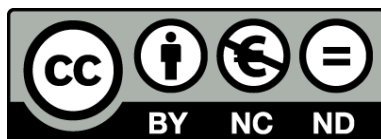




UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Síntesis, estudio biofísico y evaluación de derivados benzimidazólicos que interaccionan con RNA con potencial antiviral

Alejandro Trapote Torres



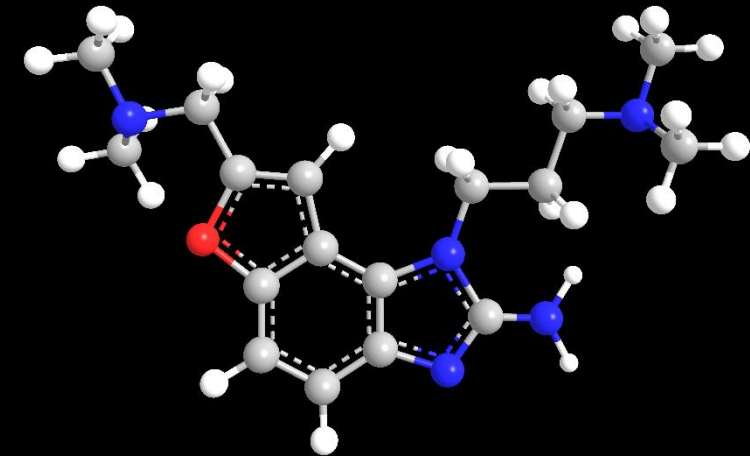
Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 3.0. Espanya de Creative Commons.**

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

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

Síntesis, estudio biofísico y evaluación de derivados benzimidazólicos que interaccionan con RNA con potencial antiviral

Alejandro Trapote Torres



2015

Alejandro Trapote Torres



B Universitat de Barcelona

Síntesis, estudio biofísico y evaluación de derivados benzimidazólicos que interaccionan con RNA con potencial antiviral

Memoria presentada por:

Alejandro Trapote Torres

Dirigida y revisada por:

Dr. Jordi Robles i Brau

Facultad de Química de la Universidad de Barcelona
Departamento de Química Orgánica

Departamento de Química Orgánica
Programa de Doctorado en Química Orgánica
Universidad de Barcelona, Septiembre 2015

Agradecimientos

En primer lloc voldria agrair al meu director de tesi, Jordi, tota l'ajuda i el suport rebuts durant aquest temps. Jordi, ha estat un privilegi poder dur a terme aquest projecte sota la teva direcció, no només per tot el que he après, sinó també pel tracte que m'has dispensat, ets una persona excepcional. M'agradaria fer extensiu aquest agraïment a l'Enrique, per haver-me donat la possibilitat d'iniciar aquest projecte. A tu Enrique, també voldria agrair-te totes les idees i consells aportats que han acabat duent aquesta tesi a bon port. Tampoc no em vull oblidar de la resta de membres del grup. Anna, Núria i Vicente, he estat molt a gust al grup i sempre que he necessitat la vostra ajuda o consell he pogut comptar amb ell, gràcies!

Me gustaría agradecer también a los miembros del grupo de la Prof.^a Encarnación Martínez Salas su inestimable colaboración en este proyecto. Los experimentos de *footprinting* e inhibición que escapan de mi área de conocimiento han supuesto un valor añadido a este trabajo.

Voldria donar les gràcies també a totes les persones que s'han barallat amb la química i m'han donat un cop de mà amb la tesi. Voldria destacar la feina feta per la Carla Tomás durant el seu TFM, que no només ha contribuït a aquesta tesi, sinó que ha obert portes de cara al futur. Carla, va ser un plaer poder guiar-te en aquells primers dies al laboratori. També vull agrair a tots els alumnes interns, de TFG i de beca de col·laboració, els esforços realitzats per tirar aquesta tesi endavant. En especial voldria destacar la feina feta pel Samuel Núñez i la Marta Broto.

Tampoc no em vull oblidar de tots els companys de laboratori i de departament que m'han acompanyat al llarg d'aquests anys: Paula, Samuel, Flavia, Ari, Albert S., Giovanna, Kapil, Carlos S., Jordi A., Jorge, Albert G., Ivanna, Erik, Joana, Aleix, Albert C., Juan Ma,.... Voldria recordar-me dels meus companys a l'arribar al lab 53: Carlos, Marta, Roger i Javi. Guardo un magnífic record d'aquells dies al laboratori i dels sopars que encara de tant en tant organitzem. En especial me gustaría agradecer a Javi toda la ayuda y los consejos recibidos en aquellos primeros meses, no podría haber encontrado un mejor compañero. També voldria agrair al Roger la capacitat d'animar sempre l'ambient tant al lab com fora d'ell.

Vull agrair també a l'Ana Claudio les seves notes amb dibuixos simpàtics; a l'Àlex G., per la seva inventiva fent bromes obligant-me a canviar la contrasenya del pc; a l'Anna S. i la Marta F., "las malotas", va ser divertit poder "xinxar-vos"; al Tomeu, per tenir sempre casa teva oberta per tothom, fins i tot a Bèlgica; a l'Omar, perquè el lab i les cerveses dels divendres no van ser el mateix sense tu; a Clément, por estar siempre pendiente de buscarme *business*; a la Miriam, per la paciència que

arribes a tenir amb mi; i al Xavi S. “perezoso”, per fer-me companyia aquests mesos d’escriptura i pels teus massatges. M’agradaria tenir una menció especial pel Xavi i l’Eli, dos companys de promoció a qui he tingut la possibilitat de conèixer personalment durant la realització del màster i el doctorat. Heu estat uns companys de viatge en aquesta etapa immillorables. Xavi, gràcies per tots els bons moments compartits: sopars, el simposi de Madrid, la cursa per la Vila Olímpica,...etc. Eli, moltes gràcies per ser sempre allà, en els bons i en els mals moments. En tu he trobat molt més que una companya: una amiga. Una amiga que espero poder conservar durant molt de temps. Per últim, voldria agrair a la Natàlia per tots i cadascun dels moments que hem compartit junts, per aguantar-me cada dia i per ser com ets. Moltes gràcies!

M’agradaria agrair també al sector QF (Fran, Vela, Sergi “Heavy”, Anna Palacios, Alba, Maria, Laura i Núria), per tots els dinars compartits jugant a cartes que han amenitzat aquests anys, i pels carnestoltes amb moments inoblidables. Tampoc no em vull oblidar del Pau, amb qui he compartit dinars els darrers temps. En especial voldria recordar-me de l’Oriol, un amic amb qui he compartit fatigues des de 3er d’ESO. Tot i que no pertany a aquest grup però el vaig conèixer a través de l’Oriol, també voldria agrair al Dani Sánchez el seu particular sentit del humor.

Recordant l’institut, voldria donar les gràcies al meu professor de química, Jaume Borrell. Ell va aconseguir transmetre’m la seva passió per la química i, per tant, és en part responsable de que hagi arribat fins aquí.

Fuera del ambiente universitario me gustaría agradecer a Miriam y Fabio su compañía en las duras tardes en clase de alemán. Danke schön! También me gustaría agradecer a Dani todos los fines compartidos, y sobre todo por los ánimos recibidos en los malos momentos. Espero poder estar ahí cuando te haga falta a ti.

Finalmente, me gustaría dar las gracias a mi familia por darme la oportunidad de llegar hasta aquí. Nunca imaginé llegar tan lejos, y sin vuestro apoyo y comprensión hubiera sido imposible. ¡Muchas gracias!

Índice

Introducción

I.1 El RNA como diana terapéutica	3
I.2 IRES: Un mecanismo de traducción alternativo	6
I.3 Fiebre aftosa	8
I.3.1 Enfermedad y tratamiento	8
I.3.2 Estructura del genoma y del IRES de FDMV	9
I.4 Hepatitis C	11
I.4.1 Enfermedad y tratamiento	11
I.4.2 Estructura del genoma y del IRES de HCV	12
I.4.3 Inhibición de HCV IRES	15
I.4.4 Estudios estructurales del subdominio IIa de HCV IRES	18
I.5 Objetivos	21
Bibliografía	25

Capítulo 1 Síntesis de una familia de derivados de benzimidazol

1.1 Introducción: Actividad farmacológica de los derivados de benzimidazol	33
1.2 Síntesis de una familia de derivados de benzimidazol: Obtención de Isis-11 y de sus análogos aquirales	37
1.2.1 Síntesis de Isis-11	37
1.2.2 Síntesis de los análogos IRAB basados en la estructura de Isis-11	43
1.2.2.1 Síntesis de IRAB-1	44
1.2.2.2 Síntesis de IRAB-2	49
1.2.2.3 Síntesis de IRAB-3	51
Bibliografía	54

Capítulo 2 Evaluación de los ligandos mediante ensayos biofísicos y experimentos de *footprinting* e inhibición

2.1 Ensayos biofísicos sobre segmentos de los IRES de FMDV y HCV	60
2.1.1 Planteamiento inicial y elección de las dianas	60
2.1.2 Evaluación de la interacción RNA-ligando mediante experimentos de fusión	62
2.1.2.1 Diseño experimental de las curvas de fusión	64
2.1.2.2 Resultados con los segmentos SL3a y CRL del IRES de FMDV	65
2.1.3 Estudio de la interacción RNA-ligando mediante ensayos por dicroísmo circular	67
2.1.3.1 Diseño experimental de los ensayos de dicroísmo circular	68
2.1.3.2 Resultados con el segmento SL3a del IRES de FMDV	68
2.1.4 Determinación de la afinidad ligando-RNA mediante valoraciones por fluorescencia	70
2.1.4.1 Precedentes en el estudio de la interacción de ligandos sobre el subdominio IIa del IRES de HCV	71
2.1.4.2 Ensayos por fluorescencia intrínseca	73
2.1.4.2.1 Diseño de los experimentos de titulación por fluorescencia intrínseca	73
2.1.4.2.2 Resultados con los segmentos SL3a y CRL del IRES de FMDV	74
2.1.4.3 Valoraciones con RNAs fluorescentes que incorporan 2-aminopurina	75
2.1.4.3.1 Elección de la posición de marcaje	76
2.1.4.3.2 Diseño de los experimentos de valoración con 2-aminopurina	77
2.1.4.3.3 Resultados con el segmento SLIIa/AP54 del IRES de HCV	78
2.1.4.3.4 Resultados con los segmentos del IRES de FMDV	80
2.1.5 Caracterización de la interacción RNA-ligando mediante calorimetría de valoración isotérmica (ITC)	82
2.1.5.1 Diseño de los ensayos de ITC	85

2.1.5.2 Resultados con el segmento SL3a del IRES de FMDV	85
2.1.5.3 Resultados con el segmento SLIIa del IRES de HCV	87
2.1.6 Estudio de la estequiometría de complejos RNA-ligando mediante espectrometría de masas	88
2.1.6.1 Experimento para establecer la estequiometría del complejo SL3a - IRAB-1	89
2.2 Experimentos de sondeo químico sobre el IRES de FMDV	91
2.2.1 Análisis SHAPE	91
2.2.2 Sondeo mediante radical hidroxilo (<i>Hydroxyl Radical Footprinting</i>)	94
2.3 Evaluación de la capacidad inhibitoria de la traducción mediada por IRES y de la actividad antiviral	96
2.3.1 Ensayos de inhibición de la traducción in vitro	96
2.3.1.1 Inhibición in vitro de FMDV IRES	97
2.3.1.2 Inhibición in vitro de HCV IRES	98
2.3.2 Ensayos de inhibición in vivo de FMDV	99
2.3.2.1 Inhibición de la replicación viral	99
2.3.2.2 <i>Western blot</i>	100
Bibliografía	102
Conclusiones	107
Parte Experimental	
Materiales y métodos	
1. Disolventes y reactivos	113
2. Instrumentación general	114
3. Disoluciones tampón	115
3.1 Tampón de acetato de trietilamonio (TEAA) 2 M pH 7,0	115
3.2 Tampón de cacodilato sódico 10 mM	116
4. Técnicas cromatográficas	116

4.1 Cromatografía en capa fina (CCF)	116
4.2 Cromatografía en columna	117
4.3 Cromatografía líquida de alta presión (HPLC)	117
4.4 Cromatografía líquida de media presión (MPLC)	117
5. Síntesis de oligonucleótidos en fase sólida	118
6. Cuantificación de oligonucleótidos	119
7. Caracterización por espectrometría de masas de los oligonucleótidos	120

Capítulo 1

1. Preparación de Isis-11	121
1.1 Síntesis de 2-alil-1,3-difluorobenceno (1)	121
1.2 Síntesis de 3-(2,6-difluorofenil)propan-1,2-diol (2)	121
1.3 Síntesis de pivaloato de 3-(2,6-difluorofenil)-2-hidroxipropilo (3)	122
1.4 Síntesis de pivaloato de 2-acetoxi-3-(2,6-difluorofenil)propilo (4)	123
1.5 Síntesis de pivaloato de 2-acetoxi-3-(2,6-difluoro-3-nitrofenil)propilo (5)	124
1.6 Síntesis de pivaloato de 2-acetoxi-3-(2-(3- <i>N,N</i> -dimetilamino-1-propilamino)-6-fluoro-3-nitrofenil)propilo (6)	124
1.7 Síntesis de 4-(3- <i>N,N</i> -dimetilaminopropil)-5-nitro-2-pivaloiloximetil-2,3-dihidrobenzo(b)furano (7)	125
1.8 Síntesis de 2-benzamido-1-(3- <i>N,N</i> -dimetilaminopropil)-7-pivaloiloximetil-7,8-dihidrofuro[2,3- <i>g</i>]benzimidazol (8)	126
1.9 Síntesis de 2-amino-1-(3- <i>N,N</i> -dimetilaminopropil)-7-hidroximetil-7,8-dihidrofuro[2,3- <i>g</i>]benzimidazol (9)	127
1.10 Síntesis de 2-amino-1-(3- <i>N,N</i> -dimetilaminopropil)-7-mesiloximetil-7,8-dihidrofuro[2,3- <i>g</i>]benzimidazol (10)	128
1.11 Síntesis de 2-amino-7- <i>N,N</i> -dimetilaminometil-1-(3- <i>N,N</i> -dimetilaminopropil)-7,8-dihidrofuro[2,3- <i>g</i>]benzimidazol (Isis-11, 11)	128
2. Obtención de la familia de análogos IRAB	129
2.1 Síntesis de 2-cloro-6-hidroxibenzaldehído (12)	129
2.2 Síntesis de 4-clorobenzo(b)furan-2-carboxilato de metilo (13)	130

2.3 Síntesis de 4-cloro- <i>N,N</i> -dimetilbenzo(b)furan-2-carboxamida (14)	130
2.4 Síntesis de 4-cloro- <i>N,N</i> -dimetil-5-nitrobenzo(b)furan-2-carboxamida (15)	131
2.5 Síntesis de 4-(3- <i>N,N</i> -dimetilamino-1-propilamino)- <i>N,N</i> -dimetil-5-nitrobenzo(b)furan-2-carboxamida (16)	132
2.6 Síntesis de 2-amino- <i>N,N</i> -dimetil-1-(3- <i>N,N</i> -dimetilaminopropil)-furo[2,3- <i>g</i>]benzimidazol-7-carboxamida (17)	133
2.7 Síntesis de 2-amino-7- <i>N,N</i> -dimetilaminometil-1-(3- <i>N,N</i> -dimetilaminopropil)-furo[2,3- <i>g</i>]benzimidazol (IRAB-1, 18)	133
2.8 Síntesis de 4-cloro- <i>N</i> -(3- <i>N,N</i> -dimetilaminopropil)benzo(b)furan-2-carboxamida (19)	134
2.9 Síntesis de 4-cloro- <i>N</i> -(3,3-dimetilaminopropil)-5-nitrobenzo(b)furan-2-carboxamida (20)	135
2.10 Síntesis de <i>N</i> -(3,3-dimetilaminopropil)-4-metilamino-5-nitrobenzo(b)furan-2-carboxamida (21)	136
2.11 Síntesis de 2-amino- <i>N</i> -(3- <i>N,N</i> -dimetilaminopropil)-1-metil-furo[2,3- <i>g</i>]benzimidazol-7-carboxamida (22)	137
2.12 Síntesis de 2-amino-7- <i>N</i> -(3- <i>N,N</i> -dimetilaminopropil)aminometil-1-metil-furo[2,3- <i>g</i>]benzimidazol (IRAB-2, 23)	138
2.13 Síntesis de <i>N</i> -(3- <i>N,N</i> -dimetilaminopropil)-1-metil-furo[2,3- <i>g</i>]benzimidazol-7-carboxamida (24)	139
2.14 Síntesis de 7- <i>N</i> -(3- <i>N,N</i> -dimetilaminopropil)aminometil-1-metil-furo[2,3- <i>g</i>]benzimidazol (IRAB-3, 25)	140
3. Determinación espectrofotométrica del pK_a de los ligandos	141
3.1 Preparación de las disoluciones	141
3.2 Registro de los espectros	142
3.3 Análisis de los datos	142
Capítulo 2	
1. Síntesis y caracterización de los oligonucleótidos	143
2. Curvas de fusión	144
2.1 Preparación de las muestras	144

2.2 Experimentos de fusión	144
2.3 Análisis de los experimentos de fusión	145
3. Experimentos de DC	146
3.1 Preparación de las muestras	146
3.2 Ensayos de adición de 1 y 5 eq de ligando sobre la diana SL3a	146
3.3 Valoraciones por DC	147
4. Valoraciones por fluorescencia	147
4.1 Experimentos de fluorescencia intrínseca	147
4.1.1 Preparación de las muestras	147
4.1.2 Determinación de λ_{exc} y λ_{em} de Isis-11 e IRAB-1	147
4.1.3 Experimentos de titulación por fluorescencia intrínseca	148
4.2 Valoraciones sobre RNAs fluorescentes que incorporan 2-aminopurina	149
4.2.1 Preparación de la muestra	149
4.2.2 Experimentos de valoración	150
4.2.3 Análisis de las valoraciones	150
4.2.3.1 Diana SLIIa (HCV IRES)	150
4.2.3.2 Dianas SL3a/AP167, SL3a/AP180 y CRL/AP239 (FMDV IRES)	150
4.3 Determinación de la selectividad	151
4.3.1 Preparación de las muestras	151
4.3.2 Experimento y análisis de los datos	151
5. Valoraciones por ITC	151
5.1 Preparación de las muestras	151
5.2 Experimento	152
5.3 Análisis del experimento	153
6. Determinación de la estequiometría por espectrometría de masas	153
6.1 Preparación de la muestra	153

6.2 Realización y análisis del experimento	154
Bibliografía	155
Anexo	
1. Ciclo de síntesis en fase sólida de los oligoribonucleótidos	159
2. Determinación espectrofotométrica del pK_a de los ligandos	160
3. Inhibición in vitro de FMDV IRES con IRAB-2	161
Abreviaturas, acrónimos y símbolos	165

Introducción

Introducción

I.1 El RNA como diana terapéutica

En los últimos años, el RNA ha despertado un gran interés como diana terapéutica debido a la gran variedad de funciones que lleva a cabo en los procesos celulares. Desde 1958, en que Francis Crick estableció el “dogma central”, por el que se describía que la información genética fluía del DNA a las proteínas pasando a través del RNA¹, diversos hallazgos han ido demostrando que el rol del RNA no es tan pasivo. La percepción comenzó a cambiar con el descubrimiento a comienzos de la década de los 80 de los primeros RNAs catalíticos, las ribozimas, implicadas en la catálisis de procesos de autofragmentación y empalme del propio RNA (*cleavage* y *splicing*)². Ya en los 90, se descubrieron los microRNAs (miRNA) y los RNAs pequeños de interferencia (siRNA), capaces de regular la expresión génica mediante mecanismos muy diversos³. Recientemente, se han descubierto los llamados riboconmutadores o *riboswitches*, dominios presentes en los extremos no codificantes de ciertos mRNAs capaces de autoregular la función génica variando la estructura, a modo de sensores de cationes o metabolitos específicos⁴.

Actualmente, por tanto, se reconoce el papel fundamental del RNA en la regulación de la transcripción, la traducción y la catálisis, funciones que se creían exclusivas de las proteínas. A consecuencia de ello, se ha incrementado el interés en el diseño de moléculas con capacidad para unirse selectivamente a dianas de RNA con potencial terapéutico. A diferencia del DNA, el RNA presenta una estructura tridimensional muy diversa, más propia de las proteínas, a causa de los plegamientos ocasionados por segmentos más o menos extensos de bases desapareadas, que originan concavidades y motivos susceptibles de poder ser lugares de unión para moléculas pequeñas⁵⁻⁸. A pesar de ello, el número de ligandos de RNA que han sido validados sigue siendo escaso, en comparación a los existentes para el DNA y las proteínas. A continuación, se destacan algunos de los ejemplos descritos en la bibliografía.

El ejemplo paradigmático de diana terapéutica de RNA es sin duda alguna el ribosoma. El ribosoma bacteriano además de ser el centro de la síntesis proteica⁷ es probablemente la diana de RNA más estudiada, habiendo sido validada para un gran número de compuestos antibacterianos. Los antibióticos naturales de tipo

aminoglicosídicos basados en 2-desoxiestreptamina (2-DOS), como la paromomicina o la neomicina (**Fig. I.1**), fueron los primeros compuestos con actividad ligada a la interacción con el RNA ribosomal bacteriano. Los estudios por cristalografía de rayos X realizados para determinar la estructura del ribosoma⁹⁻¹¹ permitieron también corroborar que los aminoglicósidos actúan uniéndose al lugar A (A-site) de la subunidad 16S del RNA ribosomal, interfiriendo en el mecanismo de control de la traducción que acaba desencadenando la generación de proteínas truncadas o erróneas¹²⁻¹⁴. El modelo estructural detallado de la interacción aminoglicósido-ribosoma ha sido extremadamente útil para desarrollar un gran número de análogos e isómeros de los aminoglicósidos basados en 2-DOS, así como también otros antibióticos que se unen al ribosoma como los macrólidos y las oxazolidinonas^{15,16}.

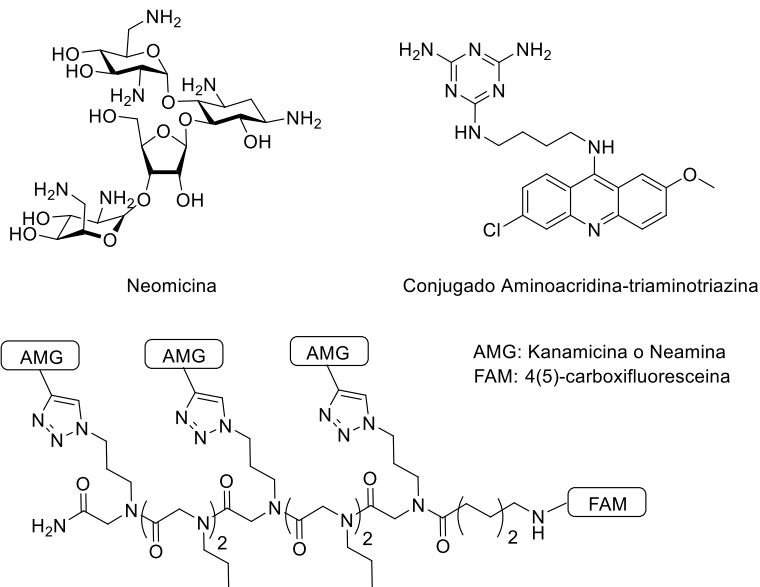


Fig. I.1 Diversos compuestos con actividad biológica que actúan como ligandos de RNA.

Las enfermedades asociadas a la expansión de repeticiones de trinucleótidos (TRED, del inglés *triplet repeated expansion diseases*), que incluyen entre otras las distrofias miotónicas de tipo 1 y 2 (DM1 y DM2), el síndrome X Frágil y la enfermedad de Huntington, también ofrecen estructuras secundarias de RNA candidatas a ser utilizadas como diana terapéutica. Por ejemplo, la DM1 está relacionada con la repetición múltiple del triplete CTG. Tras la transcripción, el RNA resultante incorpora copias repetitivas del triplete CUG, que tienden a

estructurarse en forma de horquilla con bucles internos, a los que se une con gran afinidad la proteína MBNL1, una proteína reguladora del empalme alternativo de mRNA (*alternative splicing*)^{7,17}. El secuestro de MBNL1, por unión a los bucles, ha demostrado ser el origen común de las patologías porque desencadena la desregulación del *alternative splicing*^{7,11}. Como estrategia terapéutica, se han diseñado diversos compuestos que actúan como ligandos del RNA y liberan la proteína. Entre ellos, destacan los conjugados aminoacridina-triaminotriazina (**Fig. I.1**), en que se combina la capacidad intercalante de la primera con las propiedades de base Janus de la segunda¹⁸, o los peptoides conjugados con ligandos de surco o los aminoglicósidos neamina y kanamicina (**Fig. I.1**)^{19,20}. También ha sido muy útil la aplicación de la química combinatoria dinámica para la obtención de quimiotecas, como por ejemplo, dímeros peptídicos²¹ con los que inhibir la formación del complejo RNA-MBNL1.

Los RNAs virales también han despertado un gran interés como potenciales dianas. Sin duda alguna, el caso que ha suscitado mayor atención, debido a las devastadoras consecuencias sobre la salud, ha sido el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Su mecanismo de replicación ha sido extensamente estudiado, identificando entre otras posibles dianas los RNA a los que se unen dos de las principales proteínas reguladoras del virus, Tat y Rev^{5,7}. Tat es una proteína encargada de facilitar la transcripción del RNA, que a diferencia de los activadores de la transcripción habituales, se une con mayor afinidad al RNA que al DNA. Tat reconoce una estructura tipo horquilla (*hairpin*) en el inicio del RNA a transcribir que recibe el nombre de TAR (*Trans-Activating Response element*). Dado el papel primordial de la proteína Tat, se puede conseguir detener la transcripción viral si se inhibe la formación del complejo Tat-RNA. Con este objetivo, se han ensayado diversos compuestos que actúan de ligandos del RNA TAR, como por ejemplo, aminoglicósidos²² o los llamados aminoácidos poliamida (PAA o *polyamide amino acids*)²³, formados por unidades de 2-aminoetilglicina derivatizadas con α -aminoácidos (similares a los ácidos nucleicos peptídicos o PNAs), que consiguen inhibiciones en el rango micromolar. Por otro lado, Rev es la proteína encargada de transportar el RNA desde el núcleo de la célula huésped al citoplasma, mediante la unión de Rev a una zona del RNA llamada RRE (*Rev Response Element*), que se caracteriza por adoptar estructuras tallo-lazo (*stem-loop*). Como en el caso de TAR, se ensayaron diversos compuestos que, actuando como ligandos del RNA RRE, inhiben la formación de los complejos Rev-RRE. Destacan aquí diversos

aminoglicósidos, con los que se consiguen valores de K_d (afinidad) e IC_{50} (inhibición) muy bajos, en los rangos micro- y submicromolar²⁴.

Entre las nuevas dianas de RNA viral que despiertan interés se hallan los llamados Sitios Internos de Entrada al Ribosoma o IRES (del inglés *Internal Ribosome Entry Site*). Se caracterizan por ser segmentos de RNA con una compleja y variada estructura que se hallan habitualmente en el extremo 5' no codificante de algunos RNAs virales y también en determinados mRNAs de eucariotas, que habilitan un mecanismo de traducción alternativo independiente de caperuza 5' (*cap*). A pesar de la gran diversidad entre ellos, en tamaño, estructura y mecanismo, suele observarse una elevada conservación secuencial, de ahí, la posibilidad de contemplarlos como potenciales dianas terapéuticas²⁵⁻²⁸.

I.2 IRES: Un mecanismo de traducción alternativo

Debido a que ningún virus codifica su propio ribosoma, éstos dependen de los elementos de la maquinaria de traducción propia de la célula huésped. Por ello, la mayoría de virus han desarrollado mecanismos de traducción alternativos adaptados a sus características. En primer lugar, la traducción dependiente de *cap* produce normalmente una única proteína a partir de un mRNA, mientras que un mismo RNA viral debe sintetizar diversas proteínas para poder completar el ciclo de replicación del virus. Por otro lado, la elevada compactación de los RNAs virales obliga al solapamiento de secuencias para conseguir la codificación de diversas proteínas por un mismo RNA. Por último, cabe mencionar también que la mayoría de RNAs virales no presentan la capacidad de incorporar un *cap* en el extremo 5' o la cola poliadenilada²⁹.

Probablemente por ello, los IRES constituyen el mecanismo de determinados virus para iniciar la traducción de sus genes, ya que así consiguen esquivar las limitaciones de la traducción eucariota dependiente de *cap*. Para ello, los IRES son segmentos de RNA capaces de iniciar la traducción al unirse directamente al ribosoma, sin el concurso de muchos de los factores de iniciación necesarios en la traducción dependiente de *cap* (eIFs). Se encuentran habitualmente en la zona 5' no codificante de los RNAs virales, aunque también hay ejemplos de IRES presentes entre dos marcos abiertos de lectura (ORF, del inglés *Open Reading Frame*), o incluso insertados en el propio ORF³⁰. La función de los IRES fue revelada en 1988 al conocerse el mecanismo de traducción de dos picornavirus, el poliovirus y el virus

de la encefalomiocarditis (EMCV)³¹⁻³³. Tras este hallazgo, se fueron descubriendo estructuras IRES en diversos RNAs virales e incluso en mRNAs de eucariotas, observándose diferencias tanto en las secuencias como en los mecanismos. Son RNAs compuestos habitualmente por entre 200 y 500 nucleótidos, con una gran variabilidad, incluso entre IRES de distintas cepas de un mismo virus. Sin embargo, esta enorme variabilidad contrasta con la gran conservación de determinados motivos estructurales, entre cepas e incluso entre diferentes virus, concretamente, los responsables de la correcta estructuración y función del IRES. La estructura de un IRES suele estar compuesta por diversos módulos o dominios, cada uno de los cuáles tiene su rol en la traducción. Los mecanismos de los IRES elucidados hasta la fecha difieren notablemente, pero pueden clasificarse según el número de factores que necesitan para dar inicio a la traducción³³.

Hasta la fecha, se han descrito en la bibliografía más de un centenar de IRES, esencialmente en virus pero también se localizan en eucariotas³¹. Los mRNAs eucariotas que presentan IRES ponen de manifiesto que los mecanismos de traducción alternativos no son exclusivos de virus. Nuevamente, el origen de ello puede ser el gran número de factores que requiere el mecanismo de traducción canónico. Se explica que en determinadas situaciones de estrés celular, la traducción dependiente de *cap* se vea altamente comprometida, por lo que se precisen mecanismos de traducción alternativos, como el mediado por IRES, para mantener la homeostasis^{30,34}.

Como se verá, los objetivos de la presente Tesis giran en torno del diseño y del consiguiente estudio de nuevas moléculas capaces de inhibir selectivamente la traducción dependiente de IRES, en concreto, en el virus de la hepatitis C (HCV) y en el de la fiebre aftosa (FMDV, del inglés *Foot and Mouth Disease Virus*). Por ello, resulta oportuno tratar a continuación con más detalle la información disponible de estos dos tipos de virus y de sus respectivos IRES.

I.3 Fiebre aftosa

I.3.1 Enfermedad y tratamiento

La fiebre aftosa es una enfermedad altamente contagiosa que afecta al ganado ungulado (bovino, porcino y ovino). Se manifiesta por la aparición de fiebre alta y aftas o vesículas en la boca y las patas, de ahí, su nombre. Se suele contagiar por contacto directo con los animales afectados, habitualmente por vía respiratoria, o también de manera indirecta a través de humanos, fómites o aerosoles³⁵. A pesar de que la tasa de mortalidad de la enfermedad es baja, la aparición de un brote provoca la disminución de productividad del ganado. Unido esto al bloqueo comercial de los países afectados y al sacrificio de un gran número de animales para evitar la expansión de la enfermedad, acaba causando graves pérdidas económicas a nivel mundial³⁶.

Actualmente, no existen compuestos aprobados por la FDA para el tratamiento o la prevención del virus de la fiebre aftosa. El único control efectivo consiste en el sacrificio de los animales expuestos, aunque también se puede recurrir a la vacunación con el virus químicamente inactivado. No obstante, la vacunación presenta limitaciones debido a que únicamente protege contra uno o en el mejor de los casos algunos pocos de los 60 subtipos del virus³⁷ y además, no es efectiva hasta pasados 7 días tras la administración³⁵. Por este motivo, es preciso hallar alternativas que permitan un tratamiento más amplio de la enfermedad, cubriendo el mayor número de casos posibles. Como en muchos otros virus, la solución habitual ha sido la de ensayar diferentes clases de inhibidores de proteasas y polimerasas^{37,38}, pero también se han explorado las posibilidades de las terapias antigénicas utilizando péptidos^{39,40}. Otras son las estrategias que utilizan el RNA viral como diana, como los oligonucleótidos sentido y antisentido, o el empleo de siRNAs^{35,41,42}, que tienen como diana la secuencia del IRES.

I.3.2 Estructura del genoma y del IRES de FDMV

El genoma de FMDV (**Fig. I.2**), virus perteneciente a la familia de los picornavirus y del género *Aphthovirus*, está compuesto por una cadena de 8500 nucleótidos de polaridad positiva, con un único marco abierto de lectura (ORF) que codifica una poliproteína, flanqueada por dos zonas no codificantes altamente estructuradas, con elementos implicados en la replicación. En el extremo 5', formado por 1200 nucleótidos, se encuentra unida covalentemente la proteína VPg. Siguiendo hacia al extremo 3', se suceden una estructura tallo-lazo de alrededor de 400 nucleótidos (elemento S), un tramo poliribocitidina (pC), un segmento estructurado en forma de pseudonudos (Pk) y, precediendo al segmento codificante (ORF), el IRES de 462 nucleótidos. Tras el ORF, el extremo 3' consta de un segmento de 90 nucleótidos altamente estructurado esencial para la replicación viral y una cadena larga de poliadeninas A(n)^{36,43,44}.

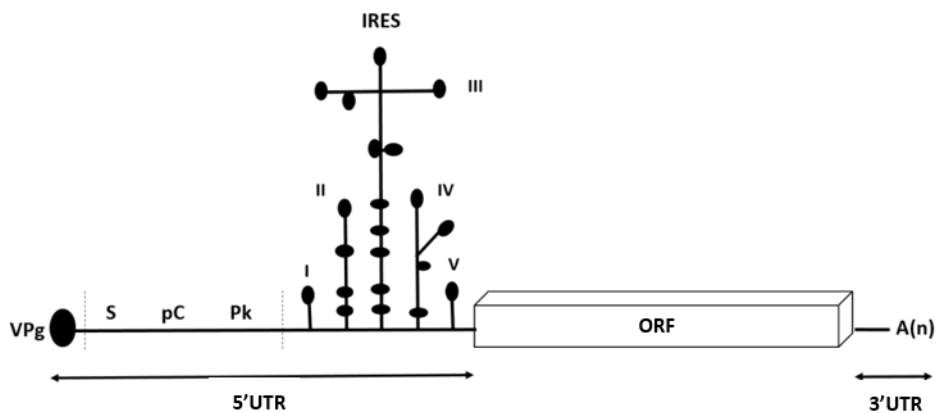


Fig. I.2 Esquema del genoma del virus de fiebre aftosa.

El IRES de FMDV consta de 462 nucleótidos distribuidos en cinco dominios, cada uno de los cuáles presenta una función diferente⁴⁵⁻⁴⁷, adoptando una estructura terciaria compleja que es imprescindible para la actividad⁴⁸. Todo parece indicar que la correcta estructuración del IRES reside en el dominio III, situado en la parte central del IRES y formado por 210 nucleótidos⁴⁹.

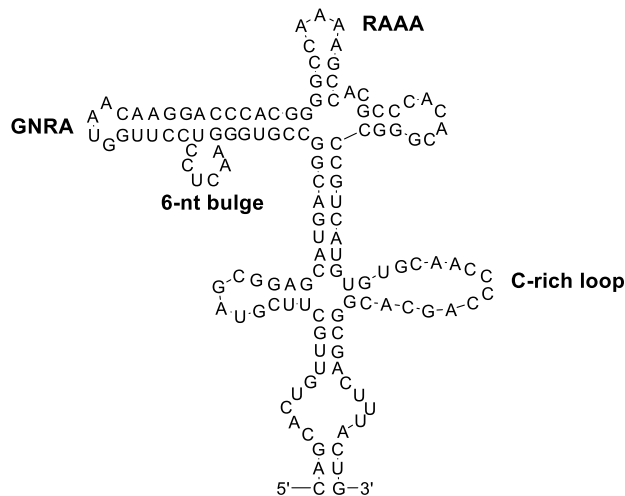


Fig. I.3 Estructura secundaria de la zona apical del dominio III del IRES de FMDV.

La zona apical del dominio III (**Fig. I.3**) presenta una estructura secundaria cruciforme, que se pliega adoptando una estructura terciaria por interacción entre el bucle tetranucleotídico o *tetra loop* GNRA, con nucleobases desapareadas de un bucle rico en C (**Fig. I.3, C-rich loop**) en el lado opuesto del dominio, según se ha podido demostrar en experimentos de sondeo⁵⁰ y por simulación de dinámica molecular^{51,52}. La interacción terciaria resultante, que se cree fundamental para la correcta estructuración del dominio y para la consiguiente actividad del IRES^{50,52}, requiere de la conservación de la estructura secundaria de cada uno de los dominios. Prueba de ello, a pesar de la elevada variabilidad secuencial entre cepas, los motivos GNRA y RAAA se hallan altamente conservados^{50,52}. Las mutaciones en esas posiciones reducen drásticamente la actividad del IRES, hasta la práctica inhibición⁴⁵. Además, las pruebas de sondeo químico tipo SHAPE (*Selective Hydroxyl Acylation analyzed by Primer Extension*) y por fragmentación radicalaria de hidroxilo (*hydroxyl radical footprinting*), que se han llevado a cabo para diferenciar la estructura secundaria originadas por las mutaciones, confirman la hipótesis que la conservación de determinados motivos es imprescindible para la correcta estructura y función del IRES de FMDV⁴⁵. También, los experimentos SHAPE han puesto de manifiesto que la correcta estructuración del IRES depende de la concentración de Mg²⁺. Así mismo, se identificó una protuberancia (*bulge*) de seis nucleótidos contenida en la zona apical del dominio III, que sin bien acepta la sustitución de algunos nucleótidos, no admite deleciones ni inserciones⁵³.

Como se discutirá más adelante, cabe destacar la similitud de la estructura de esta protuberancia con la de cinco nucleótidos presente en el subdominio IIa del HCV IRES y que es el lugar de unión de los aminobenzimidazoles con actividad anti-HCV⁵⁴.

I.4 Hepatitis C

I.4.1 Enfermedad y tratamiento

El virus de hepatitis C, perteneciente a la familia de los flavivirus del género *Hepacivirus*, es el causante de una de las principales enfermedades infecciosas en humanos a nivel mundial (pandemia), con alrededor de 170 millones de afectados crónicos. En un porcentaje significativo de los casos, la infección se acaba agravando, provocando otras enfermedades como cirrosis o cáncer hepático. El resultado final es la muerte de 350.000 personas al año por hepatitis C y patologías derivadas de ésta^{55,56}.

La transmisión en hepatitis C se produce por contacto sanguíneo entre una persona sana y una contagiada⁵⁵. Por ello, la principal vía de contagio es entre consumidores de droga que comparten aguja, aunque existen otras causas como la deficiente esterilización del material médico o las transfusiones sin control previo. También existen otros casos de transmisión menos frecuentes, como las de madre a hijo y las debidas a relaciones sexuales.

El tratamiento más habitual de la hepatitis C consiste en la administración del antiviral ribavirina (**Fig. I.4**), un nucleósido sintético, en combinación con α -interferón pegilado⁵⁷⁻⁵⁹. Los interferones son glicoproteínas producidas por el sistema inmunológico para combatir agentes patógenos, que interfieren en el proceso de replicación viral. No obstante, el tratamiento es eficiente únicamente en el 50% de los casos, es costoso económicamente y provoca frecuentes efectos secundarios⁶⁰. Por ello, se precisa desarrollar nuevas vías para el tratamiento de la enfermedad. De hecho, el ciclo de vida de hepatitis C ofrece un gran número de potenciales dianas terapéuticas. Entre las más investigadas, se encuentran la polimerasa NS5B y la proteasa NS3-4A^{59,61,62}, para las cuales se han desarrollado diversos inhibidores. Los inhibidores de NS3-4A se pueden dividir en compuestos heterocíclicos como bis(benzimidazoles)⁶³ y peptidomiméticos, como el Telaprevir (**Fig. I.4**) y Boceprevir^{64,65}, que incorporan una unidad de α -cetoamida. Este último

ha sido aprobado para tratar HCV-I, en combinación con la terapia de ribavirina y α -interferón.

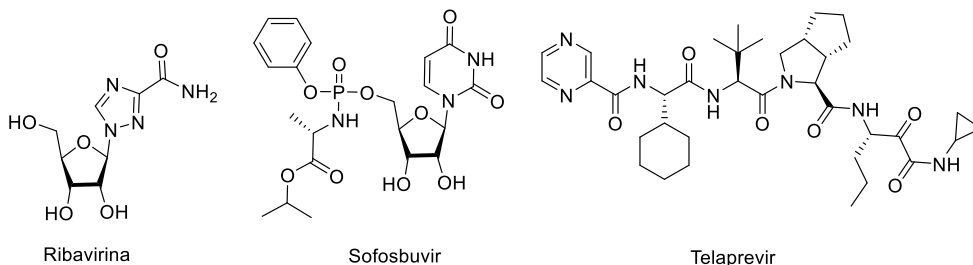


Fig. I.4 Fármacos aprobados contra HCV.

Contra la polimerasa NS5B existe también un amplio abanico de inhibidores, los cuales se pueden clasificar en compuestos no nucleosídicos, la mayoría de ellos heterocíclicos^{66–68}, y nucleosídicos, entre los que destaca el Sofosbuvir^{69,70} (conocido también como Sovaldi **Fig. I.4**), aprobado recientemente y que muestra una mayor eficacia que algunos de los tratamientos habituales.

En la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas, recientemente, también se ha explorado la vía de interferir en la función del IRES del RNA de HCV.

1.4.2 Estructura del genoma y del IRES de HCV

El genoma de HCV (**Fig. I.5**) consiste en una monocadena de RNA de polaridad positiva formada por aproximadamente 9600 nucleótidos. Desde su descubrimiento en 1989, se han identificado seis genotipos principales distintos, que a su vez, se dividen en múltiples subtipos⁵⁵.

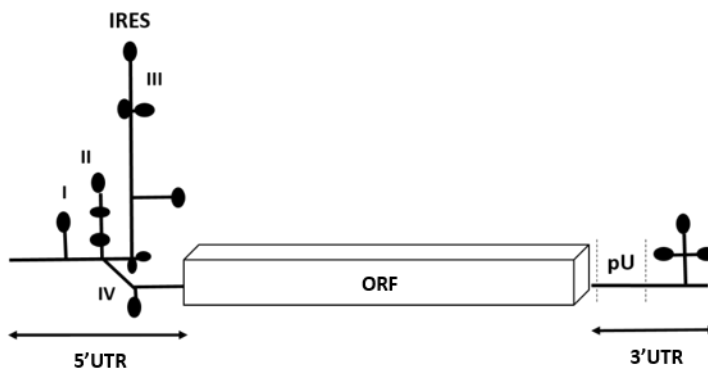


Fig. I.5 Esquema del genoma del virus de hepatitis C (HCV).

El genoma de HCV, como el de FMDV, se puede dividir en tres partes, a saber, las regiones no codificantes en los extremos 5' y 3', que contienen estructuras altamente conservadas y esenciales para la traducción y la replicación, y un marco abierto de lectura (ORF) que codifica una poliproteína que tras ser procesada da lugar a diez proteínas maduras⁷¹.

El extremo 5' no codificante consta de 341 nucleótidos divididos en cuatro dominios (I-IV) altamente estructurados, entre los que se encuentra el IRES. Éste está formado por los dominios II-IV y los primeros 24-40 nucleótidos de la región codificante. El dominio I no se requiere en la traducción mediada por IRES, pero su extremo 3' interviene en la replicación viral. El extremo 3' está constituido por tres partes, una segmento de 40 bases de secuencia variable, seguido de un sector poliuridina (pU), y finalmente, un fragmento de 98 nucleótidos altamente conservado entre los diversos genotipos del virus⁷¹.

De los diferentes dominios que forman la secuencia de HCV IRES, los dominios II y III constituyen la mayor parte de la estructura. El dominio III, el mayor en dimensiones, está formado por estructuras ramificadas tallo-lazo organizadas en cruces (*junctions*) de tres y cuatro brazos. Esta región de estructura tan compleja es el lugar de unión de la subunidad 40S del ribosoma y de algunos factores de iniciación^{27,72,73}. Mutaciones puntuales del dominio III en zonas clave para la estructuración producen una disminución de la actividad viral como probable resultado de las alteraciones en la estructura del IRES^{74,75}. Las construcciones aisladas del dominio III son capaces de unirse a la subunidad 40S con prácticamente la misma afinidad que la estructura nativa del IRES, pero no habilitan el proceso de traducción. Por lo tanto, se requiere de las interacciones adicionales que generan los dominios II y IV para que se produzca la traducción dependiente de IRES⁷⁴. Además, el dominio II juega un papel clave en el proceso de traducción, ya que al unirse al ribosoma induce en éste una reestructuración conformacional que permite el correcto posicionamiento del RNA viral en el sitio de descodificación ribosomal^{76,77}.

Se ha demostrado que el papel del dominio II depende de la estructura de un bucle interno de cinco nucleótidos situado en el subdominio IIa (**Fig. I.6**), que le otorga una conformación plegada en un ángulo de aproximadamente 90° entre los dos segmentos de doble cadena de los subdominios IIa y IIb (**Fig. I.7**).

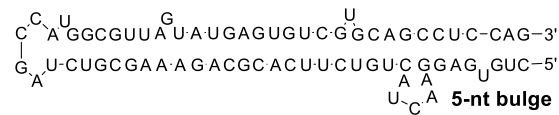


Fig. I.6 Estructura secundaria del dominio II del IRES de hepatitis C.

El ángulo del codo presenta cierta flexibilidad para permitir el acomodo del RNA viral al ribosoma para iniciar la traducción⁷⁸. Quizá por ello, la secuencia del subdominio Ila se encuentra altamente conservada (>98% en la mayoría de los nucleótidos entre 1600 muestras del virus), hecho que da idea del papel relevante que este subdominio juega en la correcta función del IRES⁷⁹. Se ha demostrado que la correcta estructuración del subdominio Ila y otras zonas correspondientes al dominio III, como en el caso de FMDV IRES, depende de la presencia de cationes divalentes como el Mg(II)⁸⁰⁻⁸².

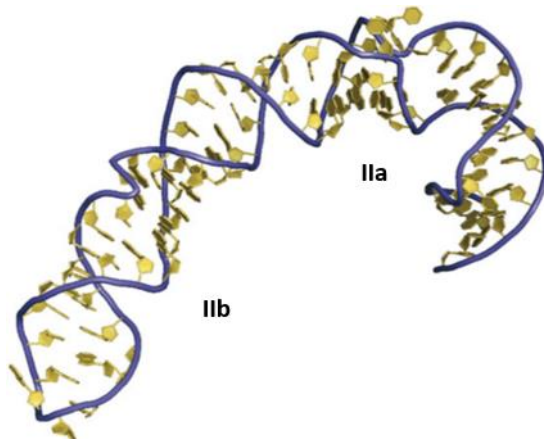


Fig. I.7 Estructura obtenida por RMN del dominio II del IRES de HCV (figura extraída de Lukavsky *et al.*²⁷).

La relevancia del IRES para la traducción viral, que se deduce de la necesaria conservación estructural y secuencial para su correcta función, induce a pensar que el IRES es una diana potencialmente válida para lograr la inhibición de HCV. Con esta hipótesis, se han descrito diversos tipos de moléculas capaces de actuar como inhibidores de IRES, o alternativamente, que tienen como diana los factores de iniciación que intervienen⁸³.

I.4.3 Inhibición de HCV IRES

Una de las primeras estrategias que se ensayaron para conseguir moléculas capaces de unirse al RNA del IRES de HCV e interferir así en su función fue la terapia antisentido⁸⁴, empleando diversos oligonucleótidos modificados y análogos, como LNAs, PNAs y oligómeros basados en morfolina⁸⁵⁻⁸⁹. Los mejores resultados se obtuvieron con aquellos oligómeros que tenían el subdominio IIIId y el dominio IV como diana, obteniéndose valores micromolares de IC₅₀ y que fueron evaluados en fase clínica I^{84,86}. Además de la terapia antisentido, también se ensayaron aptámeros⁹⁰, siRNAs y ribozimas⁸³.

Otras macromoléculas investigadas contra HCV IRES son algunos péptidos, aunque con un número de compuestos ensayados muy inferior y también, con éxito mucho menor. Un ejemplo es el péptido LaR2C, compuesto por una secuencia de 24 aminoácidos que mimetiza el extremo C-terminal de la proteína La, una proteína que interviene en el proceso de traducción uniéndose al dominio IV del IRES⁹¹. También, se ha descrito un metalopéptido (**Fig. I.8.a**) capaz de unirse al subdominio IIb y producir la fragmentación del RNA mediada por Cu(II)⁹².

Otra de las estrategias ensayadas es la que pretende inhibir la traducción mediada por IRES de manera indirecta. En lugar de emplear el IRES como diana, se emplean fragmentos de la secuencia IRES destinados a secuestrar las proteínas implicadas en la traducción. Los mejores resultados se han obtenido con un RNA del dominio III, con el que se consigue la inhibición selectiva del mecanismo dependiente de IRES frente al mediado por *cap*⁹³.

Además de macromoléculas, se han diseñado muy diversos tipos de moléculas pequeñas para ser dirigidas contra el IRES de HCV, destacando sobre todo aquellas que tienen como blanco la protuberancia de cinco nucleótidos del subdominio IIa. Estos compuestos han sido descubiertos mayoritariamente mediante cribados masivos de miles de moléculas pequeñas, evaluando los efectos sobre la traducción in vitro^{94,95} o simplemente seleccionando los de mayor afinidad por la diana^{54,96}.

Los cribados basados en la inhibición in vitro de la traducción se realizaron con RNAs bicistrónicos^{97,98} que codifican dos genes que se traducen mediante mecanismos diferentes. En este caso, la traducción de uno de los genes es dirigida por *cap*, mientras que en el otro es mediada por IRES, lo que permite determinar si

la inhibición es selectiva de un mecanismo respecto al otro. Los cribados efectuados mediante esta estrategia permitieron hallar dos tipos de compuestos diferentes, ambos con capacidades inhibitorias en el rango micromolar y que producen inhibición selectiva de la traducción mediada por IRES. En uno de los estudios, se hallaron fenazinas aminosustituídas (**Fig. 1.8.b**)⁹⁵; mientras que en otro ejemplo fueron compuestos basados en biarilguanidinas⁹⁴ (**Fig. 1.8.c**). No obstante, en ninguno de estos estudios se pudo elucidar un mecanismo concreto que explicase los efectos de las moléculas seleccionadas.

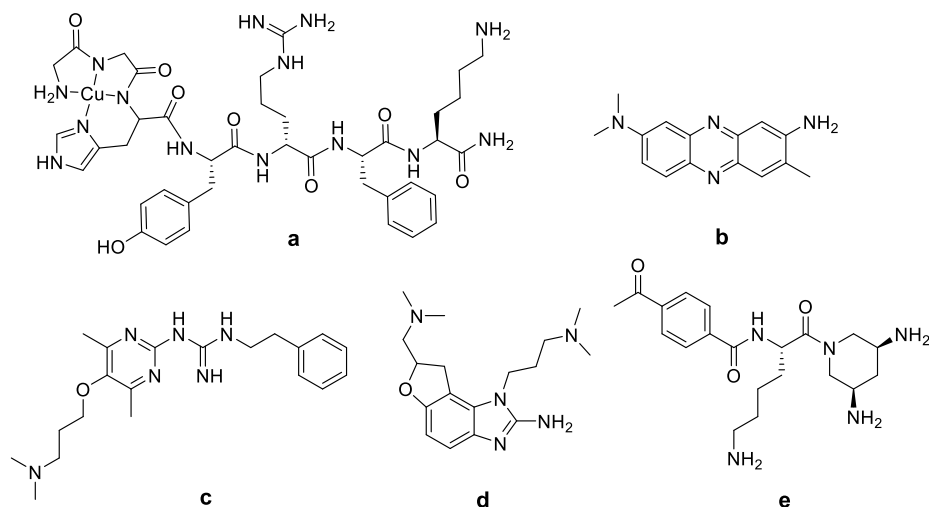


Fig. 1.8 Estructuras de algunos compuestos que inhiben la traducción mediada por IRES en HCV.

En el segundo grupo de experimentos, se llevaron a cabo cribados en los que el criterio de selección es la afinidad de los compuestos por un determinado segmento de la secuencia del IRES. La diana más estudiada corresponde al segmento del subdominio IIa aunque también se ha ensayado un modelo del subdominio IIIId⁹⁶ por ser la zona de unión al ribosoma. La elección del subdominio IIa como diana preferente se debe al papel clave que juega en la traducción, ya que experimenta un cambio conformacional cuando interacciona con el ribosoma, y por tener una secuencia muy conservada entre las diversas cepas del virus. La realización de un cribado masivo de moléculas por espectrometría de masas sobre un modelo de diana del subdominio IIa permitió la selección de un 2-aminobenzimidazol, que a pesar de mostrar una afinidad modesta (100 μ M), era potencialmente optimizable por modificación química. Partiendo pues de la

estructura básica de 2-aminobenzimidazol, se prepararon diversas moléculas con diverso grado de modificación y se emprendió un estudio de estructura-actividad, en el que nuevamente el criterio de selección fue la mejora de la afinidad por la diana de RNA. La optimización así realizada condujo a una familia de compuestos, entre ellos el llamado Isis-11 (**Fig. I.8.d**), que conseguían mostrar afinidades por el subdominio IIa en el rango micromolar bajo (véase capítulo 1, apartado 1.1). La inhibición de la replicación de HCV también fue ensayada, mostrando que los nuevos compuestos eran activos en el rango micromolar bajo, y además presentaban muy baja toxicidad en células humanas. Se realizó también un experimento de sondeo enzimático (RNA *footprinting*) mediante RNAsa sobre la diana de RNA en ausencia y presencia de uno de los aminobenzimidazoles. El resultado corroboró que la protuberancia o bucle interno presente en la estructura del dominio IIa era el lugar de unión preferido para este tipo de moléculas⁵⁴. Basados en estos resultados, se desarrollaron otras moléculas basadas en la estructura de 2-aminobenzimidazol, introduciendo sustituyentes aromáticos⁹⁹ o bien, sustituyendo el anillo de benzimidazol por el de benzoxazol¹⁰⁰, aunque en ninguno de ellos las afinidades mejoraron con respecto a los del estudio pionero. Además de derivados basados en benzimidazol, también se ensayaron compuestos basados en 3,5-diaminopiperidina (DAP)¹⁰¹ (**Fig. I.8.e**), por ser un heterociclo que mimetiza el anillo de 2-desoxiestreptamina presente en los aminoglicósidos que se unen con gran afinidad al RNA ribosomal bacteriano. En este caso, las afinidades por la diana del subdominio IIa sólo alcanzaban el rango micromolar alto.

Los estudios realizados sobre el subdominio IIa no han aportado únicamente datos de afinidad, sino que también han permitido conocer los cambios estructurales inducidos por los ligandos al unirse a la diana (véase siguiente apartado). En experimentos de titulación realizados sobre la diana de RNA marcada con 2-aminopurina como análogo fluorescente de una de las adeninas presentes en la protuberancia, se observa un incremento de la fluorescencia al añadir cantidades crecientes del ligando lo que se interpreta como que el ligando se une a la protuberancia provocando la expulsión de la 2-aminopurina hacia el exterior de la estructura^{79,82,102}. Para explicar la expulsión del residuo hacia el exterior se plantearon dos hipótesis: un cambio conformacional puntual del residuo A54 o bien la reestructuración global del *bulge*. Para evaluar cómo cambiaba la conformación del RNA al unirse los ligandos se llevó a cabo un experimento FRET empleando una diana de RNA que incorpora en los extremos dos fluoróforos que pueden acoplarse

por efecto Förster. En este caso, se observa que la adición de cantidades crecientes de ligando produce una disminución de la fluorescencia, que se explica por el distanciamiento entre los dos fluoróforos^{79,82,103}, prueba que el ligando se une produciendo un aumento del ángulo del codo sobre el que basculan los subdominios IIa y IIb. La interpretación estructural de los resultados de los experimentos de fluorescencia son coherentes con las estructuras de los complejos aminobenzimidazol-RNA que han sido elucidadas mediante RMN y difracción de rayos X¹⁰².

1.4.4 Estudios estructurales del subdominio IIa de HCV IRES

En 2003, Lukavsky y colaboradores publicaron la estructura del dominio II determinada por RMN⁷⁸. Los resultados revelaron una conformación curvada del dominio II inducida por el subdominio IIa. Éste está formado por dos segmentos de doble hélice separados por un *bulge* interno asimétrico de cinco nucleótidos (A53-A57), a modo de codo con un ángulo entre las dos hélices de aproximadamente 85°. El bucle se estructura por apilamiento de A53 sobre el par G52-C111, sigue entre A54 y C55, tiene lugar un cambio de dirección en U56, permitiendo que A57 se apile bajo el par C58-G110, estabilizado todo ello por la presencia de cationes metálicos divalentes como el Mg²⁺ o el Mn²⁺. Los espectros de RMN indican que A54, C55 y A57 interactúan con Mg²⁺. La contribución del Mg²⁺ a la estabilidad de la estructura se determinó por curvas de fusión por UV¹⁰⁴, observándose un gran incremento en la estabilidad térmica en presencia de Mg²⁺, mucho mayor que el observado al adicionar una concentración diez veces superior de K⁺.

Unos años después, en 2010, Paulsen *et al.* publicaron la estructura por RMN del subdominio IIa formando un complejo con un derivado de 2-aminobenzimidazol y la compararon con la previamente descrita para el RNA libre¹⁰². En estos experimentos, se observó que los desplazamientos de las señales del *bulge* experimentaban cambios sustanciales al registrar los espectros en presencia de una mezcla racémica de Isis-11, véase **Fig. 1.9**. Los experimentos TOCSY con diferentes concentraciones de Isis-11 permitieron además monitorizar la alteración de los entornos de los residuos implicados en el complejo y estimar un valor de la constante de afinidad ($K_d = 10 \pm 20 \mu\text{M}$). La gran variación en los desplazamientos de C55, U56, C58, C111 y C112 en comparación a los que se observan en el RNA libre indica que la estructura del bucle difiere notablemente en presencia del 2-

aminobenzimidazol. Las purinas del *bulge* (A53, A54 y A57) también registraron cambios en el desplazamiento en los picos de heterocorrelación de un experimento HSQC. La buena conectividad secuencial NOE en el RNA libre entre G52 y C55 se pierde al adicionar el ligando, en consonancia con los cambios de desplazamientos. La región imínica, que aporta información sobre el apareamiento de bases, presenta una disposición similar a la del RNA libre confirmando que el lugar de unión del 2-aminobenzimidazol es el *bulge*. Los ajustes mediante RDC (*Residual Dipolar Coupling*) mostraron que los segmentos helicoidales a ambos lados del lugar de unión del inhibidor pasan de una conformación curvada a una coaxial, alineamiento que se explica por el aumento del ángulo del *bulge*.

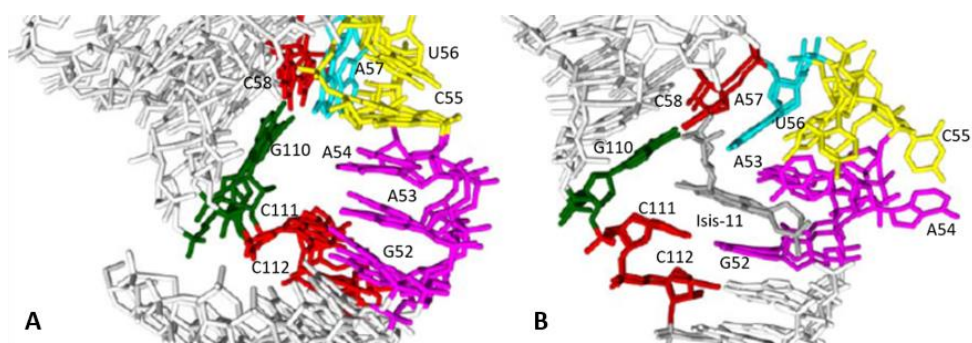


Fig. I.9 Comparativa de las estructura por RMN del *bulge* del subdominio IIa del IRES de HCV libre (A) y en presencia de Isis-11 (B) (numeración modificada respetando la correspondiente a la secuencia IRES entera), figura extraída de Paulsen *et al.*¹⁰²

Respecto a las señales del ligando, se observaron NOEs intramoleculares entre los protones alifáticos de las cadenas laterales, pero no entre ellas, lo que indica que Isis-11 adopta una conformación extendida al unirse al RNA. Se aprecian contactos extensos de la cadena lateral del anillo de furano con G51, G52 y A53. Los metilos del apéndice también mostraron señales de NOE con A54. La cadena lateral sobre la posición 1 del benzimidazol no mostró conectividad por NOE con el segmento inferior de doble hélice, pero sí de sus dos grupos metilo con C58 y U59, lo que demuestra que el grupo dimetilamino se dispone en el surco mayor, próximo a las dos pirimidinas apareadas. El anillo de benzimidazol contribuye a la unión por interacciones π de apilamiento con G52 y A53. La amina primaria y posiblemente el grupo dimetilamino sobre el furano establecen interacciones π -catiónicas con las nucleobases. Los experimentos NOE no permitieron distinguir entre ambos enantiómeros de Isis-11. Para determinar qué isómero se une preferentemente al

RNA se llevaron a cabo cálculos mediante simulación de dinámica molecular, viéndose que los dos complejos RNA-ligando tenían energías muy similares, lo que llevó a concluir que sus modos de unión también lo eran.

La estructura global del subdominio IIa también fue determinada por cristalografía de rayos X¹⁰⁴. El estudio mostró una conformación curvada con las dobles hélices que flanquean el bulge interno formando un ángulo recto, similar a la estructura observada por RMN⁷⁸. La disposición de los nucleótidos entre los pares C58-G110 y G52-C111 induce a un pliegue en forma de ángulo recto estabilizado por apilamiento, puentes de hidrógeno e interacciones con cationes metálicos. Las bases A53-C55 extienden el flanco inferior de la hélice en la curva por apilamiento continuo con el par G52-C111. A57 se orienta perpendicularmente a C55 y se apila con A58 extendiendo el extremo superior de la hélice. U56, el residuo que conecta C55 y A57, se dispone hacia el exterior del RNA, con la uridina situada frente a la ribosa de A57. Por tanto, la conformación plegada se ha observado tanto por RMN como por cristalografía de rayos X, poniéndose de manifiesto que es estable tanto en solución como en estado cristalino, en presencia de cationes metálicos divalentes. En la estructura cristalina, los cationes divalentes como el Mg²⁺ y Mn²⁺ presentan dos lugares de unión en el *bulge*. El catión Mg²⁺ interacciona con las bases A53, A54, A57 y C111 por medio de moléculas de agua.

A similitud de lo realizado por RMN, para comprobar el cambio conformacional inducido por los derivados 2-aminobenzimidazol se cocrystalizó un RNA modelo del subdominio IIa con una mezcla racémica de un análogo de Isis-11 y se determinó la estructura por difracción de rayos X⁷⁹. Como ya se había observado previamente por RMN, el complejo RNA-ligando presenta una estructura extendida, con las hélices que flanquean la protuberancia interna apiladas coaxialmente. El *bulge* interno se reordena de tal manera que pasa de una conformación curvada en el RNA libre a formar una cavidad que se adapta estrechamente al ligando y lo encapsula. El aminobenzimidazol interacciona vía puentes de hidrogeno con la cara Hoogsten de la guanina del par C58-G110, además de establecer interacciones de apilamiento con A53 y el par G52-C111, que limitan el bolsillo que se genera. Una interacción adicional por puente de hidrógeno se establece entre la cadena dimetilaminopropilo protonada y el fosfato de A109. Tampoco aquí se consiguió asignar la estereoquímica del ligando, ya que ambos enantiómeros pueden establecer las interacciones observadas en la estructura cristalina. Estos resultados

concuerdan notablemente con la estructura elucidada por RMN de Paulsen en 2010¹⁰², aunque ésta presentaba el lugar de unión más abierto, exponiendo el ligando a ambos surcos de las hélices flanqueantes. La estructura por rayos X explica las relaciones estructura-actividad que se dedujeron para los derivados benzimidazólicos estudiadas por Seth y col.⁶⁰ (véase capítulo 1, apartado 1.1). Se explica que los compuestos sin el grupo 2-amino o la cadena dimetilaminopropilo vean reducida su afinidad por el subdominio IIa, ya que estos grupos pueden establecer puentes de hidrógeno claves con el RNA. Nuevamente, la intrincada arquitectura del hueco de unión del ligando al RNA está organizada por la disposición de cationes metálicos divalentes, que se ve modificada pero no anulada por la presencia de los ligandos, lo que corrobora el papel determinante de los cationes metálicos en la estabilización de este tipo de estructuras secundarias.

I.5 Objetivos

La readecuación estructural del bucle interno en el RNA IRES de HCV por reconocimiento del ligando presenta, sin duda alguna, semejanzas con el mecanismo típico de complejación de aptámeros y *riboswitches* con sus sustratos. Así, es posible que el cambio conformacional observado en el subdominio IIa de HCV IRES tenga alguna función biológica. Siguiendo este razonamiento, Hermann y colaboradores propusieron recientemente que los derivados de 2-aminobenzimidazol que se unen al RNA IRES de HCV mimetizan en cierto modo la cadena lateral de una arginina⁸¹. La propuesta se basa en el hecho que la interacción de los aminobenzimidazoles con la cara Hoogsteen de G110 es análoga a la del grupo guanidino de arginina en numerosos complejos péptido-DNA y péptido-RNA. La hipótesis sería que la unión de una proteína en un punto cercano a la protuberancia del IRES o del ribosoma induciría el cambio conformacional del subdominio IIa, el cual pasaría de una conformación en ángulo recto a una extendida, produciendo así la separación del IRES del ribosoma y la transición de la fase de iniciación a la de elongación en el mecanismo de traducción⁷⁹.

El papel de la protuberancia de cinco nucleótidos del subdominio IIa en la estructura y función del IRES de HCV probablemente no sea un caso aislado. Entre las secuencias IRES de los enterovirus, como los poliovirus o los coxsackievirus, se conoce una protuberancia en el dominio IV, llamado *loop B* (**Fig. I.10**), que sirve

como lugar de unión para la proteína PCBP2 (*poly(rC)-binding protein 2*), encargada de habilitar la traducción mediada por IRES^{105,106}.

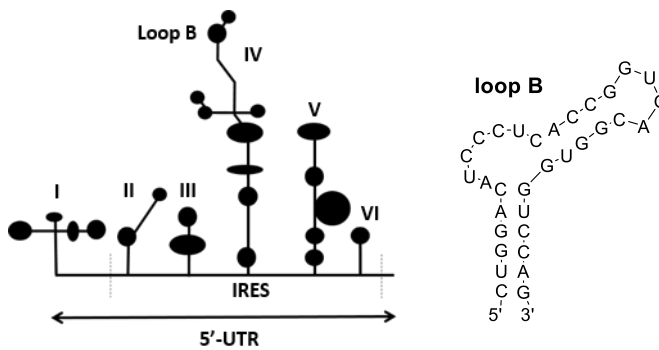


Fig. I.10 Esquema de la región 5' no traducida (5'UTR) de los poliovirus y estructura secundaria del segmento conocido como *loop B* del PV1 (cepa Mahoney)¹⁰⁶.

El análisis de las secuencias de *bulge* entre diferentes virus mostró una prevalencia de las secuencias hexanucleotídicas. Este análisis reveló que la primera posición (extremo 5') en la mayoría de los casos (>90%) es una purina, la segunda y tercera pueden ser ocupadas por cualquier nucleótido, aunque con especial tendencia por las pirimidinas en la tercera posición. Los lugares cuarto y quinto son citidinas exclusivamente, mientras que la sexta posición es ocupada por una pirimidina. Como la mitad 5' del *loop B* es la que se encuentra menos conservada, esto sugiere un rol esencialmente estructural, que organiza la estructura del *bulge* para habilitar la interacción específica de la proteína con la segunda mitad 3' rica en pirimidinas y que está altamente conservada. La estructura del *loop B* introduce un ángulo en la estructura del dominio IV, la abertura del cual depende de la secuencia. Un estudio comparativo por RMN de las secuencias de dos cepas del poliovirus tipo 1 (PV1) demostró que la flexibilidad del motivo varía notablemente con el cambio de un único nucleótido, C por U¹⁰⁵. Recientemente, Zhang et al.¹⁰⁷ sugirieron ciertas similitudes entre el IRES de HCV y un segmento de la secuencia de la telomerasa humana, la ribonucleoproteína cuya función es mantener la longitud de los telómeros y la estabilidad de los cromosomas en la mayoría de especies eucariotas. El estudio revela que la estructura global del RNA de la telomerasa humana está también dirigida por una protuberancia de cinco nucleótidos, altamente conservada entre las diferentes especies de vertebrados. Ensayadas diferentes construcciones del RNA de telomerasa, se observó que el cambio de localización o la reducción en el número de nucleósidos de la

protuberancia conllevaban una reducción importante de la actividad de la telomerasa, mientras que el alargamiento con dos citidinas adicionales la mejoraba. Cuando se modificaba la secuencia, creando protuberancias con cinco guanosinas o cinco citidinas, se provocaba un leve descenso en la actividad aunque muy inferior a los otros cambios ensayados, lo cual parece tener relación con el hecho que la secuencia consenso en diferentes vertebrados es GYYYY, donde Y corresponde a una pirimidina.

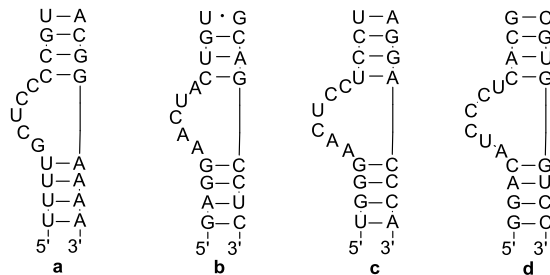


Fig. I.11 Comparativa de la estructura de las protuberancias de los RNAs de: a) Telomerasa humana, b) Subdominio IIa de HCV IRES, c) Zona apical del dominio III de FMDV IRES, d) Loop B del dominio IV del PV1 IRES (cepa Mahoney).

La protuberancia de seis nucleótidos de FMDV IRES comparte ciertas similitudes con las anteriores (**Fig. I.11**). La secuencia, AACUCC, presenta cierta semejanza con las de HCV IRES y PV1 IRES, AACUA y AUCCCU, respectivamente. Comparte con la de telomerasa el no estar altamente conservada y admitir cambios que no sean deleciones ni inserciones. Además, las zonas de los IRES donde se encuentran son similares en relevancia, ya que se demuestran imprescindibles para adoptar correctamente la conformación para su función. De la misma manera que las protuberancias juegan un papel similar en sus respectivas estructuras, existe la posibilidad que un mismo ligando sea capaz de inhibir diferentes tipos de IRES.

Estos precedentes son el origen de la presente Tesis. La hipótesis de trabajo con la que se inició fue suponer que moléculas basadas en la estructura de Isis-11, un inhibidor de la traducción mediada por el IRES de HCV, también podían producir efectos análogos sobre el IRES de fiebre aftosa. En el proyecto de tesis, se plantearon los siguientes objetivos:

i) Reproducir y mejorar la ruta sintética para la obtención de Isis-11, uno de los inhibidores descritos de la traducción mediada por IRES en hepatitis C.

ii) Diseño y síntesis de una nueva familia de derivados benzimidazol basados en la estructura de Isis-11.

iii) Estudio mediante técnicas biofísicas y de sondeo químico (*footprinting*) de la interacción de los nuevos benzimidazoles con segmentos del RNA IRES del virus de fiebre aftosa, y con el subdominio IIa del virus de hepatitis C.

iv) Evaluación in vitro de la capacidad inhibitoria de la traducción mediada por IRES en FMDV y HCV y de la actividad antiviral de los nuevos derivados de benzimidazol.

Bibliografía

- (1) Crick, F. H. C. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **1958**, *12*, 138–163.
- (2) Serganov, A.; Patel, D. J. *Nat. Rev. Genet.* **2007**, *8* (10), 776–790.
- (3) Morris, K. V.; Mattick, J. S. *Nat. Rev. Genet.* **2014**, *15* (6), 423–437.
- (4) Deigan, K. E.; Ferré-D'Amaré, A. R. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44* (12), 1329–1338.
- (5) Thomas, J. R.; Hergenrother, P. J. *Chem. Rev.*, 2008, **108**, (4), 1171–1224.
- (6) Tor, Y. *ChemBioChem* **2003**, *4* (10), 998–1007.
- (7) Guan, L.; Disney, M. D. *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7* (1), 73–86.
- (8) Aboul-ela, F. *Future Med. Chem.* **2010**, *2* (1), 93–119.
- (9) Clemons Jr, W. M.; May, J. L. C.; Wimberly, B. T.; McCutcheon, J. P.; Capel, M. S.; Ramakrishnan, V. *Nature* **1999**, *400* (6747), 833–840.
- (10) Wimberly, B. T.; Brodersen, D. E.; Clemons Jr, W. M.; Morgan-Warren, R. J.; Carter, A. P.; Vornheim, C.; Hartsch, T.; Ramakrishnan, V. *Nature* **2000**, *407* (6802), 327–339.
- (11) Poehlsgaard, J.; Douthwaite, S. *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3* (11), 870–881.
- (12) Shandrick, S.; Zhao, Q.; Han, Q.; Ayida, B. K.; Takahashi, M.; Winters, G. C.; Simonsen, K. B.; Vourloumis, D.; Hermann, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43* (24), 3177–3182.
- (13) Feldman, M. B.; Terry, D. S.; Altman, R. B.; Blanchard, S. C. *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6* (1), 54–62.
- (14) Fourmy, D.; Recht, M. I.; Puglisi, J. D. *J. Mol. Biol.* **1998**, *277* (2), 347–362.
- (15) Aoki, H.; Ke, L.; Poppe, S. M.; Poel, T. J.; Weaver, E. A.; Gadwood, R. C.; Thomas, R. C.; Shinabarger, D. L.; Ganoza, M. C. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46* (4), 1080–1085.
- (16) Douthwaite, S.; Champney, W. S. *J. Antimicrob. Chemother.* **2001**, *48* Topic T, 1–8.
- (17) Warf, M. B.; Berglund, J. A. *RNA* **2007**, *13* (12), 2238–2251.
- (18) Arambula, J. F.; Ramisetty, S. R.; Baranger, A. M.; Zimmerman, S. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106* (38), 16068–16073.
- (19) Lee, M. M.; Childs-Disney, J. L.; Pushechnikov, A.; French, J. M.; Sobczak, K.; Thornton, C. A.; Disney, M. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (47), 17464–17472.
- (20) Pushechnikov, A.; Lee, M. M.; Childs-Disney, J. L.; Sobczak, K.; French, J. M.; Thornton, C. A.; Disney, M. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (28), 9767–9779.
- (21) Gareiss, P. C.; Sobczak, K.; McNaughton, B. R.; Palde, P. B.; Thornton, C. A.; Miller, B. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (48), 16254–16261.
- (22) Mei, H. Y.; Mack, D. P.; Galan, A. A.; Halim, N. S.; Heldsinger, A.; Loo, J. A.; Moreland, D. W.; Sannes-Lowery, K. A.; Sharmeen, L.; Truong, H. N.; Czarnik, A. W. *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5* (6), 1173–1184.
- (23) Bonnard, V.; Azoulay, S.; Di Giorgio, A.; Patino, N. *Chem. Commun.* **2009**, No. 17, 2302–2304.
- (24) Luedtke, N. W.; Liu, Q.; Tor, Y. *Biochemistry* **2003**, *42* (39), 11391–11403.
- (25) Martínez-Salas, E.; Fernández-Miragall, O. *Curr. Pharm. Des.* **2004**, *10* (30), 3757–3767.
- (26) Klinck, R.; Sprules, T.; Gehring, K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *247* (3), 876–881.
- (27) Lukavsky, P. J. *Virus Res.* **2009**, *139* (2), 166–171.
- (28) Martínez-Salas, E. *Trends Microbiol.* **2008**, *16* (5), 230–237.

- (29) Firth, A. E.; Brierley, I. J. *Gen. Virol.* **2012**, *93* (7), 1385–1409.
- (30) Plank, T.-D. M.; Kieft, J. S. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **2012**, *3* (2), 195–212.
- (31) Baird, S. D.; Turcotte, M.; Korneluk, R. G.; Holcik, M. *RNA* **2006**, *12* (10), 1755–1785.
- (32) Belsham, G. J. *Virus Res.* **2009**, *139* (2), 183–192.
- (33) Kieft, J. S. *Trends Biochem. Sci.* **2008**, *33* (6), 274–283.
- (34) Martínez-Salas, E.; Piñeiro, D.; Fernández, N. *Comp. Funct. Genomics*, 2012, Article ID 391546, 12 págs, **2012**, DOI: 10.1155/2012/391546.
- (35) Vagnozzi, A.; Stein, D. A.; Iversen, P. L.; Rieder, E. *J. Virol.* **2007**, *81* (21), 11669–11680.
- (36) Sáiz, M.; Núñez, J. I.; Jimenez-Clavero, M. A.; Baranowski, E.; Sobrino, F. *Microbes Infect.* **2002**, *4* (11), 1183–1192.
- (37) Durk, R. C.; Singh, K.; Cornelison, C. A.; Rai, D. K.; Matzek, K. B.; Leslie, M. D.; Schafer, E.; Marchand, B.; Adedeji, A.; Michailidis, E.; Dorst, C. A.; Moran, J.; Pautler, C.; Rodriguez, L. L.; Mcintosh, M. A.; Rieder, E.; Sarafianos, S. G. *PLoS One* **2010**, *5* (12), e15049.
- (38) Roqué Rosell, N. R.; Mokhlesi, L.; Milton, N. E.; Sweeney, T. R.; Zunszain, P. A.; Curry, S.; Leatherbarrow, R. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24* (2), 490–494.
- (39) Villén, J.; Borràs, E.; Schaaper, W. M. M.; Meloen, R. H.; Dávila, M.; Domingo, E.; Giralt, E.; Andreu, D. *ChemBioChem* **2002**, *3* (2-3), 175–182.
- (40) Taboga, O.; Tami, C.; Carrillo, E.; Núñez, J. I.; Rodríguez, A.; Saiz, J. C.; Blanco, E.; Valero, M. L.; Roig, X.; Camarero, J. A.; Andreu, D.; Mateu, M. G.; Giralt, E.; Domingo, E.; Sobrino, F.; Palma, E. L. *J. Virol.* **1997**, *71* (4), 2606–2614.
- (41) De Los Santos, T.; Wu, Q.; De Avila Botton, S.; Grubman, M. J. *Virology* **2005**, *335* (2), 222–231.
- (42) Bigeriego, P.; Rosas, M. F.; Zamora, E.; Martínez-Salas, E.; Sobrino, F. *Antiviral Res.* **1999**, *44* (2), 133–141.
- (43) Mason, P. W.; Grubman, M. J.; Baxt, B. *Virus Res.* **2003**, *91* (1), 9–32.
- (44) Domingo, E.; Baranowski, E.; Escarmís, C.; Sobrino, F. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **2002**, *25* (5-6), 297–308.
- (45) Fernández-Miragall, O.; Martínez-Salas, E. *RNA* **2003**, *9* (11), 1333–1344.
- (46) Martínez-Salas, E.; López De Quinto, S.; Ramos, R.; Fernández-Miragall, O. *Biochimie* **2002**, *84* (8), 755–763.
- (47) Serrano, P.; Ramajo, J.; Martínez-Salas, E. *Virology* **2009**, *388* (1), 221–229.
- (48) Fernández-Miragall, O.; López De Quinto, S.; Martínez-Salas, E. *Virus Res.* **2009**, *139* (2), 172–182.
- (49) Fernández, N.; García-Sacristán, A.; Ramajo, J.; Briones, C.; Martínez-Salas, E. *Virology* **2011**, *409* (2), 251–261.
- (50) Fernández-Miragall, O.; Ramos, R.; Ramajo, J.; Martínez-Salas, E. *RNA* **2006**, *12* (2), 223–234.
- (51) Jung, S.; Schlick, T. *Biophys. J.* **2014**, *106* (2), 447–458.
- (52) Jung, S.; Schlick, T. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41* (3), 1483–1495.
- (53) Fernández, N.; Fernandez-Miragall, O.; Ramajo, J.; García-Sacristán, A.; Bellora, N.; Eyra, E.; Briones, C.; Martínez-Salas, E. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39* (19), 8572–8585.
- (54) Seth, P. P.; Miyaji, A.; Jefferson, E. A.; Sannes-Lowery, K. A.; Osgood, S. A.; Propp, S. S.; Ranken, R.; Massire, C.; Sampath, R.; Ecker, D. J.; Swayze, E. E.; Griffey, R. H. *J. Med. Chem.* **2005**, *48* (23), 7099–7102.

- (55) Zaltron, S.; Spinetti, A.; Biasi, L.; Baiguera, C.; Castelli, F. *BMC Infect. Dis.* **2012**, *12 Suppl 2* (Suppl 2), S2.
- (56) Mohd Hanafiah, K.; Groeger, J.; Flaxman, A. D.; Wiersma, S. T. *Hepatology* **2013**, *57* (4), 1333–1342.
- (57) Vezali, E.; Aghemo, A.; Colombo, M. *Expert Opin. Biol. Ther.* **2011**, *11* (3), 301–313.
- (58) Manns, M. P.; McHutchison, J. G.; Gordon, S. C.; Rustgi, V. K.; Shiffman, M.; Reindollar, R.; Goodman, Z. D.; Koury, K.; Ling, M.-H.; Albrecht, J. K. *Lancet* **2001**, *358* (9286), 958–965.
- (59) Flisiak, R.; Jaroszewicz, J.; Parfieniuk-Kowerda, A. *Expert Opin. Emerg. Drugs* **2013**, *18* (4), 461–475.
- (60) Davis, D. R.; Seth, P. P. *Antivir. Chem. Chemother.* **2011**, *21* (3), 117–128.
- (61) Neyts, J. *Antiviral Res.* **2006**, *71* (3), 363–371.
- (62) De Francesco, R.; Tomei, L.; Altamura, S.; Summa, V.; Migliaccio, G. *Antiviral Res.* **2003**, *58* (1), 1–16.
- (63) Sperandio, D.; Gangloff, A. R.; Litvak, J.; Goldsmith, R.; Hataye, J. M.; Wang, V. R.; Shelton, E. J.; Elrod, K.; Janc, J. W.; Clark, J. M.; Rice, K.; Weinheimer, S.; Yeung, K.-S.; Meanwell, N. A.; Hernandez, D.; Staab, A. J.; Venables, B. L.; Spencer, J. R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12* (21), 3129–3133.
- (64) Njoroge, F. G.; Njoroge, F. G.; Chen, K. X.; Chen, K. X.; Shih, N.-Y.; Shih, N.-Y.; Piwinski, J. J.; Piwinski, J. J. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41* (1), 50–59.
- (65) Lin, C.; Kwong, a D.; Perni, R. B. *Infect. Disord. Drug Targets* **2006**, *6* (1), 3–16.
- (66) Dhanak, D.; Duffy, K. J.; Johnston, V. K.; Lin-Goerke, J.; Darcy, M.; Shaw, A. N.; Gu, B.; Silverman, C.; Gates, A. T.; Nonnemacher, M. R.; Earnshaw, D. L.; Casper, D. J.; Kaura, A.; Baker, A.; Greenwood, C.; Gutshall, L. L.; Maley, D.; DelVecchio, A.; Macarron, R.; Hofmann, G. A.; Alnoah, Z.; Cheng, H.-Y.; Chan, G.; Khandekar, S.; Keenan, R. M.; Sarisky, R. T. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (41), 38322–38327.
- (67) Beaulieu, P. L.; Bös, M.; Bousquet, Y.; Fazal, G.; Gauthier, J.; Gillard, J.; Goulet, S.; LaPlante, S.; Poupart, M. A.; Lefebvre, S.; McKercher, G.; Pellerin, C.; Austel, V.; Kukulj, G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14* (1), 119–124.
- (68) Hirashima, S.; Suzuki, T.; Ishida, T.; Noji, S.; Yata, S.; Ando, I.; Komatsu, M.; Ikeda, S.; Hashimoto, H. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 4721–4736.
- (69) Gane, E. J.; Stedman, C. a; Hyland, R. H.; Ding, X.; Svarovskaia, E.; Symonds, W. T.; Hindes, R. G.; Berrey, M. M. *N. Engl. J. Med.* **2013**, *368* (1), 34–44.
- (70) Yang, C. Y. HEPATITIS C TREATMENTS WITH SOFOSBUVIR. WO2014/185995, **2014**.
- (71) Penin, F.; Dubuisson, J.; Rey, F. a.; Moradpour, D.; Pawlotsky, J. M. *Hepatology* **2004**, *39* (1), 5–19.
- (72) Gallego, J.; Varani, G. *Biochem. Soc. Trans.* **2002**, *30* (2), 140–145.
- (73) Fraser, C. S.; Doudna, J. A. *Nat. Rev. Microbiol.* **2007**, *5* (1), 29–38.
- (74) Kieft, J. S.; Zhou, K.; Jubin, R.; Doudna, J. A. *RNA* **2001**, *7* (2), 194–206.
- (75) Barría, M. I.; González, A.; Vera-Otarola, J.; León, U.; Vollrath, V.; Marsac, D.; Monasterio, O.; Pérez-Acle, T.; Soza, A.; López-Lastra, M. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37* (3), 957–971.
- (76) Spahn, C. M. T.; Kieft, J. S.; Grassucci, R. A.; Penczek, P. A.; Zhou, K.; Doudna, J. A.; Frank, J. *Science* **2001**, *291* (5510), 1959–1962.
- (77) Fraser, C. S.; Hershey, J. W. B.; Doudna, J. A. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2009**, *16* (4), 397–404.

- (78) Lukavsky, P. J.; Kim, I.; Otto, G. A.; Puglisi, J. D. *Nat. Struct. Biol.* **2003**, *10* (12), 1033–1038.
- (79) Dibrov, S. M.; Ding, K.; Brunn, N. D.; Parker, M. A.; Bergdahl, B. M.; Wyles, D. L.; Hermann, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109* (14), 5223–5228.
- (80) Vos, S.; Berrisford, D. J.; Avis, J. M. *Biochemistry* **2002**, *41* (17), 5383–5396.
- (81) Boerneke, M. A.; Dibrov, S. M.; Gu, J.; Wyles, D. L.; Hermann, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111* (45), 15952–15957.
- (82) Parsons, J.; Castaldi, M. P.; Dutta, S.; Dibrov, S. M.; Wyles, D. L.; Hermann, T. *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5* (11), 823–825.
- (83) Dibrov, S. M.; Parsons, J.; Carnevali, M.; Zhou, S.; Ryneerson, K. D.; Ding, K.; Garcia Segá, E.; Brunn, N. D.; Boerneke, M. A.; Castaldi, M. P.; Hermann, T. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (5), 1694–1707.
- (84) Hanecak, R.; Brown-Driver, V.; Fox, M. C.; Azad, R. F.; Furusako, S.; Nozaki, C.; Ford, C.; Sasmor, H.; Anderson, K. P. *J. Virol.* **1996**, *70* (8), 5203–5212.
- (85) Tallet-Lopez, B.; Aldaz-Carroll, L.; Chabas, S.; Dausse, E.; Staedel, C.; Toulme, J. J. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31* (2), 734–742.
- (86) Georgopapadakou, N. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2010**, *19* (1), 1–21.
- (87) Nulf, C. J.; Corey, D. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32* (13), 3792–3798.
- (88) McCaffrey, A. P.; Meuse, L.; Karimi, M.; Contag, C. H.; Kay, M. a. *Hepatology* **2003**, *38* (2), 503–508.
- (89) Alotte, C.; Martin, A.; Caldarelli, S. A.; Di Giorgio, A.; Condom, R.; Zoulim, F.; Durantel, D.; Hantz, O. *Antiviral Res.* **2008**, *80* (3), 280–287.
- (90) Kikuchi, K.; Umehara, T.; Fukuda, K.; Kuno, A.; Hasegawa, T.; Nishikawa, S. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33* (2), 683–692.
- (91) Pudi, R.; Ramamurthy, S. S.; Das, S. J. *J. Virol.* **2005**, *79* (15), 9842–9853.
- (92) Bradford, S.; Cowan, J. A. *Chem. Commun.* **2012**, *48* (25), 3118–3120.
- (93) Ray, P. S.; Das, S. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32* (5), 1678–1687.
- (94) Jefferson, E. a.; Seth, P. P.; Robinson, D. E.; Winter, D. K.; Miyaji, A.; Osgood, S. a.; Swayze, E. E.; Risen, L. M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14* (20), 5139–5143.
- (95) Wang, W.; Préville, P.; Morin, N.; Mounir, S.; Cai, W.; Siddiqui, M. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10* (11), 1151–1154.
- (96) Baugh, C.; Wang, S.; Li, B.; Appleman, J. R.; Thompson, P. A. *J. Biomol. Screen.* **2009**, *14* (3), 219–229.
- (97) Mountford, P. S.; Smith, A. G. *Trends Genet.* **1995**, *11* (5), 179–184.
- (98) López De Quinto, S.; Martínez-Salas, E. *Gene* **1998**, *217* (1), 51–56.
- (99) Ding, K.; Wang, A.; Boerneke, M. a.; Dibrov, S. M.; Hermann, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24* (14), 3113–3117.
- (100) Ryneerson, K. D.; Charrette, B.; Gabriel, C.; Moreno, J.; Boerneke, M. A.; Dibrov, S. M.; Hermann, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24* (15), 3521–3525.
- (101) Carnevali, M.; Parsons, J.; Wyles, D. L.; Hermann, T. *ChemBioChem* **2010**, *11* (10), 1364–1367.
- (102) Paulsen, R. B.; Seth, P. P.; Swayze, E. E.; Griffey, R. H.; Skalicky, J. J.; Cheatham, T. E.; Davis, D. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107* (16), 7263–7268.
- (103) Zhou, S.; Ryneerson, K. D.; Ding, K.; Brunn, N. D.; Hermann, T. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21* (20), 6139–6144.

- (104) Dibrov, S. M.; Johnston-Cox, H.; Weng, Y. H.; Hermann, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46* (1-2), 226–229.
- (105) Du, Z.; Ulyanov, N. B.; Yu, J.; Andino, R.; James, T. L. *Biochemistry* **2004**, *43* (19), 5757–5771.
- (106) Bailey, J. M.; Tapprich, W. E. *J. Virol.* **2007**, *81* (2), 650–668.
- (107) Zhang, Q.; Kim, N.-K.; Peterson, R. D.; Wang, Z.; Feigon, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107* (44), 18761–18768.

Capítulo 1

Capítulo 1: Síntesis de una familia de derivados de benzimidazol

1.1 Introducción: Actividad farmacológica de los derivados de benzimidazol

Como se mencionó, el presente proyecto se centra en el estudio de derivados de benzimidazol que muestran potencial antiviral debido a la interacción con RNA. Estructuralmente, el benzimidazol puede considerarse un isómero del indol y la purina¹ (**Fig. 1.1**), presentes en la estructura de proteínas y ácidos nucleicos. A su vez, los benzimidazoles son compuestos potencialmente activos debido a la enorme capacidad para interactuar con biomoléculas, tanto por puentes de hidrógeno como por intercalación.

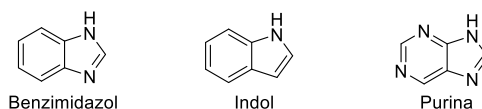


Fig. 1.1 Benzimidazol, isómero de indol y purina.

El anillo de benzimidazol cobró importancia en la década de los 50 al comprobarse que el 5,6-dimetil-1-(α -D-ribofuranosil)benzimidazol formaba parte de la estructura de la vitamina B₁₂. En los inicios de los 60 aparecieron los primeros fungicidas para plantas y antihelmínticos de uso veterinario basados en el esqueleto de benzimidazol. El primero para su uso en humanos, el tiabendazol², se desarrolló y aprobó en 1962. Desde entonces y hasta día de hoy, la batería de benzimidazoles, tanto de origen natural como sintético, se ha ampliado enormemente, a la vez que se abría el abanico de sus aplicaciones terapéuticas. Actualmente, el número de fármacos aprobados que derivan de benzimidazol es muy extenso y con muy diversas funciones (**Fig. 1.2**).

Además de los fármacos ya aprobados, cabe mencionar la existencia de muchas otras sustancias derivadas de benzimidazol identificadas como *leads* con una amplia variedad de terapias¹⁻³, contra VIH^{4,5} y Alzheimer^{6,7}, anticancerígena⁸, antioxidante⁹, antiinflamatoria y analgésica¹⁰, antidiabética¹¹, y así, un largo etcétera.

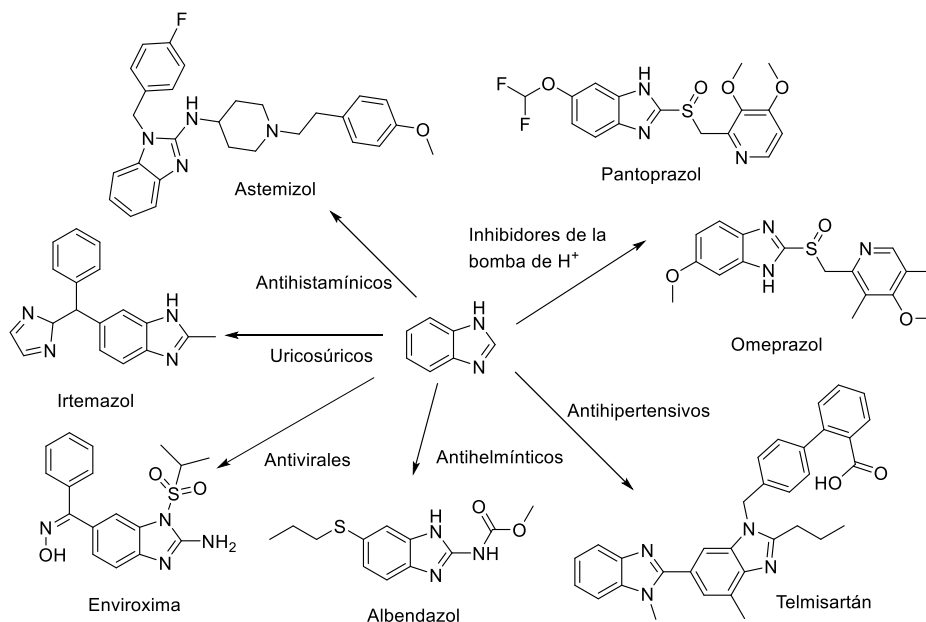


Fig. 1.2 Fármacos aprobados con estructura de benzimidazol.

En este contexto, en esta tesis nos hemos centrado en las propiedades antivirales de pequeñas moléculas que derivan de la interacción con RNA. Concretamente, se ha evaluado la capacidad antiviral de una pequeña familia de benzimidazoles contra los virus de la hepatitis C (HCV) y la fiebre aftosa (FMDV). Para el diseño y síntesis de esta familia, el punto de partida fueron las bibliotecas de compuestos derivados de benzimidazol desarrolladas con anterioridad contra el HCV^{12,13}. A partir del cribado de estas bibliotecas, se han identificado moléculas capaces de inhibir HCV mediante mecanismos de acción totalmente distintos, prueba de que los benzimidazoles son sustancias muy versátiles. En la bibliografía, la mayor parte son ejemplos de benzimidazoles que actúan sobre proteínas, como los 1,2-disustituídos que inhiben la polimerasa NS5B¹⁴, y los bisbenzimidazoles^{15,16} y 2-(tiometilpirimidino)benzimidazoles¹⁷ como inhibidores de las serín proteasas. Los 2-aminobenzimidazoles han mostrado un mecanismo de acción distintivo, que consiste en unirse a un segmento del subdominio IIa del RNA IRES^{18,19} de HCV (**Fig. 1.3.A**), provocando la inhibición de la traducción viral independiente de caperuza. El compuesto denominado Isis-11 es el ejemplo paradigmático de este último grupo de sustancias. Como se verá a continuación, Isis-11 fue el punto de partida escogido para diseñar los nuevos benzimidazoles que se describen en este trabajo.

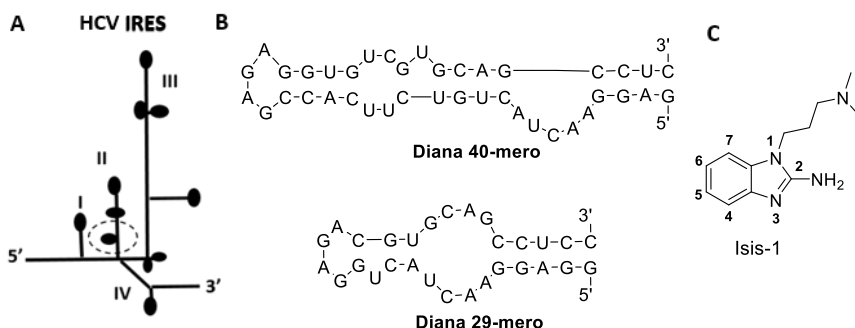


Fig. 1.3 A) Estructura secundaria del RNA IRES de HCV con el subdominio IIa destacado con un círculo, B) Modelos 29-mero y 40-mero del subdominio IIa de HCV IRES y C) Isis-1, molécula *hit* que resulta de un cribado masivo, con estructura de 2-aminobenzimidazol (posiciones numeradas).

La familia de análogos de Isis-11 tiene su origen en un cribado masivo de moléculas que se unen selectivamente a un 29-mero que mimetiza el subdominio IIa del RNA IRES de HCV (**Fig. 1.3.B**), y que fue llevado a cabo mediante espectrometría de masas por Seth y colaboradores¹². Como se comentó en la introducción, el subdominio IIa viral es estratégico para la correcta traducción de las proteínas virales dependiente de IRES y, por tanto, constituye un blanco terapéutico idóneo para el desarrollo de nuevos antivirales^{20,21}. En el estudio mencionado, se cribaron un total de 180.000 moléculas pequeñas, consiguiéndose identificar 2-amino-1-(3,3-dimetilaminopropil)-1*H*-benzo[*d*]imidazol (Isis-1) como la sustancia de mayor afinidad (**Fig. 1.3.C**).

Dado que la molécula seleccionada mostraba una afinidad (100 μ M) y una selectividad moderadas, se construyó una biblioteca discreta de análogos modificando la estructura de este primer *hit* mediante la introducción de grupos electrodonadores y electroattractores varios sobre el anillo de benzimidazol, modulando las características de la cadena que pende del nitrógeno N1 y se llevó a cabo un estudio de estructura-afinidad por el segmento IIa de IRES HCV. Las conclusiones fueron que (i) la cadena sobre N1 era óptima tanto en longitud como por la presencia de una amina terminal, (ii) la sustitución sobre las posiciones C4-C7 produce, como mucho, la disminución de la afinidad con respecto al *hit*, y (iii) la introducción de un grupo metoxi sobre la posición C6 aumenta la afinidad. En correspondencia con ello, el reemplazo del grupo metoxi por 3,3-dimetilaminopropiloxi incrementaba aún más la afinidad. Como la estructura determinada por RMN del dominio II de HCV IRES²² difería de la que hasta entonces

se creía correcta, se repitieron los ensayos de afinidad con un nuevo modelo 40-mero del subdominio IIa más apropiado (**Fig. 1.3.b**). Como los valores de afinidad por esta nueva diana prácticamente no diferían de los conseguidos con el primer modelo, se consideraron validados los resultados del cribado inicial. Por último, se ensayó la restricción conformacional de las cadenas laterales mediante ciclación (**Fig. 1.4**), lo que condujo a moléculas con valores de afinidad muy mejorados, algunos de ellos en el rango submicromolar.

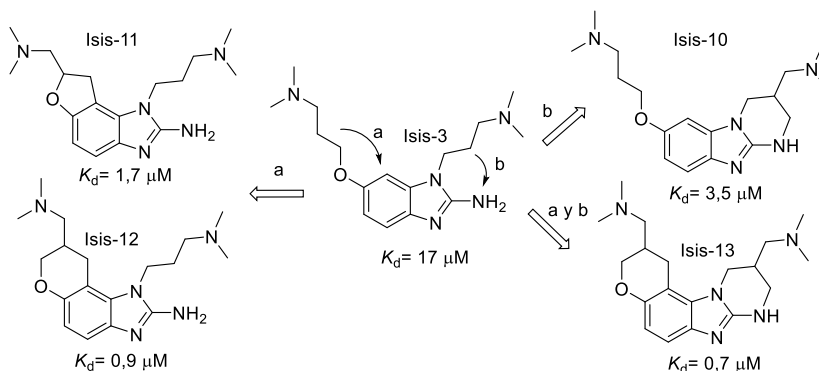


Fig. 1.4 Estrategia seguida por Seth y col.¹² para la obtención de 2-aminobenzimidazoles más afines y afinidades hacia la diana 40-mero obtenidas por EM.

En este mismo estudio, se ensayó también la inhibición de la replicación viral de HCV, confirmándose la estrecha relación entre la afinidad de los aminobenzimidazoles por el segmento del RNA IRES y sus efectos antivirales. En la **tabla 1.1** se muestran los valores de K_d de los ensayos por espectrometría de masas y las EC_{50} de inhibición del replicón de HCV. Estos datos revelan una correlación entre los resultados de ambos experimentos, observándose que a mayor afinidad (menor K_d) también se produce mayor inhibición de la replicación viral (menor EC_{50}). En general, el orden entre ligandos se mantiene en ambos ensayos, con Isis-11 como principal excepción, ya que presenta la tercera mejor afinidad pero la mayor capacidad de inhibición.

	K_d 40-mer por EM (μM)	EC_{50} replicón (μM)
Isis-3	17	37
Isis-10	3,5	29
Isis-11	1,7	1,5
Isis-12	0,9	3,9
Isis-13	0,7	5,4

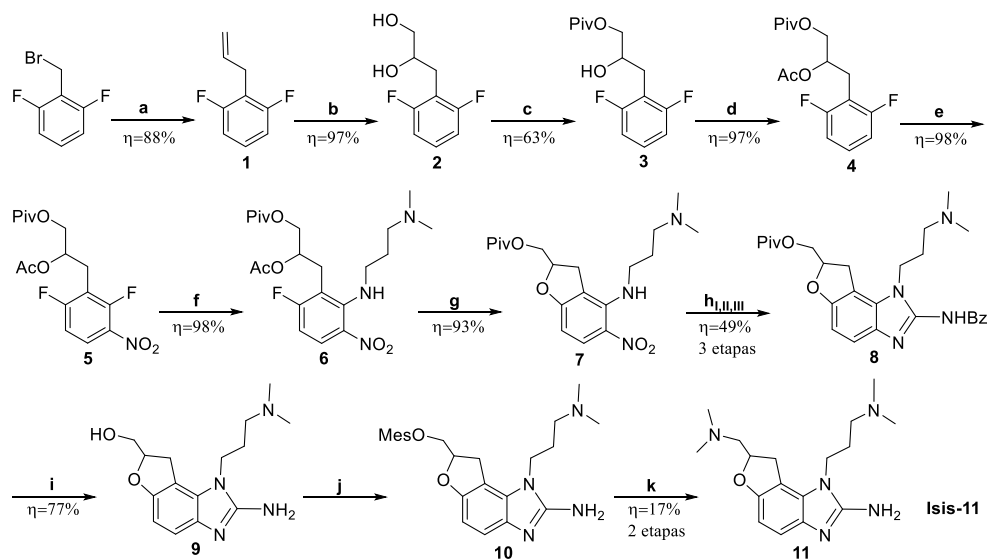
Tabla 1.1 Valores de afinidad y de inhibición de replicación viral de análogos Isis.

Las conclusiones de este estudio constituyen el punto de partida del presente proyecto. De entre las moléculas ensayadas, Isis-11, que mostraba la mejor relación afinidad-actividad antiviral, fue escogida para ser la primera de las sustancias a ensayar y el molde estructural sobre el cual diseñar nuestras nuevas moléculas. A continuación, se describen las síntesis de Isis-11 y de los nuevos análogos estudiados en este proyecto.

1.2 Síntesis de una familia de derivados de benzimidazol: Obtención de Isis-11 y de sus análogos aquirales

1.2.1 Síntesis de Isis-11

El primer objetivo que se abordó fue la obtención de Isis-11, reproduciendo la ruta descrita en la bibliografía¹², aunque optimizándola oportunamente en alguna de las etapas con menor rendimiento o para evitar el uso de un reactivo problemático, como el OsO₄. El siguiente esquema (Fig. 1.5) resume la ruta resultante, una vez optimizada.



a) CH₂CHMgBr, CuI, 2,2'-bipiridina, THF anh, -78°C, 3 h; b) K₂OsO₂(OH)₄, NMO, acetona/H₂O, T amb, 4 d; c) (CH₃)₃CCOCl, Et₃N, CH₂Cl₂ anh, 0°C, 24 h; d) CH₃COCl, 2,4,6-colidina, CH₂Cl₂ anh, 0°C, 16 h; e) HNO₃ fumante, 0°C, 30 min; f) (CH₃)₂N(CH₂)₃NH₂, K₂CO₃, CH₂Cl₂, T amb, 15 h; g) K₂CO₃, MeOH, DMSO anh, 50°C, 17 h; h) Pd/C, H₂, MeOH, T amb, 17 h; h_{ii}) BzNCS, DIEA, CH₂Cl₂ anh, T amb, 5 h; h_{iii}) EDC, CH₂Cl₂ anh, T amb, 17 h; i) 10% HCl, H₂O/dioxano, 100°C, 18 h; j) CH₃SO₂Cl, DIEA, CH₂Cl₂ anh, 60°C, 6 h; k) HNMe₂, MeOH, 60°C, 40 h.

Fig. 1.5 Ruta sintética para la obtención de Isis-11 llevada a cabo en este trabajo.

El procedimiento de síntesis de Isis-11 empleado en este trabajo consta de un total de trece etapas y rinde el producto con un rendimiento global del 3%. Se parte del bromuro de 2,6-difluorobencilo, un compuesto de origen comercial, que proporciona los átomos del anillo bencénico central de Isis-11. La primera parte de la ruta tiene como objeto incorporar y funcionalizar adecuadamente el anillo de benceno con los grupos y apéndices que se precisan para acabar formando los dos heterociclos fusionados. En la segunda parte de la síntesis, se llevan a cabo las ciclaciones que conducen a los heterociclos, en primer lugar, la que conduce al dihidrofurano, mediante una reacción de sustitución aromática intramolecular y a continuación, previa reducción de un grupo nitro, la condensación de una *o*-fenilendiamina con una tiourea protegida para producir el anillo de 2-aminoimidazol. Las tres últimas etapas tienen como objeto la desprotección del grupo 2-amino y la funcionalización del apéndice del anillo de dihidrofurano en forma de amina.

El primer paso de la síntesis consistió en la adición del bromuro de vinilmagnesio a -78°C sobre el bromuro de 2,6-difluorobencilo, un compuesto de origen comercial, catalizada por Cu(I) y empleando 2,2'-bipiridina como agente quelante. Se generó así la olefina **1** con un rendimiento del 88%, sin que se precisase de purificación cromatográfica.

La siguiente etapa es la dihidroxilación del doble enlace para obtener el diol **2**. En esta etapa se varió el procedimiento descrito en la bibliografía¹², que utilizaba OsO₄ como agente oxidante y óxido de *N*-metilmorfolina (NMO) como co-oxidante. El OsO₄ es un reactivo habitual en este tipo de reacciones, pero debido a la elevada toxicidad y volatilidad se creyó conveniente evitar su uso. Para ello, se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica para encontrar unas condiciones de reacción más seguras. En la **tabla 1.2** se resumen los intentos realizados, especificando las condiciones empleadas y el resultado obtenido.

En el primer intento, se utilizó OsO₄ encapsulado en una matriz de poliurea, registrado comercialmente con el nombre OsEnCat^{®23}, cuya principal ventaja es minimizar la toxicidad reduciendo la volatilidad. El ensayo no condujo a la formación del producto, recuperándose el producto de partida. Ello condujo a ensayar un abanico de reactivos alternativos. Aparte de otros compuestos de osmio, como el osmiato de potasio, se probaron también el peryodato sódico y el permanganato potásico. Los resultados se resumen también en la **tabla 1.2**.

Ensayo	Condiciones	Resultado
1	OsEnCat® (0,1 eq), NMO (1 eq), acetona/H ₂ O 10:1, 22 h	No se observa producto
2	1) NaIO ₄ (0,3 eq), KBr (0,2 eq), AcOH glacial, 95°C, 14 h 2) K ₂ CO ₃ (1,5 eq), MeOH, 15 h	No se observa producto
3	NaIO ₄ (1,5 eq), RuCl ₃ ·3H ₂ O (0,005 eq), H ₂ SO ₄ (0,2 eq), H ₂ O/ACN/AcOEt (2:6:6), 0°C, 4h	Conversión incompleta. Mayoritariamente, rotura oxidativa del doble enlace
4	KMnO ₄ (1,5 eq), EtOH/H ₂ O 1:1, 0°C, 8 h	No se observa producto
5	K ₂ OsO ₂ (OH) ₄ cat., K ₃ [Fe(CN) ₆] (3 eq), K ₂ CO ₃ (3 eq), tBuOH/H ₂ O 1:1, 72 h	Se observa producto pero muy impurificado
6	K ₂ OsO ₂ (OH) ₄ cat, NMO (2,1 eq), acetona/H ₂ O 10:1, 24-96 h	Se obtiene el producto

Tabla 1.2 Ensayos de dihidroxilación de la olefina 1.

En ninguna de las pruebas con NaIO₄²⁴ (ensayos 2 y 3) se observó el producto de dihidroxilación ni tampoco se pudo recuperar el producto de partida. Únicamente en el ensayo 3 catalizado por Ru(III)^{25,26} pudo identificarse el producto formado, el cual resultaba de la rotura oxidativa del doble enlace. El experimento 4 con KMnO₄²⁷ tampoco condujo al resultado esperado y, como en el caso del peryodato, no se pudo recuperar la olefina de partida ni tampoco identificar el producto formado. En cambio, los ensayos 5 y 6 realizados con osmiato de potasio fueron positivos, tanto al utilizar K₃[Fe(CN)₆]²⁸ o NMO²⁹ como co-oxidantes. No obstante, debido a la mayor pureza del crudo, se eligió el tratamiento que empleaba NMO como co-oxidante. La única limitación de este procedimiento es el elevado precio del osmiato, lo que obligó a disminuir la proporción de oxidante a 0,01 eq (aprox. 10 mg para cantidades de 0,1-2 g de alqueno), y alargar los tiempos de reacción entre 1 y 4 días, en función de la cantidad de olefina a tratar.

La dihidroxilación de la olefina **1** utilizando osmiato de potasio como oxidante catalítico y el NMO como co-oxidante permitió obtener el producto de manera prácticamente cuantitativa. Debido a la imposibilidad de seguir la reacción por CCF,

por la similitud cromatográfica entre el diol **2** y la biperidina, la reacción requirió del análisis por HPLC.

Obtenido el diol **2**, el siguiente paso consistía en la protección selectiva del hidroxilo primario frente al secundario por reacción con el cloruro de pivaloilo, en presencia de DMAP y NEt_3 . Siguiendo el procedimiento descrito, la reacción condujo a la obtención de dos productos, el compuesto protegido en el hidroxilo primario **3** y un segundo producto mayoritario con los dos hidroxilos protegidos. Este resultado inesperado obligó a modificar el procedimiento para maximizar la formación del producto monoprotegido deseado. Con este objeto, se ensayó llevar a cabo la reacción evitando el exceso del cloruro de ácido mediante una adición fraccionada. En estas nuevas condiciones, la proporción del compuesto de interés con respecto al producto de diprotección aumentó, permitiendo obtener el producto **3** con un rendimiento del 63% tras purificación cromatográfica.

A continuación, se procedió a acetilar el hidroxilo secundario por tratamiento con cloruro de acetilo y 2,4,6-colidina a 0°C , consiguiendo el producto **4** en un 97% en un grado de pureza apropiado sin precisar de purificación cromatográfica.

El producto diprotegido **4** se sometió a una nitración por tratamiento con HNO_3 fumante a 0°C durante 30 minutos, generando de manera prácticamente cuantitativa el isómero deseado **5** debido al efecto conjunto *orto*- y *para*-director de los átomos de flúor.

Tras la nitración, se pasó a incorporar el apéndice amino que en la estructura de Isis-11 pende del nitrógeno imidazólico, tratando el producto **5** con 3,3-dimetilamino-1-propilamina en presencia de K_2CO_3 . La sustitución nucleófila aromática tiene lugar selectivamente desplazando el átomo de F en *orto* respecto al grupo nitro, obteniéndose la nitroanilina **6** con un 98% de rendimiento.

La siguiente etapa tiene como objeto la formación del dihidrobenzofurano **7**, mediante el tratamiento de la nitroanilina con K_2CO_3 en una mezcla de DMSO y MeOH anh a 50°C . La transformación implica en primer lugar la desprotección selectiva del hidroxilo secundario (el impedimento estérico del grupo pivaloilo protege el grupo hidroxilo primario), para seguidamente, producirse una sustitución nucleófila aromática intramolecular en que el hidroxilo desplaza el átomo de flúor. El procedimiento genera **7** de forma prácticamente cuantitativa (93%) y sin precisar purificación cromatográfica.

Los tres siguientes pasos tienen como objeto la formación del tercer anillo fusionado, el de imidazol, y se realizan de manera consecutiva, sin aislar los intermedios. El primero de ellos consiste en la reducción del grupo nitro a amina generando la *o*-fenilendiamina. Esta etapa es especialmente delicada, ya que las *o*-fenilendiaminas son productos inestables al aire. Éstas se oxidan rápidamente por el oxígeno atmosférico a la correspondiente *o*-diimina quinona (**Fig. 1.6**), un producto a su vez inestable que puede condensar rápidamente con otra molécula de *o*-fenilendiamina generando la 2,3-diaminofenazina³⁰. Prueba de la aparición de éste u otros subproductos es el rápido oscurecimiento de las disoluciones en contacto con el aire y la formación de precipitados insolubles.

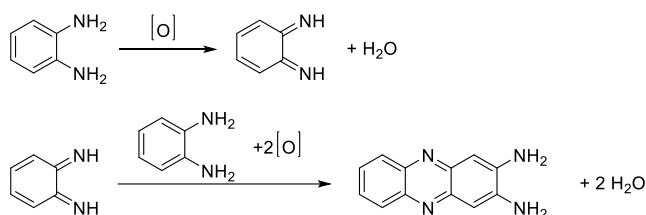


Fig. 1.6 Oxidación de la *o*-fenilendiamina.

Siguiendo el procedimiento descrito, la reducción se llevó a cabo con hidrógeno y empleando como catalizador Pd/C en MeOH anh. La formación de la *o*-fenilendiamina es fácilmente detectable por la desaparición del intenso color amarillo de la nitroanilina **7**. En la misma lámina de gel de sílice, se puede observar a simple vista la oxidación de la fenilendiamina, por el oscurecimiento paulatino de la mancha cromatográfica correspondiente al ser expuesta al aire. Una vez finalizada la reducción y eliminado el hidrógeno mediante la purga con argón, para evitar el deterioro de *o*-fenilendiamina por contacto con el oxígeno atmosférico, el crudo se filtra al vacío sobre Celite® para eliminar el catalizador. Una vez evaporado el disolvente, se redissuelve en CH₂Cl₂ anh y se añade el isotiocianato de benzoílo para generar la tiourea. Una vez comprobada su formación por CCF, se adicionaron EDC y DIEA al crudo de reacción, para conseguir la ciclación que conduce al benzimidazol **8** (**Fig. 1.7**). Tras la purificación por columna cromatográfica, se obtuvo **8** en un 49%.

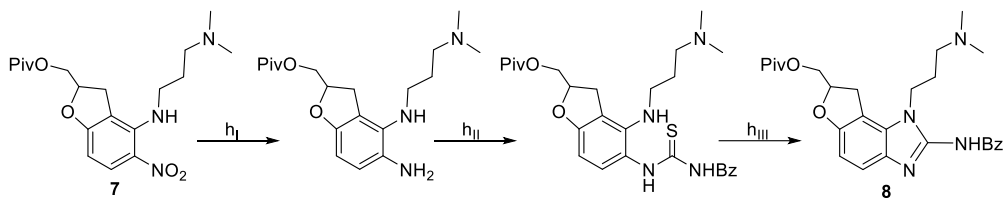


Fig. 1.7 Detalle de la transformación de la nitroanilina (7) en la aminoguanidina (8).

La siguiente etapa consistía en la desprotección del compuesto **8** mediante un tratamiento con HCl al 10% en una mezcla H₂O/dioxano a reflujo para eliminar a la vez los grupos protectores benzoilo y pivaloilo de los grupos 2-amino e hidroxilo, respectivamente. El crudo obtenido reveló la presencia del producto desprotegido **9** con un rendimiento del 77%. Como se verá más adelante en la síntesis de los análogos de Isis-11, la desprotección de este grupo no siempre es posible, hecho que obligó a modificar la ruta sintética para evitar el uso de un grupo protector tan estable.

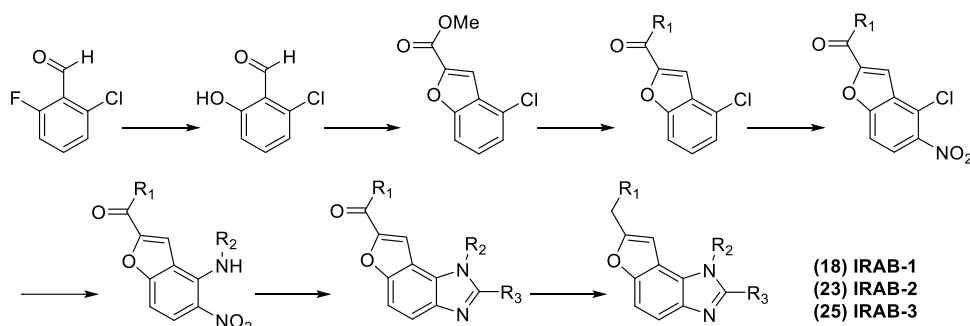
En este punto de la ruta, sólo resta transformar el grupo hidroxilo primario en dimetilamino. Para ello, el producto desprotegido **9** se trató con cloruro de mesilo en presencia de DIEA para activar el hidroxilo por conversión en mesilato. Se obtuvo el compuesto mesilado **10**, aunque con una pureza máxima del 65%, muy probablemente debido a la extrema labilidad del grupo protector en el proceso de purificación. A un paso del término de la ruta, se decidió proseguir con la síntesis, sin necesidad de aislar el intermedio, por la inherente inestabilidad y elevada polaridad del mesilato.

El último paso consistía en una sustitución nucleófila, desplazando el mesilato por tratamiento con una disolución de *N,N*-dimetilamina 2,0 M en MeOH en un vial sellado a 60°C durante 18 h. Dado que el análisis por CCF no era factible por la elevada polaridad e inherente inestabilidad del mesilato, el análisis del avance de la reacción tuvo que ser llevado a cabo por ESI-MS, verificando la desaparición del pico correspondiente a la masa del producto mesilado a la vez que aparecía la señal correspondiente a Isis-11. Al término del tratamiento, el crudo obtenido se concentró a sequedad y se purificó por MPLC de fase reversa empleando un gradiente 0-40% B, siendo A H₂O 0,1% TFA y B ACN 0,1% TFA. El análisis por HPLC y ESI-MS permitió identificar las fracciones que contenían Isis-11 con el grado de pureza adecuado y finalmente, se liofilizaron. Por último, el producto se cuantificó por espectroscopia de UV-visible, a partir del valor estimado de ϵ_{280} del 2-

aminobenzimidazol ($7800 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). El rendimiento conjunto de estas últimas dos etapas que transforman **9** en Isis-11 fue del 17%.

1.2.2 Síntesis de los análogos IRAB basados en la estructura de Isis-11

La ruta sintética para la obtención de esta nueva familia de análogos de Isis-11 (**Fig. 1.8**), bautizados como IRAB (**IRES Aminobenzimidazole Binder**), se diseñó combinando diversos procedimientos descritos en la bibliografía^{18,31,32}.



	R₁	R₂	R₃
(18) IRAB-1	-N(CH ₃) ₂	-(CH ₂) ₃ N(CH ₃) ₂	-NH ₂
(23) IRAB-2	-NH(CH ₂) ₃ N(CH ₃) ₂	-CH ₃	-NH ₂
(25) IRAB-3	-NH(CH ₂) ₃ N(CH ₃) ₂	-CH ₃	-H

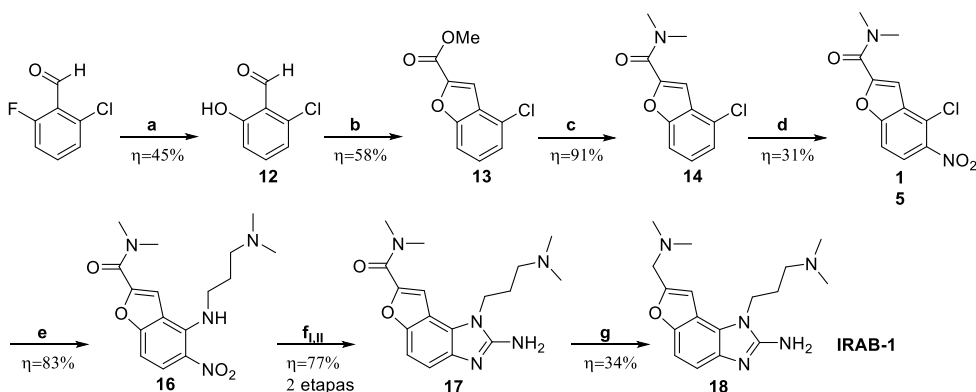
Fig. 1.8 Esquema general de la síntesis de los análogos IRAB.

El rasgo estructural común que diferencia estos nuevos derivados IRAB de Isis-11 es la existencia de un doble enlace en el anillo de furano. El doble enlace adicional comporta una extensión de la aromaticidad a la vez que un aumento de la planicidad, la ausencia de quiralidad y, también, una notoria simplificación de la ruta sintética. Por un lado, el aumento de la aromaticidad y de planicidad respecto a Isis-11 podría suponer una mejora de la afinidad hacia las dianas por la mayor capacidad intercalante de los ligandos. En cuanto a la quiralidad, ésta no parece ser una característica determinante en la actividad de Isis-11, ya que ambos enantiómeros son activos y muestran afinidades por el subdominio IIa del IRES de HCV muy similares (2,6 y 9,0 μM^{33}). Por lo que respecta a la síntesis, la ruta de los derivados IRAB comporta una notable reducción de etapas con respecto a la de Isis-

11 (8 en vez de 13), esencialmente, porque se simplifica la etapa de ciclación que conduce al anillo de furano y no se precisa la protección del imidazol.

1.2.2.1 Síntesis de IRAB-1

El primero de estos análogos, IRAB-1, fue diseñado respetando la estructura de Isis-11, introduciendo un doble enlace adicional sobre el anillo de furano. Con ello, se pretendía comprobar cuál era el efecto sobre la actividad de aumentar la planicidad sin alterar el resto de características estructurales de Isis-11.



a) KOH, THF, T amb, 48 h; b) $\text{CH}_2\text{BrCOOCH}_3$, K_2CO_3 , ACN anh, 70°C , 48 h; c) HNMe_2 , 60°C , 39 h; d) $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$ 1:1, 0°C , 90 min; e) $(\text{CH}_3)_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$, DBU, NMP, 100°C , MW, 1 h; f) Pd/C, H_2 , MeOH anh, T amb, 17 h; f_{ii}) CNBr, MeOH/ACN, T amb, 18 h; g) $\text{BH}_3\cdot\text{THF}$, 65°C , 18 h

Fig. 1.9 Ruta sintética para la obtención de IRAB-1.

La ruta sintética (Fig. 1.9) puesta a punto para conducir a IRAB-1 parte de 2-cloro-6-fluorobenzaldehído, un compuesto de origen comercial y de precio asequible. La primera parte de la ruta tiene como objeto construir el anillo de furano. Para ello, es clave la reacción de 2-cloro-6-hidroxibenzaldehído (preparado por desplazamiento selectivo de flúor por hidróxido) con bromoacetato de metilo, ya que en una sola etapa tiene lugar la *O*-alquilación seguida de la condensación intramolecular que conduce directamente a la formación del anillo de furano. En una segunda parte de la ruta, se introduce el grupo dimetilamino que pende del anillo de furano y se funcionaliza el anillo central de forma adecuada para propiciar la formación del anillo de 2-aminoimidazol. Éste se obtiene en la tercera y última parte de la ruta, en este caso, por condensación de una *o*-fenilendiamina con BrCN. Se simplifica aquí significativamente el procedimiento con respecto al de Isis-11, ya que no se precisa un grupo protector sobre el grupo amino de la guanidina. La ruta se completa con la reducción del grupo carboxamido a amina. En total, se trata de

una ruta de ocho etapas, bastante menos laboriosa que la de Isis-11 y adaptable a la preparación de otros derivados, como se verá en los próximos apartados.

La primera etapa de la síntesis de IRAB-1 tiene lugar mediante una sustitución nucleófila desplazando el átomo de flúor por hidroxilo mediante reacción con KOH en THF a T amb durante 48 h. La diferencia en el carácter de grupo saliente entre fluoruro y cloruro permitía que sólo se observara la monosustitución. La reacción tiene como objeto introducir el grupo hidroxilo que propiciará la formación del anillo de furano en la siguiente etapa. El hidroxibenzaldehído **12** se obtuvo de este modo como un sólido amarillo cristalino en forma de agujas con un 45% de rendimiento. El procedimiento original³¹ en que se basaba describía la reacción en DMSO, pero fue conveniente el cambio de disolvente a THF. Después del procesado de la reacción, se observaba que el crudo era un aceite amarillo debido a las trazas de DMSO, que resultaban difíciles de eliminar. El principal problema derivado de la presencia de DMSO surgió en la etapa posterior, ya que causaba la oxidación parcial del aldehído al ser calentado. El cambio de disolvente por THF mostraba el inconveniente de disolver parcialmente el KOH, pero se resolvió empleando hidróxido previamente molturado. Además, permitía llevar a cabo la reacción a una temperatura más baja y más rápidamente, ya que no hacía falta calentar para aumentar la solubilidad del KOH. Dada la volatilidad del producto de partida, llevar a cabo la reacción a una temperatura más baja minimizaba también la disminución del rendimiento debida a la pérdida por evaporación.

En la etapa clave de la ruta que conduce a la formación del anillo de furano, el compuesto **12** se trató con bromoacetato de metilo en presencia de K₂CO₃, calentando a reflujo de ACN durante 48 h. El benzofuranoato de metilo **13** se obtuvo con un 58% de rendimiento, en un grado de pureza adecuado para no precisar de purificación cromatográfica. El procedimiento era la adaptación de una reacción prácticamente idéntica donde se utilizaba 2-cloroacetato de etilo y DMF³¹ como disolvente. En esta ocasión, se cambió el disolvente por ACN para facilitar su eliminación. La transformación tiene lugar en dos fases. En primer lugar, se produce una sustitución nucleófila del hidroxilo sobre el bromoacetato de metilo, para formar el *O*-arilacetato de metilo. A continuación, sin necesidad de aislar el intermedio, tiene lugar una reacción aldólica intramolecular, en que participan el carbono α del acetato y el carbonilo del aldehído, obteniéndose el β -hidroxiéster, que deshidrata *in situ* para conducir al anillo de furano.

El siguiente paso consistió en convertir el grupo éster del producto **13** en la correspondiente dimetilamida por tratamiento con una disolución de dimetilamina 2,0 M en MeOH. Como se trataba de una reacción lenta, dificultada por la volatilidad de la amina, el modo más conveniente de llevarla a cabo fue en un vial sellado calentando a 60°C en una estufa durante 40 h. Se obtuvo la amida **14** con un 91% de rendimiento, sin que se precisara de purificación cromatográfica.

El siguiente paso implicaba la nitración del compuesto **14**, con el objeto de obtener el derivado **15**. El primer procedimiento ensayado fue el mismo que el empleado para la obtención de Isis-11. El compuesto **14** se trató a 0°C con ácido nítrico fumante durante 30 min. En este caso, a diferencia de lo ocurrido en la síntesis de Isis-11, se obtuvieron los tres isómeros nitrados posibles (**Fig. 1.10**), en *orto* (correspondiente al producto deseado **15**), *para* y *meta* respecto al cloro, en proporción 62:28:10.

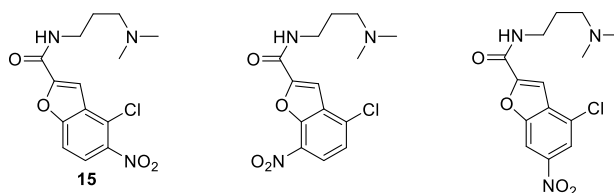


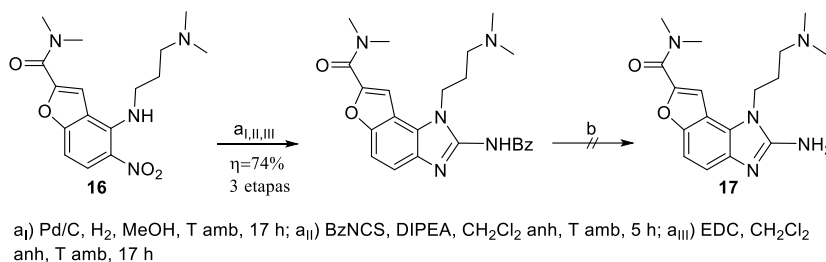
Fig. 1.10 Isómeros obtenidos en la etapa de nitración.

Aunque **15** era el producto mayoritario del crudo, se creyó conveniente variar ligeramente las condiciones de nitración para aumentar su proporción en el crudo. El tratamiento con una mezcla $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$ ^{34,35} 1:1 a 0°C durante 90 min consiguió mejorar levemente la proporción del isómero de interés a 67:23:10. El crudo de reacción con la mezcla de isómeros se purificó por columna cromatográfica obteniendo el compuesto nitrado **15** con un 31% de rendimiento. A pesar del bajo rendimiento obtenido, no se ensayaron otros métodos.

Tras la nitración y como en la síntesis de Isis-11, la siguiente etapa consistía en una sustitución nucleófila aromática sobre el cloro para incorporar el apéndice diamina. De inicio, ensayadas las condiciones que habían permitido llevar a cabo una reacción equivalente en la ruta de Isis-11, se vio que no conducían adecuadamente al producto. Después de algunos ensayos infructuosos, se encontró que la reacción podía llevarse a cabo convenientemente por medio de la calefacción por microondas. El procedimiento más adecuado resultó ser disolver el compuesto en NMP en un vial, tratarlo con 3,3-dimetilamino-1-propilamina y DBU,

e irradiar en el horno de microondas durante 1 h. El crudo obtenido tras *work-up* se purificó por columna cromatográfica, obteniendo la *o*-nitroanilina con un 83% de rendimiento.

El siguiente paso precisaba de la reducción del grupo nitro para formar la *o*-fenilendiamina, el intermedio necesario para llevar la ciclación que conduce al tercer anillo fusionado de imidazol. El primer procedimiento ensayado fue el mismo que para Isis-11. En primer lugar, se redujo el grupo nitro en atmósfera de hidrógeno y Pd/C como catalizador. Comprobada la desaparición de la nitroanilina **16**, tanto a simple vista (desaparición del color amarillo inicial) como por análisis de CCF, la *o*-fenilendiamina generada se trató con isotiocianato de benzoílo para producir la tioguanidina correspondiente, y sin aislarla, se adicionó EDC y DIEA al crudo de reacción para formar el anillo de 2-benzoilaminoimidazol. Una vez formada la guanidina, el siguiente paso a realizar era la desprotección. Siguiendo el mismo procedimiento que para producir el producto **9**, tratando con HCl al 10% en H₂O a 100°C durante 16 h, apenas se observó la desprotección a **17** (Fig. 1.11). Cuando se intentó forzar las condiciones empleando HCl concentrado, el resultado fue prácticamente el mismo.



Ensayo	Condiciones etapa b	Conversión (%)
1	HCl 10%, H ₂ O/dioxano, 100°C, 18 h	< 10
2	HCl conc, 100°C, 18 h	< 10
3	HNMe ₂ , MeOH, 60°C, 18 h	< 30
4	NH ₃ conc, 60°C, 18 h	< 30

Fig. 1.11 Intento de obtención de (17).

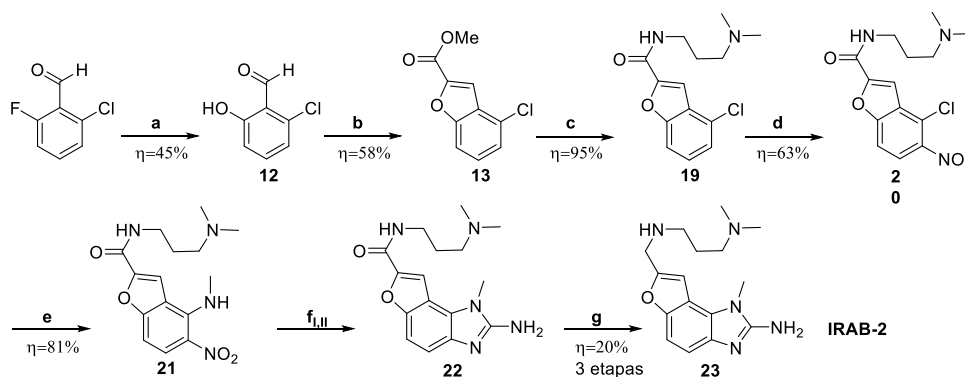
Ante la imposibilidad de producir la desprotección en condiciones ácidas, se intentó llevarla a cabo en condiciones básicas, realizando tratamientos a 60°C en un vial sellado en la estufa durante 16 h. Tanto con NH₃ conc³⁶ como con una disolución de MeNH₂ en etanol³⁷ a 60°C, se obtuvieron porcentajes de conversión inferiores al 30%. Debido a las dificultades observadas, se optó por cambiar la

metodología con la que producir el anillo de 2-aminoimidazol, sustituyendo las reacciones con isotiocianato y posterior ciclación con EDC y DIEA por un único tratamiento con BrCN¹⁸, un reactivo clásico para generar guanidinas a partir de diaminas¹⁸, pero que se tiende a evitar por su extrema toxicidad. Con este propósito, se trató la *o*-fenilendiamina producida por reducción de la nitroanilina **16**, con una disolución comercial de BrCN 5,0 M en ACN. El análisis por RMN y por masas corroboró la formación del 2-aminobenzimidazol **17**. Como en este caso no se precisaba el paso adicional de desprotección, restaba únicamente un paso para la obtención de IRAB-1.

El último paso de la ruta consistía en la reducción del carbonilo a metileno. Guiados por un artículo de referencia en que se describía una reducción de un producto de similares características¹⁸, se ensayó LiAlH₄ para llevarla a cabo. Al intentarlo, se observó tanto por ESI-MS como por RMN ¹H la degradación del producto sin poder llegar a identificar la especie formada. Se interpretó que un reductor de tipo hidruro podría no ser conveniente dado el gran número de centros ácidos de la molécula. Por lo tanto, se realizó una búsqueda bibliográfica de alternativas al hidruro para este tipo de reducciones, y se vio que otro de los reactivos habituales es el borano³⁸⁻⁴¹. El procedimiento ensayado consistió en un tratamiento a reflujo del producto **17** en una disolución de borano en THF durante 4 h, más 14 h adicionales a T amb. Concentrado el crudo a sequedad, el procedimiento más apropiado consistió en tratar en primer lugar con HCl conc y posteriormente HCl al 10% a reflujo, para acabar de hidrolizar los complejos de boro. Se comprobó por HPLC y ESI-MS la formación de IRAB-1. El crudo obtenido se purificó por MPLC de fase reversa consiguiendo obtener IRAB-1 con un 34% de rendimiento. Cabe señalar aquí que debido al carácter higroscópico del sólido obtenido tras la liofilización, la cuantificación de IRAB-1 fue necesario llevarla a cabo por RMN ¹H, empleando la señal del dioxano añadido al disolvente D₂O como referencia.

1.2.2.2 Síntesis de IRAB-2

El diseño de IRAB-2 fue realizado tras constatar que IRAB-1 mostraba mejora tanto en los ensayos biofísicos como en los biológicos (véase capítulo 2) con respecto a Isis-11. Por tanto, todo parecía indicar que la insaturación adicional de IRAB-1 era un rasgo estructural favorable con respecto a Isis-11 en el contexto estudiado. Ello animó a explorar otras posibles modificaciones estructurales sobre el esqueleto de IRAB-1. Concretamente, el objetivo en la obtención de IRAB-2 fue comprobar la influencia de refundir el apéndice 3,3-dimetilaminopropilo unido a imidazol con la amina que pende de furano. Para llevar a cabo la síntesis de este segundo análogo, el esquema sintético (**Fig. 1.12**) podía ser esencialmente el mismo que para IRAB-1, intercambiando únicamente los pasos de incorporación de los dos apéndices, empleando la 3,3-dimetilamino-1-propilamina en la etapa **c** de formación de la amida y la metilamina en la de la sustitución nucleófila aromática **e** tras la nitración. Aprovechando la ocasión, se optimizaron algunas de las etapas equivalentes a las empleadas en la preparación de IRAB-1.



a) KOH, THF, T amb, 48 h; b) $\text{CH}_2\text{BrCOOMe}$, K_2CO_3 , ACN anh, 70°C , 48 h; c) $(\text{CH}_3)_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$, MeOH, 75°C , MW, 3h; d) HNO_3 fumante, 0°C , 0,5 h; e) NH_2Me , DBU, MeOH, 80°C , MW, 2 h; f) Pd/C, H_2 , MeOH, 16 h; f_i) CNBr, MeOH/ACN, 16 h; h) $\text{BH}_3\cdot\text{THF}$, 65°C , 18 h.

Fig. 1.12 Ruta sintética para la obtención de IRAB-2.

Como se puede observar en la **Fig. 1.12**, las dos primeras etapas de esta ruta coinciden con las de la obtención de IRAB, por lo que se comentará desde la formación de la amida.

Para preparar la amida **19**, el benzofuranoato de metilo **13** se disolvió en MeOH y se trató con 3,3-dimetilamino-1-propilamina en un vial sellado a 75°C en un horno MW durante 3 h. De esta manera, se obtuvo el derivado amida **19** en un 95% de

rendimiento sin precisar de purificación adicional. Aquí nuevamente, como en algún otro caso anterior, la calefacción mediante la irradiación por MW supuso una reducción drástica del tiempo de reacción, ya que se consiguió pasar de las 40 h necesarias si se calentaba térmicamente, a sólo 3 h si se realizaba en un horno de MW.

Siguiendo con la ruta, el compuesto **19** se trató a continuación con HNO₃ fumante, obteniéndose nuevamente una mezcla de tres isómeros nitrados, en el que era mayoritario el producto deseado. Aquí, a diferencia de la reacción equivalente en la ruta de IRAB-1, la proporción de isómeros prácticamente no variaba si en vez de HNO₃ fumante se empleaba una mezcla de HNO₃/H₂SO₄. De este modo, se obtuvo el producto nitrado **20** con un 63% de rendimiento tras una purificación por columna cromatográfica.

En la etapa previa a la formación del imidazol, el producto **20** se trató con una disolución de MeNH₂ en etanol y DBU. De forma equivalente a la ruta de IRAB-1, se llevó a cabo la reacción en un vial sellado en un horno MW a 80°C durante 2 h, consiguiéndose la completa conversión de **20** en la nitroanilina **21**, a través de la sustitución nucleófila que desplaza el átomo de cloro. Se obtuvo el producto con un rendimiento del 81% tras la purificación por columna cromatográfica. Aquí, en paralelo, se realizó un intento empleando NH₃ con vistas a obtener otro nuevo análogo con el anillo de imidazol no alquilado. No obstante, se descartó ya que a igual tiempo de reacción, la conversión distaba mucho aún de ser completa.

En cuanto a la etapa de formación del anillo de imidazol, se siguió exactamente la misma metodología que en la ruta de IRAB-1. El compuesto **21** se sometió a un tratamiento de reducción con atmósfera de H₂ y catálisis de Pd/C, para generar la *o*-fenilendiamina correspondiente. Cabe destacar aquí la especial inestabilidad de este intermedio, observándose que si no se procedía con el suficiente cuidado, el crudo se oscurecía con mucha mayor rapidez que en las hidrogenaciones anteriores. Para paliarlo, la separación del catalizador por filtración debió realizarse estrictamente bajo atmósfera de argón, trasvasando el crudo mediante cánula al filtro, recogiendo el filtrado en un matraz y realizando inmediatamente la adición de la disolución de BrCN en ACN para obtener el compuesto **22**. Finalizada la reacción, y una vez evaporado el disolvente, el crudo de reacción se empleaba directamente en la siguiente y última etapa de la ruta.

Nuevamente basados en la ruta de IRAB-1, se procedió a reducir la amida por tratamiento con $\text{BH}_3\cdot\text{THF}$ durante 4 h a reflujo y 14 h más a T amb. El crudo se trató con HCl conc y, posteriormente, con HCl al 10% a reflujo para hidrolizar los complejos de boro. Una vez comprobada la reducción mediante el análisis por ESI y HPLC, el crudo obtenido se purificó por MPLC de fase reversa empleando un gradiente 0-30% B, siendo A H_2O 0,1% TFA y B ACN 0,1% TFA. Reunidas las fracciones correspondientes al producto puro y tras ser convenientemente liofilizadas, se obtuvo IRAB-2 con un 20% de rendimiento acumulado para las tres últimas etapas. Nuevamente aquí, como en el caso de IRAB-1, la cuantificación se realizó por RMN ^1H .

1.2.2.3 Síntesis de IRAB-3

La síntesis de IRAB-3 se llevó a cabo tras los resultados obtenidos en los ensayos biofísicos con los compuestos IRAB sintetizados previamente (véase capítulo 2, apartados 2.1.4.3 y 2.1.5). En ellos, ambos ligandos mejoraban en líneas generales las afinidades mostradas por Isis-11, tanto hacia las dianas IRES de fiebre aftosa como de hepatitis C. Además, de la comparativa entre ambos, IRAB-2 sale beneficiado mostrando mayor afinidad en los experimentos de fluorescencia e ITC. Debido al progresivo incremento en las afinidades en los compuestos IRAB, se planteó el diseño de IRAB-3, consistente en la eliminación del grupo amino de la posición 2 del anillo de benzimidazol de la estructura de IRAB-2. Se pretendía así estudiar cómo afectaba la ausencia del grupo 2-amino en las propiedades y comprobar si, como se había descrito en HCV, era esencial para la actividad inhibitoria de los ligandos Isis^{12,20}.

El esquema sintético (**Fig. 1.13**) es prácticamente idéntico al de IRAB-2 con la salvedad que en la etapa de formación del anillo de imidazol se sustituye el bromuro de cianógeno por el ácido fórmico con catálisis de ácido polifosfórico³². Es por ello que la descripción de esta síntesis se iniciará en la etapa de formación del anillo de imidazol, **f**, ya que los pasos previos son idénticos a los de IRAB-2. Estos últimos pasos de la ruta fueron realizados por Carla Tomás durante la realización de su Trabajo Final de Máster⁴².

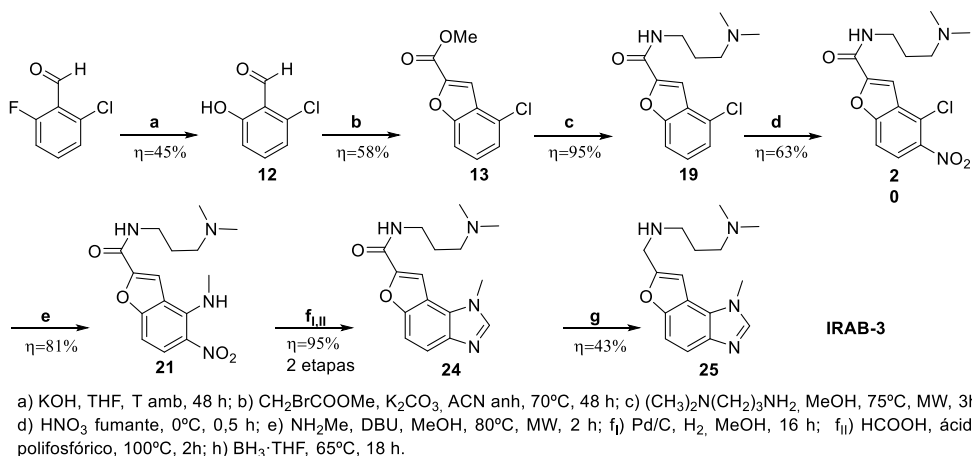


Fig. 1.13 Ruta sintética para la obtención de IRAB-3.

Para la preparación del compuesto **24**, en primer lugar se redujo el grupo nitro siguiendo la metodología idéntica a la de los compuestos anteriores, empleando la reducción con atmósfera de H₂ y catálisis de Pd/C. Una vez comprobada la formación de la *o*-fenilendiamina, el crudo se filtró bajo atmósfera de argón para separar el catalizador y, seguidamente, se concentró a sequedad evitando al máximo el contacto con el aire. A continuación, se redisolvió el residuo en ácido fórmico bajo atmósfera de argón y se adicionó una cantidad catalítica de ácido polifosfórico. La mezcla de reacción resultante se calentó a reflujo durante 2 h, produciéndose la condensación entre la *o*-fenilendiamina y el ácido fórmico que condujo a la formación del benzimidazol **24** en un 95%.

La amida del compuesto **24** fue reducida empleando el mismo procedimiento que para los compuestos IRAB precedentes, mediante el tratamiento con BH₃·THF durante 4 h a reflujo y, 18 h más a T amb. El crudo se trató a continuación con HCl conc, y, posteriormente, con HCl al 10% a reflujo para hidrolizar los complejos de boro. La reducción fue controlada mediante el análisis por ESI y HPLC, y el crudo obtenido se purificó por MPLC de fase reversa empleando un gradiente 0-30% B, siendo A H₂O 0,1% TFA y B ACN 0,1% TFA. Las fracciones correspondientes al producto IRAB-3 puro se juntaron y fueron liofilizadas para obtenerlo finalmente con un 43% de rendimiento. Como en los dos primeros IRAB, la cuantificación se realizó por RMN ¹H.

Al término de la redacción de esta memoria, el compuesto IRAB-3 aún no ha podido ser evaluado, pero se prevé que pueda serlo próximamente, junto a otros

derivados IRAB que fueron preparados recientemente en nuestro grupo por Carla Tomás durante su Trabajo final de Máster⁴².

Bibliografía

- (1) Fei, F.; Zhou, Z. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2013**, *23* (9), 1157–1179.
- (2) Yadav, G.; Ganguly, S. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 1–25.
- (3) El Rashedy, A. A.; Aboul-Enein, H. Y. *Curr. Drug Ther.* **2013**, *8* (1), 1–14.
- (4) Monforte, A.-M.; Ferro, S.; De Luca, L.; Lo Surdo, G.; Morreale, F.; Pannecouque, C.; Balzarini, J.; Chimirri, A. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22* (4), 1459–1467.
- (5) Singh, A.; Yadav, D.; Yadav, M.; Dhamanage, A.; Kulkarni, S.; Singh, R. K. *Chem. Biol. Drug Des.* **2015**, *85* (3), 336–347.
- (6) Melnyk, P.; Vingtdoux, V.; Burlet, S.; Eddarkaoui, S.; Grosjean, M.-E.; Larchanché, P.-E.; Hochart, G.; Sergheraert, C.; Estrella, C.; Barrier, M.; Poix, V.; Plancq, P.; Lannoo, C.; Hamdane, M.; Delacourte, A.; Verwaerde, P.; Buée, L.; Sergeant, N. *ACS Chem. Neurosci.* **2015**, *6* (4), 559–569.
- (7) Vangavaragu, J. R.; Valasani, K. R.; Gan, X.; Yan, S. S. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *76*, 506–516.
- (8) Xiang, P.; Zhou, T.; Wang, L.; Sun, C.-Y.; Hu, J.; Zhao, Y.-L.; Yang, L. *Molecules* **2012**, *17* (1), 873–883.
- (9) Menteşe, E.; Ülker, S.; Kahveci, B. *Chem. Heterocycl. Compd.* **2015**, *50* (12), 1671–1682.
- (10) Gaba, M.; Singh, S.; Mohan, C. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *76*, 494–505.
- (11) Goebel, M.; Wolber, G.; Markt, P.; Staels, B.; Unger, T.; Kintscher, U.; Gust, R. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18* (16), 5885–5895.
- (12) Seth, P. P.; Miyaji, A.; Jefferson, E. A.; Sannes-Lowery, K. A.; Osgood, S. A.; Propp, S. S.; Ranken, R.; Massire, C.; Sampath, R.; Ecker, D. J.; Swayze, E. E.; Griffey, R. H. *J. Med. Chem.* **2005**, *48* (23), 7099–7102.
- (13) Zhou, S.; Rynearson, K. D.; Ding, K.; Brunn, N. D.; Hermann, T. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21* (20), 6139–6144.
- (14) Mahmoud, A. H.; Elsayed, M. S. A.; ElHefnawi, M. *Med. Chem. Res.* **2013**, *22* (4), 1866–1883.
- (15) Sperandio, D.; Gangloff, A. R.; Litvak, J.; Goldsmith, R.; Hataye, J. M.; Wang, V. R.; Shelton, E. J.; Elrod, K.; Janc, J. W.; Clark, J. M.; Rice, K.; Weinheimer, S.; Yeung, K.-S.; Meanwell, N. A.; Hernandez, D.; Staab, A. J.; Venables, B. L.; Spencer, J. R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12* (21), 3129–3133.
- (16) Katz, B. A.; Clark, J. M.; Finer-Moore, J. S.; Jenkins, T. E.; Johnson, C. R.; Ross, M. J.; Luong, C.; Moore, W. R.; Stroud, R. M. *Nature* **1998**, *391* (6667), 608–612.
- (17) El Diwani, I. H.; Abdel-Mohsen, H. T.; Salama, I.; Ragab, F. A.; Ramla, M. M.; Galal, S. A.; Abdalla, M. M.; Abdel-Wahab, A.; El Demellawy, M. A. *Chem. Pharm. Bull.* **2014**, *62* (9), 856–866.
- (18) Parker, M. A.; Satkiewicz, E.; Hermann, T.; Bergdahl, B. M. *Molecules* **2011**, *16* (1), 281–290.
- (19) Ding, K.; Wang, A.; Boerneke, M. a; Dibrov, S. M.; Hermann, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24* (14), 3113–3117.
- (20) Dibrov, S. M.; Ding, K.; Brunn, N. D.; Parker, M. A.; Bergdahl, B. M.; Wyles, D. L.; Hermann, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109* (14), 5223–5228.
- (21) Parsons, J.; Castaldi, M. P.; Dutta, S.; Dibrov, S. M.; Wyles, D. L.; Hermann, T. *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5* (11), 823–825.

- (22) Lukavsky, P. J.; Kim, I.; Otto, G. A.; Puglisi, J. D. *Nat. Struct. Biol.* **2003**, *10* (12), 1033–1038.
- (23) Whitehead, D. C.; Travis, B. R.; Borhan, B. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47* (22), 3797–3800.
- (24) Emmanuvel, L.; Ali Shaikh, T. M.; Sudalai, A. *Org. Lett.* **2005**, *7* (22), 5071–5074.
- (25) Bataille, C. J. R.; Donohoe, T. J. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40* (1), 114–128.
- (26) Plietker, B.; Niggemann, M.; Pollrich, A. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2* (8), 1116–1124.
- (27) Sisquella, X.; de Pourcq, K.; Alguacil, J.; Robles, J.; Sanz, F.; Anselmetti, D.; Imperial, S.; Fernández-Busquets, X. *FASEB J.* **2010**, *24* (11), 4203–4217.
- (28) Riedl, R.; Tappe, R.; Berkessel, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120* (35), 8994–9000.
- (29) Mbere-Nguyen, U.; Ung, A. T.; Pyne, S. G. *Tetrahedron* **2010**, *66* (23), 4133–4143.
- (30) *o*-Phenylenediamine [MAK Value Documentation, 1999]. The MAK Collection for Occupational Health and Safety. **2012**, 216–235.
- (31) Gyback, H.; Malmström, J.; Terp, E. G. 2-carboxamide-4-piperazinyl-benzofuran derivative. WO2012/087229, **2012**.
- (32) Feng, J.; Gwaltney, S. L.; Wallace, Mi. B.; Zhang, Z. DIPEPTIDYL PEPTIDASE INHIBITORS. US2005/0272765, **2005**.
- (33) Paulsen, R. B.; Seth, P. P.; Swayze, E. E.; Griffey, R. H.; Skalicky, J. J.; Cheatham, T. E.; Davis, D. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107* (16), 7263–7268.
- (34) Perez-Medrano, A.; Nelson, D. W.; Carroll, W. A.; Kort, M. E.; Gregg, R. J.; Voight, E. A.; Jarvis, M. F. THE USE OF SELECTIVE P2X7 RECEPTOR ANTAGONISTS. WO 2006/086229, **2006**.
- (35) Tani, J.; Mushika, Y.; Yamaguchi, T. *Chem. Pharm. Bull.* **1982**, *30* (10), 3530–3543.
- (36) Mikhailopulo, I. A.; Sivets, G. G. *Helv. Chim. Acta* **1999**, *82* (11), 2052–2065.
- (37) Masjost, B.; Ballmer, P.; Borroni, E.; Zürcher, G.; Winkler, F. K.; Jakob-Roetne, R.; Diederich, F. *Chem. A Eur. J.* **2000**, *6* (6), 971–982.
- (38) Jarkas, N.; Mcconathy, J.; Voll, R. J.; Goodman, M. M. *J. Med. Chem.* **2005**, *48* (13), 4254–4265.
- (39) Mavel, S.; Meheux, N.; Guilloteau, D.; Emond, P. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18* (1), 236–241.
- (40) Jarkas, N.; Voll, R. J.; Williams, L.; Votaw, J. R.; Owens, M.; Goodman, M. M. *J. Med. Chem.* **2008**, *51* (2), 271–281.
- (41) Parhi, A. K.; Wang, J. L.; Oya, S.; Choi, S.-R.; Kung, M.-P.; Kung, H. F. *J. Med. Chem.* **2007**, *50* (26), 6673–6684.
- (42) Tomás, C. Síntesi de nous derivats de benzimidazole amb potencials propietats antivirals, Trabajo Final de Máster, Universitat de Barcelona, **2015**.

Capítulo 2

Capítulo 2: Evaluación de los ligandos mediante ensayos biofísicos y experimentos de *footprinting* e inhibición

El trabajo que se resume en este capítulo se divide en dos bloques de experimentos:

Con el objetivo de ofrecer la imagen más completa posible de la interacción de los ligandos con el RNA, se han combinado técnicas biofísicas como las espectroscopias de UV, DC y fluorescencia, y la calorimetría de titulación isotérmica (ITC) con técnicas de sondeo químico (*footprinting*). Las primeras permiten estudiar la interacción con segmentos concretos del RNA y poder determinar los correspondientes parámetros termodinámicos. El sondeo químico ofrece una visión más general y complementaria, aunque más compleja de interpretar, del grado de alteración de la estructura completa. Además, como se verá, los resultados de estos últimos experimentos han sido de utilidad para rediseñar los experimentos biofísicos.

Por otro lado, también se han llevado a cabo estudios de actividad antiviral de los derivados de aminobenzimidazol. En primer lugar, se han realizado experimentos *in vitro* con los que determinar la inhibición de la traducción mediada por IRES, en FMDV y HCV. En una segunda fase, se ha evaluado la inhibición de la replicación viral y la expresión proteica en células infectadas con FMDV.

Los experimentos de inhibición y de *footprinting* se han llevado a cabo en colaboración con el grupo de la Prof.^a Encarnación Martínez Salas del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa en Madrid, en el marco de un proyecto del programa Consolider Ingenio 2010-15 (*An integrated approach to post-transcriptional regulation of gene expression and its role in human disease, RNAREG*).

2.1 Ensayos biofísicos sobre segmentos de los IRES de FMDV y HCV

2.1.1 Planteamiento inicial y elección de las dianas

Como ya se ha explicado, el presente trabajo tiene como principal objetivo ahondar en el estudio de la inhibición de la traducción dependiente de IRES en el virus de fiebre aftosa (FMDV), siguiendo los precedentes en HCV (véase introducción), a la vez que tratar de profundizar en el mecanismo de inhibición del mismo. Para ello, se partió de la hipótesis que los IRES, a pesar de las grandes diferencias en estructura y tamaño, presentan motivos estructurales comunes, altamente conservados a pesar de la variabilidad de las secuencias, sobre los que pivota la regulación de la traducción independiente de *cap*.

Apoyando esta hipótesis, se ha visto recientemente que un IRES completamente distinto del de HCV, el del virus de Seneca Valley (SVV), muestra también un elemento estructural que regula la función del IRES a modo de conmutador (*switch*), con secuencia diferente pero que responde al mismo tipo de estructura secundaria que el de HCV¹. La equivalencia funcional es tal, que los conmutadores pueden ser intercambiados en uno u otro RNA, manteniendo la actividad de los IRES. Prueba que la funcionalidad se debe a la estructura secundaria, los ligandos que inhiben el IRES de HCV por unión al elemento conmutador, también interactúan aunque con una afinidad menor con secuencias análogas al subdominio IIa de HCV IRES de otros virus como SVV. Más recientemente, se han identificado elementos similares en los IRES de otros virus².

En nuestro caso, se empezó por seleccionar los segmentos del RNA que se emplearían como blancos de los experimentos biofísicos. En este tipo de experimentos (UV, fluorescencia, calorimetría, etc), se debían elegir segmentos de pequeño tamaño (20-50 nucleótidos) con los que estudiar la interacción de los ligandos. Como se verá, las técnicas de sondeo químico (*footprinting*) son las únicas que permiten estudiar la interacción con el RNA completo, pero suelen ser más útiles para determinar el grado de perturbación de la estructura que en delimitar el lugar de interacción.

Como ya se ha explicado, la actividad del IRES de HCV descansa en el bucle interno del subdominio IIa, que es el blanco de los aminobenzimidazoles que inhiben la traducción independiente de caperuza. Aunque los IRES de HCV y FMDV

son muy distantes genéticamente, el dominio III de FMDV cumple un rol crucial en la estructuración del IRES, que recuerda al del dominio II en el IRES de HCV^{3,4}. De la inspección de la estructura secundaria, destaca la similitud del bucle hexanucleotídico A₁₆₆ACUCC₁₇₁ del tallo-lazo 3a (SL3a, véase **Fig. 2.1**) del dominio III con el bucle pentanucleotídico A₅₃ACUA₅₇ en el segmento IIa del de HCV, que es donde se unen los inhibidores 2-aminobenzimidazol. A diferencia de HCV, la secuencia del bucle en FMDV no se encuentra altamente conservada, pero no acepta inserciones ni deleciones. De la necesaria conservación del número de nucleósidos se deduce que el motivo es imprescindible para la correcta función del IRES⁵. Como se verá más adelante, los experimentos de sondeo químico de tipo SHAPE pusieron de manifiesto que SL3a era una de las regiones cuya estructura resultaba más alterada en presencia de los ligandos. Por todo ello, el segmento SL3a fue elegido como el primero de los blancos con el que estudiar la interacción de los 2-aminobenzimidazoles mediante las técnicas biofísicas.

El análisis de los resultados del experimento SHAPE (apartado 2.2.1) motivó el estudio de un segundo segmento del IRES de fiebre aftosa, en concreto, el *loop* rico en C (CRL, ver **Fig. 2.1**) cuya correcta estructuración es también importante para la función del IRES^{4,6}.

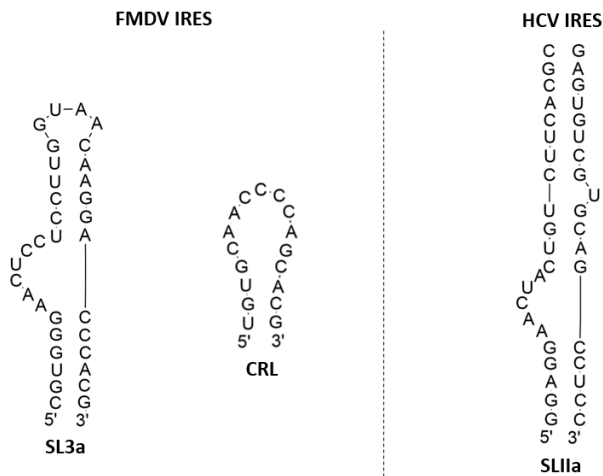


Fig. 2.1 Secuencias de RNA utilizadas como diana en los ensayos biofísicos.

Existe un gran número de técnicas biofísicas que permiten el estudio de la interacción de moléculas pequeñas con los ácidos nucleicos y, más concretamente, con el RNA⁷⁻¹⁰. Entre el amplio abanico de posibilidades, el estudio de la interacción

RNA-ligando se inició con las curvas de fusión por UV y los espectros de dicroísmo circular, dos técnicas habituales en el estudio de los ácidos nucleicos^{7,8}.

Dado que los ensayos biofísicos iniciales no aportaban información suficiente sobre la interacción de los ligandos con el RNA, se exploraron otras técnicas para su estudio. Se optó primero por intentar determinar la afinidad aprovechando la fluorescencia intrínseca de los propios ligandos. La realización de estos ensayos presentó ciertas dificultades que obligaron a modificar el diseño de los experimentos. La nueva estrategia consistió en la utilización de RNAs fluorescentes, marcados con 2-aminopurina, un procedimiento ya descrito para estudiar la interacción de los derivados de 2-aminobenzimidazol con HCV IRES^{11,12}. Mediante esta estrategia, se pudieron determinar las afinidades de los ligandos por los segmentos de FMDV IRES. A la vez, también se estudió la interacción con la diana de HCV IRES, a modo de control. Finalmente, se realizó una caracterización termodinámica completa mediante la titulación por calorimetría isotérmica (ITC) de la interacción de los compuestos por las dianas SL3a de FMDV IRES y SLIIa de HCV IRES (**Fig. 2.1**), y se intentó determinar la estequiometría de uno de los complejos SL3a-ligando mediante espectrometría de masas.

2.1.2 Evaluación de la interacción RNA-ligando mediante experimentos de fusión

Uno de los ensayos habituales en el estudio de la estructura de los ácidos nucleicos son los experimentos de fusión. Éstos permiten evaluar la estabilidad térmica de la estructura generada al hibridarse dos o más cadenas oligonucleotídicas. La estabilidad de la estructura hibridada depende de la propia secuencia nucleotídica y del medio iónico. Las fuerzas responsables de la estabilidad y cohesión de la estructura son esencialmente las interacciones π - π debidas al apilamiento entre bases y la formación de puentes de hidrógeno, canónicos o no, entre los pares de bases de cada escalón de la doble hélice. Como resultado, la estabilidad de la doble cadena depende de la longitud, del grado de complementariedad de las dos cadenas, así como del porcentaje de pares guanina-citosina. Entre los factores debidos al medio, se incluyen el pH, la fuerza iónica y la propia naturaleza del tampón¹³. Al incrementar la temperatura, aumenta la energía hasta provocar la completa separación de las cadenas. Este proceso se puede

realizar mediante un calentamiento lento y gradual, de manera que la deshibridación tenga lugar de un modo cooperativo¹⁴.

La disociación de las cadenas se puede monitorizar mediante la medida de cualquier propiedad física que cambie con la variación de la temperatura. Existen diversas técnicas para realizar este seguimiento, como son la espectroscopía UV, el dicroísmo circular, la fluorescencia o la RMN. Probablemente, la metodología más empleada para monitorizar la transición entre la estructura hibridada y la de cadenas separadas es la que registra la variación de la absorbancia UV. La variación de absorbancia que se observa habitualmente al calentar un dúplex es positiva, debido a la pérdida del efecto hipocrómico¹⁵ que producen las interacciones electrónicas de apilamiento entre nucleobases. Normalmente, la representación de la variación de absorbancia frente a la temperatura es ajustable a un modelo sigmoideal, cuyo punto de inflexión corresponde a la llamada temperatura de fusión, T_m (**Fig. 2.2**). La T_m define el valor de temperatura en el punto medio de este proceso de desnaturalización, en el que un 50% del dúplex está hibridado y un 50%, desestructurado⁷. Cuanto más elevada es la temperatura de fusión, mayor es la estabilidad térmica de la estructura. Aunque la estabilidad térmica no se corresponde estrictamente con la estabilidad termodinámica, en muchos casos, se correlacionan.

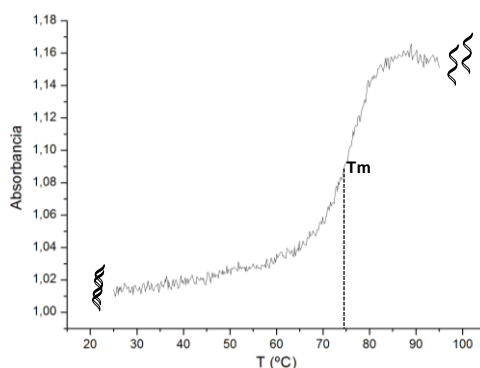


Fig. 2.2 Ejemplo de curva de fusión: desnaturalización de la diana SL3a de FMDV IRES.

Los experimentos de fusión también pueden ser empleados para estimar la afinidad de ligandos por una determinada estructura diana. Asumiendo que la transición tiene lugar entre un estado estructurado y uno desestructurado, y que en el estado desnaturalizado no se produce interacción ligando-diana⁷, un incremento en la T_m del complejo con respecto a la de la diana libre ($\Delta T_m > 0$) es

indicativo de una interacción favorable entre el ligando y la diana, mientras que una variación nula o negativa se podría interpretar como el resultado de una escasa o nula afinidad.

2.1.2.1 Diseño experimental de las curvas de fusión

En estos primeros experimentos de fusión por UV se determinó la estabilización térmica inducida por los ligandos Isis-11 e IRAB-1 sobre las dianas SL3a y CRL del IRES de fiebre aftosa.

La composición de las disoluciones para llevar a cabo los experimentos de fusión era una mezcla equimolar 2 μ M de RNA y de ligando, 0,1 mM de EDTA, 10 mM de cacodilato sódico y 150 mM de NaCl. Estas condiciones salinas y de tampón habían sido descritas previamente en el estudio de las interacciones de los aminoglicósidos con el RNA ribosomal⁹. El pH de las disoluciones se ajustó a tres valores distintos (6,5, 7,0 y 7,5) con la intención de evaluar el efecto del estado de protonación de los ligandos, cuyos pK_a se sitúan entre 5,8 y 6,5 (debido al grupo guanidinio, véase **Fig. 2.3**). Como se explica en la parte experimental (véase capítulo 1, apartado 3), los valores de pK_a de los compuestos ensayados se determinaron mediante el registro de espectros de UV a diferentes pHs.

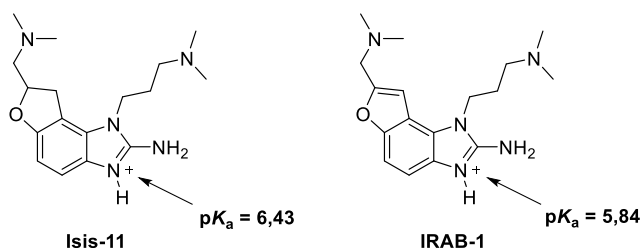


Fig. 2.3 Estructuras de Isis-11 e IRAB-1 indicando el protón ácido del grupo guanidinio y el correspondiente valor de pK_a .

Antes de llevar a cabo los experimentos, las muestras se sometieron a un proceso de desnaturalización y renaturalización, para producir la correcta estructuración del complejo, calentando las muestras a 90°C y dejando atemperar hasta T ambiente lentamente. Tras esta etapa de preparación, se estudió el proceso de desnaturalización producido por el incremento de temperatura entre 25 y 95°C a una velocidad de 0,5°C/min. La variación de absorbancia se registró a 260 nm, longitud de onda correspondiente al máximo de absorción de los ácidos nucleicos.

Los experimentos de fusión se realizaron, como mínimo, por duplicado y tomando el valor promedio como el valor de Tm.

2.1.2.2 Resultados con los segmentos SL3a y CRL del IRES de FMDV

En la **tabla 2.1** se resumen los resultados obtenidos en los experimentos de fusión con la diana SL3a perteneciente a FMDV IRES.

		Fusiones SL3a (FMDV IRES)					
		pH 6,5		pH 7,0		pH7,5	
		Tm (°C)	ΔTm (°C)	Tm (°C)	ΔTm (°C)	Tm (°C)	ΔTm (°C)
SL3a (Blanco)		75,3	-	75,0	-	75,1	-
Isis-11	1 eq	75,0	-0,3	75,0	0,0	74,9	-0,2
	5 eq	75,1	-0,2	75,6	0,6	74,7	-0,4
IRAB-1	1 eq	74,9	-0,4	75,6	0,6	74,7	-0,4
	5 eq	74,7	-0,6	75,1	0,1	74,9	-0,2

Tabla 2.1 Resultado de las curvas de fusión por espectroscopia UV con la diana SL3a.

Los valores de Tm obtenidos parecen cuestionar la existencia de una interacción entre ligando y RNA, o cuanto menos, en caso de existir, todo indicaría que es débil o no afecta la estabilidad térmica del complejo. De hecho, las mínimas variaciones en las temperaturas de fusión ($|\Delta T_m| \leq 0,5^\circ\text{C}$) se encuentran dentro del margen de error de la técnica. De igual manera, tampoco se observa una influencia del pH sobre la interacción. Con la intención de forzar la interacción, se realizaron otros ensayos con 5 equivalentes de ligando respecto al RNA, pero tampoco aquí los valores de Tm variaron significativamente de los anteriores.

Las pequeñas variaciones de Tm observadas en las curvas de fusión por UV motivaron la búsqueda de alternativas. Así, se planteó realizar las curvas de fusión por dicroísmo circular (DC). Como se explicará en el siguiente apartado, esta técnica espectroscópica mide la diferente absorción de las componentes izquierda y derecha de luz polarizada circularmente al hacerla pasar a través de una muestra ópticamente activa y está especialmente indicada para apreciar cambios estructurales. La magnitud que se mide aquí, la elipticidad⁸, presenta un máximo positivo a 267 nm para los RNAs estudiados, por lo que fue ésta la longitud de onda elegida para registrar los experimentos de fusión.

En las curvas de fusión, la desnaturalización de la estructura producida por el aumento de la temperatura conduce a un descenso de la elipticidad. Los experimentos se realizaron a pH 7,5 con una concentración de RNA 5 μ M y con una proporción equimolar de los ligandos. Los resultados se muestran en la **tabla 2.2**.

	Fusiones por DC de SL3a (FMDV IRES)	
	Tm (°C)	Δ Tm (°C)
SL3a (Blanco)	75,1	-
Isis-11	74,4	-0,7
IRAB-1	74,4	-0,7

Tabla 2.2 Resultado de las curvas de fusión por espectroscopia DC con la diana SL3a.

Como se aprecia, los resultados de las fusiones por dicroísmo circular no fueron muy diferentes a los obtenidos por UV. Los pequeños valores de Δ Tm (-0,7°C) en presencia de los dos ligandos son totalmente comparables a los observados en las curvas de fusión por UV ($|\Delta$ Tm \leq 0,5°C). Nuevamente, a la luz de estos resultados, no se podía confirmar la interacción entre los ligandos y el RNA.

Los experimentos SHAPE (apartado 2.2.1) mostraron variaciones de reactividad en un segmento de la zona apical del dominio III donde se halla un *loop* rico en C (CRL), por lo que también fue elegida como diana. Para realizar una primera evaluación de la interacción de los ligandos con la diana CRL, se realizaron curvas de fusión por UV. Se optó por realizar las curvas de fusión en las condiciones anteriores, sólo a pH 7,5. La **tabla 2.3** presenta un resumen de los datos.

	Fusiones CRL (FMDV IRES)			
	50 mM NaCl		150 mM NaCl	
	Tm (°C)	Δ Tm (°C)	Tm (°C)	Δ Tm (°C)
CRL (Blanco)	68,9	-	73,6	-
Isis-11	67,4	-1,5	71,3	-2,3
IRAB-1	67,7	-1,2	73,5	-0,1

Tabla 2.3 Resultado de las curvas de fusión por espectroscopia UV con la diana CRL.

Los primeros datos obtenidos con esta nueva diana, a 150 mM NaCl, mostraron divergencia de resultados entre Isis-11 e IRAB-1. Mientras que IRAB-1 mostró un efecto prácticamente nulo, Δ Tm= -0,1°C, Isis-11 redujo la Tm en algo más de 2°C (Δ Tm= -2,3°C). Para comprobar si la elevada fuerza iónica era la causa que

enmascaraba la interacción de nuestros ligandos con el RNA, se repitieron los experimentos con una concentración salina menor, a 50 mM de NaCl. Sorprendentemente, los resultados obtenidos mostraron una tendencia inversa entre ambos ligandos. En presencia de IRAB-1, se observó un leve descenso de T_m , mientras que Isis-11 moderó la reducción de la temperatura de fusión con respecto a lo observado a 150 mM de NaCl.

En conclusión, los resultados obtenidos en una u otra diana no parecían mostrar una clara interacción entre ligando y RNA. Dado que ello no se correspondía con los prometedores datos obtenidos en los ensayos de inhibición (véase apartado 2.3), se optó por emplear otras técnicas con las que poner de manifiesto la afinidad de nuestras moléculas por el RNA.

2.1.3 Estudio de la interacción RNA-ligando mediante ensayos por dicroísmo circular

El dicroísmo circular es una técnica espectroscópica que mide la diferente absorción de las componentes derecha e izquierda de un haz de luz polarizado circularmente al hacer pasar éste a través de una muestra ópticamente activa. Como resultado de la interacción con las moléculas quirales, el haz de luz queda polarizado elípticamente. Por ello, en el dicroísmo circular se mide habitualmente la elipticidad^{16,17}, θ , normalmente expresada en miligrados (mdeg). En el caso de los ácidos nucleicos, el carácter asimétrico de las unidades nucleosídicas es el origen de actividad óptica. Además, la hibridación de estos biopolímeros para formar estructuras secundarias como las hélices, asimétricas en sí mismas, contribuye a incrementar aún más la actividad óptica¹⁶. El dicroísmo circular es una técnica de análisis rápida, no destructiva y de gran sensibilidad. Como el DC es muy sensible a pequeñas variaciones en la estructura, se puede utilizar para monitorizar la valoración con ácidos, sales o ligandos¹⁸. En los ácidos nucleicos, el rango de longitudes de onda habitual para el estudio por DC se corresponde con el de absorción máxima de las nucleobases, por lo que se pueden registrar espectros entre 200 y 320 nm¹⁹.

2.1.3.1 Diseño experimental de los ensayos de dicroísmo circular

Estos experimentos se llevaron a cabo en dos fases. En la primera de ellas, se registraron los espectros de dicroísmo circular de la diana SL3a en presencia de 1 y 5 equivalentes de los ligandos Isis-11 e IRAB-1 para evaluar de manera cualitativa la interacción. De acuerdo con los primeros ensayos, se realizaron unos segundos experimentos de valoración del RNA con los ligandos, con el objetivo de determinar cuantitativamente la interacción ligando-diana y calcular un valor de afinidad, en este caso, en forma de EC_{50} . En ambos experimentos, se evaluó el efecto del grado de la protonación de los ligandos, llevándolos a cabo a diferentes pHs.

En estos ensayos, la composición de las disoluciones fue la misma que en las fusiones por DC, variando únicamente la concentración de ligando, 5 o 25 μ M de ligando (Isis-11 o IRAB-1). Los experimentos se realizaron también a tres diferentes pHs (6,5, 7,0 y 7,5). Asimismo, la preparación de las muestras siguió el mismo procedimiento de desnaturalización y renaturalización descrito para las curvas de fusión.

2.1.3.2 Resultados con el segmento SL3a del IRES de FMDV

Los espectros de dicroísmo de los complejos RNA-ligando en proporción equimolar revelaron leves diferencias de elipticidad con respecto al RNA libre, en la zona del máximo positivo (aprox. 267 nm), en los tres diferentes pHs (**Fig 2.4**).

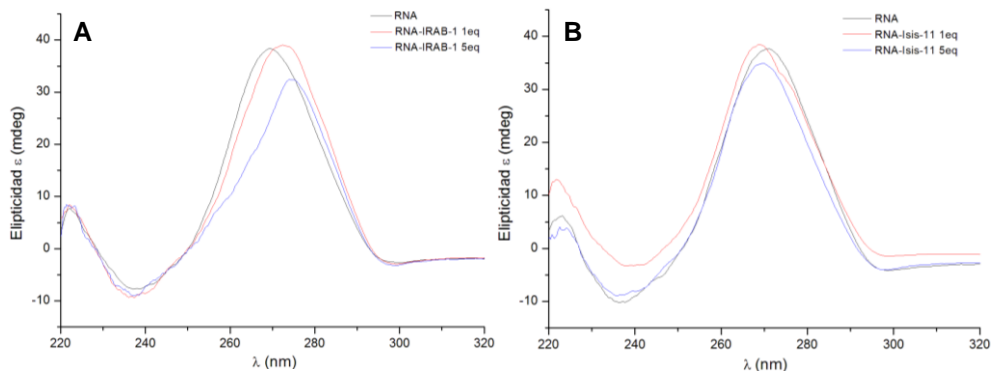


Fig. 2.4 Superposición de espectros de SL3a con diferentes equivalentes de IRAB-1 (A) e Isis-11 (B) a pH 6,5.

Al incrementar hasta cinco el número de equivalentes de los ligandos, se observaron descensos significativos de elipticidad que confirmaban la interacción con el RNA.

El resultado de estos primeros espectros motivó la realización de los experimentos de valoración del RNA, con el objeto de poder determinar las afinidades de los ligandos. La composición del medio para estos nuevos ensayos fue la misma que en los anteriores espectros, a dos valores diferentes de pH, 6,5 y 7,5.

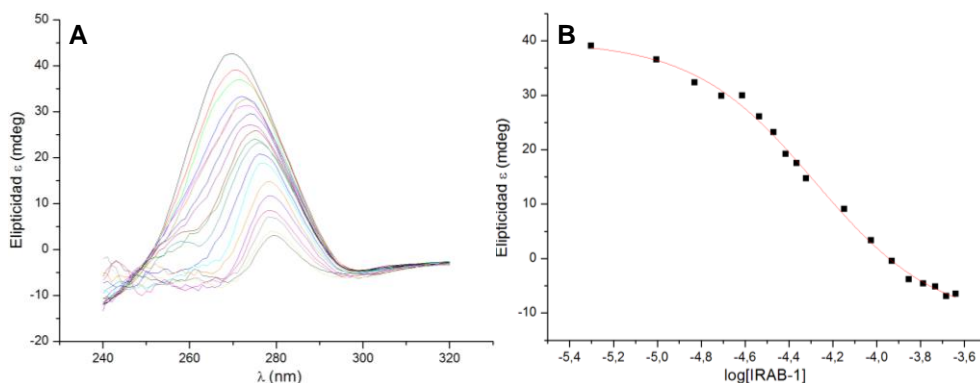


Fig. 2.5 A) Superposición de espectros de SL3a; B) Representación de la elipticidad a λ : 270 nm frente al logaritmo de la concentración de IRAB-1 (pH 6,5).

Los ensayos de valoración consistieron en la adición de cantidades crecientes de ligando, entre 5 y 650 μM , sobre la disolución del RNA. El descenso de elipticidad en la zona del máximo inducido por el ligando representado frente al logaritmo de la concentración del ligando dio lugar a una curva, la cual fue ajustada a un modelo sigmoideal para calcular el valor de EC_{50} (Fig 2.5). En la **tabla 2.4** se resumen los resultados obtenidos.

	FMDV SL3a EC_{50} (μM)	
	pH 6,5	pH 7,5
Isis-11	348 \pm 9	254 \pm 7
IRAB-1	51,9 \pm 0,4	52,0 \pm 1,0

Tabla 2.4 Resultados de las valoraciones por DC.

Los resultados muestran una diferencia notable de afinidad entre IRAB-1 e Isis-11, ya que IRAB-1 presenta afinidades entre 5 y 7 veces superiores a las de Isis-11. El efecto del pH sobre las afinidades de los dos compuestos es dispar, pero puede relacionarse con los valores de pK_a . Mientras que para IRAB-1, el efecto del pH es

prácticamente nulo, en el caso de Isis-11, la interacción se encuentra favorecida a pH 7,5 con respecto a pH 6,5. Se deduce que IRAB-1, que es la molécula con menor pK_a (5,84), muestra mayor afinidad que Isis-11, cuyo grupo guanidinio tiene un pK_a más alto (6,43). También, la afinidad de Isis-11 aumenta con el pH. Según estos datos, todo parecería indicar que la afinidad de los ligandos disminuye con el grado de protonación del grupo guanidinio: mayor afinidad, a menor pK_a y a mayor pH. Con el objeto de corroborar estos resultados preliminares, se planteó la utilización de otras técnicas alternativas que permitieran la determinación de afinidades con mayor exactitud, ya que la medida de elipticidad en estos experimentos era muy baja. Dado que los compuestos eran fluorescentes, se pensó que podría aprovecharse esta propiedad para el registro de curvas de valoración por fluorescencia.

2.1.4 Determinación de la afinidad ligando-RNA mediante valoraciones por fluorescencia

La fluorescencia tiene lugar cuando una molécula es excitada por absorción de luz de una longitud de onda determinada y tras un corto período de tiempo, generalmente en el rango de los nanosegundos, se relaja mediante la emisión de luz de una longitud de onda superior. Habitualmente, el proceso de relajación se produce por medios no radiantes, como la cesión de calor al medio. En un principio, la molécula o fluoróforo se encuentra en su estado electrónico fundamental y al absorber la radiación, accede a uno de los niveles vibracionales de un estado excitado. Tras cesar la excitación, el fluoróforo experimenta la relajación, que consta de dos etapas: la termalización y la emisión. En la termalización, el fluoróforo desciende al nivel vibracional inferior del estado excitado sin emisión de radiación. El tiempo de vida de un fluoróforo corresponde al tiempo que permanece en este nivel vibracional del estado excitado. Transcurrido este espacio de tiempo, el fluoróforo se relaja hasta alcanzar uno de los niveles vibracionales del estado fundamental mediante la emisión de luz. Las múltiples transiciones entre estados vibracionales motivan que las bandas de emisión fluorescente sean normalmente anchas. A diferencia de la absorción de luz que sólo depende del coeficiente de extinción, la fluorescencia depende de diversos parámetros como son el rendimiento cuántico, la polarización, el tiempo de vida del estado excitado y de la longitud de onda de excitación^{20,21}.

Aparte de los parámetros mencionados, la fiabilidad de las medidas de fluorescencia, especialmente en análisis cuantitativos, requiere del control sobre un fenómeno que según la naturaleza del fluoróforo y las condiciones del experimento se manifiesta en menor o mayor medida, y que es la extinción o *quenching*. El *quenching* se define como la reducción de la intensidad de fluorescencia de una sustancia causada por la relajación del estado excitado al estado fundamental por mecanismos alternativos a la emisión de luz (*dynamic quenching*) o por la inhibición de la formación del estado excitado (*static quenching*)²². Esta reducción de la emisión fluorescente puede tener lugar por colisiones desactivantes del fluoróforo con el disolvente o por su interacción con *quenchers*, generando complejos o colisiones desactivantes²⁰. En el caso que el *quenching* sea limitado se puede corregir incrementando el tiempo entre medidas y la homogeneización mediante agitación, para favorecer la disociación de los complejos desactivantes.

La fluorescencia es una técnica sensible y rápida, lo cual explica que exista en la bibliografía un amplio número de ejemplos en el estudio de la interacción de pequeñas moléculas con RNA^{23–25}. Según el caso a estudiar, existen diversas técnicas basadas en la fluorescencia, que abarcan desde la simple titulación de un compuesto fluorescente y registro de la variación de la fluorescencia, al cribado masivo de ligandos mediante la medida de fluorescencia en multiplacas o *microarrays*¹⁰.

2.1.4.1 Precedentes en el estudio de la interacción de ligandos sobre el subdominio IIa del IRES de HCV

En la bibliografía, existían precedentes del estudio de la interacción de ligandos 2-aminobenzimidazol sobre el subdominio IIa del IRES de hepatitis C^{11,12,26,27}. Concretamente, se han llevado a cabo experimentos de titulación por adición de cantidades crecientes del ligando sobre un RNA que incorpora 2-aminopurina como marcador fluorescente en una posición determinada y experimentos de tipo FRET mediante RNAs doblemente marcados. La interacción del ligando con el RNA produce cambios estructurales que inducen variaciones en la intensidad de fluorescencia de los fluoróforos^{11,12,27}. Para estudiar la interacción de Isis-11 con el dominio IIa del IRES de HCV^{11,12}, se introdujo 2-aminopurina en una posición cercana al lugar de unión, sustituyendo la adenina 54. Como ya se explicó (véase

introducción, apartado 1.4.3), la adición del ligando provoca un cambio conformacional de la protuberancia expulsando el residuo 54 hacia el exterior. Esta modificación conformacional induce un incremento de la intensidad de fluorescencia, ya que al ser expulsada hacia el exterior, la 2-aminopurina deja de experimentar el *quenching* provocado por el apilamiento con las otras nucleobases. Las variaciones de fluorescencia, ajustadas a una curva de dosis-respuesta, permitieron determinar las afinidades de los ligandos, que en este caso, se sitúan en el rango micromolar bajo (Fig. 2.5).

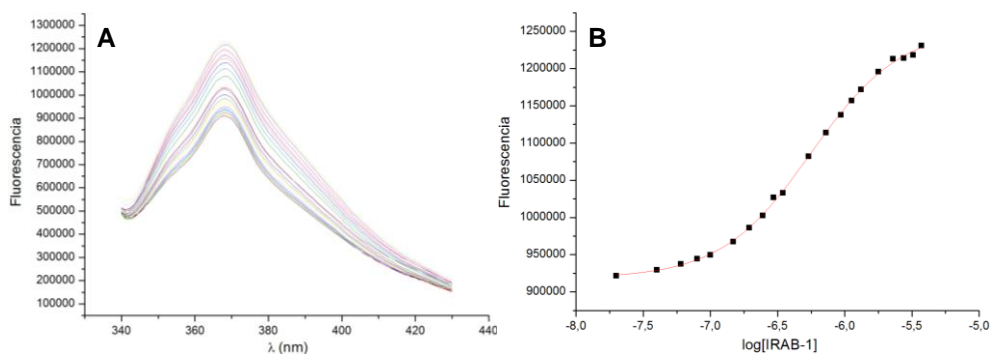


Fig. 2.5 A) Superposición de espectros de fluorescencia de SLIIa/AP54; B) Representación de la intensidad de fluorescencia a λ : 365 nm frente al logaritmo de la concentración de IRAB-1.

Por su parte, los experimentos de transferencia de energía de Förster (FRET) realizados sobre HCV IRES, no sólo permitieron determinar la afinidad de los ligandos sino que además posibilitaron corroborar el cambio conformacional que inducen al unirse al subdominio IIa. En estos ensayos, es necesario que la diana de RNA esté doblemente marcada con dos fluoróforos. El criterio de selección para esta pareja de fluoróforos es que el espectro de emisión del primero se solape con el espectro de excitación del segundo, de tal manera que la excitación del primer fluoróforo acabe induciendo la emisión en el segundo, que es el llamado efecto Förster. Como la intensidad de emisión depende fuertemente de la distancia ($I \propto 1/r^{-6}$) entre los dos fluoróforos, el efecto Förster puede servir para monitorizar cambios conformacionales. En los experimentos FRET realizados sobre el subdominio IIa de HCV IRES se marcaron los extremos de la diana con cianinas. Las posiciones de los dos fluoróforos se eligieron partiendo de la estructura del subdominio IIa por rayos X, de manera que los cambios conformacionales producidos en la diana por unión del ligando situaran el par de marcas dentro del llamado radio de Förster, valor característico de distancia en cada par con que se

observa el fenómeno FRET. Por medio de este experimento, se realizó una valoración con Mg^{2+} con la intención de evaluar su efecto en la estructuración de la diana. Al aumentar la concentración de Mg^{2+} , se observaba el incremento de la intensidad de fluorescencia. Como esto sólo se podía explicar por el acercamiento de los dos fluoróforos, se confirmaba así que Mg^{2+} inducía al plegamiento de la estructura y a la consiguiente disminución del ángulo del codo (véase introducción, apartado 1.4.3). En cambio, la valoración con un ligando derivado de 2-aminobenzimidazol conducía a una reducción de la fluorescencia. Siguiendo el razonamiento anterior, como la disminución de la fluorescencia era debida al alejamiento de los fluoróforos, se interpretaba que la unión del ligando producía la apertura del ángulo entre las hélices, tal y como se había visto en las estructuras de RMN y rayos X. Por su elevada sensibilidad, los experimentos FRET han sido empleados para estudiar la afinidad por el segmento IIa de otras moléculas, como paso previo a su evaluación como inhibidores de la traducción dependiente de IRES en HCV²⁸.

2.1.4.2 Ensayos por fluorescencia intrínseca

2.1.4.2.1 Diseño de los experimentos de titulación por fluorescencia intrínseca

En las últimas etapas de preparación de los compuestos, se observó que tanto Isis-11 como IRAB-1 presentaban fluorescencia. Así, la primera opción que se barajó fue aprovechar esta propiedad intrínseca de los ligandos para evaluar la interacción con los dos segmentos del IRES de fiebre aftosa, SL3a y CRL, por medio de experimentos de titulación y medida de la variación de la fluorescencia de los ligandos. Para ello, se registraron en primer lugar los espectros de excitación y emisión de ambos compuestos, para hallar las longitudes de onda de excitación y emisión respectivas que permitirían la realización de los ensayos. Una vez determinadas (**Tabla 2.5**), se realizaron las valoraciones de los ligandos por adición de cantidades crecientes de RNA, hasta un total de 5 equivalentes con respecto al ligando, sobre una disolución 2 μ M del ligando, en el mismo tampón que los experimentos de fusión y DC. Como en los ensayos de dicroísmo circular, también se realizaron a pH 6,5 y 7,5. En este caso, la adición de los RNAs sobre los ligandos comportaba un descenso en la intensidad de emisión de los ligandos. Los valores de intensidad de fluorescencia del máximo de emisión se ajustaron a un modelo de

equilibrio 1:1, que permitió la determinación de las afinidades en forma de constantes de disociación (**Fig. 2.6**).

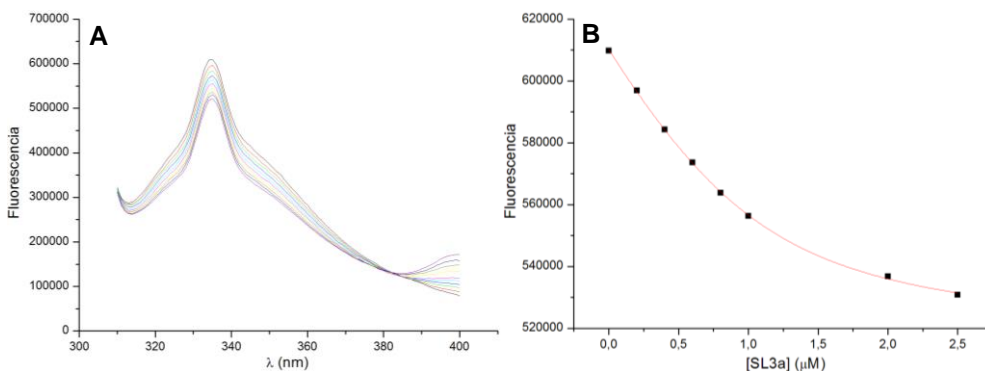


Fig. 2.6 A) Superposición de espectros de fluorescencia de Isis-11; B) Representación de los valores de fluorescencia a λ : 335 nm frente a la concentración de la diana SL3a de FMDV IRES y ajuste a una curva de afinidad.

2.1.4.2.2 Resultados con los segmentos SL3a y CRL del IRES de FMDV

Los resultados obtenidos se resumen en la siguiente **tabla 2.5**:

	Parámetros		K_d (μM) FMDV IRES			
	λ exc (nm)	λ em (nm)	SL3a		CRL	
			pH 6,5	pH 7,5	pH 6,5	pH 7,5
Isis-11	300	335	$7,3 \pm 1,3$	$0,29 \pm 0,05$	$5,8 \pm 2,1$	$0,6 \pm 0,2$
IRAB-1	280	312	$6,35 \pm 0,05$	$8,2 \pm 1,3$	$28,4 \pm 7,9$	$2,9 \pm 0,4$

Tabla 2.5 Longitudes de onda de excitación y emisión de los ligandos. Afinidades obtenidas por fluorescencia mediante valoración de los ligandos por adición de RNA, y registro de la fluorescencia.

En general, la mayoría de los valores de afinidad (K_d) obtenidos se sitúan en los rangos submicromolar y micromolar bajo. Comparando con los valores de EC_{50} que resultaban de los experimentos de fusión por DC (en estas condiciones, EC_{50} equivale a K_d), se observa que los valores aquí obtenidos son francamente inferiores. Esto podría atribuirse a la mejor sensibilidad en la medida de fluorescencia con respecto a la de DC y, también, a que las valores de fluorescencia permitieron un ajuste a un modelo de interacción 1:1. Comparando los ligandos, se observa que Isis-11 presenta, en general, mayores afinidades (menores K_d) que IRAB-1 por ambas dianas, a excepción de la diana SL3a de FMDV IRES a pH 6,5. A

similitud de lo observado en los experimentos de DC, la tendencia aquí es la de obtener mejores afinidades a pH 7,5. Por tanto, todo parece indicar que las mejores afinidades de Isis-11 y IRAB-1 por los RNAs ensayados se consiguen con un bajo grado de protonación del grupo guanidinio. Ello también explicaría que IRAB-1 mostrara una mejor afinidad que Isis-11 ya que el pK_a de su grupo guanidinio es menor (5,84 frente a 6,43 para Isis-11).

A pesar de los resultados obtenidos, la medida de la fluorescencia intrínseca de los derivados aminobenzimidazol para determinar afinidades no se mostró como un método suficientemente reproducible. Se observó que la intensidad de fluorescencia de los ligandos no era estable, ya que rápidamente aparecían efectos de *quenching*, obligando a dejar transcurrir hasta 7 minutos entre adiciones para minimizarlo. A esto hay que sumar el hecho que el número de puntos por valoración no podía ser muy elevado (< 10) debido al elevado gasto de RNA que suponía (se podía llegar a emplear un máximo de 5 eq de RNA con respecto al ligando) y porque si se incrementaba aumentaría la agregación. Por todo ello, tal y como se explica en el siguiente apartado, se consideró oportuno explorar otra metodología basada en fluorescencia para determinar la afinidad de forma más óptima. Como se verá, con esta otra metodología no sólo se consiguió el objetivo, sino que además permitió disponer de una imagen aproximada de cómo los ligandos interaccionaban con el segmento SL3a de IRES de FMDV.

2.1.4.3 Valoraciones con RNAs fluorescentes que incorporan 2-aminopurina

Las dificultades en la realización de las valoraciones mediante la medida de la fluorescencia intrínseca de los ligandos motivaron un cambio de metodología. Se decidió realizar las valoraciones sobre RNAs marcados con 2-aminopurina, un análogo fluorescente de adenina, siguiendo el procedimiento descrito en la bibliografía para el estudio de la interacción de los derivados 2-aminobenzimidazol con el subdominio IIa de HCV IRES^{11,12,27}. El marcaje con 2-aminopurina es un procedimiento descrito en diversas ocasiones para estudiar la interacción de moléculas pequeñas con RNA²⁹, ya que la sustitución de adenina por 2-aminoadenina supone una modificación mínima de la estructura. Además, si se sitúa la sonda fluorescente próxima al lugar de unión del ligando, la evolución de la fluorescencia permite determinar con mayor precisión y de forma selectiva la

interacción con un segmento concreto de RNA. En nuestro caso, dados los precedentes en el estudio del IRES de HCV, suponía poder comparar los valores de afinidad de nuestros ligandos con los anteriormente descritos, comprobando la reproducibilidad y validando así los resultados.

2.1.4.3.1 Elección de la posición de marcaje

A efectos de poder realizar la comparativa con los resultados publicados, se empezó trabajando con la diana de HCV. En esta diana se decidió introducir la marca fluorescente en la posición 54, siguiendo los ejemplos descritos anteriormente en la bibliografía^{11,12,27}, ya que ésta es una posición cercana al lugar de unión de los compuestos y que no alteraba la estructura del *bulge* (Fig. 2.7).

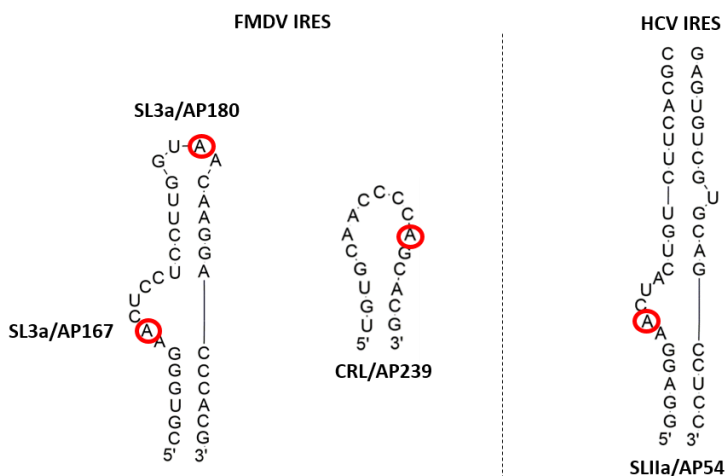


Fig. 2.7 Dianas marcadas con 2-aminopurina que han sido utilizadas en las valoraciones por fluorescencia. Se señalan con un círculo rojo las posiciones que incorporan 2-aminopurina.

En el caso de FMDV IRES, se utilizaron tres dianas fluorescentes correspondientes a los dos segmentos IRES ensayados anteriormente, SL3a y CRL. Se estudiaron dos dianas derivadas de la secuencia SL3a, la primera de ellas marcada en la protuberancia hexanucleotídica (SL3a/AP167) y la segunda en el *tetraloop* GNRA (SL3a/AP180), véase la Fig. 2.7. El motivo de la utilización de estas dos dianas fue evaluar si existía una interacción preferente de los ligandos por la protuberancia con respecto al *loop*. De acuerdo con los resultados preliminares de sondeo SHAPE, la diana CRL se modificó en la posición 239 (CRL/AP239),

correspondiente a una adenina que se sitúa en medio de la secuencia del bucle. Los cuatro RNAs marcados con 2-aminopurina empleados en estos estudios fueron de origen comercial.

2.1.4.3.2 Diseño de los experimentos de valoración con 2-aminopurina

Los experimentos se adaptaron a lo descrito en la bibliografía^{11,27}. Las muestras se prepararon con una concentración 2 μ M del RNA marcado con 2-aminopurina, en un tampón 10 mM de cacodilato sódico y 150 mM de NaCl. En este caso, a diferencia de los experimentos realizados por UV o DC, se prescindió de EDTA, un quelante de cationes metálicos divalentes, ya que en algunos de los ensayos con HCV IRES se pretendía comprobar el efecto de Mg^{2+} sobre la afinidad de los ligandos. Como en las pruebas anteriores, se evaluó el efecto del pH en la interacción ligando-RNA, realizando las valoraciones a dos pHs, 6,5 y 7,5. Para realizar los experimentos de titulación, el rango de concentraciones de ligando varió entre 20 nM y 130 μ M, según la afinidad por la diana. Inicialmente, la longitud de onda de excitación para registrar los experimentos de fluorescencia fue de 310 nm y la de emisión de 365 nm, siguiendo el procedimiento descrito en la bibliografía^{11,30}. No obstante, durante la realización de los experimentos se observó que la fluorescencia intrínseca de los ligandos, especialmente la de Isis-11, interfería en las medidas de fluorescencia de la 2-aminopurina (**Fig. 2.8**), en especial, en las valoraciones de Isis-11 con SLIIa de HCV IRES. Concretamente, al representar los valores de fluorescencia frente al logaritmo de la concentración de ligando se observaba que la curva no acababa de llegar a la saturación (**Fig. 2.8 A**), como sí sucedía con IRAB-1. Este efecto se agravó en los ensayos con las dianas de fiebre aftosa, ya que los ligandos mostraban una menor afinidad, observándose un continuo incremento de fluorescencia, aún mayor. Para solventar el problema, se analizaron y compararon los espectros de excitación de los ligandos con el del RNA marcado con 2-aminopurina para tratar de encontrar una longitud de onda donde se minimizase ese efecto. La solución fue desplazar la longitud de onda de excitación hasta los 327 nm (**Fig. 2.8 B**).

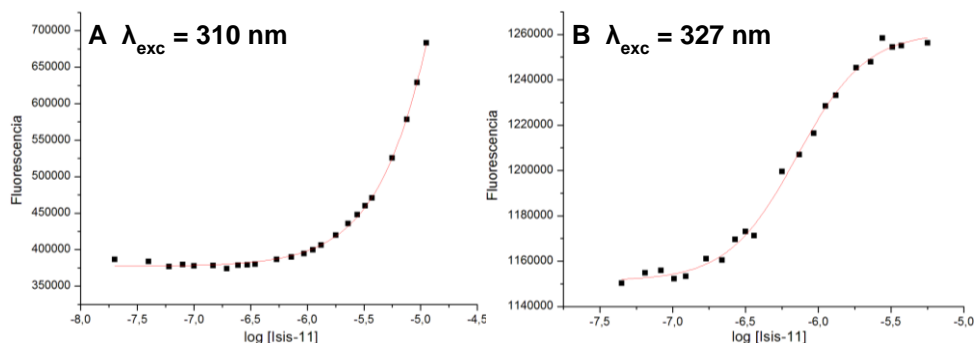


Fig. 2.8 Comparativa de curvas de afinidad de Isis-11 con SLIIa/AP54 a 310 y 327 nm.

Con este desplazamiento de longitud de onda, el problema de interferencia en los experimentos con el segmento de HCV IRES quedó resuelto (**Fig. 2.8 B**). Con respecto a los experimentos con las dianas del IRES de fiebre aftosa, las cantidades de ligando requeridas para poder determinar los valores de afinidad eran superiores, por la menor afinidad por el RNA, por lo que el desplazamiento de la longitud de onda de excitación fue insuficiente. Para solventar esta nueva limitación, se optó por realizar el experimento de valoración con las mismas secuencias de RNA sin marcar y restar la fluorescencia de este experimento a la obtenida en la valoración sobre el RNA marcado. Esta solución permitió determinar afinidades de hasta 60 μM en el caso de IRAB-1, pero siguió siendo insuficiente en los casos en que la afinidad era menor, por lo que no pudieron determinarse. Dado que se trataba de los casos con peores afinidades, no se buscó una solución alternativa.

2.1.4.3.3 Resultados con el segmento SLIIa/AP54 del IRES de HCV

En la siguiente **tabla 2.6** se resumen los resultados con la diana SLIIa:

	EC₅₀ (μM) SLIIa/AP54				Selectividad
	pH 6,5		pH 7,5		pH 7,5
	-	Mg ²⁺	-	Mg ²⁺	-
Isis-11	0,83 ± 0,01	1,46 ± 0,01	3,55 ± 0,02	3,59 ± 0,11	2,55
IRAB-1	0,56 ± 0,01	0,94 ± 0,01	2,09 ± 0,01	3,43 ± 0,01	1,60
IRAB-2	0,14 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,63 ± 0,01	0,83 ± 0,01	1,95

Tabla 2.6 Valores de afinidad de los ligandos por SLIIa/AP54.

Los resultados de la tabla permiten extraer las siguientes conclusiones:

i) En primer lugar, se reproducen los valores de afinidad descritos para Isis-11 (2,6-9,0 μ M según Paulsen¹²).

ii) Comparando los ligandos, los compuestos IRAB mejoran en todas las condiciones las afinidades de Isis-11. Por tanto, se pone de manifiesto que la incorporación del doble enlace adicional con respecto a Isis-11 supone una mejora en la afinidad. El intercambio de la posición de los apéndices amino en IRAB-2 también incrementa la afinidad en comparación a IRAB-1, siendo IRAB-2 el que presenta los mejores valores de EC_{50} , todos ellos en el rango submicromolar.

iii) El efecto del pH en la interacción de estos compuestos sobre HCV IRES muestra también una tendencia clara. Concretamente, las afinidades a pH 6,5 son superiores en todos los casos a las de pH 7,5, por lo que se deduce que la protonación del grupo guanidino influye favorablemente en la interacción de los ligandos.

iv) El efecto de Mg^{2+} es relativamente débil, aunque la tendencia es la de disminuir la afinidad de los ligandos, lo que prueba que parte de la afinidad de los 2-aminobenzimidazoles es debida a las interacciones electrostáticas con el RNA. El carácter competidor del Mg^{2+} apenas llega a duplicar el valor de EC_{50} en el peor de los resultados y en otros, apenas influye en el resultado.

v) Por último, se evaluó la selectividad de los ligandos por la diana, llevando a cabo los ensayos con un exceso de 10 equivalentes de tRNA de secuencia múltiple como agente competidor. Los valores de selectividad se calcularon mediante el cociente de las EC_{50} obtenidas en presencia del tRNA y en ausencia de él. En estos ensayos, los ligandos IRAB vuelven a mostrar nuevamente resultados sensiblemente mejores que Isis-11, resultando ser IRAB-1 el más específico.

2.1.4.3.4 Resultados con los segmentos del IRES de FMDV

A continuación, se resumen los resultados sobre los segmentos de fiebre aftosa en la **tabla 2.7**:

	EC ₅₀ (µM) FMDV IRES						Selectividad (SL3a/AP167)
	SL3a/AP167		SL3a/AP180		CRL/AP239		
	pH 6,5	pH 7,5	pH 6,5	pH 7,5	pH 6,5	pH 7,5	pH 7,5
Isis-11	10,7 ± 0,2	15,5 ± 0,1	>100	>100	ND*	ND*	>4,5
IRAB-1	23,7 ± 0,4	18,6 ± 0,2	>100	>100	53,1 ± 0,4	60,3 ± 0,4	3,51
IRAB-2	5,16 ± 0,01	8,51 ± 0,02	>100	>100	7,6 ± 0,1	ND*	>4,5

ND*: No pudieron ser determinados

Tabla 2.7 Valores de afinidad de los ligandos por las diversas dianas de FMDV IRES.

Los valores de afinidad de los ligandos por las diferentes dianas de FMDV IRES son claramente inferiores a los obtenidos con la diana SLIIa de HCV IRES. La diana por la que los ligandos mostraron mayor afinidad fue la correspondiente al segmento SL3a marcado en la protuberancia (SL3a/AP167). Este resultado, unido a la ausencia de interacción con el mismo RNA marcado en el motivo GNRA (SL3a/AP180) sugiere que los 2-aminobenzimidazoles interaccionan de forma preferente en este tipo de protuberancias, a similitud de lo que sucede en el IRES de HCV. No obstante, los compuestos también mostraron afinidad por CRL/AP239, aunque notablemente inferiores en los casos en que pudieron ser determinadas.

En general, los compuestos IRAB mejoran los resultados de Isis-11 salvo el caso de IRAB-1 con SL3a/AP167. A similitud de lo visto con SLIIa de HCV, IRAB-2 vuelve a ser el que presenta mayor afinidad. La tendencia observada en HCV IRES con el pH se mantiene, determinándose las mejores afinidades a pH 6,5, a excepción nuevamente de IRAB-1 con la diana SL3a/AP167. Este efecto parecía contrastar con la tendencia observada en los ensayos realizados anteriormente mediante DC y la fluorescencia intrínseca de los ligandos, donde se apreciaba lo contrario, en que las afinidades eran mejores a pH 7,5 que a 6,5. Sin embargo, dada la mayor sensibilidad y reproducibilidad de esta última técnica se dedujo que los resultados obtenidos por DC y por la fluorescencia intrínseca, si bien habían sido útiles para confirmar la

interacción de forma cualitativa, no lo eran suficientemente para un tratamiento cuantitativo. De hecho, los resultados aquí obtenidos eran también más coherentes con el comportamiento habitual de los ligandos catiónicos, que interaccionan con mayor afinidad con los ácidos nucleicos cuánto menor es el pH⁹.

Finalmente, se determinó la selectividad de los ligandos por la diana con mayor afinidad, SL3a/AP167, siguiendo el mismo procedimiento utilizado en HCV IRES, comparando las afinidades en ausencia y presencia de un exceso de tRNA. Las selectividades así obtenidas siguieron la tendencia observada en los valores de afinidad, observándose la mejor selectividad en el caso de IRAB-1. Con Isis-11 e IRAB-2 sólo se pudo realizar una estimación de los valores mínimos, siendo estos bastante superiores a los de IRAB-1, por lo que se dedujo que interaccionaban con mucha menor selectividad.

Los datos de afinidad pudieron ser contrastados con la información derivada de los experimentos de sondeo químico SHAPE (véase apartado 2.2.1) realizados sobre el IRES de FMDV, en el laboratorio de la Prof.^a Martínez-Salas. La conclusión de estos experimentos era que no se observaba un lugar de interacción único para los ligandos, sino que daban lugar a un complejo entramado de contactos. Entre los más significativos, se observaron cambios de reactividad en diversos segmentos de la región apical del dominio III de FMDV IRES. Como se ha mencionado en la introducción, en esta zona apical se establecen múltiples interacciones terciarias que generan una intrincada estructura tridimensional^{4,6}. Una de las interacciones clave es la que se produce entre el *tetraloop* GNRA y algunas de las bases del *loop* rico en C (CRL). Todo ello, nos motivó a plantear unos experimentos de valoración en presencia de las dos dianas que pertenecen a estos segmentos, CRL y SL3a, empleando una de las dos marcada con 2-aminopurina y la otra, sin marcar. De establecerse una interacción terciaria entre las dos secuencias, la intención era la de comprobar si ésta podía generar o modificar un hueco ya existente por el que los ligandos presentasen mayor afinidad. La realización de estos experimentos se llevó a cabo a pH 7,5 con IRAB-1, el único ligando con el que se había logrado determinar la afinidad por las dos dianas. A continuación, se muestran los resultados en la **tabla 2.8**:

EC ₅₀ (μM) Doble diana FMDV IRES	
SL3a/AP167 + CRL	CRL/AP239 + SL3a
29,2 ± 0,2	70,0 ± 0,8

Tabla 2.8 Valores de afinidad de IRAB-1 en los ensayos de doble diana de FMDV IRES.

Como se muestra en la tabla, se observa una competición entre las dos dianas por IRAB-1, ya que se observa un incremento de la EC₅₀ en ambos experimentos. Se concluyó que en las condiciones ensayadas, los dos segmentos probablemente no son capaces de reproducir la interacción terciaria que establecen en el conjunto del IRES, por lo que se descartó de seguir estudiando el caso.

2.1.5 Caracterización de la interacción RNA-ligando mediante calorimetría de valoración isotérmica (ITC)

La calorimetría de valoración isotérmica (ITC) es una técnica de elección, a la vez que versátil, para conocer la termodinámica completa de las interacciones moleculares. Su principal ventaja sobre las técnicas espectroscópicas es que no requiere de cromóforos o de marcas fluorescentes, lo que permite el estudio de compuestos espectroscópicamente silenciosos y en medios tanto homogéneos como heterogéneos, y en condiciones celulares³¹. En cambio, su aplicación sigue siendo limitada en el estudio y cribado de grupos grandes de moléculas, ya que el número de experimentos que se pueden realizar por día es reducido. No obstante, los últimos avances técnicos van en la dirección de posibilitar la selección de quimiotecas por medio de datos termodinámicos obtenidos por ITC³². De forma habitual, la ITC se utiliza para caracterizar termodinámicamente una interacción tras haberla comprobado mediante técnicas espectroscópicas³³. Históricamente, el talón de Aquiles de la ITC siempre ha sido la elevada cantidad necesaria de producto para llevar a cabo un experimento, aunque el desarrollo técnico de microcalorímetros en las últimas décadas ha permitido, a la vez que una mayor simplicidad de uso, un notable incremento en la sensibilidad. Ello ha posibilitado ampliar el rango de estudio hasta la escala subnanomolar de afinidad, y ha abierto la puerta al estudio de las interacciones en sistemas biológicos. Ampliamente empleada para estudiar las proteínas, la ITC ha sido también aplicada a los ácidos nucleicos y, en especial, a los complejos de los RNA con moléculas pequeñas^{9,34}.

El experimento de ITC consiste en la adición secuencial de una pequeña cantidad de un valorante a una celda que contiene el analito, mientras se mide el calor generado en la interacción^{34,35}. En el caso de las interacciones de RNA con moléculas pequeñas o ligandos, como en el nuestro, el valorante suele ser el ligando y el analito, la diana de RNA. El caso más estudiado en la bibliografía es el de la interacción de los aminoglicósidos sobre el *A-site* ribosomal³⁶. El intercambio de calor se detecta en la mayoría de calorímetros actuales mediante la compensación de potencia que monitoriza y mantiene estable la temperatura entre dos celdas, la que contiene la muestra y la de referencia³⁷. La integración de la diferencia de potencia suministrada a las celdas se corresponde con el calor absorbido o desprendido por la reacción. Como el calor generado en cada adición es proporcional a la cantidad de complejo formado, los primeros puntos corresponden a los de mayor variación, por ser aquellos en que la proporción de diana libre respecto al complejo es mayor. La entalpía de cada inyección no se corresponde únicamente con la entalpía de formación del complejo, sino que incluye otras contribuciones, como los efectos debidos al disolvente, reorganizaciones moleculares, cambios conformacionales, calores de dilución y artefactos mecánicos debidos a la agitación de la celda. Estas contribuciones no relacionadas con el calor de la interacción se eliminan del calor de cada inyección mediante la sustracción de un blanco. Para ello, hay dos procedimientos. El más directo consiste en extraer el valor medio de los últimos puntos de la curva de valoración. Como en esas últimas inyecciones, la diana se encuentra totalmente saturada por la adición de un exceso de ligando, el calor registrado puede considerarse debido únicamente a la dilución del ligando libre. El segundo procedimiento supone la realización de un experimento de ITC extra en el que se adiciona el valorante sobre la celda que contiene únicamente el disolvente o la disolución tampón³⁵.

Los parámetros termodinámicos se obtienen a partir de los valores de calor, por ajuste a un modelo apropiado de interacción, en que las variables son las concentraciones iniciales de diana y de ligando, y el volumen de la celda. Del ajuste por mínimos cuadrados se extraen los valores de entalpía (ΔH), estequiometría (n) y la constante de disociación del complejo (K_d). Los valores de ΔG y ΔS se obtienen mediante las siguientes ecuaciones^{34,35}:

$$\Delta G = -RT \ln K_d$$

$$\Delta S = (\Delta H - \Delta G)/T$$

La representación habitual de los valores de calor obtenidos en un experimento de ITC son el termograma y la isoterma de Wiseman. El termograma es la representación de los picos de calor generados en cada inyección frente al tiempo, que se van reduciendo hasta llegar al valor de saturación. En la isoterma de Wiseman se representan los valores de calor por mol de ligando adicionado frente al número de equivalentes con respecto a la diana.

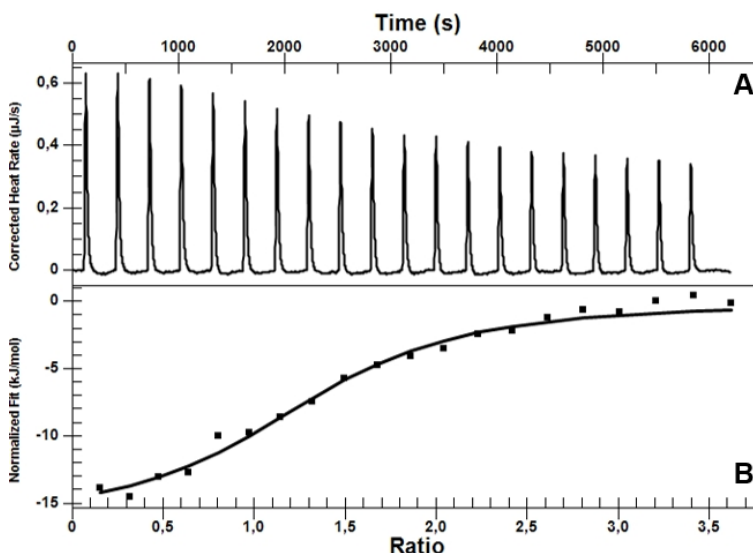


Fig. 2.9 Ejemplos de los gráficos de un experimento de ITC (ej: valoración de SLIIa de HCV IRES con IRAB-1): A) Termograma; B) Isoterma de Wiseman.

De la isoterma de Wiseman puede calcularse el llamado factor experimental “c”, por medio del producto de la constante de equilibrio por el coeficiente estequiométrico y la concentración de diana. Se suele emplear para optimizar las condiciones de un experimento y como indicador de la fiabilidad de los valores obtenidos. El criterio aplicado suele ser que el valor “c” debe encontrarse entre 1-1000, idealmente entre 10-100, para que la información del ensayo se considere suficientemente válida^{34,38}.

2.1.5.1 Diseño de los ensayos de ITC

Para llevar a cabo los ensayos de ITC, se partió de la experiencia previa en el grupo³⁹. Se empleó el mismo tampón que en las valoraciones de los RNAs fluorescentes (que contienen 2-aminopurina) a pH 6,5. Se empezó trabajando con la diana SL3a del IRES de FMDV y con concentraciones de diana y ligando iniciales de 10 μM y 300 μM , respectivamente. Como los calores obtenidos eran demasiados pequeños para lograr resultados reproducibles con la sensibilidad del aparato (rango de detección 0,05 μJ - 3 μJ), se optó por duplicar la concentración de diana y la del ligando a 20 μM y 600 μM , respectivamente. Una vez conseguidos unos valores óptimos de calor se pasó a modular las concentraciones de ligando, con el objeto de determinar con mayor exactitud los parámetros de la interacción específica con estequiometría 1:1 entre los ligandos y la diana. Estas concentraciones tuvieron que reducirse, hasta 390 μM , en el caso de los ligandos más afines. Una vez realizados los experimentos con la diana SL3a de FMDV, se siguió trabajando con la diana SLIIa del IRES de HCV, con la misma pauta para fijar la concentración óptima de ligando en la bureta, que resultó ser de 210 μM .

2.1.5.2 Resultados con el segmento SL3a del IRES de FMDV

Las isotermas se ajustaron en todos los casos a un modelo de unión múltiple e independiente (opción *Independent* en el software del aparato), en el que todos los lugares de unión son idénticos. Ello permitió la obtención de los parámetros termodinámicos correspondientes a la interacción 1:1 de los ligandos con la diana que se resumen en la siguiente **tabla 2.9**:

	Isis-11	IRAB-1	IRAB-2
K_d (μM)	13,1 \pm 0,9	30,4 \pm 13,3	14,9 \pm 0,3
n	1,3 \pm 0,1	1,1 \pm 0,3	1,3 \pm 0,0
ΔH (kJ/mol)	-3,3 \pm 0,6	-12,2 \pm 4,4	-23,5 \pm 0,4
$-T\Delta S$ (kJ/mol)	-24,55	-13,68	-4,02
ΔG (kJ/mol)	-27,87	-25,90	-27,55
$\Delta H/-T\Delta S$	0,1	0,9	5,9

Tabla 2.9 Valores de los parámetros termodinámicos de la interacción de los ligandos con SL3a obtenidos por ITC.

Los valores de la constante de disociación (K_d) se sitúan en todos los casos en el rango micromolar medio, valores comparables a los de las EC_{50} determinados por fluorescencia. En estos experimentos, Isis-11 mostró la mejor afinidad, por delante de IRAB-2, invirtiéndose el orden observado por fluorescencia. Esta divergencia en el orden del efecto producido por los ligandos puede ser explicada por las diferencias en las interacciones medidas. En el primero de los casos, se medía el efecto local del ligando sobre 2-aminopurina mediante el cambio de fluorescencia, mientras que en ITC se mide el calor que resulta de la interacción del ligando con el conjunto del RNA. Todas las estequiometrias se hallan rondando la relación 1:1, lo que coincidiría con la de los complejos de los derivados de 2-aminobenzimidazol con el subdominio IIa de HCV IRES, que se habían descrito anteriormente en la bibliografía¹¹.

El perfil termodinámico, definido como el cociente de la contribución entálpica y la entrópica a la energía libre ($-\Delta H/T\Delta S$), puede servir para identificar el modo de interacción de un ligando con los ácidos nucleicos³³. A su vez, la desconvolución de la energía libre de la interacción ligando-diana se ha demostrado útil en la selección de moléculas mediante criterios termodinámicos³². En este sentido, estudios recientes ponen de manifiesto que los ligandos con mejor relación selectividad-actividad son aquellos en que se corresponde la mejor afinidad con el mayor carácter entálpico en la interacción con la diana⁴⁰.

Analizando el perfil termodinámico de la interacción de los compuestos por el RNA ($\Delta H/-T\Delta S$, **Tabla 2.9**) se observa un claro aumento de la componente entálpica en el caso de los ligandos IRAB con respecto a Isis-11. La interacción de Isis-11 con la diana está esencialmente dirigida por la entropía ($\Delta H/-T\Delta S= 0,1$) mientras que IRAB-2 sigue una tendencia totalmente opuesta ($\Delta H/-T\Delta S= 5,9$), en que predomina el término entálpico. Por su parte, IRAB-1 muestra una contribución equilibrada en la ΔG , con un cociente $\Delta H/-T\Delta S$ de 0,9.

Como ya se ha comentado, el modo de unión de pequeñas moléculas al DNA ha sido relacionado con el perfil termodinámico de su interacción³³. Esencialmente, existen dos modos extremos de unión de las moléculas pequeñas al DNA, por intercalación o por unión al surco. La interacción de los compuestos que se unen al surco se caracteriza por estar dirigida por la entropía debida esencialmente al desplazamiento del agua de hidratación del DNA. En cambio, las interacciones de ligandos intercalantes son dirigidas por la entalpía, ya que se originan interacciones

de Van der Waals por apilamiento (*stacking*) entre los pares de bases³³. Partiendo de este razonamiento, se puede tratar de deducir el modo de unión de nuestros ligandos con el RNA, por extrapolación. Así, el carácter entálpico de la interacción de los ligandos IRAB, sobre todo de IRAB-2, por el segmento SL3a parece indicar que la unión de éstos al RNA tiene lugar con mayor intercalación. Por el contrario, la elevada componente entrópica de Isis-11 es característica de un ligando de surco. El mayor carácter intercalante de los compuestos IRAB con respecto a Isis-11 se podría explicar por la extensión de la aromaticidad producto del doble enlace adicional. Por su parte, la idea con la que se diseñó IRAB-2 (véase capítulo 1, apartado 1.2.2.2) se ve apoyada parcialmente por el resultado, ya que el menor peso entrópico de IRAB-2 con respecto a IRAB-1 podría tener relación con el menor número de grados de libertad de su única cadena lateral, en comparación a las dos que posee IRAB-1.

2.1.5.3 Resultados con el segmento SLIIa del IRES de HCV

Los experimentos se realizaron siguiendo el mismo procedimiento que para el segmento SL3a del IRES de FMDV. Los resultados se resumen en la siguiente **tabla 2.10**:

	Isis-11	IRAB-1	IRAB-2
K_d (μM)	$3,1 \pm 1,5$	$2,7 \pm 1,1$	$2,2 \pm 0,7$
n	$0,9 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,0$	$1,4 \pm 0,1$
ΔH (kJ/mol)	$-10,6 \pm 4,3$	$-15,8 \pm 0,8$	$-25,5 \pm 0,4$
$-T\Delta S$ (kJ/mol)	-21,00	-16,12	-6,94
ΔG (kJ/mol)	-31,60	-31,88	-32,40
$\Delta H/-T\Delta S$	0,5	1,0	3,7

Tabla 2.10 Valores de los parámetros termodinámicos de la interacción de los ligandos con SLIIa obtenidos por ITC.

Las afinidades se encuentran en el rango micromolar bajo, un orden de magnitud mayor que los valores EC_{50} obtenidos en los experimentos de fluorescencia aunque se mantiene, en general, el mismo comportamiento. Cabe recordar que en las condiciones de los experimentos, EC_{50} y K_d son prácticamente equivalentes. Aun así, como se ha mencionado anteriormente, las interacciones medidas por fluorescencia y por ITC difieren en un sentido estricto. Probablemente,

ello explicaría que los valores de las EC_{50} medidos por fluorescencia sean inferiores a los de K_d medidos por ITC. No obstante, el orden por afinidad de los ligandos es el mismo que el observado en las valoraciones por fluorescencia. Los dos ligandos IRAB mejoran los resultados de Isis-11, siendo IRAB-2 el que presenta una mayor afinidad por el segmento del subdominio IIa de HCV IRES. El perfil termodinámico de las interacciones sigue la misma tendencia que en la diana de fiebre aftosa. La unión de Isis-11 está dirigida esencialmente por la entropía aunque la contribución entálpica es mayor que en el caso del segmento SL3a de FMDV. Por su parte, IRAB-1 tiene balanceadas las contribuciones entálpica y entrópica, mientras que la interacción de IRAB-2 está dirigida de forma entálpica. Siguiendo la pauta observada en el anterior apartado, las interacciones de los ligandos IRAB muestran un mayor carácter intercalante que la de Isis-11.

2.1.6 Estudio de la estequiometría de complejos RNA-ligando mediante espectrometría de masas

Más allá de como técnica de determinación estructural, la espectrometría de masas de ionización por electrospray (EM-ESI) ha ido cobrando relevancia en los últimos años como herramienta en el descubrimiento de nuevos compuestos con potencial terapéutico. Las mejoras de sensibilidad y resolución han habilitado su implementación en diversos procesos, como la identificación de *leads*, como en el caso de HCV IRES²⁶, o la realización de estudios farmacocinéticos, entre otros⁴¹.

Otra de las nuevas aplicaciones de la EM-ESI consiste en el estudio de complejos no covalentes. Descrito por primera vez por Ganem y col. en 1991, se consiguió transferir un complejo no covalente en solución a fase gas y detectarlo intacto mediante ESI⁴². Desde entonces, se han publicado más de 300 artículos sobre interacciones entre proteínas y ácidos nucleicos, así como interacciones de estos con moléculas pequeñas. Además, se han desarrollado otras muchas metodologías basadas en la EM-ESI para determinar parámetros termodinámicos de las interacciones, como las constantes de complejación, estequiometrias o especificidades⁴¹.

La EM-ESI es una técnica extremadamente sensible que requiere de un ajuste cuidadoso de los parámetros. Especialmente crítica es la elección de los voltajes y las temperaturas de las etapas de ionización y de análisis. En el caso del estudio de los ácidos nucleicos, otros factores importantes son la selección de un tampón y

una fuerza iónica adecuados, para hacerlo de manera compatible con una de las mayores limitaciones de la técnica: su baja tolerancia al uso de electrolitos. El esqueleto polifosfato de los ácidos nucleicos se encuentra ionizado en disolución, por lo que para preservar la estructuración nativa requiere de una fuerza iónica correspondiente a una concentración 150 mM de un catión monovalente. Sin embargo, los cationes habituales como el Na⁺ o K⁺ producen una amplia variedad de aductos poliiónicos cuando se detectan por EM-ESI. La solución a este problema fue la utilización de acetato amónico, ya que consigue la estabilización de la estructura sin formar aductos⁴³. Como contrapartida, uno de los puntos fuertes de la técnica es la capacidad para resolver la composición de mezclas complejas de señales y con diferente grado de ionización. A diferencia de las técnicas espectroscópicas, cada especie formada que difiere en masa presenta una señal en el espectro, pudiendo detectarse así complejos incluso en casos en que su proporción sea muy pequeña en la muestra. A partir de la relación m/z de la señal, se pueden deducir el número de cadenas del ácido nucleico y de ligandos que forman el complejo⁴³.

2.1.6.1 Experimento para establecer la estequiometría del complejo SL3a - IRAB-1

Los resultados de ITC mostraban que los complejos de mayor afinidad eran los de estequiometría 1:1, tanto para la diana SL3a de FMDV IRES como para SLIIa de HCV IRES. En el caso de HCV IRES, los resultados se correspondían con las estructuras por RMN y cristalografía de rayos X que habían sido publicadas, que mostraban la formación del complejo 1:1 entre derivados de benzimidazol y el subdominio IIa^{11,12}. Como no se disponía de estructuras de los segmentos del IRES de fiebre aftosa, se quiso comprobar la estequiometría que ofrecían los experimentos de ITC, por medio de experimentos de EM-ESI. A falta de experiencia previa en el uso de la metodología, se eligió el complejo de IRAB-1 con la diana SL3a del IRES de fiebre aftosa.

Para la elección de las condiciones se contó con el asesoramiento de la Dra. Marta Vilaseca de la Unidad de Espectrometría de Masas del IRB-PCB. De inicio, se preparó una disolución 50 μM de SL3a con un exceso de 50 equivalentes de IRAB-1 en un tampón 50 mM de AcONH_4 a pH 7,0 y se analizó la muestra en modo negativo. El exceso de ligando se correspondía con el número necesario de equivalentes para llegar a la saturación de las curvas de fluorescencia. El espectro se registró en un aparato Synapt G1 HDMS (Waters) de la Unidad de Espectrometría de Masas del IRB, por infusión directa.

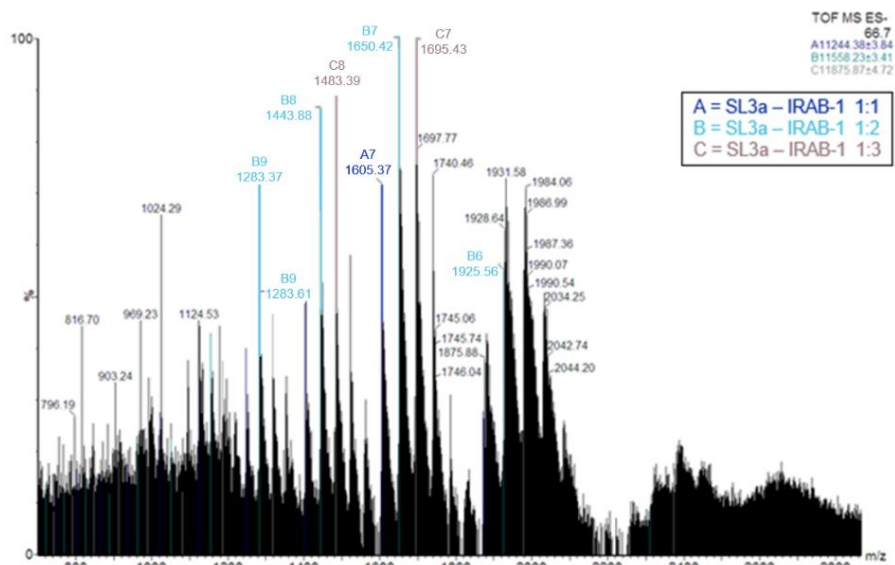


Fig. 2.10 Espectro de ESI-MS de los complejos formados entre SL3a e IRAB-1. Cada complejo es indicado con una letra (A, B o C) y color. El número que sucede a la letra corresponde al número de cargas (z) de la especie.

En el espectro obtenido (**Fig. 2.10**) se observan tres grupos de señales que corresponden a los complejos SL3a – IRAB-1 con estequiometrías 1:1 (azul oscuro), 1:2 (azul claro) y 1:3 (gris), con carga z entre 6 y 9. La intensidad relativa de las señales indicaría que la formación de los complejos 1:2 y 1:3 es mayoritaria, aunque no es descartable que pudiera deberse al gran exceso de ligando presente en la muestra. A falta de más datos, la conclusión de este único experimento es que no se puede establecer con fiabilidad la estequiometría de la interacción entre IRAB-1 y SL3a. Para ello, hubiera sido necesario, por ejemplo, la realización de ensayos limitando el número de equivalentes de ligando a un valor más cercano al de los experimentos de ITC, y verificar si en esas condiciones se corrobora la estequiometría 1:1 entre ligando y diana.

2.2 Experimentos de sondeo químico sobre el IRES de FMDV

Otra fase en el estudio de la interacción de los ligandos consistió en analizar el grado de alteración de la estructura terciaria que producen sobre el IRES. Para ello, se llevaron a cabo dos tipos de ensayos, experimentos SHAPE (*Selective 2'-Hydroxyl Acylation analyzed by Primer Extension*) y el sondeo mediante radical hidroxilo (*hydroxyl radical footprinting*). Como se explica a continuación, ambos métodos aportan informaciones complementarias acerca de las estructuras secundaria y terciaria del RNA y permiten completar la información aportada por los experimentos biofísicos de afinidad. Además, a diferencia de los ensayos biofísicos en que sólo puede estudiarse un fragmento de RNA, por las dificultades de interpretación con RNAs más extensos, las pruebas de sondeo pueden realizarse con el RNA completo y en disolución.

Como ya se mencionó, estos experimentos fueron realizados por el grupo de la Prof.^a Martínez-Salas. En esta memoria sólo se comentan los resultados obtenidos. Para la consulta de los detalles experimentales, se dirige el lector al artículo publicado recientemente⁴⁴.

2.2.1 Análisis SHAPE

Los experimentos SHAPE o *Selective 2'-Hydroxyl Acylation analyzed by Primer Extension* aportan información sobre el grado de flexibilidad conformacional de los nucleótidos de una estructura de RNA. Este procedimiento comienza con la incubación del RNA con un agente acilante, a modo de sonda química, que reacciona selectivamente sobre los grupos hidroxilo 2' de los nucleósidos más accesibles y flexibles. En este caso, el agente escogido fue el anhídrido *N*-metilisatoico (NMIA) (**Fig. 2.11**).

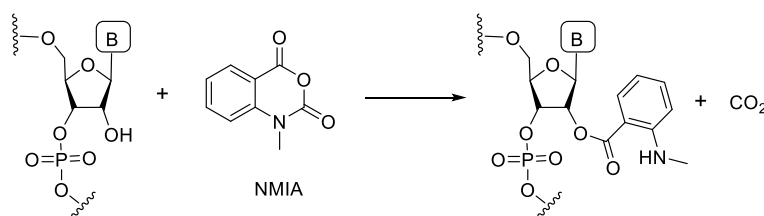


Fig. 2.11 Reacción de acilación del RNA por el anhídrido *N*-metilisatoico (NMIA), empleada en el análisis SHAPE.

Tras la incubación, el RNA se somete a un tratamiento de transcripción inversa utilizando cebadores marcados con ^{32}P . Como los nucleósidos acilados producen la obstaculización de la retrotranscriptasa, no se produce un único transcrito, sino una colección de oligonucleótidos truncados. El consiguiente análisis por electroforesis revela el patrón de reactividad de la estructura, de acuerdo con el grado de acilación del RNA original. Este patrón se procesa informáticamente y se normaliza para producir un valor numérico que cuantifique la reactividad relativa de cada posición. La reactividad de una determinada posición está directamente relacionada con la flexibilidad o accesibilidad del nucleótido en la estructura terciaria del RNA⁴⁵⁻⁴⁷. La flexibilidad del nucleótido depende de su participación en la estructura secundaria y terciaria. Un nucleótido que se encuentre en un segmento dúplex formando un par canónico Watson-Crick será muy poco flexible y consecuentemente será poco reactivo. En cambio, un nucleótido que forme parte de un motivo tipo *loop* o *bulge* presentará a priori una mayor reactividad, ya que al no estar apareado, tendrá un menor grado de estructuración por ser más flexible y, por consiguiente, será más reactivo frente al agente acilante. De todas formas, la reactividad de estas regiones viene determinada en última instancia por la estructura terciaria del RNA, resultado de los plegamientos de la estructura que ponen en contacto zonas del RNA alejadas en secuencia. La participación de una región en una interacción terciaria conllevará, por tanto, un cambio de la reactividad de sus nucleósidos, que se traduce habitualmente en una reducción de grado de acilación. Por todo ello, el patrón de reactividad derivado de este tipo de experimentos puede considerarse una huella dactilar de la estructura terciaria del RNA, de ahí el nombre de la técnica en inglés (*footprinting*). La técnica también puede ser empleada en el estudio de la interacción de una molécula pequeña con el RNA, ya que cualquier cambio estructural producto de la interacción comportará un cambio en el patrón de reactividad de los nucleósidos. Además, pueden deducirse los nucleósidos o segmentos que interaccionan con el ligando observando cuáles son los residuos que ven modificada su reactividad.

Los experimentos SHAPE se realizaron a diferentes concentraciones de IRAB-1 e Isis-11 (2, 10, 20 μM) con la intención de comprobar cómo variaba la reactividad. En un principio, se iniciaron los ensayos a una concentración 6 mM de Mg^{2+} para asegurar la correcta estructuración del IRES. No obstante, al observar que en estas condiciones la interacción de los ligandos era muy débil e inespecífica, comportamiento que no se correspondía con los resultados de las pruebas

biofísicas, se interpretó que el RNA se encontraba excesivamente compactado. Por tanto, se optó por disminuir la concentración de Mg^{2+} , a 0,5 mM, con el objetivo de reducir la compactación del RNA. Como se mencionó en la introducción (apartado 1.4.4), los cationes divalentes como el Mg^{2+} , juegan un papel clave en la correcta estructuración de las secuencias IRES, por lo que no se pueden suprimir del medio, únicamente se puede modular su concentración.

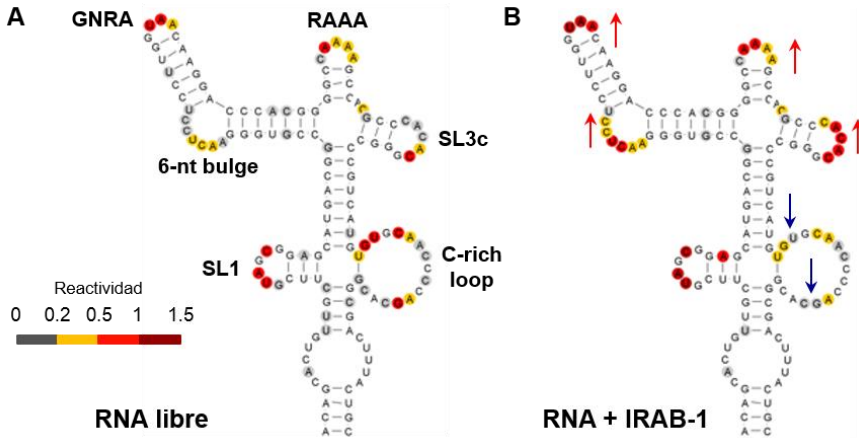


Fig. 2.12 Diferencias de la reactividad SHAPE indicadas con flechas y código de colores en la zona apical del dominio III de FMDV IRES: A) RNA libre y B) RNA incubado con IRAB-1.

La comparación de los patrones obtenidos para el IRES libre e incubado con los ligandos, Isis-11 e IRAB-1, reveló la aparición de cambios de reactividad en ciertas zonas de la secuencia, especialmente en la zona apical del dominio III⁴⁴, tal y como se muestra con un código de flechas y colores en la **Fig. 2.12**. El foco de atención se centró sobre el ligando IRAB-1 debido a que la intensidad y cantidad de cambios inducidos por IRAB-1 sobre la estructura del IRES eran más intensos que los generados por Isis-11. La interacción de IRAB-1 con el RNA provocaba un aumento en la reactividad de diversos segmentos de la zona apical, en especial, el *bulge* de 6 nucleótidos y los *tetraloops* GNRA y RAAA. No obstante, también hubo algún segmento como el correspondiente al *loop* rico en C que vio reducida su reactividad. Estos resultados contrastan con el análisis por SHAPE descrito en la bibliografía para un derivado de Isis-11 con el IRES de HCV⁴⁸, donde las diferencias de reactividad más acusadas se centraron en cinco nucleósidos, tres pertenecientes al *bulge* pentanucleotídico del subdominio IIa y los otros dos a dos pares de bases adyacentes a éste, resultado que indicaba un lugar claro de unión, en la línea de los estudios estructurales de rayos X y RMN^{11,12}.

La conclusión que se puede extraer de estos experimentos SHAPE es que no existe un lugar de unión específico para los ligandos, a diferencia del precedente con HCV IRES, sino que éstos alteran la estructura de diversas regiones. Aunque con estos datos no es posible ofrecer una imagen clara de cómo los ligandos interaccionan y alteran la estructura del IRES, lo que sí puede deducirse es que la unión de los ligandos induce un cambio conformacional generalizado de la estructura, en especial, en la zona apical del dominio III. Se genera así una estructura algo más flexible y menos compacta, cambio que se monitoriza a través de las variaciones de reactividad de los diversos segmentos de esta región del IRES.

Dado que el dominio III es considerado clave para la correcta funcionalidad del IRES⁴, todo parece indicar que la afectación de esta región por los derivados 2-aminobenzimidazol es el mecanismo más plausible para explicar la actividad inhibitoria que presentan (véase más adelante, apartado 2.3).

2.2.2 Sondeo mediante radical hidroxilo (*Hydroxyl Radical Footprinting*)

Este ensayo de *footprinting* consiste en medir la accesibilidad al medio de los nucleótidos de la estructura del IRES. Se parte de la suposición que las nucleobases que se encuentran en el interior de la estructura se encuentran protegidas contra la acción del reactivo mientras que las que se encuentran expuestas pueden reaccionar, y desencadenar la fragmentación del esqueleto. Este tipo de experimento sirve, por tanto, para conocer los segmentos del RNA que se encuentran más expuestos al medio. Los cambios inducidos por la unión de un ligando pueden ser diagnósticos de cómo modifican la estructura terciaria del RNA.

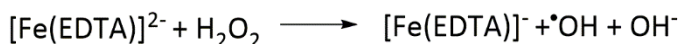


Fig. 2.13 Reacción de Fenton.

El reactivo empleado en este experimento es el radical hidroxilo, que se genera mediante la reacción de Fenton (**Fig. 2.13**), entre Fe(II) y H₂O₂. El mecanismo aceptado para esta reacción consiste en la oxidación de Fe²⁺ a Fe³⁺, a la vez que el peróxido de hidrógeno se reduce a hidróxido y a radical hidroxilo. Ésta última es la especie altamente reactiva capaz de captar un hidrógeno de las posiciones C4' o C5' de la ribosa, para acabar causando la rotura del esqueleto. El Fe²⁺ es regenerado en el propio medio de reacción por el ascorbato, como agente reductor^{46,49,50}. También es necesaria la presencia de EDTA, que actúa como agente quelante de

Fe^{2+} , para evitar que el catión metálico interactúe con la estructura de RNA. Tras el tratamiento y como en el análisis SHAPE, se obtiene una colección de RNAs truncados por reacción con el radical. Para su análisis, se somete el RNA a una transcripción inversa empleando un cebador, marcado en este caso con un fluoróforo. A continuación, se analizan los resultados por electroforesis. Como en el sondeo tipo SHAPE, se realiza un procesamiento informático para normalizar la señal y obtener, en este caso, los valores relativos de accesibilidad de los residuos al disolvente.

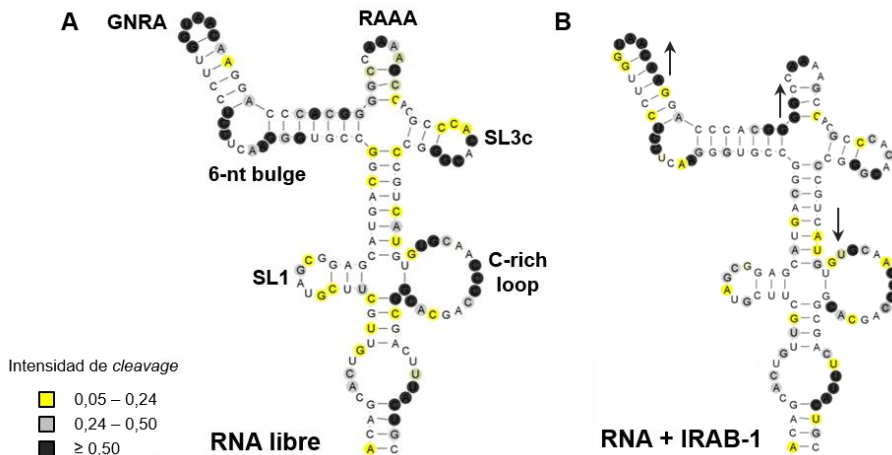


Fig. 2.14 Comparativa de la accesibilidad del disolvente a nivel de nucleótido entre la región apical del dominio III de FMDV IRES libre (A) y en presencia de IRAB-1 (B). El código de colores y las flechas indican el sentido de la variación en la accesibilidad de los residuos.

En este experimento, llevado a cabo con la secuencia IRES completa, la atención se centró directamente sobre la zona apical del dominio III de FMDV IRES, dados los resultados del análisis SHAPE realizado con anterioridad. También, sólo se analizó el efecto de IRAB-1. La comparativa del patrón de reactividad de la zona apical del IRES libre con respecto al tratado con IRAB-1 (véase **Fig. 2.14**) revela la existencia de dos segmentos especialmente reactivos. El primero corresponde al tallo-lazo SL3a, donde se ve aumentada la accesibilidad (incremento de puntos oscuros en la **Fig. 2.14**). El otro segmento afectado es el *loop* rico en C, en que disminuye la accesibilidad al medio (puntos grises y amarillos). Nuevamente, aunque no es posible ofrecer una imagen clara de cómo actúa el ligando, el resultado concuerda con las tendencias observadas por SHAPE. No se deduce un lugar único de unión y

las diferencias en los patrones de reactividad más significativas se concentran en las mismas regiones del dominio III.

2.3 Evaluación de la capacidad inhibitoria de la traducción mediada por IRES y de la actividad antiviral

La primera fase de estos experimentos consistió en la realización de ensayos de inhibición *in vitro* empleando un RNA bicistrónico. La obtención de resultados positivos en estos primeros ensayos abrió la puerta a seguir con ensayos de inhibición en células, monitorizando la capacidad de replicación viral y de síntesis proteica tras haber sido transfectadas con el virus de fiebre aftosa. Estos experimentos fueron llevados a cabo íntegramente por el grupo de la Prof.^a Martínez-Salas, por lo que esta memoria se limitará a comentar los resultados obtenidos. Los detalles experimentales pueden ser consultados en el artículo publicado recientemente⁴⁴.

2.3.1 Ensayos de inhibición de la traducción *in vitro*

La inhibición de la traducción *in vitro* fue el test preliminar antes del trabajo con células. La realización de este experimento requiere de la utilización de un RNA bicistrónico⁵¹, que consta de dos genes reporteros, cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) y luciferasa (LUC), separados entre sí por el elemento IRES (**Fig. 2.15**). Se pretende así que la traducción del gen situado en el extremo 5' tenga lugar mediante el mecanismo dependiente de caperuza (*cap*), mientras que la del segundo gen sea mediada por IRES. De esta forma, se pueden monitorizar diferencias en la eficiencia de los dos mecanismos de traducción cuando uno de ellos es inhibido selectivamente. Como ya se ha comentado, nuestro objetivo consiste en evaluar la capacidad de los derivados 2-aminobenzimidazol en inhibir selectivamente la traducción mediada por IRES frente a la mediada por *cap*. Para determinar el efecto de inhibición de estas sustancias sobre el mecanismo IRES, las proteínas CAT y LUC generadas se separan mediante electroforesis y se cuantifican por densitometría, previa adición del aminoácido ³⁵S-metionina. La eficiencia de la traducción de ambos genes se determina por comparación con un experimento control en ausencia de ligando. Los experimentos de inhibición se llevaron a cabo con los IRES de FMDV y de HCV.

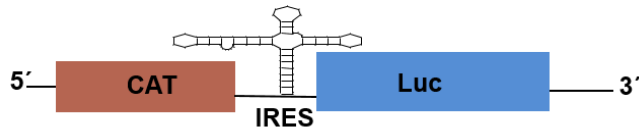


Fig. 2.15 RNA bicistónico constituido por los genes cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) y luciferasa (LUC) separados por una secuencia IRES (FMDV o HCV). El primer cistón, CAT, es traducido mediante *cap*. Mientras que la traducción del segundo gen, LUC, es mediada por IRES.

2.3.1.1 Inhibición in vitro de FMDV IRES

Los resultados muestran una inhibición preferente de la traducción mediada por IRES respecto a la canónica y que es dependiente de dosis para los tres ligandos ensayados, Isis-11, IRAB-1 e IRAB-2. Por tanto, se corrobora la hipótesis inicial de este trabajo que los derivados 2-aminobenzimidazol, que habían sido descritos contra el IRES de HCV, también pueden producir la inhibición del mecanismo IRES en FMDV.

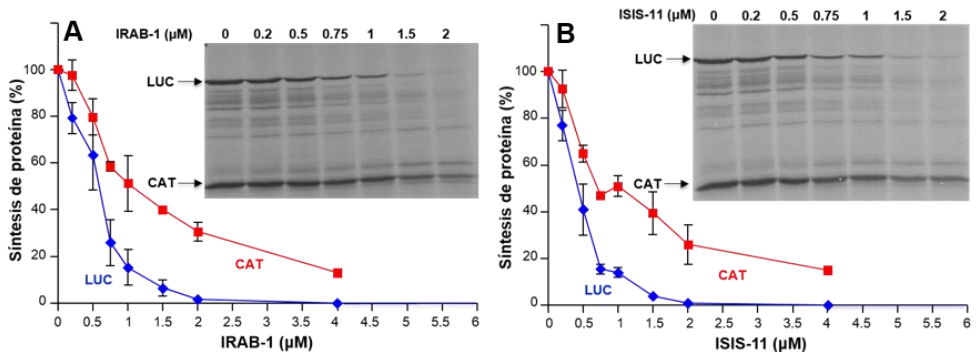


Fig. 2.16 Resultados de inhibición de la traducción de FMDV IRES con: A) IRAB-1, B) ISIS-11.

IRAB-1 e Isis-11 presentan los mejores resultados (**Fig. 2.16**), observándose una inhibición de la traducción mediada por IRES de alrededor del 50 %, sensiblemente mejor Isis-11 con respecto a IRAB-1, a una concentración 0,5 μM. En estas condiciones, la traducción dependiente de *cap* únicamente se ve reducida en un 20 %. Para ambos compuestos, a una concentración 2 μM la traducción mediada por IRES es prácticamente completa y sigue siendo patente un efecto preferente sobre la inhibición mediada por IRES. Respecto a IRAB-2 (véase anexo), los resultados mostraron una inhibición preferente de la traducción mediada por IRES aunque a un nivel inferior a los otros dos ligandos. IRAB-2 no alcanza un nivel de inhibición

del 50% hasta llegar a una concentración 2 μM y no es prácticamente total hasta 10 μM .

2.3.1.2 Inhibición in vitro de HCV IRES

En la inhibición de HCV IRES se testaron únicamente IRAB-1 e Isis-11. Como en fiebre aftosa, los resultados mostraron una inhibición del mecanismo mediado por IRES, de forma preferente y dependiente de dosis (Fig. 2.17).

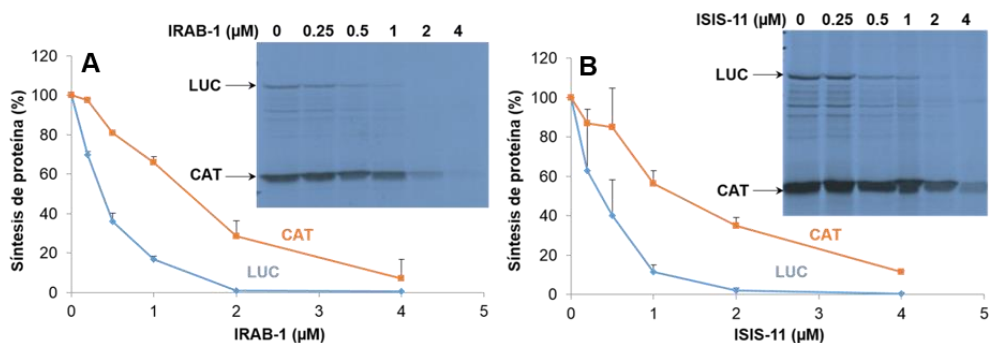


Fig. 2.17 Resultados de inhibición de la traducción de HCV IRES con: A) IRAB-1, B) ISIS-11.

Los valores de inhibición conseguidos son similares a los obtenidos para FMDV IRES. Además, para Isis-11, la inhibición se produce a valores de concentración similares a los valores descritos por Seth y col²⁶. A una concentración 0,5 μM , las inhibiciones para ambos ligandos son mayores del 60%, sensiblemente mejor que lo observado en FMDV IRES, y son prácticamente totales a 2 μM . En este caso, las diferencias de inhibición entre los mecanismos dependientes de caperuza y de IRES fueron más acusadas, es decir, los ligandos muestran una mayor selectividad en la inhibición de la traducción dependiente de IRES con respecto al mecanismo canónico. Por ejemplo, las diferencias en la capacidad de inhibición entre los dos mecanismos de traducción a una concentración 0,5 μM de ligando con el IRES de HCV rondan el 40%, un porcentaje que duplica la diferencia en el caso del IRES de FMDV (alrededor del 20%).

Por comparación con lo observado en el apartado anterior, se puede concluir que los 2-aminobenzimidazoles son inhibidores más potentes y selectivos del mecanismo IRES en HCV que en FMDV. Relacionándolo con los resultados de ITC y de sondeo químico, todo parece indicar que la inhibición de la traducción vía IRES producida por los compuestos 2-aminobenzimidazol tiene lugar por mecanismos

diferentes en HCV que en FMDV. Por lo visto en los experimentos tipo SHAPE, apoyado por los resultados de calorimetría y fluorescencia, y a diferencia de lo que sucede en HCV, puede concluirse que los compuestos derivados de 2-aminobenzimidazol deben probablemente su actividad inhibitoria del IRES de FMDV a que alteran la estructura terciaria del dominio III, que es clave en la correcta funcionalidad del IRES.

2.3.2 Ensayos de inhibición in vivo de FMDV

Los resultados notoriamente positivos en los ensayos de inhibición in vitro impulsaron a llevar a cabo los experimentos de inhibición viral en células infectadas, como prueba preliminar de la actividad antiviral de nuestros compuestos. Para ello, se transfectó el virus de fiebre aftosa sintetizado in vitro sobre células BHK-21. Previamente, se habían adicionado al medio celular una disolución de los compuestos, Isis-11 e IRAB-1, cuya capacidad inhibitoria se pretendía evaluar. Se realizaron dos tipos de experimentos. En el primero de ellos, se midió la extensión de la replicación viral mediante un ensayo de placas y en el segundo, se llevó a cabo un experimento *Western blot* para determinar la expresión de proteína.

2.3.2.1 Inhibición de la replicación viral

Este experimento consiste en comprobar la infectividad del virus en presencia o ausencia de los ligandos. Para ello, se añade un volumen del sobrenadante de cultivo celular BHK-21 transfectado sobre una monocapa de células IBRS-2 susceptibles de ser infectadas. Tras la adición, se lleva a cabo una serie de tratamientos que acaban con el fijado y tintado de la monocapa⁴⁴. Finalmente, se realiza un recuento del número de placas virales formadas por unidad de volumen (PFU/mL). Cuanto mayor es el valor del recuento, mayor es la replicación viral. Estos ensayos se llevaron a cabo a diferentes concentraciones de los ligandos y los recuentos se llevaron a cabo pasadas 24 h desde la adición.

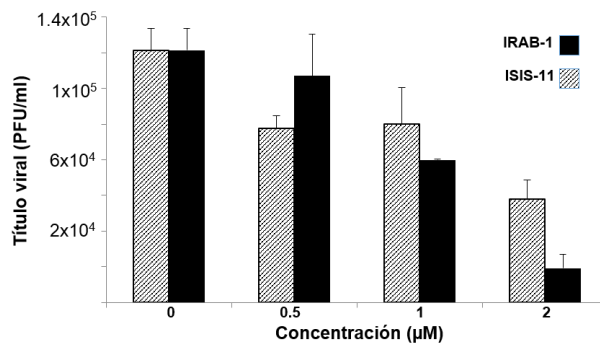


Fig. 2.18 Resultados de los ensayos de replicación viral a diferentes concentraciones de ligando.

Los resultados (**Fig. 2.18**) obtenidos muestran una inhibición de la replicación viral dependiente de dosis para ambos ligandos. IRAB-1 exhibe mejores inhibiciones que Isis-11, excepto a una concentración 0,5 μM. A la concentración 2 μM, IRAB-1 consigue una inhibición del 85%, frente al 60% de Isis-11.

2.3.2.2 Western blot

Este análisis permite determinar de manera indirecta la cantidad de proteína viral producida por las células transfectadas⁵² y por tanto, sirve para confirmar que la inhibición es debida esencialmente a la disminución de la funcionalidad del IRES viral. El proceso comienza con el lisado y posterior centrifugado de las células transfectadas para extraer la proteína de la célula. La cantidad total de proteína presente en el sobrenadante se separa mediante electroforesis y posteriormente se transfiere a una membrana donde cada proteína es reconocida por un anticuerpo específico, llamado anticuerpo primario. Este anticuerpo primario a su vez, es utilizado como diana por un anticuerpo secundario que amplifica la señal y habilita la detección y cuantificación de la proteína generada, mediante una reacción quimioluminiscente. Para asegurar que en todos los experimentos se mide la misma cantidad de proteína, en el ensayo se incluye una proteína control, que en nuestro caso fue α-tubulina^{44,52}.

El ensayo se realizó sólo sobre las células infectadas por FMDV y que habían sido tratadas con Isis-11 y IRAB-1, respectivamente. Para los dos compuestos, se puso de manifiesto que se producía la inhibición de la expresión de la proteína VP1 del virus de fiebre aftosa (**Fig. 2.19**).

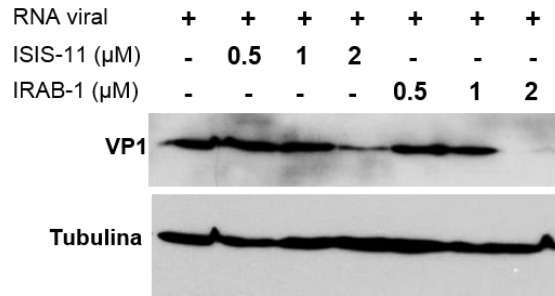


Fig. 2.19 Resultados del análisis *Western blot* incluyendo α -tubulina como control.

Los resultados mostraron una reducción de la expresión de proteína dependiente de la concentración tanto en el caso de Isis-11 como de IRAB-1. En todas las concentraciones ensayadas, IRAB-1 tiene mayor efecto que Isis-11. El efecto es especialmente relevante a concentración 2 μ M, ya que se aprecia una reducción prácticamente completa de la traducción de VP1 provocada por IRAB-1, mientras que la reducción es sensiblemente menor con Isis-11 (**Fig. 2.19**).

De estos experimentos, se concluye que IRAB-1 es capaz de inhibir la producción de proteína viral de forma más eficaz que Isis-11 y, por tanto, muestra unas mejores propiedades antivirales. Además, todo parece indicar que la inhibición de la producción viral producida en FMDV por los 2-aminobenzimidazoles es selectiva del mecanismo IRES. De todas formas, con los datos aquí disponibles, no se puede descartar que los inhibidores puedan también interferir en el papel de las proteínas implicadas en el mecanismo IRES. Es importante mencionar que después de 48 h, las células infectadas que habían sido tratadas con Isis-11 e IRAB continuaban proliferando, aunque su tasa de multiplicación era menor que la de las células nativas. Prueba de la baja citotoxicidad de los compuestos ensayados, no se observaba el desprendimiento de monocapas a las concentraciones en que se producía la inhibición viral.

Bibliografía

- (1) Boerneke, M. A.; Dibrov, S. M.; Gu, J.; Wyles, D. L.; Hermann, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111* (45), 15952–15957.
- (2) Boerneke, M. A.; Hermann, T. *RNA Biol.* **2015**, DOI: 10.1080/15476286.2015.1054592
- (3) Fernández-Miragall, O.; Martínez-Salas, E. *RNA* **2003**, *9* (11), 1333–1344.
- (4) Fernández-Miragall, O.; Ramos, R.; Ramajo, J.; Martínez-Salas, E. *RNA* **2006**, *12* (2), 223–234.
- (5) Fernández, N.; Fernandez-Miragall, O.; Ramajo, J.; García-Sacristán, A.; Bellora, N.; Eyra, E.; Briones, C.; Martínez-Salas, E. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39* (19), 8572–8585.
- (6) Jung, S.; Schlick, T. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41* (3), 1483–1495.
- (7) Wilson, W. D.; Tanious, F. a; Fernandez-Saiz, M.; Rigl, C. T. *Methods Mol. Biol. (Totowa, NJ, U.S.)* **1997**, *90*, 219–240.
- (8) Ranjbar, B.; Gill, P. *Chem. Biol. Drug Des.* **2009**, *74* (2), 101–120.
- (9) Pilch, D. S.; Kaul, M.; Barbieri, C. M.; Kerrigan, J. E.; Johnson, W. *Biopolymers* **2003**, *70*, 58–79.
- (10) Blakeley, B. D.; Deporter, S. M.; Mohan, U.; Burai, R.; Tolbert, B. S.; McNaughton, B. R. *Tetrahedron* **2012**, *68* (43), 8837–8855.
- (11) Dibrov, S. M.; Ding, K.; Brunn, N. D.; Parker, M. A.; Bergdahl, B. M.; Wyles, D. L.; Hermann, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109* (14), 5223–5228.
- (12) Paulsen, R. B.; Seth, P. P.; Swayze, E. E.; Griffey, R. H.; Skalicky, J. J.; Cheatham, T. E.; Davis, D. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107* (16), 7263–7268.
- (13) Doktycz, M. J. *Encyclopedia of life sciences*; **1997**, 3123–3140.
- (14) Mergny, J.-L.; Lacroix, L. *Oligonucleotides* **2003**, *13* (6), 515–537.
- (15) Tinoco, J. I. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82* (2), 4785–4790.
- (16) Cary, P. D.; Kneale, G. G. *Methods Mol. Biol.* **2009**, *543*, 613–624.
- (17) Kypr, J.; Kejnovská, I.; Renčíuk, D.; Vorlíčková, M. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37* (6), 1713–1725.
- (18) Chang, Y.-M.; Chen, C. K.-M.; Hou, M.-H. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 3394–3413.
- (19) Sosnick, T. R.; Fang, X.; Shelton, V. M. *Methods Enzymol.* **2000**, *317*, 393–409.
- (20) Croney, J. C.; Jameson, D. M.; Learmonth, R. P. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **2001**, *29* (2), 60–65.
- (21) Jameson, D. M.; Croney, J. C.; Moens, P. D. J. *Methods Enzymol.* **2003**, *360*, 1–43.
- (22) Callis, P. R. *J. Mol. Struct.* **2014**, *1077*, 14–21.
- (23) Hamasaki, K.; Rando, R. R. *Anal. Biochem.* **1998**, *261* (2), 183–190.
- (24) Yan, Z.; Baranger, A. M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14* (23), 5889–5893.
- (25) Blount, K. F.; Tor, Y. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31* (19), 5490–5500.
- (26) Seth, P. P.; Miyaji, A.; Jefferson, E. A.; Sannes-Lowery, K. A.; Osgood, S. A.; Propp, S. S.; Ranken, R.; Massire, C.; Sampath, R.; Ecker, D. J.; Swayze, E. E.; Griffey, R. H. *J. Med. Chem.* **2005**, *48* (23), 7099–7102.
- (27) Parsons, J.; Castaldi, M. P.; Dutta, S.; Dibrov, S. M.; Wyles, D. L.; Hermann, T. *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5* (11), 823–825.
- (28) Rynearson, K. D.; Charrette, B.; Gabriel, C.; Moreno, J.; Boerneke, M. A.; Dibrov, S. M.; Hermann, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24* (15), 3521–3525.
- (29) Barbieri, C. M.; Kaul, M.; Pilch, D. S. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 3567–3574.

- (30) Dibrov, S. M.; Johnston-Cox, H.; Weng, Y. H.; Hermann, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46* (1-2), 226–229.
- (31) Freyer, M. W.; Lewis, E. A. *Methods Cell Biol.* **2008**, *84*, 79–113.
- (32) Ladbury, J. E.; Klebe, G.; Freire, E. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9* (1), 23–27.
- (33) Chaires, J. B. *Annu. Rev. Biophys.* **2008**, *37*, 135–151.
- (34) Feig, A. L. *Biopolymers* **2007**, *87* (5-6), 293–301.
- (35) Salim, N. N.; Feig, A. L. *Methods* **2009**, *47* (3), 198–205.
- (36) Kaul, M.; Pilch, D. S. *Biochemistry* **2002**, *41*, 7695–7706.
- (37) Feig, A. L. *Methods Enzymol.* **2009**, *468*, 409–422.
- (38) Turnbull, W. B.; Daranas, A. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (48), 14859–14866.
- (39) Fernández, E. Síntesis y evaluación de ligandos con bases Janus para el reconocimiento de los pares U·U y C·U característicos de los RNAs tóxicos asociados a las distrofias miotónicas, Tesis Doctoral, Universitat de Barcelona, **2015**.
- (40) Núñez, S.; Venhorst, J.; Kruse, C. G. *Drug Discov. Today* **2012**, *17* (1-2), 10–22.
- (41) Hofstadler, S. A.; Sannes-Lowery, K. A. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5* (7), 585–595.
- (42) Ganem, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113* (8), 6294–6296.
- (43) Rosu, F.; De Pauw, E.; Gabelica, V. *Biochimie* **2008**, *90* (7), 1074–1087.
- (44) Lozano, G.; Trapote, A.; Ramajo, J.; Elduque, X.; Grandas, A.; Robles, J.; Pedroso, E.; Martínez-Salas, E. *RNA Biol.* **2015**, *12* (5), 555–568.
- (45) Merino, E. J.; Wilkinson, K. A.; Coughlan, J. L.; Weeks, K. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (12), 4223–4231.
- (46) Weeks, K. M. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2010**, *20* (3), 295–304.
- (47) Fernández, N.; García-Sacristán, A.; Ramajo, J.; Briones, C.; Martínez-Salas, E. *Virology* **2011**, *409* (2), 251–261.
- (48) Pang, P. S.; Elazar, M.; Pham, E. A.; Glenn, J. S. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39* (22), 1–11.
- (49) Tullius, T. D.; Greenbaum, J. A. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9* (2), 127–134.
- (50) McGinnis, J. L.; Duncan, C. D. S.; Weeks, K. M. *Methods Enzymol.* **2009**, *468*, 67–89.
- (51) Mountford, P. S.; Smith, A. G. *Trends Genet.* **1995**, *11* (5), 179–184.
- (52) Alegria-Schaffer, A.; Lodge, A.; Vattem, K. *Methods Enzymol.* **2009**, *463*, 573–599.

Conclusiones

Conclusiones

En el presente trabajo de tesis, se han preparado diversos análogos del aminobenzimidazol conocido como Isis-11, con el objeto de ser ensayados como inhibidores de la traducción mediada por IRES por interacción con el RNA y determinar sus potenciales propiedades antivirales.

En primer lugar, se ha llevado a cabo la síntesis de Isis-11, siguiendo un procedimiento esencialmente descrito en la bibliografía, aunque incorporando modificaciones en determinados pasos de la ruta sintética. A continuación, se ha desarrollado una nueva metodología que ha permitido la obtención de tres nuevos derivados benzimidazólicos basados en la estructura de Isis-11, a los que hemos denominado IRAB (*IRES aminobenzimidazole binders*), que incorporan una insaturación adicional en el anillo de oxígeno y en los que se varía la posición de los apéndices amino. Esta nueva ruta sintética produce los derivados IRAB en un menor número de etapas que la de Isis-11 y posibilita la obtención de benzimidazoles con muy diferente grado de modificación.

Como primer paso para evaluar el potencial inhibidor de los nuevos compuestos benzimidazólicos en la traducción mediada por IRES, se ha estudiado la interacción con segmentos de la zona apical del dominio III del IRES de FMDV (SL3a y CRL) y del subdominio IIa del IRES de HCV mediante diversas técnicas biofísicas. Con este objetivo, se han determinado afinidades y parámetros termodinámicos de interacción, empleando las espectroscopias de UV, DC y fluorescencia, y la calorimetría de titulación isotérmica (ITC).

En primer lugar, se han llevado a cabo experimentos de fusión por UV y DC con las dianas SL3a y CRL del IRES de FMDV para determinar la estabilización térmica de los complejos formados con Isis-11 e IRAB-1, pero no han sido útiles para mostrar la interacción entre ligando y RNA.

Las valoraciones por dicroísmo circular han permitido estimar la afinidad de los ligandos IRAB-1 e Isis-11 por el segmento SL3a del IRES de FMDV. Las afinidades se sitúan en el rango micromolar medio-alto. IRAB-1 ha mostrado las mejores EC_{50} , entre 5 y 7 veces inferiores a las observadas con Isis-11. El efecto del pH sobre la interacción ligando-RNA podría relacionarse con el grado de protonación de los ligandos.

En un primer bloque de experimentos por fluorescencia, se han realizado valoraciones por adición de las dianas SL3a y CRL sobre Isis-11 e IRAB-1 y midiendo la variación de la fluorescencia intrínseca de los ligandos. Los valores de afinidad se sitúan en los rangos submicromolar y micromolar bajo, siendo Isis-11 el más afín.

Con respecto al efecto del pH, se observa la misma tendencia que en los experimentos por DC, con valores de afinidad mayores (menores K_d) a pH más básico. Sin embargo, la escasa reproducibilidad de la metodología ocasionada por el *quenching* y el reducido número de medidas por experimento por el elevado gasto de RNA por ensayo, motivaron a explorar la utilización de RNAs marcados con 2-aminopurina, un análogo fluorescente de adenina, para evaluar con mayor exactitud la interacción ligando-RNA por fluorescencia.

En este segundo bloque de experimentos por fluorescencia, se ha evaluado en primer lugar la interacción de los ligandos (Isis-11, IRAB-1 e IRAB-2) con una diana SLIIa/AP54, correspondiente al subdominio IIa del IRES de HCV y que incorpora una 2-aminopurina en la posición A54 del bucle pentanucleotídico interno. Por lo que respecta a Isis-11, los resultados reproducen lo descrito con anterioridad para compuestos similares, lo que ha permitido validar la metodología. Las afinidades registradas en estos experimentos se hallan en los rangos micromolar bajo y submicromolar. Los ligandos IRAB presentan mejores afinidades que Isis-11 en todas las condiciones, siendo IRAB-2 el de menor EC_{50} . Por lo que respecta al efecto del pH, se obtienen las mayores afinidades a pH 6,5, lo que indica que la protonación del grupo guanidinio de los ligandos favorece la interacción. En cambio, a diferencia de lo publicado, el Mg^{2+} apenas influye en los valores de afinidad.

En cuanto al IRES de FMDV, se ha estudiado la interacción con las dianas SL3a, incorporando 2-aminopurina en dos posiciones diferentes, y CRL. La diana por la que los ligandos han mostrado mejores afinidades ha sido SL3a/AP167, diana marcada en una posición del bucle hexanucleotídico interno, seguida por la diana CRL/AP239. Por el contrario, no se ha observado interacción de los ligandos con la diana SL3a/AP180, que incorpora 2-aminopurina en el bucle terminal. Todo parece indicar que los ligandos interaccionan preferentemente con el bucle interno hexanucleotídico de SL3a en vez de con el *tetraloop* GNRA. El ligando que ha presentado las mejores afinidades ha sido IRAB-2, seguido por Isis-11, y por último, IRAB-1. En cuanto al efecto del pH, se observan mejores afinidades a pH 6,5 que a pH 7,5, lo que lleva a concluir que la protonación de la guanidina tiene un efecto favorable en la interacción.

Se han llevado a cabo experimentos de selectividad, en presencia de un exceso de tRNA a modo de competidor. Por lo que respecta a la diana SLIIa/AP54 de HCV, los compuestos IRAB han mostrado la mejor selectividad, siendo IRAB-1 el más selectivo de los tres. La selectividad de los ligandos por la diana SL3a/AP167 se ha

podido determinar únicamente para IRAB-1, pudiendo sólo estimarse un valor mínimo para Isis-11 e IRAB-2. En este caso, IRAB-1 es también el más selectivo.

Para finalizar el estudio biofísico, se han realizado experimentos de ITC que han permitido determinar la termodinámica completa de la interacción de los ligandos con las dianas SLIIa de HCV y SL3a de FMDV. En cuanto a la diana SL3a, los ligandos muestran valores de afinidad (K_d) del mismo orden de magnitud que los de fluorescencia, siendo Isis-11 el que muestra la mayor afinidad, seguido de cerca por IRAB-2. Las estequiometrías de los complejos más estables han mostrado ser aproximadamente 1:1, coincidiendo con las observadas para los complejos de los derivados de 2-aminobenzimidazol con el subdominio IIa de HCV IRES mediante otras técnicas. Se ha realizado un experimento adicional para corroborar esta estequiometría por espectrometría de masas aunque el resultado no ha sido suficientemente concluyente. El perfil termodinámico de la interacción de los ligandos ha revelado un incremento de la componente entálpica de los ligandos IRAB con la diana respecto a la de Isis-11. Esto indica que la interacción de los ligandos IRAB tiene un mayor carácter intercalante que la de Isis-11, un hecho coherente con la mayor aromaticidad y planicidad de estos ligandos, en comparación con Isis-11.

Las afinidades (K_d) de los ligandos que se determinan en los ensayos de ITC con la diana SLIIa se encuentran en el rango micromolar bajo, un orden de magnitud superior a las de los experimentos de fluorescencia, aunque coherentes con los valores descritos en la bibliografía. Nuevamente, los ligandos IRAB han mostrado las mayores afinidades (menores K_d), siendo IRAB-2 el compuesto más afín. También, las estequiometrías de los complejos más estables se encuentran alrededor de la relación 1:1. Con respecto al perfil termodinámico, se observa el mismo comportamiento que en FMDV. La interacción de Isis-11 se encuentra dirigida principalmente por la entropía, en IRAB-1 las componentes entálpica y entrópica se hallan equilibradas y la interacción de IRAB-2 se encuentra dirigida entálpicamente. A similitud de lo observado en la diana de FMDV, se deduce que los ligandos IRAB presentan un mayor carácter intercalante que Isis-11.

Los datos obtenidos en los experimentos biofísicos se han complementado con los experimentos de sondeo químico de tipo *footprinting* realizados sobre el IRES de FMDV, con el objeto de disponer de una imagen del grado de alteración estructural del RNA completo al interactuar con los ligandos. Los experimentos tanto por SHAPE como con el radical hidroxilo han permitido extraer la conclusión que la interacción de los ligandos con el IRES no se produce en un único lugar de unión, sino en diversos segmentos, aunque especialmente en la zona apical del

dominio III. Unido esto a los resultados de los experimentos biofísicos, todo parece indicar que los ligandos deben esencialmente su actividad a que interactúan con el IRES de FMDV produciendo un cambio conformacional de la zona apical del dominio III, vital para la correcta estructuración y funcionalidad del RNA.

Como primer paso para evaluar la actividad antiviral derivada de la inhibición del mecanismo IRES de traducción, se han realizado ensayos de inhibición *in vitro* tanto con el IRES de HCV como con el de FMDV, utilizando un RNA bicistrónico. Los resultados con ambos IRES han mostrado una inhibición preferente del mecanismo de traducción vía IRES frente al mediado por *cap*, para los tres aminobenzimidazoles ensayados. La inhibición se observa a concentraciones submicromolares para IRAB-1 e Isis-11 y en el rango micromolar bajo para IRAB-2. La inhibición se ha observado más selectiva en el IRES de HCV que en el de FMDV. Las actividades de Isis-11 e IRAB-1 son muy similares, sin observarse una clara diferencia entre ellos. Se corrobora, por tanto, la hipótesis inicial de este trabajo que los derivados de 2-aminobenzimidazol, que habían sido descritos contra el IRES de HCV, también pueden producir la inhibición del mecanismo IRES en otros virus y a concentraciones muy bajas.

Finalmente, se han llevado a cabo experimentos de inhibición *in vivo* con Isis-11 e IRAB-1 sobre células transfectadas con el virus de FMDV. Ambos ligandos consiguen inhibir la replicación viral en los rangos de concentración submicromolar y micromolar bajo. En líneas generales, IRAB-1 ha presentado índices de inhibición de la replicación viral superiores a Isis-11, siendo a una concentración 2 μM de un 85% para IRAB-1, por un 60% de Isis-11. La inhibición de la producción de proteína viral en un experimento *Western blot* ha mostrado que IRAB-1 consigue una inhibición prácticamente completa de la formación de proteína a una concentración 2 μM , superior a la provocada por Isis-11. Además, las células tratadas con los aminobenzimidazoles siguen proliferando, aunque a una velocidad inferior a las no tratadas, pero sin observarse el desprendimiento de monocapas provocado por citotoxicidad.

En vista de los resultados, se puede concluir que la actividad antiviral de los dos compuestos ensayados, Isis-11 e IRAB-1, tiene relación con su capacidad en interferir en la traducción de FMDV mediada por IRES por interacción directa con el RNA. Una ruta sintética más directa y la actividad sensiblemente mejor de IRAB-1 en relación a Isis-11 permiten pensar que podrán desarrollarse otros derivados IRAB con mayor actividad antiviral, producto de una mejor selectividad por el RNA IRES.

Parte Experimental

Parte Experimental

Materiales y métodos

1. Disolventes y reactivos

ACN: Calidad HPLC-gradiente (>99,9% pureza) de VWR o Fischer Scientific.

ACN anhidro: Calidad HPLC-gradiente (>99,9% pureza). Se destila sobre CaH_2 en polvo y se guarda sobre piedras de CaH_2 y bajo atmósfera de argón.

ACN anhidro (Síntesis de oligonucleótidos): ACN de calidad síntesis de oligonucleótidos comprado a Applied Biosystems y guardado sobre desecante Trap-Pak® para mantenerlo anhidro.

Agua milliQ: Agua desionizada ($18,2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$) obtenida de un sistema Milli-Q Synthesis A10 system de Millipore.

NH_3 : Disolución comercial al 32% extrapura de Scharlau.

CH_2Cl_2 anhidro: Grado de calidad para síntesis de Scharlau. Para obtener CH_2Cl_2 anhidro, se destila sobre CaH_2 en polvo y se guarda sobre piedras de CaH_2 y bajo atmósfera de argón.

2,4,6-colidina anhidra: Se guarda sobre piedras de CaH_2 y bajo atmósfera de argón.

DIEA anhidra: Se guarda sobre piedras de CaH_2 y bajo atmósfera de argón.

DMSO anhidro: Se guarda sobre tamiz molecular de 3 Å activado y bajo atmósfera de argón.

Dioxano: Grado de calidad para espectrofotometría de Sigma Aldrich.

Éter dietílico: Grado de calidad para síntesis de Scharlau o para espectrofotometría de Sigma Aldrich.

Etanol (absoluto): adquirido de Panreac.

Metanol: Calidad HPLC de VWR.

Metanol anhidro: Grado de calidad para síntesis de Panreac. Se guarda sobre tamiz molecular de 3 Å activado y bajo atmósfera de argón.

THF anhidro: Grado de calidad para síntesis de Scharlau. Para obtener THF anhidro, se destila sobre Na(s) en presencia de benzofenona. Se recoge sobre tamiz molecular de 3 Å activado cuando la disolución está de color azul. Se guarda bajo atmósfera de argón.

Trietilamina anhidra: Se guarda sobre piedras de CaH₂ y bajo atmósfera de argón.

El resto de reactivos fueron adquiridos a Sigma-Aldrich, de calidad síntesis o su equivalente.

2. Instrumentación general

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de ¹H y ¹³C se han realizado en los espectrómetros Varian Inova 300 o Varian Mercury-400 de la unidad de RMN de los Servicios Científico-Técnicos de la UB. Los desplazamientos químicos se expresan en ppm respecto a la referencia interna de tetrametilsilano ($\delta = 0$ ppm) o a la misma señal del disolvente deuterado.

Los espectros de masas por MALDI-TOF se han obtenido en un aparato 4800 Plus MALDI TOF/TOF de Applied Biosystems. Los espectros de masas realizados mediante ESI se han obtenido en un aparato de Micromass ZQ con sonda de electrospray y detector de cuadrupolo simple acoplado a un HPLC Waters 2695. Los espectros de masas exactas han sido realizados por los Servicios Científico-Técnicos de la UB de la Unidad de Espectrometría de Masas mediante ESI de alta resolución en un espectrómetro de masas ESI-MS LC/MSD-TOF de Agilent Technologies.

Los espectros de UV-Vis y curvas de fusión fueron registrados en un espectrofotómetro Jasco V-550 conectado a un ordenador y equipado con un controlador de temperatura Jasco Peltier ETC-505T conectado a un baño de agua Pharmacia Biotech Multitemp III. Para los espectros de dicroísmo circular se ha utilizado un espectropolarímetro Jasco-J810 conectado a un ordenador y con un baño de agua Neslab RP-100 para controlar la temperatura de la celda. En ambos experimentos se utilizaron cubeta de cuarzo Hellman de volumen 1,4 mL y un paso de luz de 10 mm.

Los espectros de fluorescencia se han adquirido en un fluorímetro modular QuantaMaster PTI (Photon Technology International) equipado con una lámpara de xenón de 150 W, un tubo fotomultiplicador R928, un *Shutter* automático en el monocromador de excitación, rejillas motorizadas y un soporte con capacidad para cuatro cubetas con agitador y controlador de temperatura Turret 400 (Quantum). Las cubetas utilizadas han sido de cuarzo, de 10 mm de paso de luz y volumen 1,5 mL (Hellma, modelo 119.004F-QS).

Los experimentos de ITC se han llevado a cabo en un microcalorímetro NanoITC Low Volume (TA Instruments).

Las liofilizaciones de las disoluciones acuosas se han llevado a cabo en los aparatos Labconco Freezone 6 y Virtis Freezemobile 25EL.

Las suspensiones se centrifugaron en una centrífuga 5430R de Eppendorf.

Los puntos de fusión se han medido en los aparatos Reichert Termovar F05-76 y Gallenkamp MPD-350-BM 2.5.

Las reacciones con irradiación por microondas se han llevado a cabo en un horno microondas Biotage Initiator en viales sellados de volúmenes entre 2 y 20 mL.

Las medidas de pH se han realizado en un pH-metro Crison micropH Basic 20.

El material desechable de plástico (puntas de micropipetas, eppendorfs, etc) para la manipulación del RNA se adquirió previamente esterilizado. El resto de material de vidrio y de plástico se esterilizó previamente en una autoclave Autester ST P (Selecta).

3. Disoluciones tampón

3.1 Tampón de acetato de trietilamonio (TEAA) 2 M pH 7,0

Para la preparación de 500 mL de tampón, se adicionan 140 mL (1mol) de trietilamina y 58 mL de ácido acético glacial (1 mol) en un Erlenmeyer con 250 mL de agua MilliQ y provisto de agitación magnética. Se agita durante 1 h, se ajusta el pH a 7,0 con unas gotas de NEt_3 o AcOH y se enrasa a 500 mL con agua milliQ en un matraz aforado. La disolución obtenida se filtra con un filtro de poro de 45 μm . La

disolución utilizada para el análisis y purificación por HPLC se prepara por dilución de la anterior disolución con agua calidad HPLC, hasta una concentración 0,1 M.

3.2 Tampón de cacodilato sódico 10 mM

150 mM NaCl: Para preparar 100 mL de tampón, se disuelven 0,22 g de cacodilato sódico (10 mM), 0,88 g de NaCl (150 mM) y 4 mg de Na₂EDTA·2H₂O (0,1 mM) en 90 mL de agua milliQ. Se ajusta el pH a los diferentes valores seleccionados (6,5, 7,0 o 7,5) por adición de NaOH o HCl diluido y se enrasa a 100 mL con agua milliQ.

50 mM NaCl: Para preparar 100 mL de tampón, se disuelven 0,22 g de cacodilato sódico (10 mM), 0,29 g de NaCl (150 mM) y 4 mg de Na₂EDTA·2H₂O (0,1 mM) en 90 mL de agua milliQ. Se ajusta el pH a los diferentes valores seleccionados (6,5, 7,0 o 7,5) por adición de NaOH o HCl diluido y se enrasa a 100 mL con agua milliQ.

150 mM NaCl, sin EDTA: Para preparar 100 mL de tampón, se disuelven 0,22 g de cacodilato sódico (10 mM) y 0,88 g de NaCl (150 mM) en 90 mL de agua milliQ. Se ajusta el pH a los diferentes valores seleccionados (6,5 o 7,5) por adición de NaOH o HCl diluido y se enrasa a 100 mL con agua milliQ.

150 mM NaCl, sin EDTA y con Mg²⁺: Para preparar 100 mL de tampón, se disuelven 0,22 g de cacodilato sódico (10 mM), 0,88 g de NaCl (150 mM) y 6 mg de MgCl₂·6H₂O (0,3 mM) en 90 mL de agua milliQ. Se ajusta el pH a los diferentes valores seleccionados (6,5 o 7,5) por adición de NaOH o HCl diluido y se enrasa a 100 mL con agua milliQ.

4. Técnicas cromatográficas

4.1 Cromatografía en capa fina (CCF)

La cromatografía en capa fina se ha realizado sobre cromatofolios de gel de sílice con indicador de fluorescencia a 254 nm (60F, 0,2 mm, Merck). El revelado se lleva a cabo de forma directa por visualización bajo una lámpara de ultravioleta de 254 nm.

4.2 Cromatografía en columna

La purificación por columna cromatográfica se llevó a cabo usando como fase estacionaria gel de sílice (Chromatogel 60A CC, 35-70 μm , SDS) y como fase móvil diferentes mezclas de disolventes orgánicos escogidos en función de las polaridades de los productos a separar.

4.3 Cromatografía líquida de alta presión (HPLC)

El análisis y purificación por columna cromatografía líquida de alta presión en fase reversa se ha realizado utilizando diferentes aparatos: Shimadzu (2 bombas LC-6A con mezclador de alta presión, autoinyector SIL-6B, detector UV-Vis SPD-6A y registrador Chromatopac C-R6A), Shimadzu (Bomba LC-20AD, autoinyector SIL-20A HT, desgasificador DGU-20A5 y detector SPD-M20A o SPD-20A) y Waters (*Controller* 600, autoinyector 717 plus y detector 2487).

Las columnas de HPLC se eligieron según las condiciones de elución de los compuestos:

En las condiciones de análisis de oligonucleótidos se ha utilizado una columna Kromasil 100 C18 (250 x 4 mm, 10 μm , Teknokroma) a un flujo de 1 mL/min. Para realizar las purificaciones se ha empleado una columna semipreparativa Jupiter C18 (250 x 10 mm, 10 μm , 300 Å, Phenomenex) a un flujo de 3 mL/min. Los eluyentes utilizados en estas condiciones han sido: A: TEAA 0,1 M y B: ACN.

En condiciones de análisis con eluyentes ácidos, la columna utilizada ha sido GraceSmart RP-18 (250 x 4,6 mm, 10 μm , Grace), a un flujo de 1 mL/min. Los eluyentes en estas condiciones han sido: A: 0,045% TFA/H₂O y B: 0,036% TFA/ACN.

Antes de ser utilizados, todos los eluyentes fueron desgasificados en un baño de ultrasonidos durante 15 min.

4.4 Cromatografía líquida de media presión (MPLC)

La purificación por MPLC se ha realizado empleando un sistema formado por una bomba de pistón Ismatec Mc-Z, un detector de UV-Vis Uvicord SII de Pharmacia Biotech de longitud de onda fija (lámpara y filtro de 254 nm), un colector de fracciones automático Ultrorac 7000 de LKB y un registrador Ecograph RSG30 de

Endress+Hauser, y utilizando una columna de fase reversa de gel de sílice Vydac C18 (20 x 2 cm, 15-20 μm de diámetro de partícula y 300 Å de medida de poro), eluyendo a un flujo entre 2,5-3 mL/min. Para llevar a cabo la elución por gradiente se ha utilizado un recipiente con dos vasos comunicantes (gradientómetro), llenados cada uno con 500 mL de las disoluciones inicial y final del gradiente a realizar. Los eluyentes fueron desgasificados durante 15 min en un baño de ultrasonidos antes de ser utilizados.

5. Síntesis de oligonucleótidos en fase sólida

La síntesis de oligonucleótidos se ha realizado en un sintetizador automático Applied Biosystems 3400, usando la metodología estándar del fosfito triéster a escala de 1 μmol^1 . El soporte sólido usado, han sido bolas de vidrio de poro controlado (CPG) de origen comercial (Glen Research o Link Technologies), que contienen el primer nucleósido unido a través del hidroxilo 3' mediante un grupo succinilo. Se han utilizado para la síntesis β -cianoetilo fosforamiditos de origen comercial (Glen Research y Link Technologies), con las aminas exocíclicas de las nucleobases protegidas con grupo acilo (fenoxiacetilo para adeninas (A^{Pac}), isopropoxifenoxiacetilo para guaninas ($G^{\text{iPr-Pac}}$) y acetilo para citosinas (C^{Ac})), el hidroxilo primario en la posición 5' protegido con dimetoxitritilo (DMT), y el hidroxilo 2' de la ribosa protegido por el grupo *tert*-butildimetilsililo (TBDMS) a excepción de los dos últimos nucleósidos de cada extremo, que eran 2'-*O*-metilados, con la intención de mejorar la estabilidad enzimática del oligonucleótido. El resto de reactivos usados en la síntesis de oligonucleótidos son también de origen comercial (Glen Research, Link Technologies).

Antes de iniciar la síntesis, los derivados fosforamidito y el BTT se han secado durante toda una noche en un desecador a vacío en presencia de P_2O_5 y KOH. Se introducen en el sintetizador disueltos en ACN anh, a una concentración 0,1 M (0,3 mL por acoplamiento) para los fosforamiditos y 0,3 M (0,6 mL por acoplamiento) para el BTT. Para prevenir la contaminación por humedad, todo el material empleado en la preparación de estas disoluciones se secó previamente en una estufa a 110°C durante 24 h, y se dejó atemperar en un desecador.

Finalizado el acoplamiento de la cadena, se coloca la resina en un vial roscado para reacciones a presión, se adicionan 2 mL de una mezcla 1:1 de NH_3 ac (32%) y una disolución de dimetilamina 8 M en etanol, y se deja 30 min a 65°C. De esta

manera, el oligonucleótido es desanclado del soporte sólido y las aminas exocíclicas de las nucleobases quedan desprotegidas. Pasado ese tiempo, se filtra la resina y se lava con EtOH absoluto. El filtrado se concentra a presión reducida y el residuo resultante se trata con 600 µL de una disolución desililante (1,5 mL de NMP anh, 0,75 mL de TEA y 1 mL de hidrófluoruro de trietilamina) a 65°C durante 2,5 h, eliminando así el grupo protector TBDMS. La mezcla resultante se deja enfriar a T amb, se añaden 2 mL de isopropoxitrimetilsilano, se agita y se deja reposar durante 10 min, observándose la aparición de un precipitado. Se adicionan 5 mL de éter dietílico, se centrifuga durante 5 min (10°C, 4500 rpm), y se decanta la solución sobrenadante, repitiendo el proceso dos veces más. El precipitado se seca, se disuelve en 1 mL de TEAA 0,1 M, y se purifica por HPLC utilizando un gradiente 0-50% de B. Para eliminar el grupo DMT del último nucleótido se añade una disolución de ácido acético al 3% en agua sobre el oligonucleótido purificado y se deja reaccionar durante 45 min a T amb. Seguidamente se liofiliza y se repurifica por HPLC (gradiente 0-30% de B), las fracciones correspondientes al oligonucleótido puro se combinan y liofilizan.

6. Cuantificación de oligonucleótidos

La cuantificación de los oligonucleótidos se realiza mediante espectroscopia UV-Vis, midiendo la absorbancia a 260 nm, longitud correspondiente al máximo de absorbancia de las nucleobases. El coeficiente de extinción molar de cada oligonucleótido se puede estimar usando la fórmula siguiente²:

$$\epsilon_{oligo} = \sum (\epsilon_{base}) \cdot f_c$$

Donde f_c corresponde a un factor de corrección (0,9 para oligonucleótidos monocatenarios y 0,8 para bicatenarios) debido a las interacciones por apilamiento entre nucleobases que producen una disminución de la absorbancia con respecto a la de los nucleósidos individuales. Los coeficientes de extinción molar de los nucleósidos se muestran en la siguiente tabla:

Nucleósido	ϵ_{260} (L·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹)
A	15100
G	11500
C	10100
U	7700

7. Caracterización por espectrometría de masas de los oligonucleótidos

Los espectros de masa adquiridos mediante la técnica de desorción iónica provocada por láser asistida por matriz y con detección del tiempo de vuelo (MALDI-TOF) se han realizado en un aparato 4800 Plus MALDI TOF/TOF de Applied Biosystems. Para el análisis de oligonucleótidos, se utiliza normalmente el modo negativo que implica la detección de aniones y modo de análisis lineal. Este modo presenta una mayor sensibilidad que el modo reflector, a cambio de una menor precisión. En todos los casos, se ha empleado 2,4,6-trihidroxiacetofenona (THAP) como matriz. La preparación de las muestras consistió en la mezcla de 1 µL de la disolución de analito, 1 µL de disolución de la matriz THAP (10 mg/mL en H₂O/ACN 1:1) y 1 µL de disolución de citrato amónico (10 mg/mL en H₂O). De la mezcla resultante se extrae 1 µL que se deposita sobre una placa, se deja secar a temperatura ambiente y se introduce en el aparato.

Los espectros de masas realizados mediante ESI se han obtenido en un aparato de Micromass ZQ con sonda de electrospray y detector de cuadrupolo simple acoplado a un HPLC Waters 2695. Las muestras para los experimentos de electrospray se prepararon por disolución del analito a una concentración 1 mM aproximadamente en agua milliQ o metanol de calidad HPLC y se inyectaron al espectrómetro a través del módulo HPLC con un flujo constante (0,2 mL/min) de agua milliQ o metanol HPLC según las características de la muestra. Dependiendo del analito, se eligió la utilización de un modo positivo o negativo de análisis.

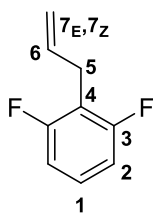
La determinación de la estequiometría del complejo ligando-RNA se llevó a cabo en un espectrómetro de masas Synapt G1 HDMS (Waters) con infusión directa, del Servicio de Espectrometría de Masas del IRB-PCB (véase el apartado 6 del capítulo 2 de esta sección).

Parte Experimental - Capítulo 1

1. Preparación de Isis-11

1.1 Síntesis de 2-alil-1,3-difluorobenceno (1)

Se disuelven 6,0 g (28,8 mmol) de bromuro de 2,6-difluorobencilo en 50 mL de THF anh bajo atmósfera de argón. A continuación se añaden 0,451 g (2,88 mmol) de 2,2'-bipiridina y 0,547 g (2,88 mmol) de CuI situando el sistema en un baño de acetona – nieve carbónica a -78°C . Finalmente se adicionan gota a gota 43,2 mL (43,2 mmol) de una disolución 1,0 M de bromuro de vinilmagnesio en THF. Se mantiene en agitación durante 3 h a -78°C para posteriormente dejar atemperar hasta temperatura ambiente, tiempo durante el cual la mezcla de reacción se oscurece pasando de amarillo anaranjado a marrón. Se finaliza el tratamiento por adición de 100 mL de disolución de NH_4Cl sat. Se separan las fases y la fase acuosa se extrae con AcOEt (3 x 50 mL), las fases orgánicas combinadas se lavan con disolución de NH_4Cl sat (4 x 50 mL). Se seca la fase orgánica con MgSO_4 anh y se concentra a sequedad obteniendo 3,94 g ($\eta = 88\%$) de un aceite amarillo.



Caracterización

R_f (AcOEt/Hexano 7:3): 0,72.

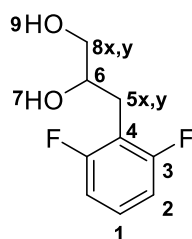
RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): 7,15 (s, 1H, H_1), 6,86 (m, 2H, H_2), 5,93 (m, 1H, H_6), 5,04 (m, 2H, $\text{H}_{7\text{E},7\text{Z}}$), 3,42 (m, 2H, H_5).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) δ (ppm): 161,42 (dd, $^1J_{\text{CF}} = 245,8$ Hz, $^3J_{\text{CF}} = 8,6$ Hz, C_3), 134,54 (C_6), 127,68 (t, $^3J_{\text{CF}} = 10$ Hz, C_1), 115,78 (C_7), 111,03 (dd, $^2J_{\text{CF}} = 19$ Hz, $^4J_{\text{CF}} = 7,1$ Hz, C_2), 26,40 (C_5).

1.2 Síntesis de 3-(2,6-difluorofenil)propan-1,2-diol (2)

En 50 mL de acetona se disuelve 1,0 g (6,5 mmol) de **1** y seguidamente se adicionan 0,010 g (0,027 mmol) de osmiato de potasio, 1,64 g (13,6 mmol) de óxido de *N*-metilmorfolina y 5 mL de H_2O . La mezcla se deja en agitación a T amb y se sigue el avance de la reacción por HPLC (gradiente lineal 0-100% de B, siendo A H_2O 0,045% TFA y B ACN 0,036% TFA), observándose conversión completa pasadas 100 h. Se evapora la acetona, y el residuo se diluye con agua, 20 mL, y es extraído con

AcOEt (3 x 50 mL). Se seca la fase orgánica con MgSO₄ anh y se concentra a sequedad, generando 1,18 g ($\eta = 97\%$) de un aceite naranja.



Caracterización

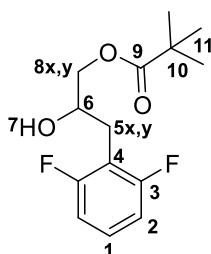
R_f (AcOEt/Hexano 7:3): 0,14.

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 7,19 (m, 1H, **H**₁), 6,88 (m, 2H, **H**₂), 3,98 (dddd, ³J= 8,8 Hz, ³J= 4,0 Hz, 1H, **H**₆), 3,69 (dd, ²J= 15,2 Hz, ³J= 4,0 Hz, 1H, **H**_{8x}), 3,53 (dd, ²J= 15,2 Hz, ³J= 8,8 Hz, 1H, **H**_{8y}), 2,92 (dd, ²J= 18,4 Hz, ³J= 9,6 Hz, 1H, **H**_{5x}), 2,84 (dd, ²J= 18,4 Hz, ³J= 8 Hz, 1H, **H**_{5y}).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm): 161,72 (dd, ¹J_{CF}= 245,2 Hz, ³J_{CF}= 8,6 Hz, **C**₃), 128,10 (t, ³J_{CF}= 10,3 Hz, **C**₁), 113,72 (t, ²J_{CF}= 20,4 Hz, **C**₄), 111,08 (dd, ²J_{CF}= 19,0 Hz, ⁴J_{CF}= 6,8 Hz, **C**₂), 71,44 (**C**₆), 65,92 (**C**₈), 26,40 (**C**₅).

1.3 Síntesis de pivaloato de 3-(2,6-difluorofenil)-2-hidroxiopropilo (3)

Se disuelven 1,441 g (7,65 mmol) de **2** en 20 mL de CH₂Cl₂ anh. Se adicionan sobre la disolución 0,110 g (0,96 mmol) de DMAP y 1,40 mL (9,56 mmol) de NEt₃. La mezcla de reacción se enfría en un baño de hielo y se añaden 1,05 mL (8,41 mmol) de cloruro de pivaloilo gota a gota y de manera fraccionada a lo largo de 24 h, controlándose la formación del producto por HPLC (gradiente lineal 0-100% de B, siendo A H₂O 0,045% TFA y B ACN 0,036% TFA). Completada la conversión, se diluye con CH₂Cl₂ y se lava con HCl al 5% (3 x 30 mL), NaHCO₃ sat (3 x 30 mL) y H₂O (30 mL). Se seca con MgSO₄ anh y se concentra a sequedad. El crudo obtenido se purifica por columna cromatográfica utilizando como fase móvil inicial Hexano/AcOEt 9:1, eluyéndose el producto diprotegido, y se aumenta la polaridad llegando a una proporción Hexano/AcOEt 75:25 para obtener el producto monoprotegido de interés. Se juntan las fracciones correspondientes y se concentra a sequedad obteniendo 1,311 g ($\eta = 63\%$) de un sólido blanco.



Caracterización:

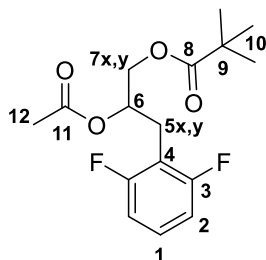
R_f (AcOEt/Hexano 7:3): 0,65.

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): 7,19 (m, 1H, H_1), 6,88 (m, 2H, H_2), 4,11(m, 3H, H_6 , $\text{H}_{8x,y}$), 2,93 (d, $^3J= 8,0$ Hz, 2H, $\text{H}_{5x,y}$), 1,23 (s, 9H, H_{11}).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) δ (ppm): 178,03 (C_9), 161,74 (dd, $^1J_{\text{CF}}= 246,0$ Hz, $^3J_{\text{CF}}= 7,6$ Hz, C_3), 128,32 (t, $^3J_{\text{CF}}= 10,2$ Hz, C_1), 113,26 (t, $^2J_{\text{CF}}= 20,0$ Hz, C_4), 111,15 (dd, $^2J_{\text{CF}}= 19$ Hz, $^4J_{\text{CF}}= 6,7$ Hz, C_2), 69,46 (C_6), 67,33 (C_8), 38,89 (C_{10}), 27,15 (C_{11}), 26,73 (C_5).

1.4 Síntesis de pivaloato de 2-acetoxi-3-(2,6-difluorofenil)propilo (4)

Se disuelven 0,74 g (2,7 mmol) de **3** en 15 mL de CH_2Cl_2 anh y la disolución se enfría en un baño de hielo a 0°C . A continuación, se adicionan 0,61 mL (4,6 mmol) de 2,4,6-colidina y 1,35 mL (19,0 mmol) de cloruro de acetilo añadidos gota a gota. Al cabo de 16 h, comprobada la desaparición del producto de partida por CCF, se diluye con CH_2Cl_2 y se lava con HCl al 5% (3 x 30 mL), NaHCO_3 sat (3 x 30 mL) y H_2O (30 mL). La fase orgánica se seca con MgSO_4 anh y se concentra a sequedad obteniendo 0,83 g ($\eta= 97\%$) de un aceite naranja.



Caracterización

R_f (AcOEt/Hexano 7:3): 0,72.

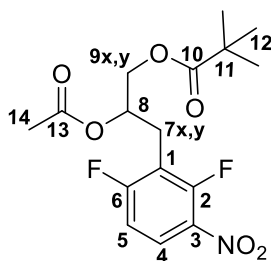
RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): 7,20 (m, 1H, H_1), 6,87 (m, 2H, H_2), 5,34 (dddd, $^3J= 6,4$ Hz, $^3J= 4$ Hz, 1H, H_6), 4,26 (dd, $^2J= 11,6$ Hz, $^3J= 4$ Hz, 1H, H_{7x}), 4,04 (dd, $^2J= 12,0$ Hz, $^3J= 6,9$ Hz, 1H, H_{7y}), 3,06 (dd, $^2J= 14,0$ Hz, $^3J= 5,6$ Hz, 1H, H_{5x}), 2,99 (dd, $^2J= 14,0$ Hz, $^3J= 6,8$ Hz, 1H, H_{5y}), 1,99 (s,

3H, H_{12}), 1,20 (s, 9H, H_{10}).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) δ (ppm): 177,97 (C_8), 170,09 (C_{11}), 161,73 (dd, $^1J_{\text{CF}}= 246,2$ Hz, $^3J_{\text{CF}}= 8,2$ Hz, C_3), 128,68 (t, $^3J_{\text{CF}}= 10,2$ Hz, C_1), 112,20 (t, $^2J_{\text{CF}}= 20,0$ Hz, C_4), 111,05 (dd, $^2J_{\text{CF}}= 19,1$ Hz, $^4J_{\text{CF}}= 6,5$ Hz, C_2), 70,11 (C_6), 63,90 (C_7), 38,79 (C_9), 27,05 (C_{10}), 23,86 (C_5), 20,75 (C_{12}).

1.5 Síntesis de pivalato de 2-acetoxi-3-(2,6-difluoro-3-nitrofenil)propilo (5)

En un balón previamente enfriado en un baño de hielo se disuelven 0,80 g (2,54 mmol) de **4** en 5 mL de HNO₃ fumante añadido gota a gota y se mantiene en agitación durante 1 h. Seguidamente, se diluye en H₂O y se extrae con AcOEt (3 x 30 mL), se realizan lavados con NaHCO₃ sat (3 x 30 mL) a la fase orgánica y se seca con MgSO₄ anh. Finalmente se concentra a sequedad obteniendo 0,90 g (η = 98%) de un aceite naranja.



Caracterización

R_f (Hexano/AcOEt 7:3): 0,48.

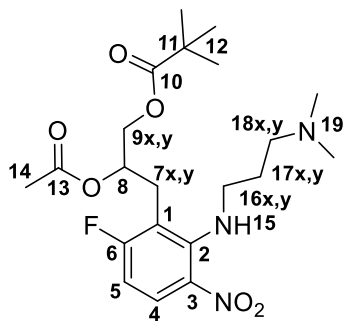
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 8,06 (m, 1H, **H**₄), 7,05 (m, 1H, **H**₅), 5,37 (m, 1H, **H**₈), 4,31 (dd, ²J= 15,6 Hz, ³J= 5,6 Hz, 1H, **H**_{9x}), 4,09 (dd, ²J= 15,6 Hz, ³J= 5,6 Hz, 1H, **H**_{9y}), 3,11 (m, 2H, **H**_{7x}, **H**_{7y}), 2,01 (s, 3H, **H**₁₄), 1,22 (s, 9H, **H**₁₂).

H₁₂).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm): 178,22 (**C**₁₀), 170,37 (**C**₁₃), 164,27 (dd, ¹J_{CF}= 257 Hz, ³J_{CF}= 7,5 Hz, **C**₆), 155,31 (dd, ¹J_{CF}= 264,0 Hz, ³J_{CF}= 9,3 Hz, **C**₂), 126,20 (d, ³J_{CF}= 11,2 Hz, **C**₄), 115,53 (dd, ²J_{CF}= 21,0 Hz, ²J_{CF}= 18,9 Hz, **C**₁), 111,59 (dd, ²J_{CF}= 24,5 Hz, ⁴J_{CF}= 4,1 Hz, **C**₅), 69,74 (**C**₈), 63,80 (**C**₉), 38,87 (**C**₁₁), 27,02 (**C**₁₂), 24,33 (**C**₇), 20,68 (**C**₁₄).

1.6 Síntesis de pivalato de 2-acetoxi-3-(2-(3-*N,N*-dimetilamino-1-propilamino)-6-fluoro-3-nitrofenil)propilo (6)

Se disuelven 1,21 g (3,37 mmol) de **5** en 15 mL de CH₂Cl₂ anh bajo atmósfera de argón y a continuación se adicionan 0,70 g (5,05 mmol) de K₂CO₃ y 0,63 mL (5,05 mmol) de 3,3-dimetilamino-1-propilamina y se agita la mezcla a T amb. Al cabo de 15 h, se comprueba por CCF el avance de la reacción y se observa que la conversión aún no es completa, por lo que se añaden 0,5 eq más de amina y K₂CO₃ y se mantiene la mezcla de reacción 24 h más en agitación. Pasadas 38 h desde el inicio y verificada la conversión total por CCF, se diluye en CH₂Cl₂ hasta 100 mL y se realizan lavados con H₂O (3 x 30 mL). La fase orgánica se seca con MgSO₄ anh y se concentra a sequedad obteniendo 1,48 g (η = 98%) de un aceite naranja.



Caracterización

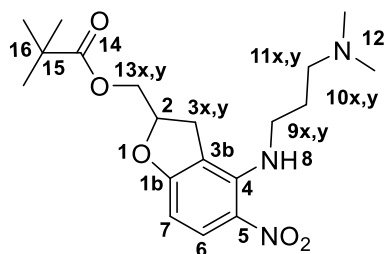
R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NEt}_3$ 93:5:2): 0,44.

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): 7,90 (dd, $^3J=9,2$ Hz, $^4J_{\text{HF}}=6,4$ Hz, 1H, H_4), 7,05 (t, ancho, $^3J=4,8$ Hz, 1H, H_{15}), 6,53 (dd, $^3J=9,2$ Hz, $^3J_{\text{HF}}=9,2$ Hz, 1H, H_5), 5,30 (m, $^3J=6,4$ Hz, $^3J=3,2$ Hz, 1H, H_8), 4,21 (dd, $^2J=12,0$ Hz, $^3J=3,6$ Hz, 1H, H_{9x}), 4,07 (dd, $^2J=12,0$ Hz, $^3J=6,4$ Hz, 1H, H_{9y}), 3,28 y 3,17 (m, 2H, $\text{H}_{16x,y}$), 3,11 (dd, $^2J=7,2$ Hz, $^3J=2,0$ Hz, 1H, H_{7x}), 3,01 (dd, $^2J=7,2$ Hz, $^3J=2,4$ Hz, 1H, H_{7y}), 2,32 (t, $^3J=6,8$ Hz, 2H, $\text{H}_{18x,y}$), 2,22 (s, 6H, H_{19}), 2,00 (s, 3H, H_{14}), 1,78 (m, 2H, $\text{H}_{17x,y}$), 1,20 (s, 9H, H_{12}).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) δ (ppm): 177,96 (C_{10}), 170,33 (C_{13}), 164,67 (d, $^1J_{\text{CF}}=251,6$ Hz, C_6), 146,77 (d, $^3J_{\text{CF}}=8,0$ Hz, C_2), 134,87 (C_3), 127,56 (d, $^3J_{\text{CF}}=12,6$ Hz, C_4), 113,59 (d, $^2J_{\text{CF}}=17,5$ Hz, C_1), 105,77 (d, $^2J_{\text{CF}}=27,0$ Hz, C_5), 69,88 (C_8), 64,04 (C_9), 57,57 (C_{18}), 47,23 (C_{16}), 45,56 (C_{19}), 38,81 (C_{11}), 27,95 (C_{17}), 27,07 (C_{12}), 26,02 (d, $^3J_{\text{CF}}=4,9$ Hz, C_7), 20,68 (C_{14}).

1.7 Síntesis de 4-(3-*N,N*-dimetilaminopropil)-5-nitro-2-pivaloiloximetil-2,3-dihidrobenzo(b)furano (7)

Bajo atmósfera de argón, se disuelven 1,48 g (3,35 mmol) de **6** en 35 mL de DMSO anh y seguidamente se adicionan 1,86 g (13,48 mmol) de K_2CO_3 y 1,4 mL de MeOH anh, y se agita calentando a 50°C. Pasadas 17 h y comprobada por CCF la desaparición del producto de partida se diluye el crudo de reacción con H_2O hasta 50 mL y se extrae con AcOEt (3 x 75 mL). Se realizan lavados de la fase orgánica con disolución de NaCl sat, se seca con MgSO_4 anh y se concentra a sequedad obteniendo 1,18 g ($\eta=93\%$) de un aceite naranja.



Caracterización

R_f (CH₂Cl₂/MeOH/NEt₃ 93:5:2): 0,37.

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 8,56 (s, ancho, 1H, **H₈**), 8,12 (d, ³J= 12,4 Hz, 1H, **H₆**), 6,19 (d, ³J= 12,4 Hz, 1H, **H₇**), 5,06 (m, 1H, **H₂**), 4,36 (dd, ²J= 16,0 Hz, ³J=4,4 Hz, 1H, **H_{13x}**), 4,24 (dd, ²J= 16,0 Hz, ³J= 6,8 Hz, 1H, **H_{13y}**), 3,58 (m,

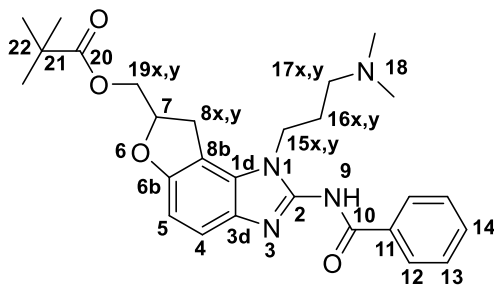
3H, **H_{3x}**, **H_{9x,y}**), 3,26 (dd, ²J= 14,8, ³J= 6,4 Hz, 1H, **H_{3y}**), 2,38 (t, ³J= 9,2 Hz, 2H, **H_{11x,y}**), 2,23 (s, 6H, **H₁₂**), 1,78 (m, 2H, **H_{10x,y}**), 1,15 (s, 9H, **H₁₆**).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm): 178,20 (**C₁₄**), 166,41 (**C_{1b}**), 145,22 (**C₄**), 130,22 (**C₆**), 128,80 (**C₅**), 108,39 (**C_{3b}**), 100,76 (**C₇**), 81,31 (**C₂**), 65,39 (**C₁₃**), 56,71 (**C₁₁**), 45,47 (**C₁₂**), 42,80 (**C₉**), 38,86 (**C₁₅**), 32,87 (**C₃**), 28,47 (**C₁₀**), 27,03 (**C₁₆**).

1.8 Síntesis de 2-benzamido-1-(3-*N,N*-dimetilaminopropil)-7-pivaloiloximetil-7,8-dihidrofuro[2,3-*g*]benzimidazol (**8**)

Se disuelven 1,73 g (4,56 mmol) de **7** en 40 mL de MeOH anh bajo atmósfera de argón y se adicionan 0,173 g (0,16 mmol) de Pd/C (10% m/m) dejando en agitación a T amb. El sistema se purga con H₂ y se mantiene en agitación bajo atmósfera de H₂ a presión atmosférica durante 17 h. Debido a la inestabilidad de la fenilendiamina obtenida, el crudo de reacción se procesa evitando al máximo el contacto con el aire. En primer lugar, se purga el balón con argón para desplazar el H₂, evitando el contacto directo aire-H₂-Pd/C, y seguidamente se filtra al vacío a través de Celite®. Se concentra en el rotavapor previamente purgado con argón, obteniéndose un aceite naranja-marrón que se utiliza directamente en la siguiente etapa. Se redisuelve en 40 mL de CH₂Cl₂ anh y la disolución resultante se enfría en un baño de hielo a 0°C para a continuación añadir gota a gota 0,63 mL (4,56 mmol) de isotiocianato de benzoilo y se mantiene la mezcla de reacción en agitación durante 5 h a T amb. Comprobada la formación de la tiourea por CCF, se adicionan directamente sobre el crudo de reacción 1,30 g (6,2 mmol) de EDC y 0,9 mL (5,0 mmol) de DIEA para formar el anillo de imidazol. Se mantiene en agitación a T amb durante 17 h. Completada la conversión, se diluye hasta 150 mL y se efectúan lavados con H₂O (3 x 40 mL). Se seca la fase orgánica con MgSO₄ anh y se concentra a sequedad. El crudo resultante se purifica por columna cromatográfica utilizando

como fase móvil CH₂Cl₂/MeOH/NEt₃ 98:1:1. Se juntan las fracciones correspondientes al producto y se concentran obteniendo 1,248 g (η= 49%, 3 etapas) de un aceite verde, suficientemente puro para ser empleado en la siguiente etapa.



Caracterización

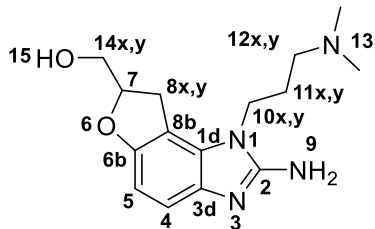
R_f (CH₂Cl₂/MeOH/NEt₃ 98:1:1): 0,36.

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 8,32 (d, ³J= 6,1 Hz, 2H, H₁₂), 7,45 (m, 3H, H₁₃, H₁₄), 7,06 (d, ³J= 8,0 Hz, 1H, H₄), 6,69 (d, ³J= 8,8 Hz, 1H, H₅), 5,11 (m, 1H, H₇), 4,42 (dd, ²J= 12,0 Hz, ³J=

4,0 Hz, 1H, H_{19x}), 4,29 (m, 3H, H_{19y}, H_{15x,y}), 3,69 (dd, ²J= 15,2 Hz, ³J= 9,6 Hz, 1H, H_{8x}), 3,36 (dd, ²J= 15,2 Hz, ³J= 6,8 Hz, 1H, H_{8y}), 2,41 (t, ³J= 6,8 Hz, 2H, H_{17x,y}), 2,23 (s, 6H, H₁₈), 2,04 (m, 2H, H_{16x,y}), 1,13 (s, 9H, H₂₂).

1.9 Síntesis de 2-amino-1-(3-*N,N*-dimetilaminopropil)-7-hidroxi-7,8-dihidrofuro[2,3-*g*]benzimidazol (9)

Se disuelven 1,23 g (2,57 mmol) de **8** en 9 mL de dioxano y 20 mL de HCl al 10% en H₂O y la mezcla se calienta a reflujo durante 18 h. Se evapora el disolvente hasta un tercio del volumen inicial y se basifica añadiendo lentejas de NaOH hasta pH=13. Se realizan extracciones con CH₂Cl₂/EtOH 95:5 (3 x 30 mL), se seca con MgSO₄ y se concentra a sequedad obteniendo 0,68 g (η= 77%) de un sólido marrón, suficientemente puro para ser empleado en la siguiente etapa.



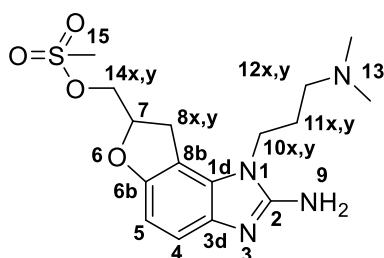
Caracterización

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 7,13 (d, ³J= 11,2 Hz, 1H, H₄), 6,59 (d, ³J= 11,2 Hz, 1H, H₅), 5,99 (s, ancho, 2H, H₉), 4,96 (m, 1H, H₇), 4,00 (m, 2H, H_{10x,y}), 3,92 (dd, ²J= 16,0 Hz, ³J= 4,4 Hz, 1H, H_{14x}), 3,79 (dd, ²J= 16,0 Hz, ³J= 7,2 Hz, 1H,

H_{14y}), 3,46 (dd, ²J= 19,6 Hz, ³J= 12,4 Hz, 1H, H_{8x}), 3,31 (dd, ²J= 19,6 Hz, ³J= 10,4 Hz, 1H, H_{8y}), 2,35 (t, ³J= 9,2 Hz, 2H, H_{12x,y}), 2,23 (s, 6H, H₁₃), 1,93 (m, 2H, H_{11x,y}).

1.10 Síntesis de 2-amino-1-(3-*N,N*-dimetilaminopropil)-7-mesiloximetil-7,8-dihidrofuro[2,3-*g*]benzimidazol (10)

Se disuelven 100 mg (0,27 mmol) de **9** en 2 mL de CH₂Cl₂ anh y se adicionan a 0°C 80 µL (0,53 mmol) de DIEA y 45 µL (0,52 mmol) de cloruro de mesilo gota a gota, se deja en agitación a T ambiente durante 6 h. Se diluye el crudo resultante con CH₂Cl₂ hasta 20 mL y se lava con H₂O (3 x 15 mL), se seca con MgSO₄ la fase orgánica y se concentra a sequedad obteniendo 60 mg de un sólido marrón, suficientemente puro para ser empleado en la siguiente etapa.



Caracterización

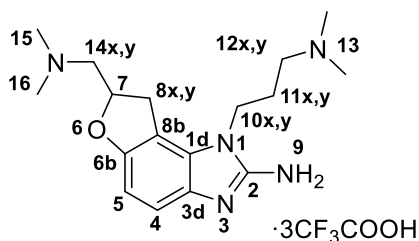
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 7,14 (d, ³J= 11,2 Hz, 1H, H₄), 6,59 (d, ³J= 11,2 Hz, 1H, H₅), 5,10 (m, 1H, H₇), 4,45 (m, 1H, H_{14x}), 4,02 (m, 2H, H_{10x,y}), 3,89 (dd, ²J= 14,4 Hz, ³J= 9,2 Hz, 1H, H_{14y}), 3,57 (dd, ²J= 20,0 Hz, ³J= 12,4 Hz, 1H, H_{8x}), 3,30 (m, 1H, H_{8y}), 3,05 (s, 3H, H₁₅), 2,35

(m, 2H, H_{12x,y}), 2,25 (s, 6H, H₁₃), 1,95 (m, 2H, H_{11x,y}).

EM (ESI, modo positivo) m/z: 368,6 [M+H]⁺, (masa calc. C₁₆H₂₄N₄O₄S: 368,2).

1.11 Síntesis de 2-amino-7-*N,N*-dimetilaminometil-1-(3-*N,N*-dimetilaminopropil)-7,8-dihidrofuro[2,3-*g*]benzimidazol (Isis-11, 11)

Se disuelven 60 mg de **10** en 1,8 mL (3,6 mmol) de disolución de dimetilamina en MeOH en un vial resistente a la presión, que una vez sellado se calienta en una estufa a 60°C durante 18 h. Se concentra a sequedad y se añaden 4 mL de disolución 2,0 M de dimetilamina repitiendo el tratamiento en las mismas condiciones. Se comprueba por ESI-MS la total desaparición de producto de partida y se concentra a sequedad. El crudo obtenido se purifica por MPLC de fase reversa (gradiente 0-40% de B, siendo A H₂O 0,1% TFA y B ACN 0,1% TFA). Las fracciones colectadas se analizan por HPLC (gradiente 0-40% de B, siendo A H₂O 0,045% TFA y B ACN 0,036% TFA) y ESI-MS. Las que contienen el producto deseado se juntan y se liofilizan. Se obtienen 38 mg (η= 17%, 2 etapas) de un sólido blanco correspondiente al compuesto en forma de tris(trifluoroacetato).



Caracterización

R_f (CH₂Cl₂/MeOH/NEt₃ 93:5:2): 0,15.

RMN ¹H (D₂O, 400 MHz) δ (ppm): 7,24 (d, ³J= 8,8 Hz, 1H, H₄), 6,89 (d, ³J= 8,8 Hz, 1H, H₅), 5,44 (m, 1H, H₇), 4,21 (dd, ³J= 7,2 Hz, ³J= 7,6 Hz, 2H, H_{10x,y}), 3,83 (dd, ²J= 15,6 Hz, ³J= 9,2 Hz, 1H, H_{14x}), 3,57 (dd, ²J= 13,2 Hz, ³J=

11,2 Hz, 1H, H_{8x}), 3,46 (dd, ²J= 13,2 Hz, ³J= 2,0 Hz, 1H, H_{8y}), 3,30 (m, 3H, H_{14y}, H_{12x,y}), 3,07 y 3,01 (2 s, 6H, H₁₅, H₁₆), 2,91 (s, 6H, H₁₃), 2,27 (m, 2H, H_{11x,y}).

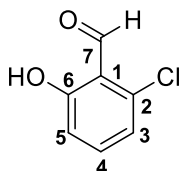
RMN ¹³C (D₂O, 100 MHz) δ (ppm): 155,96 (C₂), 150,15 (C_{6b}), 127,23 (C_{1d}), 123,79 (C_{3d}), 111,49 (C₄), 107,58 (C_{8b}), 106,31 (C₅), 76,90 (C₇), 60,13 (C₁₄), 54,14 (C₁₀), 44,46 (C₁₂), 42,88 y 42,86 (C₁₃), 41,81 y 40,34 (C₁₅, C₁₆), 30,93 (C₈), 24,14 (C₁₁).

EM (ESI, alta resolución, modo positivo) m/z: 318,2292 [M+H]⁺, (masa calc. C₁₇H₂₇N₅O: 317,2216).

2. Obtención de la familia de análogos IRAB

2.1 Síntesis de 2-cloro-6-hidroxibenzaldehído (12)

Se disuelve 1,0 g (6,32 mmol) de 2-cloro-6-fluorobenzaldehído en 20 mL de THF a 0°C y se adicionan 0,58 g (10,36 mmol) de KOH. Se mantiene en agitación a T amb y se controla por CCF. Al cabo de 48 h se acidifica hasta pH= 1 con HCl conc, se diluye con H₂O, 20 mL, y se extrae con AcOEt (3 x 50 mL). Se seca la fase orgánica con MgSO₄ anh y se concentra a sequedad obteniendo 0,44 g (η = 45%) de un sólido amarillo en forma de agujas.



Caracterización

R_f (CH₂Cl₂/Hexano 1:1): 0,63.

P.f.: 111-112°C.

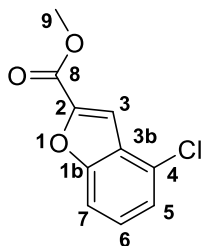
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 11,91 (s, 1H, H₆), 10,42 (d, ⁵J= 0,8 Hz, 1H, H₇), 7,41 (pseudotriplete, ³J= 10,8 Hz, 1H, H₄), 6,96 (dd, ³J= 10,8 Hz, ⁴J= 1,6 Hz, 1H, H₃), 6,90 (ddd, ³J= 10,8 Hz, ⁴J= 1,6 Hz, ⁵J= 0,8 Hz, 1H, H₅).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm): 195,43 (C₇), 163,85 (C₆), 138,04 (C₂), 137,36 (C₄), 120,96 (C₃), 117,10 (C₅), 116,99 (C₁).

EM (ESI, modo positivo) m/z: 156,4 [M+H]⁺, 178,3 [M+Na]⁺, (masa calc. C₇H₅ClO₂: 156,0).

2.2 Síntesis de 4-clorobenzo(b)furan-2-carboxilato de metilo (13)

En 50 mL de ACN anh se disuelven 1,016 g (6,51 mmol) del hidroxibenzaldehído **12** y se añaden 1,089 g (7,21 mmol) de bromoacetato de metilo y 2,487 g (18,02 mmol) de K₂CO₃, permaneciendo en agitación a 80°C durante 48 h. Se diluye en H₂O (200 mL), y se extrae con AcOEt (3 x 100 mL). La fase orgánica se seca con MgSO₄ anh y se concentra a sequedad obteniendo 0,733 g (η= 58%) de un sólido ocre.



Caracterización

R_f (CH₂Cl₂/Hexano 8:2): 0,72.

P.f.: 89-90°C.

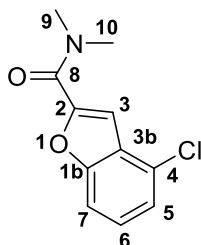
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 7,61 (d, ⁵J= 1,2 Hz, 1H, H₃), 7,50 (ddd, ³J= 10,8 Hz, ⁴J= 1,2 Hz, ⁵J= 1,2 Hz, 1H, H₇), 7,38 (pseudotriplete, ³J= 10,8 Hz, 1H, H₆), 7,31 (dd, ³J= 10,8 Hz, ⁴J= 1,2 Hz, 1H, H₅), 3,99 (s, 3H, H₉).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm): 159,51 (C_{1b}), 155,75 (C₈), 145,73 (C₂), 128,14 (C₆), 127,84 (C₄), 126,67 (C_{3b}), 123,69 (C₅), 112,28 (C₃), 110,90 (C₇), 52,54 (C₉).

EM (ESI, modo positivo) m/z: 210,4 [M+H]⁺, (masa calc. C₁₀H₇ClO₃: 210,0).

2.3 Síntesis de 4-cloro-N,N-dimetilbenzo(b)furan-2-carboxamida (14)

Se disuelven 1,080 g (5,12 mmol) de **13** en 10 mL (20 mmol) de disolución 2,0 M de dimetilamina en MeOH en un vial resistente a la presión, que una vez sellado se calienta en una estufa a 60°C. Se deja reaccionando en estas condiciones durante 15 h, pasado este tiempo se añaden 10 mL más de disolución de dimetilamina y se deja 24 h más. Se concentra a sequedad obteniendo 1,045 g (η= 91%) de un aceite marrón, suficientemente puro para no precisar de purificación.



Caracterización

R_f (CH₂Cl₂): 0,28.

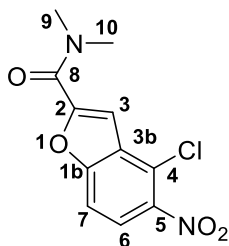
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 7,40 (ddd, ³J= 10,4 Hz, ⁴J= 2,0 Hz, ⁵J= 1,2 Hz, 1H, **H₇**), 7,36 (d, ⁵J= 1,2 Hz, 1H, **H₃**), 7,32 (pseudotriplete, ³J= 10,8 Hz, 1H, **H₆**), 7,28 (dd, ³J= 10,8 Hz, ⁴J= 2,0 Hz, 1H, **H₅**), 3,39 y 3,16 (2 s, anchos, 6H, **H₉, H₁₀**).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm): 160,03 (**C_{1b}**), 154,40 (**C₈**), 149,23 (**C₂**), 126,80 (**C₄**), 126,62 (**C₆**), 126,31 (**C_{3b}**), 123,09 (**C₅**), 110,17 (**C₇**), 109,51 (**C₃**), 38,17 y 36,13 (**C₉, C₁₀**).

EM (ESI, modo positivo) m/z: 223,4 [M+H]⁺, 245,4 [M+Na]⁺, (masa calc. C₁₁H₁₀ClNO₂: 223,0).

2.4 Síntesis de 4-cloro-N,N-dimetil-5-nitrobenzo(b)furan-2-carboxamida (**15**)

Se disuelven 4,055 g (18,13 mmol) de **14** en 30 mL de una mezcla HNO₃/H₂SO₄ 1:1 a 0°C y se deja reaccionando durante 90 min. Se diluye con H₂O, 30 mL, y se extrae con AcOEt (3 x 50 mL), la fase orgánica se lava con disolución de NaHCO₃ sat y se seca con MgSO₄ anh. Se concentra a sequedad obteniendo un aceite naranja intenso. El crudo obtenido se purifica por columna cromatográfica utilizando como fase móvil AcOEt/Hexano 1:1. Se juntan las fracciones correspondientes al isómero de interés y se concentran obteniendo 1,51 g (η = 31%) de un sólido amarillo.



Caracterización

R_f (AcOEt/Hexano 75:25): 0,33.

P.f.: 144-145°C.

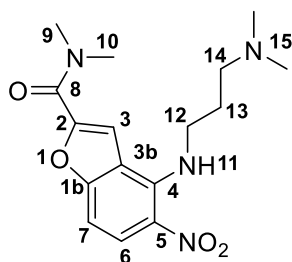
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 8,05 (d, ³J= 8,8 Hz, 1H, **H₆**), 7,55 (dd, ³J= 8,8, ⁵J= 0,8 Hz, 1H, **H₇**), 7,48 (d, ⁵J= 0,8 Hz, 1H, **H₃**), 3,35 y 3,18 (2 s, anchos, 6H, **H₉, H₁₀**).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm): 159,45 (**C_{1b}**), 154,97 (**C₈**), 152,19 (**C₂**), 143,74 (**C₅**), 128,59 (**C_{3b}**), 123,89 (**C₆**), 122,26 (**C₄**), 110,98 (**C₇**), 110,72 (**C₃**), 38,42 y 36,19 (**C₉, C₁₀**).

EM (ESI, modo positivo) m/z : 268,3 $[M+H]^+$, 290,4 $[M+Na]^+$, (masa calc. $C_{11}H_9ClN_2O_4$: 268,0).

2.5 Síntesis de 4-(3-*N,N*-dimetilamino-1-propilamino)-*N,N*-dimetil-5-nitrobenzo(b)furan-2-carboxamida (16)

Se disuelven 0,500 g (1,86 mmol) de **15** en 15 mL de NMP y se adicionan 0,42 mL (2,79 mmol) de DBU y 0,35 mL (2,79 mmol) de 3,3-dimetilamino-1-propilamina en un vial de microondas. Se irradia durante 1 h a 100°C en un horno de microondas, se deja enfriar hasta T amb y se basicifica hasta pH=12 por adición de disolución de NaOH al 10%, se diluye en H₂O hasta aproximadamente 120 mL y se extrae con CH₂Cl₂ (3 x 125 mL). Se seca con MgSO₄ anh la fase orgánica y se concentra a sequedad obteniendo un aceite naranja que se purifica por columna cromatográfica empleando como fase móvil inicial AcOEt para aumentar progresivamente la polaridad con un 10% de MeOH y finalmente utilizando como fase móvil AcOEt/MeOH/NEt₃ (85:10:5). Las fracciones correspondientes se juntan obteniendo 1,03 g (η = 83%) de un sólido naranja.



Caracterización

R_f (CH₂Cl₂/MeOH/NEt₃ 93:5:2): 0,30.

P.f.: 155-156°C.

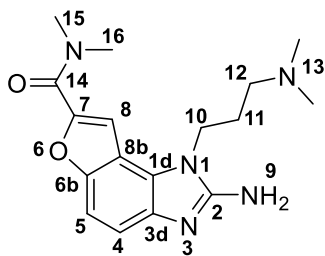
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 9,48 (t, ancho, 1H, **H₁₁**), 8,24 (d, ³J= 12,8 Hz, 1H, **H₆**), 7,78 (s, 1H, **H₃**), 6,75 (d, ³J= 12,8 Hz, 1H, **H₇**), 3,82 (pseudocuartete, ³J= 9,2 Hz, 2H, **H₁₂**), 3,36 y 3,16 (2 s, anchos, 6H, **H₉**, **H₁₀**), 2,50 (t, ³J= 8,8 Hz, 2H, **H₁₄**), 2,28 (s, 6H, **H₁₅**), 1,95 (pseudoquintete, ³J= 8,8 Hz, 2H, **H₁₃**).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm): 159,69 (**C_{1b}**), 159,07 (**C₈**), 148,34 (**C₂**), 143,50 (**C₄**), 127,37 (**C₅**), 126,44 (**C₆**), 114,67 (**C₃**), 114,09 (**C_{3b}**), 101,00 (**C₇**), 56,98 (**C₁₄**), 45,28 (**C₁₅**), 44,66 (**C₁₂**), 38,15 y 36,54 (**C₉**, **C₁₀**), 27,08 (**C₁₃**).

EM (ESI, modo positivo) m/z : 334,5 $[M+H]^+$, (masa calc. $C_{16}H_{22}N_4O_4$: 334,2).

2.6 Síntesis de 2-amino-*N,N*-dimetil-1-(3-*N,N*-dimetilaminopropil)-furo[2,3-*g*]benzimidazol-7-carboxamida (**17**)

Se pesan 0,130 g (0,39 mmol) de **16** y 0,015 g (0,014 mmol) de Pd/C (10% m/m) y a continuación se añaden 40 mL de MeOH anh bajo atmósfera de argón y se deja en agitación a T ambiente. El sistema se purga con H₂ y se mantiene bajo atmósfera de H₂ a presión atmosférica durante 17 h. El crudo de reacción se procesa evitando al máximo el contacto con el aire. En primer lugar, se purga el balón con argón para desplazar el H₂, evitando el contacto directo aire-H₂-Pd/C, y seguidamente se filtra al vacío a través de Celite®. A continuación, se adicionan 80 µL (0,39 mmol) de una disolución de bromuro de cianógeno 5 M en ACN y se deja en agitación durante 18 h bajo atmósfera de argón. Se basifica con NaOH aq al 10% hasta pH= 12 y se evapora el disolvente. Se extrae con AcOEt (3 x 30 mL), se seca con MgSO₄ anh y se concentra a sequedad obteniendo 99 mg (η= 77%) de un aceite marrón.



Caracterización

R_f (CH₂Cl₂/MeOH/NEt₃ 93:5:2): 0,20.

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 7,55 (s, 1H, H₈), 7,45 (d, ³J= 8,4 Hz, 1H, H₅), 7,29 (d, ³J= 8,4 Hz, 1H, H₄), 4,23 (m, 2H, H₁₀), 3,42 y 3,16 (2s, anchos, 6H, H₁₅, H₁₆), 2,27 (s, 6H, H₁₃), 2,23 (m, 2H, H₁₂), 2,09 (m,

2H, H₁₁).

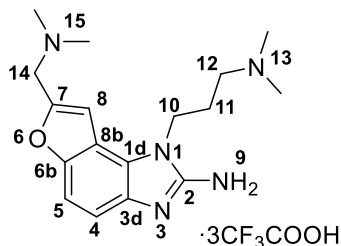
RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm): 160,59 (C_{6b}), 154,57 (C₂), 151,58 (C₁₄), 149,86 (C₇), 134,70 (C₄), 125,01 (C_{3d}), 114,48 (C_{1d}), 110,95 (C_{8b}), 108,18 (C₅), 105,21 (C₈), 53,39 (C₁₂), 44,40 (C₁₃), 40,15 (C₁₀), 38,28 y 36,74 (C₁₅, C₁₆), 26,39 (C₁₁).

EM (ESI, modo positivo) m/z: 329,6 [M+H]⁺, (masa calc. C₁₇H₂₃N₅O₂: 329,2).

2.7 Síntesis de 2-amino-7-*N,N*-dimetilaminometil-1-(3-*N,N*-dimetilaminopropil)-furo[2,3-*g*]benzimidazol (**IRAB-1**, **18**)

Se disuelven 0,045 g (0,14 mmol) de **17** en 1,4 mL (1,40 mmol) de una disolución 1,0 M de BH₃·THF, la mezcla de reacción se lleva a reflujo, 65°C, durante 4 h y se mantiene en agitación a T ambiente durante 14 h más. Se adiciona HCl concentrado hasta pH=1 y se concentra a sequedad. A continuación, se disuelve el residuo en 10

mL de HCl al 10% y se calienta a reflujo, durante 2 h. Se comprueba por ESI-MS y HPLC la completa desaparición del compuesto de partida. La mezcla de reacción se trasvasa a un tubo de centrifuga de plástico, se congela y se liofiliza. El crudo obtenido se purifica por MPLC de fase reversa utilizando un gradiente 0-70% de B, siendo A H₂O 0,1% TFA y B ACN 0,1% TFA. Se juntan las fracciones correspondientes, obteniéndose 0,015 g (η = 34%) de un sólido blanco correspondiente al compuesto en forma de tris(trifluoroacetato).



Caracterización

R_f (CH₂Cl₂/MeOH/NEt₃ 93:5:2): 0,15.

P.f.: 150-152°C.

RMN ¹H (D₂O, 400 MHz) δ (ppm): 7,63 (d, ³J= 8,8 Hz, 1H, **H₅**), 7,51 (d, ³J= 8,8 Hz, 1H, **H₄**), 7,50 (s, 1H, **H₈**), 4,66 (s, 2H, **H₁₄**), 4,48 (t, ³J= 8,8 Hz, 2H, **H₁₀**),

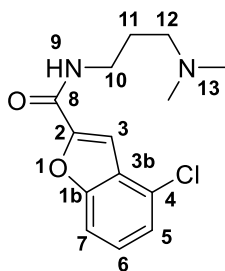
3,32 (m, 2H, **H₁₂**), 3,00 (s, 6H, **H₁₃**), 2,88 (s, 6H, **H₁₅**), 2,38 (m, 2H, **H₁₁**).

RMN ¹³C (D₂O, 100 MHz) δ (ppm): 153,40 (**C₂**), 149,46 (**C_{6b}**), 147,54 (**C₇**), 124,05 (**C₄**), 122,17 (**C_{3d}**), 111,81 (**C_{1d}**), 109,60 (**C_{8b}**), 107,94 (**C₅**), 106,50 (**C₈**), 54,12 (**C₁₄**), 53,07 (**C₁₂**), 42,66 (**C₁₃**), 42,24 (**C₁₅**), 40,70 (**C₁₀**), 23,32 (**C₁₁**).

EM (ESI, alta resolución, modo positivo) m/z: 316,2134 [M+H]⁺, (masa calc. C₁₇H₂₅N₅O: 315,2059).

2.8 Síntesis de 4-cloro-N-(3-N,N-dimetilaminopropil)benzo(b)furan-2-carboxamida (**19**)

Se disuelven 0,400 g (1,90 mmol) de **18** en 15 mL de MeOH en un vial de microondas y se adicionan 2,4 mL (19,13 mmol) de 3,3-dimetilamino-1-propilamina. Se deja reaccionar a 75°C durante 3 h en el horno de microondas y se controla por CCF. El producto obtenido se extrae con 40 mL de AcOEt y la fase orgánica se lava con una disolución de NaCl sat (2 x 20 mL). Se seca con MgSO₄ anh, se filtra y se concentra a sequedad obteniendo 0,509 g (η = 95%) de un aceite marrón.



Caracterización

R_f (CH₂Cl₂/MeOH/NEt₃ 97:2:1): 0,33.

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 8,49 (s, ancho, 1H, **H₉**), 7,48 (d, ⁵J= 0,8 Hz, 1H, **H₃**), 7,38 (ddd, ³J= 8,0 Hz, ⁴J= 1,2 Hz, ⁵J= 0,8 Hz, 1H, **H₇**), 7,32 (dd, ³J= 8,0 Hz, ³J= 7,6 Hz, 1H, **H₆**), 7,27 (dd, ³J= 7,6 Hz, ⁴J= 1,2 Hz, 1H, **H₅**), 3,59 (dt, ³J= 6,4 Hz, ³J= 5,6 Hz, 2H, **H₁₀**), 2,49 (t, ³J= 6,4 Hz, 2H, **H₁₂**), 2,31 (s, 6H,

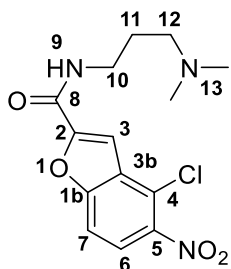
H₁₃), 1,78 (pseudoquintuplete, ³J= 6,4 Hz, 2H, **H₁₁**).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm): 164,90 (**C_{1b}**), 156,60 (**C₈**), 146,65 (**C₂**), 129,12 (**C₆**), 128,70 (**C_{3b}**), 128,50 (**C₄**), 124,90 (**C₅**), 111,78 (**C₇**), 109,20 (**C₃**), 57,56 (**C₁₂**), 44,60 (**C₁₃**), 38,09 (**C₁₀**), 27,24 (**C₁₁**).

EM (ESI, modo positivo) m/z : 280,4 [M+H]⁺, (masa calc. C₁₄H₁₇ClN₂O₂: 280,1).

2.9 Síntesis de 4-cloro-N-(3,3-dimetilaminopropil)-5-nitrobenzo(b)furan-2-carboxamida (20)

Se disuelven 0,588 g (2,19 mmol) de **19** en 10 mL de HNO₃ fumante a 0°C y se deja reaccionando durante 30 min. Seguidamente se adicionan 10 mL de una disolución de KOH al 10% y, a continuación se añade KOH previamente molturado hasta conseguir pH= 12. Se realiza la extracción del compuesto con AcOEt (3 x 20 mL) y con NaCl sat (2 x 10 mL). Se seca la fase orgánica con MgSO₄ anh y se filtra. Se concentra a sequedad obteniendo un aceite naranja intenso. El crudo obtenido se purifica por columna cromatográfica utilizando como fase móvil inicial CH₂Cl₂/NEt₃ 99:1 y aumentando progresivamente la polaridad hasta CH₂Cl₂/NEt₃ 96:4. Se juntan las fracciones correspondientes al producto deseado y se concentran obteniendo 0,410 g (η = 63%) de un sólido naranja intenso.



Caracterización

R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NEt}_3$ 95:3:2): 0,33.

P.f.: 144-145°C.

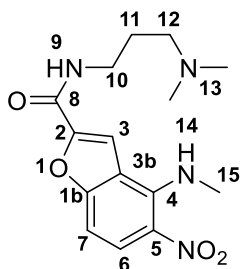
RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): 8,47 (s, ancho, 1H, **H**₉), 8,05 (d, $^3J=9,2$ Hz, 1H, **H**₆), 7,72 (d, $^5J=0,8$ Hz, 1H, **H**₃), 7,57 (dd, $^3J=9,2$ Hz, $^5J=0,8$ Hz, 1H, **H**₇), 3,67 (dt, $^3J=6,0$ Hz, $^3J=5,6$ Hz, 2H, **H**₁₀), 2,99 (t, $^3J=6,0$ Hz, 2H, **H**₁₂), 2,71 (s, 6H, **H**₁₃), 2,11 (m, 2H, **H**₁₁).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) δ (ppm): 157,40 (**C**_{1b}), 155,10 (**C**₈), 152,37 (**C**₂), 143,73 (**C**₅), 129,96 (**C**_{3b}), 123,99 (**C**₆), 122,52 (**C**₄), 110,85 (**C**₇), 109,04 (**C**₃), 58,34 (**C**₁₂), 45,00 (**C**₁₃), 39,47 (**C**₁₀), 25,10 (**C**₁₁).

EM (ESI, modo positivo) m/z : 325,4 [$\text{M}+\text{H}$]⁺, (masa calc. $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{ClN}_3\text{O}_4$: 325,1).

2.10 Síntesis de *N*-(3,3-dimetilaminopropil)-4-metilamino-5-nitrobenzo(b)furan-2-carboxamida (**21**)

En un vial de microondas se disuelven 0,153 g (0,49 mmol) de **20** en 0,3 mL (1,99 mmol) de DBU. A continuación se adiciona 1,0 mL (8,05 mmol) de una disolución de MeNH_2 al 33% en etanol absoluto. Se irradia a 80°C durante 2 h en el horno de microondas y se controla por CCF. Seguidamente, se diluye en 20 mL de H_2O y se realiza una extracción con AcOEt (3 x 25 mL) y se lava con NaCl sat. (2 x 10 mL). Se seca la fase orgánica con MgSO_4 anh. y se filtra. Se concentra a sequedad obteniendo un sólido naranja intenso. El producto se purifica mediante cromatografía en columna empleando como fase móvil inicial $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{NEt}_3$ 99:1, y aumentando la polaridad del eluyente hasta $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NEt}_3$ 97:2:1. Se juntan las fracciones correspondientes al producto deseado y se concentran, obteniendo 0,122 g ($\eta=81\%$) de un sólido amarillo intenso.

**Caracterización**

R_f (CH₂Cl₂/MeOH/NEt₃ 97:2:1): 0,29.

P.f.: 155-156°C.

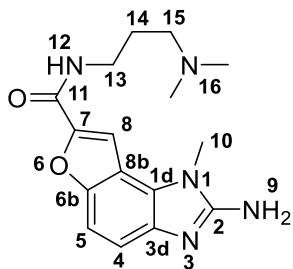
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 9,20 (s, ancho, 1H, **H₁₄**), 8,54 (s, ancho, 1H, **H₉**), 8,28 (d, ³J= 9,6 Hz, 1H, **H₆**), 7,86 (d, ⁵J= 0,8 Hz, 1H, **H₃**), 6,73 (d, ³J= 9,6 Hz, ⁵J= 0,8 Hz, 1H, **H₇**), 3,58 (pseudocuartete, ³J= 6,0 Hz, 2H, **H₁₀**), 3,45 (d, ³J= 5,6 Hz, 3H, **H₁₅**), 2,52 (t, ³J= 6,0 Hz, 2H, **H₁₂**), 2,33 (s, 6H, **H₁₃**), 1,79 (pseudoquintete, ³J= 6,0 Hz, 2H, **H₁₁**)

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm): 159,33 (**C_{1b}**), 157,97 (**C₈**), 148,44 (**C₂**), 144,68 (**C₄**), 127,60 (**C₅**), 126,76 (**C₆**), 114,93 (**C_{3b}**), 111,77 (**C₃**), 101,11 (**C₇**), 58,73 (**C₁₂**), 45,36 (**C₁₃**), 39,64 (**C₁₀**), 32,99 (**C₁₅**), 25,58 (**C₁₁**).

EM (ESI, modo positivo) m/z: 320,5 [M+H]⁺, (masa calc. C₁₅H₂₀N₄O₄: 320,1).

2.11 Síntesis de 2-amino-*N*-(3-*N,N*-dimetilaminopropil)-1-metil-furo[2,3-*g*]benzimidazol-7-carboxamida (**22**)

Se pesan 0,147 g (0,46 mmol) de **21** y 0,015 g (0,014 mmol) de Pd/C (10% m/m) y se disuelve el compuesto en 25 mL de MeOH anh bajo atmósfera de argón. Se purga el sistema con H₂ y se mantiene en atmósfera de H₂ a presión atmosférica y agitación durante 16 h. De forma visual y por CCF se observa la paulatina desaparición del característico color amarillo del producto de partida. Completada la conversión, se filtra bajo atmósfera inerte y a través de Celite® el crudo de reacción para evitar la descomposición del producto. Seguidamente, se adicionan a la mezcla 90 µL (0,46 mmol) de disolución de BrCN 5,0 M en ACN y se deja en agitación a T ambiente durante 16 h. Una vez comprobada por CCF la completa desaparición de la fenilendiamina, se concentra a sequedad obteniendo 0,163 g de un sólido rojizo-marrón. El producto se utiliza directamente en la siguiente etapa.



Caracterización

R_f (CH₂Cl₂/MeOH/NEt₃ 90:8:2): 0,10.

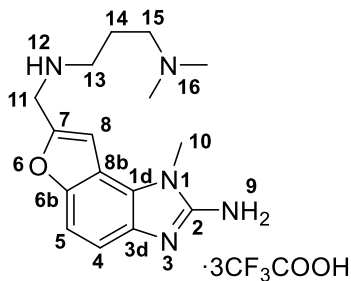
RMN ¹H (CD₃OD, 400 MHz) δ (ppm): 7,98 (d, ⁵J= 0,8 Hz, 1H, **H₈**), 7,60 (dd, ³J= 8,8 Hz, ⁵J= 0,8 Hz, 1H, **H₅**), 7,53 (d, ³J= 8,8 Hz, 1H, **H₄**), 3,96 (s, 3H, **H₁₀**), 3,56 (t, ³J= 6,4 Hz, 2H, **H₁₃**), 3,25 (m, 2H, **H₁₅**), 2,93 (s, 6H, **H₁₆**), 2,09 (m, 2H, **H₁₄**).

RMN ¹³C (CD₃OD, 100 MHz) δ (ppm): 161,15 (**C_{6b}**), 154,33 (**C₁₁**), 151,93 (**C₂**), 151,09 (**C₇**), 125,82 (**C₄**), 125,45 (**C_{3d}**), 114,15 (**C_{1d}**), 111,95 (**C_{8b}**), 108,96 (**C₅**), 107,43 (**C₈**), 56,80 (**C₁₅**), 43,67 (**C₁₆**), 37,24 (**C₁₃**), 31,52 (**C₁₀**), 26,18 (**C₁₄**).

EM (ESI, modo positivo) m/z: 315,6 [M+H]⁺, (masa calc. C₁₆H₂₁N₅O₂: 315,2).

2.12 Síntesis de 2-amino-7-N-(3-N,N-dimetilaminopropil)aminometil-1-metil-furo[2,3-g]benzimidazol (IRAB-2, 23)

Se disuelven 0,163 g (0,46 mmol) de **22** en 10 mL (10 mmol) de una disolución 1,0 M de BH₃ en THF, la mezcla de reacción se mantiene a reflujo durante 4 h y 18 h más a T amb. Pasado ese período de tiempo se añade HCl conc hasta pH=1, se concentra a sequedad y a continuación se adicionan 10 mL de HCl al 10% y se calienta a reflujo durante 5 h. El análisis por HPLC (gradiente lineal 0-30% de B, siendo A H₂O 0,045 % TFA y B ACN 0,036 % TFA) y ESI-MS del crudo anaranjado formado muestra la desaparición del producto de partida. Se elimina el máximo de HCl por evaporación y se liofiliza el crudo obtenido. Finalmente, se purifica por MPLC de fase reversa, utilizando un gradiente lineal 0-30% de B, siendo A H₂O 0,1% TFA y B ACN 0,1% TFA. Se juntan las fracciones correspondientes y se liofilizan obteniendo 0,026 g (η = 20%, correspondiente a las dos etapas 21→23) de un sólido blanco correspondiente al producto en forma de tris(trifluoroacetato).



Caracterización

R_f (CH₂Cl₂/MeOH/NEt₃ 90:8:2): 0,10.

P.f.: 146-149°C.

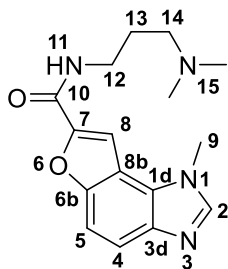
RMN ¹H (D₂O, 400 MHz) δ (ppm): 7,56 (d, ³J= 8,8 Hz, 1H, **H₅**), 7,45 (s, 1H, **H₈**), 7,41 (d, ³J= 8,8 Hz, 1H, **H₄**), 4,60 (s, 2H, **H₁₁**), 3,84 (s, 3H, **H₁₀**), 3,29 (m, 4H, **H₁₃** y **H₁₅**), 2,94 (s, 6H, **H₁₆**), 2,23 (m, 2H, **H₁₄**).

RMN ¹³C (D₂O, 100 MHz) δ (ppm): 153,06 (**C₂**), 149,68 (**C_{6b}**), 148,05 (**C₇**), 123,61 (**C₄**), 123,16 (**C_{3d}**), 112,31 (**C_{1d}**), 109,99 (**C_{8b}**), 108,99 (**C₅**), 107,26 (**C₈**), 54,12 (**C₁₅**), 43,72 (**C₁₁**), 43,48 (**C₁₃**), 42,70 (**C₁₆**), 30,28 (**C₁₀**), 21,11 (**C₁₄**).

EM (ESI, alta resolución, modo positivo) m/z: 302,1983 [M+H]⁺, (masa calc. C₁₆H₂₃N₅O: 301,1903).

2.13 Síntesis de N-(3-N,N-dimetilaminopropil)-1-metil-furo[2,3-g]benzimidazol-7-carboxamida (**24**)

Se pesan 0,143 g (0,44 mmol) de **21** y 0,015 g (0,014 mmol) de Pd/C (10% m/m) y se disuelve el compuesto en 25 mL de MeOH anh bajo atmósfera de argón. Se purga el sistema con H₂ y se mantiene en atmósfera de H₂ a presión atmosférica y agitación durante 18 h. De forma visual y por CCF se observa la desaparición del característico color amarillo del producto de partida. Completada la conversión, se filtra bajo atmósfera inerte y a través de Celite® el crudo de reacción para evitar la descomposición del producto, y a continuación el crudo se concentra a sequedad. Seguidamente, el residuo se redissuelve en 4 mL de ácido fórmico al 85% y se adiciona una cantidad catalítica (50 μ L) de ácido polifosfórico. La mezcla de reacción resultante se agita a reflujo durante 2 h. Tras dejar enfriar hasta T amb, se adicionan 15 mL de NaHCO₃ y NaOH finamente molturado hasta alcanzar pH básico (pH 12). Se realiza una extracción con AcOEt (3 x 15 mL) y la fase orgánica resultante se lava con NaCl (3 x 10 mL). Finalmente, se seca con MgSO₄ anh, se filtra y se concentra a sequedad obteniendo 128 mg (η = 95%) de un sólido en forma de tris(trifluoroacetato).



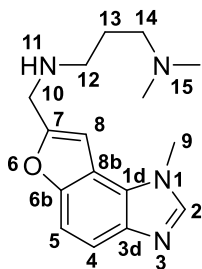
Caracterización

R_f (CH₂Cl₂/MeOH/NEt₃ 90:8:2): 0,14.

RMN ¹H (CD₃OD, 400 MHz) δ (ppm): 8,463 (s, 1H, **H₁₁**), 7,873 (s, 1H, **H₂**), 7,811 (d, ³J= 8,8 Hz, 1H, **H₅**), 7,752 (d, ³J= 8,8 Hz, 1H, **H₄**), 7,407 (s, 1H, **H₈**), 4,088 (s, 3H, **H₉**), 3,614 (m, 2H, **H₁₂**), 2,511 (t, 2H, **H₁₄**), 2,335 (s, 6H, **H₁₅**), 1.811 (m, 2H, **H₁₃**).

2.14 Síntesis de 7-*N*-(3-*N,N*-dimetilaminopropil)aminometil-1-metil-furo[2,3-*g*]benzimidazol (IRAB-3, 25)

Se disuelven 0,072 g (0,46 mmol) de **24** en 10 mL (10 mmol) de una disolución 1,0 M de BH₃ en THF. La mezcla de reacción se mantiene a reflujo durante 4 h y 18 h más a T amb. Pasado ese período de tiempo se añade HCl conc hasta pH= 1, se concentra a sequedad y a continuación se adicionan 10 mL de HCl al 10 % y se calienta a reflujo durante 5 h. El análisis por HPLC (gradiente lineal 0-30 % de B, siendo A H₂O 0,045 % TFA y B ACN 0,036 % TFA) y ESI-MS del crudo anaranjado formado muestra la desaparición del producto de partida. Se elimina el máximo de HCl por evaporación y se liofiliza el crudo obtenido. Finalmente, se purifica por MPLC de fase reversa, utilizando un gradiente lineal 0-30% de B, siendo A H₂O 0,1% TFA y B ACN 0,1% TFA. Se juntan las fracciones correspondientes y se liofilizan obteniendo 29 mg (η = 43 %) del compuesto en forma de tris(trifluoroacetato).



·3CF₃COOH

Caracterización

R_f (CH₂Cl₂/MeOH/NEt₃ 90:8:2): 0,14.

RMN ¹H (D₂O, 400 MHz) δ (ppm): 8,86 (s, 1H, **H₂**), 7,71 (d, ³J= 8,0 Hz, 1H, **H₅**), 7,67 (d, ³J= 8,0 Hz, 1H, **H₄**), 7,47 (s, 1H, **H₈**), 4,50 (s, 2H, **H₁₀**), 4,17 (s, 3H, **H₉**), 3,14 (m, 4H, **H₁₂** and **H₁₄**), 2,79 (s, 6H, **H₁₅**), 2,08 (m, 2H, **H₁₃**).

RMN ¹³C (D₂O, 100 MHz) δ (ppm): 153,89 (**C₂**), 148,45 (**C_{6b}**), 139,75 (**C₇**), 128,18 (**C₄**), 125,32 (**C_{3d}**), 113,28 (**C_{1d}**), 111,98 (**C_{8b}**), 111,10 (**C₅**), 106,10 (**C₈**), 54,13 (**C₁₄**), 46,59 (**C₁₀**), 43,80 (**C₁₂**), 42,74 (**C₁₅**), 34,20 (**C₉**), 21,14 (**C₁₃**).

EM (ESI) m/z : 287,0 [M+H]⁺, (masa calc. C₁₆H₂₂N₄O: 286,4).

3. Determinación espectrofotométrica del pK_a de los ligandos

El pK_a de los ligandos (Isis-11, IRAB-1 e IRAB-2) se determinó mediante el registro de los espectros de absorción de UV-Vis a diferentes pHs, para lo que se requirió la utilización de diferentes disoluciones tampón.

3.1 Preparación de las disoluciones

Tampón KH_2PO_4 0,1 M, rango de pH (6,5-7,7)

Se prepara una disolución madre 0,1 M de KH_2PO_4 por disolución de 1,36 g de KH_2PO_4 en H_2O milliQ en un matraz aforado de 100 mL. A partir de ésta, se preparan 9 disoluciones diluidas en un factor 1:10, ajustando el valor de pH en el rango 6,5-7,7 por adición de gotas de HCl o KOH 0,1 M.

Tampón $KH_2PO_4/AcOH$ 1:1 0,1 M, rango de pH (5,3-6,4)

Para un rango de pH más ácido se requirió de la preparación de una disolución 0.1 M de AcOH por dilución a 50 mL de 286 μ L con H_2O milliQ en un matraz aforado. Para la preparación de disoluciones de este rango de pH más ácido, se preparó un tampón por mezcla en proporción 1:1 de las disoluciones de KH_2PO_4 y AcOH 0,1 M, diluyendo en un factor 1:10 con agua milliQ y ajustando el valor de pH entre 5,3 y 6,4 por adición de gotas de HCl o KOH 0,1 M.

Disoluciones de pH extremo

Estas soluciones de pHs extremos se preparan para establecer la longitud de onda ideal a la cual seguir el cambio en el espectro de UV-Vis entre la especie ionizada y neutra (λ_{anal}). Se prepara una disolución 0,1 M de HCl, disolviendo 414 μ L de HCl conc con 50 mL con H_2O milliQ y una disolución 0,1 M de KOH, disolviendo 0,28 g de KOH con H_2O milliQ hasta un volumen total de 50 mL.

Muestras para el experimento

La preparación de las disoluciones de muestra para el experimento ha consistido en la mezcla de 50 μ L de una disolución 0,2 mM de ligando con 950 μ L de las diferentes disoluciones tampón de pH variable.

3.2 Registro de los espectros

En primer lugar, se registraron los espectros de absorción de UV-Vis entre 220 y 320 nm de los ligandos en las dos disoluciones de pHs extremo (pH= 2,08 y 11,78). Estas disoluciones se utilizan para establecer la longitud de onda ideal a la cual seguir el cambio en el espectro de UV-Vis entre la especie ionizada y neutra (λ_{anal}). Adicionalmente, con estos experimentos también se determinan las absorbancias de las formas ionizada y neutra de los ligandos (A_I y A_M) a la longitud de onda de análisis, dos valores necesarios para la estimación del pK_a .

Posteriormente, se registran los valores de absorbancia en el rango de pH en el cual se halla el pK_a de interés.

3.3 Análisis de los datos

Estos valores de absorbancia se introducen en la siguiente fórmula:

$$pK_a = pH + \log \frac{A_M - A}{A - A_I}$$

Ajustando los datos representados a una regresión lineal, el punto de cruce de la recta con el eje de las ordenadas corresponde al valor del pK_a del ligando³ (véase anexo).

Parte Experimental - Capítulo 2

1. Síntesis y caracterización de los oligonucleótidos

La síntesis de los modelos oligonucleotídicos se llevó a cabo siguiendo la metodología estándar explicada en la sección de Materiales y Métodos (apartado 5) y el anexo. La construcción de la cadena se llevó a cabo siguiendo la estrategia DMT-ON, de tal manera que el último residuo incorporado a la secuencia conservase su grupo protector DMT sobre la posición 5', para facilitar así la purificación.

Los dos nucleósidos de cada extremo se representan en letra minúscula para indicar que se trata de ribonucleósidos 2'-*O*-metilados incorporados con el propósito de minimizar la degradación enzimática. Precisamente, con el fin de evitar la degradación del RNA por nucleasas, la manipulación del RNA es necesario llevarla a cabo en condiciones estériles, usando material previamente esterilizado (véase Materiales y métodos) y agua milliQ libre de ribonucleasas (calidad *RNAse free*). En el caso de las cubetas de cuarzo, se han lavado con agua milliQ y etanol absoluto.

Caracterización

SL3a - FMDV IRES: 5'cgUGG GAA ACU CCU CCU UGG UAA CAA GGA CCC Acg3'

CRL - FMDV IRES: 5'cuGUG CAA CCC CAG CACgg3'

SLIIa - HCV IRES (18-mero): 5'gaGUG UCG UGC AGC CUcc3'

SLIIa - HCV IRES (22-mero): 5'ggAGG AAC UAC UGU CUU CACgc3'

Secuencia RNA	η (%)	MALDI-TOF [M-H] ⁻ Exp. (Calc.)	t _R HPLC (min)
SL3a - FMDV IRES	20	10932,2 (10922,5)	22,8
CRL - FMDV IRES	22	6093,6 (6089,8)	21,9
SLIIa - HCV IRES (18-mero)	33	5778,7 (5775,8)	18,0
SLIIa - HCV IRES (22-mero)	23	7043,3 (7041,0)	17,5

2. Curvas de fusión

2.1 Preparación de las muestras

En los experimentos de fusión por espectroscopia UV-Vis y DC realizados, se ha trabajado con muestras de diferente composición, modificando el pH, la fuerza iónica y la concentración de ligando (Isis-11 e IRAB-1). Para ello, la composición de los volúmenes de 1 mL de muestra ha sido:

Composición muestras para Experimentos de Fusión FMDV IRES							
Diana	Técnica	[RNA] (μM)	[Cac. Sódico] (mM)	[EDTA] (mM)	[NaCl] (mM)	pH	[Ligando] (μM)
SL3a	UV	2	10	0,1	150	6,5	0
							2
							10
						7,0	0
							2
							10
						7,5	0
							2
							10
	DC	5	10	0,1	150	7,5	0
							5
							10
CRL	UV	2	10	0,1	50	7,5	0
							2
					150	7,5	0
							2

2.2 Experimentos de fusión

Antes de llevar a cabo los experimentos de fusión, las muestras se calientan a 90°C en un baño de arena para desnaturalizarlas y se dejan enfriar lentamente hasta temperatura ambiente para renaturalizarlas. A continuación, las muestras se depositan en una cubeta Hellma 114-QS de 10 mm de longitud de paso y 1,4 mL de volumen.

Las curvas de fusión por UV-Vis se han registrado en un espectrómetro Jasco V-550 ordenador provisto de un controlador de temperatura Jasco Peltier ETC-505T conectado a un baño de agua Pharmacia Biotech Multitemp III. Las curvas se han

realizado midiendo la absorbancia de la muestra a $\lambda = 260$ nm, correspondiente al máximo de absorbancia de los oligonucleótidos, al variar la temperatura de 25 a 95°C, con un aumento de 0,5°C/min.

Los experimentos de fusión por dicroísmo circular se han registrado en un espectropolarímetro Jasco J-720 de los Servicios Científico-Técnicos, que permite la adquisición simultánea de espectros de DC y de ultravioleta, provisto de una celda Peltier para regular la temperatura de la cubeta y refrigerado con un baño de agua Neslab RP-100. Las curvas de fusión por DC se han realizado midiendo la elipticidad de la muestra a 267 nm, en que se observa un máximo positivo de elipticidad a 25°C, mientras se varía la temperatura entre 25 y 95°C, con un aumento de 0,5°C/min como en los experimentos por UV. Adicionalmente, a modo de control, se han registrado espectros de dicroísmo y UV entre 220 y 320 nm cada 10°C.

2.3 Análisis de los experimentos de fusión

Para analizar las curvas de fusión, tanto las obtenidas por espectroscopia UV-Vis como por DC, se han ajustado los datos experimentales a un modelo sigmoideal con el programa Origin Lab OriginPro 7.5. En primer lugar, los datos experimentales se representan en un gráfico *Plot Line*, y entonces se ajustan a una curva sigmoide aplicando *Fit Sigmoidal* (100 iteraciones y modelo Boltzmann). El punto de inflexión de la sigmoide que calcula el algoritmo se toma como el valor de la temperatura de fusión (T_m). Los valores de T_m se han calculado efectuando el promedio de los valores obtenidos en diferentes experimentos, aceptando una diferencia máxima de $\pm 1^\circ\text{C}$.

3. Experimentos de DC

3.1 Preparación de las muestras

En los experimentos de dicroísmo circular se ha trabajado con muestras a diferentes pH. La composición de 1 mL de muestra ha sido:

Composición disoluciones de RNA para Experimentos de DC					
Diana	[RNA] (μM)	[Cac. Sódico] (mM)	[NaCl] (mM)	[EDTA] (mM)	pH
SL3a	5	10	150	0,1	6,5
					7,0
					7,5
CRL	5	10	150	0,1	6,5
					7,0
					7,5

Antes de realizar los experimentos, las disoluciones que contienen la diana se calientan a 90°C en un baño de arena y se dejan enfriar lentamente hasta temperatura ambiente.

Aparte de las disoluciones de diana de RNA, se preparan disoluciones de ligando (Isis-11 e IRAB-1), en H₂O milliQ de concentraciones 1 y 5 mM.

3.2 Ensayos de adición de 1 y 5 eq de ligando sobre la diana SL3a

Se deposita 1 mL de la disolución de RNA en una cubeta Hellma 114-QS, se sitúa en la celda Peltier a una temperatura de 25°C, y se registra el espectro de dicroísmo circular entre 220 y 320 nm. Sobre esta muestra se adicionan consecutivamente 5 μL de disolución de ligando 1 mM y 4 μL de la disolución de ligando 5 mM, registrando un espectro de dicroísmo tras cada una de las dos adiciones. A continuación, se ha llevado a cabo la representación de los valores de elipticidad frente a la longitud de onda para cada uno de los tres espectros registrados por muestra con el programa Origin Lab OriginPro 7.5.

3.3 Valoraciones por DC

Para realizar la valoración por dicroísmo circular, se realizan hasta 18 adiciones equiespaciadas de volúmenes entre 5 y 20 μL de las disoluciones de ligando, incrementado secuencialmente la concentración (1 y 5 mM), sobre una disolución 5 μM de RNA (SL3a o CRL). Entre la adición y el registro del espectro se dejan transcurrir 2 minutos para permitir que la temperatura de la celda se estabilice.

Los valores de elipticidad obtenidos a $\lambda = 270 \text{ nm}$, se representan en un gráfico (*Plot Scatter*) mediante el programa Origin Lab OriginPro 7.5 frente al logaritmo de la concentración de ligando obteniéndose una curva. Aplicando *Fit Sigmoidal* (100 iteraciones y modelo Boltzmann), la curva es ajustada a un modelo sigmoidal, el punto de inflexión del cual corresponde a la EC_{50} de la interacción entre el RNA y el ligando.

4. Valoraciones por fluorescencia

4.1 Experimentos de fluorescencia intrínseca

4.1.1 Preparación de las muestras

En los experimentos de fluorescencia intrínseca, se ha trabajado con muestras de diferente pH. Para la realización de éstos, las muestras utilizadas han tenido la siguiente composición por mL:

Ligando (Isis-11 e IRAB-1): cacodilato sódico 10 mM, NaCl 150 mM, Na_2EDTA 0,1 mM, ligando 2 μM y pH ajustado a 6,5, o 7,5.

Por otro lado se preparan disoluciones de las dianas de RNA (SL3a y CRL) en H_2O milliQ, de concentraciones 40 μM , 0,4 mM y 5 mM. Antes de realizar los experimentos, estas disoluciones que contienen la diana se calientan a 90°C en un baño de arena y se dejan enfriar lentamente hasta temperatura ambiente.

4.1.2 Determinación de λ_{exc} y λ_{em} de Isis-11 e IRAB-1

Antes de realizar las valoraciones, se han determinado las longitudes de onda de excitación y emisión para la realización de los experimentos de titulación. Todas las medidas de fluorescencia se han realizado en un fluorímetro QuantaMaster PTI. Se deposita 1 mL de la muestra en una cubeta Hellma 119.004F-QS de 10 mm de

paso de luz y 1,5 mL de volumen, y ésta se sitúa en un soporte termostatzado a 20°C. En primer lugar, se realiza un espectro de excitación entre 200 y 500 nm para determinar el máximo de absorción del fluoróforo. Determinada la longitud de onda máxima de absorción, se registra un espectro de emisión de la muestra irradiando a la λ_{exc} máxima y empezando el barrido 10 nm por encima de ésta y hasta 500 nm. Los parámetros hallados se resumen a continuación:

Ligando	λ_{exc} (nm)	λ_{em} (nm)
Isis-11	300	335
IRAB-1	280	312

4.1.3 Experimentos de titulación por fluorescencia intrínseca

Para registrar las curvas de fluorescencia intrínseca de los ligandos, se realizan hasta 9 adiciones sobre la disolución del fluoróforo, cada 7 minutos, de 5 μ L de disolución de RNA (SL3a o CRL). Para cubrir el rango de concentraciones, se emplean disoluciones de RNA entre 40 μ M y 0,4 mM, que se han sometido previamente al ciclo de desnaturalización y renaturalización.

Los valores de fluorescencia obtenidos en el máximo de emisión se representan en un gráfico *Plot Scatter* mediante el programa Origin Lab OriginPro 7.5 frente a la concentración de RNA. Se obtiene una curva, que se ajusta de forma no lineal a la siguiente ecuación que responde a un modelo de equilibrio con estequiometría 1:1, para determinar la constante de disociación del complejo fluoróforo-RNA⁴.

$$I = I_0 + \frac{(I_r - I_0)}{(2 \times F_0) \times (R_0 + K_d + F_0 - ((R_0 + K_d + F_0)^2 - 4 \times R_0 \times F_0)^{1/2})}$$

4.2 Valoraciones sobre RNAs fluorescentes que incorporan 2-aminopurina

4.2.1 Preparación de la muestra

En los experimentos con 2-aminopurina, se ha trabajado con muestras de diferente pH y diferente composición. Para ello, se han preparado disoluciones de 1 mL con la siguiente composición:

Composición Muestras Valoraciones con 2-aminopurina							
IRES	Diana	[RNA] (μM)	[Cac.sódico] (mM)	[NaCl] (mM)	[MgCl ₂] (mM)	pH	[tRNAmix] (μM)
HCV	SLIIa/AP54	2	10	150	-	6,5	-
						7,5	20
					0,3	6,5	-
						7,5	-
FMDV	SL3a/AP167	2	10	150	-	6,5	-
						7,5	20
	SL3a/AP180	2	10	150	-	6,5	-
						7,5	-
	CRL/AP239	2	10	150	-	6,5	-
						7,5	-
	SL3a	2	10	150	-	6,5	-
						7,5	-
	CRL	2	10	150	-	6,5	-
						7,5	-
SL3a/AP167 + CRL	2+2	10	150	-	7,5	-	
CRL/AP239 + SL3a	2+2	10	150	-	7,5	-	
SL3a + CRL	2+2	10	150	-	7,5	-	

Antes de realizar los experimentos, las disoluciones que contienen la diana se calientan a 90°C en un baño de arena y se dejan enfriar lentamente hasta temperatura ambiente. Aparte, se preparan disoluciones en H₂O milliQ de los ligandos ensayados (Isis-11, IRAB-1 e IRAB-2) en un rango de concentraciones comprendido entre 10 μM y 10 mM.

4.2.2 Experimentos de valoración

Para registrar los espectros se trasvasa la muestra a una cubeta Hellma 119.004F-QS de 10 mm de longitud de paso y 1,4 mL de volumen, y ésta se sitúa en el soporte termostatzado del fluorímetro a 20°C. A continuación, se realizan hasta 25 adiciones sobre las disoluciones de RNA, de manera equiespaciada cada 4 min, de 2 µL de disolución de ligando de concentraciones entre 10 µM y 10 mM, según la afinidad del ligando por la diana.

4.2.3 Análisis de las valoraciones

4.2.3.1 Diana SLIIa (HCV IRES)

Los valores de fluorescencia obtenidos a $\lambda_{em}= 365$ nm se representan en un gráfico (*Plot Scatter*) mediante el programa Origin Lab OriginPro 7.5 frente al logaritmo de la concentración de ligando, obteniéndose una curva. Aplicando *Fit Sigmoidal* (100 iteraciones y modelo Boltzmann), la curva es ajustada a un modelo sigmoidal, el punto de inflexión del cual corresponde a la EC_{50} de la interacción entre el RNA y el ligando.

4.2.3.2 Dianas SL3a/AP167, SL3a/AP180 y CRL/AP239 (FMDV IRES)

Para corregir el efecto de la fluorescencia intrínseca de los ligandos a concentraciones elevadas, se sustraen de los valores de fluorescencia obtenidos a $\lambda_{em}= 365$ nm las intensidades registradas en las valoraciones realizadas sobre los RNAs sin marcar. Los valores obtenidos se representan en un gráfico (*Plot Scatter*) mediante el programa Origin Lab OriginPro 7.5 frente al logaritmo de la concentración de ligando, obteniéndose una curva. Aplicando *Fit Sigmoidal* (100 iteraciones y modelo Boltzmann), la curva es ajustada a un modelo sigmoidal, el punto de inflexión del cual corresponde a la EC_{50} de la interacción entre el RNA y el ligando.

4.3 Determinación de la selectividad

4.3.1 Preparación de las muestras

Para llevar a cabo los ensayos de selectividad, se ha utilizado una mezcla comercial de tRNA (Escherichia Coli. Type XXI, Strain W, Sigma Aldrich), de un promedio de 90 nucleósidos y que a 260 nm presenta un coeficiente de extinción molar promedio de $9640 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ por base. Para la preparación de las muestras, se han añadido 10 eq de esta mezcla sobre las disoluciones de muestra de RNA marcado con 2-aminopurina.

4.3.2 Experimento y análisis de los datos

La determinación del valor de la EC_{50} de los ligandos por el RNA marcado en presencia de la mezcla de tRNA competidor se realiza de forma análoga a los ensayos de determinación de la EC_{50} . Una vez obtenido el valor de afinidad en presencia del competidor, se determina el grado de selectividad a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Selectividad} = \frac{EC_{50} \text{ en presencia del tRNA competidor}}{EC_{50} \text{ en ausencia del tRNA competidor}}$$

5. Valoraciones por ITC

5.1 Preparación de las muestras

Tanto del RNA como del ligando se prepararon disoluciones madre para minimizar errores de reproducibilidad. A partir de éstas, se prepararon las muestras con la composición siguiente:

Tipo Compuesto	Nombre	[Compuesto] (μM)	[Cac. Sódico] (mM)	[NaCl] (mM)	pH
Diana	SL3a (FMDV IRES)	20	10	150	6,5
	SLIIa (HCV IRES)	20	10	150	6,5
Ligando	Isis-11	210	10	150	6,5
		390	10	150	6,5
	IRAB-1	210	10	150	6,5
		600	10	150	6,5
	IRAB-2	210	10	150	6,5
		390	10	150	6,5

Antes de llevar a cabo el experimento, el RNA se sometió a un proceso de desnaturalización y renaturalización por calentamiento de la disolución a 90°C en un baño de arena seguido por un lento enfriamiento hasta T ambiente. A continuación, todas las disoluciones fueron desgasificadas a 25°C durante 5 min a presión reducida utilizando la *Degasser Station*.

5.2 Experimento

El instrumento posee dos celdas idénticas, la celda para la muestra (190 μL) y la de referencia, y una jeringa de 50 μL dotada con capacidad de agitación. La celda de muestra se limpia y se introducen 300 μL de la disolución de RNA a través de la jeringa. La celda de referencia contiene el mismo tampón utilizado para disolver tanto el ligando como el RNA.

Por otro lado, la jeringa se llena con 50 μL de disolución de ligando evitando la formación de burbujas en su interior. Seguidamente, se acopla la jeringa a la bureta y se introduce en el microcalorímetro.

Se siguió el mismo procedimiento para todos los experimentos. Se realiza una valoración del RNA contenido en la celda de muestra por adiciones sucesivas de ligando por medio de la jeringa de 50 μL .

Los parámetros utilizados en los experimentos se resumen en la siguiente tabla:

Parámetro	Valor
Temperatura	25°C
Tiempo de línea de base	100 s
Velocidad de agitación	250 rpm
Número de inyecciones	20
Volumen de inyección	2,5 µL
Tiempo de espera	300 s

5.3 Análisis del experimento

Para la obtención de los datos termodinámicos de la interacción, los datos del experimento fueron procesados con el software Launch NanoAnalyze Data Analysis v. 2.4.1 (TA instruments). El primer paso consiste en la integración de los picos de calor originados por las inyecciones. Seguidamente, se corrigen las contribuciones de calor de los picos debidas al calor de dilución u otros factores experimentales ajenos a la interacción. Para ello, se resta el valor promedio de las últimas inyecciones, en las cuales se alcanza un valor estable de calor. Los calores obtenidos se representan en un gráfico frente a la ratio [ligando]/[RNA]. La curva sigmoide obtenida se ajusta a un modelo de unión independiente de los ligandos (*Independent Model*) con el objeto de calcular los parámetros termodinámicos de la interacción.

Las titulaciones se repitieron un mínimo de dos ocasiones, y los correspondientes parámetros termodinámicos se obtuvieron realizando la media de ambos experimentos.

6. Determinación de la estequiometría por espectrometría de masas

6.1 Preparación de la muestra

En primer lugar se introducen en un eppendorf el oligonucleótido y el ligando en las cantidades necesarias requeridas por el experimento. El RNA se mezcla con 50 equivalentes del ligando y la disolución resultante se liofiliza. El residuo resultante se disuelve en tampón 50 mM de acetato amónico hasta una concentración final 50 µM. La composición final de la muestra ha sido:

Diana SL3a: NH₄AcO 50 mM, RNA 50 µM, IRAB-1 2,5 mM y pH ajustado a 7,0.

La muestra se somete a un proceso de desnaturalización y renaturalización por calentamiento a 90°C en un baño de arena y posterior enfriamiento lento hasta alcanzar T ambiente. Seguidamente, se eluyó la muestra a través de una columna Micro Bio-Spin 6 (Bio-Gel (símbolo R) P poliacrilamida, Bio-Rad) para desalar la muestra y eliminar el exceso de ligando, utilizando como eluyente un tampón 150 mM de acetato amónico.

6.2 Realización y análisis del experimento

La muestra procesada (75-100 µL) se inyectó para un análisis por IM-MS. Las muestras fueron ionizadas negativamente por electrospray, modo IM-MS (V mode, Mobility-TOF mode). El resto de parámetros del instrumento se muestran a continuación:

Parámetro	Valor	
Sampling cone	45 V	
Source Temperature	100°C	
Trap collision energy	10 V	
Transfer collision energy	10 V	
IM-gas flow	24 mL/min	
Trap gas flow	5 mL/min	
Bias	15 V	
IM wave height	8,0 V	
IM wave velocity	300 m/s	
m/z range	500 to 8000	
Scan time	1s	
External Calibration with Csl, m/z range	500 to 8000	
Pressures	Backing	5,75 e0 mbar
	Trap	4,00 e-2 mbar
	IMS	4,67 e-1 mbar
	TOF	2,17 e-6 mbar
RF (Offset/Limit)	Source	350/450
	IMS	350/380
	Trap	350/380
	Transfer	350/380

Los datos fueron adquiridos y procesados con el software MassLynx v 4.1 (SCN 704). Los espectros de masas se deconvolucionaron con algoritmos integrados en MassLynx para proporcionar los valores de m/z promedio y se procesaron con el software Driftscope v. 2.4.

Bibliografia

- (1) Sproat, B. S. *Methods Mol. Biol.* **2005**, *288*, 17–32.
- (2) Brown, T.; Brown, D. J. S., *Oligonucleotides and Analogues A Practical Approach*, Ed. Eckstein, F., IRL Press, Practical Approach Series 83, **1991**, p 20.
- (3) Albert, A.; Serjeant, E. P. *Ionization Constants of Acids and Bases: A Laboratory Manual*, Methuen.; **1962**.
- (4) Hamasaki, K.; Rando, R. R. *Anal. Biochem.* **1998**, *261* (2), 183–190.

Anexo

2. Determinación espectrofotométrica del pK_a de los ligandos

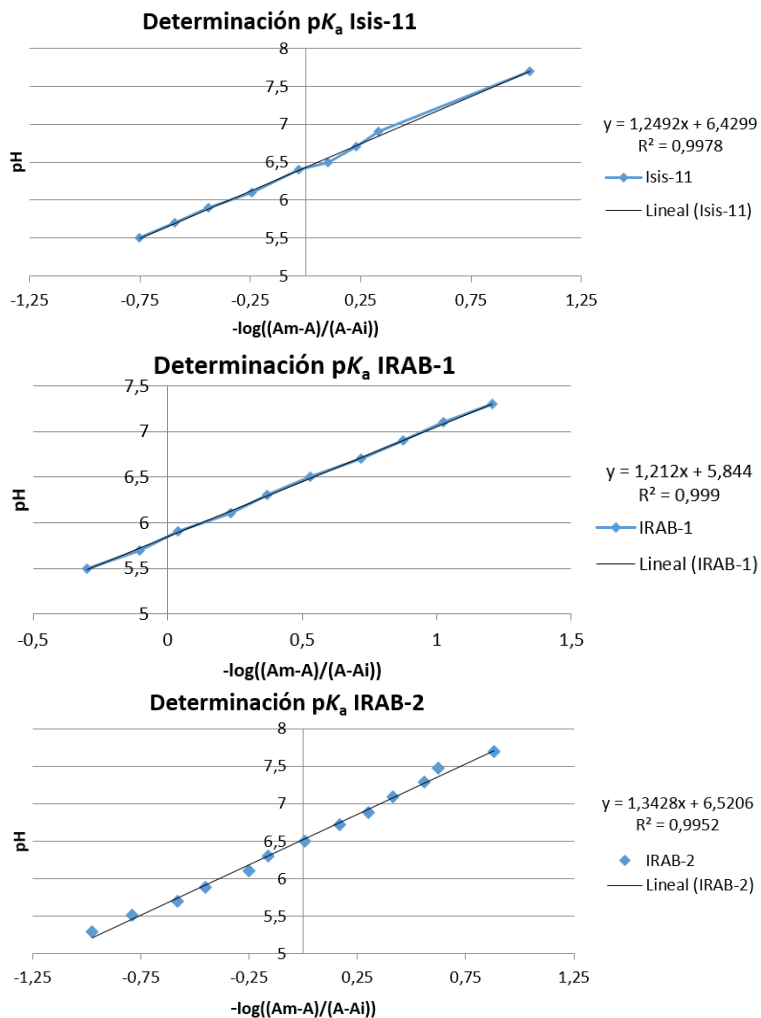


Fig. A.2 Representación del pH frente a $-\log ((A_M-A)/(A-A_i))$, obteniéndose el valor de pK_a de los ligandos como ordenada en el origen.

3. Inhibición in vitro de FMDV IRES con IRAB-2

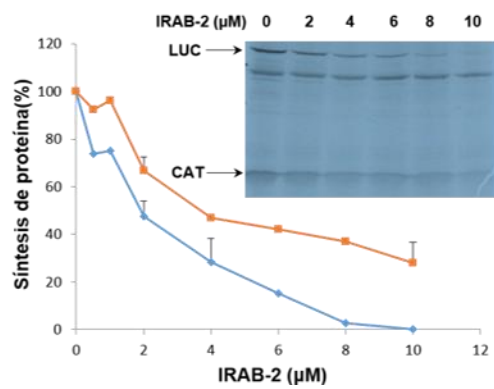


Fig. A.3 Resultados de inhibición de la traducción de FMDV IRES con IRAB-2

Abreviaturas, acrónimos y símbolos

Abreviaturas, acrónimos y símbolos

A	adenina
Ac	acetilo
Ac ₂ O	anhídrido acético
ACN	acetonitrilo
AcOEt	acetato de etilo
AcOH	ácido acético glacial
AMG	aminoglicósido
anh	anhidro
Bz	benzoílo
BTT	5-benciltio-1- <i>H</i> -tetrazol
C	citosa
cac	cacodilato
CCF	cromatografía en capa fina
CNE	2-cianoetilo
CPG	<i>Controlled Pore Glass</i> o bolas de vidrio de tamaño controlado
CRL	<i>loop</i> rico en C
DBU	1,8-diazabicycloundec-7-eno
DC	dicroísmo circular
DIEA	<i>N,N</i> -Diisopropietilamina
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMSO	dimetilsulfóxido
DMT	4,4'-dimetoxitritilo
DNA	ácido desoxirribonucleico
EC ₅₀	mitad de la concentración máxima efectiva
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminocarbodiimida)
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
eIF	<i>Eukaryotic Initiation Factor</i> o factor de iniciación eucariota
EM (MS)	espectrometría de masas
ESI	ionización por electrospray
FMDV	<i>Foot and Mouth Disease Virus</i> o virus de la fiebre aftosa
G	guanina
HCV	Hepatitis C virus
HPLC	cromatografía líquida de alta presión
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
iPr-Pac	isopropoxifenoxiacetilo
IRES	<i>Internal Ribosome Entry Site</i> o sitio interno de entrada ribosomal

ITC	<i>Isothermal Titration Calorimetry</i> o valoración por calorimetría isotérmica
LNA	<i>Locked Nucleic Acid</i> o ácido nucleico bloqueado
MALDI-TOF	espectrometría de masas por desorción iónica provocada por láser, asistida por matriz con analizador de tiempo de vuelo
MBNL1	<i>Musclebind-like 1</i>
Mes	mesilo
MPLC	cromatografía líquida de media presión
mRNA	ácido ribonucleico mensajero
MW	microondas
NMO	óxido de <i>N</i> -metilmorfolina
NMP	<i>N</i> -metilpirrolidona
NOE	<i>Nuclear Overhauser Effect</i>
ORF	<i>Open Reading Frame</i> o marco abierto de lectura
PAA	Polyamide Amino Acids o aminoácidos poliamida
Pac	fenoxiacetilo
P.f.	punto de fusión
Piv	pivaloilo
PNA	ácido nucleico peptídico
R _f	factor de retención
RMN	resonancia magnética nuclear
RNA	ácido ribonucleico
RRE	<i>Rev Response Element</i>
SHAPE	<i>Selective 2'-Hydroxyl Acylation analyzed by Primer Extension</i>
SL	stem loop o tallo-lazo
TAR	<i>Trans-Acting Response Element</i>
TBDMS	<i>tert</i> -butildimetilsililo
TCA	ácido tricloroacético
TEAA	acetato de trietilamonio
TFA	ácido trifluoroacético
THAP	2,4,6-trihidroxiacetofenona
THF	tetrahidrofurano
T _m	temperatura de fusión (en curvas de fusión o de desnaturalización)
TOCSY	<i>Total correlation Spectroscopy</i>
tRNA	ácido ribonucleico de transferencia
U	uracilo
UTR	región no traducida
VIH	virus de inmunodeficiencia humana

