics, un dels quals conté dues unitats de prolina (**A24**) i l'altre dues de prolinamida (**A25**). Aquests són força més fàcils d'obtenir, ja que en la seva síntesi s'elimina l'etapa crítica de trencament de la simetria de l'anell acridínic, i han estat obtinguts directament des de l'acridina **A16** per reacció amb un excés de prolina i prolinamida respectivament. No obstant, cal tenir en compte que el derivat **A24** pot portar problemes a l'hora de realitzar la conjugació, ja que al tenir dos grups carboxílics pot unir-se a dues cadenes oligonucleotídiques alhora. Aquest fenomen s'intentarà minimitzar utilitzant un gran excés de derivat acridínic en la reacció de conjugació. D'altra banda, el derivat **A25** no pot ser conjugat, ja que no conté cap grup àcid, però s'ha sintetitzat perquè s'ha cregut interessant avaluar-ne les seves propietats d'estabilització d'estructures quàdruplex de G (capítol 2).

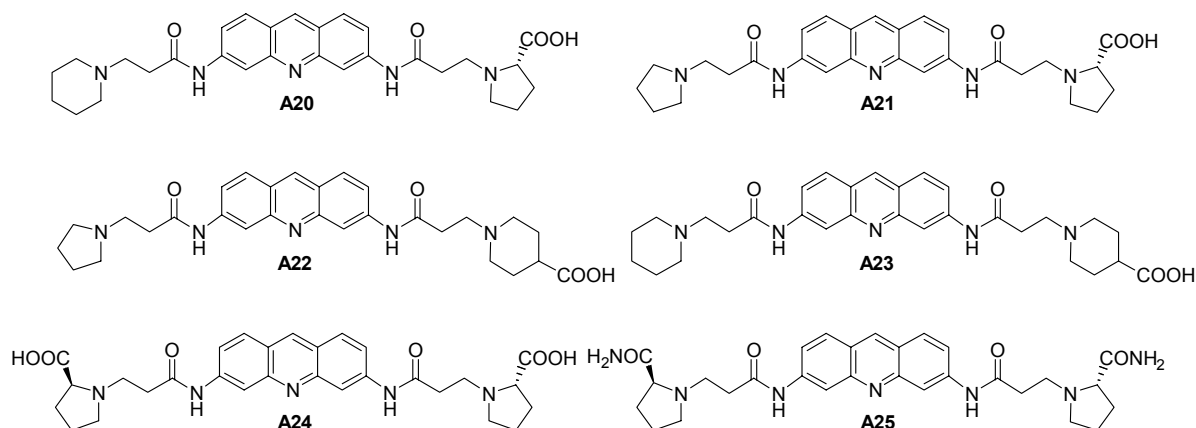


Figura 1.34 – Estructura dels derivats acridínics obtinguts.

A la figura 1.35 es mostren els cromatogrames d'HPLC dels derivats obtinguts i a la taula 1.4 apareixen els rendiments de síntesi.

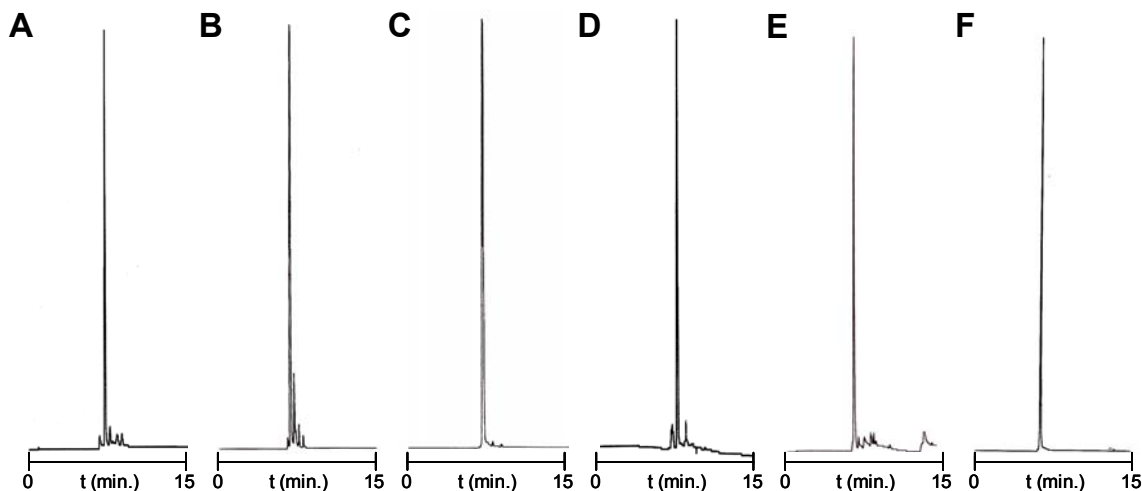


Figura 1.35 – Cromatogrames d'HPLC d'algunes de les acridines obtingudes: **A20** (A), **A21** (B), **A22** (C), **A23** (D), **A24** (E) i **A25** (F). Gradient: 5-35% B en 15 min.; A: 0.045% TFA en H₂O, B: 0.036% TFA en ACN.

Acridina	Rdt. global	Acridina	Rdt. global
A20	21%	A23	23%
A21[#]	22%	A24	33%
A22	27%	A25	64%

Taula 1.4 – Rendiments de síntesi obtinguts per a cada acridina. [#]Sintetitzada pel doctor Laurent Debéthune.

1.4 Síntesi d'oligonucleòtids modificats amb un grup amino en 5'

L'obtenció d'amino-oligonucleòtids es pot abordar seguint diferents estratègies, d'entre les que cal destacar l'ús de monòmers modificats (5' o 3' amino nucleòsids), l'ús de resines especials²⁶ o l'ús d'amino-espaiadors. Aquesta última es basa en la introducció de derivats fosforamidits d'aminoalcohols en l'últim pas de la síntesi d'un oligonucleòtid. Així, s'obté el 5' o 3' amino-oligonucleòtid, depenent de la direcció en la que té lloc la síntesi.

L'ús de monòmers modificats implica, en la majoria dels casos, la síntesi d'aquests, de manera que l'obtenció dels oligonucleòtids desitjats resulta molt laboriosa. El mètode de les resines especials en general és força bo, però pot costar posar a punt el mètode, ja que al tractar-se d'una resina no estàndard s'han d'optimitzar molts paràmetres de síntesi. En el nostre cas, s'ha estat dubtant entre utilitzar una resina especial i l'ús d'amino-espaiadors, però finalment s'ha decidit per utilitzar el darrer (fig. 1.36). Bàsicament, el gran avantatge que presenta, és la gran diversitat estructural que es pot introduir, ja que hi ha força espaiadors comercials,

S'ha decidit utilitzar **LN5** i **LN6**, així com també un no comercial d'estructura anàloga a **LN6** però més curt (3 àtoms de carboni) que hem anomenat **LN3**. L'espaiador **LN6**, tot i ser comercial, havia estat sintetitzat en el nostre grup pel Dr. Vicente Marchán, al qual aprofito per agrair-li la cessió de part del producte. Pel que fa a **LN3** s'ha hagut de sintetitzar. Finalment, també s'ha pensat en utilitzar l'espaiador **LO18** amb combinació amb algun dels altres per tal d'estudiar com afecta la longitud de l'espaiador tant en la síntesi dels conjugats, com en les seves propietats. L'ús de **LN3** i **LN6**, també permetrà estudiar com poden afectar petites variacions de longitud, i **LN5** és interessant pel fet de ser d'una naturalesa química diferent a **LN3** i **LN6**.

Pel que respecte a en quin extrem s'introdueix la modificació, de moment s'ha decidit realitzar les síntesis de forma estàndard i introduir-la en 5'. Un cop aconseguit sintetitzar conjugats en 5', obtenir-ne en 3' no hauria de portar més complicacions que el fet d'obtenir rendiments més baixos en la síntesi de la cadena nucleotídica.

1.4.1 Síntesi de l'espaiador LN3

La síntesi de l'espaiador derivat del 3-amino-1-propanol, s'ha realitzat seguint el següent esquema sintètic:

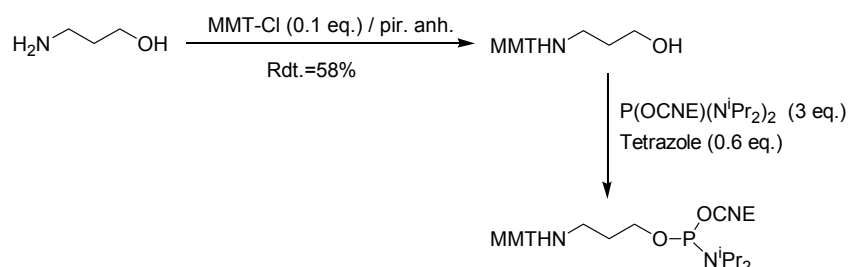


Figura 1.38 – Síntesi de l'espaiador **LN3** a partir del 3-amino-1-propanol.

La primera etapa consisteix en la protecció de l'amina amb el clorur de monometoxitritil. Aquest reactiu se sol utilitzar en la protecció d'amines en presència d'alcohols, ja que reacciona preferentment amb el grup amino. Per tal d'assegurar un bon rendiment de reacció, aquesta s'ha dut a terme amb un gran excés d'aminoalcohol de partida.

La segona reacció, la fosfitilació del grup hidroxil, ha presentat més complicacions de les previstes inicialment. Primerament s'ha realitzat amb els reactius habituals, la 2-cianoetiltetraïso-propilaminofosfina (*bis-fosfina*, 1.2 eq.) i tetrazole (0.5 eq.), però no s'ha obtingut el fosforamidit desitjat, sinó el fosfit triester derivat de la reacció de dues molècules de l'aminoalcohol amb una de *bis-fosfina*. Així doncs, s'ha repetit la reacció de fosfitilació realitzant dos assaigs en paral·lel. En un s'ha usat la 2-

cianoetil clordiisopropilaminofosfina (*cloro-fosfina*, 1.1 eq.) com a agent fosfitilant en presència de DIEA anh. (2 eq.), i en l'altre, la *bis-fosfina* però amb un excés més important (3 eq. i 0.6 de tetrazole). En ambdós casos s'ha obtingut el producte desitjat, per bé que en el cas de la *bis-fosfina* la reacció sembla ser força més neta (fig. 1.39). Tot i això, al purificar el cru obtingut en la segona reacció mitjançant una cromatografia en columna s'ha observat que el fosforamidit s'havia descomposat. Així doncs, s'ha repetit la síntesi en les últimes condicions, i s'ha utilitzat el fosforamidit sense cap etapa de purificació.

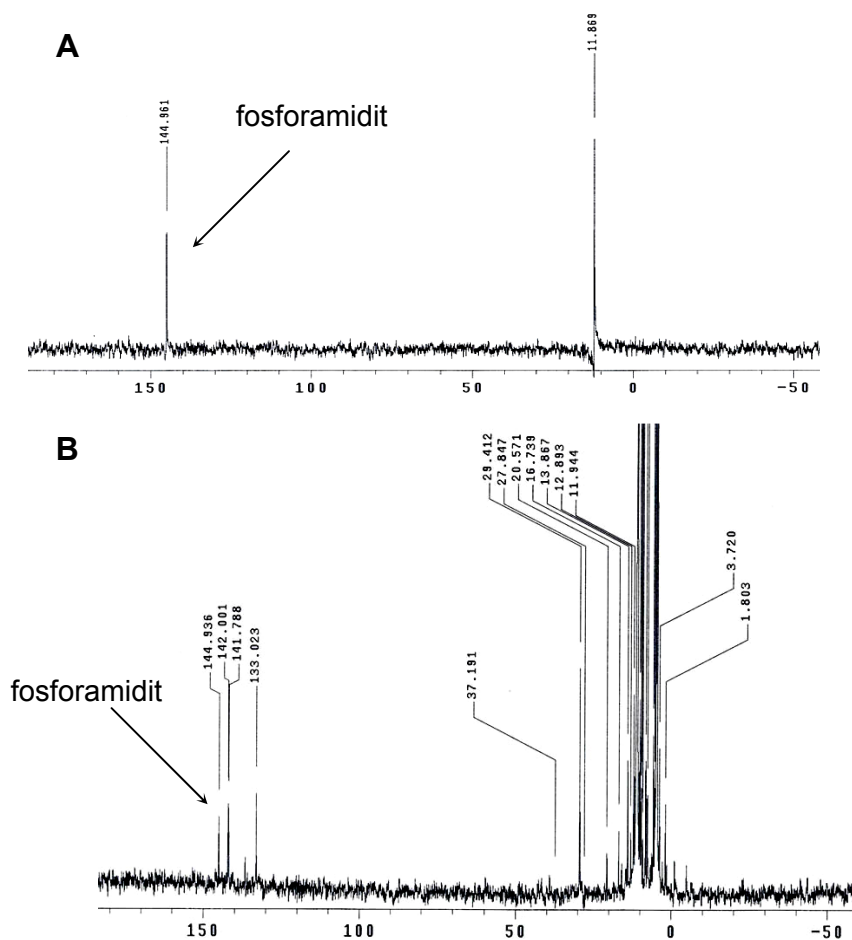


Figura 1.39 – Espectres de masses de MALDI-TOF de la reacció de fosfitilació realitzada amb *bis-fosfina* (A) i amb *cloro-fosfina* (B).

1.4.2 Síntesi dels 5'-amino-oligonucleòtids

Arribats en aquest punt del treball, ha calgut plantejar quines seqüències oligonucleotídiques es volen sintetitzar. D'entrada, s'ha considerat convenient obtenir oligonucleòtids complementaris al DNA telomèric i no a l'RNA de la telomerasa. D'aquesta manera, s'intentarà dirigir els conjugats als extrems telomèrics per tal

d'incidir en l'estructura tridimensional dels telòmers. Dirigint els conjugats contra l'RNA de la telomerasa, el mecanisme d'inhibició de l'enzim segurament estaria més relacionat en el fet d'impedir l'hibridació de l'RNA amb la seqüència telomèrica, i no tant amb la formació de quàdruplex de guanina en els telòmers. Cal recordar que l'objectiu que es pretén amb la síntesi dels conjugats és dotar de selectivitat les acridines, però intentant mantenir el seu mecanisme d'inhibició de l'enzim via estabilització d'estructures quàdruplex. Tot i que resulta força complicat saber exactament quin mecanisme té lloc, el que sí que és cert, és que dirigint els conjugats als telòmers s'evitaran, o almenys es minimitzaran, altres tipus d'interaccions. D'altra banda, si bé és cert que pot resultar força interessant obtenir conjugats dirigits a l'RNA de la telomerasa, aquesta possibilitat ha quedat fora de l'abast del present treball.

S'ha plantejat la síntesi de 3 cadenes oligonucleotídiques diferents. Dues d'elles complementàries a la seqüència telomèrica humana (CTAACCT i AACCTAA) i una altra no complementària però de similar composició (TCACTCAT), que servirà de control negatiu en els assaigs posteriors. S'ha decidit començar per obtenir cadenes relativament curtes de 8 nucleòtids, ja que és una llargada que permet treballar còmodament i alhora presentar certa selectivitat dins el genoma d'un organisme. Més endavant, i en vista dels resultats obtinguts, ja es plantejarà la possibilitat d'obtenir conjugats amb cadenes més llargues que permetin reconeixements més específics (16-mer a 18-mer).

En primera instància, els oligonucleòtids s'han sintetitzat sobre dos tipus diferents de suport sòlid. Per una banda s'ha utilitzat el suport habitual en síntesi d'oligonucleòtids (CPG) i per l'altra una resina de poliestirè, ja que l'experiència del nostre grup en síntesi de nucleopèptids ens indica que les reaccions de formació d'enllaç amida tenen lloc amb millor rendiment en aquest últim tipus de suport sòlid²⁷. Per a la síntesi sobre poliestirè resulta necessari incorporar manualment el nucleòtid de l'extrem 3'. Així doncs el primer pas ha estat obtenir les nucleotidil resines desitjades.

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

S'ha escollit la resina MBHA-PS, que conté una matriu de poliestirè reticulada amb divinilbenzè i funcionalitzada amb grups *p*-metilbenzidrilamina (fig. 1.40), ja que s'ha utilitzat amb èxit en la síntesi de nucleopèptids, on també té lloc la formació d'enllaços amida. Així doncs, les condicions de síntesi d'oligonucleòtids sobre aquest suport sòlid estan ja força optimitzades. A la figura 1.40 es mostra l'esquema sintètic utilitzat per tal d'obtenir les nucleotidil-resines a punt per l'elongació de la cadena oligonucleotídica.

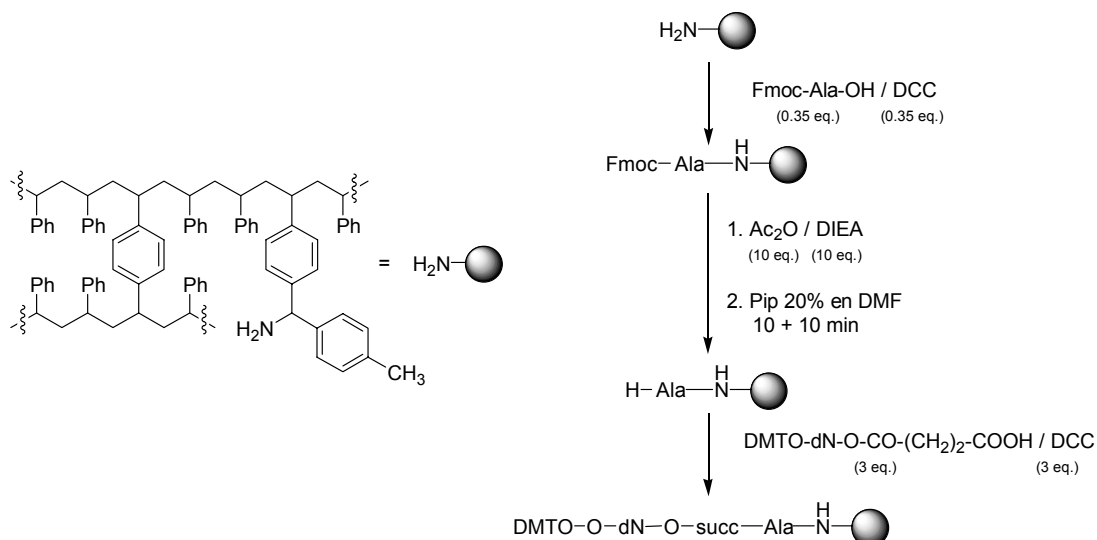


Figura 1.40 – Esquema sintètic d'obtenció de nucleotidil-resines usant com a suport sòlid MBHA-PS.

El primer pas en l'obtenció de les resines desitjades consisteix en l'acoblament d'un residu d'alanina per tal de disminuir la funcionalització inicial de la resina (0.70 mmol/g). Està comprovat que amb aquesta disminució s'aconsegueixen rendiments més bons en la síntesi d'oligonucleòtids sobre suport de poliestirè²⁸. Així doncs, controlant els equivalents de Fmoc-Ala-OH, es poden aconseguir funcionalitzacions més adequades, al voltant de 0.25 mmol/g. Un cop incorporat el residu d'alanina, es determina el nou grau de funcionalització i en cas de ser el desitjat, es procedeix amb el bloqueig (*capping*) per acetilació dels grups amino de la resina que no han reaccionat. Si per contra no s'ha assolit el valor desitjat, es repeteix el tractament amb l'Fmoc-Ala-OH, fins a assolir-lo.

Un cop obtinguda la resina amb la funcionalització desitjada, i després d'eliminar el grup Fmoc amb piperidina, té lloc la incorporació del primer nucleòtid. La unió entre aquest i el suport sòlid es realitza a través de la formació d'un enllaç amida entre el grup amino de l'alanina i el derivat succinilat del nucleòtid en qüestió. Aquest tipus d'unió és la que permetrà el desancoratge de la cadena oligonucleotídica de la resina mitjançant un tractament amb amoníac. Així doncs, en primer lloc s'ha d'obtenir el derivat nucleosídic protegit en 5' i succinilat en 3'. En el present treball s'han obtingut els derivats succinilats de la T i de la N-benzoil-2'-desoxiadenosina (A^{Bz}), la síntesi dels quals es mostra esquemàticament en la figura 1.41.

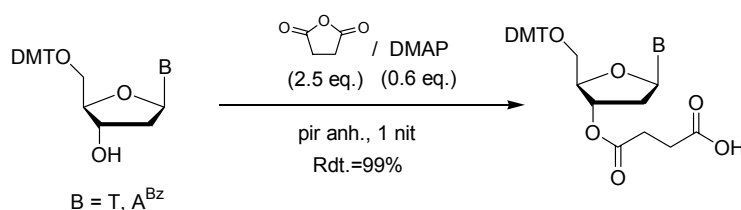


Figura 1.41 - Reacció de succinilació dels nucleòsids protegits en 5'.

Els nucleòsids protegits en 5' amb el grup DMT, són comercials, de manera que només ha calgut realitzar la succinilació en 3'. Aquesta reacció s'ha dut a terme usant un excés d'anhídrid succínic en presència de DMAP. La reacció ha funcionat bé per ambdós nucleòsids.

Un cop obtingut el derivat succinilat, s'ha prosseguit amb l'esquema sintètic mostrat en la figura 1.40, duent a terme l'acoblament del nucleòsid succinilat usant DCC com a agent acoblant. L'eficiència de l'acoblament s'ha controlat mitjançant el test qualitatiu de la ninhidrina sobre la resina un cop rentada. L'acoblament s'ha repetit fins a obtenir un assaig negatiu en el test, indicatiu de que ja no queden grups aminos lliures sobre la resina. Finalment, s'ha obtingut una funcionalització de 0.17 mmol/g en el cas de la T, i de 0.26 mmol/g en el cas de la A^{Bz}.

1.4.2.2 Elongació de la cadena oligonucleotídica

La síntesi dels oligonucleòtids s'ha realitzat seguint les condicions estàndards en el cas de CPG²⁹ i les condicions experimentals desenvolupades en el nostre grup per a la síntesi sobre suport de poliestirè³⁰. En ambdós casos, els protectors de les nucleobases utilitzats de forma estàndard són el benzoïl per a l'adenina, i la citosina i l'isobutiril per a la guanina. Com a diferències principals entre la síntesi sobre poliestirè i l'estàndard sobre boles de vidre (CPG), cal destacar els dissolvents emprats i la concentració dels fosforamidits, així com també alguns dels tractaments de rentat de la resina. Aquestes diferències es poden observar a la següent taula:

Etapas	CPG		PS	
	Reactiu	t(min.)	Reactiu	t(min.)
Rentats	ACN	0.5	DCM	0.3
Destritilació	3% TCA en DCM	1	3% TCA en DCM	2
Rentats	ACN	2	DCM	3.3
Neutralització	---	---	2% DIEA en DCM	0.5
Rentats	---	---	ACN anh.	0.75
Assecat	Argó	0.5	Argó	0.75
Acoblament	Fosforamidit 0.1 M + tetrazole 0.5 M en ACN anh.	1	Fosforamidit 0.2 M en DCM anh. + tetrazole 0.8 M en THF anh.	15
Rentats	ACN (HPLC)	1	THF	0.5
Acetilació	Ac ₂ O/NMI	1	Ac ₂ O/NMI	2
Rentats	ACN	1	DCM	1
Oxidació	^t BuOOH	1	^t BuOOH	1
Rentats	ACN (HPLC)	1	THF, DMF, DCM	3

Taula 1.5 – Condicions experimentals típiques en la síntesi d'oligonucleòtids sobre CPG i PS.

L'obtenció dels 5'-amino-oligonucleòtids s'ha realitzat duent a terme la introducció de l'espaiador al final de la síntesi i en les mateixes condicions que qualsevol altre fosforamidit. Abans de realitzar-se aquest últim acoblament, no obstant,

s'ha dut a terme un petit desancoratge de l'oligonucleòtid per tal d'avaluar la qualitat del producte obtingut. En el cas d'obtenir-se un cru molt brut, s'ha repetit la síntesi. D'entrada, i per tal de realitzar els primers assaigs de conjugació dels derivats acridínics sobre els oligonucleòtids, s'ha sintetitzat solament una de les seqüències plantejades: CTAACCCT, a la qual posteriorment s'hi han incorporat bé l'espaiador **LN6**, o l'**LN3**, obtenint-se els 5'-amino-oligonucleòtids **OL1** i **OL2**, respectivament (fig. 1.42).

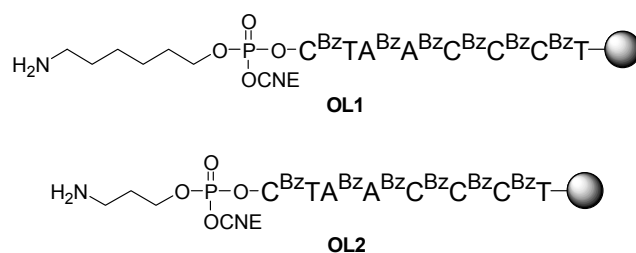


Figura 1.42 – Estructura dels 5-amino-oligonucleòtids **OL1** i **OL2** ancorats sobre resina.

1.5 Assaigs de conjugació

Els assaigs de conjugació han estat realitzats majoritàriament pel Dr. Laurent Debéthune, tanmateix, considero convenient incloure'ls resumidament en la present memòria perquè d'aquests assaigs n'ha derivat en última instància el mètode utilitzat en la síntesi dels conjugats. La meua contribució en aquest apartat inclou algun dels assaigs realitzats, així com també una forta implicació en la interpretació dels resultats obtinguts.

Els primers assaigs han consistit en l'intent d'acoblar l'acridina **A20** sobre el 5'-amino-oligonucleòtid **OL1**, ancorat sobre una resina de CPG, per tal d'obtenir el conjugat **C1** (fig. 1.43). El procediment seguit en aquests assaigs ha consistit en els següents passos:

- Eliminació en condicions àcides del grup protector de l'extrem 5'-amino (MMT).
- Rentats + Neutralització.
- Reacció d'acoblament de l'acridina (5 eq.).
- Rentats.
- Desancoratge i desprotecció del conjugat amb NH_3 .
- Anàlisi del cru per MALDI-TOF i HPLC (per tal de determinar quins productes contenen derivats acridínics, s'enregistren els cromatogrames de 260 i a 410 nm).

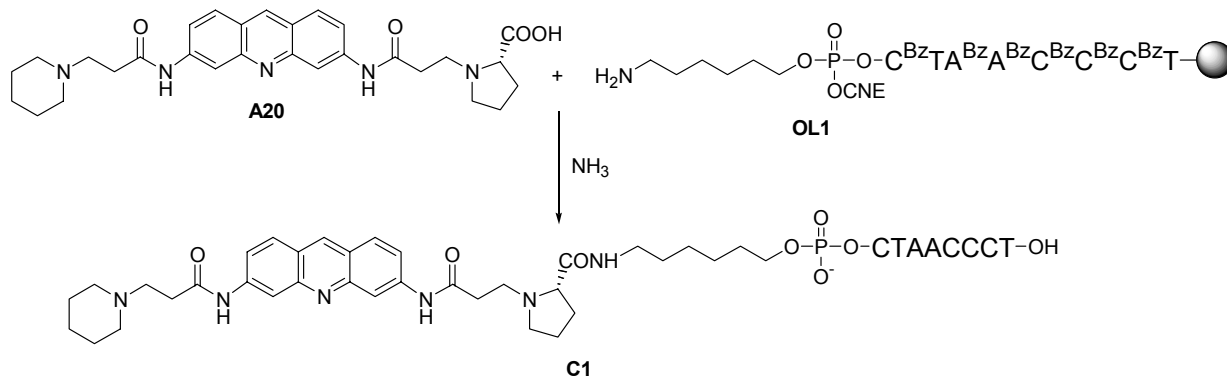


Figura 1.43 – Assaigs de conjugació de l'acridina **A20** sobre l'oligonucleòtid **OL1**, per tal d'obtenir el conjugat **C1**.

1.5.1 Assaigs sobre CPG-oligonucleotidil resines

Inicialment s'ha utilitzat DIPCDI com a agent acoblant en DMF i en presència d'HOBt, però no s'ha observat la presència del conjugat desitjat en el cru de reacció, sinó que s'ha obtingut majoritàriament l'amino-oligonucleòtid de partida. Així doncs, s'ha decidit assajar agents acoblants més potents que les carbodiimides, com ara el PyBOP o el PyAOP (fig. 1.21), també en DMF i en presència de DIEA, requerida pel mecanisme de reacció. L'anàlisi per MALDI-TOF del primer assaig amb PyBOP ha revelat la presència de diversos productes, cap dels quals, però, és el conjugat desitjat. Majoritàriament s'ha observat la presència de l'amino-oligonucleòtid de partida (acetilat i no-acetat) i, sorprenentment, del producte resultant de la conjugació d'una molècula de prolina (**C1b**) a l'amino-oligonucleòtid (fig. 1.44). En menor proporció també s'ha observat un conjugat que conté el cromòfor acridínic, però que té una massa 68 unitats menor a l'esperada (**C1a**). Aquesta massa correspon a la pèrdua de l'anell de piperidina del conjugat, seguit de la introducció d'un grup amino. El desancoratge té lloc en condicions molt bàsiques (NH_3 33%, 55°C, 1 nit), cosa que hauria pogut donar lloc a una reacció de Michael a la inversa (retro-Michael), en la qual s'eliminaria la piperidina per donar lloc al derivat acrilòil. Posteriorment, aquest derivat addicionaria l'amoníac present en el medi per donar lloc al conjugat **C1a** (fig. 1.44). Aquesta mateixa reacció secundària explicaria l'obtenció del producte que conté l'oligonucleòtid amb una molècula de prolina, ja que l'acridina de partida no contenia impureses de prolina.

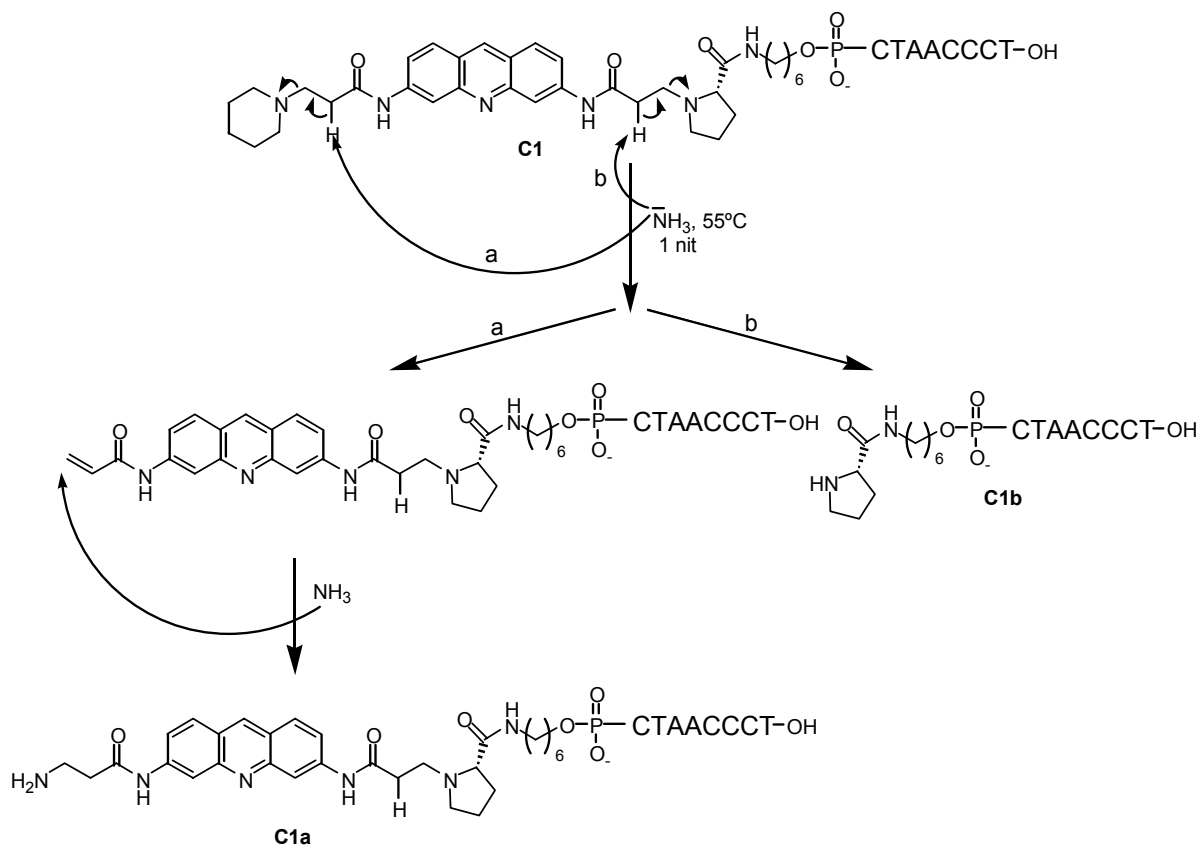


Figura 1.44 – Reaccions secundàries que tenen lloc durant el tractament amb NH_3 del conjugat **C1**.

Per intentar minimitzar aquestes reaccions secundàries, s'han suavitzat les condicions inicialment assajades disminuint el temps de desancoratge (NH_3 33%, 55°C , 2h). En aquest cas, s'ha obtingut un cru força similar a l'anterior però amb la presència del conjugat desitjat. Aquest assaig sembla confirmar la hipòtesi sobre la retro-Michael com a reacció secundària en l'etapa de desancoratge i desprotecció. Així doncs cal, d'una banda millorar el rendiment de l'acoblament, i de l'altra evitar o minimitzar aquesta reacció secundària. La reacció d'acoblament amb PyAOP ha presentat uns resultats molt similars, obtenint-se una proporció de productes provinents del conjugat (conjugat desitjat + productes de degradació durant el desancoratge) menor del 10%.

1.5.2 Assaigs sobre PS-oligonucleotidil resines

Paral·lelament als últims assaigs realitzats sobre CPG, s'han començat a realitzar els assaigs sobre PS, i en vista que aquests darrers han estat més prometedors s'han abandonat els assaigs sobre CPG.

S'ha assajat la reacció d'acoblament usant els agents acoblants 4-nitrobenzensulfonat de pentafluorofenil (PFNB), PyAOP i HATU en DMF, realitzant en tots ells el desancoratge amb una mescla NH_3 /dioxà (1:1) durant 2.5 hores a 55°C .

Com es pot observar en els cromatogrames de la figura 1.45, l'agent acoblant que ha permès obtenir una proporció de productes provinents del conjugat més elevada ha estat el PFNB (55%). En el cas del PyAOP, aquesta proporció ha estat del 17%, mentre que amb l'HATU no ha superat el 30%.

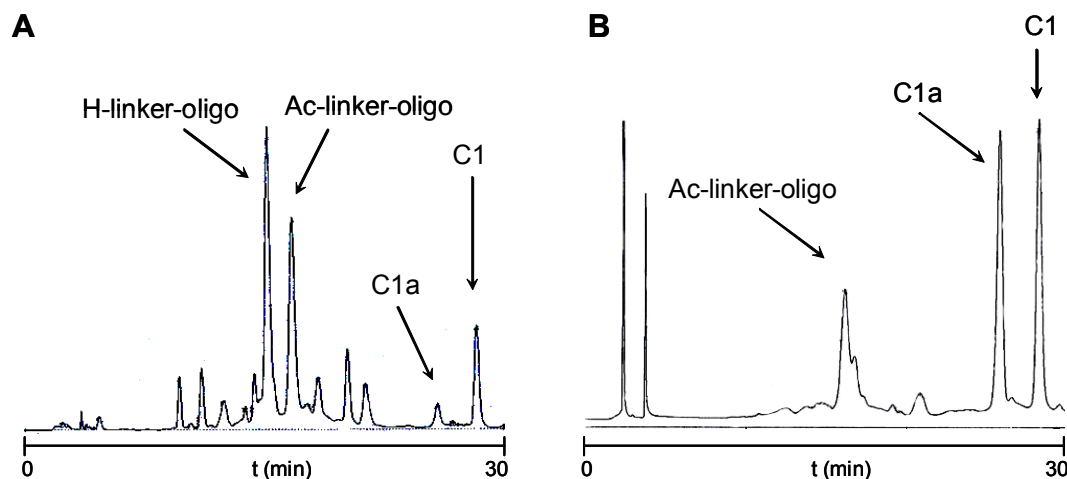


Figura 1.45 – Cromatogrames d'HPLC dels crús de desancoratge dels assaigs de conjugació realitzats amb PyAOP (A) i amb PFNB (B). Gradient: 5-35% B en 30 min.; A: 10 mM NH₄OAc en H₂O, B: ACN/H₂O (1:1).

La reacció retro-Michael, no obstant, continua tenint lloc. Per tal de minimitzar els seus efectes s'ha pensat en suavitzar encara més les condicions de desancoratge i desprotecció, disminuint la temperatura a la que té lloc el tractament. Això implica, no obstant, utilitzar fosforamidits en la síntesi de l'oligonucleòtid, que continguin protectors de les nucleobases més làbils. Aquests són el benzoïl per a l'adenina (A^{Bz}), l'acetil per la citosina (C^{Ac}) i la dimetilformamida per a la guanina (G^{dmf}). En el nostre cas, doncs, l'únic canvi ha estat l'ús de la C^{Ac} enlloc de C^{Bz}, ja que cap dels oligonucleòtids plantejats conté guanines. Ara, el desancoratge i la desprotecció de les bases es pot dur a terme amb la mateixa mescla NH₃/dioxà (1:1) a temperatura ambient i durant 6 hores. Cal remarcar que d'ara en endavant tots els oligonucleòtids s'han sintetitzat utilitzant el fosforamidit de la C^{Ac}.

Per tal de millorar el rendiment de l'acoblament del derivat acridínic **A20** sobre el 5'-amino-oligonucleòtid, s'ha pensat en la possibilitat de canviar el dissolvent (DMF) per una dissolució de LiCl 0.8 M en una mescla DMF/NMP (1:1). Aquest nou dissolvent dificulta la formació d'enllaços d'hidrogen, de manera que s'eviten possibles estructuracions i/o agregacions dels derivats acridínics. L'assaig ha resultat positiu, de manera que a partir d'ara s'utilitzarà aquest dissolvent en la reacció de conjugació.

Finalment, un dels problemes que ha presentat fins ara la síntesi dels conjugats és la presència en el cru de reacció d'una important quantitat de 5'-amino-oligonucleòtid acetilat. Aquest producte es creu que podria provenir, en part, de la reacció del grup amino situat en 5', que queda lliure un cop feta la neutralització de la resina, amb el grup acetil de la C^{Ac}. Així doncs, s'ha cregut convenient no realitzar

aquesta etapa de neutralització prèvia, sinó fer una neutralització *in situ* durant l'acoblament. S'ha decidit utilitzar 25 equivalents de DIEA per tal que hi hagi suficient base per dur a terme la neutralització, evitar la protonació de l'acridina i intervenir en el mecanisme de reacció de l'agent acoblant. Aquest assaig s'ha realitzat de forma similar als anteriors, però intentant acoblar l'acridina **A20** sobre el 5'-amino-oligonucleòtid **OL2** per tal d'obtenir el conjugat **C2**.

A la figura 1.46 es pot observar com amb totes aquestes modificacions i amb el fet de no realitzar la neutralització prèvia, sinó *in situ*, augmenta molt la qualitat del cru i disminueix dràsticament la proporció de producte acetilat.

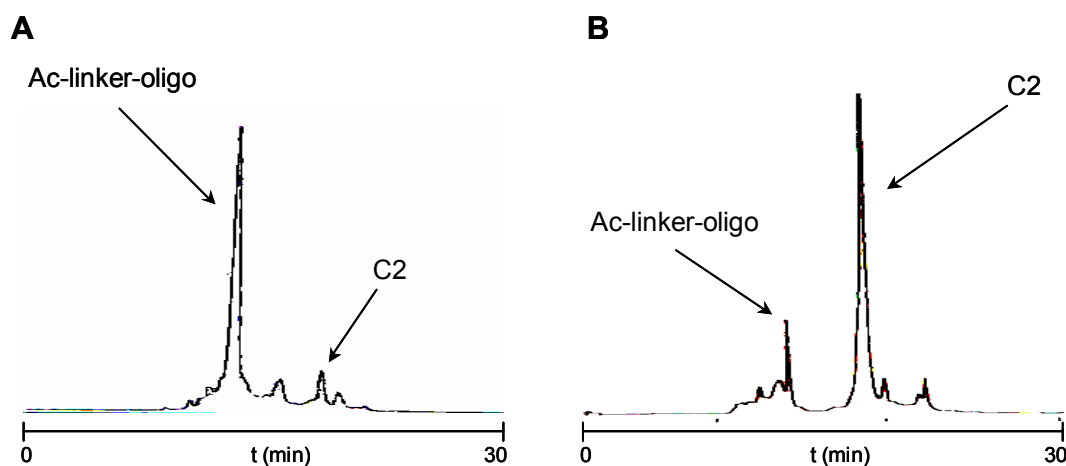


Figura 1.46 – Cromatogrames d'HPLC dels crus de desancoratge dels assaigs de conjugació realitzats amb neutralització prèvia de la resina (A) i amb neutralització *in situ* (B). Gradient: 5-35% B en 30 min.; A: 10 mM NH₄OAc en H₂O, B: ACN/H₂O (1:1).

En vista dels resultats obtinguts en aquests assaigs, s'ha decidit procedir a la síntesi d'una primera família de conjugats emprant un excés d'acridina de 5 equivalents i utilitzant el PFNB com a agent acoblant (5 eq.) amb la presència de DIEA (25 eq.) i una quantitat catalítica d'HOBT.

1.6 Síntesi d'una primera família de conjugats acridina-oligonucleòtid

1.6.1 Síntesi del PFNB

L'agent acoblant que millors rendiments ha donat en la reacció d'acoblament ha estat el PFNB (4-nitrobenzensulfonat de pentafluorfenil), i per tant és el que s'utilitzarà en la síntesi dels diferents conjugats. El PFNB és un sòlid cristal·lí que s'utilitza en química de pèptids com a alternativa a altres reactius més comuns en acoblaments difícils³¹. El producte, que no és comercial, s'obté a través de la reacció

del clorur de 4-nitrobenzensulfonil amb el pentafluorofenol. La reacció es du a terme en piridina i té lloc en bon rendiment (fig. 1.47).

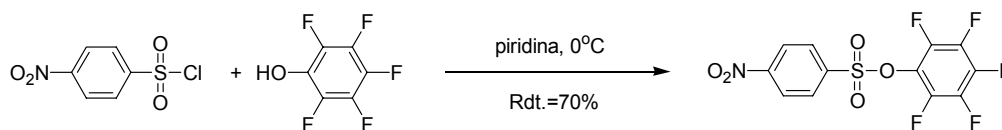


Figura 1.47 – Reacció d'obtenció del PFNB.

El mecanisme de reacció del PFNB (fig. 1.48) requereix la presència d'una base orgànica no nucleòfila i quantitats catalítiques d'HOBt³² (molt utilitzat en química de pèptids). Primerament, té lloc l'activació del benzensulfonat amb l'HOBt, formant-se un intermedi molt reactiu, el qual reacciona amb el grup carboxilat per donar un anhidrid mixt sulfònic-carboxílic. En aquest punt, tant pot tenir lloc l'atac directe del nucleòfil (en el nostre cas de l'amina) donant l'amida desitjada, com formar-se prèviament un ester actiu de pentafluorofenil. És important deixar reaccionar el PFNB amb l'HOBt i el carboxilat en presència de la base abans d'incorporar l'amina, ja que si no, aquesta última pot reaccionar amb el sulfonat activat formant-se un producte no desitjat (sulfonamida).

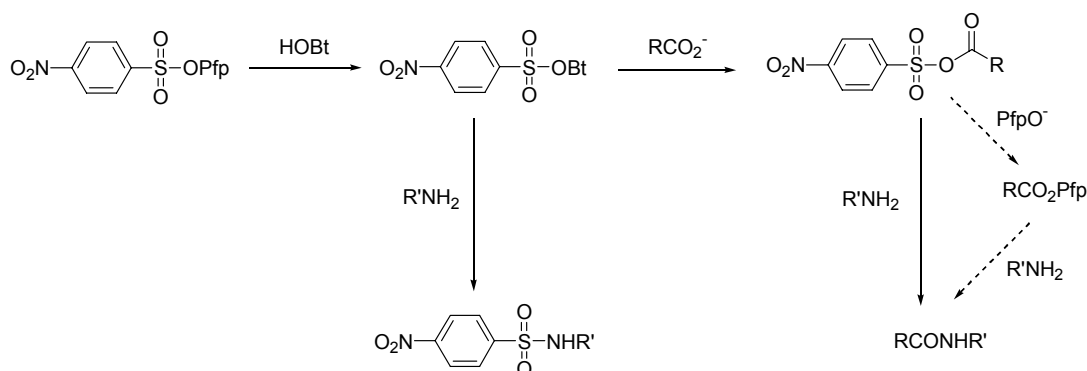


Figura 1.48 – Mecanisme de reacció dels acoblaments realitzats amb PFNB.

1.6.2 Obtenció dels conjugats

Primerament s'ha realitzat la síntesi dels oligonucleòtids sobre suport de poliestirè a escala 5 μmol. Els grups protectors de les nucleobases utilitzats han estat el benzoïl per l'adenina i l'acetil per la citosina i les síntesis s'han realitzat tal i com s'explica a l'apartat C dels materials i mètodes, obtenint-se rendiments molt elevats en cada etapa d'acoblament (>97%), excepte en el cas de l'espaiador **LN3** (~70%). Sovint els fosforamidits no comercials presenten rendiments d'acoblament menors, degut normalment al fet de contenir una mica d'humitat. Com que només s'ha utilitzat per a la

síntesi d'un conjugat, de moment no s'ha treballat per optimitzar la seva incorporació. Així, els rendiments globals d'obtenció dels oligonucleòtids han estat en tots els casos superiors al 80% excepte per l'oligonucleòtid **OL3** (~55%). A la taula 1.6 es mostren els 5'-amino-oligonucleòtids sintetitzats.

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

Taula 1.6 - 5'-Amino-oligonucleòtids sintetitzats. [#]Oligonucleòtids sintetitzats pel Dr. Laurent Debéthune.

Un cop obtingut els 5'-amino-oligonucleòtids desitjats, s'ha procedit a l'incorporació de les acridines prèviament sintetitzades. L'obtenció dels conjugats s'ha realitzat tal i com es mostra a la figura 1.49.

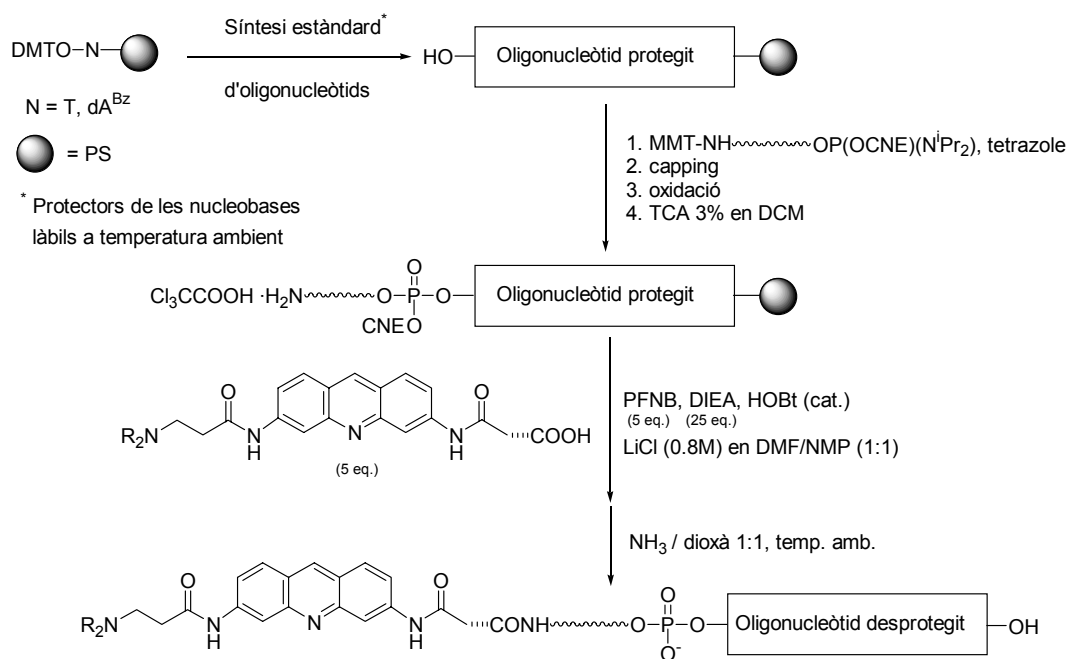


Figura 1.49 – Esquema sintètic seguit per a la síntesi dels conjugats acridina-oligonucleòtid.

Primerament, té lloc l'eliminació del grup monometoxitritil amb una dissolució de TCA al 3% en DCM. Seguidament, i després de rentar bé la resina, aquesta s'infla amb el dissolvent en el que tindrà lloc la reacció de conjugació, una dissolució 0.8 M de LiCl en DMF/NMP (1:1). Paral·lelament, s'activa l'acridina deixant-la uns 15 minuts

amb el PFNB, la DIEA i l'HOBt. La reacció té lloc durant 6 hores, després de les quals es realitza el desancoratge i la desprotecció de les nucleobases. Mitjançant aquest mètode s'han sintetitzat els conjugats que apareixen a la taula 1.7.

Conjugat	Oligonucleòtid	Acridina	(M-H) ⁻ obs.	(M-H) ⁻ calc.	t _R [*] (min.)
C1 [#]	OL1	A20	3007.44	3006.77	13.7
C2	OL2	A20	2964.64	2962.73	12.4
C3 [#]	OL3	A21	2980.10	2980.71	12.1
C4 [#]	OL3	A24	3023.77	3024.70	11.2
C5	OL3	A22	2993.18	2994.74	11.4
C6 [#]	OL4	A21	3319.97	3324.84	12.6
C7	OL5	A21	2994.81	2996.56	12.5
C8	OL6	A22	3027.48	3028.58	11.3
C9	OL6	A21	3013.28	3014.58	11.9

Taula 1.7 – Conjugats obtinguts. [#]Conjugats sintetitzats pel doctor Laurent Debéthune.

*Gradient: 5-35% B en 15 min.; A: 10 mM NH₄OAc en H₂O, B: ACN/H₂O (1:1).

Tots ells han estat purificats per cromatografia líquida de mitja pressió (MPLC) i han estat caracteritzats per MALDI-TOF i analitzada la seva puresa per HPLC (fig. 1.50).

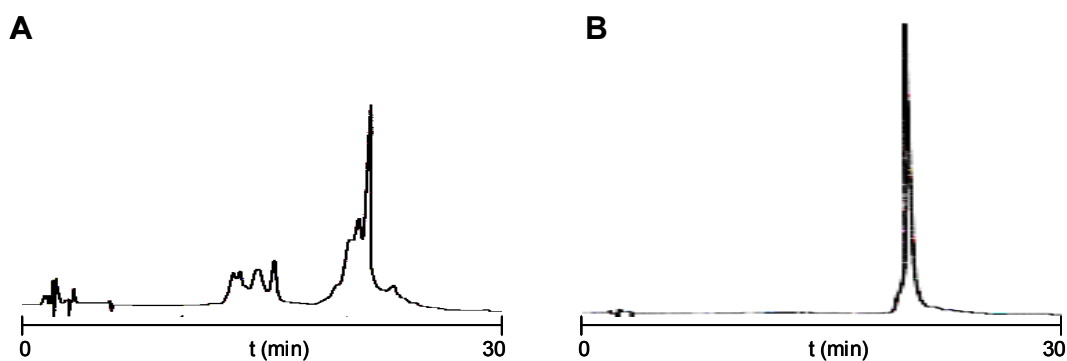


Figura 1.50 – Cromatograma del cru de síntesi del conjugat C5 (A) i del conjugat purificat (B).

Gradient: 5-35% B en 30 min.; A: 10 mM NH₄OAc en H₂O, B: ACN/H₂O (1:1).

A la figura 1.51 es mostren les estructures de tots els conjugats obtinguts mitjançant l'esquema de la figura 1.49.

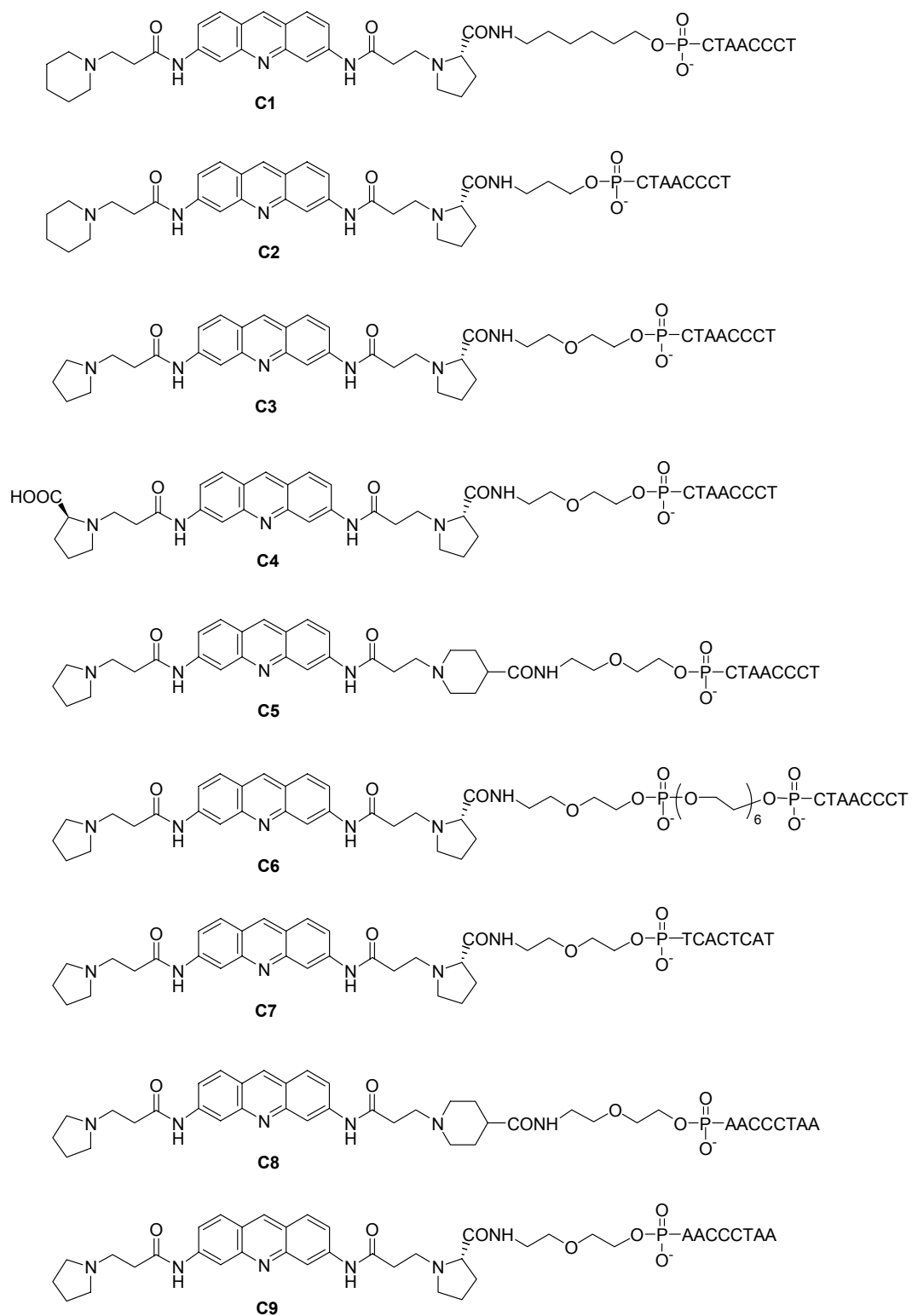


Figura 1.51 – Estructura dels conjugats obtinguts.

1.6.2.1 Consideracions per a la síntesi de conjugats en 3'

En la síntesi estàndard d'oligonucleòtids, l'elongació de la cadena es realitza en la direcció 3' → 5', ja que els reactius usats són els 3'-fosforamidits dels nucleòsids convenientment protegits. De totes maneres, és també possible sintetitzar un oligonucleòtid en la direcció contrària (5' → 3'). Això s'aconsegueix simplement amb l'ús de 5'-fosforamidits, la majoria dels quals també són comercials. En aquest cas, però, els rendiments no acostumen a ser tan bons, degut en gran part a factors estèrics.

Així doncs, havent pogut obtenir els conjugats en 5', en principi la síntesi dels conjugats en 3' no hauria de presentar més complicacions que rendiments inferiors d'acoblament dels fosforamidits i, per tant, rendiments inferiors en la síntesi dels oligonucleòtids. Ara bé, per a la síntesi dels conjugats ha calgut utilitzar fosforamidits dels nucleòsids amb les bases protegides amb grups protectors més làbils dels habituals. Aquest fet no és trivial si es vol realitzar la síntesi amb 5'-fosforamidits, ja que només són comercials els que contenen els protectors estàndard. Així, caldria sintetitzar el fosforamidit de la citosina protegida amb un grup protector làbil.

Cal tenir en ment que tot i que en els assaigs de desancoratge del conjugat s'han observat reaccions secundàries, aquestes sempre s'han observat en realitzar tractaments a 55°C. El grup benzoil de la C (protector estàndard) es pot eliminar també mitjançant tractaments prolongats a temperatura ambient. En el cas dels conjugats en 5', aquesta prova no s'ha realitzat perquè al ser comercial el fosforamidit de la C^{Ac}, s'han dut a terme les síntesis amb el fosforamidit que conté el protector làbil. Ara però, cal comprovar si els conjugats experimenten les reaccions secundàries observades durant tractaments llargs a temperatura ambient, ja que si no les experimenten, llavors la síntesi dels conjugats en 3' es podria realitzar amb els fosforamidits comercials.

S'ha dissolt una petita fracció de **C4** en una mescla NH₃/dioxà (1:1), i s'ha analitzat per HPLC. Passades 24 hores la puresa és només del 77%, mentre que abans era del 98%, cosa que posa de manifest que el conjugat en qüestió ha patit una certa degradació. Així doncs, els conjugats en 3' s'haurien d'obtenir mitjançant el mateix esquema sintètic desenvolupat pels conjugats en 5', cosa que implica l'ús, i per tant la síntesi, del derivat fosforamidit en 5' de la C^{ibu} (citosina protegida amb el grup isobutiril), ja que és el derivat que s'utilitza en les síntesis d'oligonucleòtids en la direcció 5' → 3' quan es requereix l'ús de protectors més làbils.

1.6.2.2 Quantificació dels conjugats obtinguts

Un cop obtinguda una primera família de conjugats, ha sorgit el problema de la quantificació d'aquests. La quantificació dels conjugats no només ha de servir per tal de calcular els rendiments obtinguts en les síntesis d'aquests, sinó que resulta imprescindible per tal de dur a terme els assaigs biofísics i biològics que s'expliquen en

el capítol 2 de la present memòria, ja que en aquests és necessari saber la quantitat de cadascun dels conjugats que intervé en cadascun dels assaigs.

Els oligonucleòtids es quantifiquen mitjançant l'espectroscòpia d'UV. S'enregistra l'absorbància a 260 nm d'una dissolució aquosa d'oligonucleòtid, i coneixent el volum exacte de la dissolució analitzada es pot calcular el valor de densitat òptica (OD_{260}), que és la unitat usada en la quantificació d'oligonucleòtids. Es defineix 1 OD_{260} com la quantitat d'oligonucleòtid que, continguda en 1 mL d'aigua i en una cubeta d'1 cm de pas de llum dóna una absorbància d'1. L'equivalència molar de les OD_{260} es determina a partir d'una aproximació en què es considera que l'absorció de l'oligonucleòtid en qüestió és deguda a l'efecte acumulat de l'absorció individual de cadascuna de les diferents nucleobases que el componen. En aquesta aproximació es realitza una correcció, en la qual es considera el fenomen de l'apilament que experimenten les bases en el DNA estructurat. El coeficient d'absortivitat molar d'un oligonucleòtid es calcula mitjançant la següent fórmula:

$$\epsilon_{\text{oligo}} = \sum \epsilon_{\text{base}} \cdot f_a$$

En ella, ϵ_{base} són els coeficients individuals de cada base i f_a el factor de correcció (0.9 per a oligonucleòtids de cadena única i 0.8 per a autocomplementaris o de doble cadena).

En el cas dels conjugats acridina-oligonucleòtid, però, la quantificació no és tan senzilla, ja que els derivats acridínics també absorbeixen llum ultraviolada a 260 nm. D'aquesta manera, és necessari conèixer el seu coeficient d'extinció molar. L'espectre d'UV d'una acridina presenta dos màxims (figura 1.52), un dels quals es troba a longituds d'ona menors de 280 nm i l'altre cap a 400 nm. Així doncs, s'ha decidit calcular per a 2 acridines diferents els coeficients d'extinció molar a 260 i 410 nm (ϵ_{260} i ϵ_{410}), ja que són els tradicionalment emprats en sistemes acridínics. Un cop obtinguts aquests paràmetres, llavors s'intentarà agafar un valor promig (si és que els coeficients són del mateix ordre) a partir del qual es podrà procedir a la quantificació dels conjugats

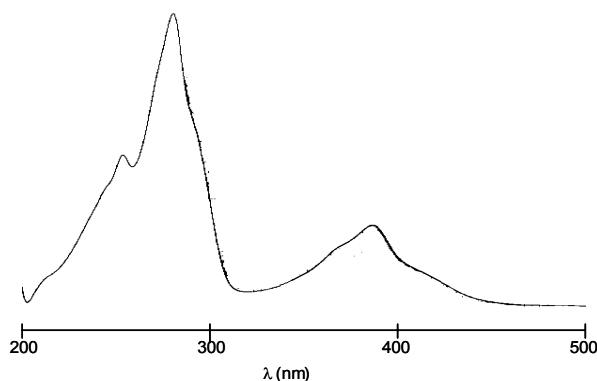


Figura 1.52 – Espectre d'UV de l'acridina 21.

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

Per tal de determinar els ϵ_{260} i ϵ_{410} s'han escollit dues de les acridines que contenen un àcid carboxílic i estan a punt per a ser conjugades (**A21** i **A22**).

L'estudi s'ha fet dissolvent les acridines en tampó NH_4OAc 10 mM, i ajustant-ne el pH a 7, ja que segurament en aquest tipus de compostos l' ϵ té una forta dependència del pH. S'ha estudiat un rang de concentracions que van de 0 a 0.2 mmol/L. El resultat ha estat una recta, el pendent de la qual correspon al coeficient d'extinció molar, segons la llei de Lambert-Beer (fig. 1.53). L'experiment s'ha realitzat per duplicat i s'ha agafat el valor mig.

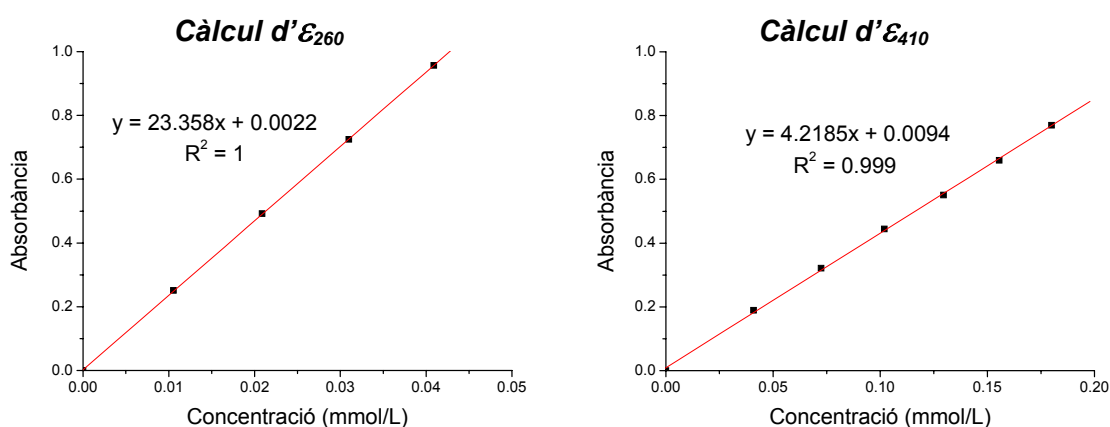


Figura 1.53 – Determinació dels coeficients d'extinció molar a 260 i 410 nm de l'acridina A21.

Acridina	ϵ_{260} ($\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)	ϵ_{410} ($\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)
A21	23404	4230
A22	19500	2409

Taula 1.8 – Valors d' ϵ_{260} i ϵ_{410} obtinguts experimentalment per a les acridines A21 i A22.

Com es pot observar a la taula 1.8, els ϵ_{410} varien força entre les dues acridines estudiades, mentre que els ϵ_{260} són d'un mateix ordre. Donat que no sabem quin efecte pot tenir sobre l' ϵ una acridina situada en l'entorn d'un oligonucleòtid, no s'ha cregut convenient fer un estudi exhaustiu de totes les acridines sintetitzades. És per això, que s'ha decidit utilitzar el valor mitjà de l' ϵ_{260} d'ambdues acridines: $21500 \text{ l}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ com a $\epsilon_{\text{acridina}}$. Un avantatge de quantificar a 260nm és que els errors provinents de la generalització feta queden en part minimitzats per l'absorció de les bases. D'altra banda, a 410 nm només absorbeixen les acridines, de manera que l'error seria molt més important. Els coeficients d'absortivitat molar així com la quantitat obtinguda de cadascun dels conjugats es mostren en la següent taula:

Conjugat	ϵ_{oligo} (OD/ μ mol)	$\epsilon_{conjugat}$ (OD/ μ mol)	OD_{260}	μ mol	Rdt.
C1	69.8	89.8	48.5	0.54	10.8%
C2	69.8	89.8	5.5	0.06	1.2%
C3	69.8	89.8	63.1	0.70	14%
C4	69.8	89.8	9.8	0.11	2.2%
C5	69.8	89.8	41.4	0.46	9.2%
C6	69.8	89.8	137	1.53	30.6%
C7	71.2	91.2	7.28	0.08	1.6%
C8	83.1	103.1	7.14	0.07	1.4%
C9	83.1	103.1	9	0.09	1.8%

Taula 1.9 – Coeficients d'absortivitat molar, quantitat obtinguda i rendiment dels conjugats sintetitzats.

Els rendiments d'obtenció dels conjugats han estat força variables. Aquests responen a diversos factors, com ara recuperacions baixes en les purificacions. Alguns són realment molt baixos (**C2**, **C4** i **C7-9**), però s'ha de tenir en compte que no han estat optimitzats. D'entre els altres, cal destacar el 30.6% obtingut en la síntesi de **C6**. Aquest conjugat és el que conté com a espaciador **LN5+LO18**, un espaciador molt més llarg que tots els altres. Així, s'ha relacionat el rendiment de la reacció de conjugació amb la distància a la que té lloc aquesta respecte a la cadena oligonucleotídica.

1.7 Bibliografia

- ¹ Rowley, P.T.; Tabler, M. **Telomerase Inhibitors**. *Anti-Cancer Research*, **2000**, *20*, 4419-30
- ² Harrison, R.J.; Gowan, S.M.; Kelland, L.R.; Neidle, S. **Human Telomerase Inhibition by Substituted Acridine Derivatives**. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, **1999**, *9*, 2463-2468
- ³ Perry, P.J.; Gowan, S.M.; Reszka, A.P.; Polucci, P.; Jenkins, T.C.; Kelland, L.R.; Neidle, S. **1,4- and 2,6-Disubstituted Amidoanthracene-9,10-dione Derivatives as Inhibitors of Human Telomerase**. *J. Med. Chem.*, **1998**, *41*, 3253-3260
- ⁴ Perry, P.J.; Reszka, A.P.; Wood, A.A.; Read, M.A.; Gowan, S.M.; Dosanjh, H.S.; Trent, J.O.; Jenkins, T.C.; Kelland, L.R.; Neidle, S. **Human Telomerase Inhibition by Regioisomeric Disubstituted Amidoanthracene-9,10-diones**. *J. Med. Chem.*, **1998**, *41*, 4873-4884
- ⁵ Perry, P.J.; Read, M.A.; Davies, R.T.; Gowan, S.M.; Reszka, A.P.; Wood, A.A.; Kelland, L.R.; Neidle, S. **2,7-Disubstituted Amidofluorenone Derivatives as Inhibitors of Human Telomerase**. *J. Med. Chem.*, **1999**, *42*, 2679-2684
- ⁶ Wainwright, M. **Acridine - a neglected antibacterial chromophore**. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **2001**, *47*, 1-13
- ⁷ Alberti, P.; Ren, J.; Teulade-Fichou, M.P.; Guittat, L.; Riou, J.F.; Chaires, J.B.; Hélène, C.; Vigneron, J.P.; Lehn, J.M.; Mergny, J.L. **Interaction of an Acridine Dimer with DNA Quadruplex Structures**. *J. Biomol. Struct. & Dynamics*, **2001**, *19*, 505-513
- ⁸ Read, M.A.; Wood, A.A.; Harrison, J.R.; Gowan, S.M.; Kelland, L.R.; Dosanjh, H.S.; Neidle, S. **Molecular Modelling Studies on G-Quadruplex Complexes of Telomerase Inhibitors: Structure-Activity Relationships**. *J. Med. Chem.*, **1999**, *42*, 4538-4546
- ⁹ Robles, J.; Beltrán, M.; Marchán, V.; Pérez, Y.; Travesset, I.; Pedroso, E.; Grandas, A. **Towards nucleopeptides containing any trifunctional amino acid**. *Tetrahedron*, **1999**, *55*, 13251-13264
- ¹⁰ Bergamin, M.; Da Ros, T.; Spalluto, G.; Boutorine, A.; Prato, M. **Synthesis of a hybrid fullerene-trimethoxyindole-oligonucleotide conjugate**. *Chem. Comm.* **2001**, 17-18
- ¹¹ Asseline, U.; Thuong, N.T. **Solid-phase synthesis of modified oligodeoxy-ribonucleotides with an acridine derivative or a thiophosphate group at their 3' end**. *Tetrahedron Lett.*, **1989**, *30*, 2521-2524
- ¹² Asseline, U.; Hau, J.F.; Czernecki, S.; Le Diguarher, T.; Perlat, M.C.; Valery, J.M.; Thuong, N.T. **Synthesis and physicochemical properties of oligonucleotides built with either α -L or β -L nucleotides units and covalently linked to an acridine derivative**. *Nucleic Acids Res.*, **1991**, *19*, 4067-4074
- ¹³ Ranasinghe, R.T.; Brown, L.J.; Brown, T. **Linear fluorescent oligonucleotide probes with an acridine quencher generate a signal upon hybridisation**. *Chem. Comm.*, **2001**, 1480-1481
- ¹⁴ Hess, S.; Götz, M.; Davis, W.B.; Michel-Beyerle, M. **On the Apparently Anomalous Distance Dependence of Charge-Transfer Rates in 9-Amino-6-chloro-2-methoxyacridine-Modified DNA**. *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 10046-10055
- ¹⁵ Bentin, T.; Nielsen, P.E. **Superior Duplex DNA Strand Invasion by Acridine Conjugated Peptide Nucleic Acids**. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6378-6379
- ¹⁶ Shiraishi, T.; Nielsen, P.E. **Down-regulation of MDM2 and activation of p53 in human cancer cells by antisense 9-aminoacridine-PNA (peptide nucleic acid) conjugates**. *Nucleic Acids Res.*, **2004**, *32*, 4893-4902
- ¹⁷ Carlson, C.B.; Beal, P.A. **Point of Attachment and Sequence of Immobilized Peptide-Acridine Conjugates Control Affinity for Nucleic Acids**. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8510-8511
- ¹⁸ Ladame, S.; Harrison, R.J.; Neidle, S.; Balasubramanian, S. **Solid-Phase Synthesis of Symmetrical 3,6-Bispeptide-Acridone Conjugates**. *Organic Lett.*, **2002**, *4*, 2509-2512

- ¹⁹ Fechter, E.J.; Dervan, P.B. **Allosteric Inhibition of Protein-DNA Complexes by Polyamide-Intercalator Conjugates.** *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 8476-8485
- ²⁰ Albert, A. **Acridine Syntheses and Reactions. Part I. Synthesis of Proflavine from m-Phenylenediamine and its Derivatives.** *J. Chem. Soc.* **1941**, 121-125
- ²¹ Robles, J. resultants no publicats.
- ²² Coste, J.; Le-Nguyen, D.; Castro, B. *Tet. Lett.*, **1990**, *31*, 205-208
- ²³ Carpino, L.A.; El-Faham, A.; Minor, C.A.; Albericio, F. *J. Chem. Soc. Comm.*, **1994**, 201-203
- ²⁴ Brain, E. G.; Doyle, F.P.; Mehta, M.D.; Miller, D.; Nayler, J.H.C.; Stove, E.R. **Derivatives of 6-Aminopenicillanic Acid. Part IV. Analogues of 2,6-Dimethoxyphenylpenicillin in the Naphthalene and Quinoline Series.** *J. Chem. Soc.*, **1963**, 491-497
- ²⁵ Wolfe, S.; Godfrey, J.C.; Holdrege, C.T.; Perron, Y.G. **Rearrangement of penicillins to anhydropenicillins.** *Can. J. Chem.*, **1968**, *46*, 2549-2559
- ²⁶ Zendequi, J.G.; Vasquez, K.M.; Tinsley, J.H.; Kessler, D.J.; Hogan, M.E. **In vivo stability and kinetics of absorption and disposition of 3' phosphopropyl amine oligonucleotides.** *Nucleic Acids Res.*, **1992**, *20*, 307-314
- ²⁷ Bardella, F.; Giralt, E.; Pedroso, E. **Polystyrene-supported synthesis by the phosphite triester approach: an alternative for the large scale synthesis of small oligodeoxyribonucleosides.** *Tetrahedron Lett.*, **1990**, *31*, 6231-6234
- ²⁸ Montserrat, F.X.; Grandas, A.; Eritja, R.; Pedroso, E. **Criteria for the economic large scale solid-phase synthesis of oligonucleotides.** *Tetrahedron*, **1994**, *50*, 2617-2622
- ²⁹ Beaucage, S.L.; Caruthers, M. **Synthetic Strategies and Parameters Involved in the Synthesis of Oligodeoxyribonucleotides According to the Phosphoramidite Method.** *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, **2000**, 3.3.1-3.3.20, John Wiley & Sons, Inc., ISBN 0-471-24662-X (2004)
- ³⁰ Marchan, V.; Rodriguez-Tanty, C.; Estrada, M.; Pedroso, E.; Grandas, A. **Alternative procedures for the synthesis of methionine-containing peptide-oligonucleotide hybrids.** *Eur. J. Org. Chem.*, **2000**, *13*, 2495-2500
- ³¹ Pudhom, K.; Vilaivan, T. **Synthesis of arylesters of protected amino acids from aryl sulfonates.** *Tet. Lett.*, **1999**, *40*, 5939-5942
- ³² Pudhom, K.; Vilaivan, T. **Pentafluorophenyl 4-Nitrobenzenesulfonate as a peptide coupling reagent.** *Synth. Comm.*, **2001**, *31*, 61-70