



Universidad de Oviedo

**Departamento de Química Orgánica e Inorgánica**

Programa de Doctorado en Síntesis y Reactividad Química

**SÍNTESIS DE OLIGONUCLEÓTIDOS CON POTENCIAL  
ACTIVIDAD TERAPÉUTICA**

**Tesis Doctoral**

**Luis Miguel Menéndez Méndez**





Universidad de Oviedo

**Departamento de Química Orgánica e Inorgánica**

Programa de Doctorado en Síntesis y Reactividad Química

**SÍNTESIS DE OLIGONUCLEÓTIDOS CON POTENCIAL  
ACTIVIDAD TERAPÉUTICA**

**Memoria presentada para optar al  
grado de Doctor en Química por  
Luis Miguel Menéndez Méndez**







## RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Síntesis de oligonucleótidos con potencial actividad terapéutica	Inglés: Synthesis of oligonucleotides with potential therapeutical activity
2.- Autor	
Nombre: LUIS MIGUEL MENÉNDEZ MÉNDEZ	DNI/Pasaporte/NIE:
Programa de Doctorado: Síntesis y Reactividad Química	
Órgano responsable: Centro Internacional de Postgrado	

### RESUMEN (en español)

Los oligonucleótidos terapéuticos son pequeños fragmentos de ácido nucleico (ADN o ARN) capaces de unirse específicamente al ARN y modular su función. Esta capacidad abre la posibilidad de utilizarlos como fármacos por medio de diversos mecanismos de acción. Estos fármacos han sido objeto de investigación durante varias décadas y se han utilizado para tratar enfermedades raras y comunes.

La síntesis química de oligonucleótidos se lleva a cabo en el laboratorio, habitualmente, mediante síntesis en fase sólida, utilizando como fragmentos de construcción fosforamiditos protegidos de nucleósidos naturales o químicamente modificados. Los factores limitantes de la eficacia del proceso son: la obtención de rendimientos bajos en alguna de las etapas, la aparición de reacciones secundarias indeseadas y las características fisicoquímicas de la resina soporte empleada, de las cuales dependen factores tan cruciales como su capacidad de carga, entre otros.

Esta Tesis Doctoral está dividida en dos capítulos, en cada uno de los cuales se aborda el estudio de diferentes aspectos en la síntesis de oligonucleótidos desde una perspectiva sintética y estructural, mostrando en algún caso sus propiedades biológicas.

El primer capítulo está relacionado con el desarrollo de soportes sólidos altamente eficientes y económicos, que sigue siendo un importante desafío en el campo de la síntesis en fase sólida de ácidos nucleicos. Dado que los actuales soportes comerciales son muy costosos, las nuevas resinas *Core-Shell* se presentan como una alternativa interesante. Estas resinas, constituidas por gránulos poliméricos de tipo núcleo-carcasa en las que los grupos funcionales aparecen distribuidos en la superficie exterior, evitan los problemas de difusión de las resinas convencionales de tipo vidrio de poro controlado (CPG) o poliestireno (PS), ofreciendo así una mayor accesibilidad tanto para disolventes como para reactivos. Hasta ahora, este tipo de resinas sólo habían sido utilizadas en la síntesis de péptidos y se carecía de una evaluación de las mismas en la síntesis de oligonucleótidos.

Se estudió la utilización de dos resinas *Core-Shell* de tipo PS-PEG denominadas PEG024 y PEG029 en la preparación de manera manual de varios dímeros, trímeros y tetrámeros. Tras encontrar las condiciones óptimas, se llevó a cabo la síntesis automatizada de oligonucleótidos de secuencia más larga, tales como el aptámero 16-mer TBA (*Trombin Binding Aptamer*) y el fosforotioato antisentido R-Las (*Renilla Luciferase Antisense*). Los resultados obtenidos permitieron demostrar la aplicabilidad de las resinas *Core-Shell* para la preparación de oligonucleótidos en fase sólida. El estudio se completó mediante la síntesis de fragmentos protegidos de ADN, así como de ciertos conjugados lipídicos y ácidos nucleicos ricos en guanina capaces de conformar estructuras de tipo G-cuádruplex.

En el segundo capítulo, se describen las síntesis y el estudio comparativo de las propiedades de oligonucleótidos G-cuádruplexes que contienen L-nucleósidos (<sup>L</sup>U) en el extremo 3' y grupos OMe u OMOE en la posición 2'.

Un G-cuádruplex es una estructura tridimensional constituida por cuatro hebras de ADN, que se forma al unirse cuatro oligonucleótidos ricos en guanina mediante puentes de hidrógeno de tipo Hoogsteen. La unión de cuatro guaninas forma una superficie o unidad plana denominada tétrada.

En primer lugar, se sintetizaron los oligonucleótidos en un sintetizador automático utilizando una resina CPG como soporte sólido. A continuación, se llevó a cabo la formación de las estructuras G-cuádruplex mediante tratamiento térmico de las muestras y posterior enfriamiento utilizando dos tipos de buffers (Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>). Los ensayos realizados para los estudios de estabilidad (dicroísmo circular, cálculo de T<sub>m</sub>, degradación enzimática con fosfodiesterasas y



electroforesis de tipo PAGE) determinaron que las modificaciones introducidas proporcionaron una gran estabilidad a las estructuras G-cuádruplexes formadas.

Parte de los resultados obtenidos a lo largo de esta Tesis Doctoral han sido publicados en el siguiente artículo:

“Synthesis of 2'-O-Methyl/2'-O-MOE L-Nucleoside Derivatives and Their Applications: Preparation of G-Quadruplexes, Their Characterization, and Stability Studies.” V. Martín-Nieves, L.-M. Menéndez-Méndez, C. Fábrega, S. Fernández, Y. S. Sanghvi, M. Ferrero, R. Eritja. *ACS Omega*, **2023**, 8, 44893-44904.

### RESUMEN (en Inglés)

Therapeutic oligonucleotides are small fragments of nucleic acid (DNA or RNA) capable of specifically binding to RNA and modulating its function. This ability opens the possibility of using them as drugs through a variety of mechanisms of action. These drugs have been the subject of research for several decades and have been used to treat rare and common diseases.

Chemical synthesis of oligonucleotides is usually carried out in the laboratory by solid-phase synthesis using natural or chemically modified nucleoside-protected phosphoramidites as building blocks. The limiting factors for the efficiency of the process are: low yields in some of the steps, undesired side reactions, and the physicochemical characteristics of the support resin used, on which crucial factors such as its loading capacity, among others, depend.

This Doctoral Thesis is divided into two chapters, each of which deals with the study of different aspects of oligonucleotide synthesis from a synthetic and structural perspective, showing in some cases their biological properties.

The first chapter is related to the development of highly efficient and cost-effective solid supports, which remains a major challenge in the field of solid-phase synthesis of nucleic acids. As the current commercial supports are very expensive, the new *Core-Shell* resins present themselves as an interesting alternative. These resins, consisting of polymeric granules in which the functional groups are distributed on the outer surface, avoid the diffusion problems of conventional controlled pore glass (CPG) or polystyrene (PS) resins, thus offering greater accessibility for both solvents and reagents. Until now, these types of resins have only been used in peptide synthesis and there was a lack of evaluation of these resins in oligonucleotide synthesis.

The use of two PS-PEG-type *Core-Shell* resins, named PEG024 and PEG029, was studied in the manual preparation of several dimers, trimers, and tetramers. After finding the optimal conditions, automated synthesis of longer sequence oligonucleotides, such as the 16-mer TBA (Trombin Binding Aptamer) and the antisense phosphorothioate R-Las (Renilla Luciferase Antisense), was carried out. The results obtained demonstrated the applicability of these *Core-Shell* resins for the preparation of solid-phase oligonucleotides. The study was completed by the synthesis of protected DNA fragments, as well as certain lipid conjugates and guanine-rich nucleic acids capable of forming G-quadruplex structures.

In the second chapter, the synthesis and comparative study of the properties of G-quadruplex oligonucleotides containing L-nucleosides (<sup>1</sup>U) at the 3'-end and OMe or OMOE groups at the 2'-position are described.

A G-quadruplex is a three-dimensional structure consisting of four strands of DNA, which is formed when four guanine-rich oligonucleotides are joined together by Hoogsteen-type hydrogen bridges. The joining of four guanines forms a flat surface unit called a tetrad.

First, oligonucleotides were synthesized in an automatic synthesizer using a CPG resin as a solid support. Then, the formation of the G-quadruplex structures was carried out by heat treatment of the samples and subsequent cooling using two types of buffers (Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup>). The tests performed for stability studies (circular dichroism, T<sub>m</sub> calculation, enzymatic degradation with phosphodiesterases, and PAGE-type electrophoresis) determined that the modifications introduced provided high stability to the G-quadruplex structures formed.

Part of the results obtained throughout this doctoral thesis have been published in the following article:

“Synthesis of 2'-O-Methyl/2'-O-MOE L-Nucleoside Derivatives and Their Applications: Preparation of G-Quadruplexes, Their Characterization, and Stability Studies.” V. Martín-Nieves, L.-M. Menéndez-Méndez, C. Fábrega, S. Fernández, Y. S. Sanghvi, M. Ferrero, R. Eritja. *ACS Omega*, **2023**, 8, 44893-44904.

## **Agradecimientos**



*A mis padres, que lo dieron todo por mí.*



*“Everything should be made as simple as possible, but not simpler”*

**Albert Einstein**

*“If you want to break new ground in science, you have to walk the path alone”*

**Gobind Khorana**

*“Quise ser como tu yeres: foces, picos, mar y viento.  
Quise ser como tu yeres borrina, llume y formientu...”*

**Nuberu**

*“Aunque mis ojos ya no puedan ver ese puro destello,  
que en mi juventud me deslumbraba.  
Aunque ya nada pueda devolver  
la hora del esplendor en la hierba de la gloria en las flores,  
no hay que afligirse.  
Porque la belleza siempre subsiste en el recuerdo...”*

**William Wordsworth**





Ojalá mi mano no tiemble al recordar con emoción, desde la perspectiva y la nostalgia que otorga el tiempo transcurrido, aquellos lejanos días de juventud cuando, en la primavera de la vida, comenzaba mis estudios universitarios en la Facultad de Química de la Universidad de Oviedo. Un edificio al que me gustaba llamar “La Madraza” debido a que, en aquella época, amenizaba mis horas de lectura y asueto una estupenda novela de Noah Gordon titulada “El Médico” y que, por analogía comparativa, hacía que mi imaginación identificase por igual ambos lugares.

Aunque mi vocación infantil había sido, ya desde temprana edad, la medicina, cuando llegó la hora de comenzar mis estudios universitarios, el devenir y las circunstancias de la vida encaminaron mis pasos a matricularme en la carrera de Ciencias Químicas, una opción que hasta entonces no había barajado de manera fehaciente.

Durante todo el tiempo que duró mi formación en esta disciplina, pude descubrir las diferentes áreas de conocimiento que la conforman, para finalmente, ya en los últimos cursos, decantarme por la especialidad de Química Orgánica.

Si bien es cierto que, en una carrera tan multidisciplinar y versátil como ésta, todas las ramas son intrínsecamente necesarias y complementarias, era el estudio de los compuestos de carbono, así como su presencia y función en la Naturaleza, lo que más llamaba mi atención por aquellos tiempos. Recuerdo con nostalgia, cómo me fascinaban aquellos dibujos y esquemas que, con tan sólo unos pocos y sencillos trazos, materializaban en el papel complicadísimos e impronunciables nombres, haciendo más accesible al entendimiento la nomenclatura de las diferentes moléculas, así como sus reacciones, procesos y transformaciones espaciales. También recuerdo con verdadero deleite cómo me apasionaba el trabajo en el laboratorio, sintetizando nuevos compuestos y profundizando en el “cómo” y “por qué” a través del estudio de los diferentes mecanismos de reacción (a veces casi imposibles) que permitían comprender de manera racional la causa por la que unas veces, en el matraz, la sustancia obtenida presentaba un desagradable aspecto ocre y otras veces (las menos) lucía vivos y espléndidos colores.

A pesar de todo, cuando mi etapa formativa tocó a su fin, curiosamente, lo último que quería, era proseguir mis estudios haciendo un doctorado, quizás por mi excesiva juventud y espíritu inquieto, mis motivaciones iban más encaminadas a experimentar cosas novedosas, conocer otros lugares, otras formas de trabajo, otros sectores... en lugar de seguir durante más años viviendo en la misma rutina de la facultad. Así que, enseguida me inserté en el mercado laboral trabajando en aspectos tan dispares como la gestión de calidad o el medio ambiente para ciertas empresas.

Tras varios años trabajando en el ámbito burocrático, y algún tiempo como técnico de laboratorio en industrias tan variadas como “*Reny Picot*” o “*BASF*”, un buen día surgió la oportunidad de realizar una estancia en un instituto de investigación extranjero, y esto lo cambió todo...

Al principio, la idea parecía un tanto descabellada. Una estancia de seis meses en el laboratorio de bioquímica de un instituto de investigación en Finlandia, en pleno invierno, no parecía que fuera a ser una experiencia demasiado prometedora para un chaval de provincias que apenas había salido de su Asturias natal.

Pese a todo, (¿qué tenía que perder?), finalmente, acepté la oferta, cogí el primer vuelo que salía hacia Helsinki y me lancé a la aventura. A día de hoy, y con la perspectiva que otorgan la madurez y el paso de los años, he de reconocer que fue una de las mejores decisiones que jamás haya tomado.

El lugar de destino era el prestigioso Instituto de Investigación Forestal de Finlandia (antes “*Mëtla*” hoy “*LuKe*”) en su centro de Vaanta, donde, bajo la supervisión de la Dra. Taina Pennanen, comencé a trabajar en un proyecto relacionado con la identificación y separación de fosfolípidos ácidos de membrana en muestras de suelos procedentes de bosques boreales situados en las afueras de Helsingfors. Recuerdo que se trataba de un proyecto relacionado con el estudio de micorrizas en determinados suelos forestales susceptibles a ser repoblados con *Piceas* u otras especies arbóreas más apropiadas para determinadas latitudes.

Este era mi primer viaje al extranjero, y para un veinteañero inexperto en estas cuitas, esta experiencia supondría superar más de un reto y no sólo en el ámbito laboral.

Como es de suponer, durante las primeras semanas las cosas no fueron demasiado fáciles. La barrera cultural e idiomática eran factores importantes a tener en cuenta. Además, las condiciones económicas de la beca eran irrisorias y como apenas podía permitirme afrontar los gastos de alojamiento, fue la propia empresa quien me proporcionó la vivienda: una pequeña cabaña de madera en medio de un bosque perdido en mitad de la nada, en un remoto lugar de la campiña finlandesa. Totalmente incomunicado y alejado de la civilización, la única opción de transporte con la que contaba para recorrer los cuatro kilómetros que me separaban de mi centro de trabajo era una vieja bicicleta de segunda mano que me permitió experimentar en mis propias carnes los rigores del crudo invierno que asolaba aquellas lejanas tierras... (Quizás lo más sorprendente, es que todo aquello no dejaba de recordarme a una de mis series televisivas favoritas: “Northern Exposure” (Doctor en Alaska), que tantos éxitos había cosechado entre su minoritaria audiencia española durante su emisión allá por los años noventa, si la memoria no me falla...).

En el ámbito laboral también me encontré importantes diferencias con lo que conocía en España, y he de decir que, para mi sorpresa, estas diferencias fueron bastante positivas. Ya desde un principio, sentí verdadera admiración por la forma de trabajar que tenían en aquel laboratorio: orden y limpieza; dos palabras que resumían a la perfección la jornada laboral en aquel lugar. Una forma de trabajar sistemática y eficiente, tan necesaria en el ámbito de la investigación, que fue unos de los aspectos más positivos que pude valorar durante aquella estancia.

Sin duda, esta experiencia marcó un punto de inflexión en mi carrera, pues a partir de ahí, comencé a considerar la posibilidad de iniciarme en el mundo de la investigación.

Estas primeras y efímeras sensaciones se fueron consolidando *a posteriori*, cuando unos meses después de finalizar mi estancia en tierras

nórdicas, fui contratado para trabajar en el departamento de “Terapias Experimentales” del “Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas” de Madrid (CNIO) para realizar tareas de investigación en el grupo de “Química Médica” que, por aquel entonces, dirigían los prestigiosos Dres. Paolo Pevarello y Guido Kurz.

Embarcado en un proyecto relacionado con la síntesis de compuestos inhibidores de quinasas como agentes anticancerígenos, fue en esta etapa donde mi vocación investigadora iba tomando cuerpo y haciéndose poco a poco realidad. Fue aquí donde, al trabajar en un grupo tan multidisciplinar con nacionalidades tan diversas, descubrí la gran importancia que tenía dominar el inglés como idioma de comunicación en el ámbito científico.

Partiendo de la base de que mi formación académica en el campo de los idiomas había sido predominantemente de índole francesa, no desaproveché la oportunidad que me surgió para trabajar en el reconocido “Centre for Synthesis and Chemical Biology” (CSCB) en Dublín, en un proyecto (tutelado por los Dres. O’Shea y Tacke) relacionado con la síntesis de nuevos complejos de titanio como posibles agentes anticarcinogénicos. Durante el tiempo que duró mi estancia allí, además de obtener resultados para realizar un Máster en el “University College Dublin” (UCD), pude perfeccionar mi nivel de inglés de manera considerable, aspecto fundamental cuando uno trabaja en el campo de la investigación.

Desde un punto de vista químico, en todos los proyectos en los que había estado trabajado hasta entonces, se abordaba la síntesis de compuestos orgánicos de manera convencional, es decir, utilizando metodologías convencionales propias de la química en disolución. Pero fue a raíz de una pequeña estancia de un par de meses en el departamento de Química Orgánica de la “Palaký University Olomouc” (República Checa), donde tuve mi primer contacto con la química en fase sólida y donde comencé a leer y conocer los trabajos del Prof. R. B. Merrifield en este campo.

Allí, en un proyecto dirigido por el Dr. Jan Hlaváč, pude llevar a cabo en el laboratorio mis primeras síntesis de compuestos orgánicos en fase sólida. Una disciplina que apenas había estudiado en la universidad y que jamás había abordado de manera práctica en ningún trabajo previo en el laboratorio. En aquella ocasión, fueron sintetizados compuestos orgánicos heterocíclicos nitrogenados sobre resinas de tipo Merrifield, con el objetivo de confeccionar una serie de bibliotecas utilizando la química orgánica combinatoria. Estos primeros escarceos en este campo abrieron las puertas de mi interés hacia un área intrínsecamente relacionada: la síntesis de oligonucleótidos y sus derivados.

Pasado algún tiempo, comencé a trabajar para una empresa de biotecnología ubicada en el “Parque Tecnológico de la Salud (PTS)”, en Granada, llamada “N-Life Therapeutics”, que basaba su cartera de negocio en la síntesis de oligonucleótidos modificados para su utilización en terapias antisentido aplicables a nuevos tratamientos contra enfermedades del sistema nervioso central (*CNS diseases*) tales como la enfermedad de Parkinson o Huntington.

Al inicio, mi labor se centraba en tareas de síntesis de compuestos orgánicos en disolución, pero con el tiempo fui acercándome a la síntesis de ácidos nucleicos en fase sólida, un mundo, como digo, totalmente desconocido para mí hasta aquel entonces. Fue debido a una reestructuración interna del departamento cuando la empresa decidió cambiarme de puesto, pasando a hacerme cargo del laboratorio de síntesis de oligonucleótidos.

Así, tras un completísimo período de formación bajo la supervisión de los Dres. Gabriel Alvarado y Javier Ortiz, comencé a familiarizarme con la síntesis a pequeña escala (1-2  $\mu\text{mol}$ ) de oligonucleótidos de manera automatizada y, entre otros aspectos, aprendí a manejar y utilizar un sintetizador automático en fase sólida. Durante todo el tiempo en que presté mis servicios en este laboratorio, recuerdo que se llevaron a cabo las síntesis de oligonucleótidos antisentido (ASO) candidatos a ser evaluados como agentes terapéuticos en ensayos biológicos y clínicos en fase avanzada. Estos candidatos eran oligonucleótidos monocatenarios de

tipo “*gapmer*” modificados en el extremo con moléculas como *indatralina* o *nomifensina*. Recuerdo que también se sintetizaban “*molecular probes*” marcadas con agentes fluorescentes como, entre otros, la *fluoresceína*.

Conforme pasaba el tiempo, mi interés por la química de los ácidos nucleicos iba en aumento y tanto los conocimientos como las habilidades prácticas en este campo se iban consolidando. Pero, como bien es sabido, nada dura eternamente, y mi colaboración en aquel proyecto terminó súbitamente el día en que la empresa decidió externalizar la producción de oligonucleótidos y cerrar el laboratorio de síntesis.

De este modo, así fue como el destino puso a Asturias de nuevo en mi camino y cómo surgió la oportunidad de trabajar nuevamente en la Facultad de Química de la Universidad de Oviedo, bajo la supervisión de los Dres. Susana Fernández González y Miguel Ferrero Fuertes, en un fabuloso proyecto, en colaboración con la empresa Rasayan Inc. (California, EE.UU.) a través de su Presidente el Dr. Yogesh S. Sanghvi, y directamente relacionado con el estudio de nucleósidos terapéuticos y la investigación de novedosos soportes sólidos, con enorme potencial, en la síntesis oligonucleotídica en fase sólida.

Un trabajo de investigación que ha sido finalizado durante este último año gracias a una colaboración interdepartamental entre el grupo de investigación de Química Bioorgánica de la Universidad de Oviedo y el prestigioso grupo de Química de los Ácidos Nucleicos perteneciente al Instituto de Química Avanzada de Cataluña (IQAC-CSIC), dirigido por el prestigioso investigador Prof. Ramón Eritja Casadellà, y donde he tenido la oportunidad y el inmenso honor de completar mis estudios de doctorado trabajando en su grupo. En definitiva, una fantástica línea de investigación directa e intrínsecamente relacionada con mi experiencia profesional previa, que me ofreció poder poner en valor todo el conocimiento y habilidades adquiridos para, así, poder realizar esta Tesis Doctoral que aquí presento.

Como es lógico, en un período de tiempo tan extenso, son muchas las situaciones, experiencias y momentos únicos vividos. Es mucho lo

aprendido, pero más aún lo compartido. Esto último, sin duda, lo más enriquecedor.

Un “compañero” es toda persona con la que se comparte el pan y, por ende, teniendo en cuenta que el “pan” es el sustento que nos permite hacer camino, podemos afirmar que un compañero es todo aquel que camina con nosotros hasta una meta concreta.

A punto de alcanzar ya esta meta, vuelvo la mirada sobre mis pasos y veo, en el polvo del camino, las huellas de todos los compañeros que, de un modo u otro, anduvieron conmigo en este fabuloso viaje. Es imposible recordarlos a todos, pero sé que estuvieron, están y siempre estarán. En estas líneas sólo he mencionado a unos pocos, pues sería totalmente imposible nombrarlos a todos, aunque, desde luego, su recuerdo permanece indeleble en mi memoria.

Por último, quería tener presentes en estos momentos tan emotivos, a las personas más cercanas: familiares y amigos, que nunca dudaron en tenderme una mano cuando el sendero se desvanecía detrás de la “borrina” y era imposible avanzar... A todos, gracias, por todo y, por tanto.

Finalmente, permítanme que finalice estas palabras con el recuerdo y el agradecimiento para la más bella persona a la que tuve la fortuna de conocer, una persona que estuvo ahí, al principio de todo, pero que desgraciadamente, y a mi pesar, no podrá estar al final de este viaje. Hace ya algún tiempo que nos dejó, pero su presencia aún perdura en el recuerdo y seguirá siempre viva en el corazón...

*¡Ultreia et Suseia!*





# **ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS**

---



----- *Abreviaturas y acrónimos*

2'-F-ANA	Ácido 2'-desoxi-2'-fluoro- $\beta$ -D-arabinonucleico
3TC	Lamivudina
5-FU	5-Fluorouracilo
5-IU	5-Iodouracilo
A	Adenina/Adenosina
ABI	<i>Applied Biosystems Incorporated</i>
ACN	Acetonitrilo
AcOH	Ácido acético
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADN-A	Ácido desoxirribonucleico de tipo A
ADN-B	Ácido desoxirribonucleico de tipo B
ADN-Z	Ácido desoxirribonucleico tipo Z
AIBN	2,2'-Azobis(isobutironitrilo)
ARN	Ácido ribonucleico
ARNi	ARN de interferencia
ARNm	ARN mensajero
ARNt	ARN de transferencia
AM-PS	Aminometil-poliestireno
ASO	Oligonucleótido antisentido

Abreviaturas y acrónimos -----

AU	Unidades de absorbancia
AX-HPLC	HPLC de intercambio iónico
AZT	3'-Azido-3'-desoxitimidina (zidovudina)
BMT	5-bencilmercaptotetrazol
Boc	Terc-butoxicarbonilo
BSP	Suero bovino fetal
BTT	5-benciltio-1 <i>H</i> -tetrazol (BMT)
Bz	Benzoilo
C	Citosina/Citidina
CAP	Proteína activadora de genes
CAP-A	<i>Capping reagent</i> de tipo A
CAP-B	<i>Capping reagent</i> de tipo B
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado
CNE	2-cianoetilo
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
CP	<i>Crowns-pins</i>
CPG	<i>Controlled Pore Glass</i> (Vidrio de poro controlado)
CS	<i>Core-Shell</i> (Núcleo-Cáscara)
CSN	Nanopartículas <i>Core-Shell</i>
d4T	2',3'-didehidro-3'-desoxitimidina (estavudina)
dA	2'-desoxiadenosina
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno
dC	2'-desoxicitidina

----- Abreviaturas y acrónimos

DCI	4,5-dicianoimidazol
DCM	Diclorometano
DDTT	1,4-ditiotreitol
dG	2'-desoxiguanosina
DIAD	Azodicarboxilato de diisopropilo
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropiletilamina
DMAP	<i>N,N</i> -dimetilaminopiridina
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMT	4,4'-dimetoxitritilo
DMTCI	Cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo
dN	Desoxinucleósido
DSB	Ruptura de doble hélice ( <i>double-strand break</i> )
DTNP	2,2'-ditiobis(5-nitropiridina)
dU	2'-desoxiuridina
DVB	Divinilbenceno
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EM	Espectrometría de masas
EMA	Agencia Europea del Medicamento
EMAR	Espectrometría de masas de alta resolución
equiv	Equivalentes
ESI	Ionización por pulverización de electrones
ESI <sup>+</sup>	Ionización por electrospray
ETT	5-etiltio-1- <i>H</i> -tetrazol
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>

Abreviaturas y acrónimos -----

Fmoc	Fluorenilmetiloxycarbonilo
G	Guanina/Guanosina
G <sub>4</sub>	Estructura G-cuádruplex
GE	<i>General Electric Company</i>
Gly	Glicina
HL	<i>High loading</i> (carga elevada)
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HRMS	Espectros de masa de alta resolución
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
Ibu	Isobutirilo
IC <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria media
IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
KPA	<i>Kieselguhr-polyacrylamide</i>
KCN	Cianuro de potasio
LCAA	<i>Long chain alkylamine</i>
Lev	Levulinilo
LL	<i>Low loading</i> (carga baja)
LNA	Ácido nucleico bloqueado

----- *Abreviaturas y acrónimos*

L-ON	L-oligonucleótido
Lys	Lisina
m	masa
mer	Eslabón en una cadena de oligonucleótido
MALDI	<i>Matrix-Assisted Laser</i>
MCT	5-mercaptotetrazol
MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub>	Metanol deuterado
min	minuto
MOE	Metoxietilo
MM	Masa molecular
MMT	Monometoxitritilo
Ms	Mesilo
MPPS	Aminometilo de poliestireno macroporoso
MSCl	Cloruro de mesitileno-2-sulfonilo
MSNT	Nitrotriazol de mesitileno-2-sulfonilo
MTT	5-metiltio-1- <i>H</i> -tetrazol
NDI	Diimidias de naftaleno
NMI	N-metilimidazol
NPE	1-(2-nitrofenil)etilo
NPEC	1-(2-nitrofenil)etoxicarbonil
NPT	Nitrofeniltetrazol
OD	Densidad óptica
ON	Oligonucleótido

Abreviaturas y acrónimos -----

OPC	<i>Oligonucleotide Purification Cartridge</i>
P-O	Enlace fosfato
P-S	Enlace fosforotioato
p/p	Relación de peso
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PEG	Polietilenglicol
PEGA	Polietilenglicol/dimetilacrilamida
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
P <sub>f</sub>	Punto de fusión
Phe	Fenilalanina
ppm	Partes por millón
PS	Poliestireno
Py	Piridina
PyBop	<i>(Benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate</i>
qPCR	PCR en tiempo real
R-Las	Oligonucleótido de secuencia complementaria del sitio 21-38 del ARNm de la luciferasa de renilla
R <sub>f</sub>	Factor de retención
RISC	<i>RNA Induced Silencing Complex</i>
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RNasa H	Ribonucleasa H
RPC	Cartuchos de fase reversa



----- Abreviaturas y acrónimos

RP-HPLC	HPLC en fase reversa
RT	Transcriptasa inversa
SARS-CoV-2	Coronavirus causante del síndrome respiratorio agudo severo
SSO	Splice-switching oligonucleotide
Succ	Succinilo
SVP	Fosfodiesterasa de veneno de serpiente ( <i>Crotalus adamanteus</i> )
t	tiempo
T	Timina/Timidina/Temperatura
t.a.	Temperatura ambiente
TAR	<i>Trans-activation reponse element</i>
TBA	Aptámero antitrombina
TBE	Tampón Tris-Borato-EDTA
TBS	<i>tert</i> -butildimetilsililo
TBTU	<i>2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylammonium tetrafluoroborate</i>
<sup>t</sup> BuOOH	Hidroperóxido terbutílico
TCA	Ácido tricloroacético
TEAA	Acetato de trietilamonio
TFA	Ácido trifluoroacético
THAP	2',4',6'-trihidroxiacetofenona
THF	Tetrahidrofurano
TLC	<i>Thin Layer Chromatography</i>
TOC	Cantidad de carbono total orgánico

Abreviaturas y acrónimos -----

TOF	<i>Time-Of-Flight</i> (Tiempo de vuelo)
Tol	Toluido
Ts	Tosilo
Tr	Tritilo
Tris	Trisaminometano
TRIS	Disolución tampón de tris
TSS	Sitio de inicio de la transcripción
U	Uracilo/Uridina
UNA	Ácido nucleico desbloqueado
UV	Ultravioleta
VHB	Virus de la hepatitis B
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
z	Carga
$\delta$	Desplazamiento químico
$\lambda$	Longitud de onda

# ÍNDICE

---



<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>7</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>13</b>
I.1. Estructura secundaria del ADN .....	15
I.2. Síntesis de oligonucleótidos: perspectiva histórica .....	23
I.3. El método del fosforamidito en la síntesis de oligonucleótidos ...	38
I.3.1. Química de las reacciones involucradas en el método del fosforoamidito .....	40
I.3.1.1. Etapa 1: Destritilación del nucleósido unido al soporte sólido.....	40
I.3.1.2. Etapa 2: Acoplamiento .....	41
I.3.1.3. Etapa 3: Acetilación.....	42
I.3.1.4. Etapa 4: Oxidación .....	43
I.3.2. Procesos post-sintéticos en la preparación de oligonucleótidos en fase sólida.....	44
I.3.2.1. Desprotección y liberación del soporte sólido.....	44
I.3.2.2. Purificación del oligonucleótido.....	46
i) Desalación .....	47
ii) Cartucho de fase reversa (RPC) .....	47
iii) HPLC de fase reversa (RP-HPLC) .....	48
iv) HPLC de intercambio aniónico (AX-HPLC) .....	48
v) HPLC dual .....	48
vi) Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE).....	49
I.4. Soportes sólidos en la síntesis de oligonucleótidos .....	50
I.4.1. <i>Linkers</i> .....	53
I.4.2. Soportes sólidos de CPG y poliestireno: ventajas e inconvenientes.....	56
I.4.3. Nuevos soportes sólidos.....	58
I.4.4. Resinas <i>Core-Shell</i> PS-PEG .....	60
I.5. Aplicaciones de los oligonucleótidos .....	63

**CAPÍTULO 1. SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE OLIGODESOXINUCLEÓTIDOS UTILIZANDO RESINAS DE TIPO *CORE-SHELL* ..... 65**

**Antecedentes** ..... 67

    1.1. Nanopartículas *Core-Shell* ..... 69

    1.2. Resinas *Core-Shell* de tipo PS-PEG en la síntesis de péptidos ..... 73

**Objetivos** ..... 81

**Resultados y discusión** ..... 85

    1. El Agente de Acoplamiento ..... 89

        1.1. Síntesis de 5-benciltio-1*H*-tetrazol (BTT) mediante cicloadición 1,3-dipolar ..... 93

    2. El soporte sólido ..... 95

        2.1. La difusión en soportes sólidos ..... 95

        2.2. La expansión del soporte sólido ..... 97

    3. Síntesis de oligonucleótidos en fase sólida ..... 101

        3.1. Puesta a punto del método de síntesis. Primeras secuencias con una resina universal ..... 101

        3.2. Primera aproximación sintética con resinas *Core-Shell*: síntesis manual de tetrámeros de ADN ..... 112

            3.2.1. Derivatización de las resinas *Core-Shell* y *NittoPhase* ..... 115

                a) Preparación de hemiésteres de succinilo nucleosídicos ..... 115

                b) Funcionalización de los soportes sólidos *PEG024*, *PEG029* y *NittoPhase* ..... 117

                c) Acetilación de los grupos amino e hidroxilo libres de las resinas ..... 118

                d) Detección de grupos amino libres por el método de Kaiser ..... 119

                e) Determinación de la carga inicial de las resinas derivatizadas ..... 121

            3.2.2. Síntesis manuales de tetrámeros ..... 124

3.2.3. Síntesis automatizada de oligonucleótidos de ADN de cadena larga con resinas <i>Core-Shell</i> .....	136
3.3. Síntesis de oligonucleótidos modificados.....	144
3.3.1. Síntesis en fase sólida de fragmentos protegidos de ADN utilizando resinas <i>Core-Shell</i> como soporte sólido .....	144
3.3.2. Síntesis de oligonucleótidos conjugados con ácidos grasos.....	160
<b>Conclusiones</b> .....	171
<b>Parte experimental</b> .....	175
1. Condiciones de trabajo, disolventes y reactivos.....	177
2. Instrumentación.....	179
3. Procedimientos experimentales.....	180
4. Datos experimentales .....	195
<b>CAPÍTULO 2. SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS DEL TIPO G-CUÁDRUPLEX CON L-NUCLEÓSIDOS EN POSICIÓN 3' .....</b>	
	<b>201</b>
<b>Antecedentes</b> .....	203
2.1. L-Nucleósidos .....	205
2.1.1. Aspectos históricos .....	206
2.1.2 Actividad biológica de los L-nucleósidos: antivirales terapéuticos y agentes antitumorales .....	208
2.2. L-Oligonucleótidos.....	210
2.2.1. Aspectos históricos .....	212
2.2.2. Actividad biológica de los L-oligonucleótidos: <i>spiegelmers</i> y otras aplicaciones en biología molecular .....	214
2.3. G-cuádruplexes como agentes terapéuticos .....	218
<b>Objetivos</b> .....	227
<b>Resultados y discusión</b> .....	231
1. Síntesis de los derivados 2'- <i>O</i> -metil /2'- <i>O</i> -MOE-L-nucleósidos ...	233

Índice -----

1.1. Síntesis de $O^{2,2'}$ -anhidro-L-uridina .....	233
1.2. Síntesis de 2'- <i>O</i> -metil-L-uridina.....	234
1.3. Síntesis de 2'- <i>O</i> -metoxietil-L-uridina .....	234
2. Síntesis de soportes sólidos funcionalizados con monómeros de 2'- <i>O</i> -metil/2'- <i>O</i> -MOE-L-uridina .....	235
2.1. Protección de la posición 5' de los derivados de L-uridina con DMT.....	236
2.2. Acoplamiento del grupo succinilo en la posición 3' de los L-nucleósidos.....	236
2.3. Funcionalización del soporte sólido con los derivados L-nucleosídicos.....	237
2.4. Síntesis de fosforamiditos a partir de derivados L-nucleosídicos.....	238
3. Síntesis y caracterización de G-cuádruplexes funcionalizados en el extremo 3' con 2'- <i>O</i> -metil/2'- <i>O</i> -MOE-L-uridina.....	239
3.1. Síntesis en fase sólida de los oligonucleótidos TG <sub>4</sub> T, TG <sub>4</sub> U <sub>OMe</sub> , TG <sub>4</sub> <sup>L</sup> U <sub>OMe</sub> y TG <sub>4</sub> <sup>L</sup> U <sub>OMOE</sub> .....	239
3.2. Procesado y cuantificación de TG <sub>4</sub> T, TG <sub>4</sub> U <sub>OMe</sub> , TG <sub>4</sub> <sup>L</sup> U <sub>OMe</sub> y TG <sub>4</sub> <sup>L</sup> U <sub>OMOE</sub> .....	241
3.3. Caracterización de los oligonucleótidos TG <sub>4</sub> T, TG <sub>4</sub> U <sub>OMe</sub> , TG <sub>4</sub> <sup>L</sup> U <sub>OMe</sub> y TG <sub>4</sub> <sup>L</sup> U <sub>OMOE</sub> .....	242
3.4 Tratamiento térmico de los oligonucleótidos TG <sub>4</sub> T, TG <sub>4</sub> U <sub>OMe</sub> , TG <sub>4</sub> <sup>L</sup> U <sub>OMe</sub> y TG <sub>4</sub> <sup>L</sup> U <sub>OMOE</sub> .....	247
3.5. Formación y caracterización de estructuras G-cuádruplex .....	248
4. Estudio de la estabilidad frente a nucleasas de G-cuádruplexes funcionalizados con 2'- <i>O</i> -metil/2'- <i>O</i> -MOE-L-uridina en el extremo 3'.....	257
<b>Conclusiones</b> .....	265
<b>Parte experimental</b> .....	269
1. Condiciones de trabajo, disolventes y reactivos .....	271
2. Instrumentación.....	271



————— ----- *Índice*

3. Procedimientos experimentales.....	272
4. Datos experimentales .....	277



# **RESUMEN**



Los oligonucleótidos terapéuticos son pequeños fragmentos de ácido nucleico (ADN o ARN) capaces de unirse específicamente al ARN y modular su función. Esta capacidad abre la posibilidad de utilizarlos como fármacos por medio de diversos mecanismos de acción. Estos fármacos han sido objeto de investigación durante varias décadas y se han utilizado para tratar enfermedades raras y comunes.

La síntesis química de oligonucleótidos se lleva a cabo en el laboratorio, habitualmente, mediante síntesis en fase sólida, utilizando como fragmentos de construcción fosforamiditos protegidos de nucleósidos naturales o químicamente modificados. Los factores limitantes de la eficacia del proceso son: la obtención de rendimientos bajos en alguna de las etapas, la aparición de reacciones secundarias indeseadas y las características fisicoquímicas de la resina soporte empleada, de las cuales dependen factores tan cruciales como su capacidad de carga, entre otros.

Esta Tesis Doctoral está dividida en dos capítulos, en cada uno de los cuales se aborda el estudio de diferentes aspectos en la síntesis de oligonucleótidos desde una perspectiva sintética y estructural, mostrando en algún caso sus propiedades biológicas.

El primer capítulo está relacionado con el desarrollo de soportes sólidos altamente eficientes y económicos, que sigue siendo un importante desafío en el campo de la síntesis en fase sólida de ácidos nucleicos. Dado que los actuales soportes comerciales son muy costosos, las nuevas resinas *Core-Shell* se presentan como una alternativa interesante. Estas resinas, constituidas por gránulos poliméricos de tipo núcleo-carcasa en las que los grupos funcionales aparecen distribuidos en la superficie exterior, evitan los problemas de difusión de las resinas convencionales de tipo vidrio de poro controlado (CPG) o poliestireno (PS), ofreciendo así una mayor accesibilidad tanto para disolventes como para reactivos. Hasta ahora, este

tipo de resinas sólo habían sido utilizadas en la síntesis de péptidos y se carecía de una evaluación de las mismas en la síntesis de oligonucleótidos.

Se estudió la utilización de dos resinas *Core-Shell* de tipo PS-PEG denominadas PEG024 y PEG029 en la preparación de manera manual de varios dímeros, trímeros y tetrámeros. Tras encontrar las condiciones óptimas, se llevó a cabo la síntesis automatizada de oligonucleótidos de secuencia más larga, tales como el aptámero 16-mer TBA (*Trombin Binding Aptamer*) y el fosforotioato antisentido R-Las (*Renilla Luciferase Antisense*). Los resultados obtenidos permitieron demostrar la aplicabilidad de las resinas *Core-Shell* para la preparación de oligonucleótidos en fase sólida. El estudio se completó mediante la síntesis de fragmentos protegidos de ADN, así como de ciertos conjugados lipídicos y ácidos nucleicos ricos en guanina capaces de conformar estructuras de tipo G-cuádruplex.

En el segundo capítulo, se describen las síntesis y el estudio comparativo de las propiedades de oligonucleótidos G-cuádruplexes que contienen L-nucleósidos (<sup>L</sup>U) en el extremo 3' y grupos OMe u OMOE en la posición 2'.

Un G-cuádruplex es una estructura tridimensional constituida por cuatro hebras de ADN, que se forma al unirse cuatro oligonucleótidos ricos en guanina mediante puentes de hidrógeno de tipo Hoogsteen. La unión de cuatro guaninas forma una superficie o unidad plana denominada tétrada.

En primer lugar, se sintetizaron los oligonucleótidos en un sintetizador automático utilizando una resina CPG como soporte sólido. A continuación, se llevó a cabo la formación de las estructuras G-cuádruplex mediante tratamiento térmico de las muestras y posterior enfriamiento utilizando dos tipos de buffers (Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>). Los ensayos realizados para los estudios de estabilidad (dicroísmo circular, cálculo de T<sub>m</sub>, degradación enzimática con fosfodiesterasas y electroforesis de tipo PAGE) determinaron que las modificaciones introducidas proporcionaron una gran estabilidad a las estructuras G-cuádruplexes formadas.

Parte de los resultados obtenidos a lo largo de esta Tesis Doctoral han sido publicados en el siguiente artículo:

“Synthesis of 2’-*O*-Methyl/2’-*O*-MOE L-Nucleoside Derivatives and Their Applications: Preparation of G-Quadruplexes, Their Characterization, and Stability Studies.” V. Martín-Nieves, L.-M. Menéndez-Méndez, C. Fàbrega, S. Fernández, Y. S. Sanghvi, M. Ferrero, R. Eritja. *ACS Omega*, **2023**, 8, 44893-44904.





## **SUMMARY**



Therapeutic oligonucleotides are small fragments of nucleic acid (DNA or RNA) capable of specifically binding to RNA and modulating its function. This ability opens the possibility of using them as drugs through a variety of mechanisms of action. These drugs have been the subject of research for several decades and have been used to treat rare and common diseases.

Chemical synthesis of oligonucleotides is usually carried out in the laboratory by solid-phase synthesis using natural or chemically modified nucleoside-protected phosphoramidites as building blocks. The limiting factors for the efficiency of the process are: low yields in some of the steps, undesired side reactions, and the physicochemical characteristics of the support resin used, on which crucial factors such as its loading capacity, among others, depend.

This Doctoral Thesis is divided into two chapters, each of which deals with the study of different aspects of oligonucleotide synthesis from a synthetic and structural perspective, showing in some cases their biological properties.

The first chapter is related to the development of highly efficient and cost-effective solid supports, which remains a major challenge in the field of solid-phase synthesis of nucleic acids. As the current commercial supports are very expensive, the new *Core-Shell* resins present themselves as an interesting alternative. These resins, consisting of polymeric granules in which the functional groups are distributed on the outer surface, avoid the diffusion problems of conventional controlled pore glass (CPG) or

## Summary -----

polystyrene (PS) resins, thus offering greater accessibility for both solvents and reagents. Until now, these types of resins have only been used in peptide synthesis and there was a lack of evaluation of these resins in oligonucleotide synthesis.

The use of two PS-PEG-type *Core-Shell* resins, named PEG024 and PEG029, was studied in the manual preparation of several dimers, trimers, and tetramers. After finding the optimal conditions, automated synthesis of longer sequence oligonucleotides, such as the 16-mer TBA (Trombin Binding Aptamer) and the antisense phosphorothioate R-Las (Renilla Luciferase Antisense), was carried out. The results obtained demonstrated the applicability of these *Core-Shell* resins for the preparation of solid-phase oligonucleotides. The study was completed by the synthesis of protected DNA fragments, as well as certain lipid conjugates and guanine-rich nucleic acids capable of forming G-quadruplex structures.

In the second chapter, the synthesis and comparative study of the properties of G-quadruplex oligonucleotides containing L-nucleosides (<sup>L</sup>U) at the 3'-end and OMe or OMOE groups at the 2'-position are described.

A G-quadruplex is a three-dimensional structure consisting of four strands of DNA, which is formed when four guanine-rich oligonucleotides are joined together by Hoogsteen-type hydrogen bridges. The joining of four guanines forms a flat surface unit called a tetrad.

First, oligonucleotides were synthesized in an automatic synthesizer using a CPG resin as a solid support. Then, the formation of the G-quadruplex structures was carried out by heat treatment of the samples and subsequent cooling using two types of buffers (Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup>). The tests performed for stability studies (circular dichroism, T<sub>m</sub> calculation, enzymatic degradation with phosphodiesterases, and PAGE-type electrophoresis) determined that the modifications introduced provided high stability to the G-quadruplex structures formed.

----- *Summary*

Part of the results obtained throughout this doctoral thesis have been published in the following article:

“Synthesis of 2’-*O*-Methyl/2’-*O*-MOE L-Nucleoside Derivatives and Their Applications: Preparation of G-Quadruplexes, Their Characterization, and Stability Studies.” V. Martín-Nieves, L.-M. Menéndez-Méndez, C. Fàbrega, S. Fernández, Y. S. Sanghvi, M. Ferrero, R. Eritja. *ACS Omega*, **2023**, 8, 44893-44904.



# **INTRODUCCIÓN**

---





## I.1. Estructura secundaria del ADN

La aparente simplicidad del ADN de doble hélice, el icono de la biología molecular, es engañosa.

Además de la doble hélice descrita por Watson y Crick (ADN-B), el ADN puede plegarse en otras estructuras secundarias diferentes tanto intermoleculares como intramoleculares (Figura 1). Aunque durante mucho tiempo se pensó que muchas de estas estructuras eran artefactos *in vitro*, la bioinformática demuestra que las secuencias de ADN capaces de formar estas estructuras se conservan a lo largo de la evolución, lo que sugiere la existencia de ADN de forma no B *in vivo*. Así mismo, los genes que promueven la formación o resolución de estas estructuras se encuentran en diversos organismos y varias investigaciones en el campo sugieren que la resolución de las estructuras secundarias del ADN es crítica para la integridad del genoma. Si bien la arquitectura de sus hebras antiparalelas sigue siendo la misma, las sutiles variaciones conformacionales que se pueden presentar son lo suficientemente importantes como para garantizar su reconocimiento por otras moléculas.

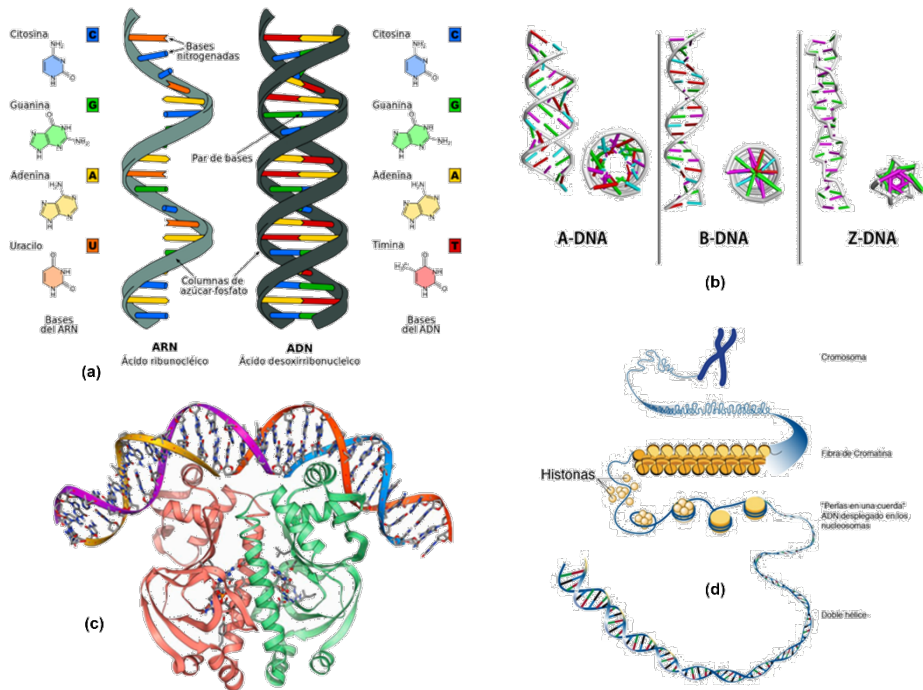
Estas variaciones estructurales son críticas, especialmente para el reconocimiento fiable entre el ADN y las proteínas, que es condición indispensable en procesos esenciales tales como la replicación, la transcripción y la compactación de la cromatina del ADN.

Los cambios conformacionales locales inducidos por interacciones con otras moléculas pueden dejar la estructura del ADN inalterada; es decir, en forma de doble hélice recta (Figura 1a), o introducir curvas y torceduras dentro de la doble hélice, como en los complejos de la proteína activadora de genes y el ADN (CAP/ADN)<sup>1</sup> dependientes de la secuencia (Figura 1c) o en el ADN enrollado alrededor de los núcleos de las histonas<sup>2</sup> (Figura 1d).

---

<sup>1</sup> S. C. Schultz, G. C. Shields, T. A. Steitz. *Science* **1991**, 253, 1001-1007.

<sup>2</sup> K. Luger, A. W. Mader, R. K. Richmond, D. F. Sargent, T. J. Richmond. *Nature* **1997**, 389, 251-260.

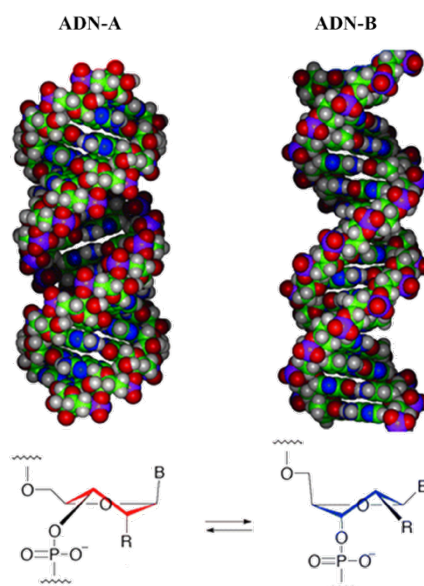


**Figura 1.** Estructuras secundarias de ADN y ARN. Diferentes variaciones estructurales: (a) estructuras canónicas de hélice monocatenaria del ARN y bicatenaria del ADN; (b) distintos tipos de doble hélice adoptada por el ADN; (c) estructura del complejo CAP-ADN; (d) plegamiento y empaquetamiento de las cadenas de ADN alrededor de los núcleos de las histonas.

La resolución refinada de la estructura del ADN, basada en la cristalografía de rayos X, ha demostrado que existe una variación considerable de la estructura helicoidal del ADN dependiente de la secuencia, y se ha vuelto cada vez más claro que el ADN puede adoptar una variedad de conformaciones alternativas basadas en motivos de secuencias particulares e interacciones con varias proteínas. Estas estructuras secundarias de tipo no B incluyen estructuras como ADN-A, ADN-Z, estructuras cruciformes, tríplex y G-cuádruplex (estructuras G4),

que fueron caracterizadas originalmente *in vitro* utilizando técnicas biofísicas como, por ejemplo, el dicroísmo circular.<sup>3</sup>

En el ADN-B, las dos hebras del dúplex son antiparalelas y los nucleótidos dispuestos en una orientación de 5' a 3' en una hebra se alinean con los nucleótidos complementarios en la orientación de 3' a 5' de la hebra opuesta. Estas interacciones se estabilizan mediante enlaces de hidrógeno, apilamiento  $\pi$ - $\pi$  e interacciones hidrofóbicas.<sup>4</sup> Según las reglas de Chargaff, las dos cadenas emparejarán adenina (A) con timina (T) y guanina (G) con citosina (C), dando lugar a la formación de dos enlaces de hidrógeno entre A y T y tres entre G y C (Figura 2).



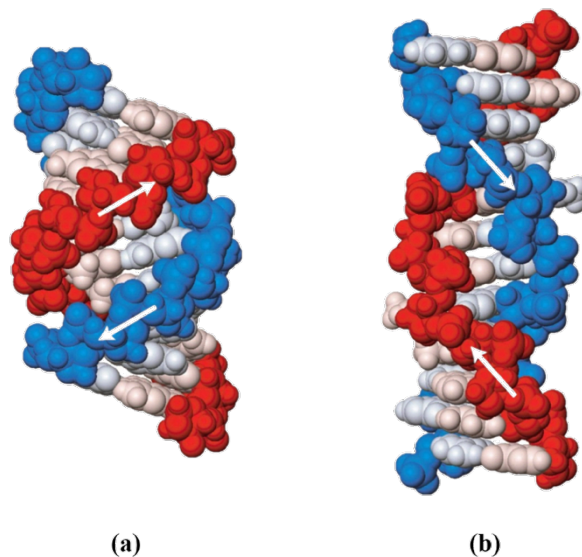
**Figura 2.** Comparación de las estructuras de doble hélice del ADN-A y ADN-B. Ambas estructuras se diferencian principalmente en la conformación del anillo de desoxirribosa: (i) en el ADN-A la conformación endo se presenta en el carbono C3', mientras que (ii) en el ADN-B esta conformación corresponde al C2'.<sup>5</sup>

<sup>3</sup> J. Kypr, I. Kejnovska, D. Renciuik, M. Vorlickova. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 1713-1725.

<sup>4</sup> a) J. D. Watson, F. H. Crick. *Nature* **1953**, *171*, 737-738; b) J. D. Watson, F. H. Crick. *Nature* **1953**, *171*, 964-967.

<sup>5</sup> L. C. Bock, L. C. Griffin, J. A. Latham, E. H. Vermaas, J. J. Toole. *Nature* **1992**, *335*, 564-566.

El ADN-A es un tipo estructural de ADN diferente al modelo propuesto por Watson y Crick (ADN-B) y que se forma en condiciones de escasa humedad y menor temperatura; es decir, en condiciones creadas de manera artificial. Se trata de una doble hélice dextrógira bastante similar a la forma más común de ADN-B, pero con una estructura helicoidal más corta y compacta cuyos pares de bases no son perpendiculares al eje de hélice como en el ADN-B, sino que se alejan del eje central y se acercan al surco principal. El resultado es una hélice en forma de cinta con un núcleo cilíndrico más abierto en forma de A (Figura 1b). La principal diferencia entre el ácido nucleico en forma A y en forma B está en la conformación del anillo de azúcar de desoxirribosa, que se encuentra en la conformación C3' endo en la forma A, mientras que está en la conformación C2' endo para la forma B (Figura 2).<sup>6</sup>



**Figura 3.** Estructuras de la doble hélice del ADN-A (a) y ADN-Z (b).

Por otro lado, a diferencia del ADN de tipos A y B, el ADN-Z es una hélice levógira<sup>7</sup> con fragmentos de purinas y pirimidinas alternas. El superenrollamiento negativo estabiliza la formación de ADN-Z en

<sup>6</sup> T. Imanishi, S. Obika. *Chem. Commun.* **2002**, 1653-1659.

<sup>7</sup> R. V. Gessner, C. A. Frederick, G. J. Quigley, A. Rich, A. H. Wang. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 7921-7935.

condiciones fisiológicas salinas<sup>8</sup> y se plantea la hipótesis de que el ADN-Z alivia el estrés torsional inducido en el proceso de transcripción.<sup>9</sup> Los motivos de ADN-Z están estrechamente asociados con los sitios de inicio transcripcionales en los genomas de eucariotas<sup>10</sup> y pueden causar inestabilidad en ellos (Figura 3).

El superenrollamiento negativo también puede hacer que el ADN-B adopte una estructura secundaria cruciforme de cuatro brazos<sup>11</sup> (Figura 4a). Estas estructuras requieren repeticiones invertidas mayores o iguales a seis nucleótidos (motivo cruciforme) para formarse, y tales motivos se encuentran cerca de orígenes de replicación, uniones de punto de ruptura y promotores de diversos organismos.<sup>12,13</sup>

El ADN tríplex de tres cadenas (Figura 4b) se forma cuando el ADN monocatenario establece enlaces de hidrógeno de Hoogsteen en el surco principal del ADN-B bicatenario rico en purinas.<sup>14</sup> Los tríplex en los que la tercera cadena es antiparalela al ADN dúplex pueden formarse a pH fisiológico, y estas estructuras se estabilizan mediante superenrollamiento negativo.<sup>15</sup> Las secuencias capaces de formar tríplex son comunes en los eucariotas, pero mucho más raras en los procariotas.<sup>16</sup> En los mamíferos, los motivos formadores de tríplex están presentes en los intrones de una variedad de genes esenciales, incluidos los implicados en el desarrollo y la señalización.<sup>17</sup> Además, se cree que los tríplex causan inestabilidad

---

<sup>8</sup> A. R. Rahmouni, R. D. Wells. *Science* **1989**, *246*, 358-363.

<sup>9</sup> S. C. Ha, K. Lowenhaupt, A. Rich, Y. G. Kim, K. K. Kim. *Nature* **2005**, *437*, 1183-1186.

<sup>10</sup> G. P. Schroth, P. J. Chou, P. S. Ho. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 11846-11855.

<sup>11</sup> E. Palecek. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1991**, *26*, 151-226.

<sup>12</sup> C. E. Pearson, H. Zorbas, G. B. Price, J. Zannis. *Cell Biochem.* **1996**, *63*, 1-22.

<sup>13</sup> K. van Holde, J. Zlatanova. *Bioessays* **1994**, *16*, 59-68.

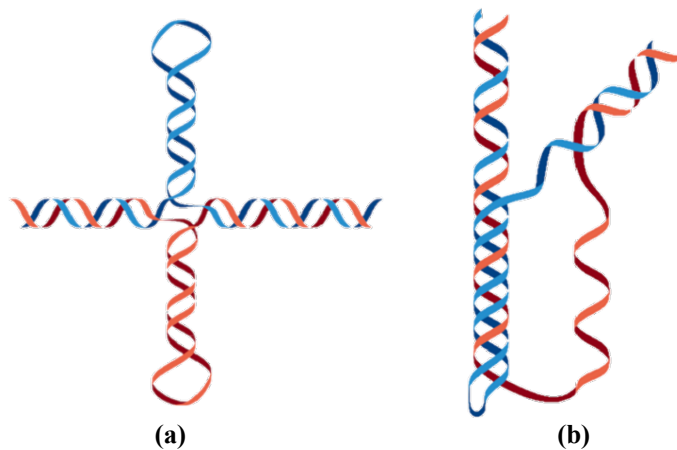
<sup>14</sup> B. A. L. Owen, Z. Yang, M. Lai, M. Gajec, J. D. Badger II, J. J. Hayes, W. Edelmann, R. Kucherlapati, T. M. Wilson, C. T. McMurray. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2005**, *12*, 663-670.

<sup>15</sup> A. Jain, G. Wang, K. M. Vasquez. *Biochimie* **2008**, *90*, 1117-1130.

<sup>16</sup> H. Manor, B. S. Rao, R. G. Martin. *J. Mol. Evol.* **1988**, *27*, 96-101.

<sup>17</sup> A. Bacolla, J. R. Collins, B. Gold, N. Chuzhanova, M. Yi, R. M. Stephens, S. Stefanov, A. Olsh, J. P. Jakupciak, M. Dean, R. A. Lempicki, D. N. Cooper, R. D. Wells. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 2663-2675.

genómica al causar roturas de doble cadena que resultan en translocaciones.<sup>18</sup>



**Figura 4.** Posibles conformaciones adoptadas por la doble hélice de ADN: (a) ADN cruciforme; (b) conformación de triplex.<sup>19</sup>

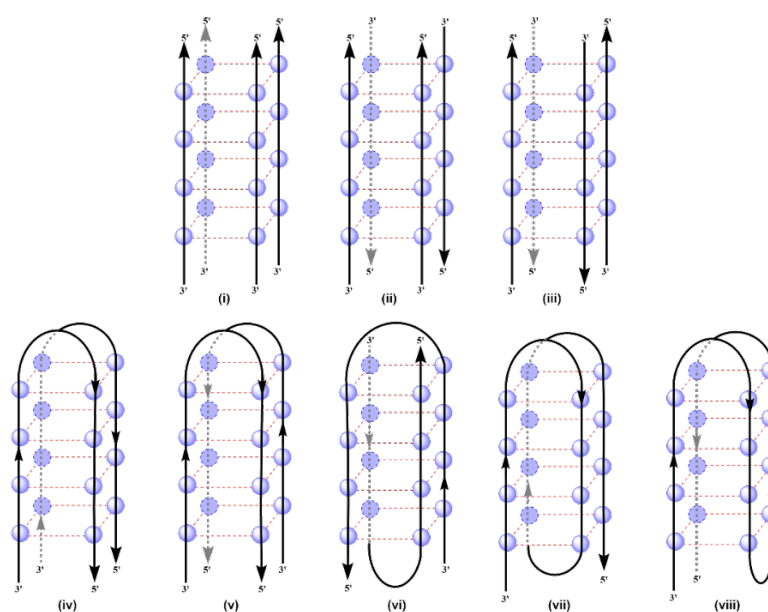
Por último, las estructuras de tipo G-cuádruplex (estructuras G4) son conformaciones secundarias de ADN estables que pueden formarse a partir de motivos que contienen fragmentos de guaninas en tándem. Las guaninas se unen mediante enlaces de hidrógeno de tipo Hoogsteen en una disposición plana, denominadas tétradas, y formando pilas conectadas por bucles de ADN monocatenarios. Una o más tétradas se pueden superponer por apilamiento  $\pi$ - $\pi$  formando la arquitectura de un G-cuádruplex. En la cavidad central de cada tétrada normalmente se encuentran iones metálicos catiónicos que proporcionan mayor estabilización a toda la estructura. Las cadenas de ADN pueden ser paralelas o antiparalelas y las estructuras G4 pueden formarse intra o intermolecularmente (Figura 5).<sup>20</sup>

La evidencia acumulada apunta ahora hacia la existencia de estas estructuras en condiciones fisiológicamente relevantes y se sabe que todas ellas tienen actividades funcionales *in vivo*.

<sup>18</sup> X. Wang, J. E. Haber. *PLoS Biol.* **2004**, *2*, e21.

<sup>19</sup> M. L. Bochman, K. Paeschke, V. A. Zakian. *Nat. Rev. Genet.* **2012**, *13*, 770-780.

<sup>20</sup> H. Inagaki, T. Ohye, H. Kogo, T. Kato, H. Bolor, M. Taniguchi, T. H. Shaikh, B. S. Emanuel, H. Kurahashi. *Genome Res.* **2009**, *19*, 191-198.

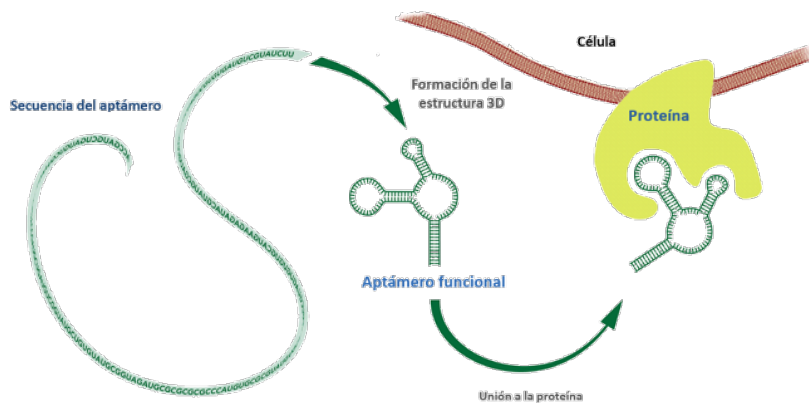


**Figura 5.** Estructuras G-cuádruplex ( $G_4$ ) de ADN. Los diagramas de i a vi representan estructuras de G-cuádruplex intermoleculares, mientras que los diagramas vii y viii representan estructuras intramoleculares. Las primeras muestran interacciones entre cuatro (i, ii y iii) o dos cadenas (iv, v, vi). Las flechas indican la dirección 3'-5' de las cadenas de ADN.

Los ácidos nucleicos también pueden interactuar con las proteínas a través de la formación de estructuras secundarias tridimensionales, una propiedad que también se está explotando terapéuticamente. Por ejemplo, los aptámeros,<sup>21</sup> ácidos nucleicos (de tipo ADN o ARN) de cadena sencilla y pequeño tamaño, de 15 a 80 nucleótidos de longitud, y con una región central variable que les permite adoptar estructuras tridimensionales únicas, posibilitando la interacción de forma específica y con alta afinidad con sus moléculas diana y, eventualmente, modulando su actividad (Figura 6). Sus usos potenciales abarcan, entre otros, el diagnóstico de enfermedades, el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos, la detección de riesgos alimentarios, la producción de biosensores, la detección de

<sup>21</sup> T. Hermann, D. J. Patel. *Science*. **2000**, 287, 820-825.

toxinas, el transporte de fármacos en el organismo y la señalización de nanopartículas.



**Figura 6.** Diagrama esquemático de la unión de un aptámero a su diana específica.

Por otro lado, aunque la alta estabilidad térmica de las estructuras G4 es potencialmente un impedimento para las transacciones del ADN, el interés en las estructuras G4 ha aumentado en los últimos años debido a sus propiedades físicas únicas y a la presencia de secuencias ricas en G en regiones biológicamente funcionales de muchos genomas. Por ejemplo, las regiones ricas en G con el potencial para formar estructuras G4 (motivos G4) están sobrerrepresentadas en telómeros, en sitios de ruptura de doble cadena mitótica y meiótica (DSB) y en sitios de inicio transcripcionales (TSS; a menudo cerca de promotores). Estos hallazgos sugieren múltiples papeles para las estructuras G4. Además, trabajos recientes sugieren que la falta de resolución de estructuras de ADN no canónicas hace que los motivos de secuencia sean capaces de formar puntos calientes estructurales que contribuyen a la inestabilidad genómica.



## **I.2. Síntesis de oligonucleótidos: perspectiva histórica**

Históricamente, un oligonucleótido se ha definido como un fragmento corto de ácido nucleico de menos de 50 nucleótidos de longitud. Sin embargo, en los últimos años el significado se ha ampliado hasta incluir a todos los ácidos nucleicos sintetizados químicamente, sin tener en cuenta su longitud.

Para hacerse una idea de la importancia que este tipo de moléculas tiene en la actualidad, y de por qué los investigadores se han interesado tanto en sintetizarlas, sería necesario remontarse a la década de 1950 y presentar una crónica condensada de las contribuciones científicas que condujeron específicamente al lanzamiento de la síntesis de estos compuestos.

Aunque la composición general de los ácidos nucleicos y su función biológica como portadores del código genético se conocía a mediados de la década de 1940, fue el artículo histórico publicado por Watson y Crick en 1953, que describe la estructura de doble hélice del ADN,<sup>4</sup> el que reveló el vínculo entre la química de la genética y su resultado biológico.

Si bien la industria biotecnológica surgió a raíz del creciente conocimiento a nivel molecular de los sistemas biológicos, fue impulsada, en última instancia, por el desarrollo de herramientas precisas. Concretamente, fue la capacidad de simular y modificar sistemas biológicos, a través de herramientas como la síntesis de proteínas recombinantes y técnicas de clonación, lo que permitió a la ciencia crear nuevas biomoléculas.

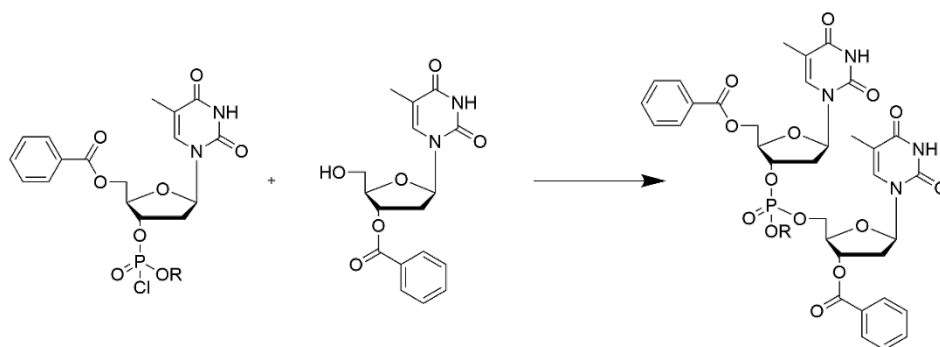
Debido a que su química era algo más simple, la síntesis de péptidos se desarrolló más rápido que la de los oligonucleótidos. En consecuencia, los sintetizadores de péptidos fueron los primeros sistemas automatizados disponibles. Vega Biotechnologies fue pionera en este campo y también introdujo el primer sintetizador de ADN, que, aunque utilizaba química actualmente obsoleta, marcó el primer intento de hacer que la síntesis de oligonucleótidos estuviera fácilmente disponible para los laboratorios de investigación.

Sin embargo, la accesibilidad general a este tipo de química requeriría muchos avances antes de que la síntesis automatizada de oligonucleótidos fuese una realidad. El comienzo de la era de la investigación del genoma humano se remonta a la colaboración entre el profesor Marvin Caruthers de la Universidad de Colorado y el profesor Leroy Hood de CalTech, cuando se propusieron automatizar la nueva síntesis química de oligonucleótidos utilizando los fosforamiditos de Caruthers. Esta colaboración, que originó la creación de Applied Biosystems Incorporated (ABI), permitió la comercialización del primer sintetizador de ADN de fosforamidito a principios de la década de 1980. De esta forma, muchos laboratorios tuvieron acceso rutinario a oligonucleótidos, lo cual fue crítico para avanzar en la comprensión general de los sistemas biológicos. Así nació la biología molecular, el área de la ciencia que investiga la interconexión entre la biología y la química.

Era natural, pues, que los químicos tuvieran enseguida interés en tratar de sintetizar algunas de las macrobiomoléculas recién descritas: proteínas y ácidos nucleicos. Consecuentemente, en 1955, Michelson y Todd fueron autores del primer estudio publicado de la síntesis química dirigida de un oligonucleótido en sentido 3'-5'. Así, describieron<sup>22</sup> la preparación de un dinucleótido de timidina, en el que el enlace fosfato entre los dos nucleósidos se hizo preparando primero el cloruro de fosforilo en la posición 3' de una timidina protegida con benzoilo en 5' y utilizando dicloruro de fenilfosforilo como agente fosforilante. A la molécula resultante se le hizo reaccionar con el hidroxilo libre de la posición 5' de una timidina protegida en la posición 3' (Esquema 1). La reacción tuvo lugar, aunque muy lentamente. Además, el intermedio cloruro de fosforilo no era muy estable, siendo susceptible de hidrólisis.

---

<sup>22</sup> A. M. Michelson, A. R. Todd. *J. Chem. Soc.* **1955**, 2632-2638.



**Esquema 1.** Método del oxiclورو de fósforo descrito por Michelson y Todd.

Los nuevos retos en la síntesis de oligonucleótidos se centrarían en la protección y desprotección selectiva de los múltiples centros reactivos presentes en los desoxirribonucleósidos.

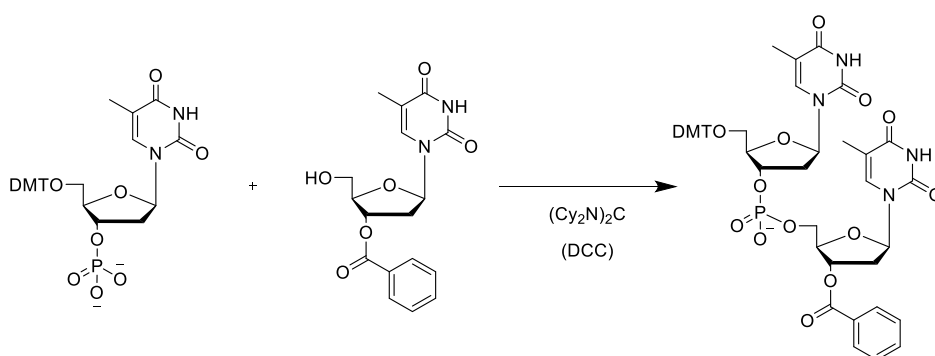
Estos retos fueron resueltos de manera satisfactoria por un investigador creativo, con visión de futuro, llamado H. Gobind Khorana y su grupo de colaboradores<sup>23</sup> de la Universidad de Chicago, quienes, a finales de la década de 1950, se interesaron por la síntesis de oligonucleótidos e introdujeron varios grupos protectores como los tritilos (para hidroxilos primarios) y los benzoilos e isobutirilos (para las aminas exocíclicas), así como dos conceptos nuevos en el campo: el esquema de protección on-off y el uso de un nucleósido fosforilado estable que se acoplaba al nucleósido deseado cuando este era activado. Ambos conceptos hicieron posible la síntesis de oligonucleótidos más largos.

Curiosamente, el primero de ellos, necesario para la síntesis secuencial de oligonucleótidos, todavía sigue siendo utilizado hoy en día por los químicos que trabajan en el campo, sin apenas modificaciones respecto a las publicaciones iniciales de Khorana.

El segundo concepto, el uso de un nucleósido fosforilado estable, denominado método del fosfodiéster en la síntesis de oligonucleótidos, ya

<sup>23</sup> H. Schaller, G. Weimann, B. Lerch, H. G. Khorana. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 3821-3827.

que después de la condensación se forma un fosfodiéster (Esquema 2), fue utilizado con éxito en el ensamblaje de un gen sintético<sup>24</sup> y sigue el mismo esquema hoy en día, con la excepción de la adición de un paso de oxidación.



**Esquema 2.** Método de acoplamiento del fosfodiéster descrito por Khorana.

En este protocolo, en lugar del cloruro de fosforilo hidrolizable, se emplean 3' fosfatos de nucleósidos protegidos en 5', usando fosforocloridatos que se hidrolizan luego al fosfomonoéster. A continuación, estos fosfatos se activan utilizando un reactivo de condensación, como la *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC), para acoplarse al hidroxilo 5' libre de otro nucleósido protegido en 3'. Este método fue revolucionario en su momento y produjo una hazaña verdaderamente notable: la síntesis de una molécula activa de 72-mer de ARNt.<sup>25</sup>

Debido a que el fosfato en sí no estaba protegido, este método tenía un punto débil y presentaba importantes deficiencias al producirse con frecuencia la ramificación en los enlaces de fosfato internucleotídico de los acoplamientos anteriores. Como resultado, fue necesario seguir un proceso de purificación de varios pasos muy arduo, en el que se eliminaban

<sup>24</sup> H. G. Khorana. *Science* **1979**, 203, 614-625.

<sup>25</sup> K. L. Agarwal, H. Büchi, M. H. Caruthers, N. Gupta, H. G. Khorana, K. Kleppe, T. Yamada. *Nature* **1970**, 227, 27-34.

los fragmentos ramificados. Sin embargo, a medida que aumentaba la longitud del oligonucleótido, el porcentaje de ramificación también aumentaba, lo que hacía que la purificación fuera aún más difícil. La química de la fase en disolución hizo que el proceso fuera muy lento, porque el oligonucleótido tenía que purificarse o precipitarse entre las distintas etapas de la síntesis para eliminar el exceso de reactivos. Cuando se considera la magnitud de la tarea, el logro de preparar una molécula activa de ARNt es mucho más notable.

Sin embargo, la contribución más duradera de Khorana fue en el área de los grupos protectores de nucleósidos, la mayor parte de los cuales siguen estando en uso actualmente.

La clave para desarrollar una síntesis eficiente, cíclica y gradual es disponer de un buen grupo protector que permita su eliminación selectiva de manera específica y cuantitativa en el momento adecuado. De lo contrario, el rendimiento del producto deseado será bajo y muy difícil de aislar de los subproductos. Para elevar aún más el listón, las purinas son susceptibles a la depurinación en condiciones de acidez leve a moderada (pH 4-5 durante períodos prolongados y pH 1-3 durante períodos bastante cortos), por lo que se debe evitar el uso de ácidos fuertes.

La solución que Khorana propuso para la protección del hidroxilo en posición 5', el grupo protector de dimetoxitritilo (DMT),<sup>26</sup> sigue estando omnipresente en la química de oligonucleótidos de hoy en día. La combinación de una buena estabilidad general y la fácil eliminación con ácido en condiciones suaves han sido factores clave. Existen otras opciones disponibles, como los grupos levulinilo y Fmoc, pero ninguna es tan popular como la exclusiva familia del tritilo.

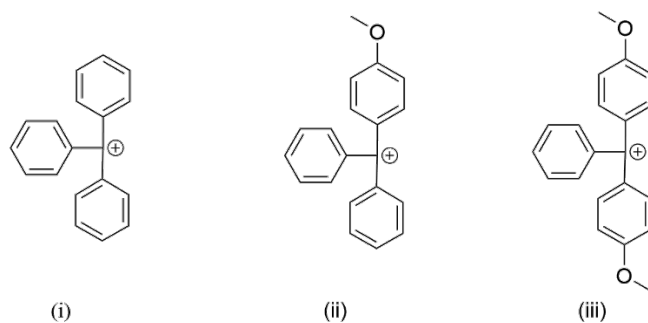
La razón por la que este éter de trifenilmetano se escinde tan fácil en condiciones ácidas, radica en el hecho de que es una de las pocas moléculas a las que le gusta formar un carbocatión. El enlace posterior del sistema de

---

<sup>26</sup> M. Smith, D. H. Rammler, I. H. Goldberg, H. G. Khorana. *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *84*, 430-440.

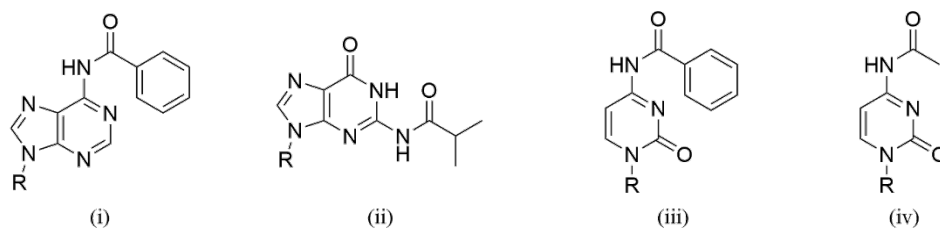
nubes de electrones  $\pi$  formado por los tres grupos fenilo es suficiente para que el carbono metílico permanezca estable como una especie cargada positivamente en condiciones ligeramente ácidas.

Además, al igual que muchos otros carbocationes, los tritilos tienen un color distintivo cuando se ionizan, lo que los ha convertido en una herramienta de diagnóstico muy útil. El carbocatión dimetoxitritilo (DMT) tiene un color naranja muy fuerte en medio ácido suave debido a su alto coeficiente de extinción, lo que significa que incluso a concentraciones muy bajas todavía se puede medir ópticamente con precisión. El carbocatión monometoxitritilo (MMT) tiene un color amarillo, mientras que el catión tritilo (Tr) es de color rojo intenso (Figura 7). La eficiencia de cada ciclo de adición de nucleósidos se puede seguir midiendo la absorbancia del DMT liberado y comparándolo con la etapa anterior.



**Figura 7.** Diferentes tipos de cationes tritilo; (i) Tritilo (Tr) rojo; (ii) Monometoxitritilo (MMT) amarillo; (iii) Dimetoxitritilo (DMT) naranja.

Khorana también introdujo los grupos protectores para las aminas exocíclicas que hoy se conocen como los grupos protectores estándar: isobutiril para guanosina y benzoilo para adenosina y citidina (Figura 8).<sup>23</sup> Aunque existen otros, estos son los grupos más utilizados en la actualidad, con la posible excepción de la citidina, en ocasiones protegida con acetil, que se elimina más fácilmente que el benzoilo.



**Figura 8.** Grupos protectores de aminas exocíclicas introducidos por Khorana; (i) *N*-Benzoil (Bz) Adenosina; (ii) *N*-Isobutiril (Ibu) Guanosina; (iii) *N*-Benzoil (Bz) Citosina; (iv) *N*-Acetil (Ac) Citosina.

El profesor Khorana influyó en muchos investigadores, tanto con sus publicaciones como a través de las estancias que grandes nombres de la química de oligonucleótidos realizaron en su laboratorio como estudiantes doctorales, postdoctorales o visitantes académicos. Entre ellos se incluyen Marvin Caruthers o Robert Letsinger, quien trabajó en la Universidad de Northwestern y desarrolló dos hitos importantes en el campo: la síntesis de oligonucleótidos en fase sólida y la química del fosfito-triéster.

El profesor Letsinger comenzó en la Universidad Northwestern (Illinois) a finales de la década de 1940 como químico especializado en el boro. Fue un investigador importante en ese campo, pero a principios de la década de 1960 dirigió su mirada a un campo emergente, la síntesis de biomacromoléculas. En ese momento, el objetivo era la síntesis de péptidos. Sin embargo, un giro del destino movió a Letsinger de la química de péptidos a la de oligonucleótidos a mediados de dicha década.

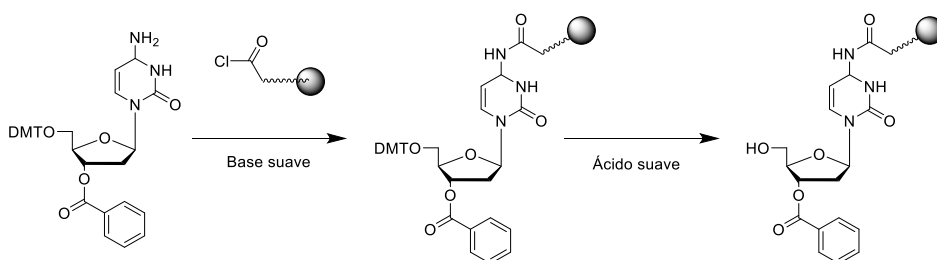
Letsinger estaba desarrollando un esquema de síntesis de péptidos utilizando química en fase sólida, utilizada en un principio para el soporte de catalizadores, y utilizó la tecnología de flujo continuo con un esquema sintético cíclico para agregar unidades secuencialmente. La introducción de un sistema de filtrado interno demostró ser un paso muy importante.

Sin embargo, no fue el único investigador que siguió este ejemplo. Bob Merrifield también investigaba la síntesis de péptidos utilizando tecnología de fase sólida. Merrifield publicó primero un artículo

describiendo la síntesis en fase sólida de péptidos,<sup>27</sup> siendo galardonado con el Premio Nobel por su trabajo. Esta inesperada primicia llevó a Letsinger a adaptar su síntesis en fase sólida para péptidos a la síntesis de oligonucleótidos, en pleno auge en ese momento.

Letsinger hizo tres contribuciones importantes al campo de los oligonucleótidos: la química en fase sólida, el método de síntesis del fosfotriéster, una mejora importante respecto al método del fosfodiéster de Khorana, y el método del fosfito-triéster basado en P(III), que es la raíz del método del fosforamidito de Caruthers.

La primera contribución fue descrita en sus artículos publicados en 1963 y 1964.<sup>28</sup> El soporte consistía en lo que se denominaba polímero de tipo "palomitas de maíz", un polímero de estireno-divinilbenceno que tenía la desafortunada propiedad de hincharse en algunos disolventes. Fue en 1965 cuando publicó el primer artículo sobre la síntesis en fase sólida de oligonucleótidos (dímeros y trímeros) utilizando este soporte.<sup>29</sup> En él se describe la unión de la 2'-desoxicitidina (dC) a través de la amina exocíclica de la base en la posición 4 al soporte modificado como cloruro de ácido para formar un enlace amida, que se hidroliza con hidróxido de amonio (Esquema 3).



**Esquema 3.** Acoplamiento inicial propuesto por Letsinger para el acoplamiento de dC a un soporte de resina modificada como cloruro de ácido.

<sup>27</sup> R. B. Merrifield. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149-2154.

<sup>28</sup> a) R. L. Letsinger, M. J. Kornet. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 3045-3046; b) R. L. Letsinger, M. J. Kornet, V. Mahadevan, D. M. Jerina. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 86, 5163-5165.

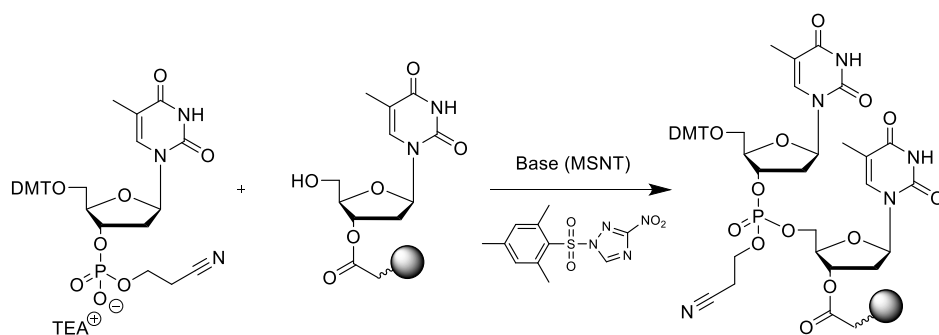
<sup>29</sup> R. L. Letsinger, V. Mahadevan. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, 87, 3526-3527.



El hidroxilo en 3' de la dC estaba protegido con un grupo benzoilo y la posición 5' con un grupo DMT. La eliminación selectiva del grupo DMT con ácido en condiciones suaves proporcionó el monómero adecuado para la síntesis de oligonucleótidos.

Durante la década de 1960 continuó explorando la técnica de síntesis en fase sólida, proponiendo unir el hidroxilo 3' al soporte polimérico, tal como se hace en la actualidad. De hecho, el investigador que jugó un papel muy importante en ese trabajo fue Caruthers. Letsinger exploró una serie de formulaciones de polímeros, pero nunca encontró una solución al problema del hinchamiento del soporte sólido, que era tan perjudicial para la síntesis. Ese papel recayó en su antiguo alumno, Caruthers, quien pronto tendría un papel determinante en esta historia.

A finales de la década de 1960, Letsinger publicó el primer artículo sobre el método del fosfotriéster para la síntesis de oligonucleótidos (Esquema 4).<sup>30</sup>



**Esquema 4.** Método de acoplamiento del fosfotriéster propuesto por Letsinger.

El avance clave de este método fue la protección del grupo fosfato para evitar las ramificaciones indeseadas que, como ya se ha dicho, eran inherentes a la síntesis por el método del fosfodiéster desarrollado por Khorana. El grupo protector más utilizado fue el grupo  $\beta$ -cianoetilo, que

<sup>30</sup> R. L. Letsinger, K. K. Ogilivie. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 3350-3355.

se elimina fácilmente con hidróxido de amonio.<sup>31</sup> También se utilizó un *o*-clorofenilo, pero requería una mezcla de desprotección más complicada.

Sin embargo, resultó que la clave para impulsar la eficiencia de la reacción, que alcanzó niveles superiores al 95% por etapa, fue la selección de un activador adecuado. El cloruro de mesitileno-2-sulfonilo (MSCl) y el nitrotriazol de mesitileno-2-sulfonilo (MSNT) fueron los más utilizados.<sup>32</sup>

Esta fue la primera química lo suficientemente simple como para poder ser reproducida con éxito en muchos laboratorios. La combinación de esta química, que funcionaba con relativa facilidad, con la metodología de fase sólida condujo a la creación de los primeros sintetizadores de ADN automatizados y semiautomatizados, ejemplificados en los instrumentos desarrollados por Vega Biotechnologies. Otro participante temprano fue también Ron Cook y su compañía Biosearch, que introdujo el SAM I a finales de la década de 1970 basado en la química del fosfotriéster. Fue, sin duda, el equipo más popular de su época. Estos instrumentos permitieron a los investigadores que no tenían una formación química preparar oligonucleótidos simples y crearon la capacidad de explorar las secuencias de genes deseadas. Con este equipamiento la industria estaba preparada para las técnicas emergentes de mapeo de genes, PCR y validación de objetivos.

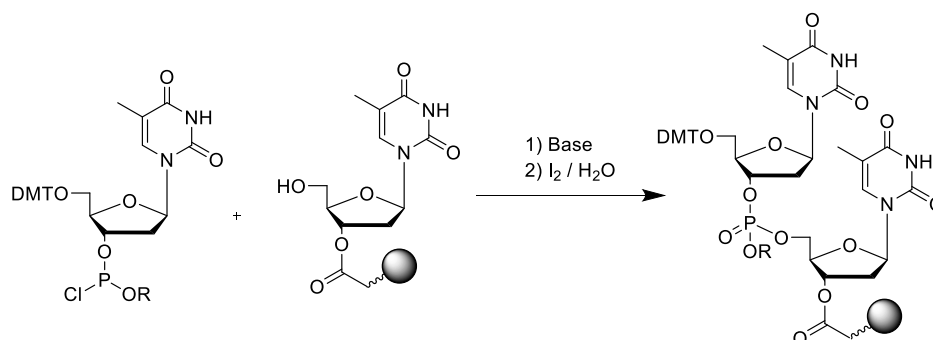
Sin embargo, la química del fosfotriéster todavía sufría de inconvenientes críticos. Entre ellos estaba el que la eficiencia promedio por etapas nunca pudo elevarse de manera reproducible por encima del 97%, incluso a menudo no alcanzó el 95%. Esto limitó el método a la síntesis rutinaria de oligonucleótidos de menos de 20 bases de longitud. Otro problema añadido era el prolongado tiempo de acoplamiento, que se traducían en tiempos de ciclo que duraban más de una hora y media.

---

<sup>31</sup> R. L. Letsinger, K. K. Ogilvie, P. S. Miller. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 3360-3365.

<sup>32</sup> K. G. Devine, C. B. Reese. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 5529-5532.

A mediados de la década de 1970, Letsinger publicó los primeros artículos que describían el método del fosfito-triéster en la química de oligonucleótidos.<sup>33</sup> Esta química se basa en el uso de fósforo reactivo en el estado P(III), en lugar de la química de fosforilo clásica de P(V) (Esquema 5). El esquema requería una etapa adicional en el ciclo de síntesis, la oxidación, para preparar la cadena natural de fosfato P(V). La principal ventaja de este método fue la reducción significativa en el tiempo requerido para el acoplamiento debido a la naturaleza altamente reactiva del intermedio nucleosídico fosfomonocloridito.



**Esquema 5.** Método de acoplamiento del fosfito-triéster.

El hecho de que el intermedio de P(III) sea más reactivo que la especie de P(V) no es intuitivo. Uno sospecharía que, debido al oxígeno doblemente unido, el P(V) sería más reactivo al ataque de un nucleófilo basado en su electronegatividad mejorada. Sin embargo, el factor determinante de la velocidad de reacción resulta ser la diferencia en la energía de formación para los intermedios de transición de la especie P(III) frente a P(V). Se forma un intermedio bpirámide trigonal y el oxígeno doblemente unido dificulta la transición de la configuración del tetraedro al plano mucho más que el par solitario de electrones.

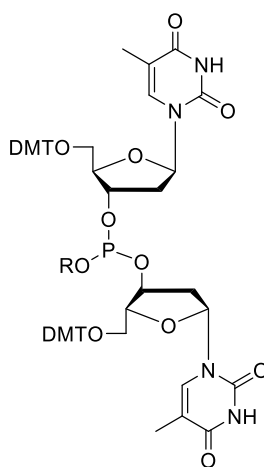
<sup>33</sup> a) R. L. Letsinger, J. L. Finnan, G. A. Heavner, W. B. Lunsford. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 3278-3279; b) R. L. Letsinger, W. B. Lunsford. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 3655-3661.

La oxidación del intermedio fosfito-triéster en un fosfotriéster es necesaria para estabilizar la cadena fosfatada del oligonucleótido en el proceso de síntesis. Esta oxidación es requerida en cada paso del ciclo debido a la inestabilidad del intermedio fosfito-triéster en el medio ácido requerido para eliminar el grupo DMT. Una mezcla de yodo y agua en presencia de una base oxida el fósforo de manera muy eficiente y cuantitativa en cuestión de segundos.

Esta nueva química supuso un gran avance en el campo. No sólo se pudo preparar ADN estándar más rápido, sino que se abrió la puerta para la investigación de una amplia variedad de oligonucleótidos modificados en la cadena fosfatada. Biologics, una compañía en la que participaban antiguos alumnos de Letsinger, comercializó un sintetizador automatizado basado en esta química y, a su vez, estaba otro en desarrollo por Vega Biotechnologies. Sin embargo, la química del fosfito-triéster tenía grandes inconvenientes.

El problema más significativo fue la naturaleza altamente reactiva del intermedio nucleósido fosfomonocloridito, ya que era muy susceptible de hidrólisis. El intermedio no era fácil de almacenar y se sintetizaba justo antes de cada acoplamiento. Otro problema era que la formación del intermedio activo era demasiado complicada. El reactivo activante de fosfodicloridito tuvo que agregarse al nucleósido protegido en 5' en unas condiciones que favoreciesen la formación del intermedio deseado y se redujera la formación del dímero 3'-3' (Figura 9). La formación de este producto secundario provoca doble daño, ya que reduce la cantidad de material deseado y aumenta la cantidad del fosfodicloridito no utilizado que permanece en disolución. Este reactivo no utilizado cubriría de manera muy eficiente la cadena de crecimiento antes de que el intermedio deseado tuviera tiempo de acoplarse. Esa fue la razón por la que no se pudo usar un exceso del reactivo para reducir la formación del aducto 3'-3'. El uso de muy pocos equivalentes del fosfodicloridito tenía un efecto perjudicial similar en el sentido de que se formaría demasiado aducto 3'-3', reduciendo la concentración de reactivo de nucleósidos activos por debajo de un

umbral crítico. Aumentar la concentración de los reactivos para combatir eso solo condujo al efecto contrario y a una reacción aún menos controlable.



**Figura 9.** Dímero 3-3'.

Los protocolos diseñados para optimizar esta reacción requerían la adición lenta de un ligero exceso de nucleósido solubilizado y protegido en 5' a una solución de RO-PCl<sub>2</sub> a temperaturas extremadamente bajas (- 78 °C).

Desafortunadamente, la combinación del requisito de preparar el nucleósido activo justo antes de cada acoplamiento y la necesidad de condiciones arduas durante esta activación, eliminó casi todas las ventajas que suponían un tiempo de acoplamiento más corto.

Este problema no se resolvió hasta principios de la década de 1980, cuando un estudiante recién graduado hizo un descubrimiento fortuito que mostró que, una introducción rápida del reactivo fosfodichloridito al nucleósido a temperatura ambiente conducía a la síntesis del nucleósido activo sin formarse demasiada proporción del aducto 3'-3' o dejar mucho fosfodichloridito sin reaccionar.<sup>34</sup> Este método mejorado se combinó más

---

<sup>34</sup> R. I. Hogrefe. *PhD dissertation. Northwestern University, Evanston, IL. 1987.*

tarde con la eliminación de cualquier exceso de RO-PCl<sub>2</sub> de la mezcla de reacción. Fue este nuevo protocolo el que permitió a Vega Biotechnologies, en colaboración con Letsinger, desarrollar un sintetizador de ADN automatizado con tiempos de acoplamiento de 15 minutos o menos. Aunque este instrumento fue una mejora significativa sobre los sintetizadores que utilizaban el método del fosfotriéster nunca se comercializó. El método del fosfito-triester fue eclipsado por el método del fosforamidito, descubierto por Caruthers, que resolvía dos problemas importantes: la expansión de los soportes de polímeros orgánicos y la inestabilidad del intermedio nucleósido activo fosforilado.

En 1981, publicó el uso de matrices inorgánicas como soportes para la síntesis de oligonucleótidos.<sup>35</sup> Al principio se utilizó sílice de grado cromatográfico. Posteriormente, fue sustituida por vidrio de poro controlado (CPG). Esto resolvió el problema de expansión experimentado con los soportes de polímero orgánico que se utilizaban en ese momento, al permitir un flujo más libre de reactivos sobre el soporte. Fue más fácil enjuagar el soporte con los reactivos antes del siguiente paso y más fácil acceder a todas las partes del soporte. Esto redujo el tiempo de lavado y mejoró la eficiencia del acoplamiento, ya que cualquier contaminación en el soporte interfería con la reacción deseada a través de hidrólisis, oxidación prematura o taponado indeseado.

El método de síntesis de oligonucleótidos desde el enfoque de los fosforoamiditos será tratado en detalle en el siguiente epígrafe.

Finalizaremos esta reseña histórica diciendo que Caruthers, con una química viable en la mano, conoció a Hood; se diseñó un instrumento automatizado de síntesis y nació ABI.

Antes de la introducción del método del fosforamidito, la síntesis de oligonucleótidos estaba en gran parte en manos de químicos experimentados. Los instrumentos se comportaban de forma caprichosa y cuando se combinaban con las síntesis de la época, casi imposibles de

---

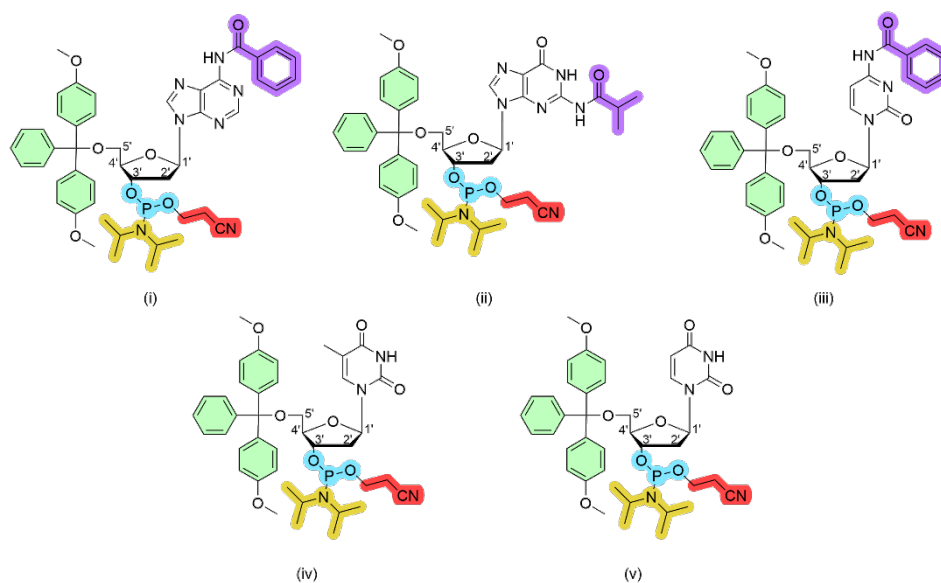
<sup>35</sup> M. D. Matteucci, M. H. Caruthers. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 3185-3191.

ejecutar con éxito. En su estado más avanzado, a mediados de la década de 1980, el método de fosfodiclоридito era complicado y requería un alto grado de experiencia para reproducirse con éxito. Junto con el método del fosforamidito, el sintetizador automatizado se volvió útil para aquellos que mejor podían hacer uso de él, los biólogos.

En conclusión, los métodos de síntesis de oligonucleótidos utilizados actualmente son el fruto de décadas de investigación por científicos progresistas como Khorana, Letsinger y Caruthers. A medida que avanza la investigación en el campo, se sigue con la tradición de buscar mejores formas de preparar oligonucleótidos. Hoy en día, los desafíos radican en la necesidad de disponer de cantidades cada vez mayores de oligonucleótidos modificados para aplicaciones terapéuticas; mejores métodos de alto rendimiento para los mercados de cribado y PCR; y mejora de la síntesis de oligonucleótidos modificados con marcadores para la industria del diagnóstico.

### I.3. El método del fosforamidito en la síntesis de oligonucleótidos

La modificación del método general del fosfito-triéster de Letsinger debido a la contribución de Caruthers parece casi trivial: el intercambio de un grupo saliente, un cloruro, por otro, una amina.<sup>36</sup> Sin embargo, este cambio sutil fue fundamental para el desarrollo de la síntesis rutinaria de oligonucleótidos porque provocó cambios muy significativos en las propiedades de la molécula.



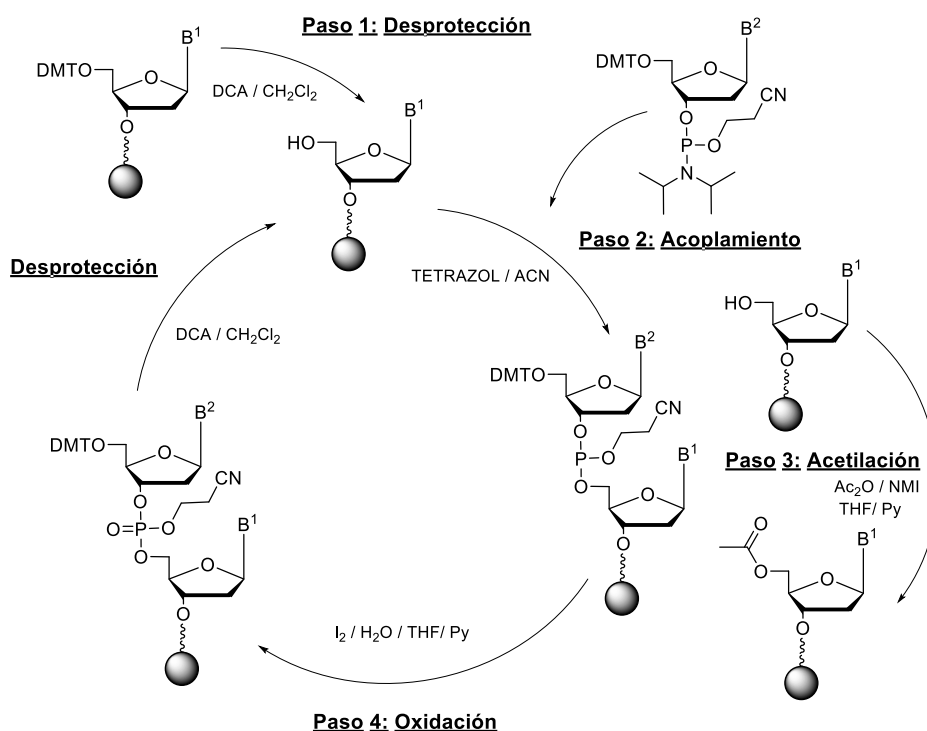
**Figura 10.** 2'-Desoxi fosforamiditos estándar más utilizados en la síntesis de oligonucleótidos. Nucleósidos: (i) 2'-desoxiadenosina; (ii) 2'-desoxiguanosina; (iii) 2'-desoxicitidina; (iv) timidina; (v) 2'-desoxiuridina. Azul: grupo fosforamidito. Verde: grupo protector dimetoxitritilo (DMT) del hidroxilo en posición 5' de la desoxirribosa, se libera en condiciones ácidas. Amarillo: grupo diisopropilamino, sirve como grupo saliente en la etapa de acoplamiento (ver Esquema 6). Rojo: grupo 2-cianoetilo, es el grupo protector del oxígeno libre del fosfito, se libera en condiciones alcalinas suaves. Violeta: grupos protectores de los grupos amino exocíclicos de las bases nitrogenadas, pueden ser hidrolizados en medio básico.

<sup>36</sup> a) S. L. Beaucage, M. H. Caruthers. *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22, 1859-1862; b) L. J. McBride, M. H. Caruthers. *Tetrahedron Lett.* **1983**, 24, 245-248.



Ahora, el intermediario nucleósido fosforilado o fosforamidito (Figura 10) podía ser fabricado con antelación (y no necesariamente en el momento de su uso, como era el caso del fosfomonocloridito), aislarse como un sólido estable y almacenarse hasta que fuese necesario. El fosforamidito era activado justo antes del acoplamiento agregando un ácido débil, el tetrazol.

Esto permitió la fabricación y distribución a escala comercial de reactivos de síntesis de ADN. Como se muestra en el Esquema 6, la única diferencia entre el ciclo de síntesis del fosforamidito y el método de Letsinger fue el paso de activación.



**Esquema 6.** Ciclo de síntesis del fosforamidito.

El ciclo comienza con la desprotección del hidroxilo en 5' del nucleósido unido al soporte. La eliminación del grupo DMT se realiza normalmente con una disolución al 2-3% de ácido dicloracético o

tricloroacético en diclorometano. A continuación, el soporte se lava con acetonitrilo para eliminar todos los restos de ácido y reducir el agua intersticial. Ahora vienen los pasos más importantes, la activación del fosforamidito y su acoplamiento al hidroxilo en 5' del último nucleósido unido a la resina, previamente desprotegido.

La activación se realiza con tetrazol, una amina secundaria inusual que en realidad actúa como un ácido suave. La donación del protón permite la formación de un anillo aromático aniónico favorecido termodinámicamente. El pKa de este ácido es lo suficientemente alto como para no eliminar el grupo protector DMT; sin embargo, sigue siendo lo suficientemente ácido como para activar al fosforamidito.

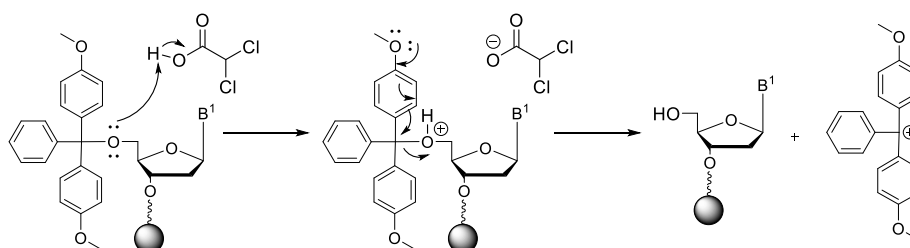
Este ciclo, elegante en su simplicidad, cuya química se abordará en detalle en los siguientes apartados, se ha mantenido sin apenas cambios durante más de dos décadas.

### **I.3.1 Química de las reacciones involucradas en el método del fosforamidito**

Este método sintetiza los oligonucleótidos en el sentido de 3' a 5', el contrario al sentido 5'-3' utilizado por la naturaleza en el proceso de biosíntesis y replicación del DNA. Cada ciclo completo consta de 4 etapas y en cada ciclo se añade un nucleótido, haciendo crecer la cadena en una unidad por el extremo 5'.

#### ***I.3.1.1. Etapa 1: Destritilación del nucleósido unido al soporte sólido***

Al comienzo del ciclo de síntesis, el primer nucleósido (A, G, C o T) protegido está anclado previamente a la resina (tipo estándar). El extremo 5' de este nucleósido estará protegido con un grupo DMT (4,4'-dimetoxitritilo) y este grupo protector debe ser escindido (destritilación) para que el hidroxilo en 5' pueda reaccionar en el siguiente paso del ciclo, permitiendo así la elongación de la cadena. Esta reacción se lleva a cabo con una disolución de ácido dicloroacético o tricloroacético al 3% en diclorometano (Esquema 7).



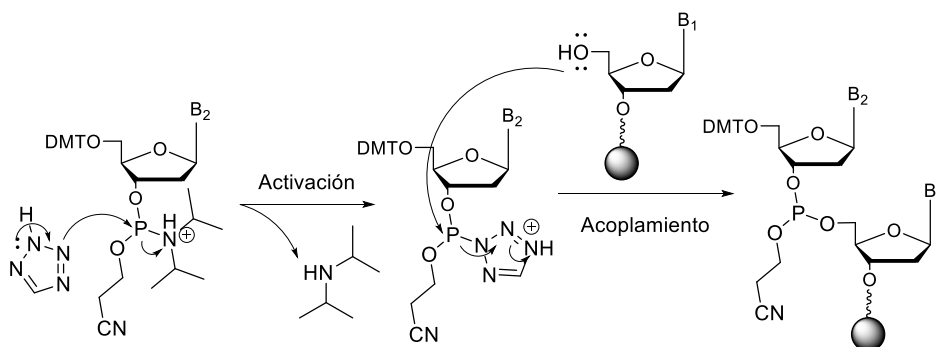
**Esquema 7.** Mecanismo de la reacción de detrilitación catalizada por ácido del nucleósido 3' unido a la resina.

En esta reacción se libera el catión tritilo que presenta una fuerte estabilización por resonancia. Este catión, que posee un máximo de absorbancia característico a una longitud de onda en torno a 500 nm, dota a las disoluciones que lo contienen de una coloración naranja muy peculiar, que es de mucha utilidad a la hora de monitorizar una síntesis, ya que mediante medidas espectrofotométricas sencillas puede llegar a calcularse la concentración del catión tritilo liberado en cada ciclo y, por ende, el rendimiento parcial y total del proceso sintético.

### ***1.3.1.2. Etapa 2: Acoplamiento***

Tras la eliminación del grupo DMT, el nucleósido anclado al soporte reacciona con el siguiente nucleósido a través del grupo fosforamidito en 3'. Para ello, se mezcla el fosforamidito, en gran exceso, con el activante, tetrazol o un derivado de éste. Generalmente se utiliza acetonitrilo, ya que es un buen disolvente para llevar a cabo reacciones de sustitución nucleofílica.

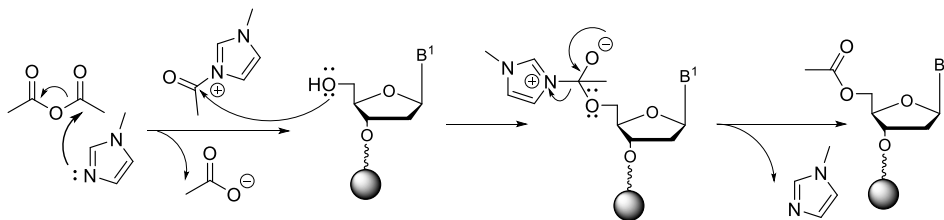
El grupo diisopropilamino del fosforamidito es protonado por el tetrazol, que lo hace un buen grupo saliente, y reemplazado posteriormente por este mismo reactivo, que será sustituido tras el ataque nucleofílico del grupo hidroxilo en posición 5' de la cadena en crecimiento. De esta manera, se forma un nuevo enlace oxígeno-fósforo, dando lugar a un nuevo fosfito-triéster unido al soporte sólido (Esquema 8).



**Esquema 8.** Mecanismo de activación y acoplamiento del fosforamidito al nucleósido anclado al soporte sólido.

### 1.3.1.3. Etapa 3: Acetilación

Se puede esperar un rendimiento del 95.5% en la etapa de acoplamiento pero, aun contando con la química más eficiente y los reactivos más puros, es imposible alcanzar el 100%. Por tanto, algunos grupos 5'-hidroxilo quedarán sin reaccionar en el nucleósido anclado a la resina. Es necesario bloquearlos para evitar que puedan participar como nucleófilos en futuras reacciones de acoplamiento con el fosforamidito correspondiente, produciéndose cadenas con secuencias truncadas de oligonucleótidos. Estas deleciones se irían acumulando con el paso de los ciclos, de manera que el producto formado sería una mezcla de oligonucleótidos y entrañaría una gran dificultad para su purificación.



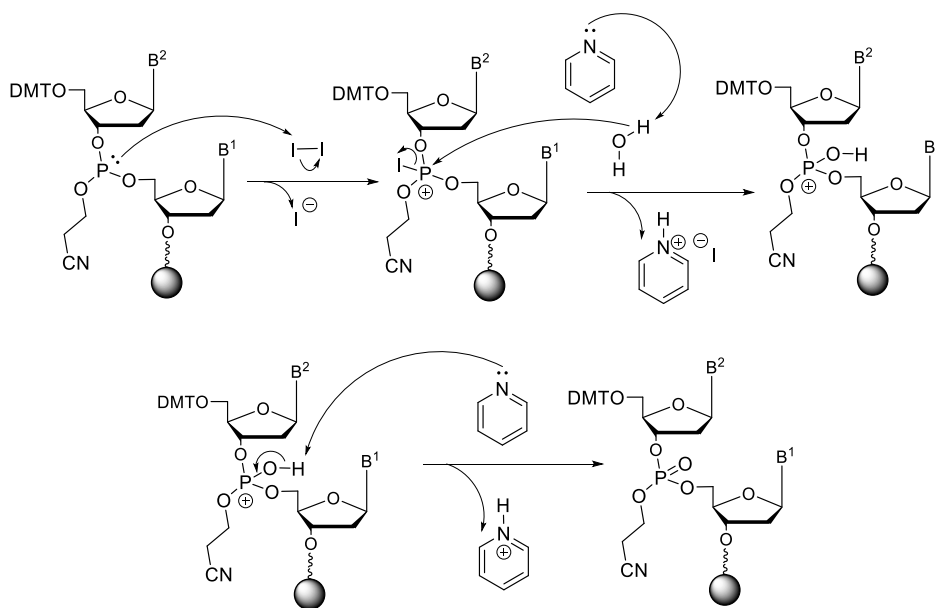
**Esquema 9.** Mecanismo de acetilación de los grupos 5'-hidroxilo libres que no reaccionaron en la etapa de acoplamiento.

Para evitar este inconveniente, se introduce en el ciclo de síntesis una etapa denominada *capping*, que consiste en proteger los grupos 5'-hidroxilo libres utilizando una reacción de acetilación (Esquema 9). Para

ello, se emplean dos disoluciones diferentes: una contiene anhídrido acético y la otra *N*-metilimidazol (NMI). Ambos reactivos están disueltos en THF y un pequeño porcentaje de piridina. La mezcla electrofílica origina rápidamente la acetilación de los alcoholes, mientras que la piridina asegura que se mantenga el pH básico durante todo el proceso para evitar la posible destrilación de la posición 5' del fosforamidito debido al ácido acético formado por la reacción entre el anhídrido acético y el NMI.

#### ***1.3.1.4. Etapa 4: Oxidación***

El fosfito-triéster de P(III) formado en la etapa de acoplamiento es inestable en medio ácido y debe ser oxidado a P(V), más estable. Esta oxidación se lleva a cabo con yodo en presencia de agua y piridina (Esquema 10). El fosfotriéster resultante está protegido en el fosfato con el grupo 2-cianoetilo. Este grupo protector evita reacciones no deseadas durante el ciclo de síntesis en el puente internucleotídico y será eliminado en la desprotección final del oligonucleótido junto con el resto de grupos protectores existentes en la molécula.



**Esquema 10.** Mecanismo de oxidación en la última etapa del ciclo sintético.

Este ciclo de síntesis se repite hasta preparar el oligonucleótido deseado. A continuación, se requiere un procesamiento posterior para convertirlo en biológicamente activo en las aplicaciones de su uso final.

### I.3.2. Procesos post-sintéticos en la preparación de oligonucleótidos en fase sólida

Una vez completado el ciclo de síntesis, el oligonucleótido unido al soporte sólido estará protegido con: un grupo 4,4'-dimetoxitritilo (DMT) en el hidroxilo 5' terminal, grupos 2-cianoetilo en los puentes fosfato y grupos acilo en los grupos amino exocíclicos de las bases nucleicas.

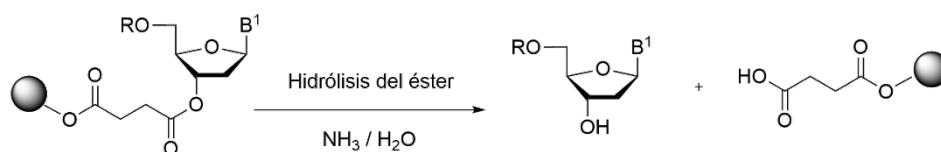
El procesamiento posterior a la síntesis es un paso crítico en el desarrollo de un oligonucleótido activo que cumpla con los requisitos de pureza y rendimiento para una aplicación final.

Hay tres procesos involucrados: escisión del soporte sólido, desprotección y purificación.

Para poder utilizar el oligonucleótido en aplicaciones posteriores debe separarse del soporte sólido y los grupos protectores deben eliminarse. Ambos procesos podrían realizarse simultáneamente. El grupo protector DMT puede permanecer en su lugar para simplificar la purificación (DMT-ON) o ser eliminado con un tratamiento ácido (DMT-OFF).

#### I.3.2.1. Desprotección y liberación del soporte sólido

La desprotección del oligonucleótido implica tres reacciones: escisión de la cadena del oligonucleótido del soporte (Esquema 11), eliminación del grupo protector 2-cianoetilo de los grupos fosfato y desprotección de las bases (Esquema 12).



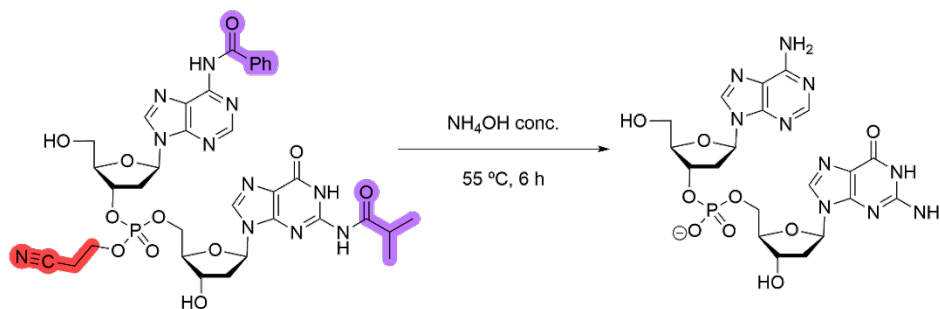
**Esquema 11.** Reacción de escisión del extremo 3' en la liberación de un oligonucleótido anclado a la resina.

Este proceso se lleva a cabo, generalmente, en modo discontinuo, donde la totalidad del soporte sólido se incuba con reactivos específicos (Tabla 1).

**Tabla 1.** Reactivos utilizados para el desanclaje y desprotección de oligonucleótidos.

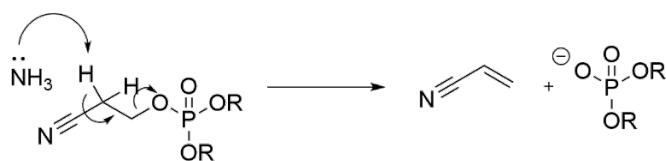
Reactivo	T (°C)	t (h)
NH <sub>4</sub> OH	t.a.-65	10-24
NH <sub>4</sub> OH / EtOH (3:1)	t.a.-65	10-24
NH <sub>4</sub> OH / Metilamina (1:1)	t.a.-50	1-5
Metilamina	t.a.-50	0.5-3

La eliminación del grupo cianoetilo y de los grupos acilo sobre las bases tiene lugar mediante tratamiento con hidróxido amónico concentrado a 55 °C durante 6 h.



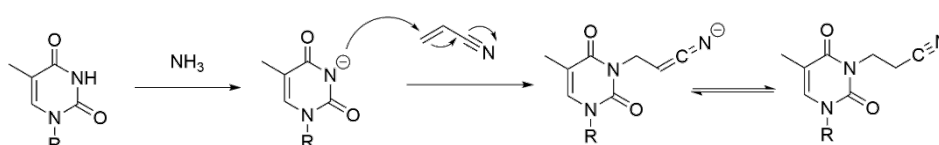
**Esquema 12.** Eliminación del grupo 2-cianoetilo y desprotección de las aminas exocíclicas de las bases.

El acrilonitrilo, un subproducto resultante de la desprotección del fosfodiéster (Esquema 13), es un aceptor de Michael.



**Esquema 13.** Mecanismo de  $\beta$ -eliminación del grupo cianoetilo y consiguiente formación del acrilonitrilo.

Cabe destacar que, bajo las fuertes condiciones básicas utilizadas en la desprotección de oligonucleótidos, se pueden formar aductos de 2-cianoetilo<sup>37,38</sup> con las bases heterocíclicas, particularmente con la timina (Esquema 14).



**Esquema 14.** Formación de aductos de cianoetilo y mecanismo de reacción de la timidina con acrilonitrilo en condiciones básicas fuertes.

Para evitar la formación de estos aductos, una vez finalizada la síntesis se puede realizar un tratamiento previo del oligonucleótido con una base débil en un disolvente orgánico (por ejemplo, 10% dietilamina en acetonitrilo). En estas condiciones, se elimina el grupo protector del fosfato, mientras el oligonucleótido permanece unido al soporte sólido.

Tras la desprotección total, el soporte sólido liberado se filtra y se recupera el oligonucleótido en disolución.

### ***1.3.2.2. Purificación del oligonucleótido***

Después de la desprotección, los oligonucleótidos se desalan o purifican mediante cartuchos de fase reversa (*Reverse Phase Cartridge*, RPC), cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC), HPLC de intercambio aniónico (AX-HPLC) o electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE).

La elección del método de purificación más conveniente garantizará que los oligonucleótidos sean adecuados para su aplicación. Es fundamental encontrar el equilibrio adecuado entre pureza y rendimiento, porque a medida que aumenta la pureza disminuye el rendimiento. La

<sup>37</sup> D. C. Capaldi, H. Gaus, A. H. Krotz, J. Arnold, R. L. Carty, M. N. Moore, A. N. Scozzari, K. Lowery, D. L. Cole, V. T. Ravikumar, M. Caruthers. *Org. Process. Res. Dev.* **2003**, 7, 832-838.

<sup>38</sup> R. Eritja, J. Robles, A. Aviñó, F. Albericio, E. Pedroso. *Tetrahedron Lett.* **1992**, 48, 4171-4182.



disponibilidad de recursos, las consideraciones de tiempo y los requisitos de pureza pueden ayudar a determinar qué método de purificación es el más apropiado dependiendo de la aplicación.

Los siguientes procesos se utilizan rutinariamente para la purificación de oligonucleótidos:

***i) Desalación***

Los oligonucleótidos desalados son adecuados para aplicaciones tales como microarrays, secuenciación o cebadores qPCR. Los oligos se tratan para eliminar los subproductos de moléculas pequeñas de las etapas de síntesis, escisión y desprotección. La desalinización es aceptable para oligonucleótidos con menos de 36 bases. Se recomienda un procesamiento adicional, como la purificación mediante cartuchos o HPLC, para aumentar la pureza de secuencias más largas u oligonucleótidos utilizados en aplicaciones sensibles.

***ii) Cartucho de fase reversa (RPC)***

Es una excelente opción para oligonucleótidos no marcados (cebadores). Por lo general, proporciona un 70% de pureza, dependiendo de la complejidad del oligonucleótido. Para que este método sea efectivo el nucleótido final debe contener el grupo protector DMT en 5'. El oligonucleótido DMT-ON contiene un alto carácter hidrofóbico y se puede separar fácilmente de las secuencias truncadas, que carecen de grupos tritilo y no se adsorben de manera eficiente en la matriz hidrofóbica de resina del cartucho.<sup>39</sup> El oligonucleótido purificado se eluye del cartucho y se elimina el DMT. Esta técnica es adecuada para oligonucleótidos que contienen hasta 50 bases. Para oligonucleótidos más largos se recomienda la purificación por HPLC o PAGE.

---

<sup>39</sup> A. Ellington, J. D. Pollard, Jr. *Introduction to the Synthesis and Purification of Oligonucleotides. Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* **2000**, 1, A.3C.1-A.3C.22.

***iii) HPLC de fase reversa (RP-HPLC)***

Se usa para purificar oligonucleótidos que contienen colorantes, ya que puede eliminar cualquier contaminación fluorescente restante de la síntesis de la sonda. Esta impureza puede elevar la fluorescencia de fondo y oscurecer la detección de la señal. También es una opción ideal para la síntesis a gran escala de oligonucleótidos con menos de 50 bases. Los oligonucleótidos más largos se pueden purificar utilizando este método, aunque la pureza y el rendimiento pueden verse afectados negativamente. Esta técnica conduce a productos con una pureza de ~80%, dependiendo de la complejidad del oligonucleótido. El principio de este método de purificación es similar al cartucho de fase reversa; sin embargo, las fases estacionarias utilizadas permiten una mayor capacidad de muestra.

***iv) HPLC de intercambio aniónico (AX-HPLC)***

Se utiliza como alternativa a la RP-HPLC cuando un oligonucleótido contiene estructuras secundarias significativas, comunes en secuencias con alto contenido de G y C. Elimina las secuencias truncadas resultantes de un acoplamiento deficiente durante la síntesis que pueden afectar a la fabricación de sondas. Estas impurezas pueden competir con la sonda para encontrar la secuencia objetivo y pueden retrasar los ciclos a un valor umbral en un ensayo de qPCR. Para un mayor éxito, la longitud del oligonucleótido debe limitarse a unas 40 bases.

***v) HPLC dual***

La purificación dual de HPLC es AX-HPLC seguida de RP-HPLC. Es un método de purificación más riguroso que los descritos con anterioridad y conduce a productos con ~ 90% de pureza, dependiendo de la complejidad del oligonucleótido. Es una excelente opción para oligonucleótidos que requieren un alto nivel de pureza, como los utilizados en ensayos de qPCR para aplicaciones industriales o aquellos que contienen modificaciones como sondas fluorescentes.

***vi) Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)***

Estos métodos de purificación utilizan el peso molecular en lugar de la carga para separar las impurezas de un oligonucleótido. Es ideal para obtener un alto porcentaje de oligonucleótidos de longitud completa y purificar secuencias no modificadas superiores a 50 bases. Si bien se logra una alta tasa de pureza en comparación con otros métodos, el rendimiento final de un oligonucleótido purificado con PAGE será menor que uno purificado con HPLC. Este método logra una pureza de más del 95% de la secuencia completa, dependiendo de la complejidad del oligonucleótido. Una limitación es que los oligonucleótidos modificados no se separan tan eficazmente como por HPLC debido a su naturaleza hidrófoba.

Para concluir este apartado, y a modo de resumen, podríamos decir que los métodos de purificación más rigurosos reducen el rendimiento final del producto. Los oligonucleótidos desalados ofrecen el mayor rendimiento, pero generalmente son los menos puros. Por el contrario, los métodos dual HPLC y PAGE ofrecen la mayor pureza, pero un rendimiento reducido en comparación con otros métodos.

#### **I.4. Soportes sólidos en la síntesis de oligonucleótidos**

La Síntesis Orgánica sobre soportes sólidos, introducida por Merrifield en 1963,<sup>27</sup> constituye una de las vías más utilizadas actualmente en la preparación de nuevos compuestos. En contraste con la síntesis tradicional, la síntesis en fase sólida evita la necesidad del aislamiento y purificación de los intermedios sintéticos, ya que ésta se lleva a cabo por lavados exhaustivos del soporte sólido al que están anclados dichos intermedios. Además, este procedimiento hace posible el uso de excesos de reactivos o catalizadores. Se utilizan un gran número de soportes sólidos, siendo el más común la resina de poliestireno entrecruzada y diversamente funcionalizada. También se utilizan espaciadores, entre la resina y el compuesto a sintetizar, los cuales se clasifican dependiendo del grupo funcional que liberen.

La selección de un soporte sólido apropiado es muy importante en la síntesis en fase sólida y sus propiedades son vitales para el éxito final del proceso sintético. El desarrollo de nuevos soportes poliméricos ha sido un aspecto importante en los últimos años debido a la evolución de la síntesis orgánica en fase sólida de manera eficiente.

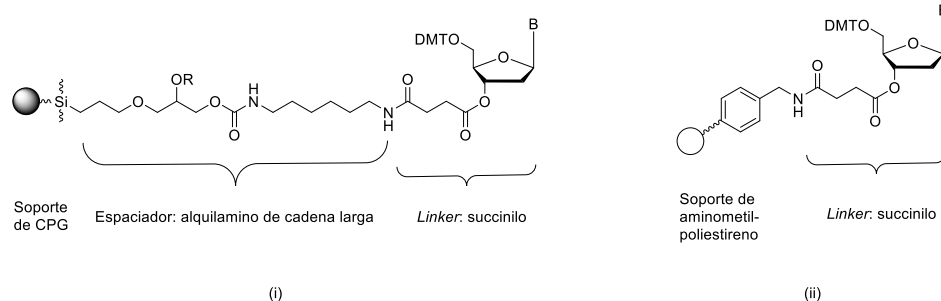
Se han descrito una amplia variedad de materiales como soportes insolubles para diferentes aplicaciones. El soporte ideal debe contener una funcionalidad química apropiada en su superficie que pueda acoplarse de manera selectiva, generalmente a través de un brazo conector, a la primera unidad monomérica. Es habitual que los soportes para la síntesis de oligonucleótidos posean un grupo amino primario, aunque también se utilizan soportes derivados de hidroxilo y carboxilo. El grado de derivatización superficial (carga) en el soporte determina la cantidad máxima de producto que se puede preparar. Se dispone de soportes con cargas de 100 a 1000  $\mu\text{mol/g}$  o más para la síntesis de péptidos o moléculas pequeñas.<sup>40</sup>

---

<sup>40</sup> M. Winter. *Supports for solid-phase organic synthesis. in Combinatorial Peptide and Non-Peptide Libraries: A Handbook* (G. Jung, ed). **1996**, 17, 465-510.

La estructura del brazo conector para unir la superficie del soporte al primer nucleósido también es de importancia crítica. Esta unión se compone de dos partes distintas. La primera parte es el espaciador que conecta el grupo funcional activo (generalmente grupos amino o hidroxilo) a la matriz del soporte insoluble. Este espaciador puede ser tan simple como un solo grupo metileno o puede ser una cadena larga de alquilo o alquiloxi. De manera general, se prefiere una cadena larga para distanciar el grupo funcional terminal de la superficie del soporte.

A continuación, se requiere una segunda molécula difuncional para conectar el grupo amino o hidroxilo terminal en el soporte a la primera unidad de nucleósido. En la síntesis de oligonucleótidos esta estructura se conoce como *linker* (Figura 11).



**Figura 11.** Estructura de los dos soportes en fase sólida más utilizados para la síntesis de oligonucleótidos: (i) LCAA-CPG. (ii) Aminometilpoliestireno (no hinchado y altamente reticulado). En ambos casos, un nucleósido se une al grupo amino del soporte a través de un enlazador de ácido succínico, que puede ser escindido con amoníaco después de la síntesis.

Estos conectores de unión suelen ser ácidos dicarboxílicos, como el ácido succínico<sup>41</sup> o el ácido hidroquinona-*O,O*-diacético,<sup>42</sup> que conectan el nucleósido al soporte a través de enlaces éster o amida. La longitud, rigidez e hidrofobicidad del *linker* pueden afectar a la eficiencia del

<sup>41</sup> a) R. T. Pon, N. Usman, K. K. Ogilvie. *BioTechniques* **1988**, 6, 768-775; b) M. J. Damha, P. A. Giannaris, S. V. Zabarylo. *Nucl. Acids Res.* **1990**, 18, 3813-3821; c) N. N. Bhongle, J. Y. Tang. *Synth. Commun.* **1995**, 25, 3671-3679.

<sup>42</sup> R. T. Pon, S. Yu. *Nucl. Acids Res.* **1997**, 25, 3629-3635.

acoplamiento<sup>43</sup> y su estabilidad química restringe las condiciones que se pueden utilizar durante la síntesis. Esto afecta a la elección de los grupos protectores. La mayoría de los *linkers* para la síntesis de oligonucleótidos son estables en condiciones ácidas y se liberan en condiciones básicas. Esto permite utilizar la combinación más popular de grupos protectores: grupos ácido-lábiles como el 5'-dimetoxitritilo (DMT) y grupos protectores de *N*-acilo y fosfato de cianoetilo lábiles en condiciones básicas. La velocidad con la que se puede escindir el conector también es una consideración importante a tener en cuenta. Las estrategias que requieren la eliminación de grupos protectores en oligonucleótidos sin escisión del soporte requieren brazos conectores que sean muy estables o removibles utilizando condiciones de desprotección ortogonales. También se pueden usar otros tipos de uniones para preparar oligonucleótidos con modificaciones terminales en el extremo 3' como fosfato, amino, carboxilo, tiol u otros sustituyentes.

Las propiedades químicas del resto de la superficie del soporte deben ser inertes o capaces de hacerse inertes por acetilación, sililación, benzoilación u otro tratamiento pasivante similar.<sup>44</sup> Esto se debe a que los grupos residuales, como los grupos amino, hidroxilo o silanol, también pueden reaccionar con el derivado de fosforamidito. Esto crea secuencias truncadas acopladas al soporte a través de enlaces fosforamidato o fosfodiéster que carecen del nucleósido correcto en la posición 3'. Cuando las reacciones de acoplamiento se monitorean mediante la cuantificación del catión dimetoxitritilo naranja liberado durante la destritolación, la formación de tales secuencias fallidas puede deducirse de rendimientos de acoplamiento aparentes >100%. Afortunadamente, los enlaces fosfodiéster en la superficie del soporte son difíciles de hidrolizar y estas secuencias

---

<sup>43</sup> J. Katzhendler, S. Cohen, M. Weisz, I. Ringel, R. D. Camerini-Oterio, J. Deutsch. *Reactive Polymers* **1987**, *6*, 175-187.

<sup>44</sup> a) R. T. Pon. *Solid-phase supports for oligonucleotide synthesis*. **1993**, *Protocols for Oligonucleotides and Analogs* (S. Agrawal, ed.) 465- 496. Humana Press, Totowa, N. J.; b) J. Y. Tang, J. X. Tang. *Passivated polymer supports for nucleic acid synthesis*. **1997**, *United States Patent #5, 668, 268*.

fallidas no se liberan del soporte en las condiciones habituales de escisión.<sup>41a</sup>

La hidrofobicidad de la superficie del soporte es otro aspecto a considerar. A veces se prefieren soportes hidrófobos, como el poliestireno y el polimetacrilato benzoilado, frente a otros soportes de vidrio de poro controlado (CPG) y polietilenglicol (PEG), que tienen superficies hidrófilas.<sup>45</sup> Todas las reacciones de acoplamiento mediante un fosforamidito son sensibles a la humedad, que puede ser evitada más fácilmente con los soportes hidrófobos. Esto permite una mayor eficiencia de síntesis con menores excesos de reactivo; sin embargo, las comparaciones cuantitativas son difíciles de hacer y tanto los soportes de poliestireno rígido como los de CPG son muy utilizados.

#### **1.4.1. *Linkers***

Para hacer que el material del soporte sólido cumpla las condiciones adecuadas para ser utilizado como resina en la síntesis de oligonucleótidos, los *linkers* deben estar unidos covalentemente a los grupos amino reactivos del CPG de aminopropilo, del CPG de alquilamino de cadena larga (LCAA CPG) o del aminometilo del poliestireno macroporoso (MPPS), dependiendo del material polimérico que se vaya a utilizar como soporte. Los grupos amino que no reaccionen serán acetilados, posteriormente, para prevenir posibles reacciones secundarias.

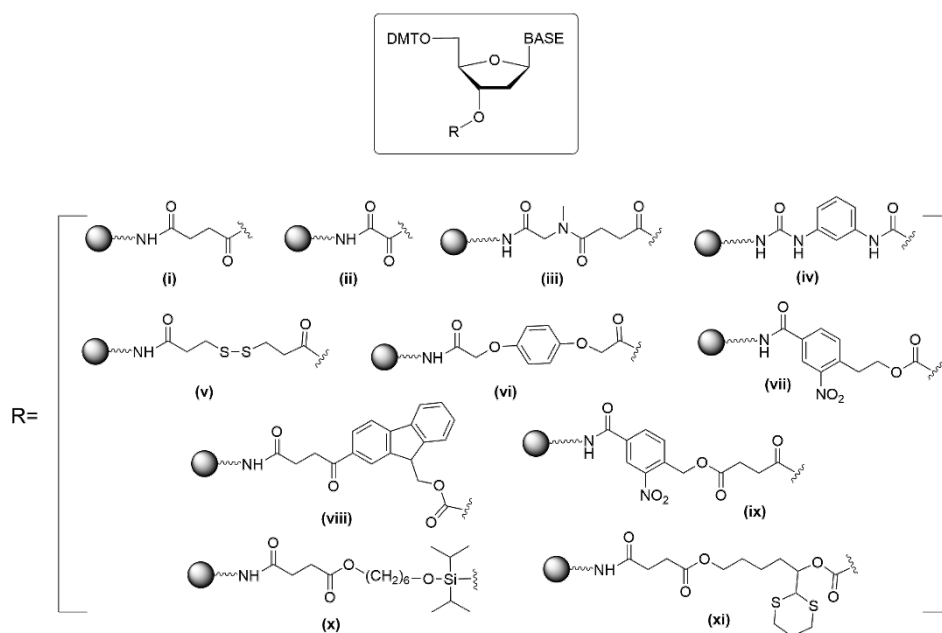
Atendiendo al tipo de *linker* utilizado, estaremos ante tres grupos diferentes de soportes sólidos:

- a) Soportes sólidos nucleosídicos. En los que previamente a la síntesis del oligonucleótido, el grupo 3'-hidroxi del nucleósido 3'-terminal se ancla mediante un enlace tipo éster, hidrolizable en condiciones fuertemente alcalinas, al soporte sólido a través de un brazo que por lo general suele ser un grupo succinilo. En la Figura 12 se

---

<sup>45</sup> C. McCollum, A. Andrus. *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 4069- 4072.

recogen varias de las opciones descritas en la bibliografía.<sup>46,47</sup> Posteriormente, el ensamblaje de la cadena de oligonucleótido comenzará con el acoplamiento del siguiente fosoramidito sobre el nucleósido 3'-terminal anclado al soporte.



**Figura 12.** Soportes sólidos nucleosídicos. Algunos de los *linkers* desarrollados para anclar el nucleósido por la posición 3' al soporte sólido:<sup>48</sup> (i) succinilo, (ii) oxalilo, (iii) succinilsarcosilo, (iv) ftaloílo, (v) *linker* disulfuro, (vi) *linker*-Q, (vii) *linker* NPE [1-(2-nitrofenil)etilo], (viii) *linker* FM, (ix) *linker* 2-nitrobenzil, (x) *linker* sililo, (xi) *linker* DM.<sup>49,50</sup>

b) Soportes sólidos universales. Un *linker*, por lo general de carácter no nucleosídico, se une al material de la resina por uno de sus

<sup>46</sup> B. S. Sproat, D. M. Brown. *Nucleic Acids Res.* **1985**, *13*, 2979–2987.

<sup>47</sup> A. P. Guzaev. *Solid-phase supports for oligonucleotide synthesis. Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* **2013**, *53*, 3.1.1-3.1.60.

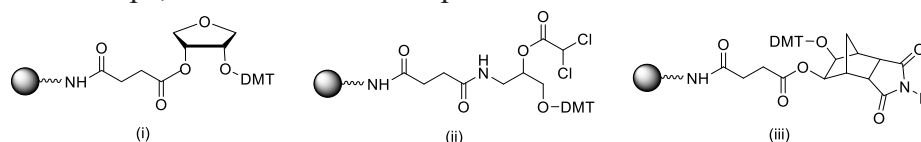
<sup>48</sup> A. Aviñó, C. Fàbrega, R. Eritja. *Methods for the synthesis of oligonucleotides.* From the book: *Nucleic Acids Chemistry: Modifications and Conjugates for Biomedicine and Nanotechnology.* **2021**, 1-44.

<sup>49</sup> G. R. Gough, M. J. Brunden, P. T. Gilham. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 4177-4180.

<sup>50</sup> X. Lin, J. Chen, S. Shahsavari, N. Green, D. Goyal, S. Fang. *Org Lett.* **2016**, *18*, 3870-3873.

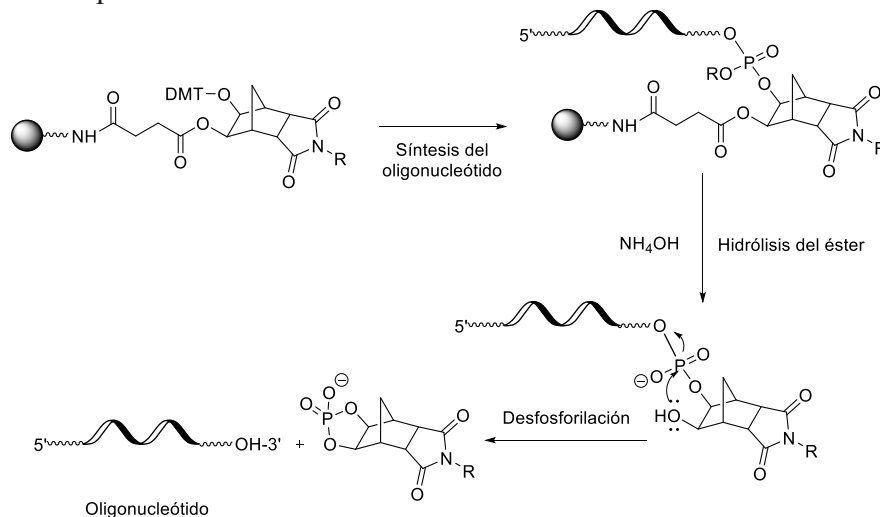


extremos (Figura 13), mientras que, por el otro, permite el anclaje del nucleósido del extremo 3' durante el primer ciclo de la síntesis, utilizando un fosforamidito convencional.<sup>47</sup> El ensamblaje de la cadena continua hasta su finalización, para dar paso, en una última etapa, a la liberación del soporte.



**Figura 13.** Algunos ejemplos de soportes sólidos universales: (i) Soporte universal I, (ii) Soporte universal II, (iii) Unylinker.

El rasgo característico de los soportes sólidos universales es que la liberación de los oligonucleótidos se produce por la escisión hidrolítica de un enlace P-O que une el extremo 3'-O del residuo de nucleótido 3'-terminal al *linker* universal, tal como se muestra en el Esquema 15.

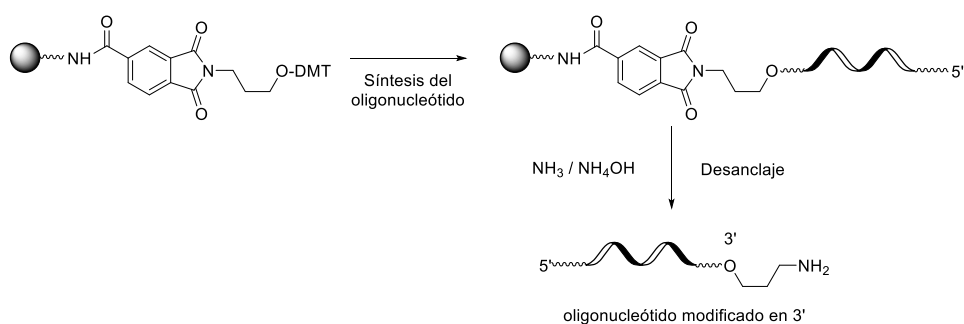


**Esquema 15.** Soportes sólidos universales. Mecanismo de liberación y desfosforilación del oligonucleótido sintetizado.

El resultado final del proceso es la liberación de un oligonucleótido con el grupo 3'-hidroxi terminal desprotegido, idéntico al que se hubiera obtenido al prepararlo sobre un soporte

sólido nucleosídico.<sup>47,48</sup> La principal ventaja de este tipo de soportes es que su utilización no depende del nucleósido en posición 3' de la secuencia del oligonucleótido que se desee sintetizar.

- c) Soportes sólidos especiales. Se utilizan para insertar grupos funcionales específicos, requeridos con fines concretos, en el extremo 3' del oligonucleótido. Se indica un ejemplo en el Esquema 16, donde el soporte sólido representado permite, tras su liberación, la obtención de un oligonucleótido que contiene un grupo 3'-*O*-aminopropil en la posición 3'-terminal. De manera similar, en la bibliografía se han descrito muchos otros soportes sólidos especiales diseñados para la unión de grupos funcionales reactivos, grupos de marcaje no radiactivos o modificadores terminales (por ejemplo, colesterol).<sup>47</sup>



**Esquema 16.** Soportes sólidos especiales.

#### **I.4.2. Soportes sólidos de CPG y poliestireno: ventajas e inconvenientes**

Desde la introducción de la síntesis en fase sólida para oligonucleótidos, se han desarrollado un gran número de soportes sólidos. En contraste con la síntesis orgánica en fase sólida y la síntesis de péptidos, en la síntesis de oligonucleótidos se obtienen mejores resultados con soportes sólidos no hinchables o poco hinchables. Los dos materiales en fase sólida más

utilizados son el vidrio de poro controlado (CPG) y el poliestireno macroporoso (MPPS).

Los soportes de CPG<sup>51</sup> se han utilizado en diversos tipos de síntesis de compuestos orgánicos, como es el caso de los oligonucleótidos. Estas resinas se definen comúnmente por su tamaño de poro. En la química de oligonucleótidos, tamaños de poro de 500, 1000, 1500, 2000 y 3000 Å se utilizan para la preparación de oligonucleótidos de aproximadamente 50, 80, 100, 150 y 200-mer, respectivamente. Para que la CPG nativa sea adecuada para su posterior procesamiento, la superficie del material debe tratarse con 3-(trietoxisilil)-1-propanamina<sup>52</sup> para dar CPG aminopropilo. El brazo de aminopropilo puede extenderse aún más para dar como resultado una CPG de aminoalquilo de cadena larga (LCAA). El grupo amino se utiliza como punto de anclaje de *linkers* adecuados para la síntesis de oligonucleótidos.

Un poliestireno macroporoso adecuado para la síntesis de oligonucleótidos es un poliestireno altamente reticulado de baja expansión obtenido por polimerización de divinilbenceno, estireno y 4-clorometilbenceno en presencia de un agente porógeno. El MPPS clorometilo macroporoso obtenido puede ser convertido en aminometil MPPS. De todas ellas, las más comunes son las resinas de poliestireno reticuladas con divinilbenceno al 1%. Este porcentaje es el mejor compromiso entre compatibilidad y estabilidad mecánica de la resina. En presencia de disolventes adecuados,<sup>53</sup> los grados más altos de reticulación producen resinas más estables, pero se expanden menos y, en consecuencia, poseen una menor capacidad de carga.

---

<sup>51</sup> F. Albericio, M. Pons, E. Pedroso, E. Giralt. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 360-366.

<sup>52</sup> A. P. Guzaev, R. T. Pon. *Attachment of nucleosides and other linkers to solid-phase supports for oligonucleotide synthesis. Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* **2013**, *52*, 3.2.1-3.2.23.

<sup>53</sup> S. S. Wang. *J. Org. Chem.* **1985**, *40*, 1235-1239.

Debido a los altos rendimientos de síntesis obtenidos con la CPG, es la resina más utilizada hasta el momento,<sup>47,54</sup> aunque puede verse afectada por el tratamiento ácido durante la liberación del DMT o por la desprotección en condiciones básicas al final de la síntesis.<sup>41a,45</sup> Además, el uso de soportes CPG es limitado debido a su baja capacidad de carga, lo que hace que la síntesis a gran escala o la funcionalización adicional del soporte sean difíciles e ineficientes.

#### **I.4.3. Nuevos soportes sólidos**

Las resinas de poliestireno entrecruzado han sido usadas en síntesis orgánica en fase sólida desde 1963 cuando Merrifield utilizó un copolímero clorometilado de estireno y divinilbenceno (DVB). Este soporte es un gel entrecruzado que permite la penetración de reactivos y disolventes entre los poros de las partículas del copolímero.

En las etapas tempranas, las resinas de clorometil/aminometil poliestireno (PS) se utilizaron comúnmente como soporte sólido. Debido a que estas resinas se preparan fácilmente y son robustas en diversos entornos químicos sintéticos, como condiciones ácidas/básicas, y permanecen en estado de suspensión en disolventes orgánicos polares/no polares, son soportes sólidos atractivos para la síntesis en fase sólida.

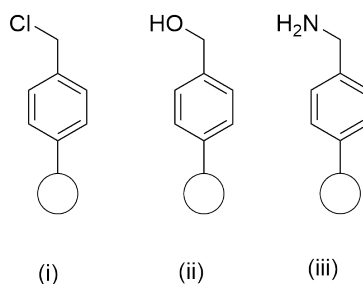
Los tres soportes poliméricos más utilizados en la actualidad y sintetizados a partir de poliestireno son: clorometilpoliestireno, preparado por posderivatización usando clorometilmetiléter y SnCl<sub>4</sub>; hidroximetilpoliestireno, preparado a partir de la resina de Merrifield por esterificación con acetato de potasio seguido de saponificación o reducción del éster;<sup>53</sup> y aminometilpoliestireno, preparado por sustitución con ftalimida de potasio de la resina de Merrifield, seguido por una reacción de aminometilación (Figura 14).<sup>55</sup> La resina aminometilada permite el uso de una multitud de ligandos y espaciadores que pueden ser añadidos al

---

<sup>54</sup> S. P. Adams, K S. Kavka, E. J. Wykes, S. B. Holder, G. R. Galluppi. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 661-663.

<sup>55</sup> A. R. Mitchell, S. B. H. Kent, B. W. Erikson, R. B. Merrifield. *Tetrahedrom Lett.* **1976**, *17*, 3795-3798.

sistema empleando grupos amida, los cuales son estables bajo condiciones fuertemente ácidas.



**Figura 14.** Estructura de los soportes sólidos más usados de poliestireno: (i) clorometilpoliestireno, (ii) hidroximetilpoliestireno, (iii) aminometilpoliestireno.

Sin embargo, en las resinas convencionales basadas en poliestireno, los grupos funcionales se distribuyen por igual en toda la región de las perlas de resina. Como resultado, la reacción entre los grupos funcionales en las perlas de resina y los reactivos entrantes de la solución, a veces, se retrasa debido a su difusión limitada a la parte central de la resina. Para superar esta limitación, varios grupos de investigación han desarrollado nuevos materiales alternativos como las resinas PS injertadas con polietilenglicol (PEG-PS): TentaGel, Anfispheres, Hypogel o ArgoGel, desarrolladas por Bayer para usos específicos con disolventes polares,<sup>56</sup> Pepsyn<sup>57</sup> y PolyHIPE,<sup>58</sup> ahora utilizadas ampliamente.<sup>59</sup> Sin embargo, en la escisión fotolítica de los productos, todas estas resinas tienen el mismo problema: una penetración inadecuada de la luz UV en el interior de las perlas de resina. A medida que el PEG injertado mejora la compatibilidad de la resina en disolventes hidrófilos, incluidos los medios acuosos, esas resinas se han utilizado como soporte polimérico para la síntesis de compuestos

<sup>56</sup> a) E. Bayer. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1991**, *30*, 113-129; b) E. Bayer, W. Rapp. *Chem. Pept. Protein* **1986**, *3*, 3-8.

<sup>57</sup> E. Atherton, R. C. Sheppard, A. J. Rosevar. *J. Chem. Soc.* **1981**, 1151-1152.

<sup>58</sup> P. W. Small, D. C. Sherrington, *J. Chem. Soc.* **1989**, 1589-1590.

<sup>59</sup> a) B. de la Torre, A. Aviñó, G. Tarrason, J. Piulats, F. Albericio, R. Eritja. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 2733-2736; b) B. de la Torre, F. Albericio, E. Saison-Behmoaras, A. Bachi, R. Eritja. *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 1005-1012.

en perlas y bioensayos sobre perlas. Sin embargo, el problema de distribución de los grupos funcionales aún persiste, lo que podría causar una baja eficiencia en algunas reacciones.

Los *Crowns-pins* (CP) son otro tipo de soportes constituidos por un injerto de polietileno-polipropileno sobre la cadena de poliestireno mediante iniciación fotoquímica.<sup>60</sup> La resina Kieselguhr-poliacrilamida (KPA)<sup>61</sup> también se usa en diversos tipos de síntesis orgánica. Por otra parte, el copolímero polietilenglicol/dimetilacrilamida (PEGA) es un material muy polar que aumenta sus propiedades en agua, posee flexibilidad y facilita el acceso de grandes macromoléculas como las enzimas; sin embargo, tiene baja estabilidad mecánica.<sup>62</sup>

#### **I.4.4. Resinas *Core-Shell* PS-PEG**

Los avances logrados con la metodología de síntesis en fase sólida han contribuido a que su empleo se haya diversificado hacia otras áreas de la investigación, no solo en la síntesis de compuestos activos biológicamente, sino en la preparación de moléculas orgánicas especiales y familias de ellas, así como también de algunos polímeros y macromoléculas biológicas. Es por ello, que existe un gran interés en la búsqueda de un soporte polimérico ideal.

Recientemente, se han sugerido unas resinas alternativas "tipo núcleo-capa" (*Core-Shell*), originadas a partir de la resina de aminometilpoliestireno, que podrían solventar los problemas de difusión de disolventes y reactivos durante el proceso de síntesis.<sup>63</sup>

---

<sup>60</sup> H. M. Geysen, R. H. Meloen, S. J. Barteling. *J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 3998-4002.

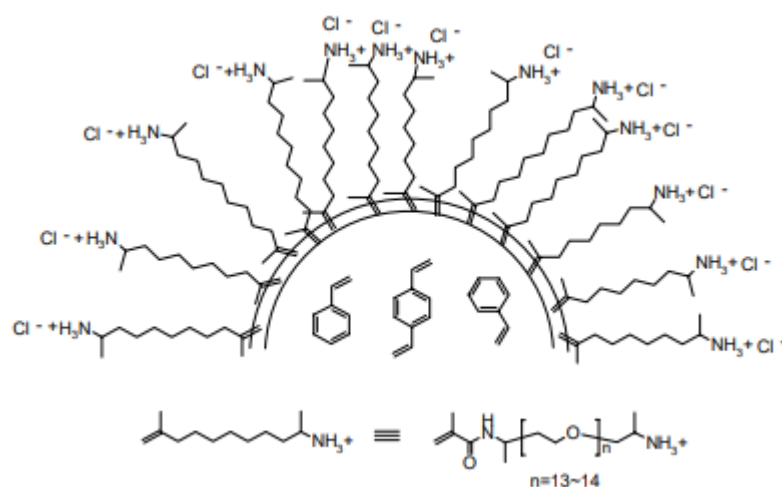
<sup>61</sup> A. Dryland, R. C. Sheppard. *J. Chem. Soc., Perking Trans. 1* **1986**, 125-137.

<sup>62</sup> M. Meldal. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 3077-3080.

<sup>63</sup> H. J. Cho, T. K. Lee, J. W. Kim, S. M. Lee, Y.-S. Lee. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 9156-9162.

Otras matrices como el polivinilacetato (Oligoprep)<sup>64</sup> y el polietilenglicol (ChemMatrix)<sup>65</sup> se estudiaron para la síntesis de oligonucleótidos.

En la actualidad, los soportes sólidos más demandados para la síntesis a escala industrial de oligonucleótidos son los soportes de poliestireno *NittoPhase*,<sup>66</sup> el soporte HybCPG a base de sílice<sup>67</sup> y el *Primer Support 5G*. Sobre este último, cabría destacar que se trata de un soporte de poliestireno de última generación desarrollado por General Electric Company (GE) y que tiene una capacidad de carga de 350  $\mu\text{mol/g}$ , permitiendo la síntesis de oligonucleótidos a una escala de 750  $\text{mmol/reacción}$ .<sup>68</sup>



**Figura 15.** Estructura de resina *Core-Shell* tipo PS-PEG.<sup>42</sup>

Hace un par de décadas, se ha descrito un método novedoso para preparar este tipo de resinas, que tienen un núcleo de poliestireno (PS)

<sup>64</sup> S. Aitken, E. Anderson. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. **2007**, 26, 931-934.

<sup>65</sup> S. Mazzini, F. García-Martin, M. Alvira, A. Aviño, B. Manning, F. Albericio, R. Eritja. *Chem. Biodivers.* **2008**, 5, 209-218.

<sup>66</sup> M. R. Putta, D. Yu, E. R. Kandimalla. *E. R. Methods Mol. Biol.* **2011**, 764, 263-277.

<sup>67</sup> D. M. Rothstein, M. L. Rothstein. *Genetic Eng Biotech News* **2012**, 32, 42-43.

<sup>68</sup> B. I. Andrews, F. D. Antia, S. B. Brueggemeier, L. J. Diorazio, S. G. Koenig, M. E. Kopyach, H. Lee, M. Olbrich, A. L. Watson. *J. Org. Chem.* **2021**, 86, 49-61.

altamente reticulado (> 4%) y recubierto con una capa de polietilenglicol (PEG).<sup>69</sup>

Para ello, se utilizó la polimerización en suspensión de estireno. Además, se agregó un macromonómero PEG sintético que tenía un grupo vinilo y un grupo amino en los extremos como comonómero y estabilizador del sistema de suspensión (Figura 15). Al preparar un copolímero de este tipo con todos los grupos funcionales ubicados en la cáscara PEG, cabría esperar que los reactivos no necesitasen difundirse en el interior de la perla, de modo que todas las reacciones químicas, incluida la fotólisis, podría proceder de manera más efectiva.

Las resinas tipo *Core-Shell* exhiben un mayor rendimiento y pureza en la síntesis de péptidos que contienen secuencias difíciles, en comparación con las resinas convencionales. Sin embargo, son incompatibles con el agua y aún no son adecuadas para bioensayos sobre perlas. Finalmente, aunque se han desarrollado resinas de este tipo altamente cargadas que contienen PEG en la capa de cáscara (Hi Core),<sup>70</sup> la cantidad adecuada de carga de PEG y grupos funcionales son todavía difíciles de controlar.

---

<sup>69</sup> J. K. Cho, B. D. Park, Y. S. Lee. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 7481–7485.

<sup>70</sup> H. Kim, J. K. Cho, W.-J. Chung, Y.-S. Lee. *Org Lett.* **2004**, *6*, 3273–3276.



## I.5. Aplicaciones de los oligonucleótidos

Los oligonucleótidos tienen el potencial de tratar o controlar una amplia gama de enfermedades. Aunque la mayoría de las terapias con oligonucleótidos se han centrado en el silenciamiento génico, se están aplicando otras estrategias, incluida la modulación de corte y pegado (*splicing*) y la activación génica, ampliando el rango de posibles objetivos más allá de los que son accesibles para las modalidades farmacéuticas convencionales.

La mayoría de los oligonucleótidos interactúan con sus moléculas diana afines a través del emparejamiento complementario de bases de Watson-Crick, por lo que la dilucidación de la secuencia objetivo es relativamente sencilla. Se pueden diseñar racionalmente compuestos con actividad biológica y altamente específicos en función del conocimiento de la secuencia primaria de un gen objetivo único y los candidatos principales pueden ser identificados mediante un cribado rápido. El uso de oligonucleótidos permite un enfoque de medicina precisa y/o personalizada, ya que pueden diseñarse para atacar selectivamente cualquier gen con efectos mínimos, o al menos predecibles, fuera del objetivo. Además, es posible dirigirse a secuencias específicas del paciente que son causantes de enfermedades raras.<sup>71</sup>

En los últimos veinticinco años, han sido aprobadas dieciocho terapias con ácidos nucleicos para el tratamiento de diversas enfermedades. Sus modos de acción incluyen: oligonucleótidos antisentido (*Antisense Oligonucleotides*, ASO), oligonucleótidos de tipo “splice-switching” (*Splice-switching Oligonucleotides*, SSO), de ARN interferente (ARNi) y un aptámero de ARN frente a una proteína. Entre las enfermedades a las que se dirige esta nueva clase de fármacos se encuentran la hipercolesterolemia familiar homocigótica, la atrofia muscular espinal, la distrofia muscular de Duchenne, la amiloidosis hereditaria mediada por transtirretina, el síndrome de quilomicronemia familiar, la porfiria

---

<sup>71</sup> J. Kim, C. Hu, C. M. El Achkar, L. E. Black, J. Douville, A. Larson, M. K. Pendergast, S. F. Goldkind, E. A. Lee, A. Kuniholm, *et al.* *N. Engl. J. Med.* **2019**, *381*, 1644-1652.

hepática aguda y la hiperoxaluria primaria. La modificación química del ADN y el ARN ha sido fundamental para preparar fármacos a partir de oligonucleótidos.<sup>72</sup>

Dadas las exitosas aplicaciones diagnósticas y los prometedores ensayos clínicos con ADN y ARN modificados, se cree que se necesitarán grandes cantidades de oligonucleótidos de alta pureza en los próximos años.<sup>73</sup> Por lo tanto, reducir el coste total de producción de medicamentos basados en oligonucleótidos incrementaría su potencial aplicación en el tratamiento de enfermedades oftálmicas, aplicaciones cardiovasculares, enfermedades metabólicas, trastornos inflamatorios, tratamiento del cáncer, trastornos neurológicos, infecciones virales y enfermedades huérfanas.<sup>73</sup>

---

<sup>72</sup> M. Egli, M. Manoharan. *Nucleic Acids Res.* **2023**, *51*, 2529–2573.

<sup>73</sup> Y. S. Sanghvi. *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* **2011**, 4.1.1-4.1.22.

# CAPÍTULO 1

---

Síntesis, caracterización y evaluación de  
Oligodesoxinucleótidos utilizando resinas de tipo  
*Core-Shell*



**Antecedentes**



## 1.1. Nanopartículas *Core-Shell*

Las nanopartículas *Core-Shell* (núcleo-cáscara) son una clase de materiales nanoestructurados que recientemente han recibido más atención debido a sus interesantes propiedades y amplia gama de aplicaciones en catálisis, biología, química de materiales, sensores y síntesis de biomacromoléculas, como es el caso de los péptidos.

Al diseñar racionalmente los núcleos, así como las capas de dichos materiales, se pueden preparar una gama de nanopartículas núcleo-cáscara con propiedades personalizadas.

En las últimas décadas, el rápido desarrollo de la nanotecnología ha permitido a los investigadores ver a los catalizadores heterogéneos convencionales desde una nueva perspectiva.<sup>74</sup>

En particular, los materiales catalíticos ahora se pueden preparar con mayor precisión a través de procesos utilizados por la nanotecnología.<sup>75</sup> Las nanopartículas que contienen metales nobles, que a menudo sirven

---

<sup>74</sup> a) M. B. Gawande, S. N. Shelke, R. Zboril, R. S. Varma. *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 1338-1348; b) C. Burda, X. B. Chen, R. Narayanan, M. A. El-Sayed. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1025-1102; c) C. T. Duncan, A. V. Biradar, S. Rangan, R. E. Mishler, T. Asefa. *Chem. Mater.* **2010**, *22*, 4950-4963; d) F. Zaera. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 2746-2762.

<sup>75</sup> a) J. C. Park, A. Y. Kim, J. Y. Kim, S. Park, K. H. Park, H. Song. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 8484-8486; b) M. Kim, J. C. Park, A. Kim, K. H. Park, H. Song. *Langmuir* **2012**, *28*, 6441-6447; c) J. C. Park, H. Song. *Nano Res.* **2011**, *4*, 33-49.

como componentes catalíticos activos, se pueden sintetizar rutinariamente con tamaños, formas, facetas cristalinas, estructura y composición bien definidas.<sup>76</sup>

Tal control sobre las estructuras de los materiales podría conducir al desarrollo de nuevas tecnologías para aplicaciones en química verde, procesos químicos sostenibles y económicamente viables, que actualmente se consideran entre las áreas emergentes y más desafiantes de la química.<sup>77</sup> Además de ofrecer soluciones a las demandas tradicionales de que los catalizadores sean eficientes y selectivos para una reacción catalítica particular, estos nanomateriales podrían ofrecer las ventajas de la reducción de residuos, la eficiencia atómica, mayores velocidades de reacción y también la fácil recuperación del catalizador.<sup>78</sup>

Tradicionalmente, los nanomateriales compuestos con núcleos (material interno) y capas (material de capa externa), ambos a nanoescala, se definen como nanopartículas núcleo-cáscara (*Core-Shell Nanoparticules*, CSN).<sup>79</sup>

---

<sup>76</sup> a) X. Guo, P. Brault, G. Zhi, A. Caillard, G. Jin, X. Guo. *J. Phys. Chem. C*, **2011**, *115*, 24164-24171; b) M. N. Nadagouda, V. Polshettiwar, R. S. Varma. *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*, 2026-2031.

<sup>77</sup> a) M. B. Gawande, V. D. B. Bonifacio, R. Luque, P. S. Branco, R. S. Varma. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 5522-5551; b) M. B. Gawande, V. D. B. Bonifacio, R. Luque, P. S. Branco, R. S. Varma. *ChemSusChem*, **2013**, *7*, 24-44; c) B. M. Trost. *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 695-705; d) R. S. Varma. *Green Chemical Reactions*, ed. P. Tundo, V. Esposito, **2008**, 155-171.

<sup>78</sup> a) F. Jutz, J. M. Andanson, A. Baiker. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 322-353; b) M. B. Gawande, R. K. Pandey, R. V. Jayaram. *Catal. Sci. Technol.* **2012**, *2*, 1113-1125; c) M. B. Gawande, A. Rathi, I. D. Nogueira, C. A. A. Ghumman, N. Bundaleski, O. M. N. D. Teodoro, P. S. Branco. *ChemPlusChem*, **2012**, *77*, 865-871; d) S. S. Kahandal, S. R. Kale, M. B. Gawande, R. Zboril, R. S. Varma, R. V. Jayaram, *RSC Adv.* **2014**, *4*, 6267-6274.

<sup>79</sup> H. Wang, L. Y. Chen, Y. H. Feng, H. Y. Chen. *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 1636-1646.



Aunque, históricamente, el término fue acuñado para las nanopartículas semiconductoras con multicapas concéntricas,<sup>80</sup> la definición de los nanomateriales núcleo-cáscara puede extenderse a los nanomateriales que tienen distintos materiales que cubren (total o parcialmente) el componente interno, siempre que puedan identificarse por separado. Dependiendo de la composición y disposición de los dos componentes, las nanoestructuras núcleo-cáscara se pueden dividir en varias clases, incluyendo CSN de tipo inorgánico-inorgánico, inorgánico-orgánico, orgánico-inorgánico y orgánico-orgánico.<sup>81</sup> Las CSN pueden tener propiedades que son sinérgicas entre los núcleos y las cáscaras, ofreciendo nuevas propiedades dependiendo de las interacciones entre ambos componentes.<sup>82</sup> Estas propiedades únicas y adaptables han posicionado a las CSN como una clase muy importante de nanomateriales con aplicaciones en bionanotecnología,<sup>83</sup> dispositivos ópticos mejorados,<sup>84</sup> y la síntesis en fase

---

<sup>80</sup> a) C. F. Hoener, K. A. Allan, A. J. Bard, A. Campion, M. A. Fox, T. E. Mallouk, S. E. Webber, J. M. White. *J. Phys. Chem.* **1992**, *96*, 3812-3817; b) I. Honma, T. Sano, H. Komiyama. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 6692-6695.

<sup>81</sup> a) H. Amouri, C. Desmarests, J. Moussa. *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 2015-2041; b) H. H. Park, K. Woo, J.-P. Ahn. *Sci. Rep.* **2013**, *3*, 1497.

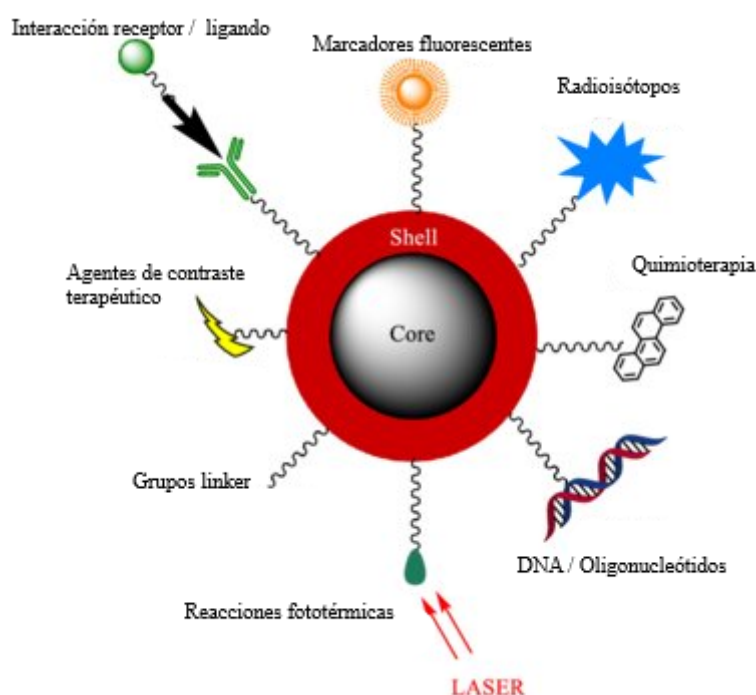
<sup>82</sup> a) D. Wang, Y. Li. *Adv. Mater.* **2011**, *23*, 1044-1060; b) J. Kitchin, J. Nørskov, M. Barteau, *J. Chem. Phys. Rev. Lett.* **2004**, *93*, 156801; c) W. Cha, N. C. Jeong, S. Song, H.-J. Park, T. C. Thanh Pham, R. Harder, B. Lim, G. Xiong, D. Ahn, I. McNulty, J. Kim, K. B. Yoon, I. K. Robinson, H. Kim. *Nat. Mater.* **2013**, *12*, 729-734; d) L. Adijanto, D. A. Bennett, C. Chen, A. S. Yu, M. Cargnello, P. Fornasiero, R. J. Gorte, J. M. Vohs. *Nano Lett.* **2013**, *13*, 2252-2257; e) H. Wang, H. Guo, Y. Dai, D. Geng, Z. Han, D. Li, T. Yang, S. Ma, W. Liu, Z. Zhang, *Appl. Phys. Lett.* **2012**, *101*, 083116.

<sup>83</sup> a) S. Laurent, D. Forge, M. Port, A. Roch, C. Robic, L. Vander Elst, R. N. Muller. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2064-2110; b) X. Gong, S. Peng, W. Wen, P. Sheng, W. Li. *Adv. Funct. Mater.* **2009**, *19*, 292-297; c) W. S. Seo, J. H. Lee, X. Sun, Y. Suzuki, D. Mann, Z. Liu, M. Terashima, P. C. Yang, M. V. McConnell, D. G. Nishimura, H. Dai. *Nat. Mater.* **2006**, *5*, 971-976.

<sup>84</sup> a) J. Zhang, Y. Tang, K. Lee, M. Ouyang. *Nature* **2010**, *466*, 91-95; b) X. Yu, J. Wan, Y. Shan, K. Chen, X. Han. *Chem. Mater.* **2009**, *21*, 4892-4898; c) L. Wang, C. S. Clavero, Z. Huba, K. J. Carroll, E. E. Carpenter, D. Gu, R. A. Lukaszew. *Nano Lett.*, **2011**, *11*, 1237-1240.

Antecedentes -----

sólida de una amplia gama de biopolímeros como oligosacáridos y péptidos, entre otros (Figura 16).<sup>70,85</sup>



**Figura 16.** Representación de las aplicaciones más importantes de las nanopartículas Core-Shell.

Un desafío importante, que a menudo afrontan los químicos que trabajan en el área de la síntesis de compuestos en fase sólida, es el desarrollo de soportes y resinas poliméricas altamente cargadas, inertes, selectivas, robustas, de bajo coste y ambientalmente benignos. Este problema, en su totalidad o en parte, puede ser abordado mediante el desarrollo de resinas con características estructurales núcleo-cáscara.

---

<sup>85</sup> M. Weishaupt, S. Eller, P. H. Seeberger. *Solid Phase Synthesis of Oligosaccharides*, Chapter 22, Academic Press, **2010**, 478, 463-484.

Entre las posibles ventajas que ofrecen este tipo de nanomateriales, se pueden destacar tres principalmente:

- El uso de un núcleo inerte como soporte, lo que favorece el diseño estructural específico de la superficie (*shell*) en términos de porosidad, área superficial, etc., resultando así un rendimiento superior en la capacidad de carga (*loading*) de dicha capa.

- La sinergia entre la cáscara y el núcleo, que permite lograr una mayor eficiencia/rendimiento/selectividad en términos sintéticos.

- La combinación de las propiedades del núcleo y la cáscara conducen a mejoras como, por ejemplo, la eliminación de la porosidad y rigidez estructural característica de materiales ampliamente utilizados en el campo, como es el caso de los soportes CPG en la síntesis de oligonucleótidos, logrando así una mayor expansión de la resina en contacto con los disolventes de la reacción y un aumento de la reactividad superficial de la misma.

## **1.2. Resinas *Core-Shell* de tipo PS-PEG en la síntesis de péptidos**

La síntesis de péptidos altamente agregativos, responsables de diversas enfermedades como el Alzheimer, la encefalopatía espongiforme bovina, el Parkinson y la enfermedad de Huntington, es importante para identificar las causas de estas enfermedades y desarrollar agentes terapéuticos.<sup>86</sup> Para sintetizar estas difíciles secuencias peptídicas se han propuesto métodos

---

<sup>86</sup> a) J. P. Taylor, J. Hardy, K. H. Fischbeck. *Science* **2002**, 296, 1991; b) D. L. Brody, D. M. Holtzman. *Annu. Rev. Neurosci.* **2008**, 31, 175; c) B. Caughey, P. T. Lansbury. *Annu. Rev. Neurosci.* **2003**, 26, 267.

químicos y recombinantes. A pesar de las ventajas del método recombinante, sigue siendo un proceso complicado y no puede proporcionar secuencias peptídicas no naturales y modificadas.

Por el contrario, el método químico, en particular la síntesis en fase sólida, es un proceso simple y fácil de reproducir.<sup>87</sup> Sin embargo, el método químico también tiene limitaciones a la hora de sintetizar secuencias peptídicas agregativas largas.

Uno de los factores más importantes para el éxito de la síntesis en fase sólida es elegir un soporte sólido adecuado. El rendimiento del soporte sólido está estrechamente relacionado con su propiedad de expansión, accesibilidad y compatibilidad con el disolvente, los reactivos y el compuesto sintetizado.

El desarrollo de soportes sólidos altamente eficientes y económicos sigue siendo un desafío en el campo de la química de péptidos. En general, se emplean soportes de tipo gel ligeramente reticulados (1-2%). Sin embargo, estas resinas requieren una capacidad de hinchamiento adecuada para la difusión de los reactivos, lo que limita la elección de disolventes y su uso para sistemas de flujo continuo.<sup>88</sup> Incluso si las resinas están completamente hinchadas, presentan un obstáculo para el acceso de moléculas grandes como las enzimas<sup>89</sup> o la penetración de la luz en las perlas de resina.<sup>90</sup>

---

<sup>87</sup> S. B. Kent, H. Annu. Rev. Biochem. **1988**, 57, 957.

<sup>88</sup> a) J. Kress, R. Zanaletti, A. Rose, J. G. Frey, W. S. Brocklesby, M. Ladlow, M. J. Bradley. *Comb. Chem.* **2003**, 5, 28; b) B. Yan, J. B. Fell, G. J. Kumaravel. *Org. Chem.* **1996**, 61, 7467; c) P. Hodge, *Synthesis and Separations using Functional Polymers*, D. C. Sherrington, P. Hodge, Eds. *John Wiley & Sons: New York*, **1988**; d) S. L. Regen, *Macromolecules* **1975**, 8, 689.

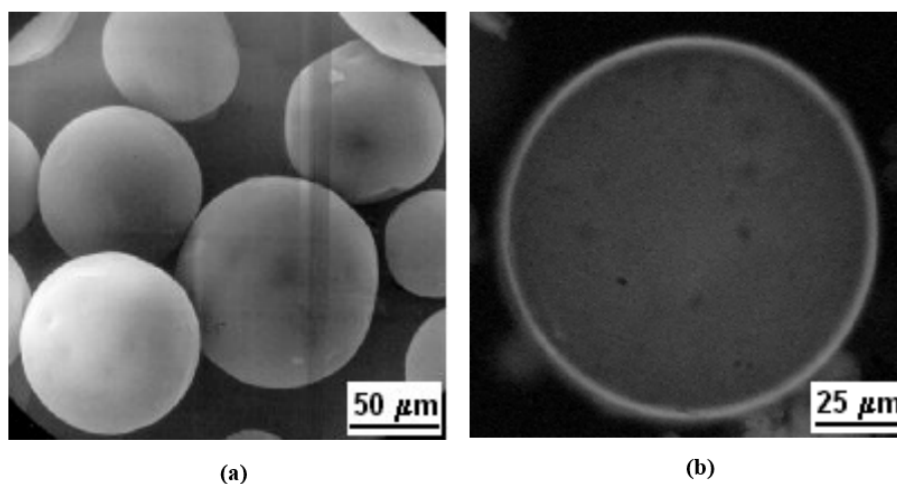
<sup>89</sup> J. Kress, R. Zanaletti, A. Amour, M. Ladlow, J. G. Frey, M. Bradley. *Chem. Eur. J.* **2002**, 8, 3769.

<sup>90</sup> A. Patchnornik, B. Amit, R. B. Woodward. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, 92, 6333.

En un esfuerzo por superar estos inconvenientes, el Prof. Y.-S. Lee y sus colaboradores prepararon nuevas resinas de tipo núcleo-cáscara con un núcleo de poliestireno (PS) altamente reticulado (>4%) cubierto con una carcasa de polietilenglicol (PEG) y mostraron su uso en la síntesis de péptidos en fase sólida. La utilización de un núcleo rígido puede proporcionar buenas propiedades mecánicas y la cáscara flexible funcionalizada puede favorecer un fácil contacto de los reactivos.

Para prepararlas utilizaron la polimerización de una suspensión de estireno. Además, se agregó un macromonómero PEG sintético que tiene un grupo vinilo y un grupo amino en cada extremo como comonómero y estabilizador del sistema de suspensión. Al preparar un copolímero de este tipo, con todos los grupos funcionales ubicados en la cáscara PEG, era de esperar que los reactivos no necesitaran difundirse en el interior de la perla, de modo que todas las reacciones químicas, incluida la fotólisis, pudiesen producirse de manera más efectiva.

Tras la síntesis, las perlas de polímero resultantes se tamizaron y se lavaron con agua, metanol y diclorometano y, finalmente, se secaron en vacío. Todas las resinas obtenidas eran de tipo perla, con un diámetro de 50-200  $\mu\text{m}$  y con capacidades de carga de los grupos amino de 0.05-0.2 mmol/g de resina. La vista transversal de las perlas, teñidas con un marcador fluorescente, mostró que todos los grupos amino estaban ubicados en la parte superficial. El espesor de la cáscara de PEG era de 2-4  $\mu\text{m}$  (Figura 17).



**Figura 17.** (a) Micrografía de barrido electrónico que muestra las perlas esféricas preparadas por polimerización en suspensión. (b) Vista transversal de resinas PS-PEG tipo núcleo-cáscara mediante microscopio de fluorescencia.

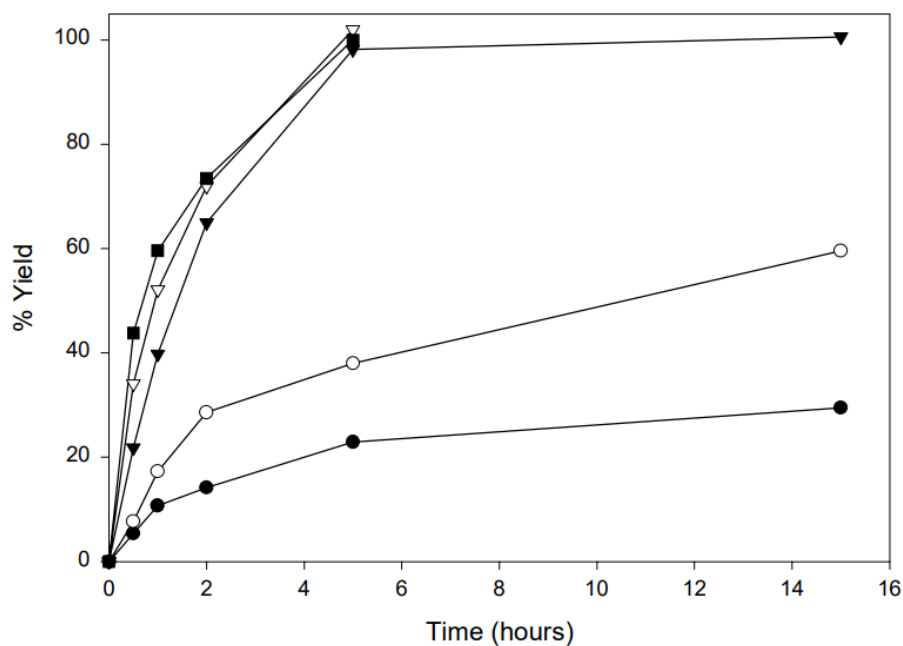
Se descubrió que estas resinas se hinchaban menos que las de tipo TentaGel tanto en agua como en la mayoría de los disolventes orgánicos. Con un disolvente hidrofóbico como el diclorometano, se hinchaban menos que las resinas PS. Esto se debe a la alta reticulación en el núcleo de la perla de resina.

La carga inicial se mantuvo sin cambios incluso en condiciones de reacción severas.

Para comprobar el rendimiento de las nuevas resinas, se sintetizó un dipéptido modelo, Fmoc-Gly-Phe-OH, y se introdujo un *linker* fotolábil, el grupo *o*-nitrobenzil, en las resinas.<sup>91</sup> Posteriormente, el péptido se liberó del enlazador mediante fotólisis y el producto se analizó cuantitativamente por HPLC.

---

<sup>91</sup> D. H. Rich, S. K. Gurwara. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 1575-1579.



**Figura 18.** Perfiles cinéticos de la fotólisis obtenidos para cada resina: PS (●), TentaGel (○), PS-PEG-NH<sub>2</sub> (▼), PS-PEG-NH<sub>2</sub>-Lys (▽), PS-PEG-NH<sub>2</sub>-Lys-(Lys)<sub>2</sub> (■).

Para esta prueba se emplearon las resinas tipo núcleo-cáscara PS-PEG-NH<sub>2</sub> (0.13 mmol NH<sub>2</sub>/g) y las de capacidad de carga amplificadas como la PS-PEG-NH<sub>2</sub>-Lys (0.21 mmol NH<sub>2</sub>/g) y la PS-PEG-NH<sub>2</sub>-Lys-(Lys)<sub>2</sub> (0.30 mmol NH<sub>2</sub>/g). A modo de comparación, se utilizaron la resina de aminoisopropilpoliestireno (PS) (1.22 mmol NH<sub>2</sub>/g) y la resina TentaGel (0.26 mmol NH<sub>2</sub>/g) en idénticas condiciones de reacción.

Se encontró que las resinas PS-PEG tipo núcleo-cáscara eran más eficientes que la resina PS e incluso que la resina TentaGel. En cuanto a la velocidad de escisión fotolítica del producto peptídico, en las resinas PS-PEG tipo núcleo-cáscara fue también mucho más rápida que en las resinas PS o TentaGel. Se observa que los procesos son más rápidos con las resinas

## Antecedentes -----

de carga amplificada mediante el acoplamiento con Boc-Lys-(Boc)-OH. Además, las resinas PS-PEG tipo núcleo-cáscara liberaron el producto con rendimiento cuantitativo en 5 h. Sin embargo, después de 15 h, la resina PS liberó tan solo el 29% (similar a resultados anteriores)<sup>92</sup> y la resina TentaGel el 59% de los productos (Figura 18).

A partir de estos resultados, se encontró que las resinas PS-PEG tipo *Core-Shell* estaban libres del efecto retardante causado por el grupo nitroso resultante durante la fotólisis.<sup>93</sup> El menor rendimiento de la resina PS parecía razonable porque no se hinchó lo suficiente en un disolvente hidrófilo como el metanol.

A pesar de que estas resinas mostraron un comportamiento adecuado en las reacciones de escisión fotolítica y enzimática,<sup>69,94</sup> presentan cargas relativamente bajas (0.05-0.2 mmol/g) y la preparación de los macromonómeros fue demasiado complicada.

Posteriormente, se diseñaron, caracterizaron y estudiaron nuevas resinas de núcleo-cáscara (*Core-Shell*, CS) preparadas fácilmente a partir de aminometilpoliestireno disponible comercialmente (AM-PS, BeadTech).<sup>95</sup>

Aunque estas resinas CS resultantes eran menos hinchables que las resinas tipo gel, como resultado de su mayor grado de reticulación, su cáscara anfifílica de polietilenglicol les permitió ser compatibles con una amplia gama de disolventes hidrófilos/hidrófobos.

---

<sup>92</sup> S. J. Wang. *J. Org. Chem.* **1976**, *41*, 3258-3261.

<sup>93</sup> A. Patchnornik, B. Amit, R. B. Woodward, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 6333-6335.

<sup>94</sup> J. K. Cho, B. D. Park, K. B. Park, Y. S. Lee. *Macromol. Chem. Phys.* **2002**, *203*, 2211-2217.

<sup>95</sup> <http://www.beadtech.co.kr>.



Los resultados obtenidos con la resina CS óptima (0.37 mmol/g) se compararon con los de la resina TentaGel-NH<sub>2</sub> (0.30 mmol/g) y la resina AM-PS (reticulado al 1%). Durante el curso del ensamblaje del péptido en las resinas, se encontró que la carga del primer aminoácido en la resina CS ocurría de manera mucho más eficiente que en las otras resinas. En la síntesis orgánica en fase sólida, se sabe que la carga inicial es un paso problemático debido al efecto de la matriz de la cadena polimérica principal.<sup>96</sup> Sin embargo, este problema parece minimizarse en las resinas CS. Para examinar detalladamente la cinética del proceso, se investigaron los rendimientos de acoplamiento de Fmoc-Leu de acuerdo con el tiempo de acoplamiento. La velocidad de acoplamiento en la resina CS fue entre 2-4 veces más rápida que la de TentaGel, la resina PS de baja carga (*Low Loading*, LL) o la resina PS de alta carga (*High Loading*, HL).

Después de la síntesis de péptidos en fase sólida, se llevaron a cabo reacciones de fotoescisión en cada resina. Como era de esperar, en comparación con las otras resinas, la resina CS exhibió un excelente rendimiento en la reacción de fotoescisión. Dicha resina liberó el producto rápidamente y proporcionó más del 95% de rendimiento en 1 h. En contraste, la resina TentaGel liberó sólo el 72% del producto, y las resinas LL PS y HL PS liberaron solo el 41% y el 34% del producto, respectivamente, incluso después de 3 h. La diferencia en el rendimiento entre las resinas TentaGel y PS puede deberse, en parte, al diferente grado de expansión de las resinas en el metanol.<sup>97</sup> A diferencia de las resinas de gel, se descubrió que el rendimiento de la resina CS no estaba relacionado con su capacidad de hinchamiento.

Si bien este tipo de resinas ofrecen resultados alentadores en la síntesis de péptidos, la utilización de dos etapas en la polimerización,<sup>69,71</sup> la

---

<sup>96</sup> a) W. Li, B. Yan. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 4092-4097; b) A. Basso, B. Evans, N. Pegg, M. Bradley. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 3763-3767.

<sup>97</sup> C. P. Holmes. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 2370-2380.

reticulación del núcleo<sup>70,98</sup> o la hidrólisis parcial<sup>99</sup> en la preparación de la estructura *Core-Shell* de la perla de polímero requiere procedimientos complicados y condiciones drásticas.

Para solucionar estos problemas, Lee diseñó un procedimiento a partir de una resina de aminometil poliestireno (AM PS) usando un método de funcionalización bifásico sencillo y económico en condiciones suaves de reacción. La resina resultante posee buenas propiedades de hinchamiento y una estructura clara tipo núcleo-cáscara que puede ser fácilmente controlada y reproducida. Para evaluar el comportamiento de la resina se sintetizaron varias secuencias peptídicas difíciles, un puente disulfuro péptido cíclico y un ácido peptídico nucleico. Esta resina mostró mejores resultados en comparación con otras resinas convencionales que no presentaban estructura de tipo *Core-Shell*.<sup>63</sup>

---

<sup>98</sup> T. K. Lee, J. H. Choi, S. J. Ryoo, Y.-S. Lee. *J. Pept. Sci.* **2007**, *13*, 655-661.

<sup>99</sup> a) T. K. Lee, S. J. Ryoo, J. W. Byun, S. M. Lee, Y. S. Lee. *J. Comb. Chem.* **2005**, *7*, 170-173; b) T. K. Lee, S. M. Lee, S. J. Ryoo, J. W. Byun, Y. S. Lee, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 7135-7138; c) J. H. Choi, T. K. Lee, J. W. Byun, Y. S. Lee, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 4272-4275.

**Objetivos**



El desarrollo de soportes sólidos altamente eficientes y económicos para la síntesis de oligonucleótidos en fase sólida es un importante desafío, pues los actuales soportes comercialmente disponibles, principalmente poliestireno (PS) y vidrio de poro controlado (CPG), son muy costosos y poseen una capacidad de carga relativamente baja.

En vista de los excelentes resultados obtenidos con las resinas de tipo *Core-Shell* en la síntesis de péptidos, estos soportes sólidos se presentan como una nueva alternativa en el campo de los oligonucleótidos.

El objetivo de este capítulo es evaluar las nuevas resinas *Core-Shell* de tipo PS-PEG y demostrar que pueden ser empleadas de manera viable y factible en la síntesis convencional de oligonucleótidos en fase sólida.



## Resultados y discusión





El desarrollo de la metodología sintética en fase sólida para la síntesis de macrobiomoléculas como péptidos, oligonucleótidos y oligosacáridos es una de las principales contribuciones de la química orgánica a las ciencias de los materiales y de la salud.<sup>100</sup>

A medida que aumenta la demanda de oligonucleótidos terapéuticos, se requiere disponer de nuevas estrategias y metodologías sintéticas para un desarrollo más efectivo de los mismos a escala industrial, por lo que se están reanalizando los métodos estándar preexistentes de síntesis para satisfacer las necesidades de oligonucleótidos en grandes cantidades.<sup>73</sup> Además, también se está revisando y minimizando el gran consumo de reactivos y disolventes utilizados en los protocolos de síntesis en fase sólida.<sup>68</sup>

Por otro lado, las propiedades físicas y mecánicas de los soportes insolubles utilizados en este tipo de síntesis juegan un papel crucial en el éxito de los protocolos desarrollados, así como su capacidad para lograr la mayor carga posible sin interferir en los rendimientos de la etapa de acoplamiento del proceso sintético.<sup>101</sup>

---

<sup>100</sup> R. Breinbauer, Solid-Phase Synthesis of Biomolecules en “Wiley Encyclopedia of Chemical Biology” **2008** (<https://doi.org/10.1002/9780470048672.webcb552>).

<sup>101</sup> M. Catani, C. de Luca, J. M. Alcantara, N. Manfredin, D. Perrone, E. Marchesi, R. Weldon, T. Müller-Spáth, A. Cavazzini, M. Morbidelli, M. Sponchioni. *Biotechnol. J.* **2020**, *15*, e1900226.

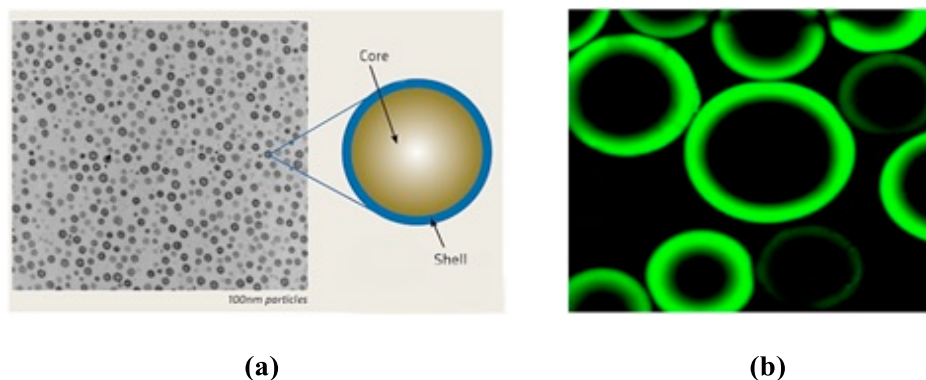
Históricamente, la síntesis de oligonucleótidos en fase sólida utilizando fosforamiditos fue diseñada y desarrollada, principalmente, utilizando soportes de sílice y vidrio de poro controlado (CPG).<sup>102</sup> Estos soportes permiten ciclos de síntesis rápidos, ideales para procesos a pequeña escala, pero poseen el inconveniente de ser mecánicamente inestables y de presentar capacidades de carga muy bajas (~50  $\mu\text{mol/g}$ ). Por otro lado, también fueron desarrollados soportes sólidos de poliestireno (PS) altamente entrecruzado para aplicaciones a pequeña escala (50-200 nmol) que ofrecen la posibilidad de mayores rendimientos de acoplamiento debido a su naturaleza altamente hidrofóbica, lo que permite una rápida eliminación del agua de la disolución de yodo utilizada en la etapa oxidativa del ciclo sintético.<sup>45</sup>

En la actualidad, los soportes sólidos más demandados para la síntesis de oligonucleótidos a escala industrial son los soportes de poliestireno *NittoPhase*,<sup>66</sup> el *Primer Support 5G*<sup>101</sup> y el soporte *HybCPG* a base de sílice.<sup>67</sup>

En este capítulo, evaluaremos la idoneidad de un nuevo soporte sólido de tipo *Core-Shell* conformado por un núcleo (*Core*) de PS y un recubrimiento de una longitud controlable de PEG (*Shell*), inicialmente diseñado y desarrollado para la síntesis de péptidos en fase sólida.<sup>63</sup> Estos dos tipos de materiales hacen que las propiedades de estos soportes adquieran un compromiso entre el poliestireno hidrófobo y los soportes de polietilenglicol tipo gel con elevada resistencia mecánica y alta capacidad de carga. Como los grupos funcionales se distribuyen en la capa externa del soporte, las reacciones de acoplamiento son rápidas, tal y como se ha observado en su aplicación en la síntesis de péptidos (Figura 19a).

---

<sup>102</sup> M. H. Caruthers, A. D. Barone, S. L. Beaucage, D. R. Dodds, E. F. Fisher, L. J. McBride, M. Matteucci, Z. Stabinsky, J. Y. Tang. *Methods Enzymol.*, **1987**, *154*, 287-313.

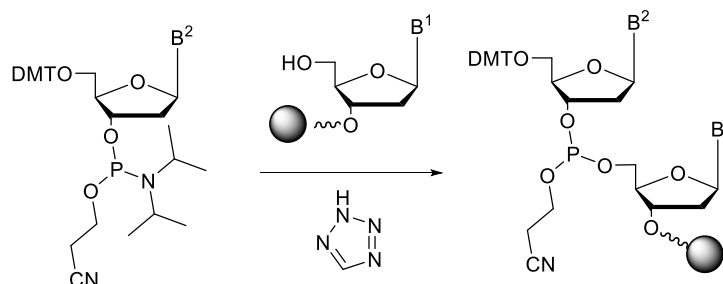


**Figura 19.** (a) Esquema de estructura de nanopartículas tipo *Core-Shell*; (b) Imagen de partículas *Core-Shell* del tipo PS-PEG por microscopía de fluorescencia.

Previamente al estudio de la síntesis de oligonucleótidos utilizando diferentes soportes, tendremos en cuenta algunas consideraciones respecto a su preparación.

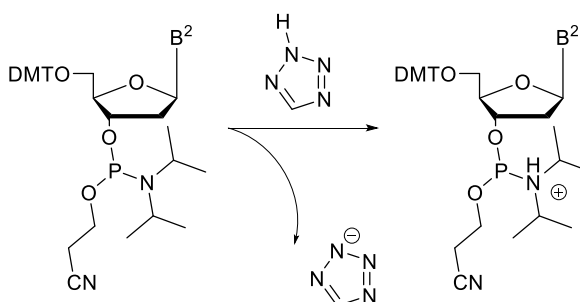
## 1. EL AGENTE DE ACOPLAMIENTO

La síntesis de oligonucleótidos en fase sólida utilizando el método del fosforamidito, representa una estrategia muy conveniente y efectiva. Con el fin de garantizar una síntesis exitosa con una elevada eficiencia, la reacción crítica de acoplamiento entre los fosforamiditos y el hidroxilo libre en la posición 5' del nucleósido debe ser rápida y casi cuantitativa (Esquema 17), lo que requiere que los fosforamiditos estén activados por un agente de acoplamiento eficiente.



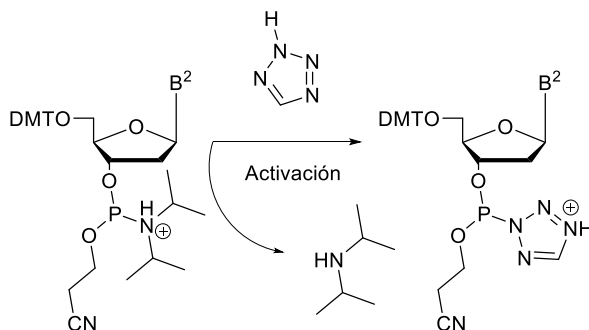
**Esquema 17.** Etapa de acoplamiento de fosforamidito usando 1*H*-tetrazol como agente de acoplamiento.

Los estudios de los mecanismos de acoplamiento indican que el activante desempeña un doble papel. Por un lado, posee un carácter lo suficientemente ácido como para iniciar la protonación de la fracción de amina en el fosforamidito (Esquema 18), pero no demasiado como para provocar reacciones secundarias no deseadas durante el proceso de síntesis, como podrían ser la hidrólisis del grupo protector DMT o la hidrólisis de las bases orgánicas nitrogenadas (despurinación y despirimidinación).



**Esquema 18.** Protonación del fosforamidito por el agente activante.

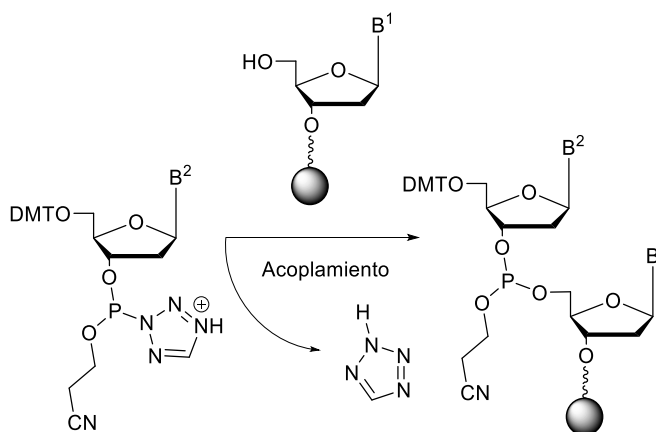
Por otro lado, debe actuar como buen nucleófilo para poder atacar a la fosfina y generar el intermedio reactivo clave (Esquema 19).



**Esquema 19.** Formación de un fosforamidito activado muy reactivo.

Éstas son las características a tener en cuenta en la mayoría de los diseños de activantes.

El 1*H*-tetrazol y el 5-benciltio-1*H*-tetrazol (BTT) se utilizan muy a menudo como agentes activantes en la reacción de acoplamiento en la síntesis en fase sólida de ácidos nucleicos (Esquema 20).



**Esquema 20.** Etapa de acoplamiento durante la elongación de la cadena del oligonucleótido.

Los derivados del tetrazol son más apropiados que el 1*H*-tetrazol debido a su alta acidez (Tabla 2). Además, el uso de 1*H*-tetrazol acarrea otros problemas adicionales debido a su elevada explosividad y, aunque en el pasado fue muy utilizado, actualmente se tienden a utilizar otras alternativas como el empleo de derivados tales como el BTT.

Se pueden utilizar muchos activantes en la síntesis de oligonucleótidos. Para su selección hay que tener en cuenta varios factores como son: el coste, la solubilidad en acetonitrilo, la reactividad y la toxicidad. Los activantes como 1*H*-tetrazol, 5-etiltio-1*H*-tetrazol (ETT), 5-benciltio-1*H*-tetrazol y 4,5-dicianoimidazol (DCI) están disponibles comercialmente y son adecuados para la síntesis automática con soporte sólido. La solubilidad en acetonitrilo es un parámetro importante, ya que el activante con baja solubilidad tiene tendencia a cristalizar al ser usado en una disolución concentrada, lo cual afectaría a la estabilidad de dicha

disolución. Otro problema adicional, muy frecuente en el proceso automatizado de síntesis, es que dichos cristales pueden provocar importantes bloqueos en los tubos capilares del sintetizador, dando lugar a averías en los equipos. Las solubilidades de los activantes más comunes en acetonitrilo se resumen también en la en la Tabla 2.<sup>103</sup>

**Tabla 2.** Resumen de los valores de pKa y solubilidad en acetonitrilo de agentes activantes más comunes.

Entrada	Activante	Abreviatura	pKa	Solubilidad ACN (M)
1	1 <i>H</i> -tetrazol	-	4.8	0.5
2	5-(4-nitrofenil)-1 <i>H</i> -tetrazol	4-NPT	3.7	0.12
3	5-(Bis-3,5-trifluorometilfenil)-1 <i>H</i> -tetrazol	Activador-42	3.4	0.94
4	5-etiltio-1 <i>H</i> -tetrazol	ETT	4.3	1.52
5	5-benciltio-1 <i>H</i> -tetrazol	BTT	4.08	0.44
6	5-metiltio-1 <i>H</i> -tetrazol	MTT	4.15	> 2.0
7	1-metil-5-mercaptotetrazol	1-Me-MCT	3.86	≥ 0.5
8	1-fenil-mercaptotetrazol	1-Ph_MCT	3.65	≥ 0.5
9	4,5-dicianoimidazol	DCI	5.2	1.1

Diferentes estudios muestran que los activantes de tetrazol modificados con mayor acidez, como ETT, 4-NPT, Activador-42 y MCT, son superiores al 1*H*-tetrazol en la síntesis de ADN.<sup>104,105,106,107</sup> Pero hay que tener en cuenta que su alta acidez puede aumentar la formación de subproductos no deseados debido a la eliminación del DMT u otros grupos

<sup>103</sup> X. Wei. *Tetrahedron* **2013**, *69*, 3615-3637.

<sup>104</sup> P. Wright, D. Lloyd, W.Rapp, A. Andrus. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 3373-3376.

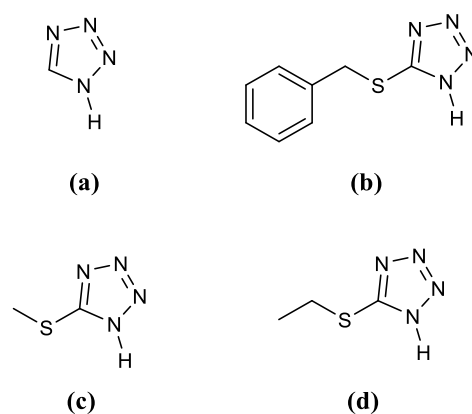
<sup>105</sup> Y. Hayakawa, M. Kataoka. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1175-e11762.

<sup>106</sup> A. Wolter, M. Leuck. U.S. Patent 0,247,431, **2006**.

<sup>107</sup> V. A. Efimov, A. L. Kalinkina, O. G. Chakhmakhcheva. *Russ. J. Bioorg. Chem.* **1996**, *22*, 128-130.

protectores durante la síntesis y, por lo tanto, minimizar el rendimiento del acoplamiento.

En el trabajo desarrollado en esta tesis, se utilizó como agente de acoplamiento un derivado del *1H*-tetrazol, concretamente el 5-(benciltio)-*1H*-tetrazol (Figura 20b), más conocido por sus siglas BTT.



**Figura 20.** Tetrazoles más utilizados como agentes activantes: (a) *1H*-tetrazol; (b) BTT; (c) MTT; (d) ETT.

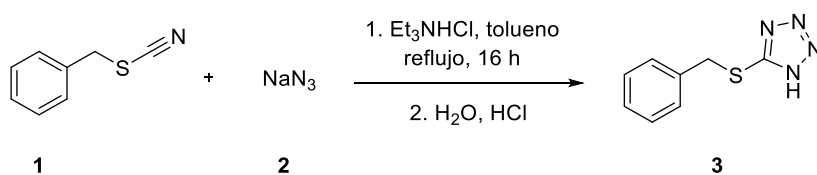
### 1.1. Síntesis de 5-benciltio-*1H*-tetrazol (BTT) mediante cicloadición 1,3-dipolar

La síntesis del agente activante se llevó a cabo utilizando una reacción de cicloadición en la que participa una molécula 1,3-dipolar, que forma un dipolo eléctrico a nivel molecular por deslocalización electrónica a lo largo de 3 átomos, y un dipolarófilo que reaccionará con la molécula dipolar para obtener el compuesto esperado mediante un mecanismo de cicloadición pericíclica concertada.<sup>108</sup> En este caso, se utilizó la azida de sodio como molécula dipolar y el tiocianato de bencilo como dipolarófilo.

<sup>108</sup> R. Huisgen. *Angew. Chem. Int.* **1963**, 2, 633-645.

Resultados y discusión -----

La reacción se realizó a reflujo de tolueno, aislándose tras 16 horas el BTT con un 86% de rendimiento y elevada pureza. (Esquema 21).



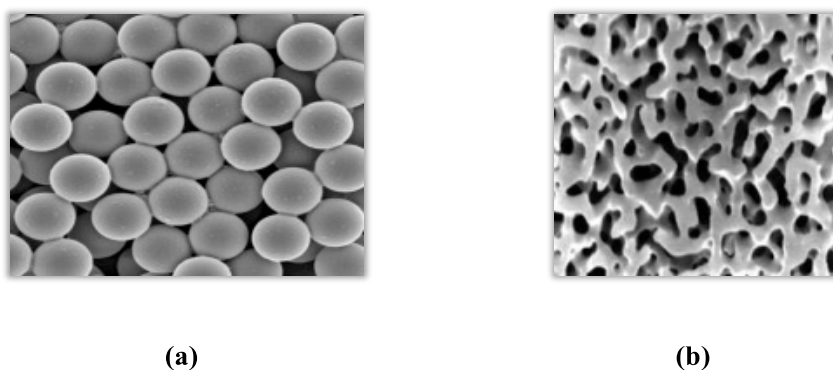
**Esquema 21.** Síntesis de 5-(benciltio)-1H-tetrazol (BTT, **3**) mediante reacción de cicloadición 1,3-dipolar utilizando: tiocianato de bencilo (**1**), azida de sodio (**2**) y cloruro de trietilamonio.



## 2. EL SOPORTE SÓLIDO

### 2.1. La difusión en soportes sólidos

Para el estudio se eligieron dos resinas de tipo PS-PEG de elevada capacidad de carga ( $\sim 230 \mu\text{mol/g}$ ) que habían sido diseñadas para superar el problema de la deficiente difusión de disolventes y reactivos en los soportes convencionales de poliestireno (PS, Figura 21a) y vidrio de poro controlado (CPG, Figura 21b).



**Figura 21.** Resinas utilizadas como soportes sólidos convencionales en la síntesis de ácidos nucleicos: (a) partículas de poliestireno (PS); (b) vidrio de poro controlado (CPG).

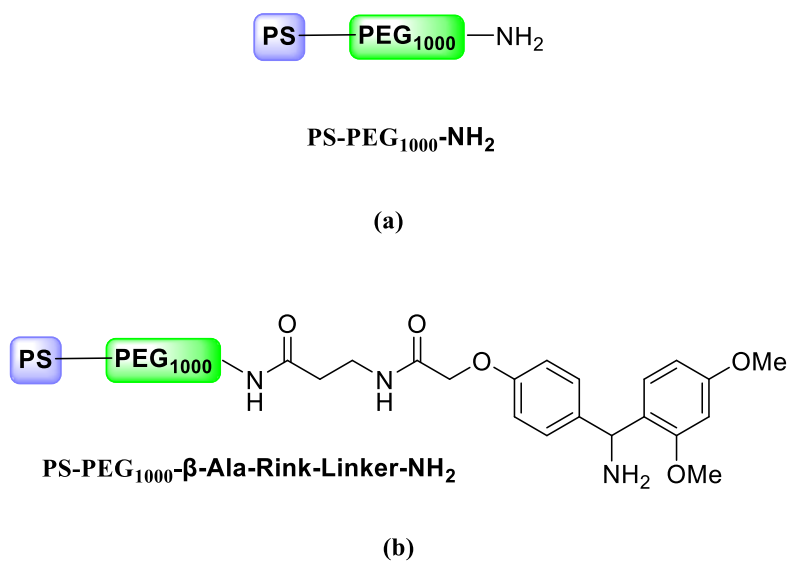
Estos problemas de difusión tienen su origen y causalidad en la distribución homogénea de los centros reactivos por todo el soporte. Es decir, que los sitios donde irán ancladas las cadenas de oligonucleótidos durante el proceso sintético se distribuyen por todas las partes del polímero, provocando que tanto los reactivos como los disolventes utilizados en la síntesis no puedan llegar por igual a todas las partes de la resina.

Por otro lado, en el caso de los materiales porosos como el CPG, el crecimiento de las cadenas oligonucleotídicas en el interior de los poros hace que estos se bloqueen conforme las cadenas se hacen más grandes y voluminosas, provocando impedimentos estéricos significativos y una deficiente distribución de los disolventes y reactivos necesarios para las

síntesis o desanclaje de los compuestos formados, lo cual se traduce en una limitación importante en el rendimiento y/o la calidad de los productos finales obtenidos.

Los soportes *Core-Shell* de tipo PS-PEG que se estudiarán tienen los sitios reactivos exclusivamente en la superficie externa del recubrimiento de polietilenglicol que conforma las partículas de la resina, lo cual aumenta de forma considerable la accesibilidad de los mismos.

La estructura de las resinas seleccionadas se muestra en la Figura 22. Su efectividad ya ha sido probada y demostrada en la síntesis de péptidos complejos en fase sólida,<sup>63</sup> pero nunca antes con oligonucleótidos.



**Figura 22.** Resinas *Core-Shell* de tipo PS-PEG estudiadas en este capítulo: (a) PEG029; (b) PEG024.

## 2.2. La expansión del soporte sólido

El hinchamiento (*swelling*) en las resinas es el aumento de volumen de una resina cuando se expone a un disolvente o a una disolución. El factor de expansión es importante para la síntesis en fase sólida, ya que afecta a la cinética, a los rendimientos y a las conversiones de la reacción. Esta característica varía con el tipo de resina, dependiendo de su composición química, reticulación, porosidad y compatibilidad con los disolventes.

La cinética de la reacción está controlada por el proceso de difusión. En consecuencia, la resina que se hincha más tendrá una mayor difusión de los reactivos en el núcleo de la matriz, lo que dará como resultado tiempos de reacción más cortos y mayores conversiones químicas.

En el caso de la síntesis de ácidos nucleicos, los dos soportes sólidos más utilizados son el PS y el CPG. En términos de expansividad, el CPG es un material rígido y poroso que no presenta ningún aumento de volumen en los disolventes utilizados durante la síntesis.

El poliestireno no reticulado o lineal se disuelve en disolventes hidrófobos y precipita en disolventes próticos, por lo que la mayoría de los soportes de poliestireno utilizados contienen un 1% o 2% de divinilbenceno (DVB) como agente de reticulación. Estos poliestirenos reticulados son insolubles en todos los disolventes comunes. Por lo general, estas resinas se preparan y utilizan como pequeñas perlas esféricas.

A pesar de que las resinas de poliestireno reticulado son insolubles en disolventes orgánicos, son solvatadas e hinchadas por disolventes apróticos como el tolueno, la dimetilformamida (DMF) y el diclorometano (DCM). Un gramo de resina reticulada DVB al 1% se hinchará de 4 a 6 veces su volumen original en DCM. Por el contrario, un gramo de resina reticulada DVB al 2% se hincha solo de 2 a 4 veces su volumen original en DCM.

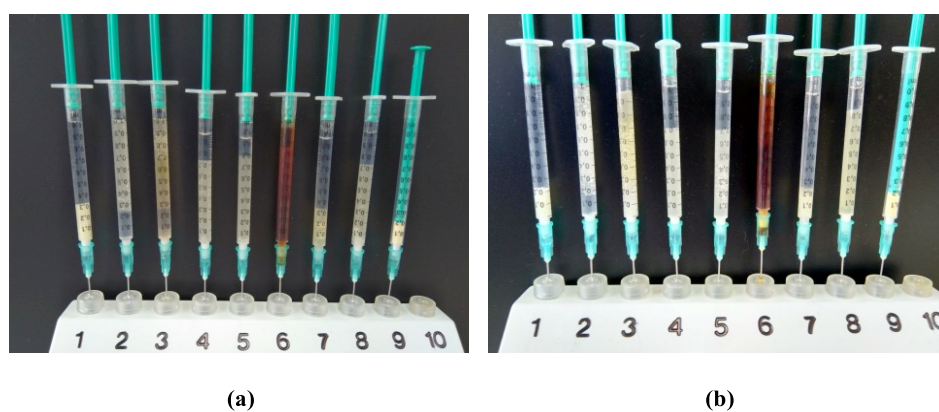
En la Tabla 3 se enumeran los factores de hinchamiento típicos del poliestireno reticulado al 1% en una selección de disolventes comunes.

**Tabla 3.** Factor de hinchamiento del poliestireno reticulado al 1% en varios disolventes.

<b>Disolvente</b>	<b>Hinchamiento (mL/g)</b>	<b>Disolvente</b>	<b>Hinchamiento (mL/g)</b>
<b>THF</b>	5,5	<b>ACN</b>	3,5
<b>Tolueno</b>	5,3	<b>Et<sub>2</sub>O</b>	3,2
<b>DCM</b>	5,2	<b>EtOH</b>	2,0
<b>1,4-Dioxano</b>	4,9	<b>MeOH</b>	1,8
<b>DMF</b>	4,7	<b>H<sub>2</sub>O</b>	--

Aunque una mayor expansión de la resina en contacto con los disolventes es más efectiva en términos de rendimiento y tiempos cortos de reacción, en el caso de la síntesis automatizada de oligonucleótidos es preciso llegar a un compromiso, ya que este tipo de síntesis está limitada por el volumen de la columna donde tiene lugar la reacción. Un hinchamiento excesivo del soporte sólido podría conllevar a un bloqueo por sobrepresión de la columna y, por consiguiente, una pérdida de efectividad en la difusión de disolventes y reactivos, mermando así la capacidad del sistema. Por tanto, serán preferibles soportes sólidos con hinchamientos moderados.

Así, se ha estudiado el hinchamiento de las resinas PEG024 y PEG029 en los diferentes disolventes utilizados durante la síntesis de oligonucleótidos. Para ello, se realizó un experimento en el que un determinado volumen de resina seca (0.2 mL) fue introducida en una jeringuilla graduada de 1 mL de volumen total, que posteriormente se rellenó con el disolvente de interés. Tras 16 h en contacto con el disolvente, se midió el incremento de volumen experimentado por la resina (Figura 23).



**Figura 23.** Experimento para el estudio del hinchamiento de las resinas: (a) PEG024 y (b) PEG029. Disolventes utilizados: (1) ACN; (2)  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; (3) destilación (3% de ácido dicloroacético en diclorometano); (4) CAP-A (THF/Py/ $\text{Ac}_2\text{O}$ , 8:1:1); (5) CAP-B (10% de 1-metilimidazol en THF); (6) oxidación (0.02 M  $\text{I}_2$  en Py/THF/ $\text{H}_2\text{O}$ , 88:10:2); (7) tolueno; (8) THF. En las posiciones (9) se encuentran las resinas secas en ausencia de disolvente.

Los resultados obtenidos se encuentran recogidos en las Tablas 4 y 5.

*Resultados y discusión* -----

**Tabla 4.** Valores de hinchamiento de la resina PEG024 [133.5 mg,  $V_0$  (resina seca) = 0.2 mL] en diferentes disolventes.

<b>Disolvente</b>	<b><math>V_1</math> (mL) (resina húmeda)</b>	<b><math>V_1 - V_0</math> (<math>\mu</math>L)</b>	<b>Hinchamiento (mL/g)</b>
1. ACN	0.30	0.10	<b>0.75</b>
2. $\text{CH}_2\text{Cl}_2$	0.85	0.65	<b>4.88</b>
3. Destritilación	0.80	0.60	<b>4.51</b>
4. CAP-A	0.75	0.55	<b>4.13</b>
5. CAP-B	0.80	0.60	<b>4.51</b>
6. Oxidación	0.85	0.65	<b>4.88</b>
7. Tolueno	0.30	0.10	<b>0.75</b>
8. THF	0.75	0.55	<b>4.13</b>
9. No disolvente	-	-	-

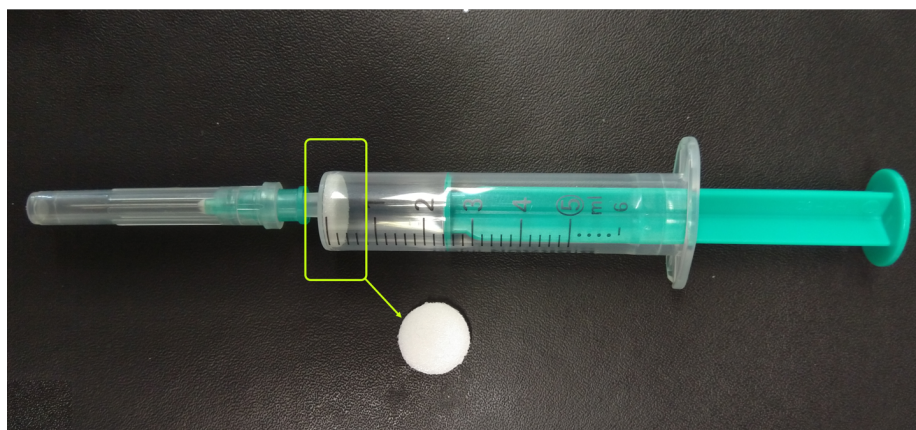
**Tabla 5.** Valores de hinchamiento de la resina PEG029 [120,5 mg,  $V_0$  (resina seca) = 0.2 mL] en diferentes disolventes.

<b>Disolvente</b>	<b><math>V_1</math> (mL) (resina húmeda)</b>	<b><math>V_1 - V_0</math> (<math>\mu</math>L)</b>	<b>Hinchamiento (mL/g)</b>
1. ACN	0.20	0.00	-
2. $\text{CH}_2\text{Cl}_2$	0.80	0.60	<b>4.97</b>
3. Destritilación	0.80	0.60	<b>4.97</b>
4. CAP-A	0.70	0.50	<b>4.15</b>
5. CAP-B	0.70	0.50	<b>4.15</b>
6. Oxidación	0.90	0.70	<b>5.81</b>
7. Tolueno	0.20	0.00	-
8. THF	0.70	0.50	<b>4.15</b>
9. No disolvente	-	-	-

### 3. SÍNTESIS DE OLIGONUCLEÓTIDOS EN FASE SÓLIDA

Para llevar a cabo el estudio de la viabilidad de las resinas *Core-Shell* como soporte sólido alternativo en la síntesis de oligonucleótidos en fase sólida, se procedió, en primer lugar, a realizar una síntesis manual de secuencias cortas de oligonucleótidos sencillos de ADN.

El método de síntesis manual consistió en el ensamblaje de oligonucleótidos por el método del fosforamidito mediante protocolos convencionales utilizando reactivos y disoluciones anhídras descritos en la bibliografía,<sup>109</sup> y usando un sencillo sistema de jeringuillas desechables de plástico provistas de una frita de polipropileno en su interior, como reactor (Figura 24).



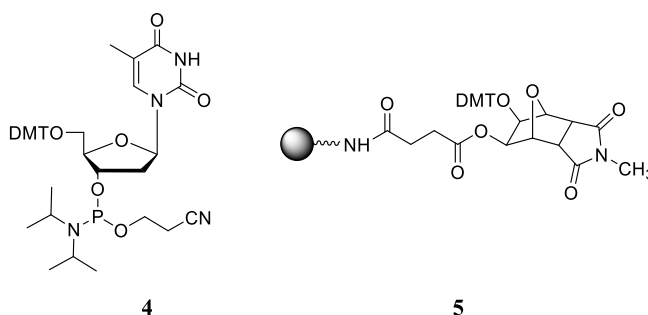
**Figura 24.** Jeringuilla desechable como reactor en la síntesis manual de oligonucleótidos.

#### 3.1. Puesta a punto del método de síntesis. Primeras secuencias con una resina universal

Para poner a punto tanto los protocolos de síntesis como el equipamiento utilizado, se prepararon una serie de dímeros sencillos en una escala entre 1 y 2  $\mu\text{mol}$ . Para tal fin, se eligió el fosforamidito de

<sup>109</sup> R. Güimil, R. Eritja. *Microinjection and Transgenesis* **1998**, 5, 96-112.

timidina (T) (**4**, Figura 25) ya que, al carecer de grupos protectores en la base, evitaría posibles complicaciones. La resina elegida para llevar a cabo estas pruebas fue la “CUTAG” (**5**, Figura 25), una resina CPG de tipo universal (comercializada por Merck) con un tamaño de poro de 500 Å y una carga inicial del *linker* de 30-40 µmol/g.



**Figura 25.** Estructura molecular del fosforamidito de timidina **4** y del *linker* universal de la resina “CUTAG” (Merck) **5**.

Los disolventes y reactivos utilizados en cada etapa de síntesis fueron los siguientes:

- Destritilación: una disolución al 3% de ácido dicloroacético en diclorometano anhidro.
- Acoplamiento: una disolución 0.1 M del fosforamidito en acetonitrilo anhidro y una disolución 0.4 M del agente activante BTT (Figura 20b) también en acetonitrilo anhidro.
- Acetilación: una disolución CAP-A compuesta de THF/Py/anhídrido acético en proporción 8:1:1 y otra de CAP-B formada por 10% de 1-metilimidazol en THF.
- Oxidación: disolución 0.02 M de yodo en Py/THF/AcOH en proporción 88:10:2.

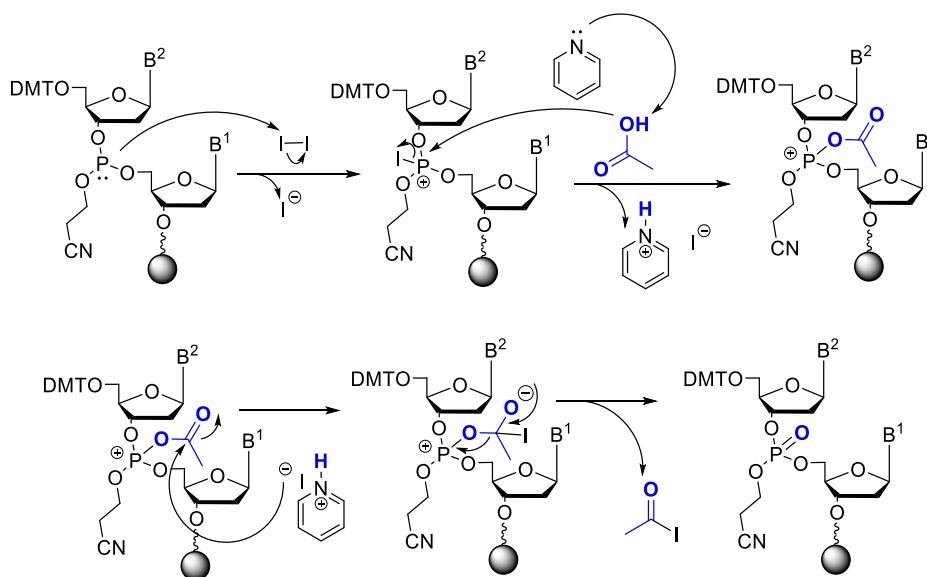
Cabe destacar que en la etapa oxidativa la mezcla de reactivos utilizados habitualmente lleva un 2% de H<sub>2</sub>O en lugar de ácido acético. El agua juega



un papel importante en el paso de oxidación de P(III) a P(V) actuando como nucleófilo y desplazando al yodo (Esquema 10).

Pero el agua puede ser perjudicial en la etapa de acoplamiento, ya que compite con el hidroxilo 5' libre del nucleósido anclado en la resina a la hora de unirse a la posición 3' del fosforamidito. Esto ocurre frecuentemente cuando el agua no ha sido bien eliminada antes de llegar a esta etapa de síntesis.

Para evitar este inconveniente puede sustituirse el agua de la mezcla oxidante por otro nucleófilo como el ácido acético (1-2%), que permitirá la oxidación del fósforo en ausencia de H<sub>2</sub>O (Esquema 22).

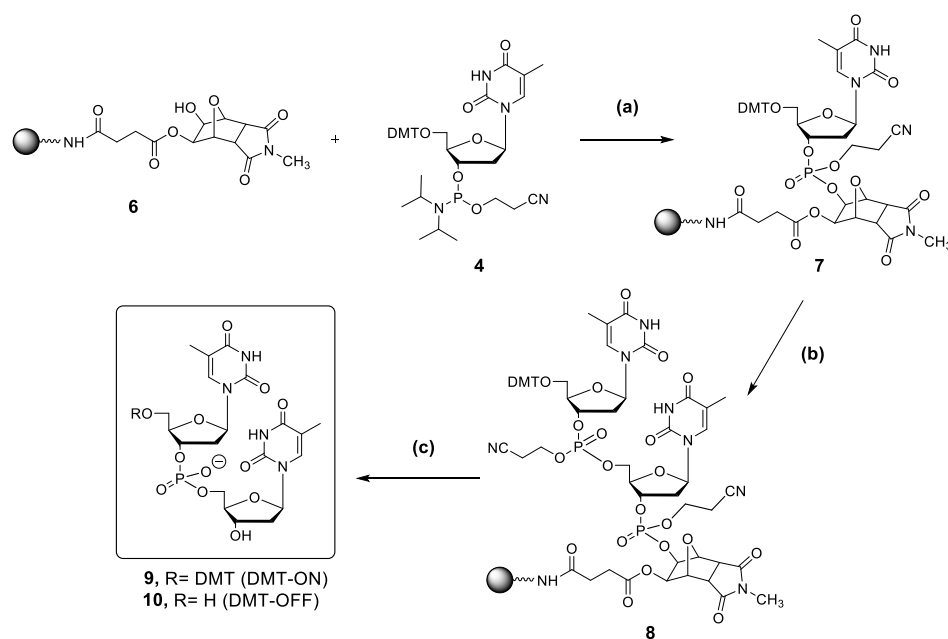


**Esquema 22.** Mecanismo de la etapa de oxidación donde se ha sustituido el agua por ácido acético en la reacción, evitando así su presencia en etapas posteriores de la síntesis, especialmente en la fase de acoplamiento, donde las condiciones deben ser anhidras.

De esta forma, se llevó a cabo la síntesis de dímeros de timidina tanto en su versión DMT-OFF como en DMT-ON para estudiar, por un lado, la eficiencia de la etapa de acoplamiento y, por otra parte, el rendimiento total obtenido al final de la síntesis.

## Resultados y discusión -----

La escala de síntesis fue entre 1 y 2  $\mu\text{mol}$ , por lo que para cada síntesis se pesaron entre 30 y 60 mg de resina en la jeringuilla de reacción. Tras el lavado con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y ACN anhidros, se procedió a la desprotección del DMT del soporte agitando la resina en 1 mL de una disolución al 3% de DCA en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhidro y repitiendo el proceso hasta obtener una disolución incolora. Las diferentes fracciones de la disolución naranja obtenida se juntaron y se guardaron para su posterior análisis por espectrofotometría Vis-UV. El valor de la absorbancia de esta disolución medida a una longitud de onda de  $\lambda = 505 \text{ nm}$  se tomará como referencia a la hora de calcular el rendimiento del siguiente acoplamiento o del proceso global de síntesis.



**Esquema 23.** Síntesis de dímeros de timidina: (a) Primer ciclo de síntesis; (b) segundo ciclo de síntesis; (c) etapa de desprotección y liberación del dímerno del soporte sólido.

Tras esta etapa, la resina se lava sucesivamente con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y ACN anhidros para eliminar los restos de ácido. A continuación, se procedió al

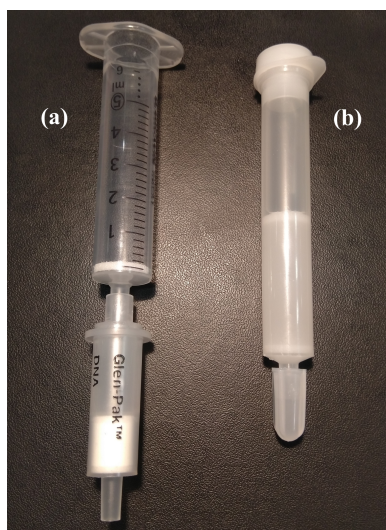
acoplamiento del primer fosforamidito (Esquema 23a). Para ello, se agitó la resina **6**, que presenta un hidroxilo libre, con una mezcla de la disolución activante (BTT) **3** y la disolución de fosforamidito **4** durante 2 min. Una vez finalizado el acoplamiento se obtiene el nucleótido incorporado en la resina. Se completó el ciclo de síntesis con la etapa de acetilación, agitando la resina con una mezcla de las disoluciones CAP-A y CAP-B, descritas previamente, y el posterior paso de oxidación con una disolución de yodo en THF/Py/AcOH, dando lugar al producto **7**.

Tras varios lavados de la resina con DCM y ACN, se procedió a repetir el ciclo de síntesis para incorporar el último fosforamidito y formar así el dímero esperado **8** anclado a la resina (Esquema 23b).

La última etapa consistió en el desanclaje del dímero de la resina. Si el dímero final a obtener se requiere libre de DMT en el extremo 5' es preciso desproteger previamente esta posición en las condiciones habituales. Se utilizarán las disoluciones de color naranja obtenidas de los sucesivos lavados para el cálculo del rendimiento del último acoplamiento.

Para liberar el oligonucleótido de la resina (Esquema 23c) se trata con una disolución concentrada de amoníaco al 32% en agua a 55 °C durante 16 h. En estas condiciones también se desprotege el fosfato del grupo protector cianoetilo mediante una  $\beta$ -eliminación, aislandose los dímeros deseados **9** y **10** tras la separación de la resina por filtración.

A continuación, se llevó a cabo la purificación del oligonucleótido utilizando cartuchos de purificación de oligonucleotidos (*Oligonucleotide Purification Cartridge*, OPC) (Figura 26a), que permiten purificar manualmente ácidos nucleicos DMT-ON mediante un sistema de fase reversa.



**Figura 26.** Cartuchos empleados en la purificación de oligonucleótidos: (a) OPC; (b) Sephadex.

Para purificar las secuencias DMT-OFF se utilizan los cartuchos de tipo Sephadex (Figura 26b) que permiten la purificación mediante un mecanismo de exclusión por tamaños.

Para calcular los rendimientos de acoplamiento obtenidos en cada ciclo de la síntesis se midió la absorbancia de las disoluciones del catión tritilo obtenidas en cada una de las reacciones de destrilación. La absorbancia obtenida por estas disoluciones, a  $\lambda = 505$  nm, se puede relacionar directamente, a través de la ecuación de Lambert-Beer, con la concentración del catión tritilo en la disolución. Esta, a su vez, con los grupos hidroxilo desprotegidos en la posición 5' de cada eslabón en la cadena nucleotídica. La relación entre el valor de la absorbancia obtenida en cada etapa de destrilación y el obtenido en la etapa anterior nos dará el rendimiento del acoplamiento.

*ECUACIÓN DE LAMBERT-BEER*

$$A = \varepsilon bc$$

*A = absorbancia*  
 *$\varepsilon$  = absortividad molar*  
*b = paso óptico (1 cm)*  
*c = concentración de la especie que absorbe*

Es preciso tener en cuenta que la ecuación de Lambert-Beer sólo presenta linealidad a concentraciones muy bajas por lo que para poder relacionar de manera directamente proporcional la concentración con la absorbancia es preciso que el valor de la absorbancia medido en cada disolución esté por debajo de 2 unidades. Cuando se obtuvieron disoluciones con valores superiores de A se prepararon diluciones diluidas 1:10 o 1:100 de la muestra utilizando una disolución 0.1 M de ácido *p*-toluensulfónico en acetonitrilo.

Para cuantificar la cantidad de dímero obtenido en cada síntesis, se prepararon muestras diluidas (1:100;  $f_{dil} = 100$ ) a partir de muestra (1 mL;  $V_{muestra} = 1$  mL) de los *pellets* obtenidos en cada lote, con agua milli-Q®. Después se midió la absorbancia ( $\lambda = 260$  nm), utilizando un espectrofotómetro Vis-UV, y se calcularon las unidades OD (1 OD = 33  $\mu\text{g/mL}$ ) obtenidas mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Unidades OD} = A_{260} V_{muestra} f_{dil}$$

*A<sub>260</sub> = absorbancia de la muestra medida a una longitud de onda de 260 nm*

*V<sub>muestra</sub> = volumen total inicial en el que se encuentra diluida la muestra*

*f<sub>dil</sub> = factor de dilución a la hora de preparar la muestra para la medición*

Los resultados de los rendimientos obtenidos en las reacciones 1-6 y su cuantificación quedan reflejados en las Tablas 6 y 7, respectivamente.

## Resultados y discusión -----

**Tabla 6.** Rendimientos de los acoplamientos para las reacciones 1-6 de preparación del dímero 5'-TT-3'.

Reacción	Escala (μmol)	A <sup>a</sup> Etapa 1 <sup>b</sup>	A <sup>a</sup> Etapa 2 <sup>c</sup> (rend, %)	A <sup>a</sup> Etapa 3 <sup>d</sup> (rend, %)	Rend. (%) <sup>e</sup>
1. DMT-ON	1	0.0328	0.0297 ( <b>91</b> )	--	--
2. DMT-ON	2	0.0138	0.0151 (> <b>99</b> )	--	--
3. DMT-OFF	1.5	2.1538	1.6579 ( <b>77</b> )	1.8654 (> <b>99</b> )	<b>86</b>
4. DMT-OFF	1.5	2.1331	1.1211 ( <b>53</b> )	0.3052 ( <b>27</b> )	<b>14</b>
5. DMT-OFF	2	2.1336	2.1339 (> <b>99</b> )	2.1307 ( <b>99</b> )	<b>99</b>
6. DMT-ON	2	2.1362	2.1348 ( <b>99</b> )	--	--

<sup>a</sup>A= Absorbancia medida a  $\lambda= 505$  nm. <sup>b</sup>Desprotección de la resina. <sup>c</sup>Acoplamiento primero. <sup>d</sup>Acoplamiento segundo. <sup>e</sup>Rendimiento global.

Como se puede observar en la Tabla 6, para la reacción número 4 se obtuvieron rendimientos muy bajos. Tras analizar las posibles causas de estos resultados, se llegó a la conclusión de que la utilización de material de plástico a la hora de guardar y manipular las disoluciones de DCA podrían provocar lecturas erróneas de absorbancia. Esto se corroboró al llevar a cabo la reacción número 5 donde se sustituyó todo el material de plástico por recipientes de vidrio. Además, se utilizó una cubeta de cuarzo a la hora de leer la absorbancia de las disoluciones ácidas de tritilo en el espectrofotómetro. En este caso los rendimientos obtenidos fueron del 99%.

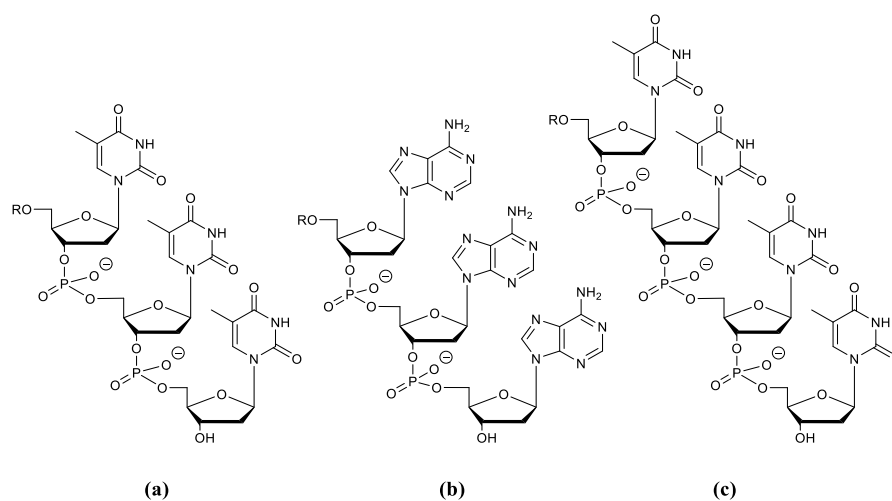
En la Tabla 7 se recogen los datos de la cuantificación (ODs y cantidad de dímero) de las preparaciones 1-6 de los dímeros DMT-ON.

**Tabla 7.** Cuantificación de las reacciones 1-6 de preparación del dímero 5'-TT-3'. Sólo fueron cuantificadas las reacciones DMT-ON.

Reacción	MW	Escala (μmol)	A <sup>a</sup>	OD	Conc. (μg/mL)	Dímero (mg)
1. DMT-ON	847	1	0.333	33.30	1099	1.09
2. DMT-ON	847	2	0.0959	9.59	316	0.32
3. DMT-OFF	541	1.5	--	--	--	--
4. DMT-OFF	541	1.5	--	--	--	--
5. DMT-OFF	541	2	--	--	--	--
6. DMT-ON	847	2	0.0606	6.05	200	0.20

<sup>a</sup>A= Absorbancia medida a λ= 260 nm.

A continuación, y siguiendo la misma metodología, se llevaron a cabo varias síntesis de trímeros: dos de timidina (5'-TTT-3') (Figura 27a) y uno de 2'-desoxiadenina (5'-dAdAdA-3') (Figura 27b), para el cual se utilizó el fosforamidito derivado de la dA<sup>Bz</sup>.



**Figura 27.** (a) trímero de timidina; (b) trímero de 2'-desoxiadenina; (c) tetrámero de timidina. DMT-OFF (R= H); DMT-ON (R= DMT).

Resultados y discusión -----

Las Tablas 8 y 9 muestran los rendimientos y cuantificaciones de los oligonucleótidos obtenidos.

**Tabla 8.** Rendimientos de los acoplamientos para las reacciones 7-9 de preparación de los trímeros 5'-TTT-3' y 5'-dAdAdA-3' realizadas a escala de 2  $\mu$ mol.

Reacción	A <sup>a,b</sup>	A <sup>a,c</sup> (rend, %)	A <sup>a,d</sup> (rend, %)	A <sup>a,e</sup> (rend, %)	Rend. (%) <sup>f</sup>
7. DMT-OFF T <sub>3</sub>	2.0918	0.0297 (91)	1.9925 (>95)	1.9726 (>99)	94
8. DMT-ON T <sub>3</sub>	1.5302	0.0151 (>99)	1.5568 (96)	--	--
9. DMT-ON dA <sub>3</sub>	1.6354	2.1348 (99)	1.6275 (98)	--	--

<sup>a</sup>A= Absorbancia medida a  $\lambda$ = 505 nm. <sup>b</sup>Desprotección de la resina. <sup>c</sup>Acoplamiento primero. <sup>d</sup>Acoplamiento segundo. <sup>e</sup>Acoplamiento tercero. <sup>f</sup>Rendimiento global.

**Tabla 9.** Cuantificación de las reacciones 7-9 de preparación de los trímeros 5'-TTT-3' y 5'-dAdAdA-3'. Sólo fueron cuantificadas las reacciones DMT-ON.

Reacción	MW	Escala ( $\mu$ mol)	A <sup>a</sup>	OD	Conc. ( $\mu$ g/mL)	Trímero (mg)
7. DMT-OFF T <sub>3</sub>	848	2	--	--	--	--
8. DMT-ON T <sub>3</sub>	1151	2	0.0971	4.85	160	0.160
9. DMT-ON dA <sub>3</sub>	1142	2	0.6560	32.80	1082	1.082

<sup>a</sup>A= Absorbancia medida a  $\lambda$ = 260 nm.



Por último, se preparó un tetrámero de timidina (5'-TTTT-3') (Figura 27c) para estudiar los rendimientos de acoplamiento (Tabla 10) y su cuantificación (Tabla 11).

**Tabla 10.** Rendimientos de los acoplamientos para las reacciones 10-11 de preparación del tetrámero 5'-TTTT-3' realizadas a escala de 2  $\mu$ mol.

Reacción	A <sup>a,b</sup>	A <sup>a,c</sup> (rend, %)	A <sup>a,d</sup> (rend, %)	A <sup>a,e</sup> (rend, %)	A <sup>a,f</sup> (rend, %)	Rend. (%) <sup>g</sup>
10. DMT-OFF	2.3186	2.1704 (94)	2.1777 (>99)	2.1770 (99)	2.1725 (99)	92
11. DMT-ON	2.1433	2.1685 (>99)	2.1503 (99)	2.1331 (99)	--	--

<sup>a</sup>A= Absorbancia medida a  $\lambda= 505$  nm. <sup>b</sup>Desprotección de la resina. <sup>c</sup>Acoplamiento primero. <sup>d</sup>Acoplamiento segundo. <sup>e</sup>Acoplamiento tercero. <sup>f</sup>Acoplamiento cuarto. <sup>g</sup>Rendimiento global.

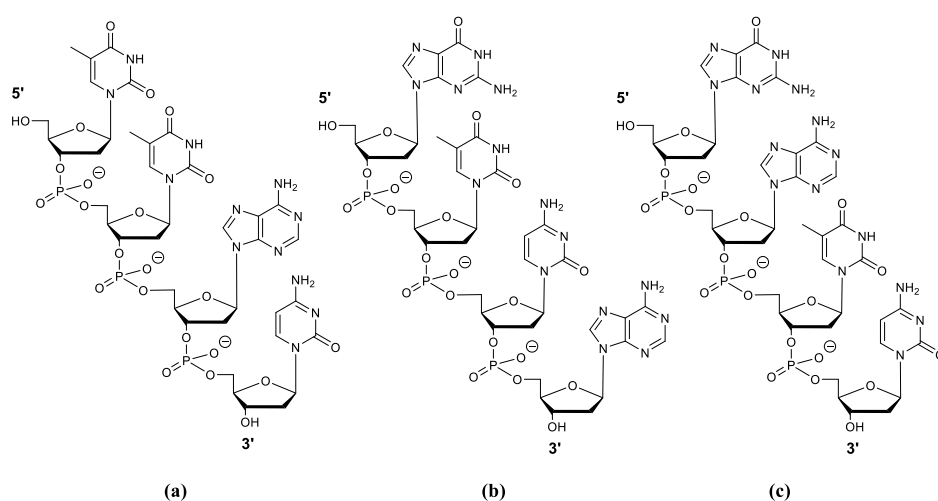
**Tabla 11.** Cuantificación de las reacciones 10-11 de preparación del tetrámero 5'-TTTT-3'. Sólo fueron cuantificadas las reacciones DMT-ON.

Reacción	MW	Escala ( $\mu$ mol)	A <sup>a</sup>	OD	Conc. ( $\mu$ g/mL)	Tetrámero (mg)
10. DMT-OFF	1152	2	--	--	--	--
11. DMT-ON	1454	2	0.7697	76.97	2540	2.54

<sup>a</sup>A= Absorbancia medida a  $\lambda= 260$  nm.

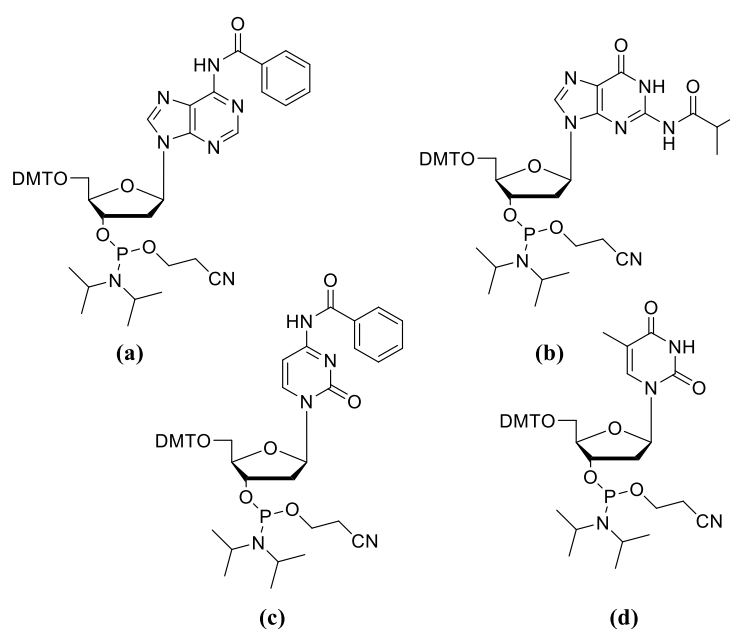
### 3.2. Primera aproximación sintética con resinas *Core-Shell*: Síntesis manual de tetrámeros de ADN

Para demostrar la aplicabilidad de las resinas PEG024 y PEG029 (Figura 22) en la síntesis de oligonucleótidos en fase sólida se comenzó elaborando de forma manual una serie de pequeños fragmentos sencillos de ADN que no implicasen ningún tipo de complicación adicional durante los procesos sintético y *post*-sintético. Concretamente, las secuencias elegidas para ser sintetizadas fueron las siguientes: 5'-TTdAdC-3', 5'-dGTdCdA-3' y 5'-dGdATdC-3' (Figura 28). Estas estructuras fueron elegidas con el objetivo de utilizar todas las bases posibles de ADN (A, C, G, T).



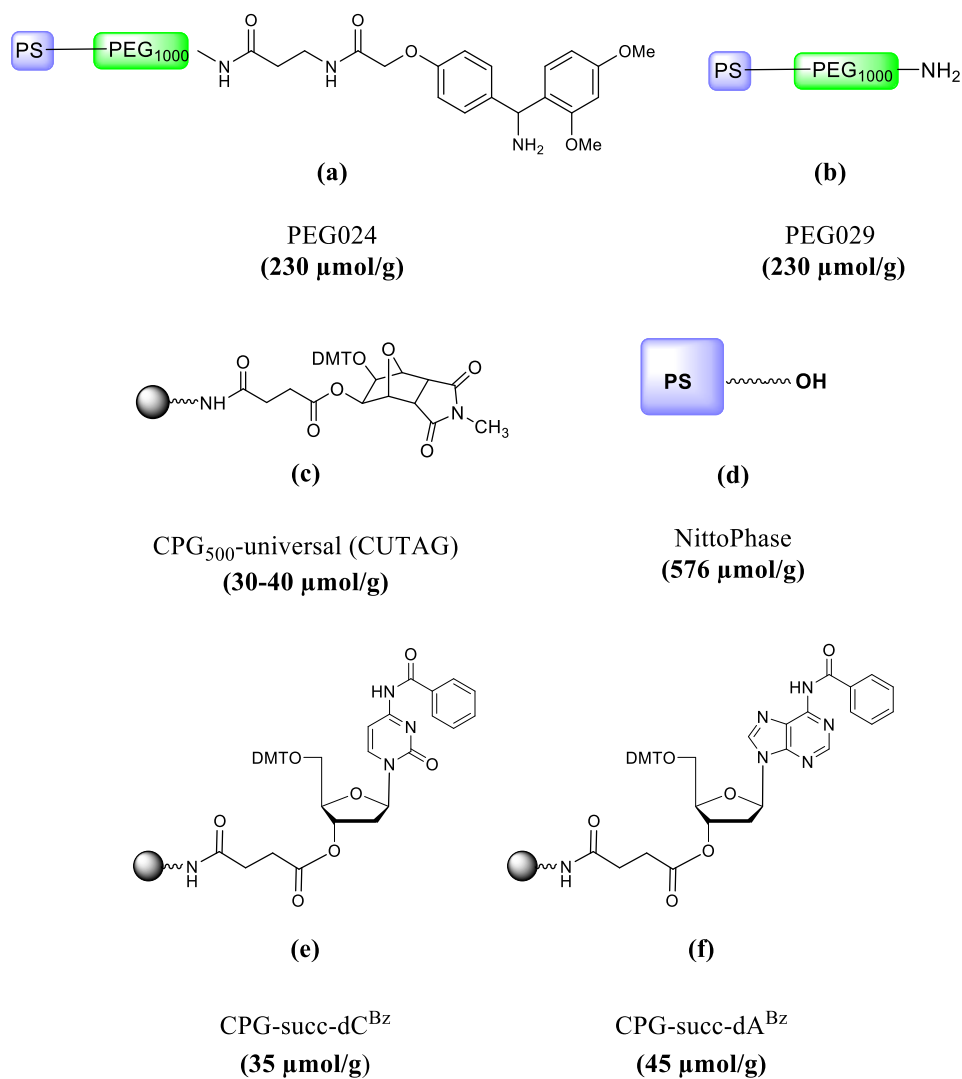
**Figura 28.** Tetrámeros sintetizados manualmente: (a) 5'-TTdAdC-3'; (b) 5'-dGTdCdA-3'; (c) 5'-dGdATdC-3'.

Para llevar a cabo las síntesis, se utilizaron los 2'-desoxifosforamiditos de adenosina, guanosina, citidina y timidina (Figura 29).



**Figura 29.** 2'-Desoxifosforamiditos 5'-DMT utilizados en la síntesis manual de los tetrámeros de ADN: (a) 2'-dA<sup>Bz</sup>; (b) 2'-dG<sup>Ibu</sup>; (c) 2'-dC<sup>Bz</sup>; (d) 2'-T.

Resultados y discusión -----



**Figura 30.** Estructura y carga inicial de las resinas utilizadas como soporte sólido en la síntesis manual de los tetrámeros de ADN. (a) y (b) resinas de tipo *Core-Shell* objeto de estudio. Resinas de control: (c) CPG universal; (d) PS de carga elevada; (e) CPG estándar 2'-dC<sup>Bz</sup>; (f) CPG estándar 2'-dA<sup>Bz</sup>.

En el estudio de las resinas *Core-Shell* PEG024 y PEG029 se utilizaron como control las resinas de tipo CPG (estándar y universal) y de tipo PS (*NittoPhase*) (Figura 30).

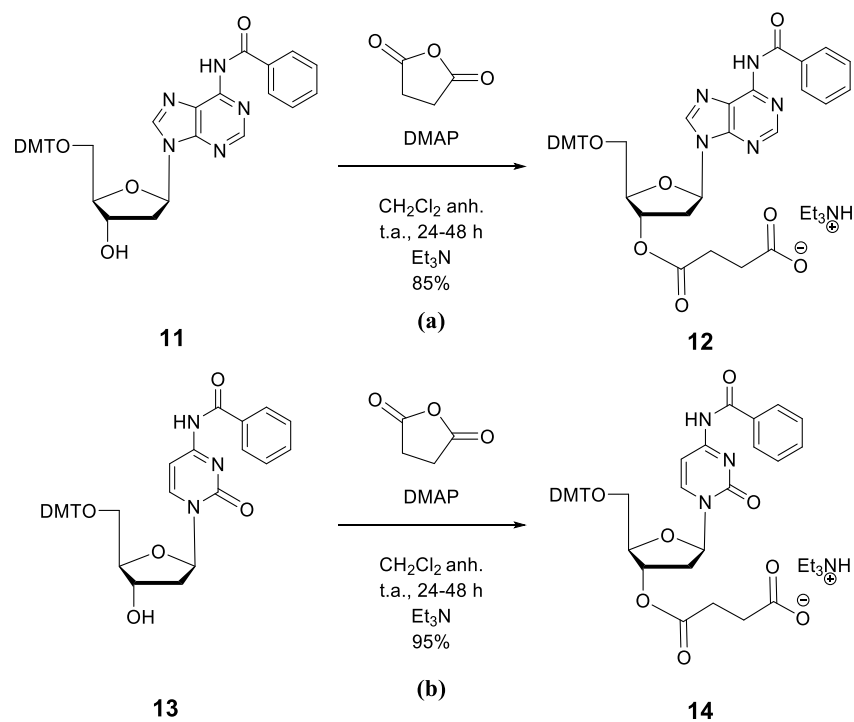
### 3.2.1. Derivatización de las resinas *Core-Shell* y *NittoPhase*

Como se puede observar en la Figura 30, tanto las resinas estándar como la resina universal ya están derivatizadas y presentan un grupo enlazante (*linker*) en su estructura que permitirá la síntesis directa de los tetrámeros a partir de los correspondientes fosforamiditos siguiendo los protocolos convencionales de síntesis. En cambio, las resinas *Core-Shell* y *NittoPhase* son resinas nativas (funcionalizadas con grupos amino e hidroxilo, respectivamente) sobre las que se debe acoplar un *linker* para que la síntesis de oligonucleótidos pueda llevarse a cabo. En este caso, el *linker* que se va a insertar corresponderá con el primer nucleósido (posición 3') unido a un grupo espaciador (succinilo) que facilitará el distanciamiento del oligonucleótido de la resina utilizada como soporte. La derivatización de las resinas se hizo en varios pasos:

#### a) Preparación de hemiésteres de succinilo nucleosídicos

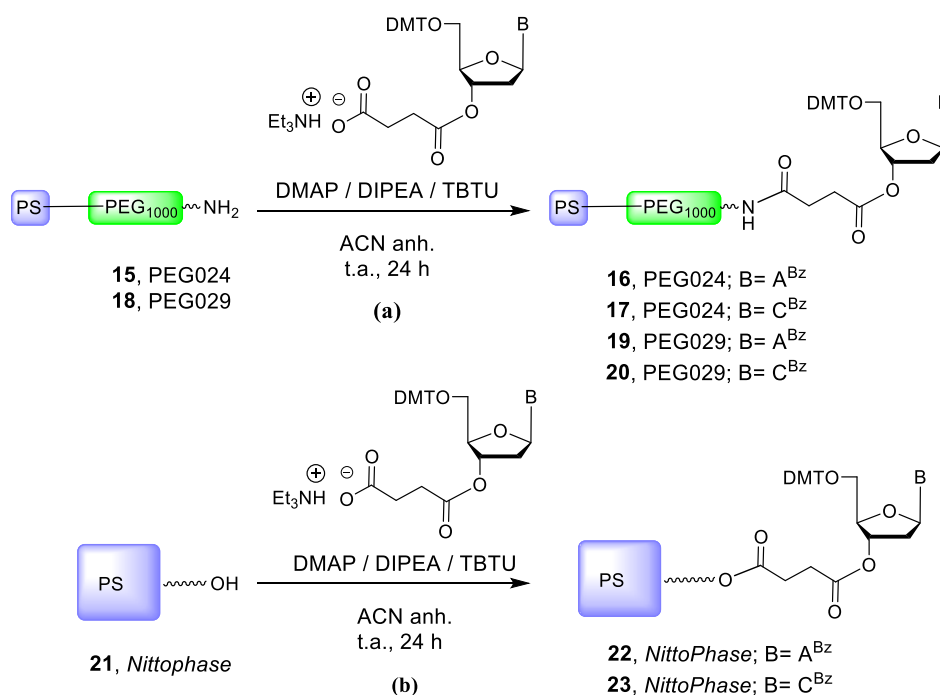
Las secuencias de los tetrámeros objeto de estudio tienen en el extremo 3' los nucleósidos 2'-dC o 2'-dA. Por tanto, se derivatizan las resinas con estos dos nucleósidos para desarrollar la síntesis completa de los tetrámeros.

En primer lugar, se sintetizaron los nucleósidos 3'-succinilo a partir de los correspondientes derivados 5'-*O*-DMT-2'-dA<sup>Bz</sup> y 5'-*O*-DMT-2'-dC<sup>Bz</sup>. (Esquema 24). Estas reacciones se llevaron a cabo con anhídrido succínico en presencia de DMAP como base y utilizando diclorometano como disolvente, aislándose los derivados nucleosídicos **12** y **14** con rendimientos del 85 y 95%, respectivamente.



**Esquema 24.** Reacción de síntesis de nucleósidos 3'-succinilo a partir de los nucleósidos 2'-dA<sup>Bz</sup> (**11**) y 2'-dC<sup>Bz</sup> (**13**); (a) síntesis de 5'-O-DMT-3'-O-succ-2'-dA<sup>Bz</sup> (**12**); (b) síntesis de 5'-O-DMT-3'-O-succ-2'-dC<sup>Bz</sup> (**14**).

b) Funcionalización de los soportes sólidos PEG024, PEG029 y NittoPhase



**Esquema 25.** Reacciones de derivatización de las resinas: (a) PEG024 y PEG029; (b) NittoPhase.

Una vez obtenidos los succinatos de los nucleósidos que se utilizarán para derivatizar las resinas nativas y que formarán el extremo 3' de los diferentes tetrámeros a sintetizar, el siguiente paso consistió en unir estos hemiésteres a las resinas **15** (PEG024), **18** (PEG029) y **21** (NittoPhase).

Para ello, los derivados 5'-O-DMT-3'-O-succinato de dA<sup>Bz</sup> y dC<sup>Bz</sup> obtenidos se incorporaron a las resinas utilizando TBTU como agente condensante y diisopropiletilamina (DIPEA) y dimetilaminopiridina (DMAP) como catalizadores en acetonitrilo (Esquema 25).

Estas reacciones se hicieron bajo atmósfera inerte y a temperatura ambiente. El transcurso de las reacciones se fue controlando mediante la

determinación de la carga de pequeñas alícuotas de resina en breves períodos de tiempo.

Así, se llegó a la conclusión que el tiempo óptimo de reacción en el cual la resina alcanzaba su carga máxima era de 24 h. Por debajo de este tiempo se obtenían cargas demasiado bajas, mientras que a tiempos de reacción superiores la carga máxima alcanzada volvía a descender.

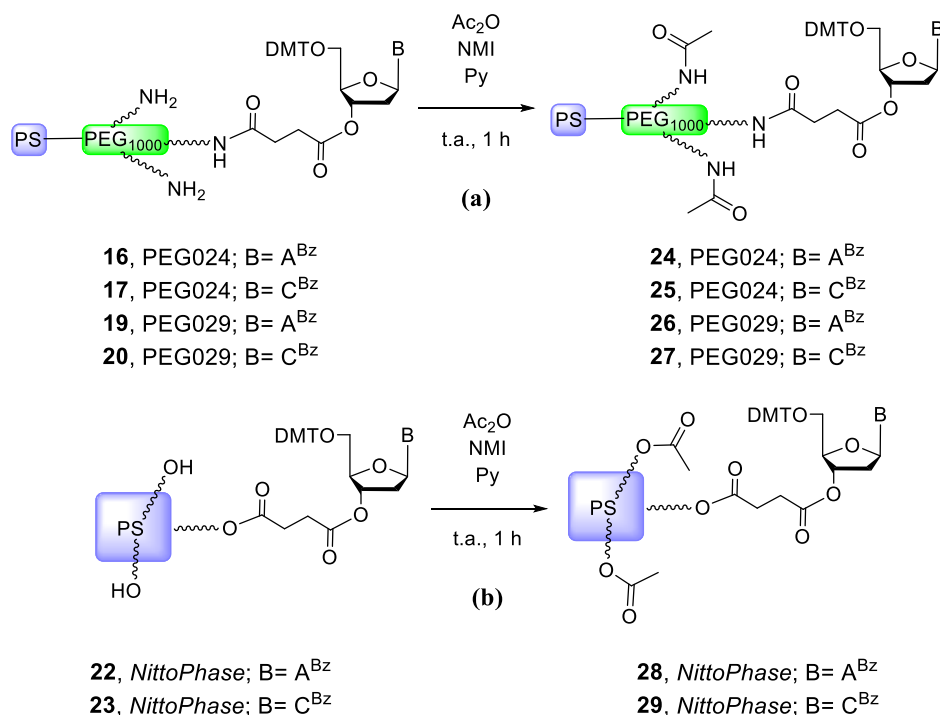
Una vez finalizada la reacción, las resinas se filtraron y se lavaron con una disolución al 5% de trietilamina en acetonitrilo y, posteriormente, con diclorometano. Las resinas se secaron a vacío y se procedió a su acetilación como paso previo a la síntesis de los tetrámeros.

*c) Acetilación de los grupos amino e hidroxilo libres de las resinas*

Los grupos amino e hidroxilo libres en la resina podrían reaccionar con los fosforamiditos introducidos en la etapa de acoplamiento, lo que supondría un grave problema, ya que podrían producirse reacciones secundarias indeseadas y errores de síntesis importantes como la formación de secuencias truncadas. Para evitar estos inconvenientes durante la síntesis de los tetrámeros, es necesario bloquear todos los grupos amino e hidroxilo de las resinas que en la etapa anterior no reaccionaron con el succinato de nucleósido.

Para ello, se realizaron reacciones de acetilación (Esquema 26) con una mezcla de piridina, anhídrido acético y *N*-metilimidazol (NMI) (2:1:1). Tras este tratamiento, las resinas se filtraron y lavaron con una solución al 5% de trietilamina en ACN seguido de acetonitrilo y diclorometano.





**Esquema 26.** Reacciones de acetilación de las resinas derivatizadas de: (a) PEG024 y PEG029; (b) *NittoPhase*.

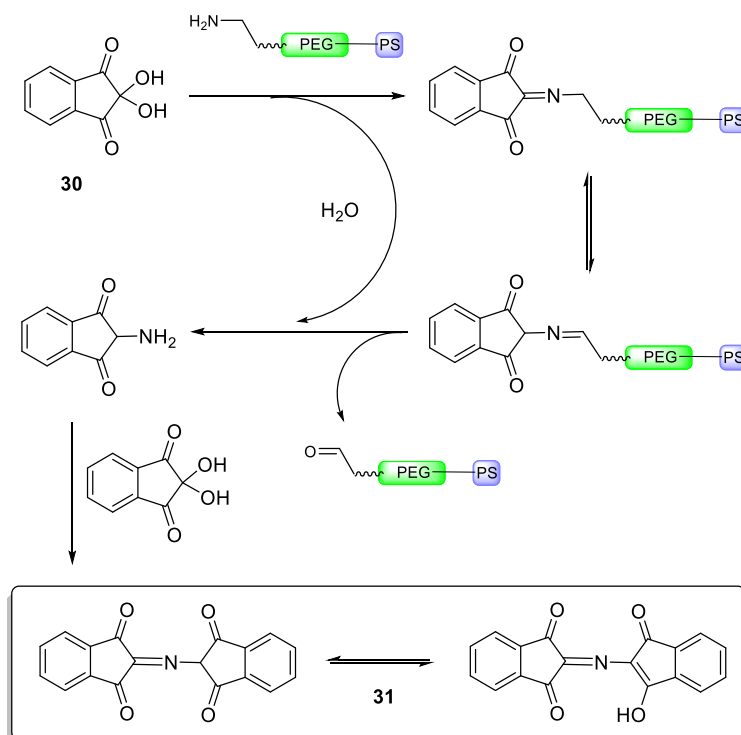
d) *Detección de grupos amino libres por el método de Kaiser*

Para saber si el proceso de acetilación anterior funcionó correctamente en las resinas *Core-Shell*, se utilizó el test de Kaiser para comprobar que los grupos amino libres habían sido acetilados en los soportes **24-29**.

Este protocolo describe la detección de grupos amino libres unidos a un soporte sólido que quedan después de la derivatización y posterior acetilación. El método se basa en el trabajo de Kaiser *et al.*,<sup>110</sup> que utiliza la reacción de la ninhidrina (**30**) con los grupos amino (Esquema 27) para

<sup>110</sup> E. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger, P. I. Cook. *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595-598.

dar lugar a la formación del azul de Ruhemann (**31**), un colorante azul oscuro (Sarin *et al.*).<sup>111</sup>



**Esquema 27.** Test de Kaiser. Reacción de la ninhidrina (**30**) con grupos amino libres del soporte sólido para formar azul de Ruhemann (**31**).

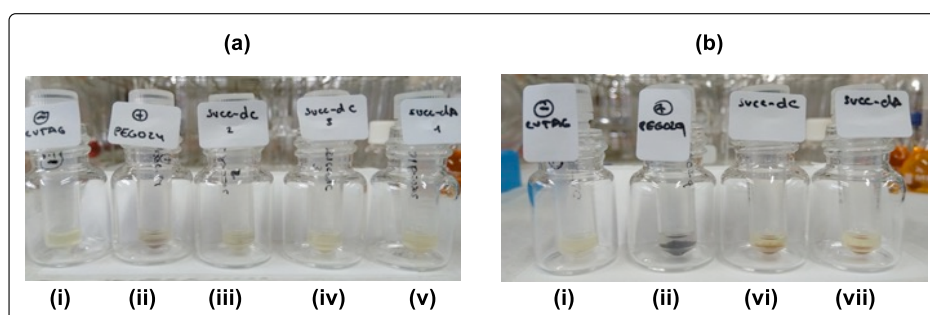
Para llevar a cabo el test, sobre alícuotas de las resinas acetiladas **24-27** se añaden unas gotas de una disolución de agua, piridina y KCN, así como otra disolución que contenía ninhidrina y etanol.

Como control negativo se cogió una muestra de resina sin grupos amino libres (CPG universal, Figura 30c) y como control positivo las resinas nativas sin derivatizar (PEG024, PEG029), que como muestran las Figuras 30a y 30b poseen grupos amino libres en su estructura y darán una coloración azul en el test de Kaiser.

<sup>111</sup> V. K. Sarin, S. B. H. Kent, J. P. Tam, R. B. Merrifield. *Anal. Biochem.* **1981**, *17*, 147-157.

Los controles recibieron el mismo tratamiento que las muestras problema. Una vez añadidas las disoluciones previamente descritas, todas las muestras se calentaron a 105 °C durante 3 min. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 31.

Como se puede observar, sólo los controles positivos (viales ii) mostraron coloración, lo cual indica que el resultado de la etapa de acetilación fue satisfactorio y que la existencia de grupos amino libres en las resinas fue mínima o indetectable, por lo que estas resinas pueden ser utilizadas para la síntesis de oligonucleótidos.



**Figura 31.** Resultados del test de Kaiser. (a) Reacción de la ninhidrina con las resinas: (i) CPG universal “CUTAG” 5 (control negativo); (ii) PEG024 nativa 15 (control positivo); (iii) y (iv) PEG024 cargada con dC<sup>Bz</sup> 25; (v) PEG024 cargada con dA<sup>Bz</sup> 24. (b) Reacción de la ninhidrina con las resinas: (i) CPG universal “CUTAG” 5 (control negativo); (ii) PEG029 nativa 18 (control positivo); (vi) PEG029 cargada con dC<sup>Bz</sup> 27; (vii) PEG029 cargada con dA<sup>Bz</sup> 26.

#### e) Determinación de la carga inicial de las resinas derivatizadas

Es necesario hacer una estimación de la carga inicial que tiene el soporte funcionalizado con el que se va a trabajar.

Para ello, se realizó la determinación cuantitativa de la carga superficial de los soportes derivatizados mediante el ensayo del tritilo.<sup>52</sup> Este procedimiento describe cómo se calcula la carga superficial de los puntos

de anclaje que están protegidos con grupos tritilo mediante análisis colorimétrico. El método se basa en la capacidad de estos grupos protectores mono-, di- y trimetoxitritilo para escindirse en condiciones ácidas liberando en la disolución cationes tritilo de colores brillantes. En ausencia de nucleófilos, el color permanece estable. El cromóforo, el catión tritilo, puede medirse espectrofotométricamente. Su intensidad y, por lo tanto, su concentración, permitirá calcular la cantidad del catión presente, que es igual a la cantidad de puntos de anclaje protegidos y unidos al soporte sólido (carga). Por tanto, la carga se puede calcular directamente a partir de la absorbancia de las disoluciones ácidas de catión tritilo utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Carga} \left( \frac{\mu\text{mol}}{\text{g}} \right) = \frac{\text{Volumen muestra (mL)} \times \text{Dilución} \times \text{Absorbancia}}{\epsilon \times \text{Peso resina (mg)}}$$

Donde  $\epsilon$  es el coeficiente de extinción molar del grupo trimetoxi-, dimetoxi- o monometoxitritilo (116, 76 y 56 mL cm<sup>-1</sup> μmol<sup>-1</sup>, respectivamente). En nuestro caso, como tenemos el DMT, tomamos el valor de 76 para realizar los cálculos.

En la Tabla 12 se muestran las cargas de las resinas que serán utilizadas en la síntesis de los tetrámeros.

Cabe destacar que las resinas comerciales de tipo CPG utilizadas como control ya estaban funcionalizadas y fueron utilizadas directamente en la síntesis de los tetrámeros tomando como referencia la carga indicada por el fabricante (Figura 30).

Por otra parte, aunque todas las cargas obtenidas tras la derivatización de los soportes son elevadas y están por encima de los valores convencionales para este tipo de resinas, llama la atención el bajo valor que se obtuvo para las resinas PEG024, ya que sólo se consiguió funcionalizar el 33 y 24% de la carga inicial de la resina nativa.

**Tabla 12.** Carga de las resinas utilizadas para la síntesis de los tetrámeros.

Tipo	Resina n <sup>a</sup>	Carga n <sup>b</sup> (μmol/g)	Resina d <sup>c</sup>	Carga d <sup>d</sup> (μmol/g)	Fun. <sup>e</sup> (%)
Core-Shell (PS-PEG)	PEG024	230	PEG024- dA <sup>Bz</sup> ( <b>24</b> )	69-76	33
Core-Shell (PS-PEG)	PEG024	230	PEG024- dC <sup>Bz</sup> ( <b>25</b> )	56-66	24
Core-Shell (PS-PEG)	PEG029	230	PEG029- dA <sup>Bz</sup> ( <b>26</b> )	153-163	71
Core-Shell (PS-PEG)	PEG029	230	PEG029- dC <sup>Bz</sup> ( <b>27</b> )	186-220	96
PS	NittoPhase	576	PS-dA <sup>Bz</sup> ( <b>28</b> )	493	86
PS	NittoPhase	576	PS-dC <sup>Bz</sup> ( <b>29</b> )	427	74
CPG <sub>500</sub> universal	<sup>f</sup> CUTAG	--	--	30-40	--
CPG <sub>500</sub> estándar	<sup>f</sup> CPG-dA <sup>Bz</sup>	--	--	45	--
CPG <sub>500</sub> estándar	<sup>f</sup> CPG-dC <sup>Bz</sup>	--	--	35	--

<sup>a</sup>Resinas nativas. <sup>b</sup>Carga de las resinas nativas. <sup>c</sup>Resinas derivatizadas. <sup>d</sup>Carga de las resinas derivatizadas. <sup>e</sup>Grado de funcionalización. <sup>f</sup>Resinas comerciales.

Creemos que esto es debido a la naturaleza del *Rink linker* donde el grupo amino que se necesita funcionalizar está estéricamente muy impedido y el acceso del succinato nucleosídico no es tan efectivo como en el caso de las resinas PEG029 y *NittoPhase*, donde el grupo amino es más accesible.

### 3.2.2. Síntesis manuales de tetrámeros

Los tetrámeros de secuencia 5'-TTdAdC-3', 5'-dGTdCdA-3' y 5'-dGdATdC-3' fueron sintetizados manualmente siguiendo el método y los protocolos de la síntesis en fase sólida mediante el uso de fosforamiditos como bloques de construcción y utilizando como soporte sólido, por primera vez, las resinas PEG024 y PEG029.

Se compararon los rendimientos obtenidos con estos soportes *Core-Shell* con los que se obtuvieron en síntesis paralelas utilizando como controles soportes convencionales de vidrio de poro controlado (CPG) y poliestireno de elevada carga (*NittoPhase*).

La síntesis se llevó a cabo sobre las cinco resinas citadas en una escala de 1  $\mu$ mol utilizando jeringuillas como recipientes de reacción (Figura 24). Los protocolos utilizados fueron los mismos que para las síntesis de dímeros y trímeros de timidina descritos previamente en el apartado 3.1 de este capítulo. Del mismo modo, la síntesis de los tetrámeros se realizó tanto en su versión DMT-ON como en DMT-OFF. Así, las secuencias protegidas en 5' fueron posteriormente purificadas utilizando cartuchos OPC de fase reversa y cuantificadas. Finalmente, se analizaron por HPLC y MALDI-TOF. En cambio, las secuencias desprotegidas en 5' sólo se utilizaron para estudios comparativos de rendimientos en las etapas de acoplamiento y rendimientos finales.

En todos los casos, se utilizaron disoluciones 0.1 M de fosforamiditos en diclorometano anhidro y disoluciones 0.4 M de agente activante (BTT) en acetonitrilo anhidro. Para cada ciclo de acoplamiento se emplearon 0.5 mL de cada disolución y, por tanto, 0.05 mmol (50 equiv) de fosforamidito y 0.2 mmol (200 equiv) de BMT.

Los rendimientos de los acoplamientos fueron de alrededor del 99% (Tabla 13), excepto para los soportes *Core-Shell*, que cuando se utilizó acetonitrilo como disolvente mostraron rendimientos inferiores al 50%.

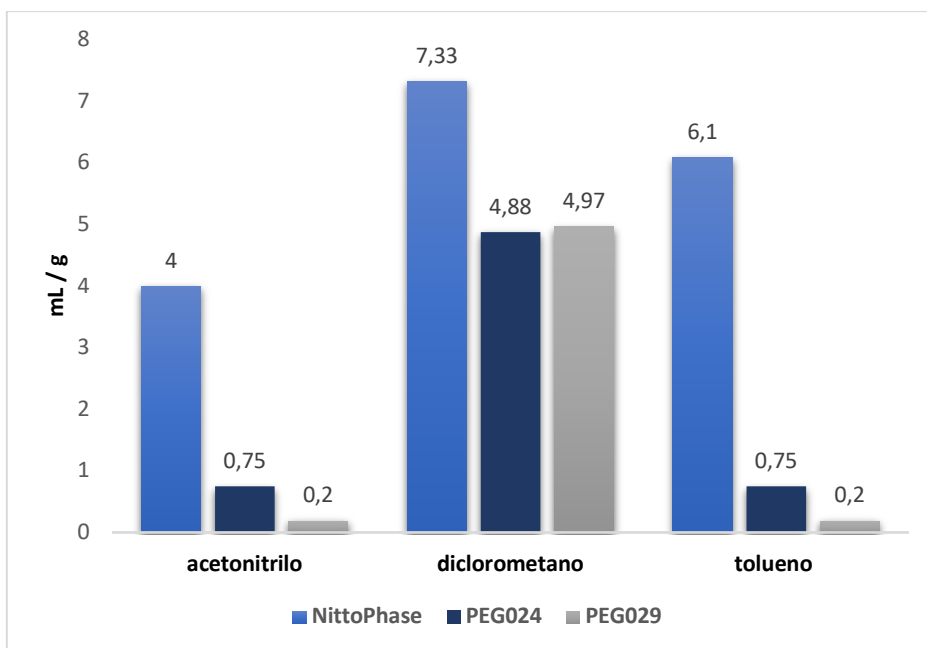
**Tabla 13.** Rendimientos de acoplamiento obtenidos en la síntesis de tetrameros cuando se utiliza acetonitrilo como disolvente en las etapas de síntesis.

<b>5'→3'</b>	<b>Resina</b>	<b>DMT</b>	<b>Acopl. ACN (%)</b>	<b>Acopl. DCM (%)</b>	
<b>TTdAdC (32)</b>	CPG <sub>500</sub> Universal	<b>OFF</b>	>99		
		ON	>99		
	CPG-dC <sup>Bz</sup>	<b>OFF</b>	>99		
		ON	90		
	PS-dC <sup>Bz</sup>	<b>OFF</b>	>99		
		ON	>99		
	<b>PEG024-dC<sup>Bz</sup></b>	<b>OFF</b>	<b>20</b>	>99	
		ON	<b>29</b>	>99	
	<b>PEG029-dC<sup>Bz</sup></b>	<b>OFF</b>	<b>44</b>	>99	
		ON	<b>61</b>	>99	
	<b>dGTdCdA (33)</b>	CPG <sub>500</sub> Universal	<b>OFF</b>	>99	
			ON	>99	
CPG-dA <sup>Bz</sup>		<b>OFF</b>	91		
		ON	95		
PS-dA <sup>Bz</sup>		<b>OFF</b>	>99		
		ON	>99		
<b>PEG024-dA<sup>Bz</sup></b>		<b>OFF</b>	<b>32</b>	95	
		ON	<b>70</b>	>99	
<b>PEG029-dA<sup>Bz</sup></b>		<b>OFF</b>	<b>45</b>	99	
		ON	<b>77</b>	92	
<b>dGdATdC (34)</b>		CPG <sub>500</sub> Universal	<b>OFF</b>	90	
			ON	96	
	CPG-dC <sup>Bz</sup>	<b>OFF</b>	76		
		ON	97		
	PS-dC <sup>Bz</sup>	<b>OFF</b>	90		
		ON	99		
	<b>PEG024-dC<sup>Bz</sup></b>	<b>OFF</b>	<b>19</b>	>99	
		ON	<b>22</b>	>99	
	<b>PEG029-dC<sup>Bz</sup></b>	<b>OFF</b>	<b>38</b>	91	
		ON	<b>47</b>	94	

La reiterada obtención de estos bajos rendimientos en ensayos repetidos bajo las mismas condiciones nos llevó a pensar que posiblemente existía un problema en la etapa de acoplamiento de la síntesis. En un principio, se ampliaron los tiempos de acoplamiento del fosforamidito, pasando de 2 a 5 min, pero se volvieron a obtener valores de rendimientos muy bajos.

Por otro lado, los resultados obtenidos en los ensayos de hinchamiento de estas resinas nos hicieron sospechar que el problema podría estar en una mala difusión de los disolventes y los reactivos en el interior de las resinas.

Como se abordó en el punto 2.2 de este capítulo, las propiedades de hinchamiento de los soportes *Core-Shell* y *NittoPhase* se midieron en tres disolventes que son utilizados normalmente en la síntesis de oligonucleótidos: acetonitrilo, diclorometano y tolueno. El acetonitrilo es necesario en la mayoría de las etapas del ciclo de síntesis, especialmente en las de acoplamiento del fosforamidito. El diclorometano y el tolueno se utilizan en las reacciones de destritolación.



**Figura 32.** Gráfica comparativa del hinchamiento de las resinas PEG024 y PEG029 frente a la resina PS de elevada carga (*NittoPhase*) en los principales disolventes usados en la síntesis en fase sólida.



Como se observa en la Figura 32, el soporte *NittoPhase* tiene buenas propiedades de hinchamiento en los tres disolventes; en cambio, los soportes *Core-Shell* sólo se expanden en diclorometano, siendo muy bajo el hinchamiento en acetonitrilo y tolueno. Creemos que los bajos rendimientos de acoplamiento obtenidos fueron debidos a este factor.

Este hecho ya fue observado previamente en soportes de poliestireno<sup>112,113</sup> y durante la síntesis de conjugados de péptido-oligonucleótido en soportes PEG-poliestireno.<sup>59</sup>

Se repitieron las síntesis de los tetrámeros en los soportes PEG024 y PEG029 sustituyendo el acetonitrilo por diclorometano en todas las etapas de reacción excepto en la disolución del agente activante BTT (insoluble en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). De esta manera, la reacción de acoplamiento de los fosforamiditos se realizó en una mezcla de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ACN (1:1).

Los valores para los rendimientos de acoplamiento obtenidos en acetonitrilo se superaron fácilmente disolviendo los fosforamiditos en diclorometano y dejando la disolución de BTT en acetonitrilo.

En estas condiciones, se obtuvo una mejora considerable en los rendimientos de acoplamiento que llegaron mayoritariamente hasta valores de 98-99% para las resinas *Core-Shell* (Tabla 13).

---

<sup>112</sup> F. Bardella, E. Giralt, E. Pedroso. *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 6231-6234.

<sup>113</sup> F. X. Montserrat, A. Grandas, R. Eritja, E. Pedroso. *Tetrahedron* **1994**, 50, 2617-2622.

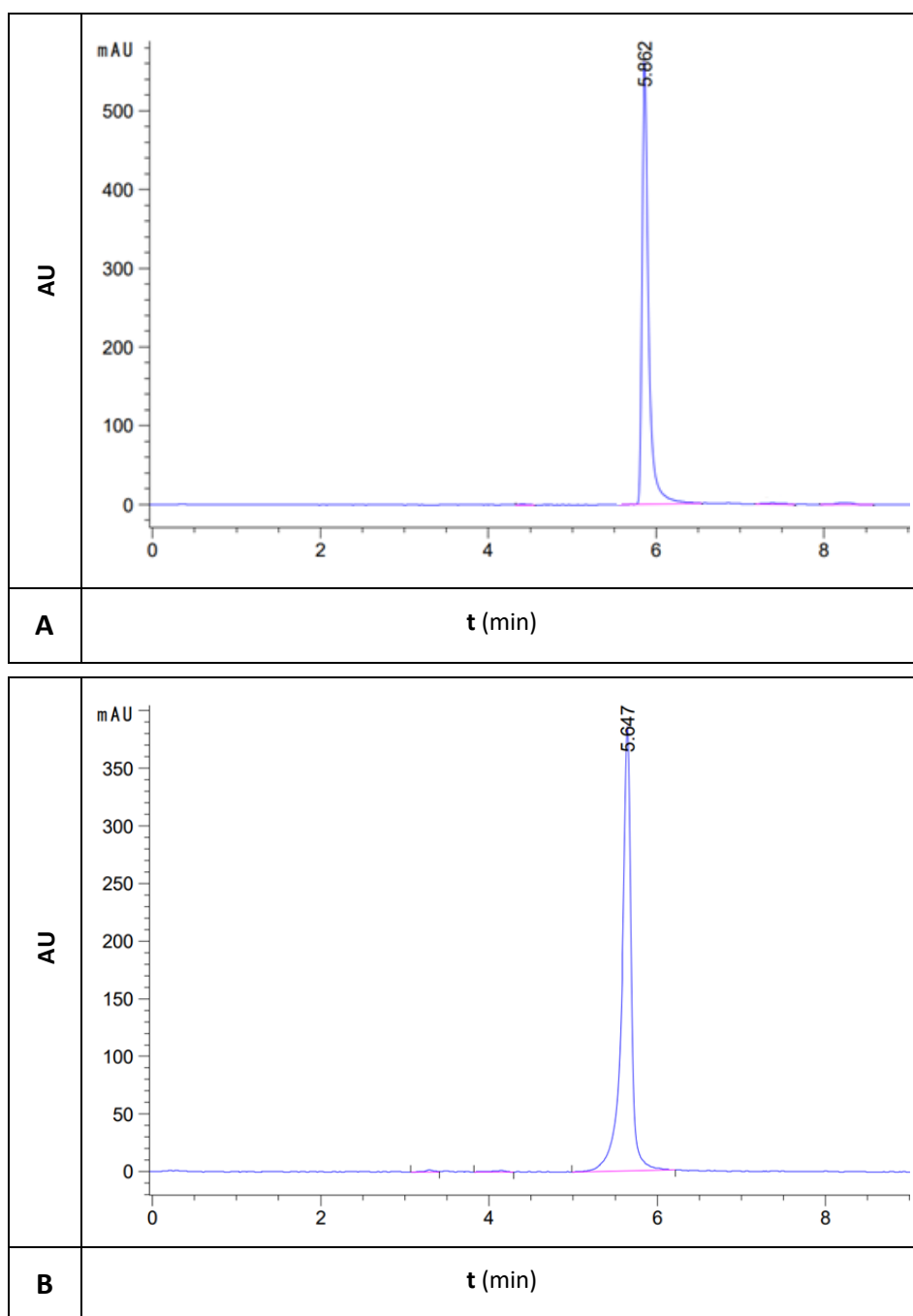
Resultados y discusión -----

Todos los soportes con los tetrámeros resultantes se trataron, posteriormente, con amoníaco concentrado y los productos DMT-ON se filtraron y purificaron por OPC para calcular la cantidad obtenida (Tabla 14).

**Tabla 14.** Cuantificación de las reacciones de preparación de tetrámeros.

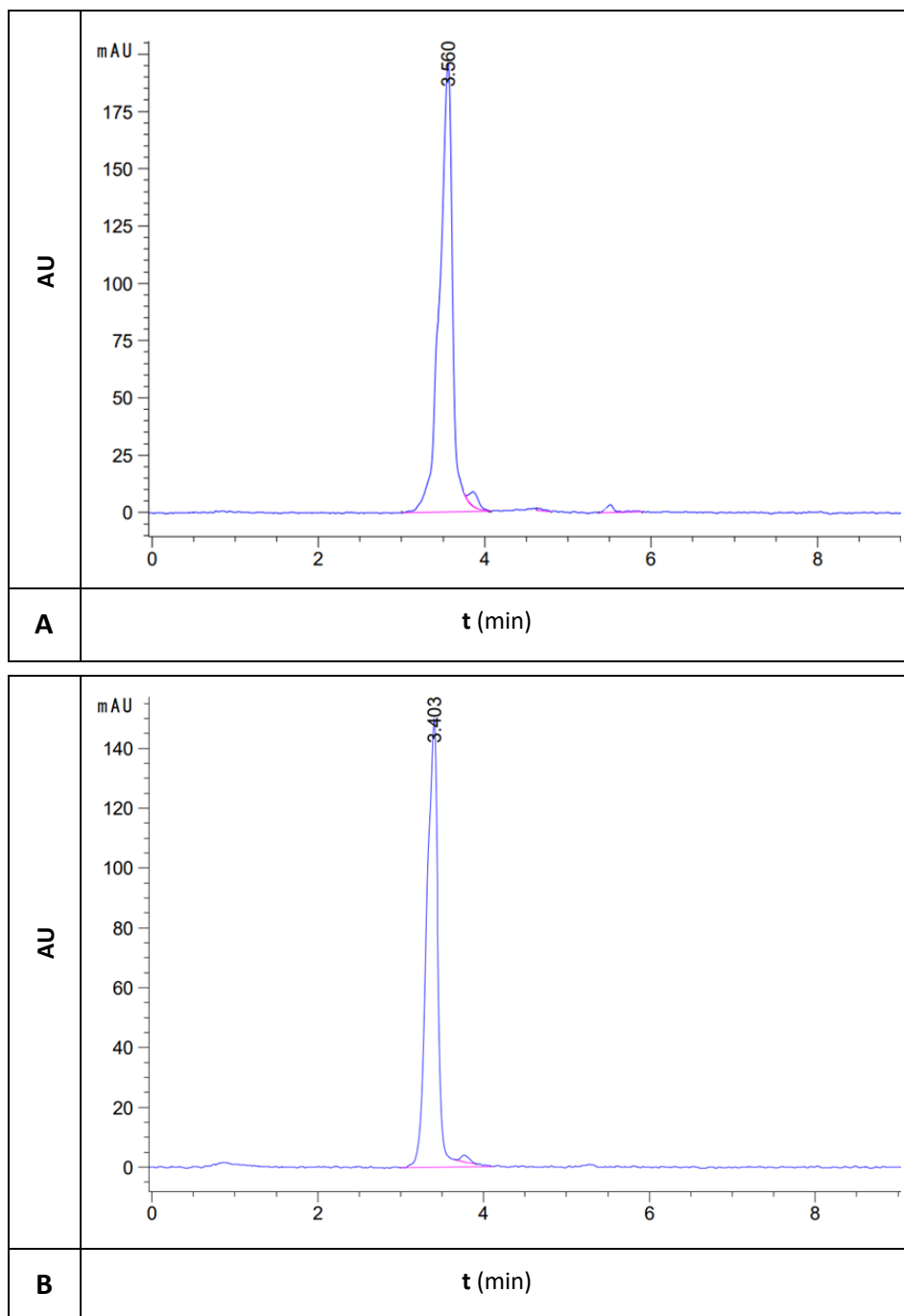
<b>5'→3'</b>	<b>Resina</b>	<b>OD</b>	<b>MW</b>	<b>Conc.</b> ( $\mu\text{g/mL}$ )	<b>Cantidad</b> ( $\mu\text{mol}$ )
<b>TTdAdC (32)</b>			1148.8		
	CPG <sub>500</sub> Universal	12.44		410.6	0.36
	CPG-dC <sup>Bz</sup>	6.07		200	0.17
	PS-dC <sup>Bz</sup>	7.96		268.7	0.23
	<b>PEG024-dC<sup>Bz</sup></b>	1.52		50.16	0.04
	<b>PEG029-dC<sup>Bz</sup></b>	17.25		569.4	0.49
<b>dGTdCdA (33)</b>			1173.8		
	CPG <sub>500</sub> Universal	7.40		244.4	0.21
	CPG-dA <sup>Bz</sup>	3.71		122	0.10
	PS-dA <sup>Bz</sup>	4.92		162.4	0.14
	<b>PEG024-dA<sup>Bz</sup></b>	3.18		104.9	0.09
	<b>PEG029-dA<sup>Bz</sup></b>	5.48		181.2	0.15
<b>dGdATdC (34)</b>			1173.8		
	CPG <sub>500</sub> Universal	0.2		100	0.1
	CPG-dC <sup>Bz</sup>	11.97		395	0.08
	PS-dC <sup>Bz</sup>	21.07		695	0.34
	<b>PEG024-dC<sup>Bz</sup></b>	0.39		12.87	0.59
	<b>PEG029-dC<sup>Bz</sup></b>	2.22		73.19	0.01

Los tetrámeros purificados **32-34** fueron analizados por HPLC en fase reversa (Figuras 33-35). En todos los casos, se observó una señal destacada, que fue recogida y analizada por espectrometría de masas MALDI-TOF.

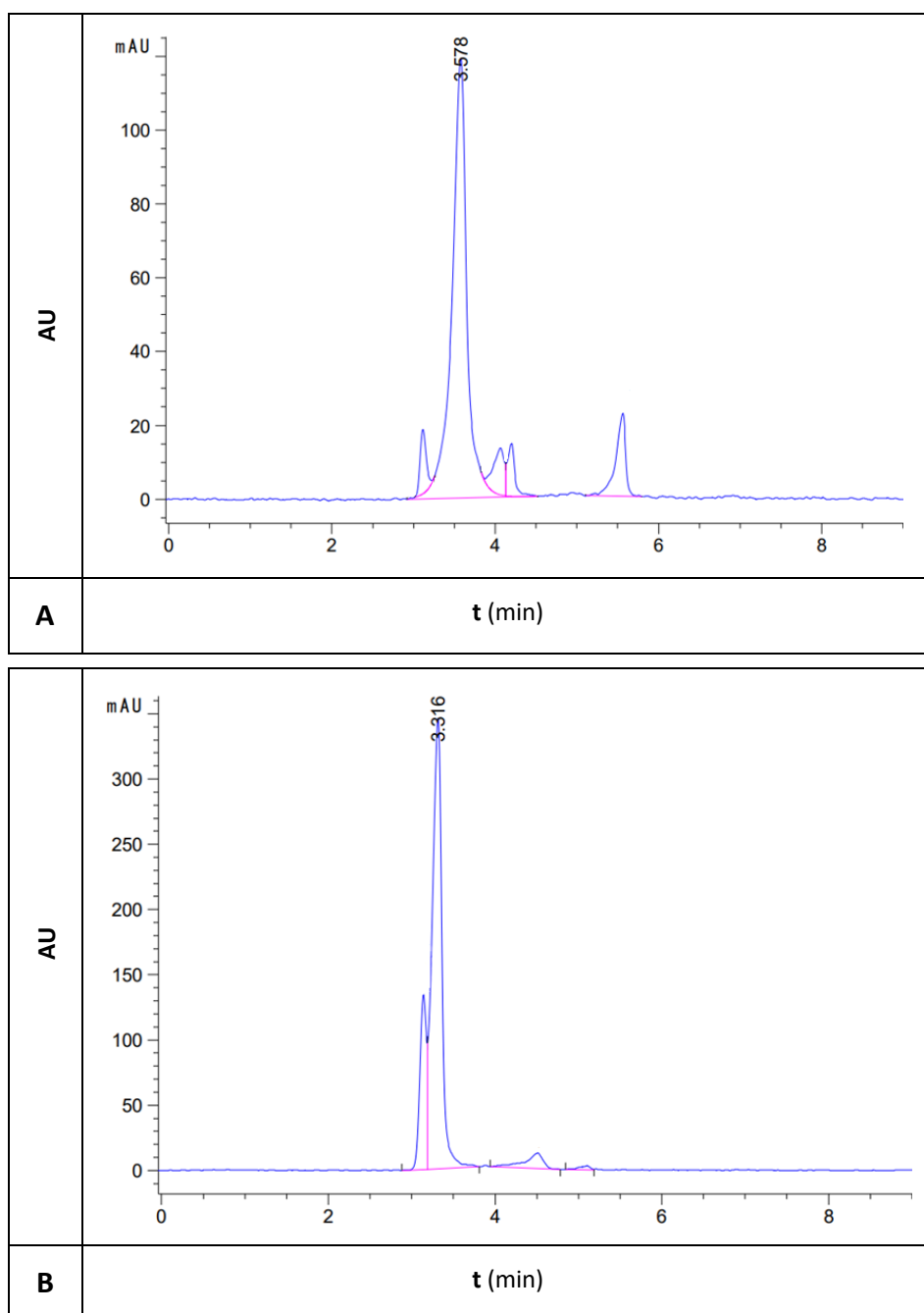


**Figura 33.** Cromatogramas de HPLC del tetrámero 5'-TTdAdC-3' (32) sintetizado con las resinas: (A) PEG024 y (B) PEG029.

Resultados y discusión -----



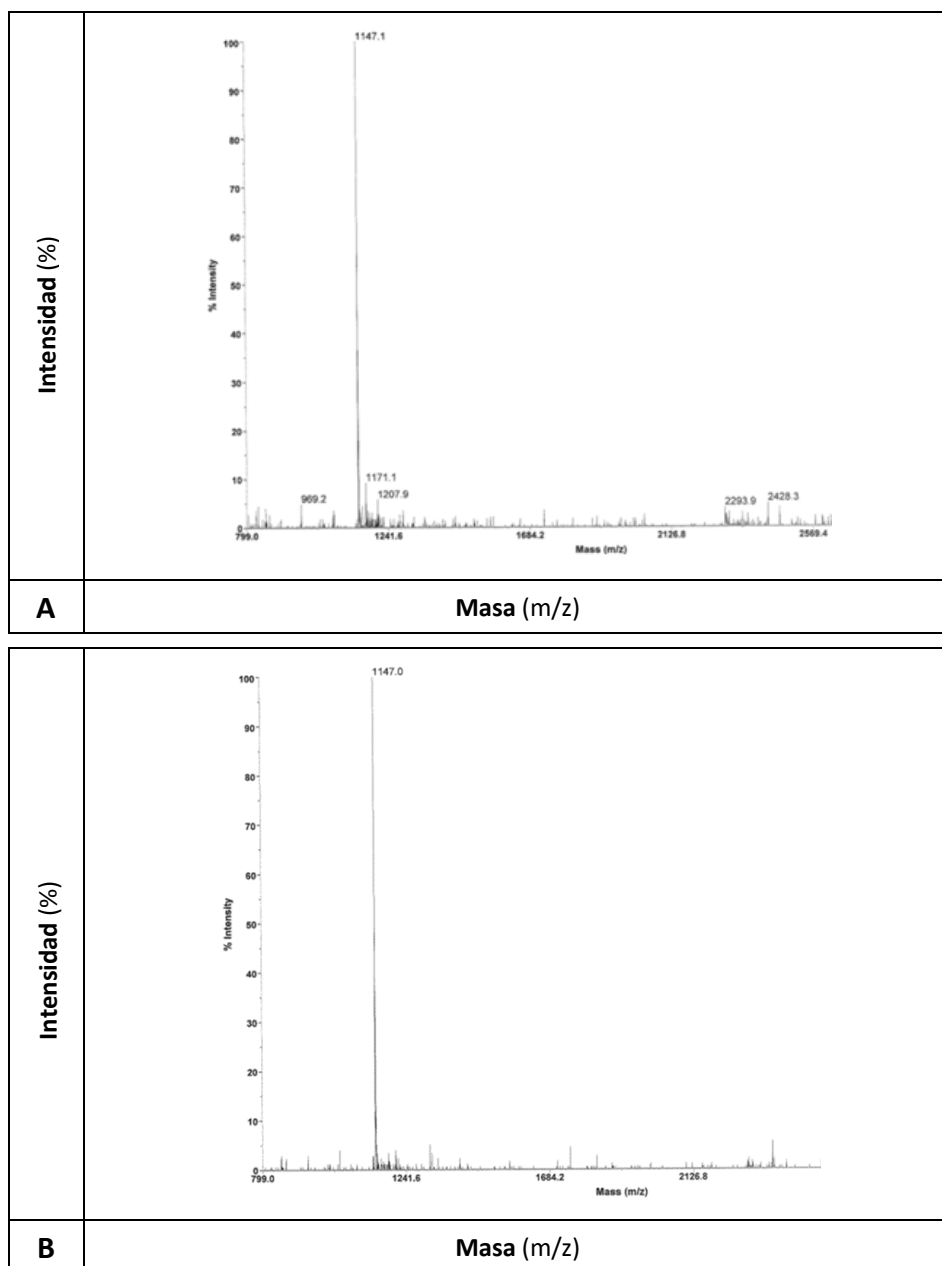
**Figura 34.** Cromatogramas de HPLC del tetrámero 5'-dGTdCdA-3' (33) sintetizado con las resinas: (A) PEG024 y (B) PEG029.



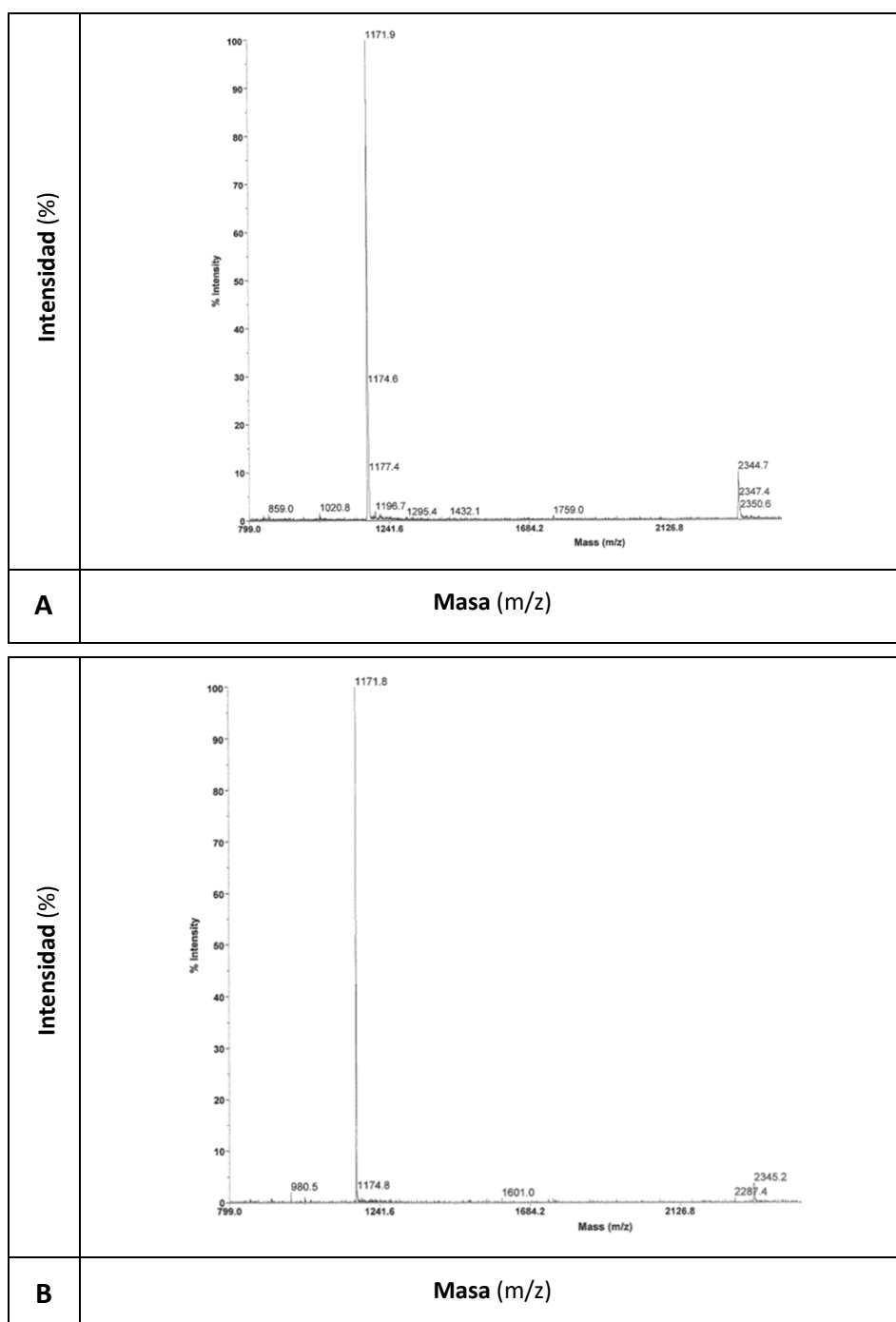
**Figura 35.** Cromatogramas de HPLC del tetramero 5'-dGdATdC-3' (34) sintetizado con las resinas: (A) PEG024 y (B) PEG029.

Resultados y discusión -----

En las Figuras 36-38 se muestran los espectros de masas de todos los tetrámeros sintetizados con las resinas *Core-Shell*.

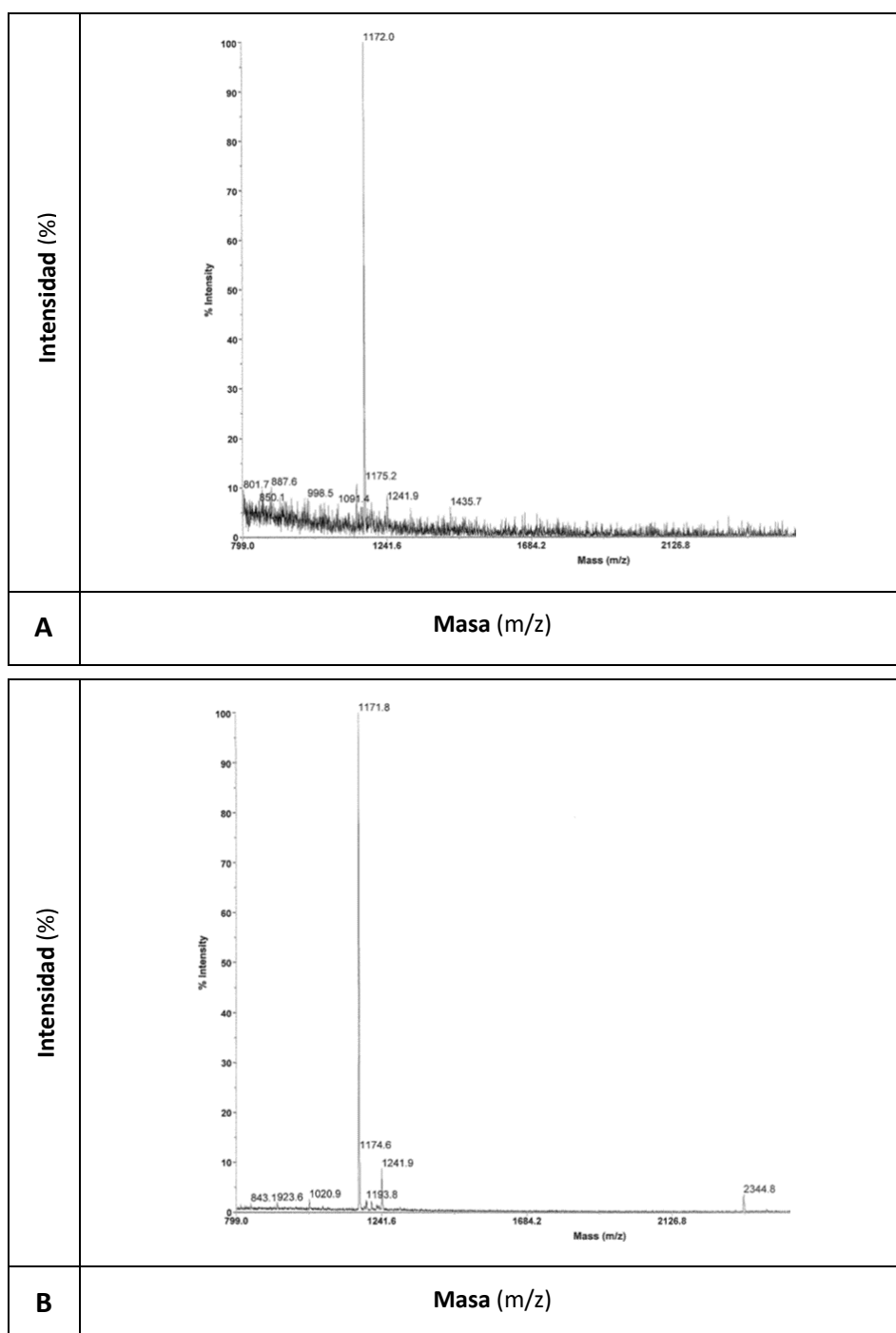


**Figura 36.** Espectros MALDI-TOF del tetrámero 5'-TTdAdC-3' (32) sintetizado con las resinas: (A) PEG024 y (B) PEG029.



**Figura 37.** Espectros MALDI-TOF del tetramero 5'-dGdCTdA-3' (33) sintetizado con las resinas: (A) PEG024 y (B) PEG029.

Resultados y discusión -----



**Figura 38.** Espectros MALDI-TOF del tetrámero 5'-dGdATdC-3' (34) sintetizado con las resinas: (A) PEG024 y (B) PEG029.



Como se muestra en la Tabla 15, la pureza de los compuestos obtenidos con todos los soportes estudiados fue elevada y muy similar tanto para los tetrámeros sintetizados con las resinas control como con las resinas PEG024 y PEG029.

**Tabla 15.** Comparación de la pureza, analizada por HPLC en fase reversa, de los tres tetrámeros de ADN **32-34** sintetizados manualmente con los cinco soportes sólidos.

<b>Secuencia 5'→3'</b>	<b>Soporte sólido</b>	<b>Disol. acoplamiento</b>	<b>Pureza (%)<sup>a</sup></b>
TTdAdC	CPG <sub>500</sub> Universal	ACN	99.5
TTdAdC	CPG-dC <sup>Bz</sup>	ACN	99.0
TTdAdC	PS-dC <sup>Bz</sup>	ACN	94.6
TTdAdC	<b>PEG024-dC<sup>Bz</sup></b>	ACN/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (1:1)	97.8
TTdAdC	<b>PEG029-dC<sup>Bz</sup></b>	ACN/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (1:1)	99.0
dGTdCdA	CPG <sub>500</sub> Universal	ACN	99.5
dGTdCdA	CPG-dC <sup>Bz</sup>	ACN	99.2
dGTdCdA	PS-dC <sup>Bz</sup>	ACN	92.6
dGTdCdA	<b>PEG024-dC<sup>Bz</sup></b>	ACN/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (1:1)	96.2
dGTdCdA	<b>PEG029-dC<sup>Bz</sup></b>	ACN/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (1:1)	98.9
dGdATdC	CPG <sub>500</sub> Universal	ACN	97.0
dGdATdC	CPG-dC <sup>Bz</sup>	ACN	97.9
dGdATdC	PS-dC <sup>Bz</sup>	ACN	97.9
dGdATdC	<b>PEG024-dC<sup>Bz</sup></b>	ACN/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (1:1)	95.4
dGdATdC	<b>PEG029-dC<sup>Bz</sup></b>	ACN/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (1:1)	94.2

### 3.2.3. Síntesis automatizada de oligonucleótidos de ADN de cadena larga con resinas *Core-Shell*

En vista de los excelentes resultados obtenidos en la síntesis manual de los tetrámeros **32-34**, el siguiente paso consistió en utilizar las resinas PEG024 y PEG029 para realizar la síntesis de oligonucleótidos automatizada. Para ello, se eligieron una serie de secuencias variadas con una longitud apropiada que podrían ser sintetizadas rutinariamente utilizando soportes sólidos convencionales.

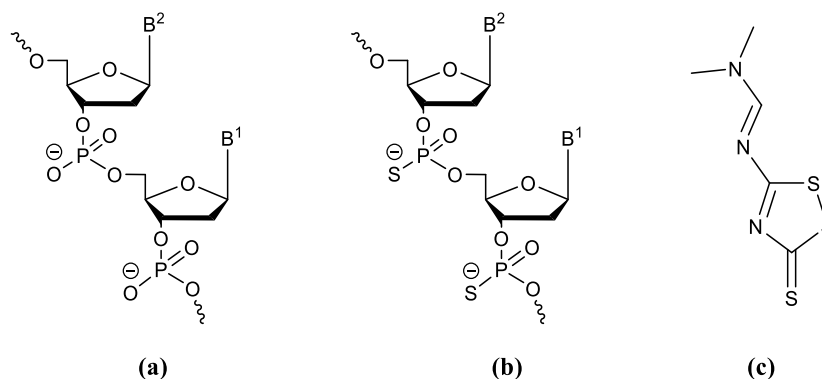
La síntesis de estos oligonucleótidos, con un rango de entre 14 y 18 bases, fue llevada a cabo en un sintetizador automático de ADN utilizando 2-cianoetil fosforamiditos en una escala de 1  $\mu$ mol (Tabla 16).

**Tabla 16.** Oligonucleótidos de ADN de cadena larga sintetizados con resinas de tipo *Core-Shell*.

Nombre	n° Bases	Fosfato	Secuencia <sup>a</sup> 5'→3'	Resina	Rend (%)
PEG024-14mer ( <b>35</b> )	14	fosfodiéster	TAGCCTGACACGTC	PEG029	98
PEG024-15mer ( <b>36</b> )	15	fosfodiéster	AGATTAGGTATGTAC	PEG024	99
PEG029-15mer ( <b>37</b> )	15	fosfodiéster	AGATTAGGTATGTAC	PEG029	98
R-Las-PO ( <b>38</b> )	18	fosfodiéster	CGTTTCCTTTGTTCTGGA	PEG024	99
R-Las-PS ( <b>39</b> )	18	fosforotioato	CGTTTCCTTTGTTCTGGA	PEG024	99

<sup>a</sup>Todos los nucleótidos son 2'-desoxi.

Una de estas secuencias es el oligonucleótido R-Las (18-mer), que fue sintetizado tanto en su versión de cadena de fosfatos (P-O) **38**, como en su versión fosforotioato (P-S) **39**. Desde un punto de vista estructural, la diferencia entre ambas secuencias radica en la naturaleza de la cadena fosfatada (Figura 39).



**Figura 39.** Tipos de enlace fosfato: (a) fosfodiéster; (b) fosforotioato; (c) agente sulfurante D-1,4-ditiotreitól (DDTT).

El oligonucleótido R-Las es la secuencia complementaria del sitio 21-38 del ARNm de la luciferasa de renilla. La versión fosforotioato **39** se utiliza en la inhibición antisentido de dicha luciferasa.<sup>114,115</sup>

Los fosforamiditos se disolvieron en DCM (0.1 M) y se implementó un ciclo modificado con tiempos crecientes para cada etapa de síntesis: 5 min para el acoplamiento, 1 min para los pasos de protección y oxidación, y 2 min para la destrilación. En el caso de los fosforotioatos, la etapa de sulfuración se realizó utilizando una disolución 0.05 M del agente sulfurante (3-((dimetilaminometilideno)amino)-3H-1,2,4-ditiazol-3-tiona (DDTT, Figura 39) en piridina. Esta etapa viene a sustituir a la etapa de oxidación con yodo que se hace en una secuencia con grupos fosfato, y debe hacerse inmediatamente después del acoplamiento del fosforamidito y antes del paso de acetilación para minimizar la formación de fosfodiésteres.

En estas condiciones, la preparación de los 14-mer **35** y 15-mer **36/37** fue más eficiente con la resina PEG024 que con la PEG029. Por esta razón, se seleccionó PEG024 para la síntesis de R-Las 18-mer **38** y **39**. El

<sup>114</sup> H.-Y. Zhang, J. Mao, D. Zhou, D. Xu, H. Thonberg, Z. Liang, C. Wahlestedt, *Nucleic Acid Res.* **2003**, *31*, e72.

<sup>115</sup> S. Grijalvo, M. Terrazas, A. Aviñó, R. Eritja. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 2144-2147.

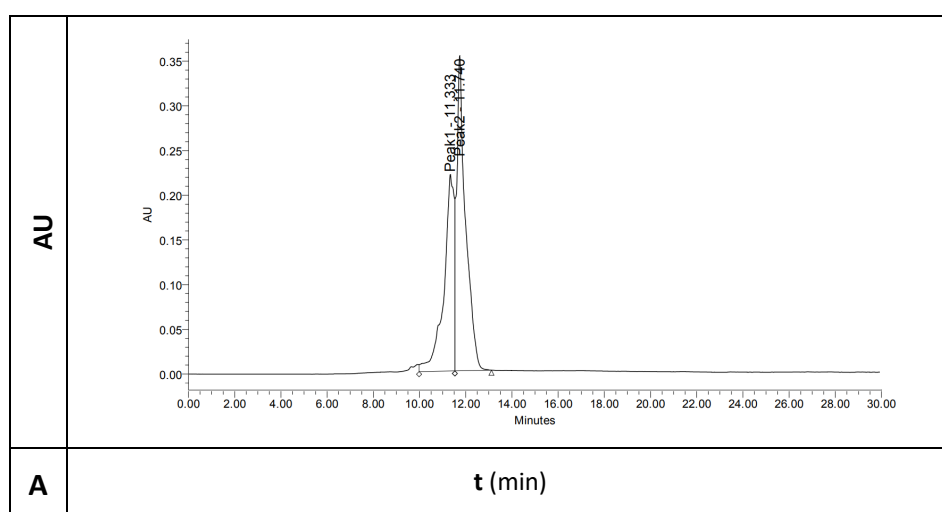
oligonucleótido se ensambló eficientemente tanto en la versión de fosfodiéster natural como en la versión de fosforotioato modificado. Todos los oligonucleótidos se sintetizaron en modo DMT-ON, se desanclaron del soporte sólido siguiendo protocolos estándar con amoníaco y fueron purificados con cartuchos OPC de fase reversa.

Finalmente, los compuestos resultantes se analizaron mediante HPLC mostrando un producto mayoritario (Figura 40), el cual fue caracterizado por espectrometría de masas MALDI-TOF (Figura 41, Tabla 17).

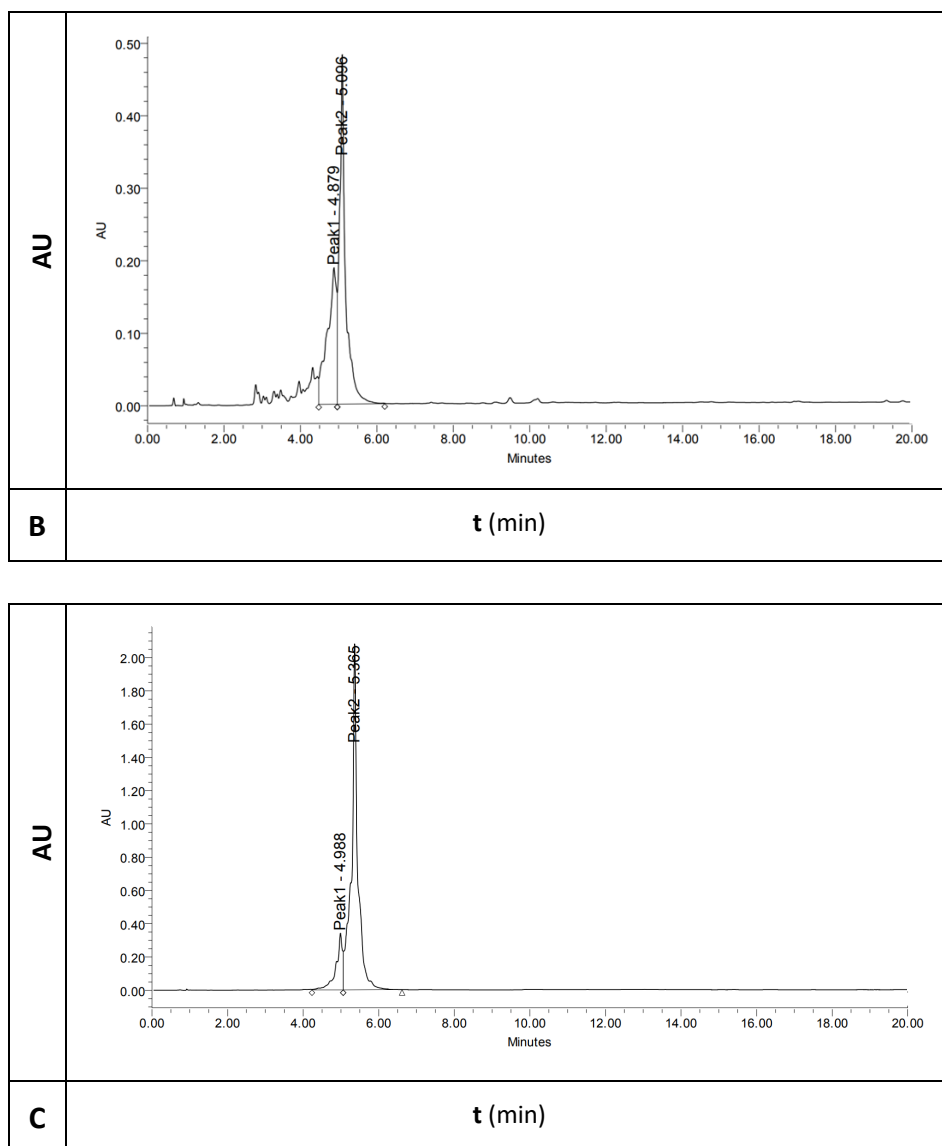
**Tabla 17.** Secuencias de oligonucleótidos y masas obtenidas por MALDI-TOF.

Nombre	Secuencia <sup>a</sup> 5'→3'	Masa calculada	Masa encontrada
PEG024-14mer (35)	TAGCCTGACACGTC	4220.7	<b>4221.1</b>
PEG024-15mer (36)	AGATTAGGTATGTAC	4630.0	<b>4632.0</b>
PEG029-15mer (37)	AGATTAGGTATGTAC	4630.0	<b>4632.0</b>
R-Las-PO (38)	CGTTTCCTTTGTTCTGGA	5461.5	<b>5464.7</b>
R-Las-PS (39)	CGTTTCCTTTGTTCTGGA <sup>b</sup>	5734.7	<b>5737.4</b>

<sup>a</sup>Todos los nucleótidos son 2'-desoxi. <sup>b</sup>Todos los grupos fosfato son del tipo fosforotioato.

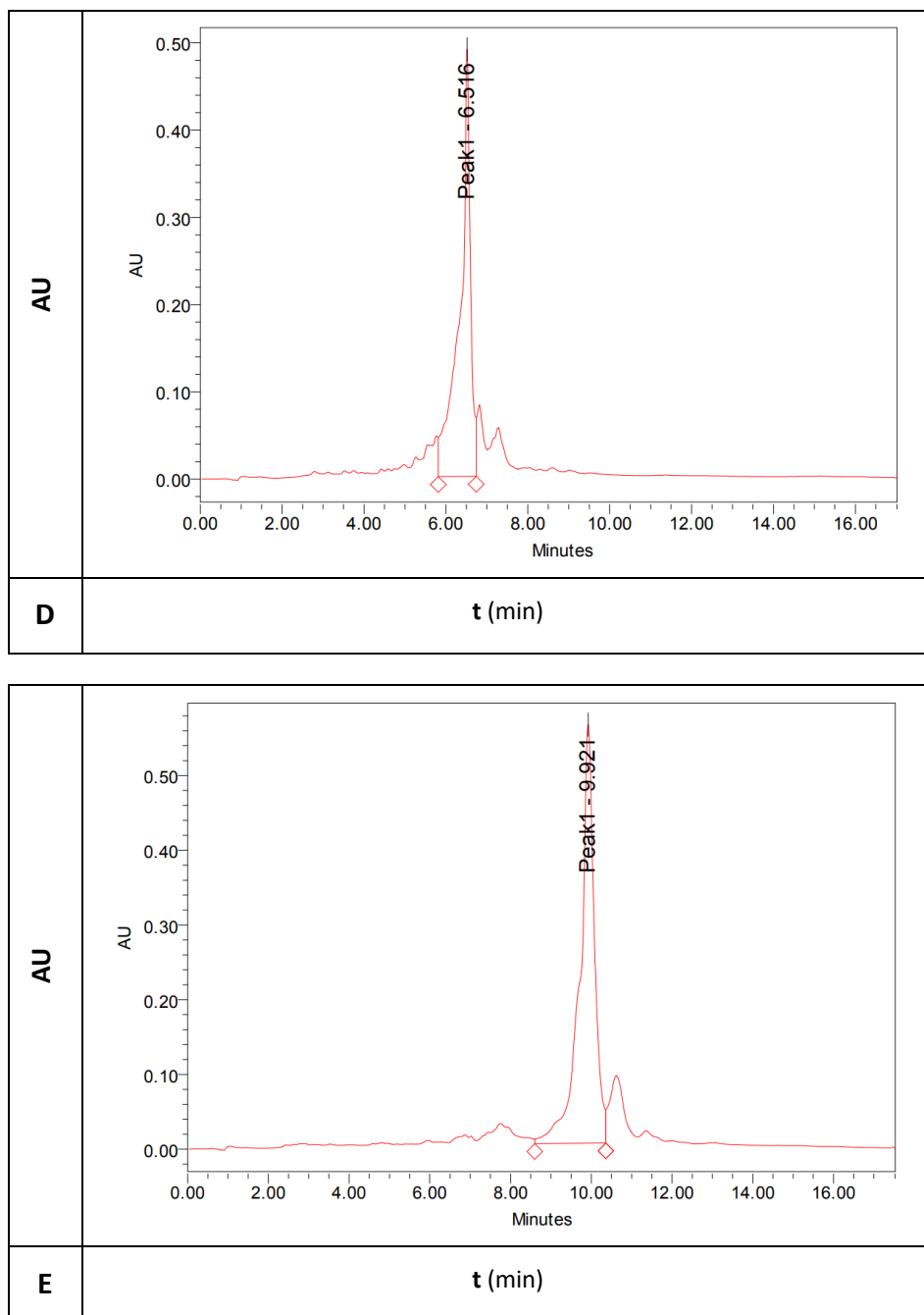


**Figura 40.** Espectros HPLC de los oligonucleótidos: (A) PEG024-14mer 35; (B) PEG024-15mer 36; (C) PEG029-15mer 37; (D) R-Las-PO 38 y (E) R-Las-PS 39.

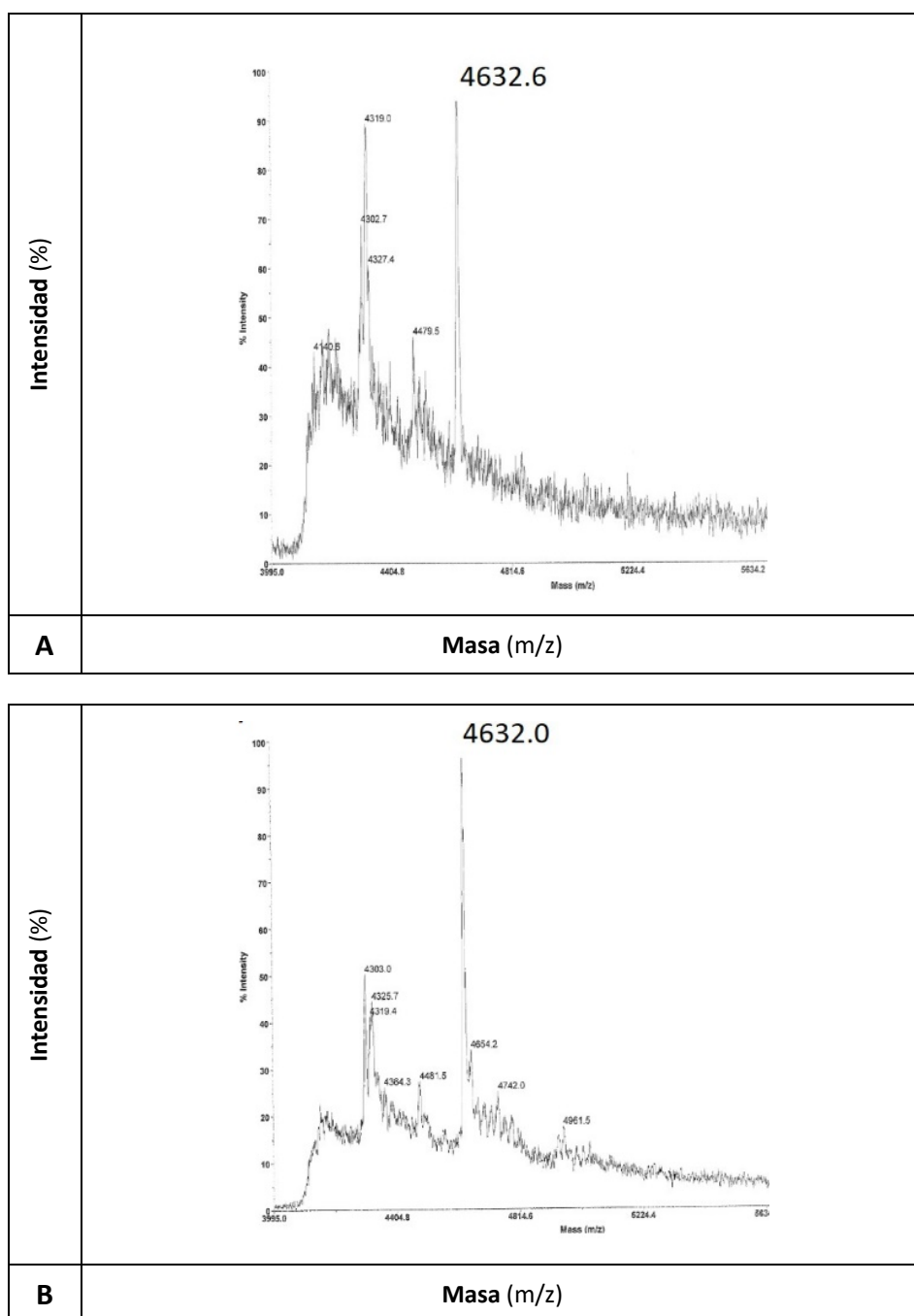


**Figura 40 (cont.).** Espectros HPLC de los oligonucleótidos: (A) PEG024-14mer **35**; (B) PEG024-15mer **36**; (C) PEG029-15mer **37**; (D) R-Las-PO **38** y (E) R-Las-PS **39**.

Resultados y discusión -----

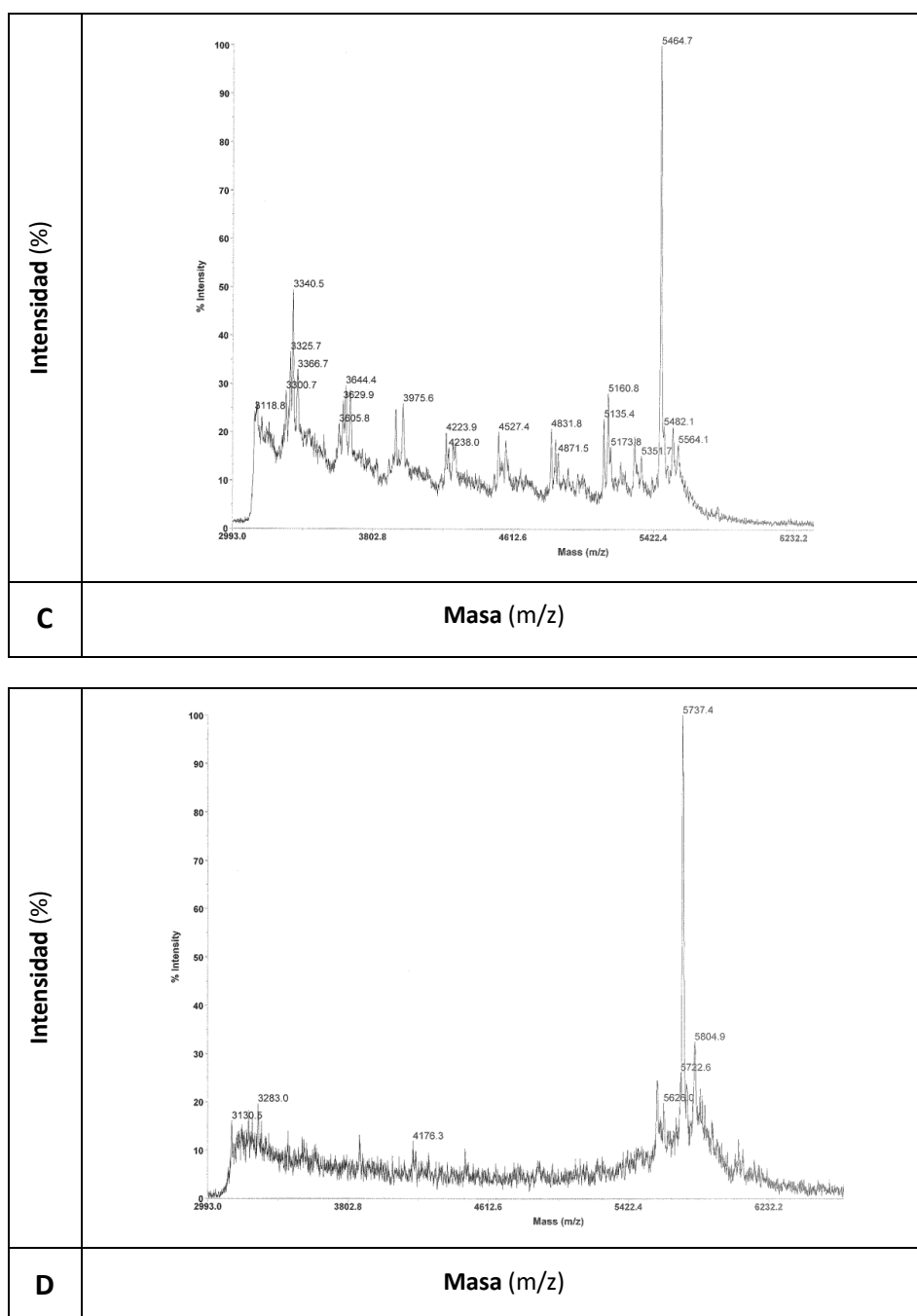


**Figura 40 (cont.).** Espectros HPLC de los oligonucleótidos: (A) PEG024-14mer **35**; (B) PEG024-15mer **36**; (C) PEG029-15mer **37**; (D) R-Las-PO **38** y (E) R-Las-PS **39**.



**Figura 41.** Espectros MALDI-TOF de los oligonucleótidos: (A) PEG024-15mer **36**; (B) PEG029-15mer **37**; (C) R-Las-PO **38** y (D) R-Las-PS **39**, sintetizados con la resina PEG024.

Resultados y discusión -----



**Figura 41 (cont.).** Espectros MALDI-TOF de los oligonucleótidos: (A) PEG024-15mer **36**; (B) PEG029-15mer **37**; (C) R-Las-PO **38** y (D) R-Las-PS **39**, sintetizados con la resina PEG024.



Como se observa en los datos de las Tablas 16 y 17, en todos los ensayos sintéticos de oligonucleótidos de cadena larga con las resinas *Core-Shell*, se obtuvieron los compuestos deseados con unos rendimientos de acoplamiento muy elevados, siendo la resina PEG024 la que proporcionó mejores resultados (99%).

Este soporte, a pesar de ser el que menor carga inicial presentaba para  $dA^{Bz} = 69-76\%$  y  $dC^{Bz} = 56-66\%$  (Tabla 12) debido a poseer una estructura molecular más compleja y por ende más impedida estéricamente, resultó ser el más apropiado para la síntesis.

Por tanto, basándonos en los resultados obtenidos, podemos decir que las resinas PEG024 y PEG029 permiten la síntesis de oligonucleótidos en fase sólida con una longitud, en principio, de hasta 18 nucleótidos con unos rendimientos de acoplamiento óptimos. Estos compuestos fueron purificados y caracterizados, obteniéndose los productos esperados con buen rendimiento.

### 3.3. SÍNTESIS DE OLIGONUCLEÓTIDOS MODIFICADOS

#### 3.3.1. Síntesis en fase sólida de fragmentos protegidos de ADN utilizando resinas *Core-Shell* como soporte sólido

En los últimos años, el desarrollo de oligonucleótidos terapéuticos, así como el desarrollo de vacunas de ARNm, han desencadenado la búsqueda de métodos de síntesis alternativos, que requieran un menor consumo de reactivos y/o que permitan unas síntesis más rápidas de oligonucleótidos de cadena larga.

La utilización de bloques de construcción formados por pequeños fragmentos protegidos de ADN y ARN son una de las posibles alternativas.

Su síntesis es especialmente interesante para el desarrollo de mutagénesis dirigida por oligonucleótidos, que necesita fosforamiditos poliméricos de trinucleótidos para experimentos de mutagénesis aleatoria.<sup>116</sup>

La generación de bibliotecas de ADN por adición de fosforamiditos monoméricos no es apropiada para la mutagénesis aleatoria, ya que podrían incorporar codones de terminación y sin sentido. La síntesis de los fragmentos protegidos con ADN y ARN se realiza generalmente utilizando química en disolución<sup>117</sup> y, recientemente, con el uso de tecnologías de mecanoquímica<sup>118</sup> o nanofiltración.<sup>119</sup> Además, se han sugerido varios métodos basados en técnicas de fase sólida para proporcionar una alternativa más rápida a las técnicas en disolución. Estos métodos han sido

---

<sup>116</sup> B. Virnekäs, L. Ge, A. Plückthun, C. Schneider, G. Wellnhofer, S. E. Moroney. *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 5600-5607.

<sup>117</sup> A. Ono, A. Matsuda, J. Zhao, D. V. Santi. *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23*, 4677-4682.

<sup>118</sup> J. D. Thorpe, D. O'Reilly, T. Friscic, M. J. Damha, *Chem. Eur. J.* **2020**, *26*, 8857-8861.

<sup>119</sup> J. F. Kim, P. R. J. Gaffney, I. B. Valtcheva, G. Williams, A. M. Buswell, M. S. Anson, A. G. Livingston. *Org. Process Res. Dev.* **2016**, *20*, 1439-1452.

revisados en los últimos años<sup>120,121</sup> y, por esta razón, se ha decidido evaluar en este capítulo la posibilidad de utilizar los soportes *Core-Shell* para la preparación de fragmentos protegidos de ADN.

En una primera aproximación, se comenzó ensamblando el trímero 5'-DMT-TTT-3' (Tabla 18) en un soporte sólido de 5'-DMT-T-succinil-PEG024, utilizando metilfosforamiditos como precursores sintéticos (Figura 42) en una síntesis a escala de 1  $\mu$ mol.

**Tabla 18.** Fragmentos protegidos de ADN que contienen enlaces de metilfosfato y mesilfosforamidato.

Nombre	5'→3'	Estabilidad grupos protectores
5'-DMT-TTT-3' ( <b>40</b> )	TmTmT	estable
5'-DMT-TTdA <sup>Bz</sup> -3' ( <b>41</b> )	TmTmdA <sup>Bz</sup>	eliminación parcial del grupo Bz
5'-DMT-TTdG <sup>Ibu</sup> -3' ( <b>42</b> )	TmTmdG <sup>Ibu</sup>	eliminación parcial del grupo Ibu
5'-DMT-TT-3' ( <b>43</b> )	T*T	estable
5'-DMT-TA <sup>Bz</sup> -3' ( <b>44</b> )	T*dA <sup>Bz</sup>	eliminación parcial del grupo Bz
5'-DMT-TG <sup>Ibu</sup> -3' ( <b>45</b> )	T*dG <sup>Ibu</sup>	eliminación parcial del grupo Ibu
5'-DMT-TC <sup>Bz</sup> -3' ( <b>46</b> )	T*dC <sup>Bz</sup>	eliminación del grupo Bz

**m** Indica enlace de metilfosfato; \*Indica enlace de mesilfosforamidato.

La etapa de oxidación se realizó con una disolución acuosa de <sup>t</sup>BuOOH en ACN para evitar la pérdida del grupo metilfosfato, descrita cuando se utilizan las disoluciones estándar de yodo.<sup>122</sup>

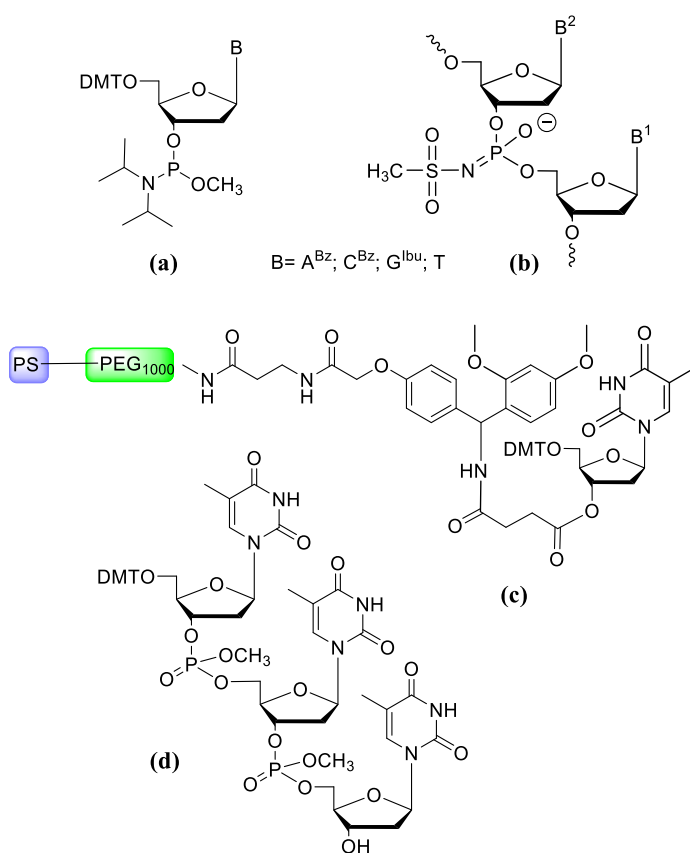
Una vez finalizada la síntesis, se liberó el oligonucleótido del soporte mediante tratamiento con una disolución 0.4 M de NaOH en metanol a la que se adiciona H<sub>2</sub>O en relación 4:1, respectivamente. Para determinar el tiempo mínimo necesario de reacción sin que exista pérdida del grupo

<sup>120</sup> T. S. Arunachalam, C. Wichert, B. Appel, S. Müller. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 4641-4650.

<sup>121</sup> R. Suchslan, B. Appel, S. Müller. Preparation of trinucleotide phosphoramidites as synthons for the synthesis of gene libraries. *Beilstein J. Org. Chem.* **2018**, *14*, 397-406.

<sup>122</sup> M. Hassler, Y. Q. Wu, M. Reddy, T. H. Chan, M. J. Damha. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 2575-2578.

protector del fosfato, el soporte sólido fue tratado con la disolución básica a intervalos de 5 min.



**Figura 42.** (a) Metilfosforamiditos; (b) Enlace internucleotídico de fosforamidato de mesilo, (c) Resina 5'-DMT-T-succinil-PEG024; (d) Oligonucleótido 5'-DMT-TmTmT-3' 40 con grupos protectores metilo en los enlaces fosfato internucleotídicos.

Además, los filtrados resultantes fueron neutralizados inmediatamente después de acabar la reacción con 1 equiv de ácido acético. Tras el análisis de las muestras, se observó que la mayor parte de los fragmentos protegidos con DMT se liberaron tras 10 min de reacción.

El aislamiento de los fragmentos protegidos con DMT se logró mediante evaporación del metanol, cargando posteriormente la solución acuosa neutralizada en un cartucho de purificación de fase reversa (OPC).

Los productos fueron analizados por HPLC y MALDI-TOF (Figura 43) que confirmaron la obtención del fragmento protegido con DMT.

Resultados y discusión -----

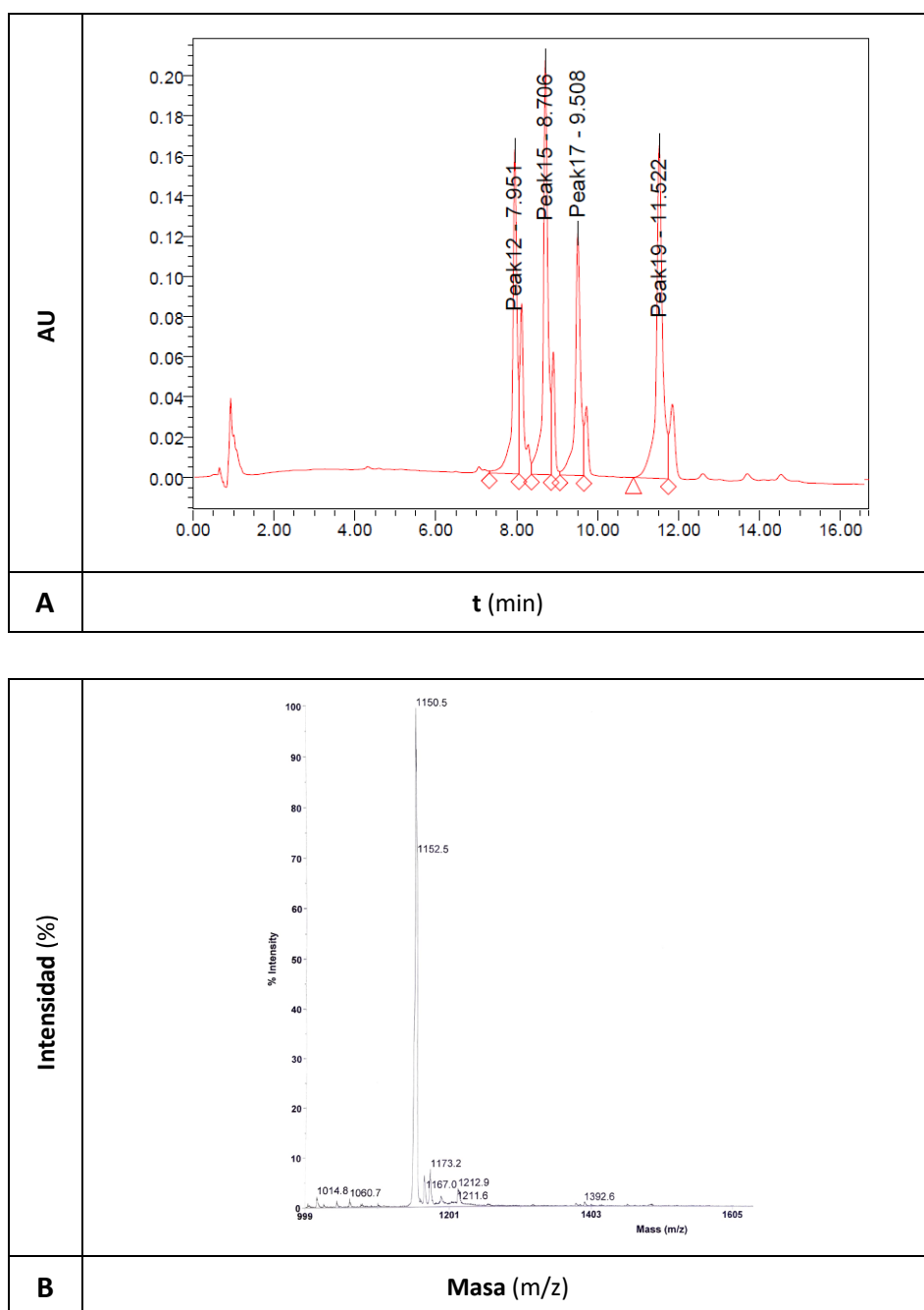


Figura 43. Espectros de HPLC (A) y MALDI-TOF (B) del trómero 5'-DMT-TTT-3' 40.

La presencia de un metilo en el grupo fosfato origina la formación de un nuevo centro quiral, lo cual hace que en el espectro de HPLC aparezcan las señales correspondientes a cada uno de los cuatro diastereoisómeros del trímero **40** analizado.

Siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente, se llevó a cabo la síntesis de los trímeros 5'-DMT-TTdA<sup>Bz</sup>-3' **41** y 5'-DMT-TTdG<sup>Ibu</sup>-3' **42** sobre un soporte PEG024 previamente derivatizado. Todo el proceso de síntesis y purificación tenía como objetivo verificar la estabilidad de los grupos protectores de benzoilo (Bz) e isobutirilo (Ibu) presentes en las bases A y G, respectivamente, en una disolución 0.4 M de NaOH en metanol a la que se adiciona H<sub>2</sub>O (relación 4:1), necesaria para la liberación de los trímeros protegidos de ADN.

Previamente, se había evaluado y analizado por cromatografía de capa fina (TLC) la estabilidad de los nucleósidos dA<sup>Bz</sup>, dG<sup>Ibu</sup> y dC<sup>Bz</sup> (ver sección experimental) en esta misma disolución, así como en otra disolución saturada de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en metanol. El estudio mostró una mayor estabilidad de los productos en la disolución de NaOH, en comparación con la de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, con tiempos de vida media de 5-20, 5-25 y 5-15 minutos para dA<sup>Bz</sup>, dG<sup>Ibu</sup> y dC<sup>Bz</sup>, respectivamente. Estos datos apoyarían el uso de estos nucleósidos protegidos para la obtención de los trímeros 5'-DMT-TTA<sup>Bz</sup>-3' **41** y 5'-DMT-TTG<sup>Ibu</sup>-3' **42**, pues el tiempo necesario para la liberación de los fragmentos protegidos con DMT de los soportes PEG024 se estimó en 10 min.

Desafortunadamente, el análisis de los resultados obtenidos por HPLC y MALDI-TOFF (Figura 44) de los productos de la síntesis de estos trímeros sugirió una eliminación parcial de los grupos benzoilo e isobutirilo.

Resultados y discusión -----

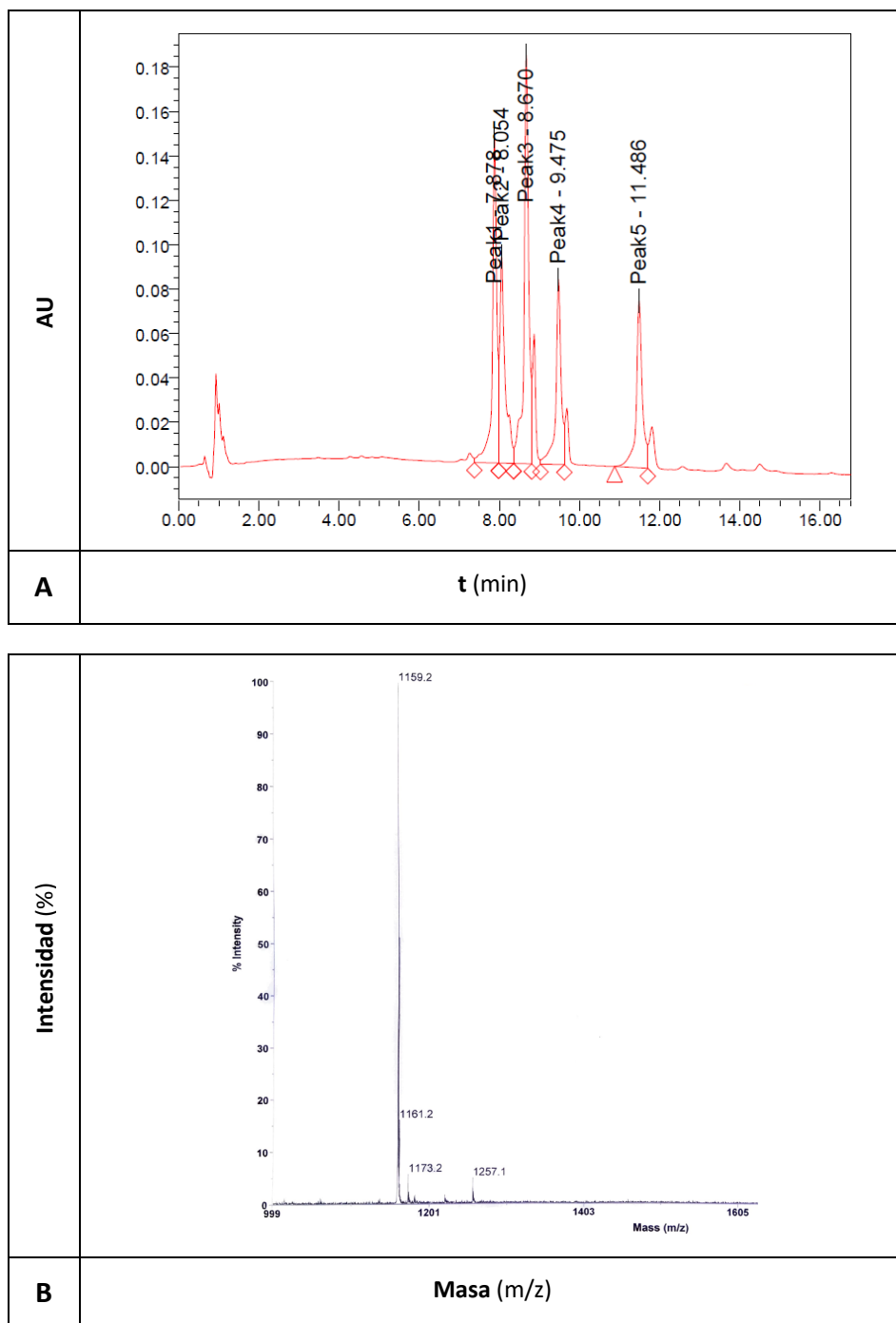
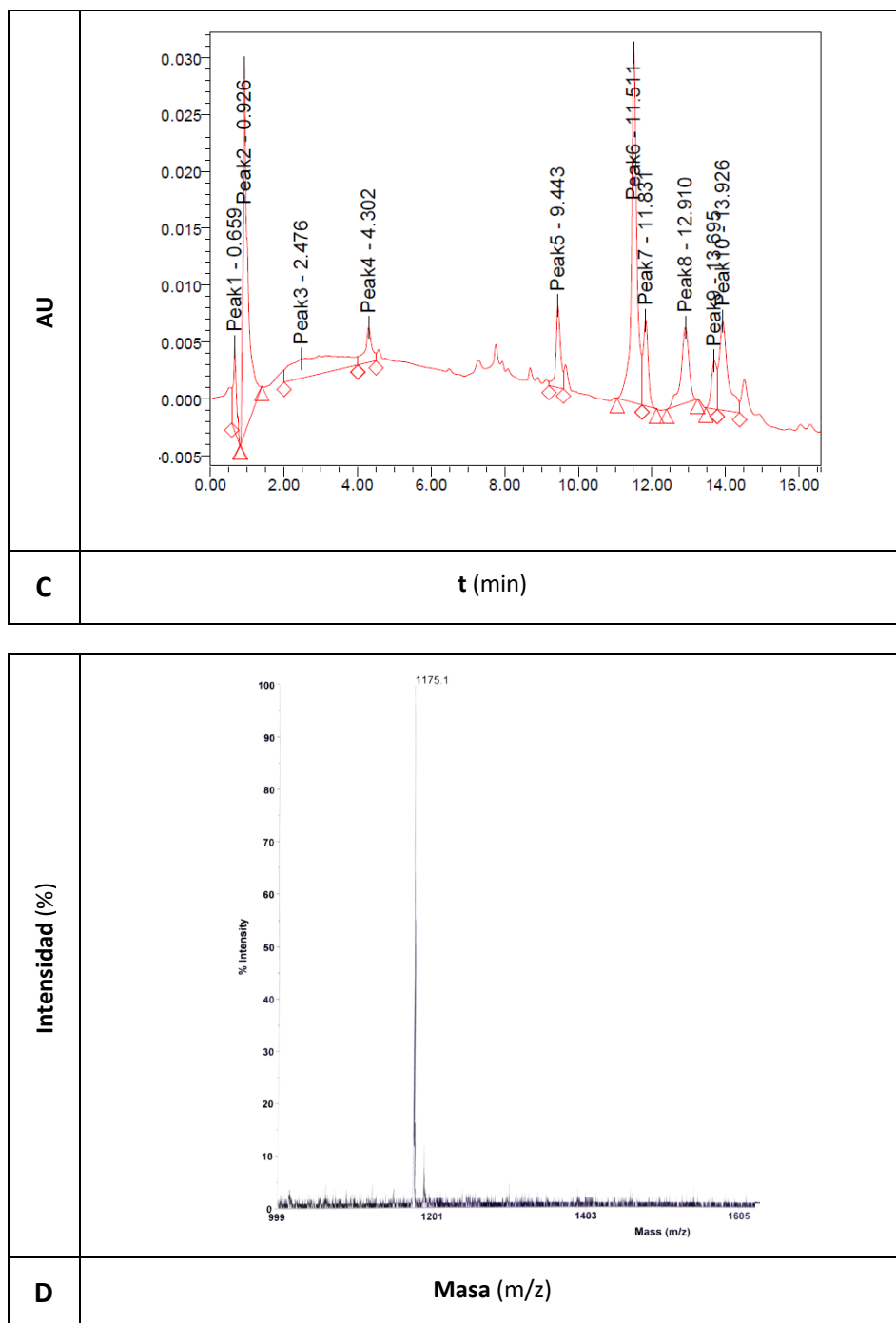


Figura 44. Espectros de HPLC (A) y MALDI-TOF (B) del trómero 5'-DMT-TTdA<sup>Bz</sup>-3' 41.





**Figura 44 (cont.).** Espectros de HPLC (C) y MALDI-TOF (D) del trímero 5'-DMT-TTdG<sup>Ibu-3'</sup> 42.

En los últimos años, se ha descrito la síntesis de oligonucleótidos portadores de enlaces mesilfosforamidato,<sup>123</sup> que tienen una alta afinidad con el ARN diana, buena resistencia a las nucleasas y un reclutamiento eficiente de la RNasa H.<sup>124,125</sup>

Debido a estas excelentes propiedades, decidimos ensayar los soportes *Core-Shell* para preparar cuatro dímeros de 5'-DMT-TT-3' **43**, 5'-DMT-TdA<sup>Bz</sup>-3' **44**, 5'-DMT-TdG<sup>Ibu</sup>-3' **45** y 5'-DMT-TdC<sup>Bz</sup>-3' **46** que portaban un enlace mesilfosforamidato internucleosídico (Figura 42b). Este fragmento protegido con DMT en 5' se sintetizó mediante el acoplamiento de β-cianoetilfosforamiditos sobre soportes de DMT-nucleósido-succinil-PEG024, seguida de una etapa de oxidación con una disolución 0.4 M de azida de mesilo en acetonitrilo.<sup>126</sup>

**Tabla 19.** Secuencias de oligonucleótidos y masas obtenidas por MALDI-TOF.

Nombre	5' → 3'	Masa calc.	Masa encontrada
5'-DMT-TTT-3' ( <b>40</b> )	TmTmT	1180	1150.5 (-2Me)
5'-DMT-TTdA <sup>Bz</sup> -3' ( <b>41</b> )	TmTmdA <sup>Bz</sup>	1294	1159.2 (-2Me, -Bz)
5'-DMT-TTdG <sup>Ibu</sup> -3' ( <b>42</b> )	TmTmdG <sup>Ibu</sup>	1276	1175.1 (-2Me, -Ibu)
5'-DMT-TT-3' ( <b>43</b> )	T*T	925	924.4
5'-DMT-TdA <sup>Bz</sup> -3' ( <b>44</b> )	T*dA <sup>Bz</sup>	1039	1037.5
5'-DMT-TdG <sup>Ibu</sup> -3' ( <b>45</b> )	T*dG <sup>Ibu</sup>	1020	1019.6
5'-DMT-TdC <sup>Bz</sup> -3' ( <b>46</b> )	T*dC <sup>Bz</sup>	1015	909.6 (-2Me, -Bz)

**m** Indica enlace de metilfosfato. \* Indica enlace de mesilfosforamidato.

<sup>123</sup> B. P. Chelobanov, E. A. Burakova, D. V. Prokhorova, A. A. Fokina, D. A. Stetsenko. *Rus. J. Bioorg. Chem.* **2017**, *43*, 664-668.

<sup>124</sup> S. K. Miroshnichenko, O. A. Patutina, E. A. Burakova, B. P. Chelobanov, A. A. Fokina, V. V. Vlassov, S. Altman, M. A. Zenkova, D. A. Stetsenko. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 1229-1234.

<sup>125</sup> O. A. Patutina, S. K. Gaponova, A. V. Sen'kova, I. A. Sevin, D. V. Glaskikh, E. A. Burakova, A. A. Fokina, M. A. Maslov, E. V. Shmendel', M. J. A. Wood, V. V. Vlassov, S. Altman, D. A. Stetsenko, M. A. Zenkova. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2020**, *117*, 32370-32379.

<sup>126</sup> Y. Xing, G. Sheng, J. Wang, P. Lu, Y. Wang. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 1244-1247.

En primer lugar, se sintetizó el dímero 5'-DMT-T\*T-3' **43** y se liberó del soporte siguiendo el protocolo mencionado anteriormente. La identidad esperada del producto fue confirmada mediante análisis de HPLC y MALDI-TOF (Figura 45).

Resultados y discusión -----

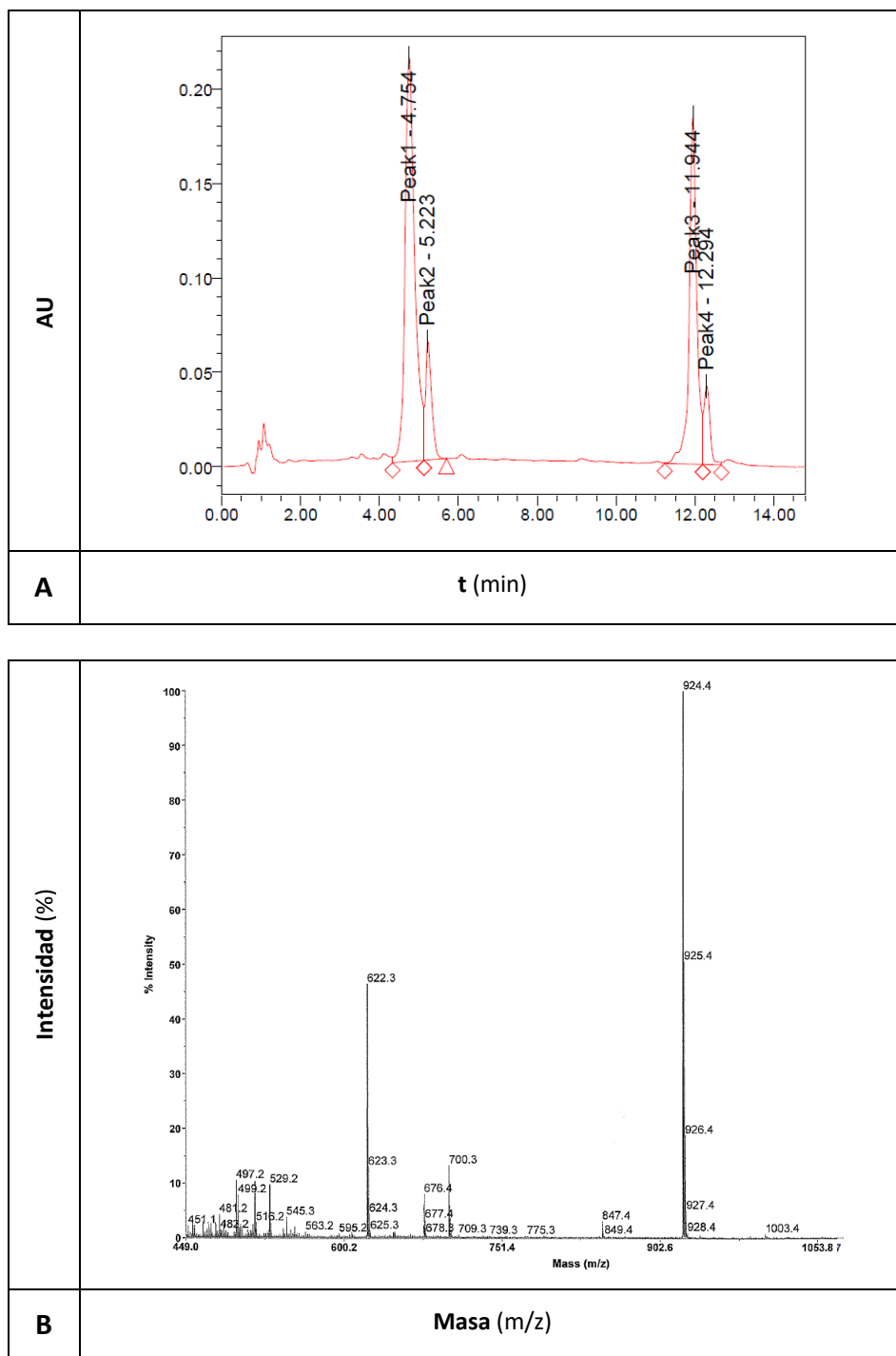
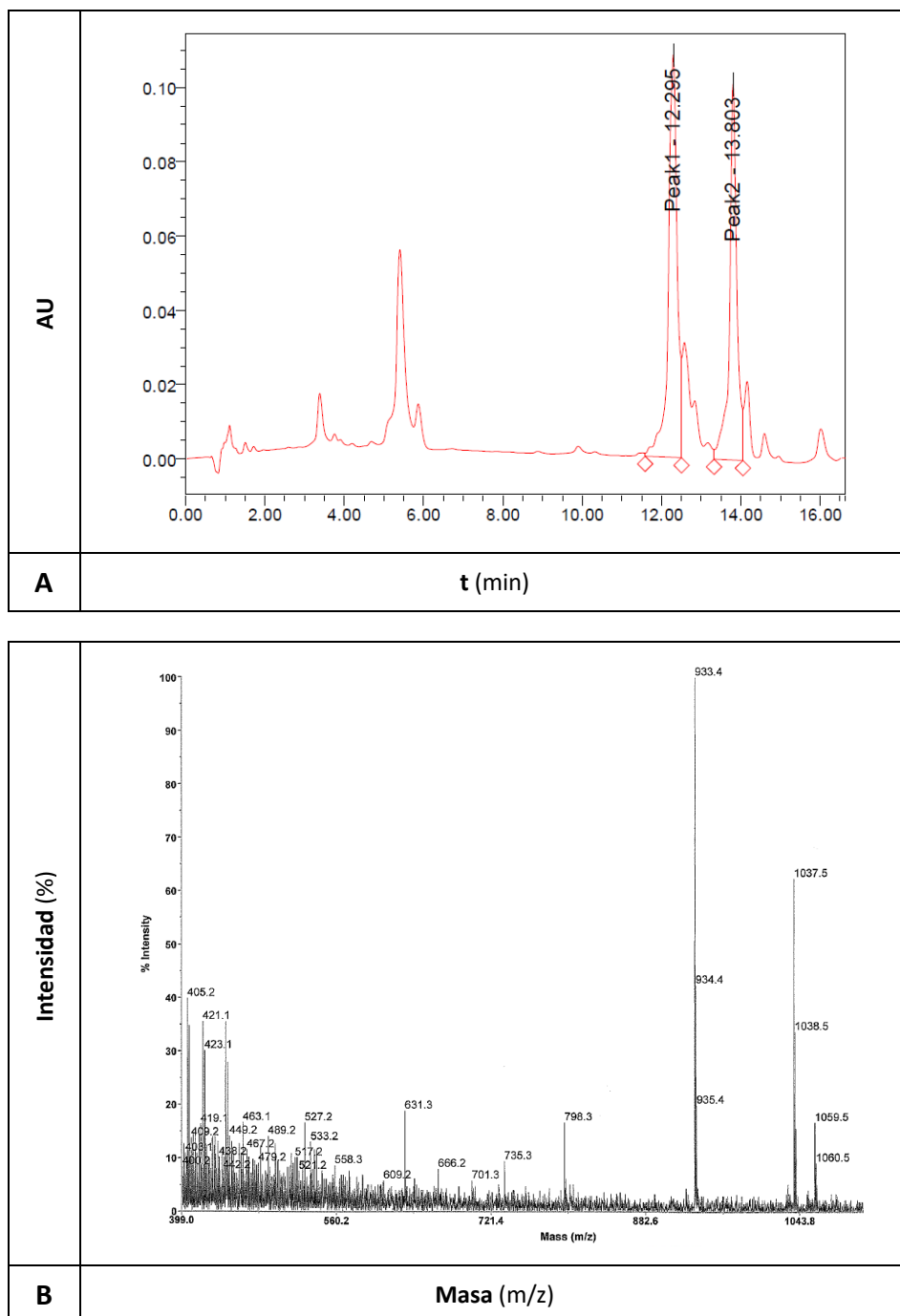


Figura 45. Espectros de HPLC (A) y MALDI-TOF (B) del dímero 5'-DMT-T\*T-3' 43.

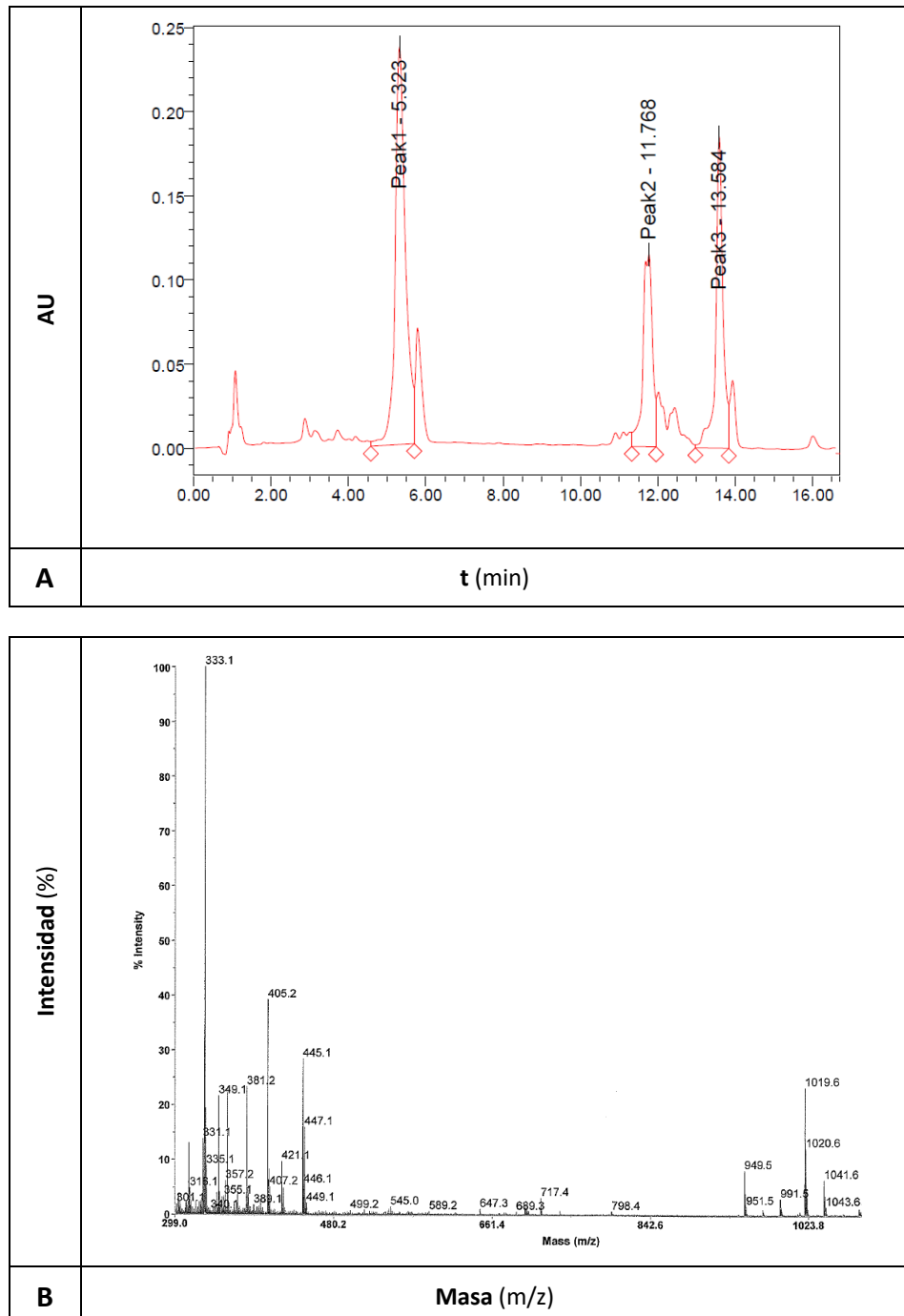
Posteriormente, de manera similar, se sintetizaron los dímeros DMT-5'-T\*dA<sup>Bz</sup>-3' **44**, DMT-T\*dG<sup>Ibu</sup>-3' **45** y DMT-T\*dC<sup>Bz</sup>-3' **46**.

Una vez liberados del soporte y purificados, el análisis por HPLC de los productos **44** y **45** mostró tres señales de tamaño similar correspondientes al dímero esperado y al dímero hidrolizado, lo que indica la eliminación parcial de los grupos benzoilo e isobutirilo en dA<sup>Bz</sup> y dG<sup>Ibu</sup> (Figuras 46 y 47).

Resultados y discusión -----



**Figura 46.** Espectros de HPLC (A) y MALDI-TOF (B) del dímero 5'-DMT-T\*dA<sup>Bz</sup>-3' 44.

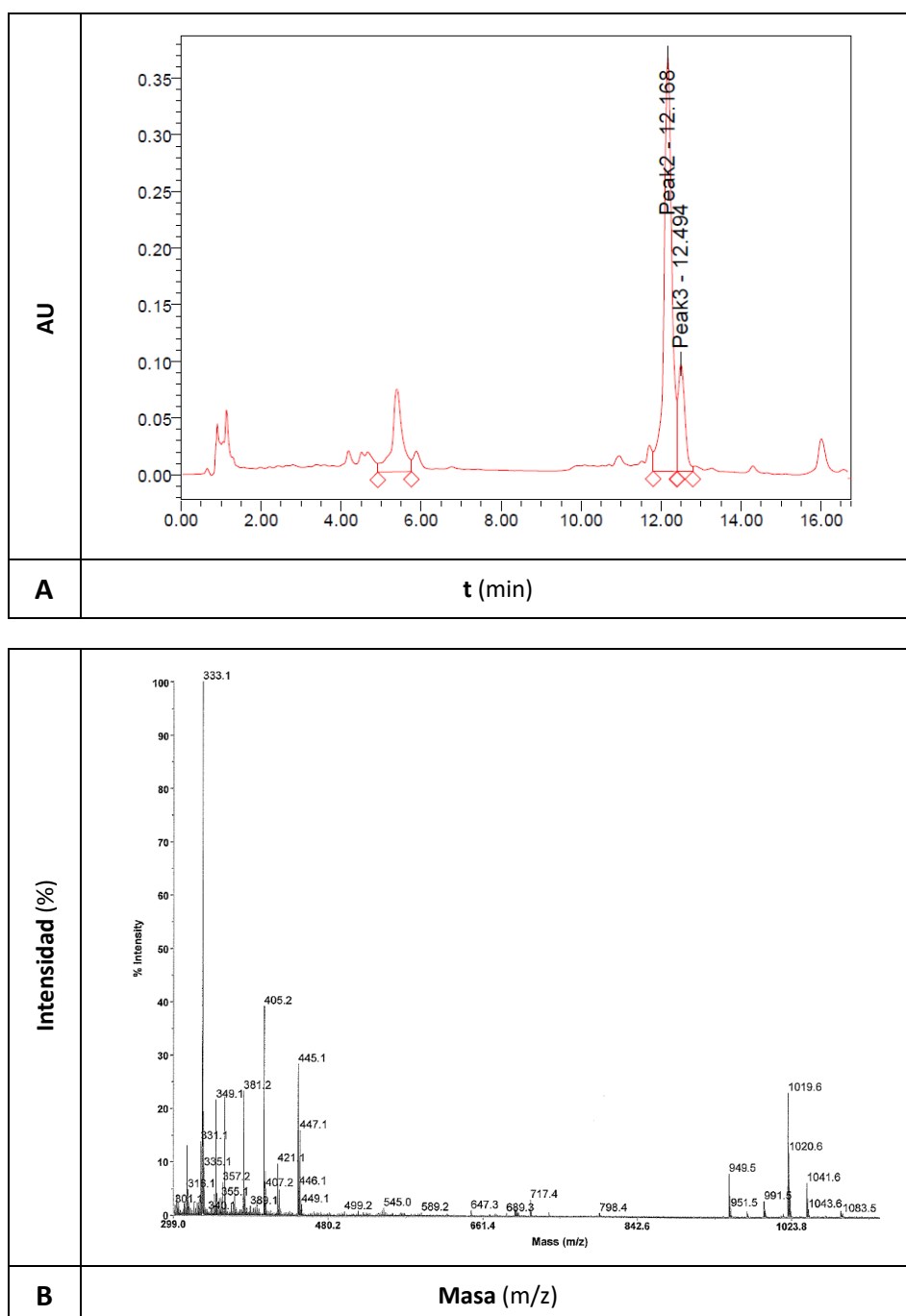


**Figura 47.** Espectros de HPLC (A) y MALDI-TOF (B) del dímero 5'-DMT-T\*dG<sup>Ibu</sup>-3' 45.

*Resultados y discusión* -----

En el caso del dímero **46** el cromatograma de HPLC mostró una única señal correspondiente a la pérdida del grupo benzoilo de la dC. Los espectros de MALDI-TOF corroboran estos resultados (Figura 48).



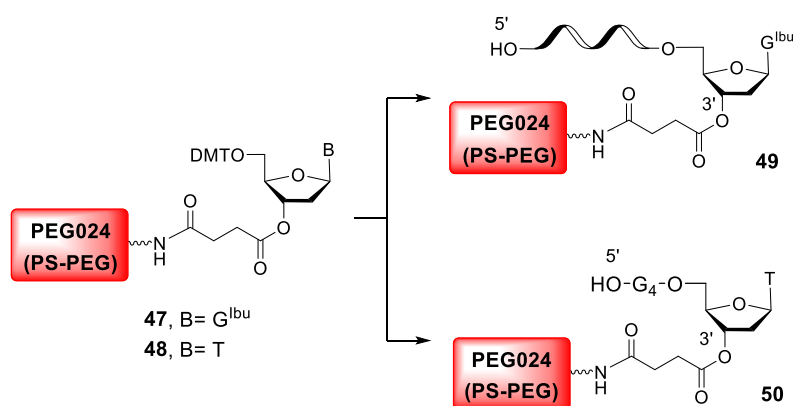


**Figura 48.** Espectros de HPLC (A) y MALDI-TOF (B) del dímero 5'-DMT-T\*dC<sup>Bz</sup>-3' **46**.

### 3.3.2. Síntesis de oligonucleótidos conjugados con ácidos grasos

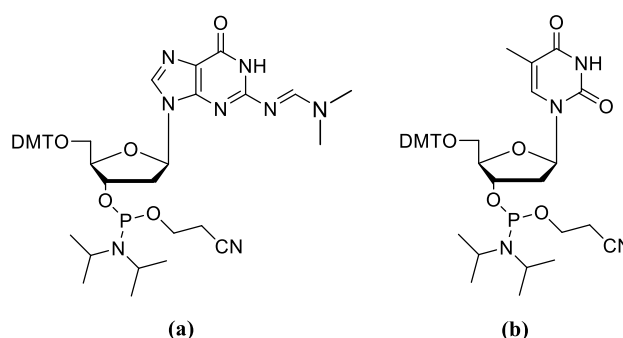
Para completar el estudio de la viabilidad del uso de resinas *Core-Shell* como soporte sólido en la síntesis de oligonucleótidos, se diseñó la síntesis de dos oligonucleótidos ricos en guanina, susceptibles de formar estructuras de tipo G-cuádruplex, a los que posteriormente se les acopló dos cadenas distintas de ácidos grasos en su extremo 5'.

En primer lugar, se procedió a la síntesis de los oligonucleótidos seleccionados, uno de cadena larga, el aptámero antitrombina TBA, cuya secuencia responde a una cadena monocatenaria de ADN con una longitud de 15-mers [5'-d(GGTTGGTGTGGTTGG)-3'], y otro de cadena corta dG<sub>4</sub>T [5'-d(GGGGT)-3']. Ambos fueron ensamblados de manera automatizada utilizando como soporte la resina PEG024 (Esquema 28), previamente funcionalizada con los nucleósidos correspondiente (47, 48), en una escala de 1-2 μmol y siguiendo los protocolos de síntesis DMT-OFF descritos en apartados anteriores.



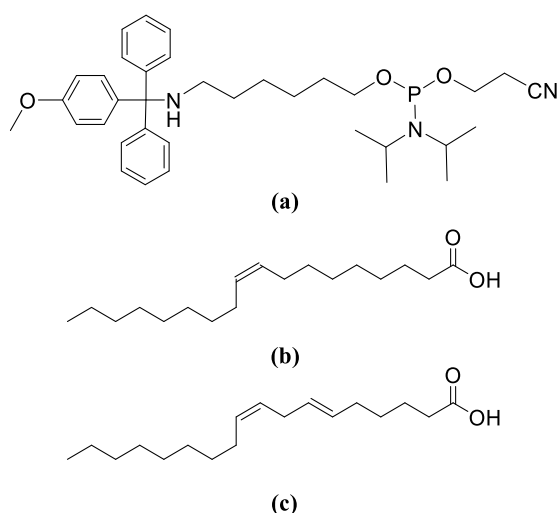
**Esquema 28.** Síntesis de oligonucleótidos DMT-OFF de TBA (49) y G<sub>4</sub>T (50).

En este caso, los β-cianoetilfosforamiditos utilizados fueron 5'-DMT-dG<sup>DMF</sup> y 5'-DMT-T (Figura 49).



**Figura 49.** Estructura de los fosforamiditos: (a) 5'-DMT-dG<sup>DMF</sup>; (b) 5'-DMT-T.

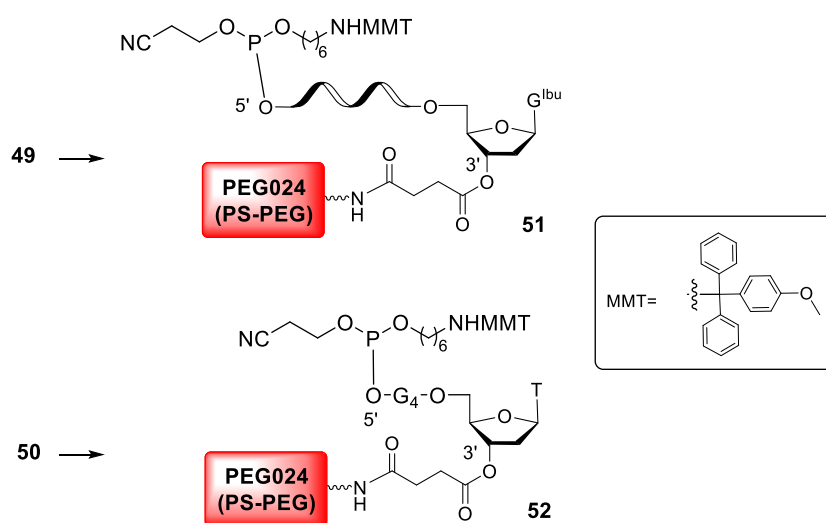
Después de la síntesis de los oligonucleótidos, fue necesario la introducción de un grupo enlazante de tipo amino que permitiese la conjugación posterior del ácido nucleico con la cadena de ácido graso. Para ello, se utilizó el derivado de fosforamidito de MMT-6-aminohexanol (Figura 50a), que permitió la incorporación de un grupo espaciador (C<sub>6</sub>) y un grupo amino en el extremo 5'- de la secuencia.



**Figura 50.** (a) Fosforamidito MMT-aminohexanol; (b) Ácido oleico; (c) Ácido linoleico.

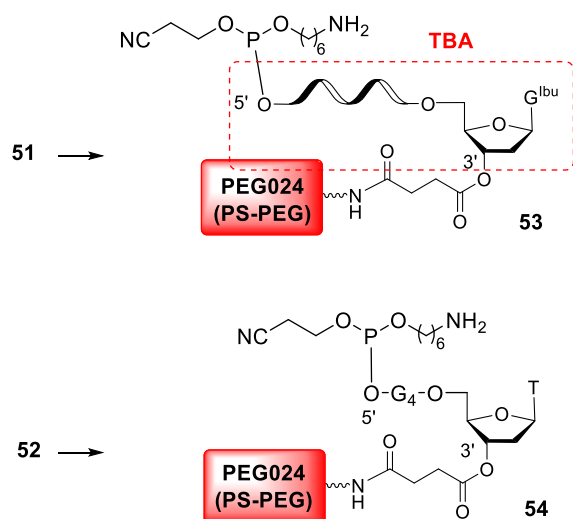
La unión del espaciador al extremo 5' de la cadena (Esquema 29) se llevó a cabo utilizando el sintetizador de ADN, programando esta etapa

como si fuese un ciclo más del proceso sintético, con la salvedad de que se evitó el paso de acetilación para evitar dicha reacción sobre el grupo amino, lo que inhabilitaría a la molécula para formar el conjugado final.



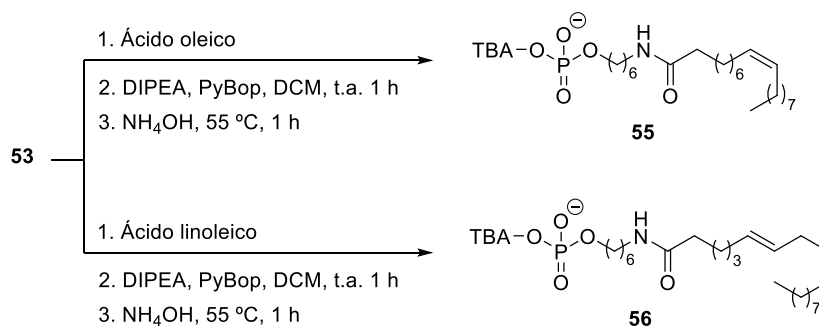
**Esquema 29.** Acoplamiento del grupo espaciador C<sub>6</sub>-NH<sub>2</sub> en 5'.

Tras eliminar el grupo protector de tritilo (MMT) con una disolución de TCA al 3% en DCM, las resinas resultantes estuvieron listas para la siguiente etapa (Esquema 30). Una pequeña alícuota del compuesto desprotegido fue liberada de la resina para hacer una estimación de las OD obtenidas. En un paso previo, esta alícuotas fueron lavadas con Et<sub>3</sub>N con el fin de eliminar el grupo protector cianoetilo, que en la liberación de la resina podría provocar reacciones indeseadas con el grupo amino libre. El valor de OD obtenido fue de 7.20 para el producto **53** y 2.48 para **54**.



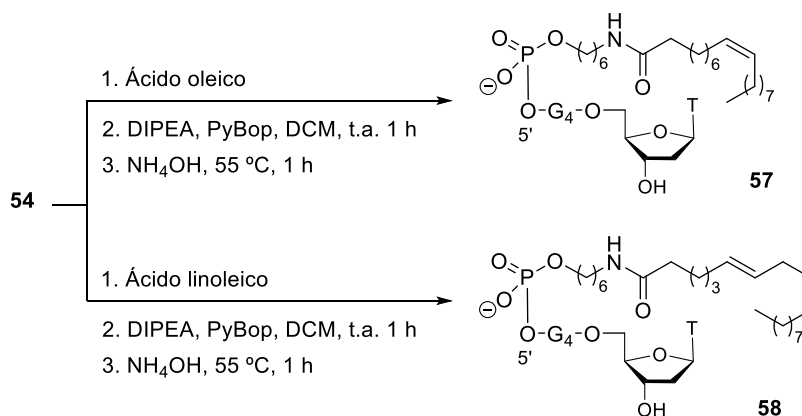
Esquema 30. Desprotección del grupo amino.

Una vez que se dispone del grupo amino libre, el oligonucleótido ya puede ser conjugado con el ácido graso de interés (Esquemas 31 y 32). Esta reacción de acoplamiento se hace antes de liberar el soporte sólido, en un proceso manual que implica la adición de una disolución del ácido graso junto con DIPEA y el agente de acoplamiento PyBoP en diclorometano sobre la resina que se pretende conjugar. Esta mezcla permaneció en contacto a temperatura ambiente y sin agitación durante 2 h.



Esquema 31. Conjugados de TBA con los ácidos oleico (55) y linoleico (56).

Resultados y discusión -----



**Esquema 32.** Conjugados de G<sub>4</sub>T con los ácidos oleico (57) y linoleico (58).

Una vez transcurrido este tiempo la resina se filtró y se lavó varias veces con diclorometano. Después se secó en vacío.

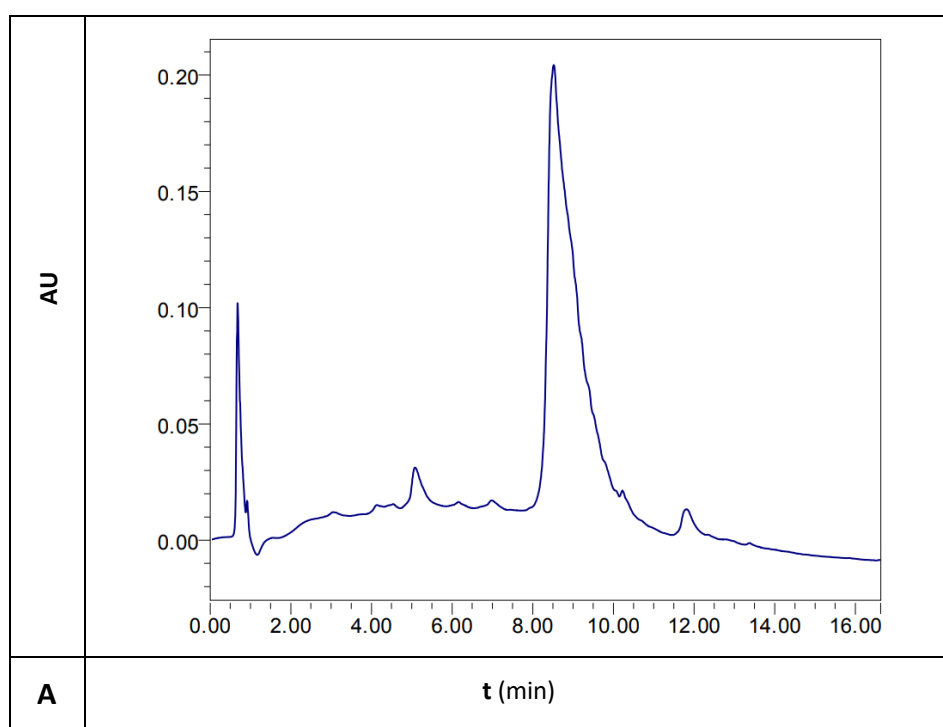
Por último, el oligonucleótido conjugado con el ácido graso se liberó de la resina en una disolución de amoníaco concentrado a 55 °C durante 1 h. Después la resina se filtró y la disolución se purificó en un cartucho Sephadex. Debido a la hidrofobicidad de los productos conjugados, la elución se hizo con una disolución de ACN al 20% en H<sub>2</sub>O. Las OD para los productos finales fueron calculadas y las muestras obtenidas se analizaron por MALDI-TOF. Estos resultados se reflejan en la Tabla 20.

**Tabla 20.** Resultados de las masas encontradas por MALDI-TOF para los oligonucleótidos conjugados con ácido oleico y linoleico.

Código	Sequences (5' → 3')	OD	MW (calc.)	MW (encontr.)
NH <sub>2</sub> -G <sub>4</sub> T (54)	NH <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> -d(GGGGT)	2.48	1738.3	1738.9
Oleico-G <sub>4</sub> T (57)	Oleico-NH <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> -d(GGGGT)	1.26	2004	1999.1
Linoleico-G <sub>4</sub> T (58)	Linoleico-NH <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> -d(GGGGT)	2.2	2002	2002.1
NH <sub>2</sub> -TBA (53)	NH <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> -TBA	7.2	4907	4903.1
Oleico-TBA (55)	Oleico-NH <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> -TBA	7.0	5173	nd
Linoleico-TBA (56)	Linoleico-NH <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> -TBA	7.3	5171	5158.3

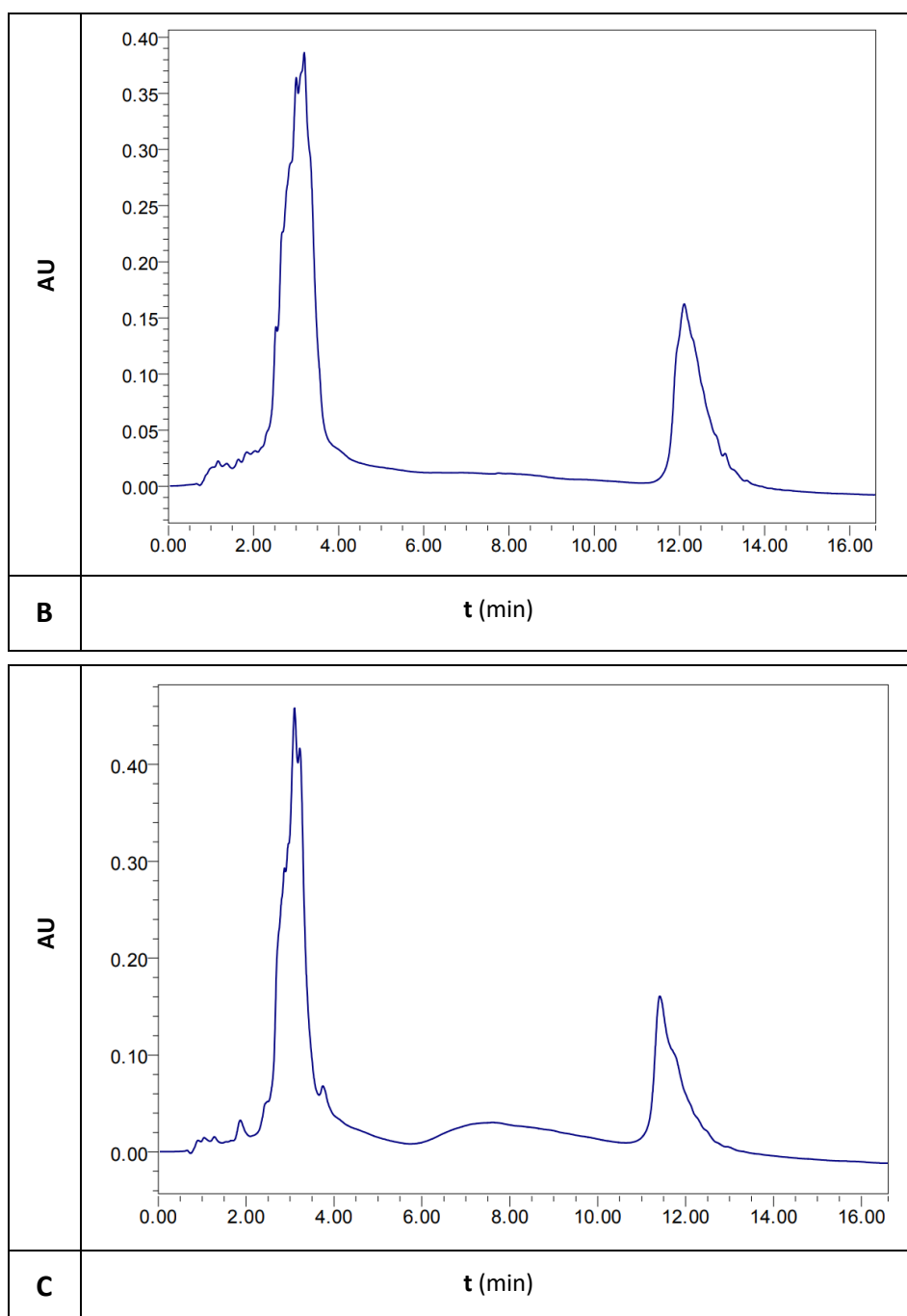
Como se puede observar las masas calculadas para los oligonucleótidos conjugados de G<sub>4</sub>T (**54**, **57**, **58**) y TBA (**53**) se corresponden con la masa encontrada. En cambio, desafortunadamente, en el caso de los conjugados **55** y **56**, la masa esperada no se corresponde con la encontrada.

A continuación, se muestran los cromatogramas de HPLC de los conjugados de TBA-NH<sub>2</sub> **53** y de los conjugados TBA-oleico **55** y TBA-linoleico **56** (Figura 51).



**Figura 51.** Cromatograma de HPLC del conjugado H<sub>2</sub>N-TBA (**53**) (**A**).

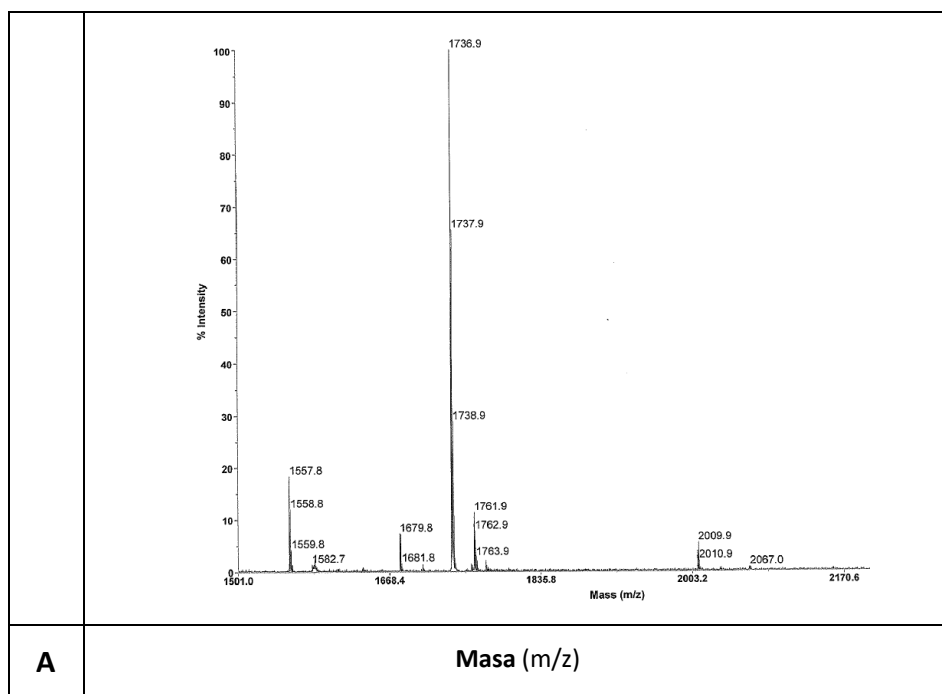
Resultados y discusión -----



**Figura 51 (cont.).** Cromatogramas de HPLC de los conjugados oleico-TBA (**55**) (**B**) y linoleico-TBA (**56**) (**C**).

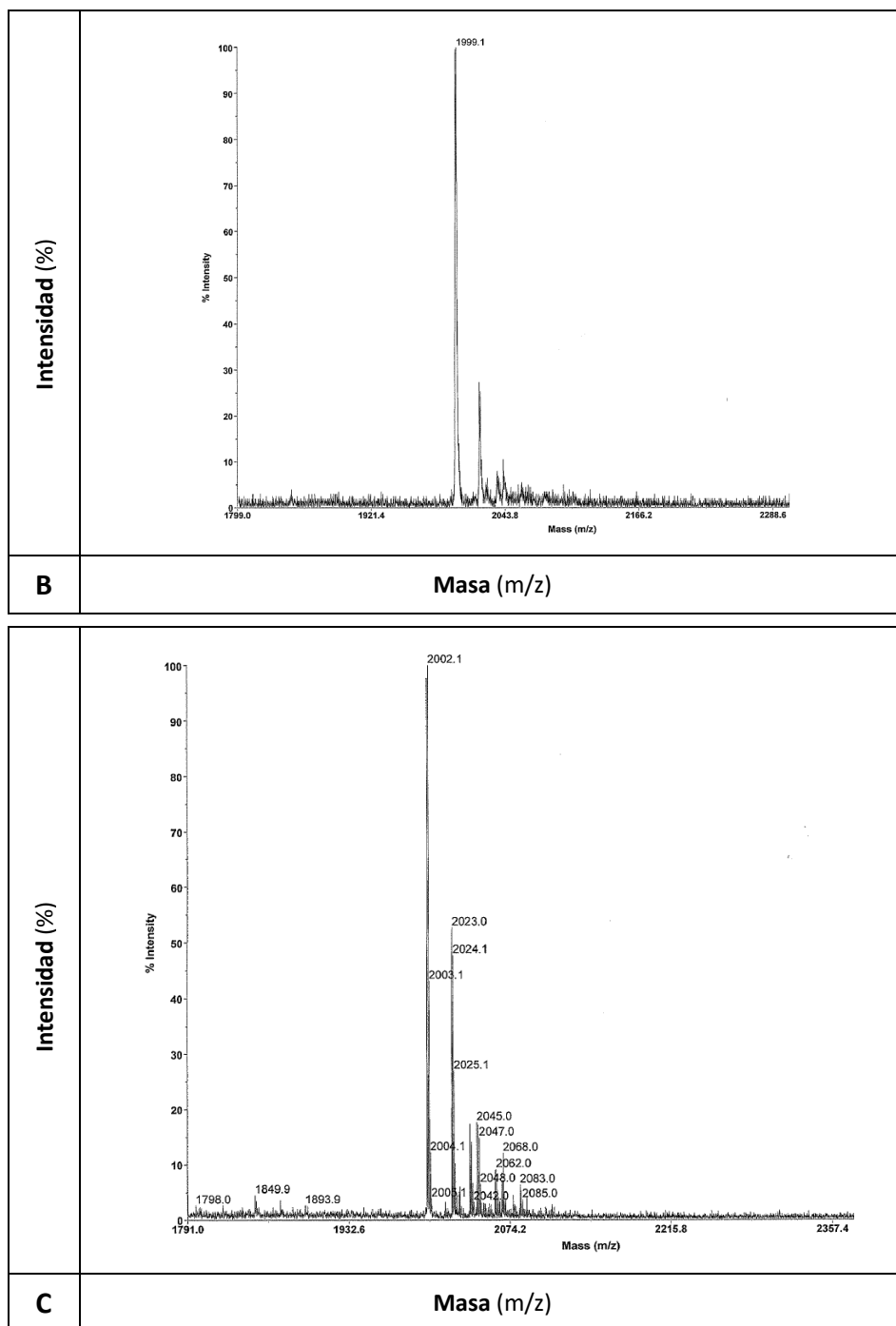


En la Figura 52 se recogen los espectros de MALDI-TOF de los conjugados de H<sub>2</sub>N-G<sub>4</sub>T **54**, oleico-G<sub>4</sub>T **57** y linoleico-G<sub>4</sub>T **58**. Además, también se muestran los espectros fallidos de MALDI-TOF de los conjugados H<sub>2</sub>N-TBA **53** y linoleico-TBA **56** (Figura 53).

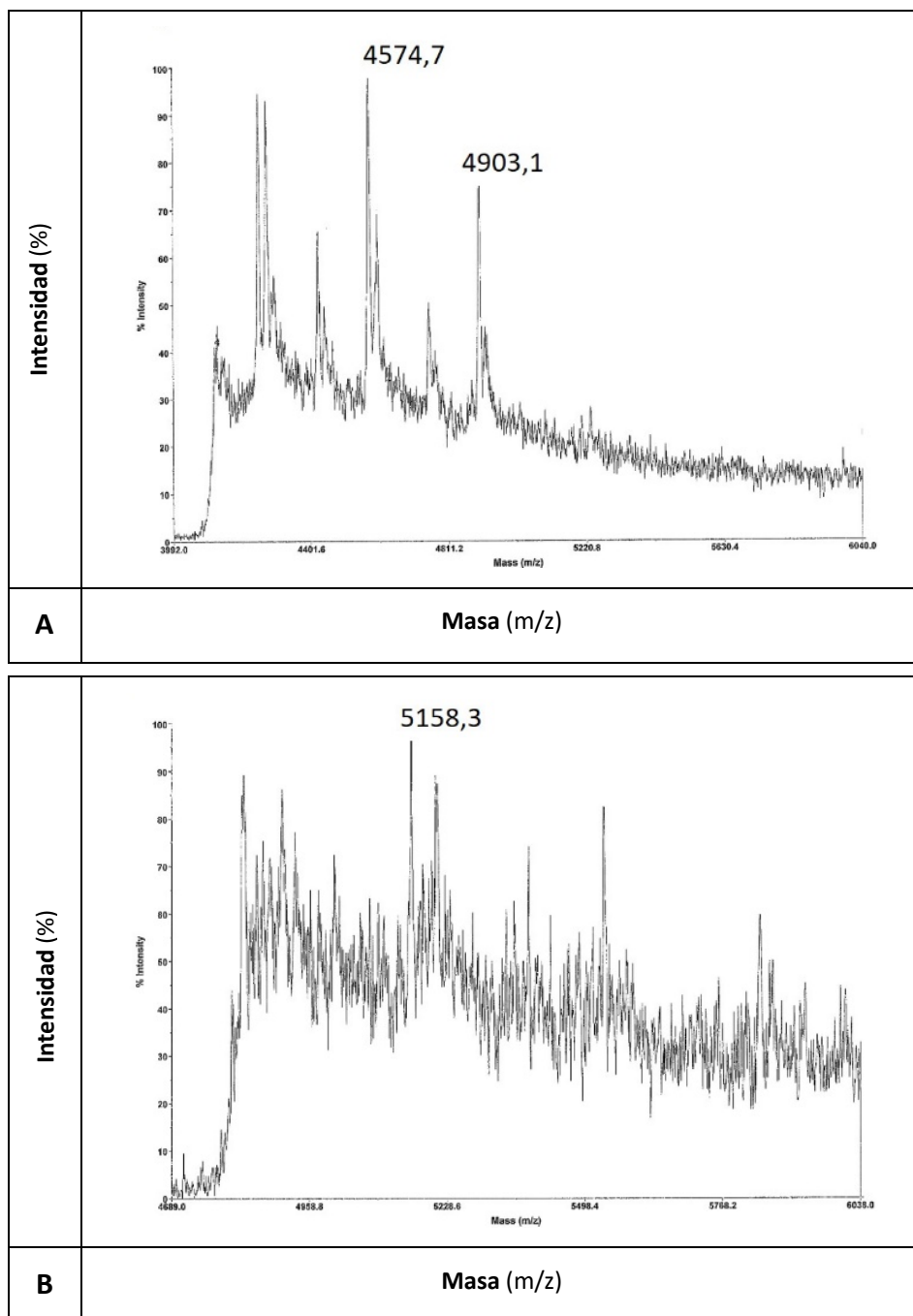


**Figura 52.** Espectro MALDI-TOF del conjugado H<sub>2</sub>N-G<sub>4</sub>T (**54**) (A).

Resultados y discusión -----



**Figura 52 (cont.).** Espectros MALDI-TOF de los conjugados: oleico-G<sub>4</sub>T (**57**) (**B**) y linoleico-G<sub>4</sub>T (**58**) (**C**).



**Figura 53.** Espectros MALDI-TOF de los conjugados: H<sub>2</sub>N-TBA (**53**) (A) y linoleico-TBA (**56**) (B).



## **Conclusiones**



En este capítulo se ha descrito, por primera vez, la utilización de resinas *Core-Shell* en la síntesis de oligonucleótidos.

Con el empleo de este novedoso tipo de soporte sólido, compuesto por perlas con un núcleo inerte de poliestireno y un recubrimiento superficial de polietilenglicol funcionalizado, se facilitó que la reactividad de la resina se focalizase única y exclusivamente en la zona superficial, obteniéndose como resultado una mayor accesibilidad de los disolventes y reactivos durante todo el proceso sintético. De esta forma, se llevó a cabo la síntesis, tanto manual como automatizada, de una serie de oligonucleótidos de diferentes tipos y tamaños, demostrando así que las resinas *Core-Shell* de tipo PS-PEG son una buena alternativa a los soportes convencionales utilizados habitualmente en la preparación de oligonucleótidos.

En resumen, se ha demostrado la viabilidad de estas resinas para la preparación de tetrámeros oligonucleotídicos con rendimientos de acoplamiento efectivos en comparación con otros soportes sólidos, incluido el vidrio de poro controlado (CPG) y el poliestireno (*NittoPhase*). Además, se han sintetizado oligonucleótidos con una longitud de entre 14 y 18 bases con rendimientos óptimos.

Estas resinas *Core-Shell* se utilizaron también para incorporar enlaces de tipo fosforotioato, metilfosfato y fosforamidato de metilsulfonilo a varias secuencias de dímeros y oligonucleótidos, en sintetizadores de ADN automatizados, con buenos rendimientos.

Sin embargo, en vista de los resultados obtenidos, surge la necesidad de ampliar el estudio de los enlaces de unión entre el soporte sólido y los dímeros de ADN para conseguir ensamblar fragmentos totalmente protegidos que puedan utilizarse posteriormente como bloques de construcción en la síntesis de secuencias largas de ARN.

Para concluir el estudio, se incorporaron exitosamente dos ácidos grasos diferentes en el extremo 5' de dos oligonucleótidos G-cuádruplexes, sintetizados sobre resinas *Core-Shell*, con el fin de obtener los conjugados lipídicos correspondientes.





**Parte experimental**



## 1. Condiciones de trabajo, disolventes y reactivos

Las reacciones en atmósfera inerte se realizaron en matraces de tipo Schlenk con agitación magnética y bajo atmósfera de argón o nitrógeno.

Los fosforamiditos, los soportes Standard CPG<sub>500</sub> (CPG-AHAP-succ-dC<sup>Bz</sup>, 35 μmol/g) y CPG<sub>500</sub> (CPG-AHAP-succ-dA<sup>Bz</sup>, 45 μmol/g), fueron proporcionados por la empresa Rasayan Inc. (California, USA), el soporte universal CPG<sub>500</sub> (CUTAG, 30-40 μmol/g) por Merck Chemicals (Merck-Sigma-Aldrich, España), el soporte *NittoPhase* (575 μmol/g) por Kinovate (California, USA), la aminoalquil-CPG de cadena larga (LCAA)-CPG (69 μmol/g) y el fosforamidito MMT-aminohexanol por Link Technologies Ltd. (Lanarkshire, Escocia, Reino Unido) y las resinas *Core-Shell* PEG024 y PEG029 (230 μmol/g) por BeadTech Inc. Co., Ltd. (Korea). Los disolventes y otros reactivos como los ácidos oleico y linoleico, así como otros productos químicos, se compraron a Merck Chemicals (Merck-Sigma-Aldrich, España), incluidos los disolventes anhidros y los disolventes deuterados (CDCl<sub>3</sub>, MeOH-*d*<sub>4</sub>), que se utilizaron directamente. El H<sub>2</sub>O desionizada *mQ* utilizada en los experimentos se obtuvo de un sistema de purificación de agua ultrapura Milli-Q<sup>®</sup>QE 7000 (Merck-Millipore) que presentaba una resistividad de 18.2 MΩ·cm a 25 °C y una cantidad de carbono total orgánico (TOC) ≤ 5 ppb.

Las disoluciones de reactivos usados en la síntesis manual de oligonucleótidos fueron preparadas utilizando disolventes destilados con el máximo grado de sequedad posible. Estas disoluciones fueron las siguientes: (a) desprotección (*deblocking*): una disolución al 3% de ácido dicloroacético en diclorometano anhidro; (b) acoplamiento (*coupling*): una disolución 0.1 M de fosforamidito en acetonitrilo anhidro y una disolución 0.4 M del agente activante BTT **3** en acetonitrilo anhidro; (c) acetilación (*capping*): una disolución CAP-A compuesta de THF/Py/anhídrido acético en proporción 8:1:1 y otra de CAP-B formada por 10% de 1-metilimidazol en THF; (d) oxidación (*oxidizing*): una disolución 0.02 M de yodo en Py/THF/AcOH en proporción 89:10:1.

Para los fosforotioatos, el reactivo de oxidación estaba compuesto por una disolución 0.05 M de DDTT en ACN anhidro. Para la formación de los fosforamidatos de mesilo se utilizó una disolución 0.4 M de azida de mesilo en ACN anhidro.

Los oligonucleótidos enumerados en las Tablas 6-11 y 13-15 se sintetizaron de manera manual mediante química en fase sólida de 2-cianoetilfosforamiditos a escala de 1  $\mu$ mol y utilizando protocolos estándar.<sup>127</sup> Para los enumerados en las Tablas 16-17 se siguieron los mismos protocolos, pero de manera automatizada. Los oligonucleótidos mencionados en las Tablas 18-19 fueron sintetizados de forma manual por química de fase sólida y utilizando metilfosforamiditos o cianoetilfosforamiditos. El agente sulfurante (DDTT) para la síntesis de oligonucleótidos con enlace fosforotioato fue suministrado por la empresa Biosearch Technologies (California, USA). Después del tratamiento con amoníaco (NH<sub>3</sub> conc. aq. a 55 °C, durante la noche), los oligonucleótidos (DMT-OFF) se desalaron usando columnas de tamiz molecular rellenas de Sephadex G-25 (NAP-10 o NAP-5) y proporcionadas por la empresa GE Healthcare (Little Chalfont, Reino Unido), mientras que los oligonucleótidos DMT-ON se purificaron mediante cartuchos en fase reversa (OPC) para ADN de la marca GlenResearch (Virginia, USA) y Thermofisher scientific (Spain).

La cromatografía en columna se realizó con gel de sílice (60 Å, malla 230 x 400), y la cromatografía en capa fina (TLC) se llevó a cabo en placas de Silica-Gel 60 F<sub>254</sub> (Merck-Sigma-Aldrich, España).

Los experimentos MALDI-TOF se realizaron utilizando una matriz compuesta de citrato de amonio dibásico y 2',4',6'-trihidroxiacetofenona monohidrato (THAP, Aldrich).

Las fases móviles utilizadas en el análisis de HPLC se prepararon utilizando acetato de trietilamonio (TEAA), acetonitrilo y agua ultrapura

---

<sup>127</sup> M. H. Caruthers, A. D. Barone, S. L. Beaucage, D. R. Dodds, E. F. Fisher, L. J. McBride, M. Matteucci, Z. Stabinsky, J. Y. Tang. *Methods Enzymol.* **1987**, *154*, 287-313.

(Millipore). El tampón A (5% ACN en 0.1 M TEAA) fue el mismo para experimentos analíticos y semipreparativos; El tampón B: 70% o 50% ACN en 0.1 M TEAA, respectivamente.

## 2. Instrumentación

Los espectros de RMN se midieron en un espectrómetro Varian Mercury-400 ( $^1\text{H}$  400.13 MHz,  $^{13}\text{C}$  100.6 MHz) o en un Bruker DPX-300 ( $^1\text{H}$  300.13 MHz,  $^{13}\text{C}$  75.5 MHz). Los desplazamientos químicos se expresan en partes por millón (ppm) tomando como referencia la señal de disolvente residual y los valores de las constantes de acoplamiento ( $J$ ) se expresan en hercios (Hz).

Los oligonucleótidos sintetizados manualmente se ensamblaron utilizando jeringuillas de plástico desechables de la marca GE Healthcare (Little Chalfont, Reino Unido).

Los oligonucleótidos se prepararon en un sintetizador automatizado de ADN (Applied Biosystems 3400).

La liberación de los tetrámeros de las resinas (*cleavage*) se llevó a cabo en un mezclador térmico de bloques con regulación de temperatura de la casa Thermofisher scientific (Spain).

Se realizó HPLC analítico y semipreparativo en fase reversa (RP) en un sistema de cromatografía Waters equipado con un módulo de separación Waters 2695 y un detector de matriz de fotodiodos Waters 2998. Se utilizaron las siguientes condiciones:

- a) Una columna analítica ACE 3  $\mu\text{m}$  HILA-3-1546-A (4.6 x 150 mm) con inyección automática, flujo de 1 mL/min y dos eluyentes.
- b) Una columna semipreparativa Xbridge OST  $\text{C}_{18}$  2.5  $\mu\text{m}$  (10 x 50 mm) con inyección manual y flujo de 1 mL/min.

Los espectros de masas de oligonucleótidos se registraron en un espectrómetro de tiempo de vuelo (TOF) MALDI Voyager DETM RP (Applied Biosystems).

Los espectros de absorción molecular entre 220 y 550 nm se registraron con un espectrofotómetro Jasco V650, donde se utilizaron cubetas de cuarzo Hellma.

### **3. Procedimientos experimentales**

#### **3.1. Síntesis de bencilio-1*H*-tetrazol (BTT)**

Para llevar a cabo la reacción a gran escala, se preparó una suspensión de cloruro de trietilamonio (5.50 g, 40 mmol) en tolueno (200 mL) a temperatura ambiente, utilizando un matraz redondo de una boca. Tras 15 min de agitación magnética se añadió lentamente azida de sodio (**2**) (2.64 g, 40 mmol) y la mezcla se agitó durante 30 min. A continuación, con la ayuda de un embudo de adición con presión compensada, se añadió gota a gota una disolución de tiocianato de bencilo (**1**) (6 g, 40 mmol) en tolueno (200 mL). Finalmente, la mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 16 h. Después de enfriar, se añadieron 160 mL de agua destilada y se dejó agitar durante 15 min. Se separó la fase acuosa y se lavó la fase orgánica con agua destilada (3 x 40 mL). Se recolectaron los extractos acuosos. A continuación, la fase acuosa se enfrió a temperatura ambiente y se acidificó a pH 3-4 utilizando HCl diluido mientras se agitaba durante 10 min. Al añadir el ácido se observó la formación de un precipitado blanco del producto **3** que se filtró, se lavó con agua, se recristalizó y se secó en vacío, obteniéndose un rendimiento del 86% (6.65 g). Los análisis por RMN mostraron una pureza elevada del BTT obtenido, por lo que fue utilizado sin necesidad de realizar ningún tipo de purificación adicional.

### 3.2. Test de hinchamiento (*swelling*) de las resinas *Core-Shell*

En jeringuillas de 1 mL, se introdujo un volumen, de peso conocido, de 0.2 mL de la resina PEG024 o PEG029. Posteriormente, se rellenó la jeringuilla con 1 mL del disolvente a estudiar, dejando que la resina se embebiese durante 16 h en contacto con el disolvente. Durante este tiempo se midió el incremento de volumen experimentado por la resina después de 1, 3, 8 y 16 h. Los disolventes empleados en el estudio fueron: (1) ACN; (2) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; (3) destritilación (3% de ácido dicloroacético en diclorometano); (4) CAP-A (THF/Py/anhídrido acético, 8:1:1); (5) CAP-B (10% de 1-metilimidazol en THF); (6) oxidación (0.02 M I<sub>2</sub> en Py/THF/H<sub>2</sub>O, 88:10:2); (7) tolueno; (8) THF. Los datos obtenidos se encuentran recogidos en las Tablas 4 y 5.

### 3.3. Síntesis de dímeros de timidina

Para una escala 1-2 μmol, se pesaron entre 30 y 60 mg de resina universal CPG<sub>500</sub>-CUTAG (30-40 μmol/g) en una jeringuilla de 5 mL provista de una frita ajustada de polipropileno. Tras el lavado con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y ACN anhidro, se procedió a la desprotección del DMT del soporte agitando la resina en 1 mL de una disolución de DCA al 3% en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro. El proceso se repitió hasta obtener una disolución incolora. Las diferentes fracciones de la disolución naranja obtenida se juntaron y guardaron para su posterior análisis por espectrofotometría vis-UV.

#### *a) Primer ciclo de síntesis (Esquema 24a)*

La resina desprotegida **6** se lavó sucesivamente con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y ACN anhidros (3 x 1 mL) para eliminar los restos de ácido. A continuación, se agitó con una mezcla de disolución activante de BTT **3** (0.5 mL, 0.4 M en ACN anhidro) y la disolución de fosforamidito **4** (0.5 mL, 0.1 M en ACN anhidro) durante 2 min. Una vez finalizado el acoplamiento, se lavó la resina con ACN anhidro (3 x 1 mL) y se completó el ciclo de síntesis con la etapa de acetilación. Para ello, la resina se agitó con 1 mL de una mezcla de disoluciones CAP-A y CAP-B, descritas previamente. En la

## Parte Experimental -----

última etapa, se hizo la oxidación del P(III) a P(V) con la disolución de yodo en THF/Py/AcOH, dando lugar al producto **7**.

### *b) Segundo ciclo de síntesis (Esquema 24b)*

El producto **7** anclado a la resina fue desprotegido con la disolución de destilación y tras los lavados con DCM y ACN fue sometida a un nuevo ciclo sintético siguiendo los mismos pasos y protocolos descritos en el apartado anterior, con el fin de incorporar el segundo nucleótido en la posición 5'. Una vez finalizado este ciclo se obtuvo el dímero unido a la resina **8**.

### *c) Desprotección y liberación del dímero del soporte sólido (Esquema 24c)*

Para obtener los dímeros DMT-ON, los oligonucleótidos fueron liberados de la resina **8** mediante tratamiento con una disolución concentrada de amoníaco (33%) en H<sub>2</sub>O, a 55 °C, durante 16 h, obteniéndose el dímero **9**. En el caso de los dímeros DMT-OFF fue necesario un tratamiento previo de desprotección con una disolución de DCA al 3% en ACN, y posterior tratamiento con amoníaco, obteniéndose el dímero **10**.

### *d) Purificación de los dímeros 9 y 10.*

La resina se separó por filtración, haciendo pasar la disolución amoniacal con el oligonucleótido a través de una pipeta Pasteur provista de un pequeño algodón, a modo de filtro, en su interior. Tras evaporar por corriente de N<sub>2</sub> el exceso de amoníaco, las muestras con el producto **9** (DMT-ON) se purificaron utilizando cartuchos de OPC (fase reversa) y eluyendo las muestras con 1 mL de una disolución de ACN al 20% en H<sub>2</sub>O *mQ*. Las muestras con el producto **10** (DMT-OFF) no fueron purificadas. Finalmente, las muestras purificadas se evaporaron bajo presión reducida hasta llevarlas a sequedad, obteniéndose así un *pellet* que fue posteriormente cuantificado (Tabla 7).



### 3.4. Síntesis de trímeros de timidina y 2'-desoxiadenosina

Estos compuestos se sintetizaron en una escala de 2  $\mu\text{mol}$  siguiendo los mismos protocolos que para los dímeros del apartado anterior, pero añadiendo un ciclo más en el proceso de síntesis. El trímero de adenosina sólo se sintetizó en su versión DMT-ON utilizando fosforamiditos del nucleósido  $dA^{Bz}$ . Tras la purificación por OPC los productos fueron cuantificados (Tabla 9).

### 3.5. Síntesis de tetrámeros de timidina

Siguiendo la metodología anterior se sintetizaron dos tetrámeros a escala de 2  $\mu\text{mol}$  en versión DMT-ON y DMT-OFF añadiendo un ciclo más en el proceso de síntesis de los trímeros. Tras la purificación del derivado DMT-ON por OPC se cuantificó y el resultado se refleja en la Tabla 11.

### 3.6. Síntesis de oligonucleótidos de ADN con resinas *Core-Shell*

#### 3.6.1 Derivatización de las resinas *Core-Shell* y *NittoPhase*

a) Preparación de hemiésteres de succinilo de los nucleósidos  $dA^{Bz}$  y  $dC^{Bz}$  (Esquema 25)

Los monómeros 5'-O-DMT- $dA^{Bz}$  **11** (1 g, 1.5 mmol) y 5'-O-DMT- $dC^{Bz}$  **13** (1 g, 1.6 mmol) se secaron dos veces por evaporación, en un matraz Schlenk de 50 mL, y se redisolvieron en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhidro (40 mL) bajo atmósfera de argón.

A continuación, se añadieron 2.2 equiv de DMAP y la mezcla se agitó magnéticamente a temperatura ambiente durante 5 min.

Posteriormente, se añadieron 6 equiv de anhídrido succínico y la mezcla de reacción se agitó entre 24 y 48 h a temperatura ambiente, siendo controlado el proceso por TLC.

Una vez finalizadas las reacciones, se obtuvieron disoluciones blanquecinas a las que se añadieron 6 equiv de  $\text{Et}_3\text{N}$  seguidos de 2 mL

## Parte Experimental -----

de H<sub>2</sub>O. Se agitó la mezcla durante 2 h más. A continuación, los disolventes se evaporaron en vacío y se obtuvo un sirope marrón.

Este residuo se redisolvió en 100 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se lavó (4 x 35 mL) con una disolución 0.1 M de TEAA en H<sub>2</sub>O (pH 5). Las capas orgánicas se mezclaron y lavaron con una disolución 0.5 M de ácido cítrico en H<sub>2</sub>O (3 x 10 mL). Finalmente, se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron y concentraron hasta sequedad para obtener una espuma sólida blanca.

Este producto fue purificado por columna cromatográfica de gel de sílice utilizando como eluyente un gradiente de Et<sub>3</sub>N/MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> que va desde 0:0:100 hasta 5:15:80.

Tras la purificación se obtuvieron los succinatos de nucleósido esperados **12** y **14** con rendimientos del 85 y 95%, respectivamente. La estructura fue confirmada después de su caracterización por RMN.

### *b) Funcionalización de los soportes sólidos PEG024, PEG029 y NittoPhase (Esquema 26)*

En este apartado, se describe la funcionalización de las resinas **15** (PEG024, 0.23 mmol/g), **18** (PEG029, 0.23 mmol/g) y **19** (NittoPhase 0.57 mmol/g) con los derivados de nucleósido correspondientes **12** y **14**.

Para ello, en dos matraces Schlenk de 50 mL cada uno, se secaron (2-3 equiv) de cada uno de los derivados de succinato **12** (650 mg) y **14** (660 mg) y se disolvieron en ACN anhidro (~15 mL) bajo atmósfera de N<sub>2</sub>.

A continuación, se añadieron 0.21 equiv de DMAP y 6.3 equiv de DIPEA y se agitaron las mezclas durante 15 min. Finalmente, se añadieron 2.15 equiv del agente de acoplamiento, TBTU, y se agitaron las disoluciones durante 1 h, obteniéndose sendas disoluciones de color marrón oscuro.

Dichas disoluciones se transfirieron a otros dos matraces que contenían una suspensión de 1 g (1 equiv) de la resina a derivatizar en ACN anhidro (~15 mL) y la mezcla se agitó utilizando un agitador orbital durante 24 h.

Al cabo de este tiempo, las resinas se filtraron y se lavaron con una disolución al 5% de Et<sub>3</sub>N en acetonitrilo (3 x 5 mL) y, posteriormente, con diclorometano (3 x 5 mL). Las resinas se secaron en vacío y se procedió a la acetilación de los grupos amino e hidroxilo libres que no reaccionaron.

*c) Acetilación de los grupos amino e hidroxilo de las resinas (Esquema 27)*

Las resinas fueron tratadas durante 1 h con 20 mL de una mezcla de Py/anhídrido acético/1-metilimidazol (2:1:1) con el fin de acetilar los restantes grupos amino e hidroxilo libres en el soporte. Al finalizar, la resina se filtró y se lavó sucesivamente con una disolución al 5% de Et<sub>3</sub>N en ACN (3 x 5 mL), ACN (3 x 5 mL) y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 5 mL). A continuación, se secó a presión reducida.

El cálculo de la carga se llevó a cabo mediante un ensayo de destitilación. La carga encontrada para los soportes funcionalizados fue de 69-76 μmol/g para **24** (33%), 56-66 μmol/g para **25** (24%), 153-163 μmol/g para **26** (71%), 186-220 μmol/g para **27** (96 %), 493 μmol/g para **28** (86%) y 427 μmol/g para **29** (74%).

*d) Detección de grupos amino libres por el método de Kaiser*

Se preparó una disolución A que contenía: 40 g de fenol, 98 mL de piridina, 10 mL de etanol (95%), 1.3 mg de KCN y 2 mL de agua. Después una disolución B con: 2.5 g de ninhidrina y 50 mL de etanol (95%).

Con una pipeta Pasteur, se recogió una pequeña muestra de resina, de 1.5 a 2 mL, en un tubo de ensayo de plástico. Se adicionó 1 mL de ACN, para hacer un lavado y se retiró la disolución. Para una observación conveniente, la cantidad de soporte sólido debe formar una capa de 2 a 3 mm en el fondo del tubo de ensayo.

Como muestras de referencia se utilizaron aproximadamente las mismas cantidades de una resina CPG universal (CUTAG) (sin grupos

amino libres, control negativo) y las resinas nativas PEG024 y PEG029 sin funcionalizar (grupos amino libres, control positivo) colocadas en tubos de ensayo separados.

Sobre cada tubo se añadieron 50  $\mu$ L de cada disolución A y B (a las muestras de ensayo y a las muestras de control). Se agitaron los tubos y se calentaron durante 3 min a 105 °C. Tras este tiempo, se retiraron los tubos de ensayo del equipo calefactor e inmediatamente se observó el color formado.

El soporte sólido en el control negativo (GPC) permaneció incoloro y la disolución continuó amarilla. El soporte sólido y la fase líquida en el control positivo (resinas nativas *Core-Shell*) mostraron un color azul oscuro. Los colores de los soportes sólidos de ensayo coincidieron todos con el color mostrado por el control negativo, lo cual indica que no se detectó la presencia de grupos amino libres y que la acetilación funcionó correctamente.

### 3.6.2 Síntesis manual de los tetrámeros 5'-TTdAdC-3' (32), 5' dGTdCdA-3' (33) y 5'-dGdATdC-3' (34)

#### a) Procedimiento sintético

Cada una de las secuencias fue sintetizada manualmente en una escala de 1  $\mu$ mol sobre cinco tipos de soporte sólido diferente: CPG<sub>500</sub>-universal, CPG<sub>500</sub>-dN<sup>Bz</sup>, PS-dN<sup>Bz</sup>, PEG024-dN<sup>Bz</sup> y PEG029-dN<sup>Bz</sup>, donde N puede ser A o C dependiendo de la secuencia. Todas las reacciones se llevaron a cabo en jeringas de plástico de 5 mL provistas de una frita de polipropileno.

En cada ciclo de síntesis tuvo lugar el ensamblaje de un nuevo nucleótido, utilizando como precursores los  $\beta$ -cianoetilfosforamiditos de los 2'-desoxinucleósidos correspondientes, en disoluciones 0.1 M en ACN anhidro para los soportes convencionales o en DCM anhidro para los soportes de tipo *Core-Shell*. Como activante se utilizaron disoluciones 0.4 M de BTT en ACN anhidro para todos los soportes. Cada ciclo constó de las siguientes etapas:

1. Desprotección del grupo DMT en 5': los soportes sólidos (1  $\mu\text{mol}$ ) se colocaron en el interior de la jeringa y se lavaron con ACN anhidro (2 x 1 mL) y DCM anhidro (2 x 1 mL), y posterior secado por succión a vacío. Posteriormente, se lavaron varias veces con 1 mL de disolución desbloqueante (3% DCA en DCM anhidro). Las disoluciones de color naranja intenso obtenidas se utilizaron para evaluar el rendimiento del acoplamiento. A continuación, los soportes sólidos se lavaron con DCM y ACN anhidros varias veces. Cuando se utilizaron resinas *Core-Shell*, todos los lavados se hicieron sólo con DCM anhidro.

2. Acoplamiento: se carga la disolución activante (0.4 M BTT en ACN anhidro para todos los soportes) en las jeringas y se agitan las suspensiones durante 30 s. Posteriormente, se añadió la disolución de fosforamidito correspondiente (0.1 M) y se agitó junto con el activador y el soporte sólido durante 2 min más. Se descartaron los disolventes y los soportes sólidos se lavaron dos veces con ACN anhidro (DCM anhidro para soportes *Core-Shell*).

3. Acetilación: se añadieron 0.5 mL de solución CAP-A ( $\text{Ac}_2\text{O}/\text{Py}/\text{THF}$  1:1:8) y 0,5 mL de CAP-B (10% *N*-metilimidazol en THF) y se agitaron con los soportes sólidos durante 30 s. Se descartaron los disolventes y los soportes sólidos se lavaron dos veces con ACN anhidro (DCM anhidro para soportes *Core-Shell*).

4. Oxidación: se llevó a cabo utilizando una disolución de  $\text{I}_2$  (10%) en  $\text{Py}/\text{THF}/\text{AcOH}$  (89:10:1) y agitando la resina durante 30 s.

Una vez finalizado el ciclo sintético, los soportes sólidos se lavaron de nuevo varias veces con ACN y DCM anhidros, evitando el ACN con los soportes *Core-Shell*.

Este proceso se repitió, utilizando el fosforamidito correspondiente en la siguiente etapa de acoplamiento, hasta alcanzar la longitud completa de la secuencia requerida. Para las secuencias DMT-OFF fue necesario

## *Parte Experimental* -----

un paso adicional de desprotección. Para ello, se trataron los oligonucleótidos con una disolución al 3% de DCA en DCM.

Para liberar los tetrámeros de los soportes, se colocaron en un vial de 1.5 mL con tapón de rosca y se añadió 1 mL de disolución de  $\text{NH}_3$  al 33% en  $\text{H}_2\text{O}$ . Las suspensiones se calentaron durante 16 h a 55 °C.

Las secuencias DMT-ON se purificaron mediante cartuchos de fase reversa (OPC) y se analizaron, posteriormente, por HPLC y MALDI-TOF. En todos los casos, se obtuvieron los productos esperados.

### *b) Purificación de los tetrámeros (DMT-ON) con cartuchos OPC*

Después de la síntesis de los tetrámeros de ADN y tras su liberación de la resina en 1 mL de disolución amoniacal, esta disolución se purificó directamente, sin ningún tipo de paso previo, sobre un cartucho de OPC.

La presencia del grupo protector DMT es muy importante, pues permite que las moléculas que lo contienen (secuencias de interés) queden retenidas por adsorción en la resina, mientras que las secuencias truncadas e impurezas (sin grupo DMT) no se quedan retenidas y pueden ser separadas fácilmente.

Para preparar la muestra a purificar, se añadió 1 mL de una disolución de NaCl (100 mg/mL) en  $\text{H}_2\text{O}$  *mQ*, lo que origina un volumen final de 2 mL, con una concentración de la muestra de alrededor 50 mg/mL, lista para ser cargada en el cartucho.

El cartucho se conectó a una jeringa de 5 mL y se acondicionó añadiendo 0.5 mL de ACN seguido de 1 mL de una disolución 2 M de acetato de trietilamonio (TEAA) en  $\text{H}_2\text{O}$  *mQ*. El ACN lava los residuos orgánicos de la resina y la humedece, mientras que la disolución de TEAA actúa como reactivo de par iónico que permite mejorar la unión de los oligonucleótidos DMT-ON a la resina.

La purificación se llevó a cabo haciendo pasar alícuotas de 1 mL de muestra y guardando las disoluciones recolectadas para repetir el proceso de carga. Las moléculas con las secuencias de interés se quedaron

retenidas en la fase sólida del cartucho, mientras que las impurezas y secuencias no deseadas salieron de la columna.

Después el cartucho se lavó con una disolución salina de lavado (5% ACN en una disolución de 100 mg/mL de NaCl en H<sub>2</sub>O) (2 x 1 mL). Con este paso se eliminaron los restos de secuencias fallidas del cartucho.

A continuación, se enjuaga el cartucho con una disolución al 2-3% de ácido trifluoroacético (TFA) en H<sub>2</sub>O *mQ* (2 x 1 mL). Así se eliminó el grupo protector DMT y como resultado se observó una franja de color naranja en el interior del cartucho debido a los cationes tritilo liberados. Posteriormente, se lavó con H<sub>2</sub>O *mQ* (2 x 1 mL) para eliminar el tritilo, observándose la desaparición de la banda naranja.

El oligonucleótido purificado se eluye de la columna con 1 mL de una disolución al 20% de ACN en H<sub>2</sub>O. Los tetrámeros purificados se recogieron en viales de microcentrifugación (Eppendorf de 1.5 mL) y se procedió a su cuantificación mediante el cálculo de OD. Tras la evaporación del disolvente en vacío utilizando un equipo *speed-vac*, los *pellets* obtenidos se guardaron a baja temperatura.

### **3.6.3 Síntesis automatizada de oligonucleótidos de cadena larga de ADN con resinas *Core-Shell***

#### *a) Procedimiento sintético*

Las secuencias de oligonucleótidos PEG024-14mer (**35**), PEG024-15mer (**36**) y PEG029-15mer (**37**), se sintetizaron en una escala de 1 μmol utilizando ~15 mg de PEG029-dC<sup>Bz</sup> (186-220 μmol) y ~40 mg de PEG024-dC<sup>Bz</sup> (56-66 μmol). Las secuencias R-Las-PO (**38**) y R-Las-PS (**39**) se sintetizaron en una escala de 1 μmol utilizando ~15 mg y ~12 mg de PEG024-dA<sup>Bz</sup> (69-76 μmol), respectivamente. Para completar el espacio muerto de la columna, se utilizó un poco de resina CPG previamente acetilada como relleno inerte. Las secuencias se sintetizaron con el protocolo estándar DMT-ON, a excepción de la PEG024-15mer (**36**) que fue sintetizada con el protocolo DMT-OFF. Los fosforamiditos (dA<sup>Bz</sup>, dC<sup>Bz</sup>, dG<sup>Ibu</sup> y T) se disolvieron en DCM para mejorar la eficiencia

del acoplamiento. Las secuencias de los oligonucleótidos sintetizados se muestran en la Tabla 16.

*b) Tratamiento post-sintético: desprotección, purificación y caracterización*

Los soportes sólidos que contenían las diferentes secuencias de oligonucleótidos se transfirieron a viales de vidrio de 5 mL provistos de tapón de rosca, se añadieron 100  $\mu$ L de 1,4-dioxano (expansión de la resina), seguido de 1 mL de disolución acuosa de  $\text{NH}_3$  (33%) y se dejó reaccionar durante 6 h a 55  $^\circ\text{C}$ , consiguiendo así la desprotección de las nucleobases y la liberación de los oligonucleótidos de los respectivos soportes sólidos.

Posteriormente, las disoluciones amoniacaes de oligonucleótidos obtenidas se cargaron en un cartucho OPC para eliminar todas las secuencias truncadas y el grupo DMT, lo que permitió la purificación y destitilación de los productos de interés, que fueron eluidos con una disolución de ACN al 20% en  $\text{H}_2\text{O}$  *mQ*.

Por último, todos los oligonucleótidos se analizaron mediante cromatografía HPLC de fase reversa y MALDI-TOF.

**3.7. Síntesis manual en fase sólida de fragmentos protegidos de ADN utilizando resinas *Core-Shell* como soporte sólido**

*a) Tritilación en 5' del nucleósido 2'-dG<sup>Ibu</sup> con DMT*

En un matraz redondo de dos bocas y bajo atmósfera de argón, se disolvió 2'-dG<sup>Ibu</sup> (~1 g, 3.17 mmol) en piridina anhidra (25 mL) y se agitó la mezcla 15 min a temperatura ambiente. Después, se añadió lentamente DMTCI (1.3 g, 1.2 equiv) y la mezcla de color rojizo se agitó durante 6 h a temperatura ambiente. La reacción fue monitorizada por TLC con un eluyente de DCM/MeOH/Et<sub>3</sub>N (100:1:1).

Tras la evaporación del disolvente se obtuvo un sirope amarillo que se redisolvió en AcOEt (~25 mL) y se lavó con  $\text{H}_2\text{O}$  (3 x 15 mL), salmuera (3 x 15 mL) y  $\text{NaHCO}_3$  (3 x 15 mL) usando un embudo de extracción.



La fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó a vacío. El crudo resultante de color amarillento fue purificado por columna cromatográfica con gel de sílice (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 99:1), aislándose un sólido blanco (2.28 g, 90%) que fue caracterizado por RMN.

*b) Preparación de hemiésteres de succinilo de los nucleósidos dG<sup>Ibu</sup> y T*

Los monómeros 5'-O-DMT-dG<sup>Ibu</sup> (1 g, 1.5 mmol) y 5'-O-DMT-T (1 g, 1.8 mmol) se secaron dos veces por evaporación, en un matraz Schlenk de 50 mL, y se redisolviaron en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (40 mL) bajo atmósfera de argón.

Después, se agregaron 2.2 equiv de DMAP y la mezcla se agitó magnéticamente a temperatura ambiente durante 5 min.

Posteriormente, se añadieron 6 equiv de anhídrido succínico y la mezcla de reacción se agitó durante 24 h a temperatura ambiente, siendo controlado el proceso por TLC.

Una vez finalizadas las reacciones, se obtuvieron disoluciones blanquecinas a las que se añadieron 6 equiv de Et<sub>3</sub>N seguidos de 2 mL de H<sub>2</sub>O. Se agitó la mezcla durante 2 h más. A continuación, los disolventes se evaporaron a vacío y se obtuvo un sirope marrón.

Este residuo se redisolvió en 100 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se lavó (4 x 35 mL) con una disolución 0.1 M de TEAA en H<sub>2</sub>O (pH 5). Las fases orgánicas se lavaron con una disolución 0.5 M de ácido cítrico en H<sub>2</sub>O (3 x 10 mL), se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron y concentraron hasta sequedad para obtener una espuma sólida blanca.

Este producto fue purificado por columna cromatográfica de gel de sílice [gradiente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> - Et<sub>3</sub>N/MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5:15:80)].

Tras la purificación se obtuvieron los succinatos de nucleósido esperados 3'-succ-T y 3'-succ-dG<sup>Ibu</sup> con un rendimiento del 90 y 96%, respectivamente. Su estructura fue confirmada tras su caracterización por RMN.

*Parte Experimental* -----

*c) Funcionalización del soporte PEG024 con hemiésteres de succinilo de los nucleósidos dG<sup>Ibu</sup> y T*

En matraces Schlenk de 50 mL se disolvieron 2 equiv de cada uno de los derivados succinato de T (~342 mg, 0.46 mmol) y dG<sup>Ibu</sup> (~387 mg, 0.46 mmol) en ACN anhidro (~15 mL) bajo atmósfera de argón.

Luego se añadieron 0.21 equiv de DMAP y 6.3 equiv de DIPEA y se agitaron las mezclas durante 15 min. Finalmente, se añadieron 2.15 equiv del agente de acoplamiento TBTU y se agitaron las disoluciones magnéticamente durante 1 h.

Las disoluciones se transfirieron a otros dos matraces que contenían una suspensión de 1 g (1 equiv) de la resina PEG024 en ACN anhidro (~15 mL) y la mezcla se agitó utilizando un agitador orbital durante 46 h.

Al cabo de este tiempo, las resinas se filtraron y se lavaron con una disolución al 5% de Et<sub>3</sub>N en ACN (3 x 5 mL) y, posteriormente, con diclorometano (3 x 5 mL). Las resinas se secaron a vacío y se procedió a la acetilación de los grupos amino e hidroxilo libres que no reaccionaron mediante tratamiento con 20 mL de una mezcla de Py/Ac<sub>2</sub>O/1-metilimidazol (2:1:1) durante 1 h. La resina se filtró y se lavó con una disolución de 5% de Et<sub>3</sub>N en ACN (3 x 5 mL), seguida de ACN (3 x 5 mL) y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 5 mL). La resina se secó finalmente a vacío.

El cálculo de la carga se llevó a cabo mediante un ensayo de destrilación. La carga encontrada para los soportes funcionalizados fue de 108 µmol/g para la PEG024-T y de 61 µmol/g para la PEG024-dG<sup>Ibu</sup>.

*d) Síntesis manual de trímeros y dímeros protegidos de ADN*

Se sintetizaron tres trímeros diferentes 5'-TTT-3' (**40**), 5'-TTdA<sup>Bz</sup>-3' (**41**) y 5'-TTdG<sup>Ibu</sup>-3' (**42**) utilizando protocolos DMT-ON en fase sólida a escala de 2 µmol, con *O*-metilfosforamidito-T, y las resinas PEG024-succ-T (108 µmol/g), PEG024-succ-dG<sup>Ibu</sup> (61 µmol/g) y PEG024-succdA<sup>Bz</sup> (69-76 µmol/g) como soportes sólidos.

En una jeringa de plástico de 5 mL se lavan los anteriores soportes con DCM anhidro (3 x 1 mL). La destitilación se realizó utilizando varios mL de una solución al 3% de TCA en DCM anhidro. Las soluciones naranjas resultantes se utilizaron para evaluar el rendimiento del acoplamiento. A continuación, los soportes sólidos se lavaron con DCM anhidro (2 x 1 mL). El acoplamiento del fosforamidito se realizó agitando 1 mL de solución activante (0.4 M BTT en ACN anhidro) y 1 mL de *O*-metilfosforamidito-T en DCM anhidro durante 2 min. Después de retirar la disolución de acoplamiento y lavar los soportes sólidos, la etapa de acetilación se llevó a cabo utilizando 0.5 mL de una disolución CAP-A (Ac<sub>2</sub>O/Py/THF 1:1:8) y 0.5 mL de CAP-B (10% de *N*-metilimidazol en THF) durante 30 s. Finalmente, la reacción de oxidación se realizó utilizando una disolución al 70% de hidroperóxido de *tert*-butilo en ACN. Este ciclo se repitió dos veces más para acoplar el segundo y tercer fosforamidito.

Por otro lado, se sintetizaron manualmente los diferentes dímeros de fosforoamidato de mesilo en modo DMT-ON: 5'-TT-3' (**43**), 5'-TdA<sup>Bz</sup>-3' (**44**), 5'-TdG<sup>Ibu</sup>-3' (**45**) y 5'-TdC<sup>Bz</sup> (**46**), utilizando los mismos protocolos, excepto la etapa de oxidación, que se sustituyó por una etapa de mesilación, mediante tratamiento con una disolución 0.4 M de azida de mesilo en ACN. El tiempo de reacción fue de 20 min.

*e) Desprotección de fragmentos protegidos con DMT*

Los soportes se trataron con una disolución 0.4 M de NaOH en metanol a la que se adiciona H<sub>2</sub>O (relación 4:1) en varios lotes de 5 min para liberar los dímeros y trímeros protegidos de la resina. La reacción de escisión fue seguida por TLC (DCM/MeOH, 9:1).

Los filtrados resultantes se neutralizaron inmediatamente con 1 equiv de ácido acético y el metanol se evaporó. A continuación, la disolución acuosa se cargó en un cartucho de purificación en fase reversa y se eluyó con 50% ACN/H<sub>2</sub>O y ACN. Las diferentes fracciones se analizaron mediante UV, HPLC y MALDI-TOF.

### 3.8. Síntesis de oligonucleótidos conjugados con ácidos grasos

En primer lugar, se procedió a la síntesis automatizada de los oligonucleótidos de TBA (5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3') **49** y G<sub>4</sub>T (5'-TGGGG-3') **50**. Ambos fueron ensamblados (Esquema 28) de manera automatizada utilizando como soportes las resinas PEG024-dG<sup>Ibu</sup> (**47**) y PEG024-T (**48**) en una escala de 1-2 μmol y siguiendo los protocolos de síntesis DMT-OFF. Los β-cianoetilfosforamiditos utilizados fueron 5'-DMT-dG<sup>DMF</sup> y 5'-DMT-T. Finalizado el ciclo sintético fue necesario un tratamiento adicional donde se introdujo el fosforamidito de MMT-6-aminohexanol (Figura 50a) que permitió la incorporación de un grupo enlazante amino unido al oligonucleótido en posición 5' por un grupo espaciador C<sub>6</sub>.

El grupo MMT de las secuencias formadas se desprotegió con una disolución al 3% de TCA en DCM de manera similar a los oligonucleótidos con DMT. Los soportes se lavaron varias veces con DCM y se secaron bajo corriente de N<sub>2</sub>. Una alícuota de cada uno de los dos oligonucleótidos 5'-amino se liberó del soporte como control, siendo posteriormente analizadas por RMN y MALDI-TOF.

Estos 5'-amino nucleótidos se conjugaron con los ácidos oleico y linoleico de forma manual. Para ello, en un vial Eppendorf de 1.5 mL se mezclaron 8 μL de DIPEA con el ácido graso correspondiente (linoleico u oleico, 8 μL) previamente disuelto en 80 μL de DMF. Tras esto se añadieron 13 mg de PyBoP y se agitó la mezcla durante 10 min.

Estas disoluciones se añadieron sobre los soportes sólidos de interés y se dejaron reaccionar a temperatura ambiente durante 2 h. A continuación, el exceso de reactivos y disolventes fue eliminado mediante lavados sucesivos de los soportes sólidos con DMF, DCM y ACN.

Los conjugados de lípido-oligonucleótido se liberaron del soporte sólido utilizando 1 mL de una disolución acuosa de NH<sub>3</sub> (33%) a 55 °C durante 6 h. Tras filtrar la resina con la ayuda de una pipeta Pasteur

provista de un algodón, se eliminó el amoníaco por corriente de N<sub>2</sub> y las muestras se purificaron en un cartucho Sephadex.

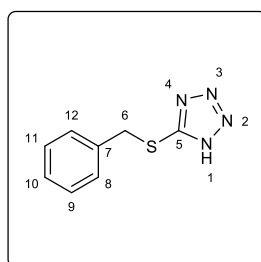
Para ello, primero se equilibró el cartucho haciendo pasar H<sub>2</sub>O *mQ* varias veces y descartando estas disoluciones. Se cargó sobre el cartucho 1 mL de disolución con la muestra y se hizo pasar dos veces dejando que cayese por gravedad. Finalmente, el producto de interés fue eluido del cartucho con una disolución al 20% de ACN en H<sub>2</sub>O *mQ* debido a la hidrofobicidad del grupo lipídico. Tras la eliminación de disolventes se calcularon las OD de los productos obtenidos (Tabla 20) y las muestras fueron caracterizadas por MALDI-TOF.

#### **4. Datos experimentales**

Se muestran aquí los datos experimentales que han permitido la caracterización de los compuestos sintetizados en este capítulo. La numeración utilizada en la asignación de los espectros de RMN se indica en la figura que acompaña a cada compuesto. En este apartado no se incluye ninguno de los oligonucleótidos sintetizados: dímeros, trímeros, tetrámeros, oligonucleótidos de cadena larga y otros derivados. Estos datos, junto con los espectros HPLC y MALDI-TOF, están recogidos en el apartado de Resultados y discusión.

Parte Experimental -----

**5-Benciltio-1H-tetrazol (3)**



Sólido blanco

**R<sub>f</sub>**: 0.12 (Hexano/AcOEt) (1:2)

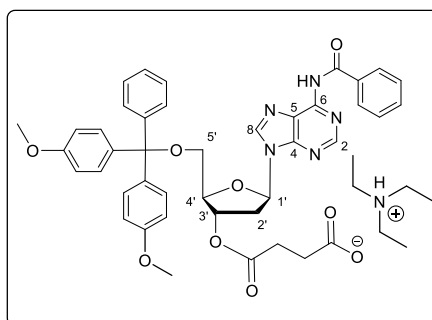
**Fórmula molecular**: C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>S

**Masa molecular**: 192.24 g/mol

**<sup>1</sup>H-RMN** (300.13 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>) δ 4.46 (s, 2H, H<sub>6</sub>), 7.41–7.18 (m, 5H, H<sub>arom</sub>) ppm.

**<sup>13</sup>C-RMN** (75.5 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>) δ 38.0 (C<sub>6</sub>), 128.9 (C<sub>10</sub>), 129.7 (C<sub>9</sub> + C<sub>11</sub>), 129.98 (C<sub>8</sub> + C<sub>12</sub>), 137.5 (C<sub>7</sub>), 155.6 (C<sub>5</sub>) ppm.

***N*<sup>6</sup>-Benzoil-5'-*O*-(4,4'-dimetoxitritil)-3'-*O*-succinil-2'-  
desoxiadenosina (12)**



Sólido blanco

**R<sub>f</sub>**: 0.37 (Et<sub>3</sub>N/MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5:5:90)

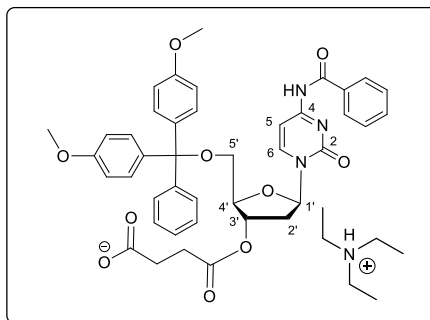
**Fórmula molecular**: C<sub>48</sub>H<sub>54</sub>N<sub>6</sub>O<sub>9</sub>

**Masa molecular**: 858.9 g/mol

**<sup>1</sup>H-RMN** (300.13 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>): δ 1.25 (t, 9H, 3CH<sub>3</sub> Et<sub>3</sub>NH<sup>+</sup>, *J* = 7.3 Hz, 9H), 2.45–2.76 (m, 6H, H<sub>2'</sub> + 2CH<sub>2</sub> succ), 3.09 (q, 6H, 3CH<sub>2</sub> Et<sub>3</sub>NH<sup>+</sup>, *J* = 7.3 Hz), 3.35–3.50 (m, 2H, H<sub>5'</sub>), 3.74 (d, 6H, 2MeO, *J* = 2.1 Hz), 4.34–4.39 (m, 1H, H<sub>4'</sub>), 5.55–5.61 (m, 1H, H<sub>3'</sub>), 6.55 (t, 1H, H<sub>1'</sub>, *J* = 6.9 Hz), 6.77 (dd, 4H, H<sub>arom</sub>, *J* = 8.8, 6.2 Hz), 7.23 (dd, 8H, H<sub>arom</sub>, *J* = 16.1, 8.2 Hz), 7.38 (dd, 2H, H<sub>arom</sub>, *J* = 8.1, 1.5 Hz), 7.53–7.69 (m, 3H, H<sub>arom</sub>), 8.06–8.11 (m, 2H, H<sub>arom</sub>), 8.49 (s, 1H, H<sub>2</sub>) ppm.

**<sup>13</sup>C-RMN** (75.5 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>): δ 9.4 (CH<sub>3</sub> Et<sub>3</sub>NH<sup>+</sup>), 31.8 (CH<sub>2</sub> succ), 33.3 (CH<sub>2</sub> succ), 37.7 (C<sub>2'</sub>), 47.6 (CH<sub>2</sub> Et<sub>3</sub>NH<sup>+</sup>), 55.7 (CH<sub>3</sub> MeO), 65.1 (C<sub>5'</sub>), 76.5 (C<sub>4'</sub>), 86.1 (C<sub>3'</sub>), 86.9 (C<sub>1'</sub>), 87.8 (C DMT), 114.0 (CH<sub>arom</sub> DMT), 127.9 (C<sub>5</sub>), 128.7 (CH<sub>arom</sub> DMT), 129.3 (CH<sub>arom</sub> DMT), 129.4 (CH<sub>arom</sub> DMT), 129.8 (CH<sub>arom</sub> DMT), 129.8 (CH<sub>arom</sub> DMT), 131.2 (CH<sub>arom</sub> DMT), 131.3 (CH<sub>arom</sub> DMT), 133.9 (CH<sub>arom</sub> Bz), 135.0 (C<sub>arom</sub> Bz), 136.9 (CH<sub>arom</sub> Bz), 137.0 (CH<sub>arom</sub> Bz), 144.8 (C<sub>8</sub>), 146.2 (C<sub>arom</sub> DMT), 151.0 (C<sub>2</sub>), 153.1 (C<sub>6</sub>), 158.2 (C<sub>4</sub>), 160.1 (C<sub>arom</sub> OMe DMT), 174.6 (C-O Bz), 180.0 (C-O succ), 180.1 (C-O succ) ppm.

***N*<sup>4</sup>-Benzoil-5'-*O*-(4,4'-dimetoxitritil)-3'-*O*-succinil-2'-desoxicitosina  
(14)**



Sólido blanco

**R<sub>f</sub>**: 0.29 (Et<sub>3</sub>N/MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5:5:90)

**Fórmula molecular**: C<sub>47</sub>H<sub>54</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub>

**Masa molecular**: 834.9 g/mol

**<sup>1</sup>H-RMN** (300.13 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>): δ 1.29 (t, 9H, CH<sub>3</sub> Et<sub>3</sub>NH<sup>+</sup>, *J* = 7.3 Hz), 2.36–2.69 (m, 5H, H<sub>2'</sub> + CH<sub>2</sub> succ), 2.79 (ddd, 1H, H<sub>2'</sub>, *J* = 14.2, 6.0, 2.6 Hz), 3.17 (q, 6H, 3CH<sub>2</sub> Et<sub>3</sub>NH<sup>+</sup>, *J* = 7.3 Hz), 3.41–3.53 (m, 2H, H<sub>5'</sub>), 3.75 (d, 6H, 2MeO, *J* = 4.0 Hz), 4.33 (d, 1H, H<sub>4'</sub>, *J* = 2.7 Hz), 5.46 (dd, 1H, H<sub>3'</sub>, *J* = 7.2, 4.0 Hz), 6.21 (t, 1H, H<sub>1'</sub>, *J* = 6.3 Hz), 6.87 (dd, 4H, H<sub>arom</sub>, *J* = 8.8, 3.9 Hz), 7.15–7.41 (m, 11H, H<sub>arom</sub> + H<sub>5</sub>), 7.47–7.68 (m, 3H, H<sub>arom</sub>), 7.90–8.01 (m, 2H, H<sub>arom</sub>), 8.26 (d, 1H, H<sub>6</sub>, *J* = 7.5 Hz) ppm.

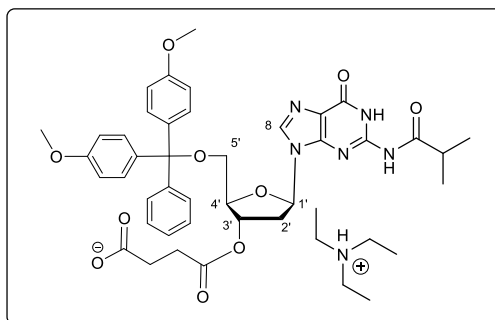
**<sup>13</sup>C-RMN** (75.5 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>): δ 9.3 (CH<sub>3</sub> Et<sub>3</sub>NH<sup>+</sup>), 31.3 (CH<sub>2</sub> succ), 32.3 (CH<sub>2</sub> succ), 40.4 (C<sub>2'</sub>), 47.8 (CH<sub>2</sub> Et<sub>3</sub>NH<sup>+</sup>), 55.9 (CH<sub>3</sub> MeO), 64.4 (C<sub>5'</sub>), 75.7 (C<sub>4'</sub>), 86.6 (C<sub>3'</sub>), 88.5 (C DMT), 89.2 (C<sub>1'</sub>), 98.4 (C<sub>5</sub>), 114.4 (CH<sub>arom</sub> DMT), 128.2 (CH<sub>arom</sub> DMT), 129.1 (CH<sub>arom</sub> DMT), 129.3 (CH<sub>arom</sub> DMT), 129.4 (CH<sub>arom</sub> DMT), 129.9 (CH<sub>arom</sub> DMT), 131.3 (CH<sub>arom</sub> DMT), 131.5 (CH<sub>arom</sub> DMT), 134.2 (C<sub>arom</sub> Bz), 134.8 (C<sub>arom</sub> Bz), 136.6 (CH<sub>arom</sub> Bz), 136.9 (CH<sub>arom</sub> Bz), 145.8 (C<sub>6</sub>), 146.2 (C<sub>arom</sub> DMT), 157.8 (C<sub>2</sub>), 160.4 (C<sub>arom</sub> OMe DMT), 169.2 (C<sub>4</sub>), 174.5 (C-O Bz), 179.0 (C-O succ), 182.0 (C-O succ) ppm.





Parte Experimental -----

**5'-O-(4,4'-Dimetoxitritil)-N-isobutiril-3'-O-succinil-2'-  
desoxiguanosina**



Sólido blanco

**R<sub>f</sub>**: 0.48 (Et<sub>3</sub>N/MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), 5:5:90)

**Fórmula molecular**: C<sub>45</sub>H<sub>56</sub>N<sub>6</sub>O<sub>10</sub>

**Masa molecular**: 840.4 g/mol

**<sup>1</sup>H-RMN** (300.13 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 0.98–1.11 (m, 6H, CH<sub>3</sub> Ibu), 1.17 (t, 9H, CH<sub>3</sub> Et<sub>3</sub>NH<sup>+</sup>, *J* = 7.3 Hz), 2.35 (d, 1H, CH Ibu, *J* = 7.3 Hz), 2.45–2.66 (m, 5H, CH<sub>2</sub> succ + H<sub>2'</sub>), 2.79 (dd, 1H, H<sub>2'</sub>, *J* = 9.6, 4.6 Hz), 2.90 (q, 6H, CH<sub>2</sub> Et<sub>3</sub>NH<sup>+</sup>, *J* = 7.3 Hz), 3.33 (qd, 2H, H<sub>5'</sub>, *J* = 10.3, 3.4 Hz), 3.76 (d, 6H, 2MeO, *J* = 2.2 Hz), 4.22 (s, 1H, H<sub>4'</sub>), 5.46 (d, 1H, H<sub>3'</sub>, *J* = 5.3 Hz), 6.14 (dd, 1H, H<sub>1'</sub>, *J* = 9.3, 5.1 Hz), 6.73–6.82 (m, 4H, H<sub>arom</sub>), 7.12–7.35 (m, 7H, H<sub>arom</sub>), 7.41 (d, 2H, H<sub>arom</sub>, *J* = 7.0 Hz), 7.77 (s, 1H, H<sub>8</sub>) ppm.

## **CAPÍTULO 2**

---

**Síntesis, caracterización y evaluación de  
oligonucleótidos del tipo G-cuádruplex con  
L-nucleósidos en posición 3'**



**Antecedentes**

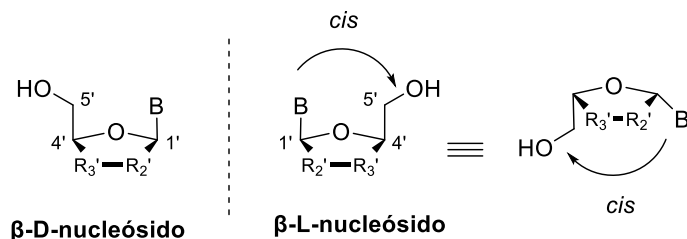


Como moléculas quirales, los D-oligonucleótidos naturales tienen enantiómeros, L-ADN y L-ARN, que están compuestos de azúcares L-(desoxi)ribosa. Estos oligonucleótidos de imagen especular tienen las mismas propiedades físicas y químicas que sus análogos de tipo D, pero son altamente ortogonales al entorno estereoespecífico de la biología. En consecuencia, los L-oligonucleótidos son resistentes a la degradación de las nucleasas y a muchas de las interacciones que afectan a las tecnologías tradicionales basadas en D-oligonucleótidos. Por tanto, son agentes ideales para desarrollar aplicaciones biomédicas.

A pesar de haber mostrado interés durante la década de 1990, la incapacidad de los oligonucleótidos D y L para formar interacciones entre sí de Watson-Crick entre los pares de bases, han llevado a la percepción de que los L-oligonucleótidos tienen una utilidad limitada. Sin embargo, en los últimos años se han comenzado a descubrir nuevas estrategias para aprovechar la bio-ortogonalidad de los L-oligonucleótidos, mientras se supera e incluso explota su incapacidad para formar pares de bases con el polímero natural.

## 2.1. L-Nucleósidos

Los L-nucleósidos son los enantiómeros de los nucleósidos naturales, es decir, la imagen especular no superponible de los nucleósidos de la serie D, en la que todos los estereocentros tienen una configuración invertida. Por analogía con los nucleósidos naturales que se encuentran en los ácidos nucleicos, la nucleobase de un nucleósido L es *cis* al grupo 4-hidroximetilo del azúcar en su configuración de furanosilo. (Figura 54).



**Figura 54.** Representación de D- y L- $\beta$ -nucleósidos en sus formas furanósicas.

Aunque la primera síntesis de un L-nucleósido tuvo lugar en la década de 1960, en general, se ha prestado poca atención a estos derivados.

En 1989 se describió la síntesis y la actividad anti-VIH de un análogo de nucleósido inusual, la ( $\pm$ )-2',3'-didesoxi-3'-tiocitidina (BCH-189).<sup>128</sup> Posteriormente, se encontró que el isómero L de este derivado (3TC) era más potente y menos tóxico que su isómero D.<sup>129,130</sup>

Desde entonces, se han sintetizado y evaluado biológicamente varios análogos de nucleósidos L, y se ha reconocido la importancia de la quiralidad y su influencia en la actividad antiviral de dichos derivados. Sin embargo, el aspecto más sorprendente en este campo fue el hecho de que en algunos casos las quinasas celulares son capaces de fosforilar a los nucleósidos L a sus correspondientes trifosfatos, lo que les permite desarrollar diversas actividades biológicas.

### 2.1.1. Aspectos históricos

En 1964, Smejkal y Sorm realizaron la síntesis del primer L-nucleósido, la L-timidina,<sup>131</sup> que fue sintetizada a partir de 2-desoxi-L-ribósido siguiendo el procedimiento descrito para el isómero D (Esquema 33).

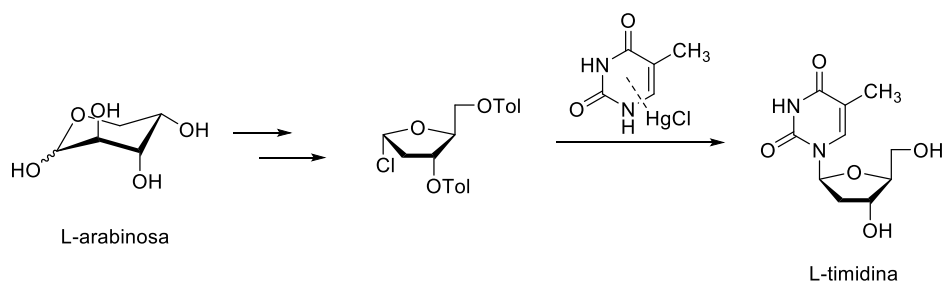
<sup>128</sup> B. Belleau, D. Dixit, N. Nguyen-Bu, J.-L. Kraus. *International Conference on AIDS*. Montreal, Canada, 4–9 June 1989 paper T.C.O.1.

<sup>129</sup> J. A.V. Coates, N. Cammack, H. J. Jenkinson. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1992**, *36*, 202–205.

<sup>130</sup> R. F. Schinazi, C. K. Chu, A. Peck. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1992**, *36*, 672–676.

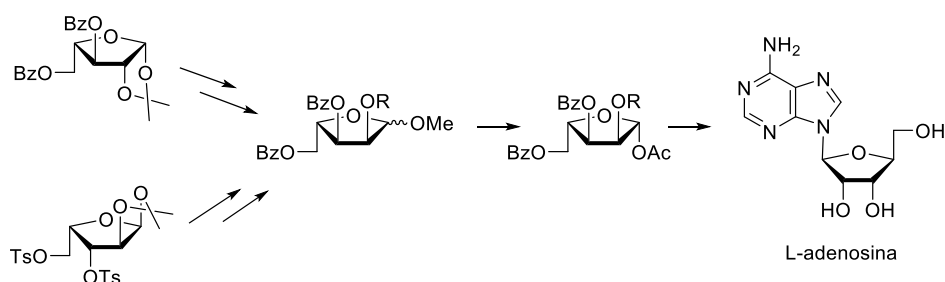
<sup>131</sup> J. Smejkal, F. Sorm. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1964**, *29*, 2809–2813.





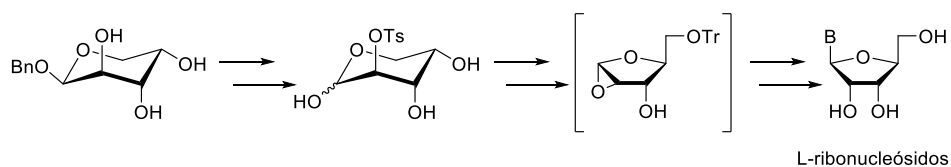
**Esquema 33.** Síntesis de L-timidina.

Ese mismo año, se describieron métodos sintéticos para la L-adenosina, a partir de L-arabinosa y L-xilosa, utilizando el acoplamiento del cloroazúcar resultante con cloromercurio-6-benzamidopurina, de acuerdo con el procedimiento conocido para la D-adenosina (Esquema 34).<sup>132</sup>



**Esquema 34.** Síntesis de L-adenosina.

Otros L-nucleósidos como L-uridina, L-citidina, L-adenosina, L-guanosina y 5-metil-L-uridina fueron sintetizados en 1969 (Esquema 35).<sup>133</sup>



**Esquema 35.** Síntesis de L-ribonucleósidos.

<sup>132</sup> E. M. Acton, K. J. Ryan, L. Goodman. *J. Chem. Soc.* **1964**, 86, 5352-5354.

<sup>133</sup> A. Holy, F. Sorm. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1969**, 34, 3383-3391.

La 2'-desoxi-L-adenosina y la 2'-desoxi-L-guanosina fueron preparadas por Robins *et al.* utilizando el método de fusión.<sup>134</sup> Holy también realizó la síntesis de 2'-desoxi-L-uridina, 2'-desoxi-L-timidina y 2'-desoxi-L-citidina construyendo la base en varias etapas en lugar de utilizar la condensación directa.<sup>135</sup>

### **2.1.2. Actividad biológica de los L-nucleósidos: antivirales terapéuticos y agentes antitumorales**

Los análogos de nucleósidos han desempeñado un papel fundamental como agentes terapéuticos de enfermedades infecciosas.<sup>136,137</sup> Debido a la similitud conformacional con la estructura natural de nucleótidos/nucleósidos, se han diseñado varios análogos de nucleósidos carbocíclicos que pueden reconocer específicamente a las polimerasas<sup>138</sup> o hidrolasas<sup>139</sup> objetivo y bloquear de manera efectiva sus actividades biológicas.

Sin embargo, la aplicación de análogos de nucleósidos carbocíclicos como agentes terapéuticos está, en muchas ocasiones, restringido por la citotoxicidad asociada. En los últimos años, la búsqueda de alternativas novedosas basadas en análogos nucleosídicos de configuración L para conseguir disminuir dicha toxicidad ha sido pionera en este campo.

Muchos L-nucleósidos han demostrado tener una gran actividad como agentes antivirales. Un ejemplo sería el análogo 5-fluoro de la lamivudina, la emtricitabina ( $\beta$ -L-2',3'-didesoxi-3'-tia-5-fluorocitidina, FTC, Figura 55), un fármaco aprobado para el tratamiento de infecciones por VIH.

De la misma forma, los análogos de  $\beta$ -timidina, telbivudina y clevidina, son dos fármacos antivirales aprobados contra el VHB. El maribavir es

<sup>134</sup> M. J. Robins, T. A. Khwaja, R. K. Robins. *J. Org. Chem.* **1969**, *34*, 636-639.

<sup>135</sup> a) A. Holy. *Tetrahedron Lett.* **1971**, *12*, 189-193; b) A. Holy. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1972**, *37*, 4072-4082.

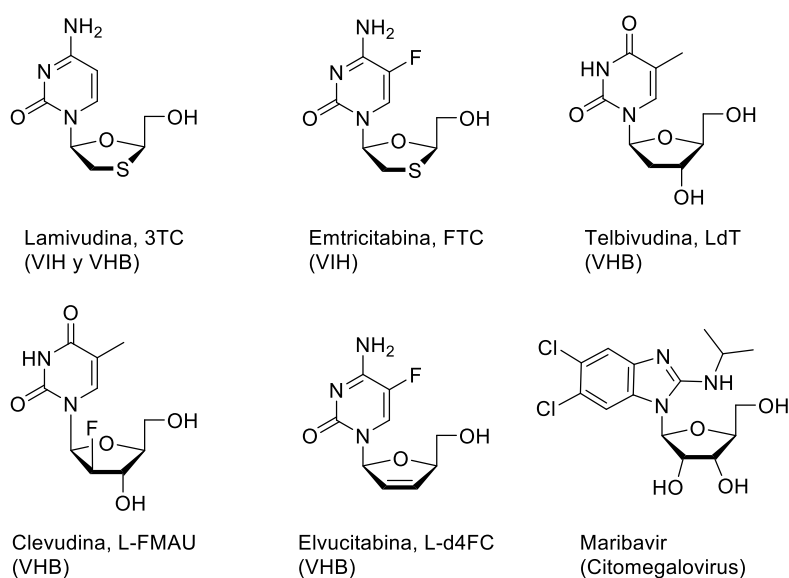
<sup>136</sup> E. de Clercq. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 13-25.

<sup>137</sup> E. de Clercq. *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, *2*, 704-720.

<sup>138</sup> C. Périgaud, G. Gosselin, J. Imbach. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* **1992**, *11*, 903-945.

<sup>139</sup> E. de Clercq. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **1994**, *13*, 1271-1295.

otro L-nucleósido que ha exhibido una mayor eficacia que la terapia antiviral convencional contra el citomegalovirus, por lo que está siendo valorado para su aprobación por la FDA.<sup>140</sup>



**Figura 55.** Algunos L-nucleósidos antivirales comercializados (3TC, FTC, LdT y L-FMAU) o en fase de estudio.

La pandemia del SARS-CoV-2 ha puesto de manifiesto la deficiencia de terapias efectivas y la importancia de desarrollar múltiples estrategias antivirales debido a las mutaciones rápidas del virus, capaz de desarrollar resistencia a los tratamientos.

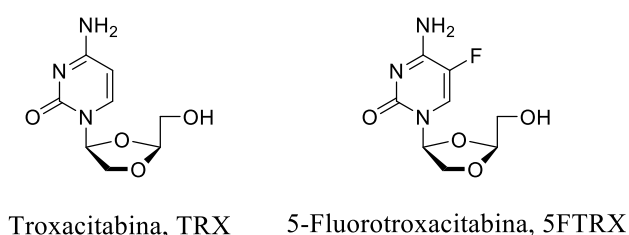
Por ello, se han llevado a cabo grandes esfuerzos para desarrollar análogos de nucleósidos de amplio espectro dirigidos a SARS-CoV-2-ARN dependiente de la ARN polimerasa.<sup>141</sup>

Los derivados de L-nucleósidos son también prometedores agentes anticancerígenos. La troxacitabina (Figura 56) es el primer compuesto con

<sup>140</sup> [takeda.com/Newsroom/ News Releases](https://www.takeda.com/Newsroom/NewsReleases). 21/07/2021.

<sup>141</sup> M. Chien, T. K. Anderson, S. Jockusch, C. Tao, X. Li, S. Kumar, J. J. Russo, R. N. Kirchdoerfer, J. Ju. *Proteome Res.* **2020**, *19*, 4690-4697.

isomería L que ha mostrado actividad contra tumores sólidos y leucemia. Otro ejemplo es su análogo 5-fluoro, la 5-fluorotroxacitabina, que ha mostrado actividad *in vitro* contra la leucemia mieloide aguda.<sup>142</sup>



**Figura 56.** L-nucleósidos antitumorales.

## 2.2. L-Oligonucleótidos

Muchas de las aplicaciones más prometedoras de los oligonucleótidos (ON) requieren que actúen dentro de ambientes biológicos complejos, por ejemplo, dentro de células vivas. Sin embargo, los ON administrados exógenamente tienen una vida media del orden de minutos y son susceptibles a interacciones no deseadas con macromoléculas endógenas, que los hacen poco adecuados para tales entornos.<sup>143</sup>

Para superar estas limitaciones, los investigadores han desarrollado una variedad de análogos de nucleótidos modificados químicamente, incluidos los 2'-*O*-metilribonucleótidos, ácidos nucleicos bloqueados (LNA) y derivados con enlaces fosforotioato (PS).<sup>144</sup>

<sup>142</sup> A. Bankar, T. P. Siriwardena, B. Rizoska, C. Rydergard, H. Kylefjord, V. Rraklli, A. Eneroth, P. Pinho, S. Norin, J. Bylund. *Haematologica* **2021**, *106*, 754-579.

<sup>143</sup> a) K. E. Lundin, O. Gissberg, C. I. Smith. *Hum. Gene Ther.* **2015**, *26*, 475-485; b) H. Sands, L. J. Gorey-Feret, A. J. Cocuzza, F. W. Hobbs, D. Chidester, G. L. Trainor. *Mol. Pharmacol.* **1994**, *45*, 932-943; c) H. Sands, L. J. Gorey-Feret, S. P. Ho, Y. Bao, A. J. Cocuzza, D. Chidester, F. W. Hobbs. *Mol. Pharmacol.* **1995**, *47*, 636-646; d) J. Goodchild, B. Kim, P. C. Zamecnik. *Antisense Res. Dev.* **1991**, *1*, 153-160; e) S. Agrawal, J. Tamsamani, W. Galbraith, J. Tang. *Clin. Pharmacokinet.* **1995**, *28*, 7-16.

<sup>144</sup> a) B. Groves, Y. J. Chen, C. Zurla, S. Pochevailov, J. L. Kirschman, P. J. Santangelo, G. Seelig. *Nat. Nanotechnol.* **2016**, *11*, 287-294; b) C. Molenaar, S. A. Marras, J. C. Slats, J. C. Truffert, M. Lemaître, A. K. Raap, R. W. Dirks, H. J. Tanke. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, e89; c) S. K. Singh, A. A. Koshkin, J. Wengel, P. Nielsen. *Chem. Commun.* **1998**, 455-456; d) F. Eckstein. *Annu. Rev. Biochem.* **1985**, *54*, 367-402.

Aunque estos nucleótidos modificados pueden aumentar considerablemente la estabilidad intracelular de los ON, y en algunos casos reducir las interacciones fuera del entorno objetivo, a menudo tienen un profundo impacto en las propiedades de hibridación.<sup>145</sup> Por otro lado, algunas modificaciones químicas pueden provocar un aumento de la toxicidad e inmunogenicidad *in vivo*, que hacen desfavorable su introducción en los sistemas de ON existentes.<sup>146</sup>

En contraste, se espera que una modificación ideal del ácido nucleico tenga una bioestabilidad absoluta, baja toxicidad y baja inmunogenicidad, al tiempo que mantiene la compatibilidad de la termodinámica del ácido nucleico. Aunque diseñar un análogo de ON que cumpla con estos criterios puede parecer muy difícil, la solución puede requerir solo “mirar en el espejo”. Las últimas dos décadas han visto un resurgimiento en la investigación de L-ON, debido, en parte, a la disponibilidad comercial de L-fosforamiditos, lo que ha dado lugar al desarrollo de muchas tecnologías prometedoras basadas en L-ON.

A continuación, se describe brevemente la historia de los L-ON, así como sus aplicaciones biológicas basadas en las tecnologías emergentes que utilizan L-ON en investigación y terapia.

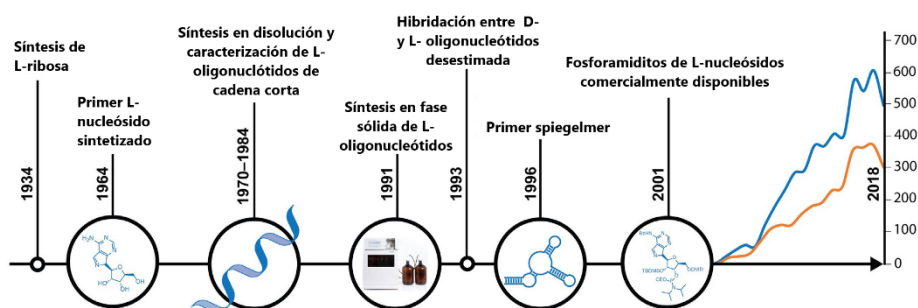
---

<sup>145</sup> a) H. Urata, E. Ogura, K. Shinohara, Y. Ueda, M. Akagi. *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 3325-3332; b) G. W. Ashley. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9731-9736; c) B. Wlotzka, S. Leva, B. Eschgf-Iler, J. Burmeister, F. Kleinjung, C. Kaduk, P. Muhn, H. Hess-Stump, S. Klussmann. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 8898-8902; d) N. C. Hauser, R. Martinez, A. Jacob, S. Rupp, J. D. Hoheisel, S. Matysiak. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 5101-5111.

<sup>146</sup> A. Garbesi, M. L. Capobianco, F. P. Colonna, L. Tondelli, F. Arcamone, G. Manzini, C. W. Hilbers, J. M. E. Aelen, M. J. J. Blommers. *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 4159-4165.

### 2.2.1. Aspectos históricos

Los orígenes de la investigación de L-ON se remontan a la década de 1930 cuando los avances en la química de azúcares sintéticos hicieron posible el acceso a la L-ribose y la L-desoxirribosa, que no están presentes en la naturaleza (Figura 57).<sup>147</sup>



**Figura 57.** Línea de tiempo que muestra los hitos más significativos de las tecnologías basadas en L-oligonucleótidos. El número de citas por año que hacen referencia a L-oligonucleótidos (azul) o solamente spiegelmers (naranja) se representa entre los años 2001 y 2018. Datos obtenidos de Web of Science.

Motivados por la posibilidad de desarrollar terapias basadas en L-ON biocompatibles, muchos grupos de investigación han dedicado esfuerzos significativos hacia la síntesis y caracterización de L-ON y sus complejos.

Como era de esperar, se demostró que las hélices homoquirales compuestas por dos hebras de L-ON complementarias eran levóginas y conservaban transiciones dinámicas e interacciones mediante enlaces de hidrógeno similares a las de las hélices dextróginas compuestas por D-ON.<sup>145a,148</sup>

Sin embargo, los esfuerzos para caracterizar las interacciones heteroquirales entre dos ON de estereoquímica opuesta (D *versus* L) fueron menos claros e incluso controvertidos. Los primeros estudios de

<sup>147</sup> a) W. C. Austin, F. L. Humoller. *J. Am. Chem. Soc.* **1934**, *56*, 1152-1153; b) J. Meisenheimer, H. Jung. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1927**, *60*, 1462-1465; c) P. A. Levene, L. A. Mikeska, T. Mori. *J. Biol. Chem.* **1930**, *85*, 785-787.

<sup>148</sup> H. Urata, K. Shinohara, E. Ogura, Y. Ueda, M. Akagi. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 8174-8175.

modelización realizados por Ashley sugirieron que la hélice de ARN en forma A podría facilitar la formación de complejos heteroquirales.<sup>145b</sup>

De hecho, varios grupos describieron la formación de interacciones específicas entre homopolímeros de L-ADN/ARN (por ejemplo, L-poli[rA] y L-poli[dA]) y sus ácidos nucleicos naturales complementarios, aunque los complejos heteroquirales resultantes fueron consistentemente menos estables que los naturales.<sup>145b,149</sup>

Estas observaciones iniciales llevaron a algunos investigadores a especular que los L-ON eran capaces de reconocer ADN y ARN naturales complementarios.

Sin embargo, esta hipótesis fue refutada más tarde por Garbesi y sus colaboradores, quienes demostraron que los L-ADN de secuencia mixta que contenían las cuatro bases no podían hibridarse a moléculas complementarias de D-ADN o D-ARN.<sup>146</sup>

Hoy en día, se acepta que el emparejamiento de bases de tipo Watson-Crick es estrictamente estereoespecífico.<sup>150</sup>

Debido a que esto impide el uso de L-ON en tecnologías dependientes de la hibridación, como la interferencia antisentido o de ARN, se pensó que los L-ON tenían poca utilidad práctica. Sin embargo, los investigadores se dieron cuenta de que esta propiedad, junto con la bioestabilidad superior de los L-ON, podría explotarse para desarrollar una variedad de tecnologías prometedoras basadas en L-ON bioortogonales con aplicaciones en investigación y en medicina. En los siguientes epígrafes se analizarán ejemplos de estas tecnologías.

---

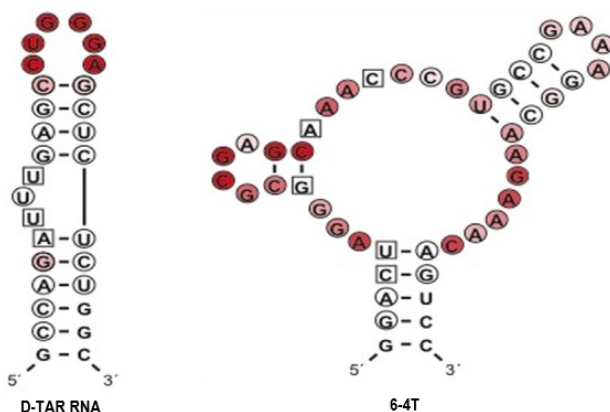
<sup>149</sup>a) Y. Hashimoto, N. Iwanami, S. Fujimori, K. Shudo. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 9883-9887; b) H. Fujimori, K. Shudo. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 7436-7438; c) U. Asseline, J. F. Hau, C. Stanislas, T. Le Diguarher, M. C. Perlat, J. M. Valery, N. T. Thuong. *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19*, 4067-4074; d) D. J. Anderson, R. J. Reischer, A. J. Taylor, W. J. Wechter. *Nucleosides Nucleotides* **1984**, *3*, 499-512.

<sup>150</sup> K. Hoehlig, L. Bethge, S. Klussmann. *PLoS One* **2015**, *10*, e0115328.

## 2.2.2. Actividad biológica de los L-oligonucleótidos: *spiegelmers* y otras aplicaciones en biología molecular

### a) *Spiegelmers*

Quizás la aplicación más exitosa de los L-ON, hasta la fecha, es el descubrimiento y desarrollo de aptámeros compuestos enteramente de L-ADN y/o L-ARN, denominados *spiegelmers* (Figura 58).<sup>151</sup>



**Figura 58.** Secuencias y estructuras secundarias de d-TAR RNA y 6-4t (*spiegelmers*).

Los aptámeros son polímeros de ácidos nucleicos que son capaces de reconocer, con alta especificidad y afinidad, un extenso rango de ligandos.<sup>152</sup>

Hasta la fecha, los *spiegelmers* han evolucionado para unirse a una variedad de objetivos, incluyendo moléculas pequeñas, péptidos y proteínas.<sup>153</sup> Por ejemplo, Olea *et al.* identificaron con éxito un *spiegelmer*

<sup>151</sup> a) S. Klussmann, A. Nolte, R. Bald, V. A. Erdmann, J. P. Furste. *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 1112-1115; b) A. Nolte, S. Klussman, R. Bald, V. A. Erdmann, J. P. Furste. *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 1116-1119.

<sup>152</sup> a) J. L. Vinkenborg, N. Karnowski, M. Famulok. *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 519-527; b) M. Famulok, G. Mayer, M. Blind. *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 591-599.

<sup>153</sup> a) S. Helmling, C. Maasch, D. Eulberg, K. Buchner, W. Schroder, C. Lange, S. Vonhoff, B. Wlotzka, M. H. Tschop, S. Rosewicz, S. Klussmann. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 13174-13179; b) R. Boisgard, B. Kuhnast, S. Vonhoff, C. Younes, F. Hinnen, J. M. Verbavatz, B. Rousseau, J. P. Furste, B. Wlotzka, F. Dolle, S. Klussmann, B. Tavitian. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2005**, *32*, 470-477; c) W. G. Purschke, D.



de L-ARN capaz de inhibir la ribonucleasa barnasa, destacando así la increíble resistencia del L-ARN a la degradación de la nucleasa.<sup>154</sup> Los spiegelmers conservan una alta afinidad por sus objetivos *in vivo*, a la vez que no son tóxicos ni inmunogénicos.<sup>145a,155a,b,e</sup> Aunque se han descubierto numerosos spiegelmers contra péptidos y proteínas, la capacidad de aislar spiegelmers contra dianas de ácidos nucleicos permanece en gran parte inexplorada.

Se han sometido a ensayos clínicos varias terapias basadas en spiegelmers, y varios fármacos han completado ensayos clínicos de fase I o II en los Estados Unidos.<sup>155e</sup> Más allá de su utilidad clínica y terapéutica, los spiegelmers también se han utilizado para desarrollar bioensayos para la detección de analitos clínicamente relevantes dentro de mezclas biológicas complejas, abriendo así la puerta a futuras aplicaciones de diagnóstico.

Como muestra la Figura 57, los spiegelmers y las publicaciones relacionadas con ellos, comprenden casi dos tercios de todas las citas de L-ON existentes en la literatura.<sup>155</sup> En consecuencia, son numerosas las revisiones que han abordado esta clase de L-ON, y su discusión excedería el objetivo de este capítulo.

#### *b) Otras aplicaciones de los L-ON en biología molecular*

Aparte de los spiegelmers, muchas de las primeras aplicaciones publicadas de los L-ON buscaron explotar su estricta bio-ortogonalidad para ampliar el alcance y la versatilidad de los ensayos tradicionales de la

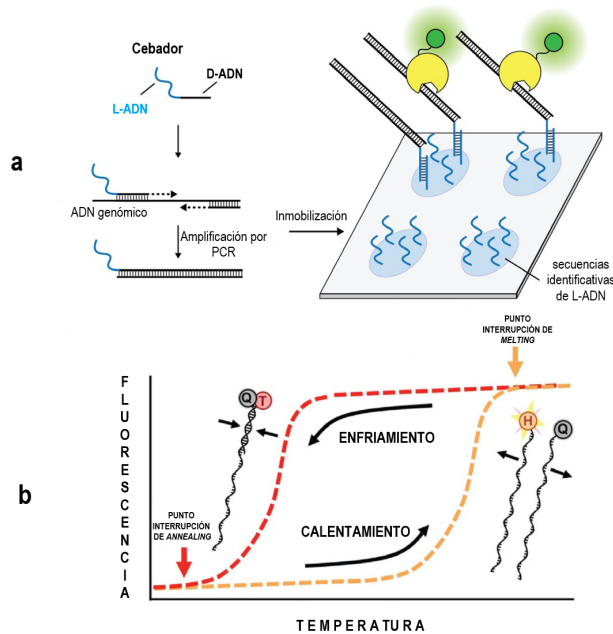
---

Eulberg, K. Buchner, S. Vönhoff, S. Klussmann. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 5173-5178; d) O. Kulkarni, R. D. Pawar, W. Purschke, D. Eulberg, N. Selve, K. Buchner, V. Ninichuk, S. Segerer, V. Vielhauer, S. Klussmann, H. J. Anders. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2007**, *18*, 2350-2358.

<sup>154</sup> C. Olea, Jr; J. Weidmann, P. E. Dawson, G. F. Joyce. *Chem. Biol.* **2015**, *22*, 1437-1441.

<sup>155</sup> a) D. Eulberg, S. Klussmann. *Chembiochem* **2003**, *4*, 979-983; b) A. Vater, S. Klussman. *Curr. Opin. Drug Discov. Dev.* **2003**, *6*, 253-261; c) S. Klussman. *The Aptamer Handbook (Ed.: S. Klussman) Wiley-VCH, Weinheim*, **2006**, pp. 417-442; d) S. Hoffmann, J. Hoos, S. Klussmann, S. Vönhoff. *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* **2011**, *4*, 1-30; e) A. Vater, S. Klussmann. *Drug Discovery Today* **2015**, *20*, 147-155.

biología molecular. En un ejemplo, Hauser *et al.* desarrollaron una novedosa plataforma universal de *microarrays* compuesta por placas de vidrio con secuencias identificativas de L-DNA (Figura 59a).<sup>145d</sup>



**Figura 59.** Aplicaciones de L-ONs en ensayos microbiológicos. a) Representación de un ensayo de una matriz de secuencias para detectar interacciones ADN-proteína. b) Una sonda ortogonal de L-ADN configurada para la optimización en tiempo real de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a temperatura de ciclo (es decir, "PCR adaptativa").

La matriz se usó junto con una sonda que consiste en una región de D-ADN complementaria a un gen diana, por ejemplo, y una región de D-ADN complementaria a la matriz del código identificativo.

De esta manera, se inmovilizaron secuencias genómicas específicas en la matriz para su posterior análisis mediante el uso de diversas técnicas. Por ejemplo, este enfoque se utilizó para detectar polimorfismos de un solo nucleótido e interacciones proteína-ADN (Figura 59a), tanto de forma independiente como simultánea en el mismo portaobjetos de microarrays. El uso de estas secuencias identificativas de L-ADN aseguró que no

hubiera riesgo de hibridación cruzada entre los ON de posicionamiento de los microarrays y la muestra de D-ADN, reduciendo así significativamente el fondo en comparación con el de los microarrays tradicionales basados en D-ADN. Además, las matrices de código identificativo de L-ADN demostraron ser completamente resistentes a la degradación de la nucleasa. Por tanto, además de las ventajas de manejo, estas matrices de L-ADN permiten una incubación y captura prolongadas con análisis directo de muestras dentro de entornos biológicos complejos.

En un segundo ejemplo, Adams *et al.* describieron el uso de un sensor de hibridación basado en L-ADN para la optimización, en tiempo real, de los ajustes de temperatura durante una PCR, denominada PCR adaptativa (Figura 59b).<sup>156</sup> Aquí, los análogos de L-ADN, tanto del dúplex objetivo como del complejo plantilla-cebador, se agregaron directamente a la PCR. Cada uno de los análogos de L-ADN fueron diseñados para producir una respuesta fluorescente única durante el ciclo de temperatura.

A medida que la PCR se calentaba (etapa de fusión), el objetivo del L-ADN analógico se desnaturalizó, produciendo una señal fluorescente que indicó que el dúplex objetivo de D-ADN correspondiente estaba completamente desnaturalizado.

Del mismo modo, a medida que la muestra se enfriaba (etapa de *annealing*), el análogo del cebador de L-ADN se unió a la plantilla de L-ADN, resultando en la extinción de fluorescencia, e indicando que el cebador de D-ADN correspondiente también se había recombinado con la plantilla de D-ADN. Como los análogos fluorescentes son compuestos de L-ADN bioinertes, se pueden agregar directamente a la muestra de PCR para monitorizar, en tiempo real, cuando se han logrado el cebador óptimo, el recombinado y la fusión del objetivo sin interferir con la reacción de amplificación.

---

<sup>156</sup> N. M. Adams, W. E. Gabella, A. N. Hardcastle, F. R. Haselton. *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 728-735.

Se han descrito muchas otras aplicaciones, como los biosensores basados en L-oligonucleótidos,<sup>157,158</sup> la detección y separación de analitos quirales<sup>159,160</sup> o incluso interesantes aplicaciones en el campo de la nanotecnología.

### 2.3. G-cuádruplexes como agentes terapéuticos

La estructura G-cuádruplex en ON es particularmente interesante, ya que se ha encontrado en áreas relevantes como en regiones promotoras o teloméricas, así como en oncogenes.<sup>161</sup>

Un ejemplo de este tipo de moléculas sería el aptámero TBA, también conocido como G15D, HTQ, HD1 o ARC183 (Figura 60i y 60iii). Se trata de un ADN monocatenario 15-mer, con la secuencia 5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3',<sup>162</sup> la cual interactúa con el *exosite I* de la alfa-trombina humana, que es el sitio de unión del fibrinógeno, por lo que este aptámero actúa como un agente anticoagulante que inhibe la activación del fibrinógeno y la agregación plaquetaria.

---

<sup>157</sup> Y. Kim, C. J. Yang, W. Tan. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 7279-7287.

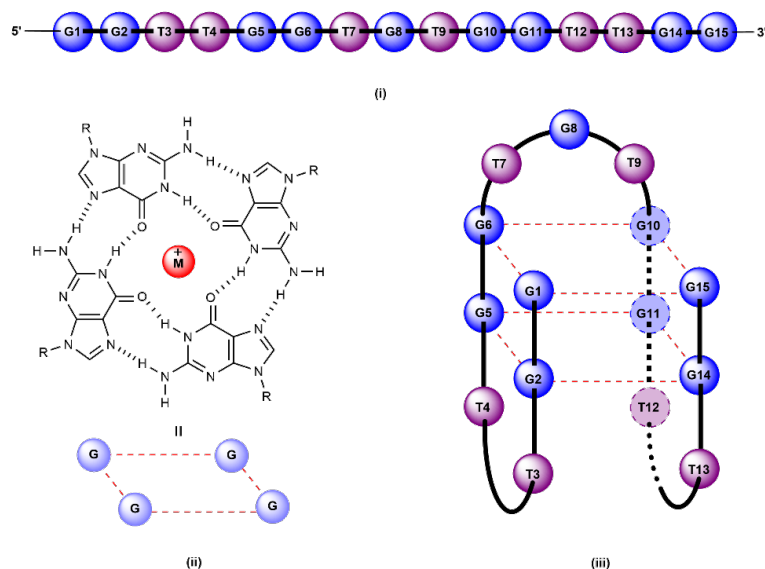
<sup>158</sup> a) L. Cui, R. Peng, T. Fu, X. Zhang, C. Wu, H. Chen, H. Liang, C. J. Yang, W. Tan. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 1850-1855; b) H. Liang, S. Xie, L. Cui, C. Wu, X. Zhang. *Anal. Methods* **2016**, *8*, 7260-7264.

<sup>159</sup> T. A. Feagin, D. P. Olsen, Z. C. Headman, J. M. Heemstra. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 4198-4206.

<sup>160</sup> a) Q. Deng, I. German, D. Buchanan, R. T. Kennedy. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 5415-5421; b) S. L. Clark, V. T. Remcho. *J. Sep. Sci.* **2003**, *26*, 1451-1454; c) A. Brumbt, C. Ravelet, C. Grosset, A. Ravel, A. Villet, E. Peyrin. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 1993-1998; d) C. Ravelet, R. Boulkedid, A. Ravel, C. Grosset, A. Villet, J. Fize, E. Peyrin. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1076*, 62-70; e) J. Ruta, C. Ravelet, C. Grosset, J. Fize, A. Ravel, A. Villet, E. Peyrin. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 3032-3039; f) J. Ruta, C. Grosset, C. Ravelet, J. Fize, A. Villet, A. Ravel, E. Peyrin. *J. Chromatogr. B* **2007**, *845*, 186-190.

<sup>161</sup> M. L. Bochman, K. Paeschke, V. A. Zakian. *Nat. Rev. Genet.* **2012**, *13*, 770-780.

<sup>162</sup> L. C. Bock, L. C. Griffin, J. A. Latham, E. H. Vermaas, J. J. Toole. *Nature* **1992**, *335*, 564-566.



**Figura 60.** (i) Secuencia de la cadena del aptámero TBA. (ii) Interacciones entre las bases de guanina (G) para formar un cuarteto (G-cuarteto); este cuarteto es representado esquemáticamente como un cuadrado y  $M^+$  denota la presencia de un catión monovalente. (iii) Estructura G-cuádruplex adoptada por el TBA.

La química computacional ha proporcionado información relevante para ser aplicada en estudios biomédicos y estructurales del TBA.

El TBA se pliega en una estructura G-cuádruplex antiparalela consistente en dos tétradas de G conectadas por dos bucles TT y un bucle TGT central (Figura 60iii).

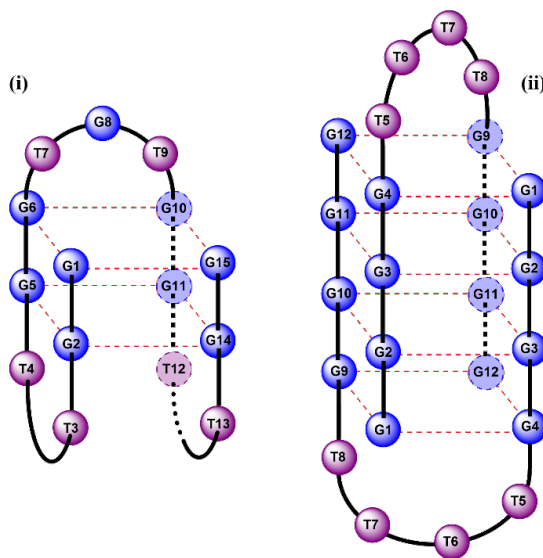
Los elementos estructurales que controlan la conformación del TBA no solo se limitan a las G-tétradas. Se sabe que los bucles juegan un papel importante en la estructura de plegado y en la unión a la molécula objetivo.

En particular, los dos bucles TT interactúan con el *exosite* I de la trombina. El bucle TGT del asa central está muy cerca del sitio de unión a la heparina de una molécula de trombina diferente, lo cual hace que el TBA

Antecedentes -----

que interactúa con dos moléculas de trombina, sólo inactiva a una de ellas.<sup>163,164,165</sup>

Otro ejemplo es el oligonucleótido de *Oxytricha nova* d(G<sub>4</sub>T<sub>4</sub>G<sub>4</sub>), que consta de 1,5 unidades de la repetición en los telómeros de *Oxytricha nova*. Es una estructura G-cuádruplex simétrica con cuatro tétradas G y bucles T<sub>4</sub> que abarcan la diagonal de las tétradas G finales (Figura. 61ii).<sup>166</sup>



**Figura 61.** Esquema comparativo de la estructura del TBA (i) y el oligonucleótido de repetición de telómeros de *Oxytricha nova* (ii).

El TBA está atrayendo considerable atención debido a que muestra notables propiedades anticoagulantes *in vitro* y algunos mutantes basados en su estructura se encuentran en ensayos clínicos avanzados.<sup>167</sup> Además, algunas estructuras G-cuádruplex, incluida el TBA, han mostrado

<sup>163</sup> J. A. Kelly, J. Feigon, T. O. Yeates. *J. Mol. Biol.* **1996**, 256 417-422.

<sup>164</sup> K. Padmanabhan, A. Tulinsky. *Acta Crystallogr. Sect. D: Biol. Crystallogr.* **D52 1996**, 272-282.

<sup>165</sup> I. Russo Krauss, A. Merlino, C. Giancola, A. Randazzo, L. Mazarella, F. Sica. *Nucleic Acids Res.* **2011**, 39, 7858-7867.

<sup>166</sup> P. Schultze, N. V. Hud, F. W. Smith, J. Feigon. *Nucleic Acids Res.* **1999**, 27, 3018-3028.

<sup>167</sup> M. Khati. *J. Clin. Pathol.* **2010**, 63, 480-487.

actividad antiproliferativa en células cancerosas.<sup>168</sup> Aunque no existe una relación clara entre la estructura y las propiedades biofísicas en el comportamiento antiproliferativo,<sup>168</sup> investigaciones más recientes avanzan en esta dirección.<sup>169,170,171</sup>

Las investigaciones basadas en la topología de plegamiento del TBA también pueden ser explotadas en diagnóstico o en aplicaciones de biodetección. Así, el TBA se utilizó como un aptasensor de ADN para la determinación de metales.<sup>172</sup>

Estudios experimentales han demostrado que es posible modular las diversas funciones biológicas de los ácidos nucleicos mediante la incorporación de modificaciones químicas específicas en sitios concretos.

Por ejemplo, para el aptámero TBA se han descrito varias modificaciones para mejorar su estabilidad térmica, resistencia a las nucleasas y afinidad hacia la trombina.<sup>173,174</sup>

Aviño *et al.* han demostrado que una estructura de orden superior del TBA se puede estabilizar mediante simples modificaciones específicas en el bucle o mediante la sustitución de varios nucleótidos naturales por otros con propiedades estructurales o físico-químicas especiales.<sup>175</sup> También se han introducido en diferentes posiciones del TBA otros derivados como

---

<sup>168</sup> V. Dapic, V. Abdomerovic, R. Marrington, J. Peberdy, A. Rodger, J. O. Trent, P. J. Bates. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 2097-2107.

<sup>169</sup> A. Virgilio, L. Petraccone, V. Vellecco, M. Bucci, M. Varra, C. Irace, R. Santamaria, A. Pepe, L. Mayol, V. Esposito, A. Galeone. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, 10602-10611.

<sup>170</sup> N. Zhang, T. Bing, X. Liu, C. Qi, L. Shen, L. Wang, D. Shangguan. *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 3831-3838.

<sup>171</sup> M. Scuotto, E. Riviaccio, A. Varone, D. Corda, M. Bucci, V. Vellecco, G. Cirino, A. Virgilio, V. Esposito, A. Galeone, N. Borbone, M. Varra, L. Mayol. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, 7702-7716.

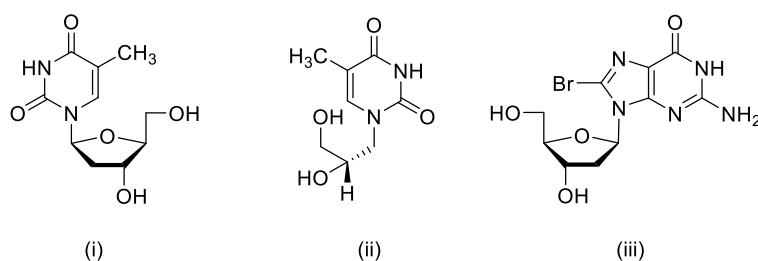
<sup>172</sup> M. Jarczewska, Ł. Górski, E. Malinowska. *Sensors Actuators B Chem.* **2016**, *226*, 37-43.

<sup>173</sup> A. Aviño, C. Fàbrega, M. Tintoré, R. Eritja. *Curr. Pharm. Des.* **2012**, *18*, 2036-2047.

<sup>174</sup> D. Musumeci, D. Montesarchio. *Pharmacol. Ther.* **2012**, *136*, 202-215.

<sup>175</sup> A. Aviño, G. Portella, R. Ferreira, R. Gargallo, S. Mazzini, V. Gabelica, M. Orozco, R. Eritja, *FEBS J.* **2014**, *281*, 1085-1099.

ácidos nucleicos bloqueados (LNA),<sup>176,177</sup> ácidos nucleicos desbloqueados (UNA)<sup>178</sup> o el ácido 2'-desoxi-2'-fluoro-β-D-arabinonucleico (2'-ANA),<sup>179</sup> todos ellos con características troncales interesantes. Además, se han estudiado modificaciones en las nucleobases, tales como alquilaciones o bases con diferente densidad electrónica, para comprender la topología de plegamiento y la estabilidad del TBA.<sup>180</sup>



**Figura 62.** Estructura química de los residuos de (i) L-timidina, (ii) (S)-GNA-T y (iii) 8-bromo-2'-desoxiguanosina utilizados para la síntesis de G-cuádruplexes modificados.

Recientemente, Aviñó *et al.* prepararon un grupo de variantes del TBA introduciendo en diferentes posiciones del bucle varias modificaciones, entre ellas, (S)-GNA-T, 8-bromo-2'-desoxiguanosina y L-timidina (Figura 62).<sup>181</sup>

En primer lugar, se estudió el efecto de la sustitución de timidinas del TBA por unidades GNA-T. Este derivado de timina es un precursor para la formación de nucleótidos de propilenglicol con tres átomos de carbono unidos por enlaces fosfodiéster.<sup>182</sup>

<sup>176</sup> A. Virno, A. Randazzo, C. Giancola, M. Bucci, G. Cirino, L. Mayol. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 5710-5718.

<sup>177</sup> L. Bonifacio, F. C. Church, M. B. Jarstfer. *J. Mol. Sci.* **2008**, *9*, 422-433.

<sup>178</sup> A. Pasternak, F. J. Hernandez, L. M. Rasmussen, B. Vester, J. Wengel. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 1155-1164.

<sup>179</sup> C. G. Peng, M. J. Damha. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 4977-4988.

<sup>180</sup> G.-X. He, S. H. Krawczyk, S. Swaminathan, S. G. Regan, J. P. Dougherty, T. Terhorst, V. S. Law, L. C. Griffin, S. Coutrè, N. Bischofberger. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 2234-2242.

<sup>181</sup> A. Aviñó, S. Mazzini, C. Fàbrega, P. Peñalver, R. Gargallo, J. C. Morales, R. Eritja. *Biochim. Biophys. Acta* **2017**, *1861*, 1205-1212.

<sup>182</sup> L. Zhang, E. Meggers. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 4174-4175.



Los GNA-T forman estructuras de dúplex antiparalelas según las reglas de Watson-Crick,<sup>182</sup> y estos derivados no se habían probado en los bucles de G-cuádruplex. También se modificaron las posiciones simples en las regiones del bucle del TBA con L-timidina en un esfuerzo por comprender el efecto de la quiralidad del nucleótido en residuos del bucle específicos.

Se demostró que las modificaciones químicas podrían proporcionar información importante sobre la estabilidad del TBA y la afinidad vinculada a los ácidos proteínicos-nucleicos. La sustitución de posiciones del bucle con GNA-T conduce a una desestabilización del TBA, al igual que la sustitución con L-timidina, aunque en este último caso fue mucho menor.

La estabilización del G-cuádruplex permite su utilización como una nueva estrategia contra el cáncer,<sup>183</sup> ya que el principal mecanismo responsable de la inmortalidad celular es un alargamiento descontrolado de un telómero por la enzima telomerasa. En las células normales, este alargamiento no se produce, lo que garantiza una diana específica contra el cáncer.<sup>184</sup>

Además, se sabe que los extremos teloméricos de los cromosomas están protegidos de los procesos de reparación, recombinación y fusión final del ADN por repeticiones en tándem de motivos de ADN ricos en G donde las proteínas como la telomerasa pueden interactuar.<sup>185</sup>

Por tanto, si las secuencias ricas en G en los promotores y los telómeros de oncogenes se pliegan en G-cuádruplex, no serán reconocidos por los factores de transcripción y la telomerasa, respectivamente.

Los ligandos objetivo de G-cuádruplexes surgieron como una alternativa prometedora a la quimioterapia convencional para tratar todos los tipos de cáncer sin mostrar efectos de segundo orden.

---

<sup>183</sup> M. di Antonio, R. Rodriguez, S. Balasubramanian. *Methods* **2012**, *57*, 84-92.

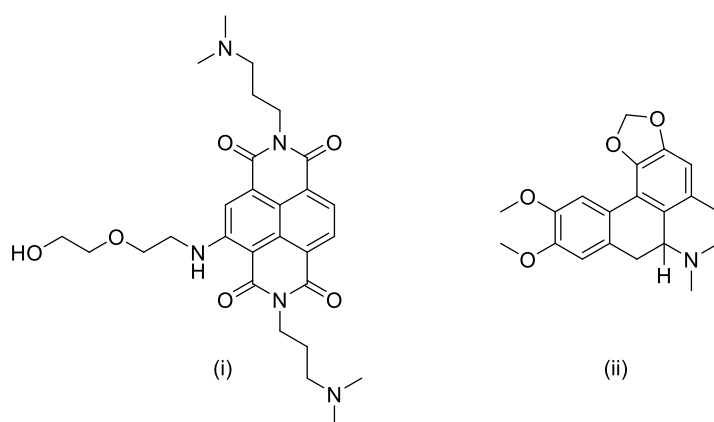
<sup>184</sup> K. Jager, M. Walter. *Genes (Basel)* **2016**, *7*, 39.

<sup>185</sup> M. Read, R. J. Harrison, B. Romagnoli, F. A. Tanius, S. H. Gowan, A. P. Reszka, W. D. Wilson, L. R. Kelland, S. Neidle. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2001**, *98*, 4844-4849.

## Antecedentes -----

Para seleccionar eficazmente los mejores compuestos, se ha diseñado un método basado en cromatografía de afinidad, el ensayo G4-CPG (*G-quadruplex on Controlled Pore Glass*), con secuencias biológicas relevantes que forman G-cuádruplex fijadas capaces de identificar ligandos al interactuar selectivamente con ellos.<sup>186</sup>

Un ejemplo de este tipo de compuestos son las diimidias de naftaleno (NDI), que tienen un potencial notable como fármacos contra el cáncer debido a su capacidad para interactuar con los cuartetos G de los G-cuádruplexes. Específicamente, se encontró que NDI-5 (Figura 63i) es el candidato más prometedor contra las células cancerosas debido a su actividad fuerte y selectiva.<sup>187,188,189</sup>



**Figura 63.** Ligandos dirigidos a G4: (i) NDI-5 y (ii) dicentrina.

Otro compuesto es la dicentrina (Figura 63ii), un alcaloide isoquinolínico de tipo aporfina que relaja el ADN e inhibe la actividad

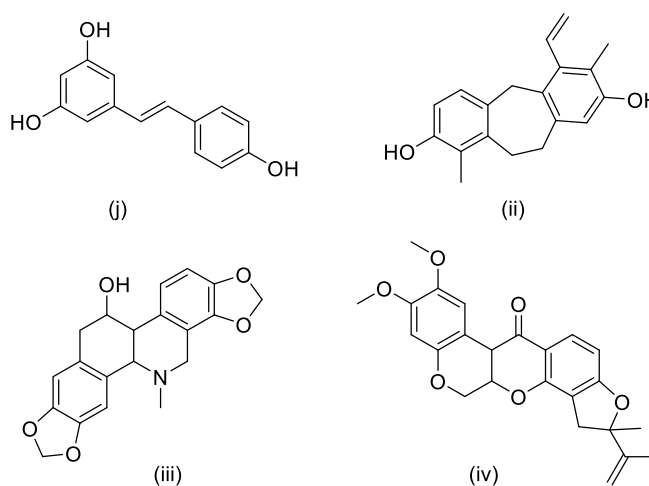
<sup>186</sup> C. Platella, D. Musumeci, A. Arciello, F. Doria, M. Freccero, A. Randazzo, J. Amato, B. Pagano, D. Montesarchio. *Anal Chim Acta* **2018**, *1030*, 133-141.

<sup>187</sup> C. Platella, V. Pirota, D. Musumeci, F. Rizzi, S. Iachettini, P. Zizza, A. Biroccio, M. Freccero, D. Montesarchio, F. Doria. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 1964.

<sup>188</sup> C. Platella, M. Trajkovski, F. Doria, M. Freccero, J. Plavec, D. Montesarchio. *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48*, 12380-12393.

<sup>189</sup> C. Platella, E. Napolitano, C. Riccardi, D. Musumeci, D. Montesarchio. *J. Med. Chem.* **2021**, *64*, 3578-3603.

catalítica de las topoisomerasas de ADN. Además, se sabe que la dicentrina estabiliza la G-cuádruplex telomérica y oncogénica inhibiendo la actividad de la telomerasa.<sup>190</sup>



**Figura 64.** Algunos ejemplos de compuestos naturales como ligandos dirigidos a G4: (i) *trans*-resveratrol, (ii) 2,8-dihidroxi-1,7-dimetil-6-vinil-9,11-dihidrodibenz[b,f]oxepina, (iii) quelidonina y (iv) rotenona.

Además, se encontró que compuestos naturales como el *trans*-resveratrol (Figura 64i), 2,8-dihidroxi-1,7-dimetil-6-vinil-9,11-dihidrodibenz[b,f]oxepina (Figura 64ii), quelidonina (Figura 64iii) y rotenona (Figura 64iv) son ligandos que interactúan específicamente con modelos G-cuádruplex de secuencias teloméricas y oncogénicas, emergiendo como compuestos activos contra las células cancerosas y con poca actividad en las células normales.<sup>191,192,193</sup>

<sup>190</sup> C. Platella, F. Ghirga, D. Musumeci, D. Quaglio, P. Zizza, S. Iachettini, C. D'Angelo, A. Biroccio, B. Botta, M. Mori, D. Montesarchio. *Int J Mol Sci* **2023**, *24*, 4070.

<sup>191</sup> C. Platella, F. Ghirga, P. Zizza, L. Pompili, S. Marzano, B. Pagano, D. Quaglio, V. Vergine, S. Cammarone, B. Botta, A. Biroccio, M. Mori, D. Montesarchio. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 1611.

<sup>192</sup> C. Platella, D. Capasso, C. Riccardi, D. Musumeci, M. DellaGreca, D. Montesarchio. *Org. Biomol. Chem.* **2021**, *19*, 9953-9965.

<sup>193</sup> C. Platella, S. Mazzini, E. Napolitano, L. M. Mattio, G. L. Beretta, N. Zaffaroni, A. Pinto, D. Montesarchio, S. Dallavalle. *Chem. Eur. J.* **2021**, *27*, 8832-8845.



## Objetivos



El enorme potencial de los L-nucleósidos como agentes terapéuticos y como unidades monoméricas de L-oligonucleótidos, ha despertado el interés por su preparación.

En este capítulo, se abordará la síntesis de oligonucleótidos con secuencias ricas en guanina y con uno de sus extremos modificado con un nucleósido de la serie L.

Para ello, se prepararán los derivados L-nucleosídicos 2'-*O*-metil/2'-*O*-MOE, partiendo de L-arabinosa, y los correspondientes precursores succinilo y fosforamidito, que permitirán su incorporación en la cadena oligonucleotídica durante su síntesis en fase sólida.

Posteriormente, una vez formadas las estructuras no canónicas de tipo G-cuádruplex, se llevarán a cabo ensayos de estabilidad térmica, toxicidad y degradación por las nucleasas.





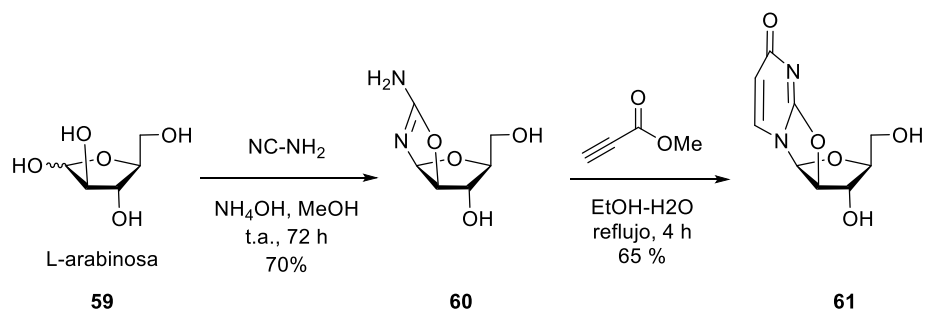
## Resultados y discusión



## 1. Síntesis de los derivados 2'-*O*-metil/2'-*O*-MOE-L-nucleósidos

La síntesis de los derivados L-nucleosídicos se llevó a cabo a través de una estrategia basada en la apertura de un anhidronucleósido (*O*<sup>2,2'</sup>-anhidro-L-uridina, **61**),<sup>194</sup> preparado a partir de L-arabinosa, mediante una reacción de sustitución S<sub>N</sub>2. Dependiendo del tipo de nucleófilo empleado se consiguió la síntesis de diferentes derivados de uridina sustituidos en la posición 2'.

### 1.1. Síntesis de *O*<sup>2,2'</sup>-anhidro-L-uridina



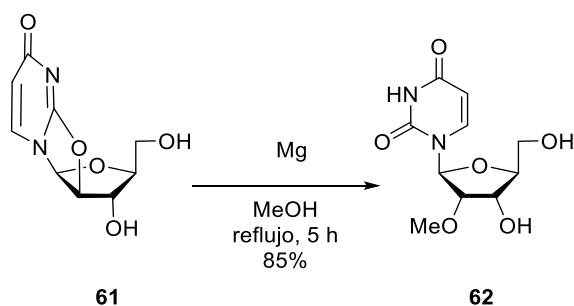
**Esquema 36.** Preparación de *O*<sup>2,2'</sup>-anhidro-L-uridina a partir de L-arabinosa.

En primer lugar, la condensación entre L-arabinosa y cianamida en un medio básico (MeOH-NH<sub>4</sub>OH) durante 3 días a temperatura ambiente proporcionó la aminooxazolina **60** con un rendimiento del 70% (Esquema 36). La estructura conformacionalmente bloqueada de **60** lo convierte en un precursor adecuado y eficiente para sintetizar los análogos de L-nucleósidos deseados. El tratamiento posterior de **60** con propinoato de metilo en una mezcla de EtOH-H<sub>2</sub>O a reflujo durante 4 h conduce a la anhidro-L-uridina **61** con un rendimiento del producto aislado del 65%.

<sup>194</sup> A. Holy, *Coll. Czech. Chem. Commun.* **1972**, 37, 4072-4087.

### 1.2. Síntesis de 2'-*O*-metil-L-uridina

Para sintetizar el derivado 2'-*O*-Me, se utilizó el procedimiento descrito por Szlenkier *et al.*<sup>195</sup> para los nucleósidos D, debido a la fácil accesibilidad de los reactivos y al alto rendimiento de la reacción. Así, el compuesto **61** se adicionó a una suspensión de magnesio y yodo en metanol y la mezcla se agitó a reflujo durante 5 h. Sin embargo, en lugar del compuesto deseado **62**, se aisló un derivado resultante de la yodación de **61** en la posición 5 de la nucleobase (40%). Para prevenir la formación de este subproducto, no se empleó el yodo como catalizador.<sup>196</sup>



**Esquema 37.** Apertura del anillo de anhidrouridina mediante mecanismo S<sub>N</sub>2 utilizando metanol como nucleófilo.

Para asegurar que el Mg(OMe)<sub>2</sub> se generaba *in situ*, se añadió magnesio al metanol y se agitó vigorosamente a 30 °C durante 40-45 min, hasta que no se observa la liberación de hidrógeno gas. Posteriormente, se agregó la anhidrouridina **61** y la reacción se agita a reflujo durante 5 h (Esquema 37). En estas condiciones, se obtuvo la 2'-*O*-metil-L-uridina (**62**) con un rendimiento del 85%.

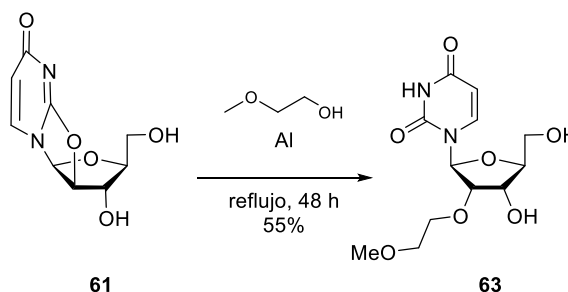
### 1.3. Síntesis de 2'-*O*-metoxietil-L-uridina

Siguiendo un procedimiento similar al descrito en el apartado anterior, se utilizó 2-metoxietanol en lugar de metanol. Sin embargo, no se logró generar el derivado 2'-*O*-MOE **63**. La síntesis de este compuesto se realizó

<sup>195</sup> M. Szlenkier, K. Kamel, J. Boryski, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2006**, *35*, 410-425.

<sup>196</sup> Roy, S. K.; Tang, J. *Org. Process Res. Dev.* **2000**, *4*, 170-171.

mediante la adición de la anhidrouridina **61** a una mezcla de 2-metoxietanol y aluminio, previamente calentada a reflujo durante 2 h, de acuerdo con las condiciones descritas por Legorburu *et al.*<sup>197</sup> (Esquema 38). Después de 48 h, se aisló la 2'-O-MOE-L-uridina (**63**) con un rendimiento del 55%.



**Esquema 38.** Apertura del anillo de anhidrouridina mediante un mecanismo  $S_N2$  utilizando 2-metoxietanol como nucleófilo.

## 2. Síntesis de soportes sólidos funcionalizados con monómeros de 2'-O-metil/2'-O-MOE-L-uridina

Una vez sintetizados los L-nucleósidos de interés necesarios para la funcionalización de la resina de CPG para la síntesis de los oligonucleótidos ricos en guanina, fue necesario un paso previo consistente en la introducción de un grupo espaciador (succinilo) en la posición 3' del anillo de ribosa que permitirá el anclaje de los nucleósidos **62** y **63** a la resina nativa mediante la formación de un enlace de tipo amida entre el grupo amino libre de la resina y el carboxilo del succinato unido a la ribosa.

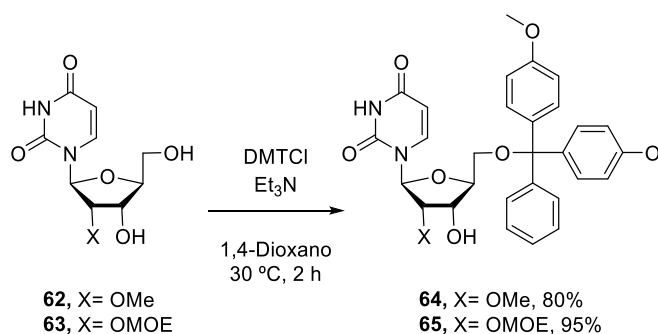
La preparación de un soporte sólido adecuado para ser utilizado en la síntesis automatizada de los oligonucleótidos requeridos se llevó a cabo en tres etapas. En la primera, se protegió el grupo hidroxilo de la posición 5' del nucleósido para evitar reacciones secundarias indeseadas en etapas sucesivas. Después, se procedió a introducir el grupo succinilo en la

<sup>197</sup> U. Legorburu, C. B Reese, Q. Song. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 5635-5640.

posición 3' y, finalmente, se funcionalizó la resina anclando el nucleósido de interés a la misma a través del espaciador de succinilo.

### 2.1. Protección de la posición 5' de los derivados de L-uridina con DMT

La protección del grupo hidroxilo primario de los compuestos **62** y **63** se llevó a cabo con DMTCl, en presencia de trietilamina, utilizando 1,4-dioxano como disolvente (Esquema 39). La reacción se agitó a 30 °C durante 2 h, dando lugar a los compuestos **64** y **65** con rendimientos del 80 y 95%, respectivamente.



Esquema 39. Síntesis de 5'-O-dimetoxitritil-L-nucleósidos 2'-modificados.

### 2.2. Acoplamiento del grupo succinilo en la posición 3' de los L-nucleósidos

En una segunda etapa, y previamente al anclaje de los nucleósidos a la resina, se hace indispensable la introducción del grupo succinilo en el grupo 3'-hidroxilo del anillo de ribosa. Este grupo servirá como nexo de unión y elemento espaciador entre el nucleósido y la resina. Este espaciador es necesario para que el nucleósido esté lo suficientemente separado de la superficie sólida de la resina, permitiendo así que las interacciones con reactivos y disolventes, durante el proceso sintético en fase sólida, sean más efectivas y evitando que los sitios de reacción se vean ocluidos o bloqueados por el soporte.

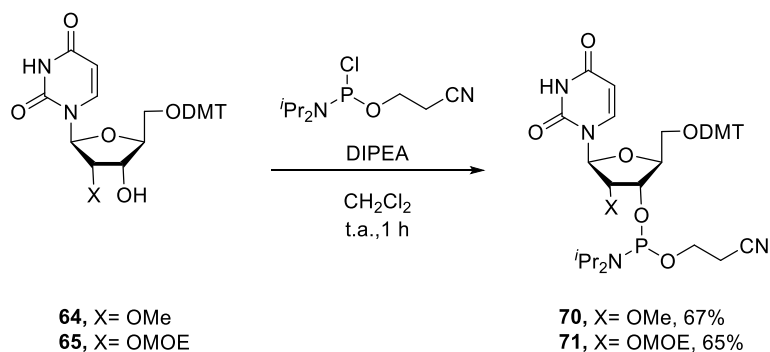


Para ello, los derivados nucleosídicos **66** y **67** se hicieron reaccionar a temperatura ambiente y durante 2 h con la resina de CPG nativa en presencia de trifenilfosfina y el agente de acoplamiento 2,2'-ditiobis(5-nitropiridina) (DTNP), utilizando DMAP como catalizador básico (Esquema 41).<sup>198</sup>

El resultado de la reacción entre el grupo funcional carboxilo del 3'-succinilo presente en los compuestos **66** y **67** con el grupo amino libre de la resina fue la formación de un enlace peptídico que permitió el anclaje de los L-nucleósidos a la resina nativa, conformando así el extremo 3' del oligonucleótido que se sintetizará, posteriormente, sobre estos soportes sólidos.

La carga inicial obtenida al final del proceso fue de 20 y 23  $\mu\text{mol/g}$  para los soportes **68** y **69**, respectivamente. Teniendo en cuenta que la carga inicial de la resina nativa era de 69  $\mu\text{mol/g}$ , podemos decir que el porcentaje de carga obtenido para los soportes **68** y **69** con respecto a la carga inicial de la resina nativa fue del 30 y 33%, respectivamente.

#### 2.4. Síntesis de fosforamiditos a partir de derivados L-nucleosídicos



Esquema 42. Síntesis de L-fosforamiditos a partir de derivados de L-uridina.

<sup>198</sup> A. P. Guzaev, R. T. Pon, *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* **2013**, 3.2.1-3.2.23.



La síntesis de fosforamiditos derivados de L-uridina 2'-sustituidos se llevó a cabo a partir de los correspondientes análogos protegidos con 5'-*O*-DMT (Esquema 42).

El tratamiento de los derivados de L-uridina **64** y **65** con 2-cianoetil-*N,N*-diisopropilclorofosforamidito en diclorometano a temperatura ambiente y en presencia de *N,N*-diisopropiletilamina durante 1 h condujo a la formación de los fosforamiditos **70** y **71** con un rendimiento del 67 y 65%, respectivamente.

Estos compuestos permitirían la inserción de un derivado de L-uridina bien en el extremo 5' o en una posición intermedia de una cadena de oligonucleótidos, pudiendo ser utilizados como bloques de construcción durante la síntesis en fase sólida mediante el método del fosforamidito.

### **3. Síntesis y caracterización de G-cuádruplexes funcionalizados en el extremo 3' con 2'-*O*-metil/2'-*O*-MOE-L-uridina**

#### **3.1. Síntesis en fase sólida de los oligonucleótidos TG<sub>4</sub>T, TG<sub>4</sub>U<sub>OMe</sub>, TG<sub>4</sub><sup>L</sup>U<sub>OMe</sub> y TG<sub>4</sub><sup>L</sup>U<sub>OMOE</sub>**

Para investigar la idoneidad y el efecto estabilizador de los L-nucleósidos en las estructuras de G-cuádruplexes, se seleccionaron una serie de secuencias cortas de una sola hebra basadas en la secuencia TGGGGT (TG<sub>4</sub>T), todas ellas con un componente elevado de guaninas, que les permite reagruparse y autoconformar una estructura no canónica del tipo G-cuádruplex paralelo, mediante un sencillo proceso de tratamiento térmico (*annealing*).

Este oligonucleótido junto con su derivado TG<sub>4</sub>U<sub>OMe</sub>, el cual se sintetizó sustituyendo la timidina de la posición 3' de la secuencia TG<sub>4</sub>T por U<sub>OMe</sub>, se utilizarán como controles de referencia a la hora de analizar los resultados de los ácidos nucleicos objeto de estudio TG<sub>4</sub><sup>L</sup>U<sub>OMe</sub> y TG<sub>4</sub><sup>L</sup>U<sub>OMOE</sub> en los diferentes ensayos a los que serán sometidos.

De esta manera, se estudiará, por comparación, si la presencia de derivados de L-nucleósidos afecta a la estabilidad del G-cuádruplex, o si su comportamiento ante la degradación por nucleasas ofrece mayor resistencia a la observada en los controles.

Con este fin, se sintetizaron los oligonucleótidos cuyas secuencias se recogen en la Tabla 21.

**Tabla 21.** Secuencias de oligonucleótidos y datos de cuantificación obtenidos por espectroscopía UV. Estos valores corresponden a la mitad del *stock* total de oligonucleótidos sintetizado, por tanto, la cantidad total real es el doble de la indicada.

Código	Secuencias (5' → 3')	OD	µg/mL	µmol/mL
TG <sub>4</sub> T	TGGGGT	15.8	521.4	0.28
TG <sub>4</sub> U <sub>OMe</sub>	TGGGGU <sub>OMe</sub>	7.2	237.6	0.13
TG <sub>4</sub> <sup>L</sup> U <sub>OMe</sub>	TGGGG <sup>L</sup> U <sub>OMe</sub>	14.4	475.2	0.25
TG <sub>4</sub> <sup>L</sup> U <sub>OMOE</sub>	TGGGG <sup>L</sup> U <sub>OMOE</sub>	21.2	699.6	0.36

Los oligonucleótidos objeto de estudio se caracterizan por contener un derivado L-nucleotídico en el extremo 3' y fueron sintetizados reemplazando la T del extremo 3' de la secuencia TG<sub>4</sub>T por los nucleósidos 2'-*O*-metil-L-uridina (**62**) y 2'-*O*-MOE-L-uridina (**63**) en dicha posición.

En total, se llevó a cabo la síntesis de manera automatizada de cuatro oligonucleótidos en escala de ~1 µmol (30-40 mg de resina) y en modo DMT-ON, usando un sintetizador de ADN que utilizó protocolos estándar de síntesis en fase sólida por el método del fosforamidito.<sup>199</sup>

Dos de ellos, los controles TG<sub>4</sub>T y TG<sub>4</sub>U<sub>OMe</sub>, fueron preparados a partir del correspondiente soporte sólido estándar comercial funcionalizado en 3' (CPG-dT y CPG-U<sub>OMe</sub>), mientras que para los otros dos, TG<sub>4</sub><sup>L</sup>U<sub>OMe</sub> y TG<sub>4</sub><sup>L</sup>U<sub>OMOE</sub>, se usaron los soportes descritos anteriormente en el apartado

<sup>199</sup> A. Ellington, J. D. Pollard. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **1998**, 42, 2-11.

1.2.3., previamente funcionalizados con 5'-*O*-DMT-3'-*O*-succ-2'-*O*-metil-L-uridina (**68**) y 5'-*O*-DMT-3'-*O*-succ-2'-*O*-MOE-L-uridina (**69**).

### **3.2. Procesado y cuantificación de TG<sub>4</sub>T, TG<sub>4</sub>U<sub>OMe</sub>, TG<sub>4</sub><sup>L</sup>U<sub>OMe</sub> y TG<sub>4</sub><sup>L</sup>U<sub>OMOE</sub>**

En el proceso post-sintético, todos los oligonucleótidos fueron purificados, cuantificados y caracterizados del mismo modo.

Primero se procedió a la destitilación manual de la posición 5' (DMT-OFF) con una disolución al 3% de ácido tricloroacético (TCA) en diclorometano, observándose la característica disolución de color naranja intenso propia de las disoluciones que contienen el catión tritilo.

En segundo lugar, se llevó a cabo la liberación de los oligonucleótidos de su soporte sólido (*cleavage*) utilizando una disolución de amoníaco concentrado en agua. Cabe destacar que sólo fue utilizada la mitad de la cantidad total de la resina, reservándose la otra mitad para posibles necesidades futuras.

Una vez separados los ácidos nucleicos de sus correspondientes soportes éstos fueron filtrados, desalados y purificados utilizando resinas de exclusión por tamaños, pues al tratarse de oligonucleótidos que habían sido liberados previamente de su grupo tritilo en 5' (DMT-OFF) la purificación con resinas de adsorción en fase reversa (OPC) se presentaba como una opción inviable.

Finalmente, se utilizó la espectroscopía de ultravioleta (UV) para cuantificar los diferentes lotes de oligonucleótidos obtenidos.

Aplicando esta aproximación a nuestros resultados y teniendo en cuenta el peso molecular de los oligonucleótidos estudiados podemos expresar la concentración de estos en unidades de OD, µg/mL o µmol/mL, tal como se muestra en la Tabla 21. Téngase en cuenta que estos resultados se corresponden solamente con la resina procesada tras el proceso de síntesis, que fue la mitad de la cantidad total. Por tanto, las concentraciones totales

obtenidas de oligonucleótido se corresponden con el doble de los valores reflejados en la tabla.

### 3.3. Caracterización de los oligonucleótidos TG<sub>4</sub>T, TG<sub>4</sub>U<sub>OMe</sub>, TG<sub>4</sub><sup>L</sup>U<sub>OMe</sub> y TG<sub>4</sub><sup>L</sup>U<sub>OMOE</sub>

El control de calidad de las secuencias sintetizadas se llevó a cabo mediante HPLC de fase reversa y espectrometría de masas (MALDI-TOF). Los datos obtenidos se muestran en la Tabla 22.

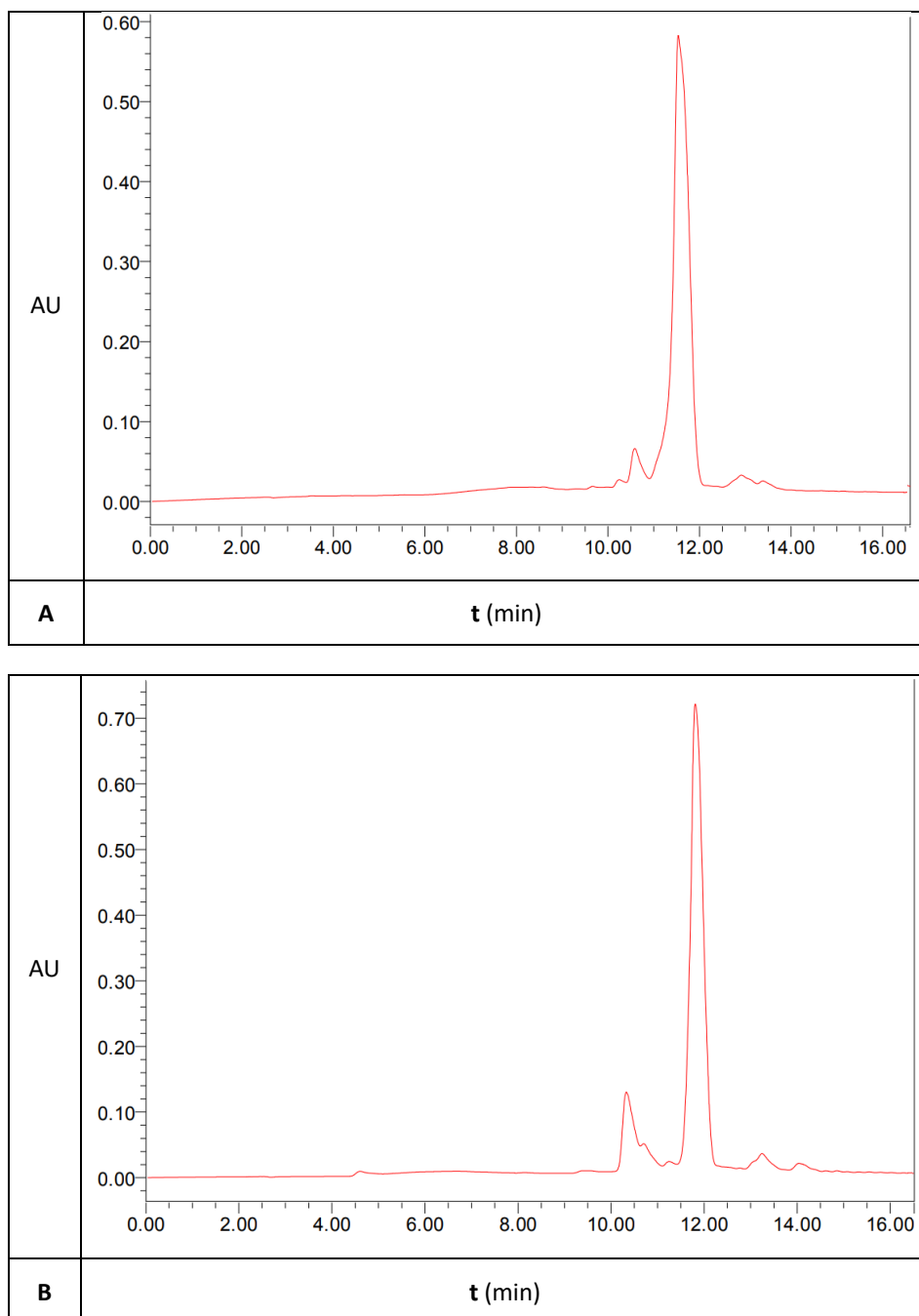
**Tabla 22.** Secuencias de oligonucleótidos y datos de caracterización.<sup>a</sup>

Código	Secuencias (5' → 3')	T <sub>m</sub> (°C) <sup>b</sup>	t <sub>R</sub> (min) <sup>c</sup>	MW (calc.)	MW (real)
TG <sub>4</sub> T	TGGGGT	67.1	11.53	1862	1861.2
TG <sub>4</sub> U <sub>OMe</sub>	TGGGGU <sub>OMe</sub>	71.3	11.81	1878	1875.7
TG <sub>4</sub> <sup>L</sup> U <sub>OMe</sub>	TGGGG <sup>L</sup> U <sub>OMe</sub>	65.8	12.65	1878	1878.4
TG <sub>4</sub> <sup>L</sup> U <sub>OMOE</sub>	TGGGG <sup>L</sup> U <sub>OMOE</sub>	60.3	11.85	1921	1919.6

<sup>a</sup>Medidos por curvas de desnaturalización, HPLC-RP (Figura 65) y MALDI-TOF (Figura 66). Los nucleósidos subrayados son nucleósidos de L-ARN. <sup>b</sup>Temperaturas de fusión medidas por CD en tampón de sodio de 10 mM (Figura 69). <sup>c</sup>Tiempos de retención obtenidos por HPLC de fase reversa.

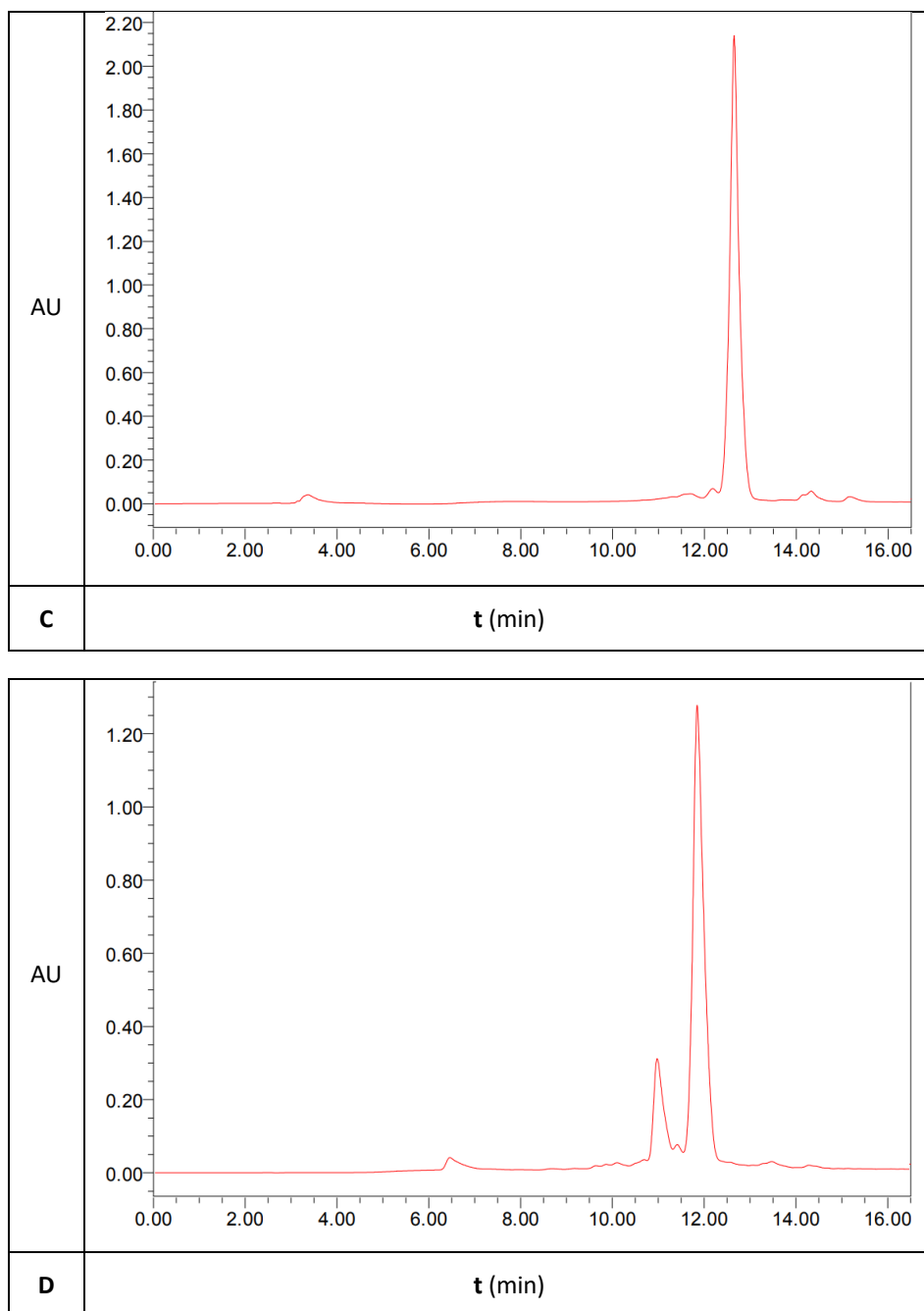
Como se ve en los cromatogramas de HPLC (Figura 65), los picos mayoritarios que corresponden a los oligonucleótidos de interés aparecen a tiempos muy similares, por lo que los tiempos de retención (t<sub>R</sub>) de los compuestos analizados están todos en torno a los doce minutos. Llama la atención que el t<sub>R</sub> observado para las secuencias TG<sub>4</sub>T y TG<sub>4</sub><sup>L</sup>U<sub>OMe</sub> se desvían ligeramente de este valor.

Por otro lado, los espectros de masas de MALDI-TOF (Figura 66) muestran picos moleculares (masa encontrada) muy similares con la masa esperada (calculada) con un error máximo de ±1 unidades, lo cual corrobora fehacientemente la correcta identidad de las secuencias analizadas.

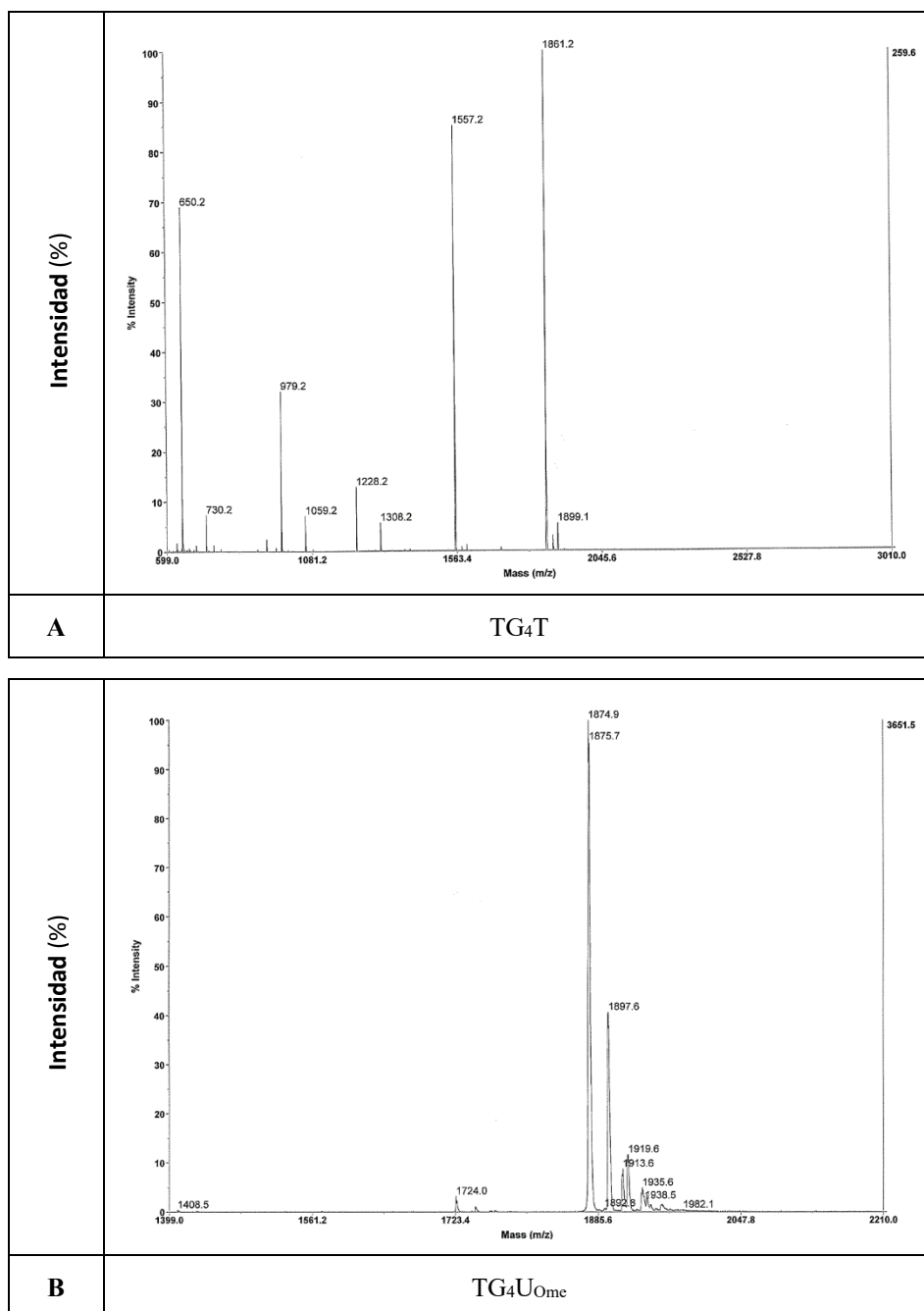


**Figura 65.** Espectros de HPLC en fase reversa obtenidos en la caracterización de los oligonucleótidos de las secuencias: (A) TG<sub>4</sub>T; (B) TG<sub>4</sub>U<sub>OMe</sub>; (C) TG<sub>4</sub><sup>L</sup>U<sub>OMe</sub>; (D) TG<sub>4</sub><sup>L</sup>U<sub>OMOE</sub>.

Resultados y discusión -----



**Figura 65 (cont.).** Espectros de HPLC en fase reversa obtenidos en la caracterización de los oligonucleótidos de las secuencias: (A) TG<sub>4</sub>T; (B) TG<sub>4</sub>U<sub>OMe</sub>; (C) TG<sub>4</sub><sup>L</sup>U<sub>OMe</sub>; (D) TG<sub>4</sub><sup>L</sup>U<sub>OMOE</sub>.



**Figura 66.** Espectros de caracterización MALDI-TOF de oligonucleótidos: (A) TG<sub>4</sub>T; (B) TG<sub>4</sub>U<sub>Ome</sub>; (C) TG<sub>4</sub><sup>L</sup>U<sub>Ome</sub>; (D) TG<sub>4</sub><sup>L</sup>U<sub>OMOE</sub>.

Resultados y discusión -----

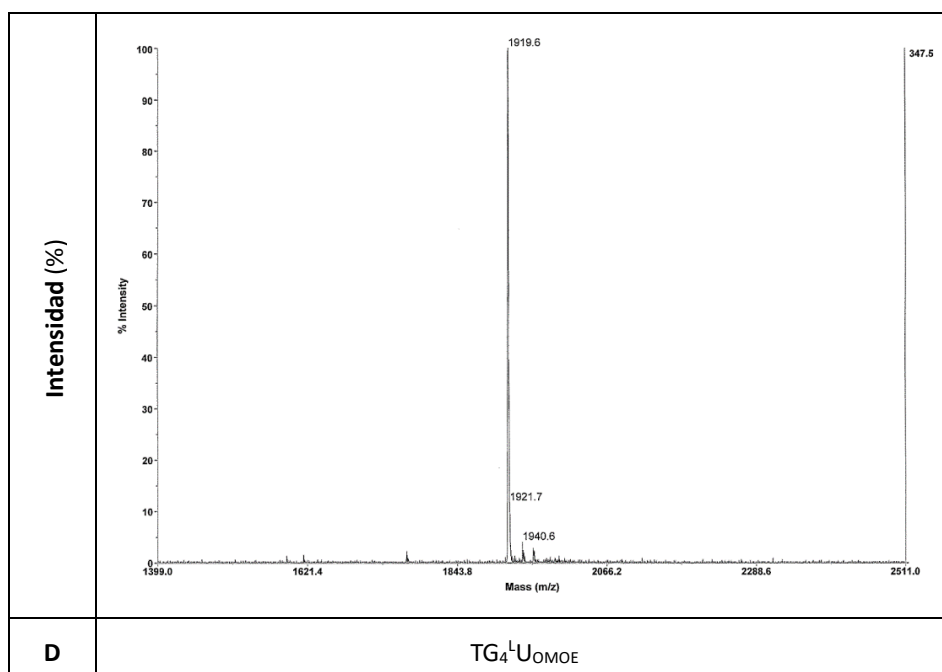
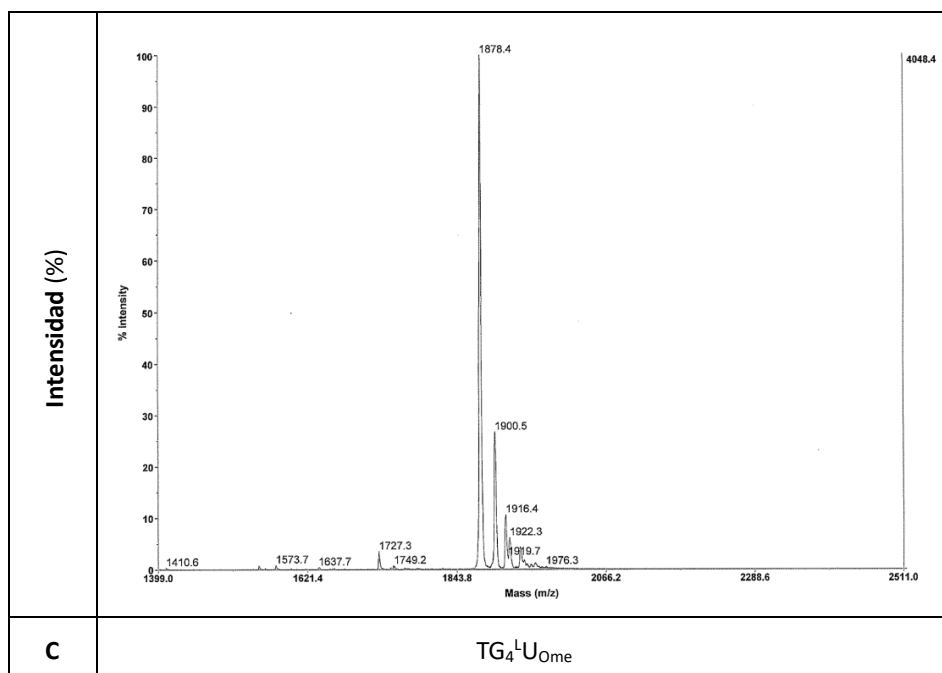


Figura 66 (cont.). Espectros de caracterización MALDI-TOF de oligonucleotidos: (A)  $TG_4T$ ; (B)  $TG_4U_{ome}$ ; (C)  $TG_4^L U_{ome}$ ; (D)  $TG_4^L U_{ome}$ .



### 3.4 Tratamiento térmico de los oligonucleótidos TG<sub>4</sub>T, TG<sub>4</sub>U<sub>OMe</sub>, TG<sub>4</sub><sup>L</sup>U<sub>OMe</sub> y TG<sub>4</sub><sup>L</sup>U<sub>OMOE</sub>

Una vez finalizada la síntesis y caracterización de los oligonucleótidos, el siguiente paso consistió en la formación de la estructura secundaria no canónica de G-cuádruplex, que se forma en las cadenas de ácidos nucleicos ricos en guanina.

Estas cadenas, tras un tratamiento denominado *annealing*, tienden a interaccionar de manera que las bases de guanina se reagrupan en una conformación espacial denominada tétrada. El apilamiento de estas tétradas dará lugar a la formación de estructuras de tipo cuádruplex.

El *annealing* es un tratamiento consistente en un calentamiento rápido del oligonucleótido, en el que queremos formar el cuádruplex, disuelto en un tampón salino a 90-95 °C durante un breve período de tiempo (5 min), seguido de un enfriamiento paulatino hasta alcanzar la temperatura ambiente. Tras este proceso, las hebras de los ácidos nucleicos se habrán agrupado conformando una estructura estable de cuádruplex.

La naturaleza del tampón salino utilizado como disolvente es un aspecto crucial a la hora de estudiar la estabilidad de las estructuras formadas, ya que las tétradas de guanina se formarán en torno a un catión central que les proporcionará una mayor o menor estabilidad dependiendo de factores como la carga o el tamaño de éste.

Diferentes estudios han demostrado que la estabilidad de la estructura G-cuádruplex depende en gran medida de la naturaleza y tipo de catión que ocupe la cavidad central de las tétradas. De este modo, en un estudio llevado a cabo por Venczel *et al.*, se observó el siguiente orden de iones que estabilizan la estructura: Sr<sup>2+</sup> > Ba<sup>2+</sup> > Ca<sup>2+</sup> > Mg<sup>2+</sup> y K<sup>+</sup> > Rb<sup>+</sup> > Na<sup>+</sup> > Li<sup>+</sup> = Cs<sup>+</sup>.<sup>200</sup>

Aunque los cationes monovalentes fisiológicamente más relevantes son el K<sup>+</sup> y el Na<sup>+</sup>, actualmente se sabe que los cationes monovalentes Rb<sup>+</sup>,

---

<sup>200</sup> E. A. Venczel, D. Sen. *Biochemistry* **1993**, 32, 6220-6228.

Cs<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y Tl<sup>+</sup>, y los cationes divalentes Sr<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup> y Pb<sup>2+</sup>, pueden promover las estructuras de G-cuádruplex en algunos oligonucleótidos específicos.<sup>201</sup>

En nuestro caso, los estudios fueron realizados sobre estructuras formadas en tampones con cationes Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup>.

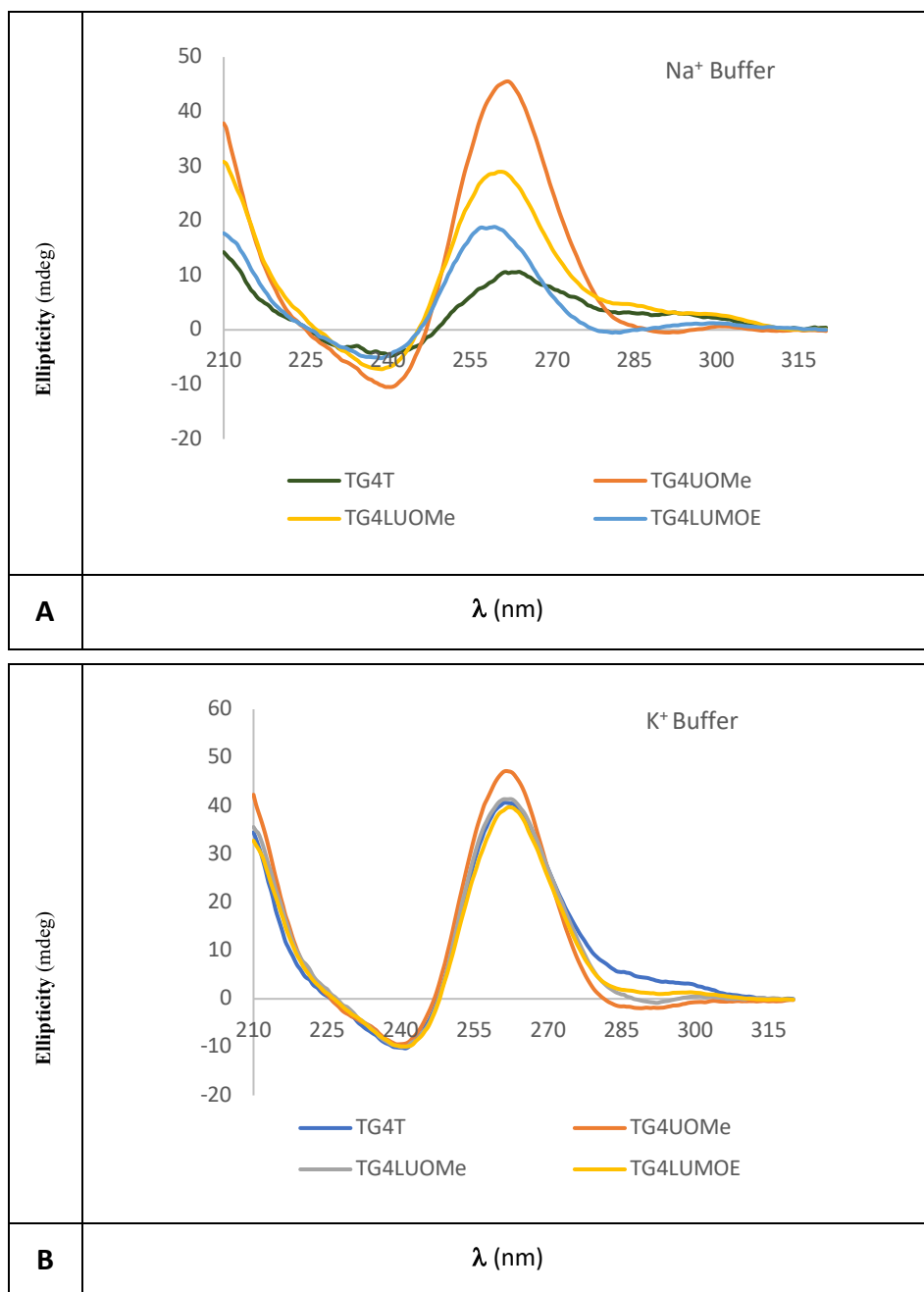
### 3.5. Formación y caracterización de estructuras G-cuádruplex

La formación de las estructuras G-cuádruplex que contienen el ribonucleósido de L-uridina fue corroborada mediante dicroísmo circular (DC).

Los espectros obtenidos de TG<sub>4</sub><sup>L</sup>U<sub>OMe</sub> y TG<sub>4</sub><sup>L</sup>U<sub>OMOE</sub> se muestran en la Figura 67. Como se puede observar, ambos compuestos muestran el perfil característico de esta conformación con una banda negativa a 238 nm y un máximo positivo a 265 nm, parámetros que son indicativos de una estructura tetramolecular G-cuádruplex de cadena paralela.

---

<sup>201</sup> D. Bhattacharyya, G. M. Arachchilage, S. Basu. *Front. Chem.* **2016**, *4*, 38.



**Figura 67.** Espectros de dicroísmo circular (DC) de los oligonucleótidos G-cuádruplex a una concentración de 3 μM; (A) en 100 mM NaCl, (B) en 10 mM KCl.

Por otro lado, se evaluó también, mediante el empleo de técnicas de dicroísmo circular, la estabilidad térmica de los oligonucleótidos  $TG_4^L U_{OMe}$  y  $TG_4^L U_{OMOE}$  (Figura 68).

En estos experimentos de temperatura de fusión, se utilizó un tampón de cloruro de sodio de 10 mM para obtener las curvas de desnaturalización que son representadas en la Figura 69.

Aunque en un principio, siguiendo los protocolos presentes en la bibliografía,<sup>202</sup> se planeó utilizar un tampón de Na 100 mM en agua, esta idea tuvo que ser descartada debido a que, a dicha concentración, las curvas de desnaturalización no se completaban al alcanzar una temperatura de 90 °C.

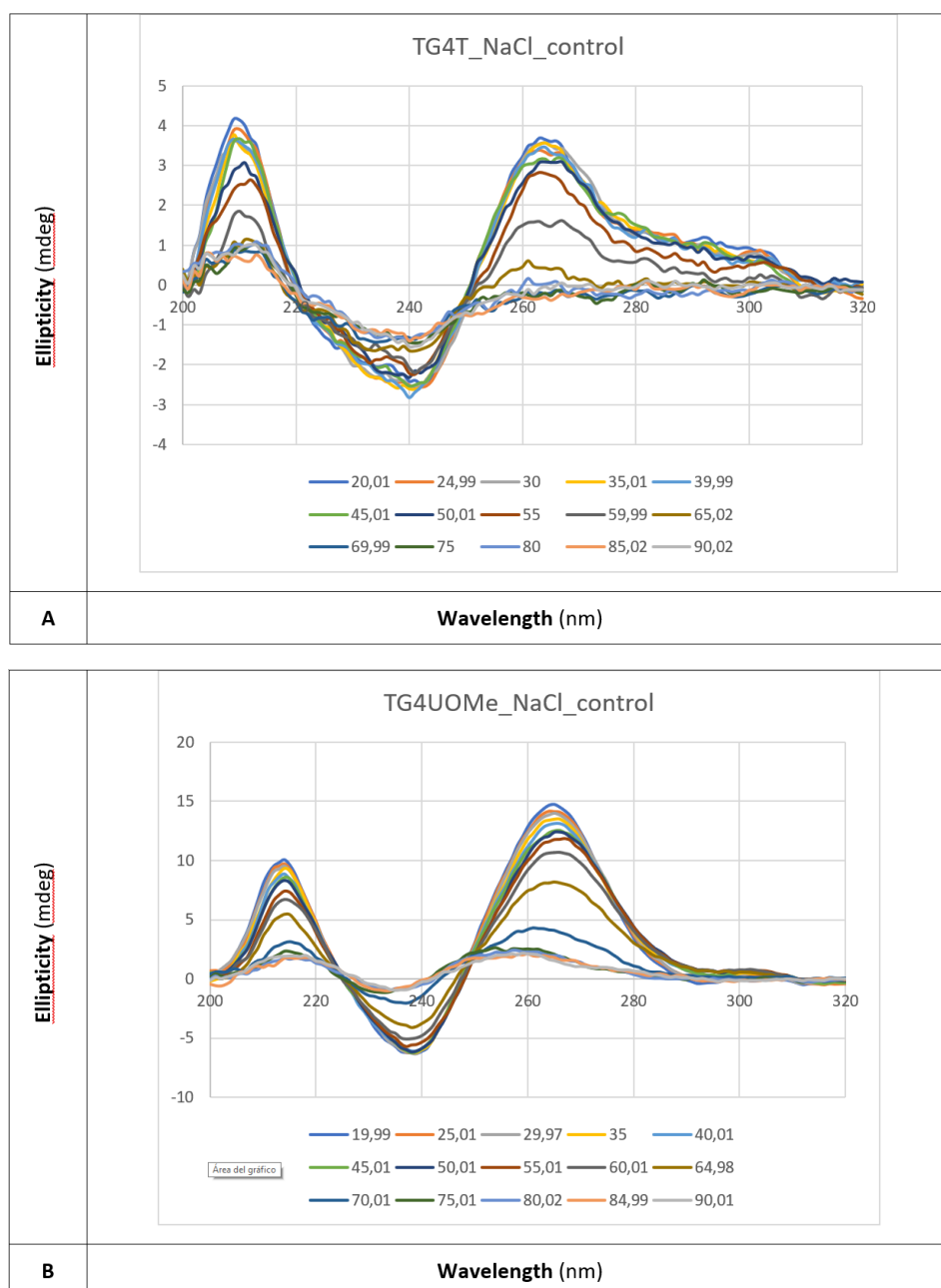
Por otro lado, con el tampón de potasio no se observó la desnaturalización del tetrámero cuádruplex como se describió anteriormente para  $TG_4T$ .<sup>202</sup>

Además, los perfiles sigmoidales del cambio en la elipticidad frente a la temperatura, a 265 nm de longitud de onda, permitieron hacer una estimación de su temperatura de fusión que se encontró entre valores de 65.8 °C ( $TG_4^L U_{OMe}$ ) y 60.3 °C ( $TG_4^L U_{OMOE}$ ), medidas en tampón de sodio de 10 mM (Figura 68).

Estos valores (reflejados en la Tabla 22) fueron ligeramente inferiores a los correspondientes valores de temperatura de fusión encontrados para las secuencias de control  $TG_4T$  (67.1 °C) y  $TG_4U_{OMe}$  (71.3 °C), tal como se muestra en la Figura 69.

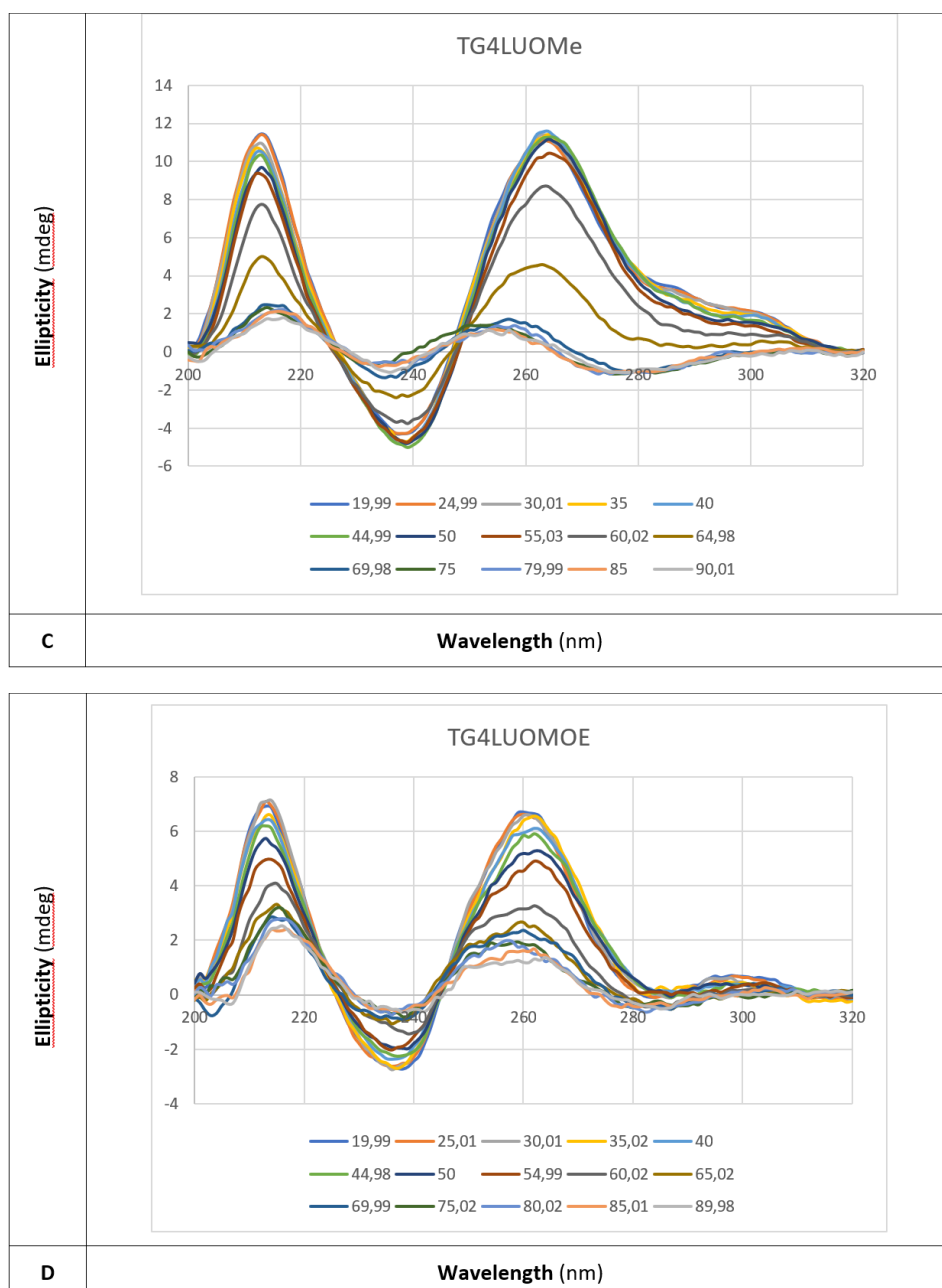
---

<sup>202</sup> R. Ferreira, M. Alvira, A. Aviñó, I. Gómez-Pinto, C. González, V. Gabelica, R. Eritja. *ChemistryOpen*, **2012**, *1*, 106-114.

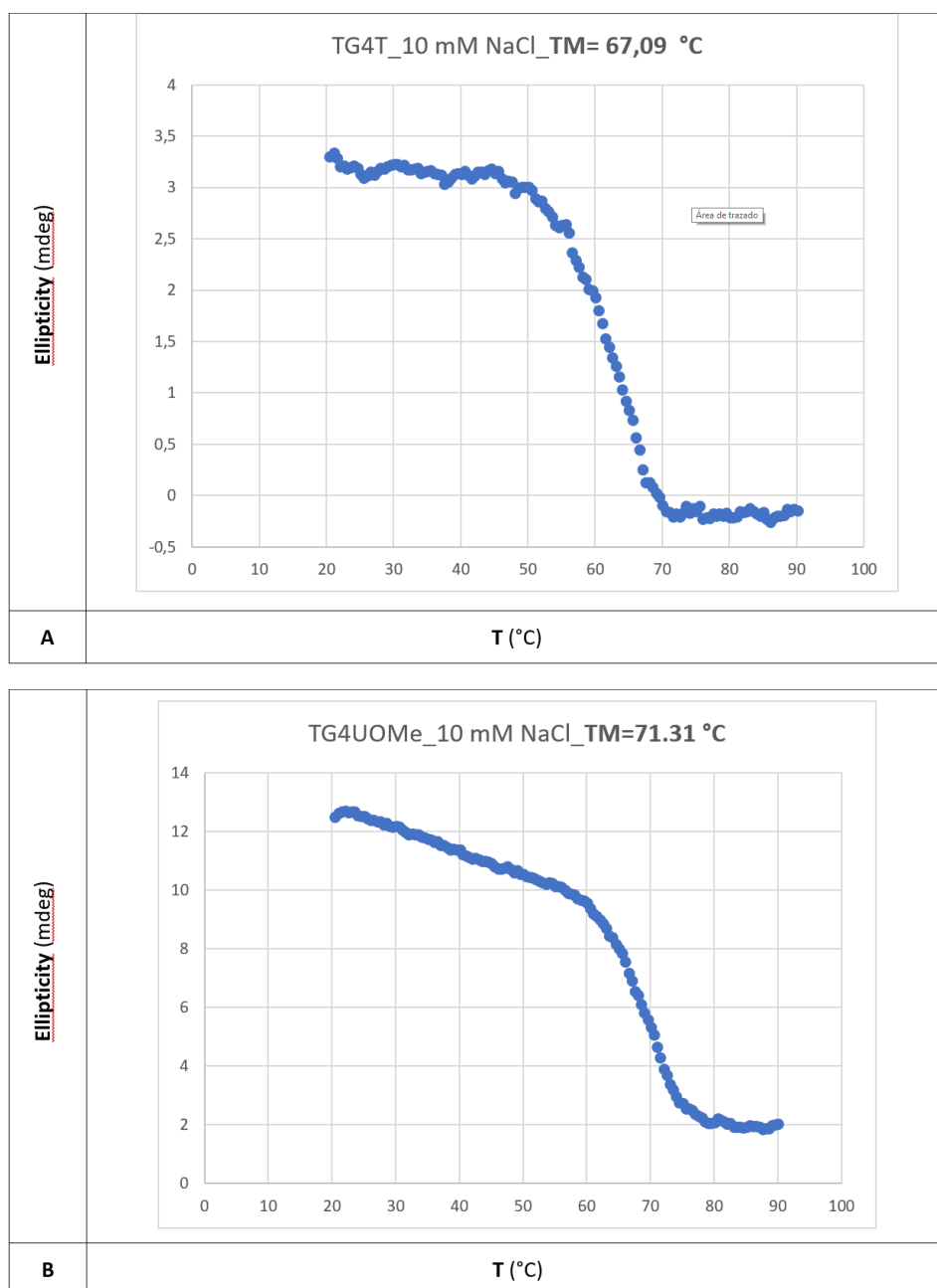


**Figura 68.** Espectros de dicroísmo circular. Las muestras fueron sometidas a calentamiento superior a 90 °C en tampón 10 mM de NaCl en agua. (A) TG<sub>4</sub>T; (B) TG<sub>4</sub>UOMe; (C) TG<sub>4</sub><sup>L</sup>UOMe; (D) TG<sub>4</sub><sup>L</sup>UOMOE.

Resultados y discusión -----

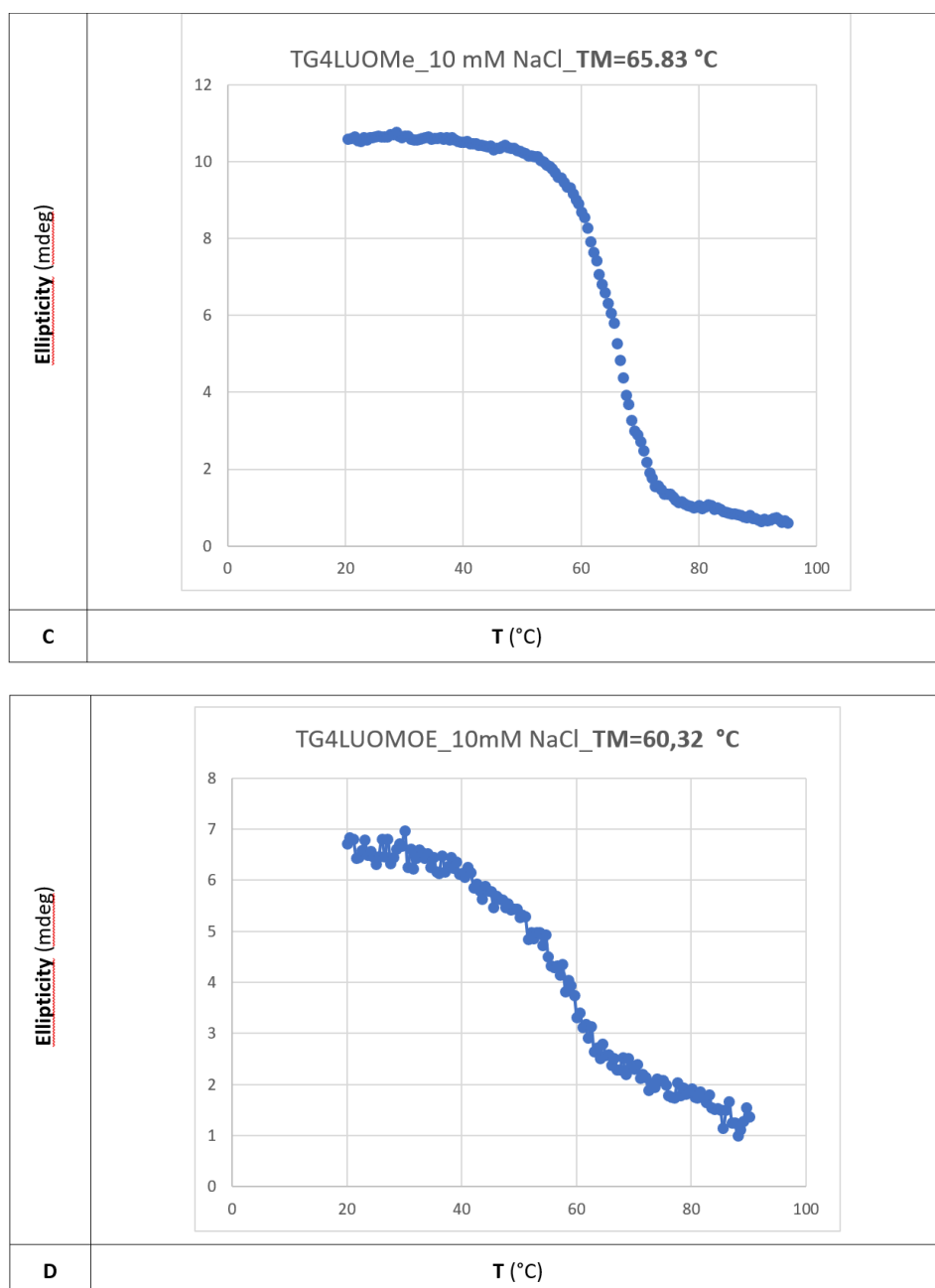


**Figura 68 (cont.).** Espectros de dicroísmo circular. Las muestras fueron sometidas a calentamiento superior a 90 °C en tampón 10 mM de NaCl en agua. (A) TG<sub>4</sub>T; (B) TG<sub>4</sub>U<sub>OMe</sub>; (C) TG<sub>4</sub><sup>L</sup>U<sub>OMe</sub>; (D) TG<sub>4</sub><sup>L</sup>U<sub>OMOE</sub>.



**Figura 69.** Curvas de desnaturalización térmica seguidas por dicroísmo circular: (A) TG<sub>4</sub>T; (B) TG<sub>4</sub>UOMe; (C) TG<sub>4</sub><sup>L</sup>UOMe; (D) TG<sub>4</sub><sup>L</sup>UOMOE.

Resultados y discusión -----



**Figura 69 (cont.).** Curvas de desnaturalización térmica seguidas por dicroísmo circular: (A) TG<sub>4</sub>T; (B) TG<sub>4</sub>U<sub>OMe</sub>; (C) TG<sub>4</sub><sup>L</sup>U<sub>OMe</sub>; (D) TG<sub>4</sub><sup>L</sup>U<sub>OMOE</sub>.



La formación de G-cuádruplexes de derivados de L-uridina se confirmó también mediante electroforesis en gel de poliacrilamida nativa al 20% (PAGE). Ésta es una técnica fundamental utilizada para separar oligonucleótidos y otras macromoléculas por su movilidad electroforética. Los geles de poliacrilamida se forman mediante la polimerización de monómeros de acrilamida y moléculas reticulantes de bis-acrilamida. Juntas, la acrilamida y la bis-acrilamida forman poros a través de los cuales pueden migrar las moléculas en estudio. Por tanto, el tamaño y volumen de la molécula serán factores cruciales para que, durante el proceso de migración a lo largo del gel, unas queden más retenidas que otras. De esta forma, el gel consigue separar los ácidos nucleicos por su tamaño. Cuanto mayor sean éstos mayor dificultad tendrán para atravesar un determinado tamaño de poro y, por tanto, permanecerán más retenidos en el gel.

En el caso que nos ocupa, los oligonucleótidos ricos en G, al formar estructuras de tipo G-cuádruplex, son más voluminosos que los ácidos nucleicos que no adquieren esta conformación y ofrecerán mayor resistencia al atravesar la estructura reticulada del gel de poliacrilamida que las moléculas que no formen esta estructura.

Por ello, cabría esperar que, tras correr y revelar el gel, las bandas correspondientes a las estructuras de G-cuádruplex aparezcan más retenidas que las moléculas que no adquieren dicha conformación.

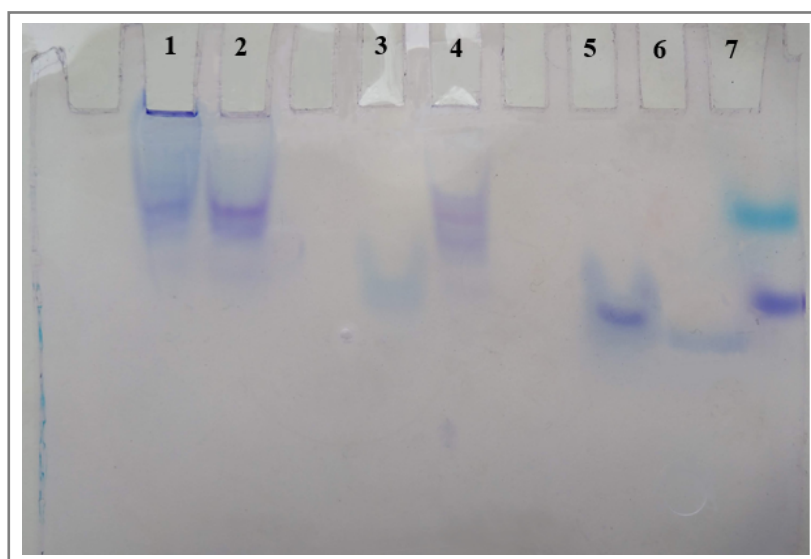
En la práctica, el ensayo se llevó a cabo utilizando las secuencias TG<sub>4</sub>T y T<sub>6</sub> como controles de referencia y, como tampón, una disolución 10 mM de Tris-Borato-EDTA (TBE) que, a su vez, contenía una disolución 100 mM de KCl.

En un principio, el experimento fue diseñado para realizarse a temperatura ambiente, pero, tras varios intentos, los resultados fueron fallidos. En estas condiciones, las bandas corrían demasiado y los geles obtenidos mostraban bandas muy igualadas y cercanas a la base del gel en todas las muestras estudiadas.

## Resultados y discusión -----

Finalmente, se decidió realizar el experimento electroforético bajando la temperatura de la cubeta a 4 °C durante todo el proceso (2-3 h).

Bajo estas condiciones se logró obtener un gel donde los resultados obtenidos se reflejan en la Figura 70.



**Figura 70.** PAGE nativo al 20% en buffer de TBE 1X complementado con 100 mM KCl y utilizando el mismo buffer durante el desplazamiento a 100 W y 4 °C durante 2-3 h; teñido con Stains-All. Secuencias: (1) 5'-TG<sub>4</sub><sup>L</sup>U<sub>OMOE</sub>-3'; (2) 5'-TG<sub>4</sub><sup>L</sup>U<sub>OMe</sub>-3'; (3) 5'-TG<sub>4</sub>T-3'; (4) 5'-TG<sub>4</sub>U<sub>OMe</sub>-3'; (5) y (6) T<sub>6</sub>; (7) Colorante (Azul de bromofenol + Cianol de xileno).

Como puede apreciarse, las estructuras ricas en guanina con L-uridina en la posición 3' (pocillos 1 y 2) mostraron una banda principal con movilidad reducida, comparable a la mostrada por la estructura TG<sub>4</sub>U<sub>OMe</sub> (pocillo 4), pero un poco más retardada que la banda correspondiente a TG<sub>4</sub>T (pocillo 3). Esto se explicaría porque, aunque todas estas secuencias ricas en guanina tienen una estructura de cuádruplex, las secuencias modificadas en 3' con los grupos 2'-metoxi (OMe) y 2'-metoxietilo (OMOE) serían de mayor tamaño y, por tanto, tendrían una movilidad de desplazamiento electroforético menor.

En todos los casos, la movilidad de las secuencias ricas en G fue diferente de la movilidad de la secuencia T<sub>6</sub>, que se desplazó a mayor velocidad.

Estos datos serían consistentes con los resultados obtenidos en los experimentos de CD, que confirman la formación de una estructura paralela de G-cuádruplex que no se ve afectada por la sustitución del ribonucleósido de timina terminal en posición 3' por un ribonucleósido de L-uridina modificado en 2'. Además, la presencia de diferentes sustituyentes en la posición 2' de la ribosa no impidió la formación de la estructura paralela tetramérica.

#### **4. Estudio de la estabilidad frente a nucleasas de G-cuádruplexes funcionalizados con 2'-O-metil/2'-O-MOE-L-uridina en el extremo 3'**

La estabilidad de las estructuras G-cuádruplex es uno de los elementos clave para su uso potencial en aplicaciones terapéuticas. Uno de los principales inconvenientes que suelen sufrir los oligonucleótidos y que es un factor limitante a la hora de su empleo como agentes terapéuticos es su baja resistencia a la escisión por nucleasas. Los oligonucleótidos naturales se degradan fácilmente por este tipo de enzimas que son abundantes en toda clase de células.

Para comprobar la estabilidad y la resistencia a las nucleasas de estos oligonucleótidos modificados con L-nucleósidos, se llevaron a cabo una serie de ensayos de degradación con la exonucleasa fosfodiesterasa I (veneno de serpiente, SVP), que rompe los oligonucleótidos a partir del extremo 3' libre.

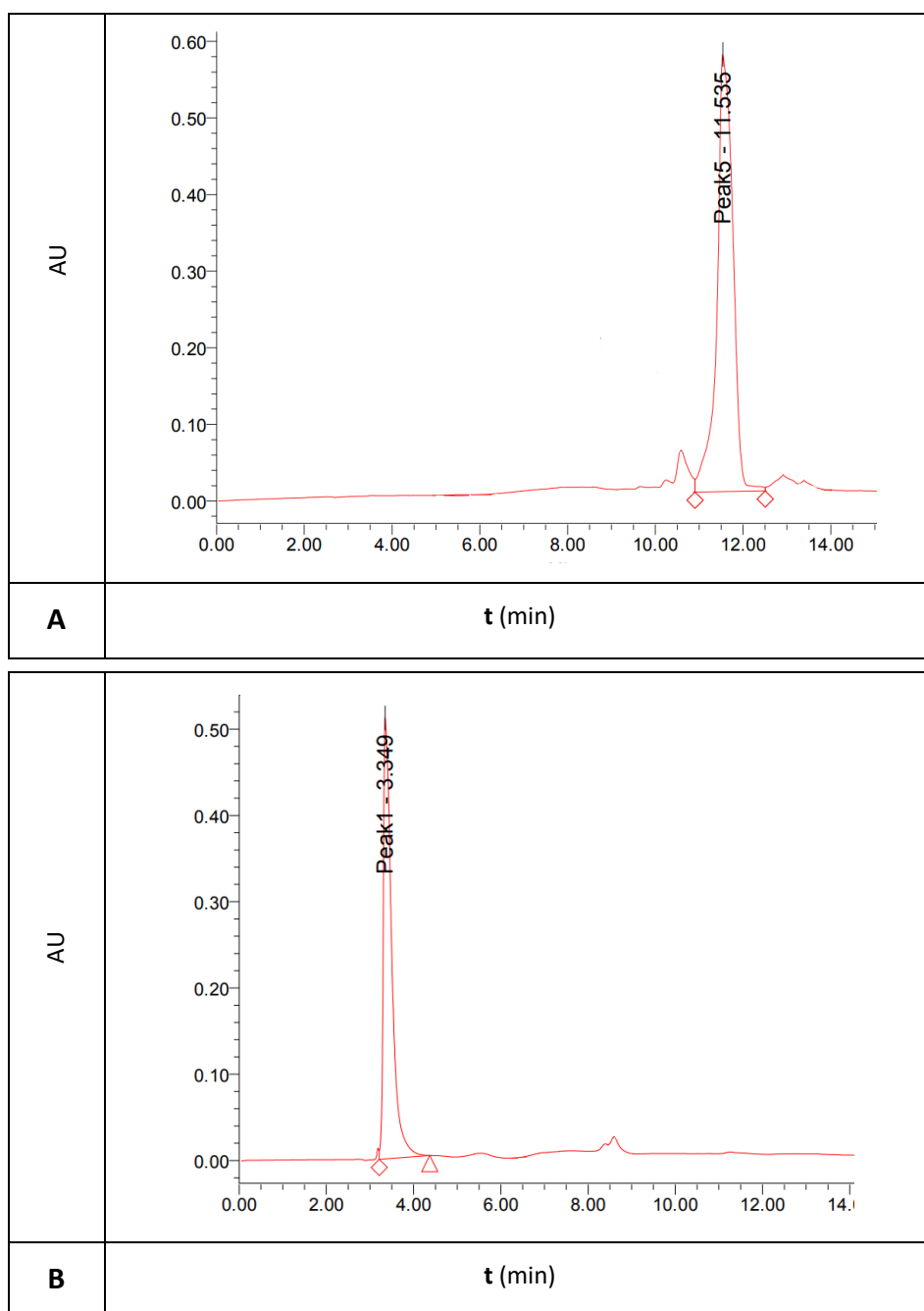
Este enfoque, a primera vista, podría parecer un poco pobre, pues lo ideal sería realizar una evaluación más precisa incluyendo el uso de suero bovino fetal (fosfodiesterasa II, BSP), pero la gran cantidad de compuestos presentes en el suero hacían inviable su análisis analítico mediante técnicas de HPLC y requerirían el uso de técnicas electroforéticas, las cuales presentaban ciertos problemas técnicos intrínsecamente relacionados con

la difusión de las muestras fuera y dentro del gel durante los protocolos de tinción debido al pequeño tamaño de los oligonucleótidos a estudiar (6-mer). Por otra parte, tampoco fue viable el uso de colorantes intercalantes como Syber-Green, ya que la muestra control T<sub>6</sub> al no formar cuádruplex no puede ser teñida con este tipo de tintes.

Para estudiar el efecto del enzima sobre los diferentes oligonucleótidos modificados con derivados de L-nucleósidos, se llevó a cabo una incubación de 20 µL de 1 OD de cada muestra con el enzima fosfodiesterasa en un tampón de TRIS y MgCl<sub>2</sub> en agua, a una temperatura de 37 °C y utilizando un agitador térmico. Los períodos de incubación se hicieron durante determinados intervalos de tiempo: 30 min, 1 h, 4 h, 8 h y 24 h.

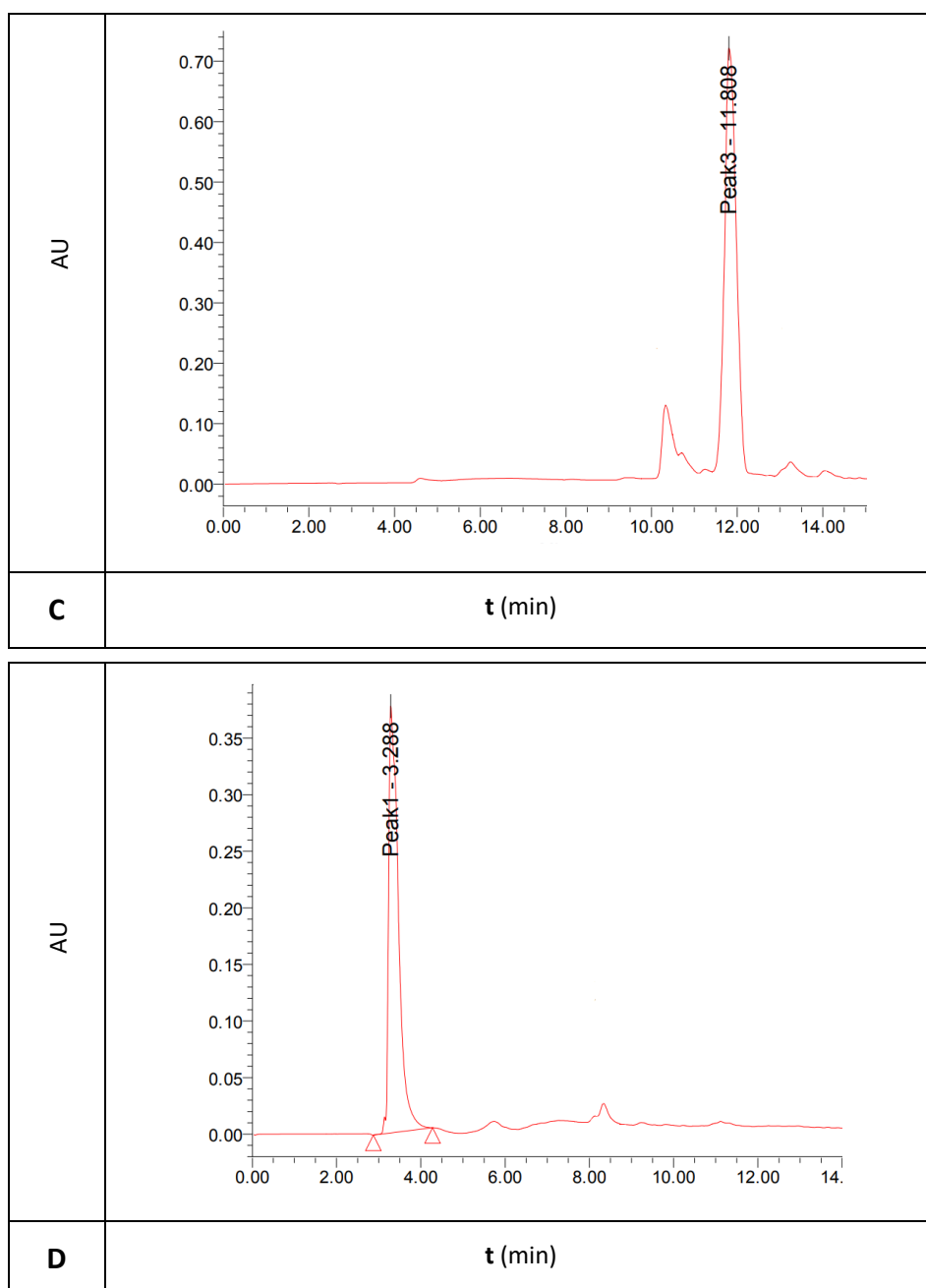
Tras el período de incubación correspondiente, las muestras fueron sometidas a un calentamiento brusco (85 °C) durante 5 minutos para desnaturalizar el enzima y detener así la reacción de degradación. Adicionalmente, las muestras de los controles TG<sub>4</sub>T y TG<sub>4</sub>U<sub>OMe</sub> también fueron incubadas en intervalos de 5, 10, 15 y 20 minutos, ya que tras 30 minutos de incubación estas muestras se encontraban totalmente degradadas. Tras la desnaturalización del enzima, las muestras se analizaron por HPLC en fase reversa tomando como referencia muestras de oligonucleótidos incubadas en las mismas condiciones que las anteriores, pero en ausencia del enzima.

Los espectros de HPLC de las muestras de control TG<sub>4</sub>T y TG<sub>4</sub>U<sub>OMe</sub> muestran un pico principal que eluye en torno a 12 min, en ambos casos, cuando no fueron tratadas con la exonucleasa (Figura 71A y 71C). Después del tratamiento con el enzima durante 30 min, se observa que esta señal ha desaparecido, dando lugar a otro pico con menor tiempo de retención (alrededor de 3 min) y que se correspondería con el derivado monofosfato, el cual eluye muy rápido y aparece al comienzo del cromatograma (Figura 71B y 71D). Como se observa en la Tabla 3, tras 20 min ambos oligonucleótidos están totalmente degradados.



**Figura 71.** Señales de las muestras control TG<sub>4</sub>T (B) y TG<sub>4</sub>U<sub>OMe</sub> (D) tras incubación con fosfodiesterasa I durante 30 min. Las figuras (A) y (C) corresponden a la señal de las muestras incubadas en ausencia de enzima. Tras este tiempo ambas muestras fueron completamente degradadas.

Resultados y discusión -----



**Figura 71 (cont.).** Señales de las muestras control TG<sub>4</sub>T (B) y TG<sub>4</sub>UOM<sub>e</sub> (D) tras incubación con fosfodiesterasa I durante 30 min. Las figuras (A) y (C) corresponden a la señal de las muestras incubadas en ausencia de enzima. Tras este tiempo ambas muestras fueron completamente degradadas.

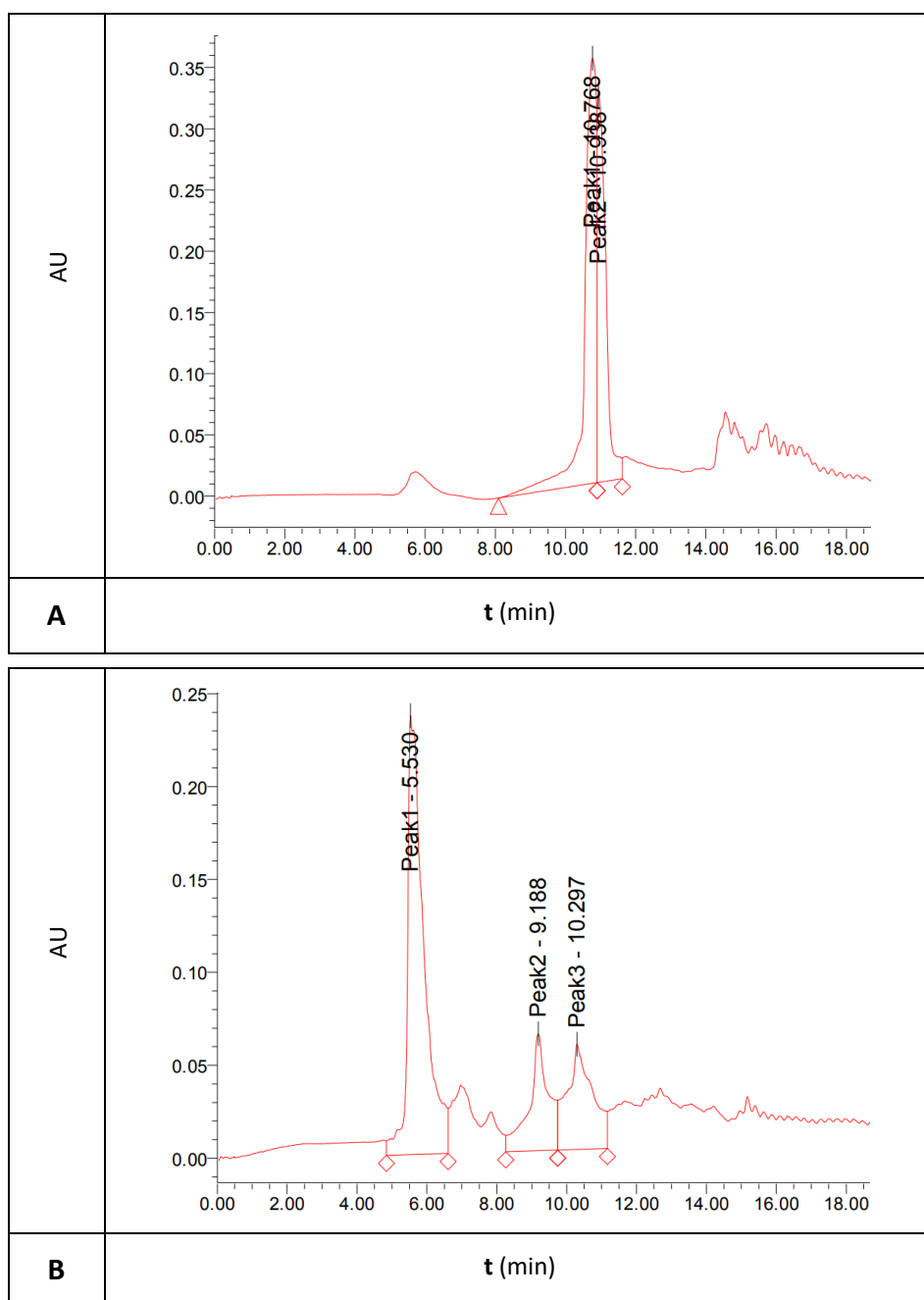
En cambio, para las muestras con derivados L-nucleotídicos en posición 3' (Figura 72), tras 24 h de incubación enzimática, todavía se observaron picos del oligonucleótido inicial correspondientes a fragmentos que no habían sido aún degradados por el enzima. Tras 24 h de reacción con la fosfodiesterasa, estos ácidos nucleicos no se habrían degradado de forma completa (Tabla 23), mostrando un mejor comportamiento ante la resistencia a la nucleasa en comparación con los G-cuádruplexes no modificados.

**Tabla 23.** Resistencia a la degradación enzimática por exonucleasas de G-cuádruplexes a intervalos de tiempo tras ser sometidos a incubación con el enzima fosfodiesterasa I.

Código	Degradación (%)									
	5 min	10 min	15 min	20 min	30 min	1 h	4 h	8 h	24 h	
TG <sub>4</sub> T	45	52	72	100	100	-	-	-	-	
TG <sub>4</sub> U <sub>OMe</sub>	50	56	78	100	100	-	-	-	-	
TG <sub>4</sub> <sup>L</sup> U <sub>OMe</sub>	-	-	-	-	0	0	57	85	90	
TG <sub>4</sub> <sup>L</sup> U <sub>OMOE</sub>	-	-	-	-	15	17	51	67	70	

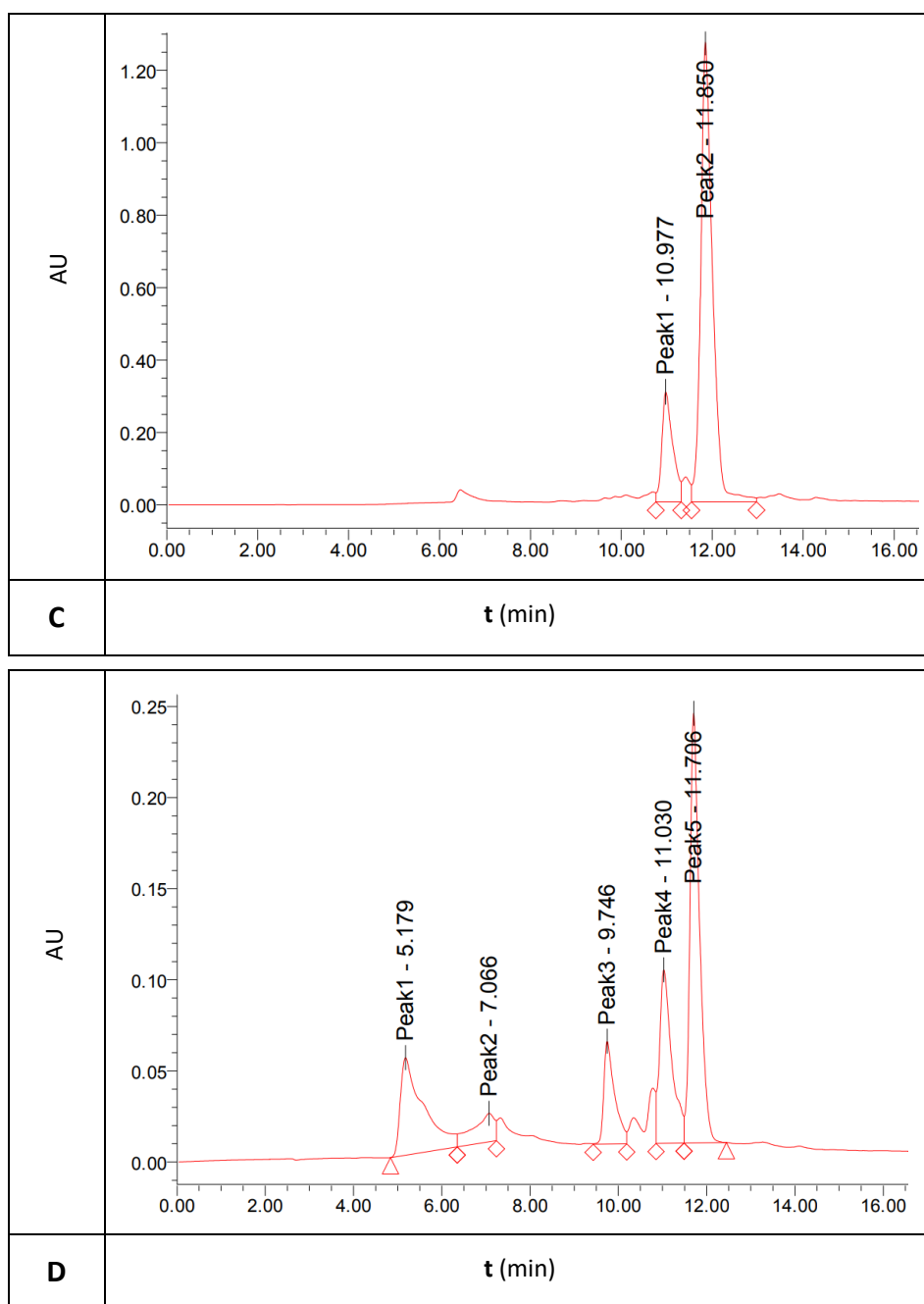
En la Figura 73 se representan los datos correspondientes a la degradación de los G-cuádruplexes tras incubación con fosfodiesterasa I.

Resultados y discusión -----

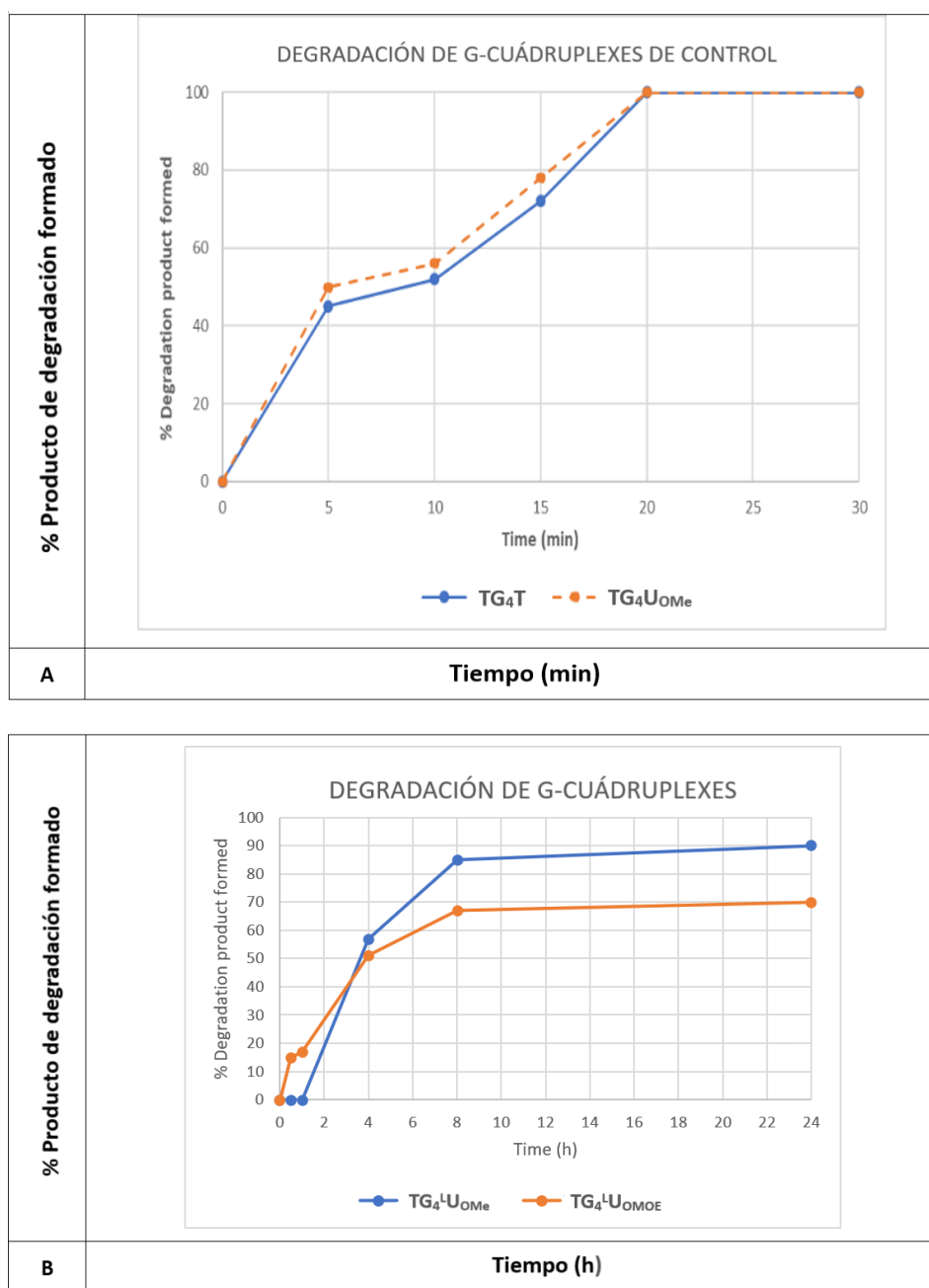


**Figura 72.** Señales de las muestras TG<sub>4</sub><sup>L</sup>U<sub>OMe</sub> (B) y TG<sub>4</sub><sup>L</sup>U<sub>MOE</sub> (D) tras incubación con fosfodiesterasa I durante 24 h. Tras este tiempo ambas muestras no fueron completamente degradadas. Las figuras (A) y (C) corresponden a la señal de las muestras incubadas en ausencia de enzima.





**Figura 72 (cont.).** Señales de las muestras TG<sub>4</sub><sup>L</sup>U<sub>OMε</sub> (B) y TG<sub>4</sub><sup>L</sup>U<sub>MOE</sub> (D) tras incubación con fosfodiesterasa I durante 24 h. Tras este tiempo ambas muestras no fueron completamente degradadas. Las figuras (A) y (C) corresponden a la señal de las muestras incubadas en ausencia de enzima.



**Figura 73.** Degradación de los G-cuádruplexes tras incubación con fosfodiesterasa I: (A) Controles TG<sub>4</sub>T y TG<sub>4</sub>U<sub>OMe</sub>; (B) TG<sub>4</sub><sup>L</sup>U<sub>OMe</sub> y TG<sub>4</sub><sup>L</sup>U<sub>OMOE</sub>.

## **Conclusiones**



En este capítulo, se ha descrito la síntesis de derivados de L-uridina-2'-sustituidos con grupos -OMe y -OMOE mediante una ruta sintética que implica la formación de *O*<sup>2'-2'</sup>-anhidro-L-uridina, sintetizada a partir de L-arabinosa, y la posterior apertura del anillo con diferentes agentes nucleofílicos.

Un aspecto clave en la aplicación terapéutica de oligonucleótidos es incrementar la resistencia a las nucleasas. Con este objetivo, se llevó a cabo con éxito la carga de los monómeros 2'-*O*-Me- y 2'-*O*-MOE-L-uridina en un soporte sólido convencional en la síntesis automatizada en fase sólida. Posteriormente, se sintetizaron y caracterizaron oligonucleótidos ricos en guanina de tipo G-cuádruplex funcionalizados en el extremo 3' con ribonucleótidos derivados de L-uridina.

Además, se analizaron sus características estructurales y propiedades de resistencia a las nucleasas en comparación con el oligonucleótido control no modificado TG<sub>4</sub>T.

Los resultados obtenidos por técnicas de dicroísmo circular y análisis electroforético en gel de poliacrilamida sugirieron que ambos oligonucleótidos, TG<sub>4</sub><sup>L</sup>U<sub>OMe</sub> y TG<sub>4</sub><sup>L</sup>U<sub>OMOE</sub>, mantienen la estructura paralela de G-cuádruplex de manera similar a TG<sub>4</sub>T, lo que indica que la sustitución del extremo 3' T por diferentes ribonucleótidos de L-uridina no afecta a la topología de la estructura G<sub>4</sub>.

Los ensayos de estabilidad frente a las nucleasas indicaron que la incorporación de ribonucleótidos de L-uridina en el extremo 3' ofrece una mayor resistencia a la degradación enzimática, aumentando significativamente la estabilidad paralela del G-cuádruplex en medios fisiológicos y con un impacto mínimo en las propiedades estructurales del ácido nucleico.

Las potenciales aplicaciones de estos nuevos monómeros incluyen la incorporación de estos compuestos en los extremos salientes 3'- de siRNAs y la estabilización de aptámeros u otros oligonucleótidos terapéuticos.



**Parte experimental**





### **1. Condiciones de trabajo, disolventes y reactivos**

Los reactivos y métodos generales han sido detallados en la Parte experimental del capítulo anterior.

Los oligonucleótidos enumerados en la Tabla 1 se sintetizaron de manera automatizada mediante química en fase sólida de 2-cianoetilfosforamiditos a escala de 1-2  $\mu\text{mol}$  y utilizando protocolos estándar.<sup>127</sup> Después del tratamiento con amoníaco ( $\text{NH}_3$  conc. aq. a 55 °C, durante la noche), los oligonucleótidos se desalaron usando columnas de tamiz molecular rellenas de Sephadex G-25 (NAP-10 o NAP-5) proporcionadas por la empresa GE Healthcare (Little Chalfont, Reino Unido).

### **2. Instrumentación**

Las técnicas instrumentales utilizadas en la realización de este capítulo han sido detalladas en el capítulo anterior, con las siguientes excepciones:

Los espectros de RMN se midieron en un espectrómetro Varian Mercury-400 ( $^{31}\text{P}$  121.5 MHz).

Los espectros de masas de alta resolución (HRMS) se registraron en un espectrómetro de masas bajo ionización por pulverización de electrones (ESI).

Las mediciones de dicroísmo circular se llevaron a cabo con un espectropolarímetro J-810.

Los experimentos de degradación enzimática se realizaron en un termoagitador Eppendorf a 37 °C, y el control de la degradación se monitorizó mediante RP-HPLC (Chromatograph Waters) a 260 nm utilizando una columna semipreparativa Xbridge OST  $\text{C}_{18}$  2.5  $\mu\text{m}$  (10 x 50 mm).

Los espectros infrarrojos fueron adquiridos con un espectrómetro Jasco FT/IR 4700.

### 3. Procedimientos experimentales

#### 3.1. Preparación de 2'-*O*-metil/2'-*O*-MOE-*L*-uridine (62 y 63)

##### *a) Síntesis del derivado de aminooxazolina 60*

Sobre una suspensión de *L*-arabinosa (1 g, 6.7 mmol) y cianamida (677 mg, 16.1 mmol) en metanol (17 ml) se añade una disolución acuosa de NH<sub>4</sub>OH 6 M (2.8 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 d. A continuación, se disminuyó la temperatura a -10 °C y se mantuvo en agitación durante 12 h. Se evaporó el disolvente a presión reducida y el sólido se filtró y se lavó con MeOH y Et<sub>2</sub>O. El producto **60** se obtuvo con un 70% de rendimiento.

##### *b) Síntesis de O<sup>2,2'</sup>-anhidro-*L*-uridina (61)*

Sobre una disolución del compuesto **60** (1.6 g, 9.2 mmol) en 23 ml de una mezcla EtOH/H<sub>2</sub>O (1:1, v:v) se añadió propiolato de metilo (1.6 ml, 18.4 mmol) y la mezcla se agitó a reflujo durante 4 h. A continuación, se evaporó el disolvente a presión reducida y el sólido se filtró y se lavó con EtOH y H<sub>2</sub>O. El compuesto **61** se obtuvo con un rendimiento del 65%.

##### *c) Síntesis de 2'-*O*-metil-*L*-uridina (62)*

Una suspensión de magnesio (430 mg, 17.6 mmol) en MeOH anhidro (13 ml) se agitó vigorosamente a 30 °C durante 45 min. A continuación, se añadió la anhidrouridina **61** (200 mg, 0.88 mmol) y se agitó a reflujo durante 5 h. La mezcla se enfrió, primero a temperatura ambiente y después a 0 °C, y se añadió ácido acético glacial hasta pH neutro. Posteriormente, se evaporaron los disolventes hasta obtener una espuma que se redisolvió en EtOH y se calentó a reflujo durante 2 h. Tras una filtración sobre Celite<sup>®</sup>, el crudo se purificó mediante columna cromatográfica (5% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), aislándose el compuesto **62** con un 85% de rendimiento.

##### *d) Síntesis de 2'-*O*-metoxietil-*L*-uridina (63)*

Una suspensión de aluminio (36 mg, 1.3 mmol) en 2-metoxietanol (1 ml) se agitó a reflujo durante 2 h. A continuación, la mezcla se enfrió a

temperatura ambiente, se añadió el compuesto **61** (50 mg, 0.22 mmol) y se calentó a reflujo durante 48 h. Posteriormente, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se trituró y coevaporó con MeOH (3 veces). El crudo resultante se purificó por columna cromatográfica (5% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), obteniéndose el compuesto **63** con un 55% de rendimiento.

### **3.2. Preparación de soportes sólidos funcionalizados con 2'-O-metil/2'-O-MOE-L-uridina (68 y 69)**

*a) Protección de los derivados **62** y **63** en la posición 5' con DMT. Síntesis de **64** y **65***

Et<sub>3</sub>N anhidro (10 equiv) y cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (1.5 equiv) se añadieron sucesivamente sobre una disolución de **62** o **63** en 1,4-dioxano anhidro (0.1 M). La mezcla se agitó a 30 °C durante 2 h. A continuación, se añadió una solución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> y se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La fase orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó a presión reducida. El crudo se purificó por columna cromatográfica (40% AcOEt/hexano), previamente empacada con gel de sílice utilizando una solución de Et<sub>3</sub>N al 10% en AcOEt:hexano (4:6, v:v). Los compuestos **64** y **65** se obtuvieron en un 80 y 95% de rendimiento, respectivamente.

*b) Síntesis de los hemisuccinatos de L-uridina **66** y **67***

Los monómeros 5'-O-DMT **64** o **65** (1 equiv) se secaron por evaporación con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se redisolviaron en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (0.02 M). Sobre la mezcla se agregaron 1.5 equiv de DMAP y 1.5 equiv de anhídrido succínico. La solución se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Posteriormente, la mezcla de reacción se diluyó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y la fase orgánica resultante se lavó con una disolución acuosa 0.1 M de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 5), se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evaporó a sequedad, proporcionando **66** (93% de rendimiento) u **67** (91% de rendimiento). Estos hemisuccinatos fueron utilizados directamente para la funcionalización de los soportes sólidos.

*c) Incorporación de 3'-O-hemisuccinatos de L-uridina 66 y 67 a un soporte sólido CPG-LCAA. Síntesis de 68 y 69*

En una jeringa de polipropileno, equipada con una frita del mismo material, se colocaron 643 mg de resina CPG-LCAA-NH<sub>2</sub> (CPG New Jersey, 69 μmol/g) (para **68**) u 800 mg (para **69**) y se lavaron secuencialmente con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y ACN a vacío.

En un tubo Eppendorf se disolvieron 15 mg (~1 equiv) de DMAP en 100 μL o 1 ml de ACN y la solución se añadió gota a gota sobre 55 mg (0.08 mmol) de 5'-O-DMT-3'-O-succinil-2'-O-metil-L-uridina (**66**) u 80 mg (0.11 mmol) de 5'-O-DMT-3'-O-succinil-2'-O-MOE-L-uridina (**67**), permitiendo la disolución completa de la muestra. En otros tubos se disolvieron 25 mg (~1 equiv) de Ph<sub>3</sub>P en 100-200 μL de ACN, y 30 mg o 34 mg de 2,2'-ditiobis-(5-nitropiridina) (DTNP) en una solución de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ACN (3:1) (~100 μL). Ambas disoluciones se mezclaron y se agregaron sobre las disoluciones de hemisuccinato-nucleósido. Se obtuvo una solución rojo anaranjado, que se añadió sobre la resina nativa. La reacción se dejó durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente, la resina se lavó abundantemente con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / ACN. Las etapas de acetilación se llevaron a cabo pasando a través del cartucho 4 mL de una solución de anhídrido acético, piridina y 1-metilimidazol (Ac<sub>2</sub>O/Py/NMI) (1:1:1) en THF. La carga alcanzada para la resina se calculó mediante el ensayo de tritilo. Los valores de carga calculados fueron 20 μmol/g y 23 μmol/g para las resinas **68** y **69**, respectivamente.

**3.3. Síntesis de fosforamiditos de derivados L-uridina (70 y 71).** El compuesto **64** o **65** se secó por coevaporación con acetonitrilo anhidro y se dejó en un liofilizador durante toda la noche. A continuación, se disolvió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (0.1 M) y se adicionó <sup>i</sup>Pr<sub>2</sub>NEt (3 equiv) a la solución. La mezcla se enfrió en un baño de hielo y se adicionó 2-cianoetil-*N,N*-diisopropilclorofosforamidito (1.5 equiv) gota a gota con una jeringuilla. Después de la adición, se dejó que la reacción alcanzase temperatura ambiente y se agitó durante 1 h adicional. La reacción se detuvo mediante la adición de salmuera y se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La capa

orgánica se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se evaporó a sequedad. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice previamente empaquetada con una solución al 10% de  $\text{Et}_3\text{N}$  en 20% hexano:AcOEt y eluida con 20% hexano:AcOEt, aislándose **70** (67%) o **71** (65%).

### 3.4. Síntesis de secuencias de oligonucleótidos ricos en G

Todas las secuencias de oligonucleótidos G-cuádruplex (ricos en G) utilizadas en este trabajo (ver Tabla 1) fueron preparadas DMT-ON en una escala de 1  $\mu\text{mol}$  en un sintetizador automático de ADN de Applied Biosystems y utilizando la química de los fosforamiditos en fase sólida. Antes de la etapa de escisión, los oligonucleótidos se destritilaron utilizando una solución de ácido tricloroacético (3%) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . A continuación, el soporte sólido se trató con 1 mL de una disolución acuosa concentrada de amoníaco (32%) durante la noche a t.a. y, posteriormente, 1 h a 55 °C. Los oligonucleótidos se desalaron utilizando un cartucho de Sephadex. La longitud y homogeneidad de los oligonucleótidos fueron verificadas por espectrometría de masas MALDI-TOF (Tabla 1).

La cuantificación y concentración de los oligonucleótidos obtenidos se determinó mediante la relación matemática existente entre su coeficiente de extinción molar y los valores de absorbancia medidos para cada muestra a una longitud de onda de 260 nm (Ley de Lambert-Beer). La cantidad total de cada una de las secuencias ricas en G se dividió en varias alícuotas de 1  $\text{OD}_{260}$ .

Finalmente, todas las muestras se llevaron hasta sequedad en vacío y se almacenaron a -20 °C para su posterior utilización.

### 3.5. Formación de G-cuádruplexes

Los cuatro oligonucleótidos se disolvieron en una disolución 10 mM de NaCl en  $\text{H}_2\text{O}$  Milli-Q y se llevó a cabo el proceso de “*annealing*”, calentando las muestras a 95 °C durante 5 min y enfriándose lentamente a t.a. Los conjugados de oligonucleótidos G-cuádruplexes resultantes se almacenaron a 4 °C.

Por otro lado, se disolvieron otras muestras de oligonucleótidos en una disolución tampón diferente (una mezcla de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  20 mM y de  $\text{KCl}$  70 mM en  $\text{H}_2\text{O}$  Milli-Q) y se sometieron nuevamente al proceso de *annealing* en las mismas condiciones anteriores. Los cuádruples formados se almacenaron a 4 °C.

### **3.6. Experimentos de desnaturalización térmica: estudios de temperatura de fusión y espectros de dicroísmo circular (DC)**

Las curvas de fusión UV de los oligonucleótidos ricos en G se realizaron monitorizando la hipercromicidad de absorbancia a 240 nm y 260 nm. Los espectros de absorción UV se registraron a 0.5 °C en intervalos de 1 min, con un tiempo de equilibrio de 1 min entre cada valor de temperatura; la muestra se calentó en el rango de 20-80 °C. La cantidad de oligonucleótido en las muestras fue de alrededor de 1  $\text{OD}_{260}$ . Se permitió que cada muestra se equilibrara a la temperatura inicial durante 5 min antes de que se iniciara el experimento de fusión.

Las mediciones de dicroísmo circular se registraron entre 200-320 nm en el mismo tampón que para las curvas de desnaturalización. Los experimentos de desnaturalización térmica de DC se realizaron en el rango de temperatura de 10-90 °C utilizando una velocidad de calentamiento de 0.5 °C/min y monitorizando los valores de DC a 260 y 295 nm con una velocidad de escaneo de 100 nm / min, un tiempo de respuesta de 4 s, un paso de datos de 0.5 nm y un ancho de banda de 1 nm.

### **3.7. Ensayo de desplazamiento de movilidad en electroforesis de poliacrilamida nativa (PAGE)**

Se preparó una electroforesis en gel nativo de poliacrilamida (PAGE) utilizando acrilamida al 20% (v/v) en condiciones nativas. Las muestras se disolvieron en glicerol y el gel se corrió en un tampón TBE (1x) (combinado con 100 mM  $\text{KCl}$ ) a 100 V durante aproximadamente 2-3 h a una temperatura fija de 4 °C. La tinción de las bandas de oligonucleótidos se llevó a cabo con el revelador *Stains-All*, preparado a

partir de una punta de espátula del compuesto de cianina en una disolución del 45% de formamida en agua y siguiendo los protocolos estándar. Los oligonucleótidos TG<sub>4</sub>T y T<sub>6</sub> se utilizaron como secuencia de control positiva y negativa, respectivamente. Se utilizó una solución que contenía azul de bromofenol y cianol de xileno como apoyo para el seguimiento visual de la migración de los oligonucleótidos durante el proceso de electroforesis.

### **3.8. Ensayo de degradación enzimática**

Se realizaron ensayos de degradación enzimática mediante análisis de HPLC de los oligonucleótidos ricos en G.

Para ello, se disolvió una cantidad de 1 OD<sub>260</sub> de oligonucleótido en 93 µL de H<sub>2</sub>O, 5 µL de una solución acuosa de Tris-HCl 1 M (pH 8.0) y 1 µL de una solución acuosa 1 M de MgCl<sub>2</sub>. A continuación, se añadió 1 µL de la fosfodiesterasa I del veneno de *Crotalus adamanteus* (SVP) y las muestras se incubaron a 37 °C.

Se sacaron alícuotas de 20 µL a las 0.5, 1, 4, 8 y 24 h. Inmediatamente, se calentaron a 85 °C durante 5 min con el fin de desnaturalizar la enzima y detener la digestión. Las muestras se analizaron mediante HPLC y se compararon los resultados con una muestra control de oligonucleótidos ricos en G, los cuales estaban disueltos en el mismo tampón, pero sin la enzima fosfodiesterasa I.

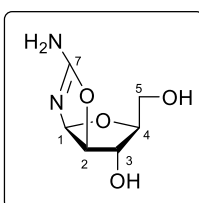
Las condiciones de análisis por HPLC fueron de 20 min de gradiente lineal de 0 a 30% de tampón B. El volumen de muestra inyectado fue de 40 µL en cada caso.

## **4. Datos experimentales**

Se muestran aquí los datos experimentales que han permitido la caracterización de los compuestos sintetizados en este capítulo. La numeración utilizada en la asignación de los espectros de RMN se indica en la figura que acompaña a cada compuesto.

Parte Experimental -----

**2-Amino-β-L-arabinofurano[1',2':4,5]oxazolina (60)**



Sólido blanco

**Pf:** 179-181 °C

**Rf:** 0.40 (1% NH<sub>3</sub>/MeOH)

**Fórmula molecular:** C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>

**Masa molecular:** 174.15 g/mol

**<sup>1</sup>H-RMN** (300.13 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 3.49 (dd, 1H, H<sub>5</sub>, *J* = 12.1, 6.9 Hz), 3.57 (dd, 1H, H<sub>5</sub>, *J* = 12.1, 5.4 Hz), 3.98 (m, 1H, H<sub>4</sub>), 4.29 (dd, 1H, H<sub>3</sub>, *J* = 3.1, 1.0 Hz), 4.89 (dd, 1H, H<sub>2</sub>, *J* = 5.5, 1.0 Hz), 5.87 (d, 1H, H<sub>1</sub>, *J* = 5.5 Hz) ppm.

**<sup>13</sup>C-RMN** (75.5 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 61.2 (C<sub>5</sub>), 75.2 (C<sub>3</sub>), 84.3 (C<sub>4</sub>), 88.7 (C<sub>2</sub>), 98.6 (C<sub>1</sub>), 164.8 (C<sub>7</sub>) ppm.

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*):

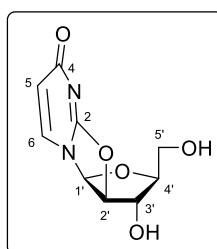
-Calculada para C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 175.0713. Encontrada: 175.0718

-Calculada para C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>4</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 197.0533. Encontrada: 197.0530

-Calculada para C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>KN<sub>2</sub>O<sub>4</sub> [M+K]<sup>+</sup>: 213.0272. Encontrada: 213.0268



***O*<sup>2,2'</sup>-Anhidro-L-uridina (61)**



Sólido blanco

**P<sub>f</sub>**: 237-239 °C

**R<sub>f</sub>**: 0.53 (40% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

**Fórmula molecular**: C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

**Masa molecular**: 226.19 g/mol

**IR**: ν 3249, 2192, 1775, 1619 cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H-RMN** (300.13 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 3.56 (m, 2H, H<sub>5'</sub>), 4.40 (m, 1H, H<sub>4'</sub>), 4.67 (m, 1H, H<sub>3'</sub>), 5.47 (d, 1H, H<sub>2'</sub>, *J* = 5.9 Hz), 6.19 (d, 1H, H<sub>5</sub>, *J* = 7.4 Hz), 6.54 (d, 1H, H<sub>1'</sub>, *J* = 5.9 Hz), 7.92 (d, 1H, H<sub>6</sub>, *J* = 7.4 Hz) ppm.

**<sup>13</sup>C-RMN** (75.5 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 60.9 (C<sub>5'</sub>), 75.5 (C<sub>3'</sub>), 89.6 (C<sub>2'</sub>), 89.8 (C<sub>4'</sub>), 91.0 (C<sub>1'</sub>), 108.7 (C<sub>5</sub>), 138.4 (C<sub>6</sub>), 161.2 (C<sub>2</sub>), 175.7 (C<sub>4</sub>) ppm.

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*):

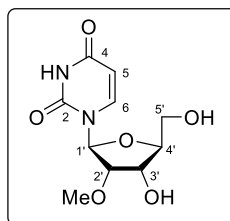
-Calculada para C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 227.0662. Encontrada: 227.0658

-Calculada para C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>5</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 249.0482. Encontrada: 249.0477

-Calculada para C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>KN<sub>2</sub>O<sub>5</sub> [M+K]<sup>+</sup>: 265.0221. Encontrada: 265.0216

Parte Experimental -----

**2'-O-Metil-L-uridina (62)**



Sólido blanco

**P<sub>f</sub>**: 156-158 °C

**R<sub>f</sub>**: 0.77 (30% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

**Fórmula molecular**: C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>

**Masa molecular**: 258.23 g/mol

**IR**:  $\nu$  3232, 3005, 2990, 1649 cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H-RMN** (300.13 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  3.50 (s, 3H, O-Me), 3.79 (dd, 1H, H<sub>5'</sub>,  $J = 12.9, 4.3$  Hz), 3.91 (dd, 1H, H<sub>5'</sub>,  $J = 12.8, 2.8$  Hz), 4.04 (dd, 1H, H<sub>2'</sub>,  $J = 5.2, 4.0$  Hz), 4.09 (ddd, 1H, H<sub>4'</sub>,  $J = 6.3, 4.2, 3.0$  Hz), 4.32 (t, 1H, H<sub>3'</sub>,  $J = 5.7$  Hz), 5.88 (d, 1H, H<sub>5'</sub>,  $J = 8.1$  Hz), 5.96 (d, 1H, H<sub>1'</sub>,  $J = 3.9$  Hz), 7.89 (d, 1H, H<sub>6</sub>,  $J = 8.1$  Hz) ppm.

**<sup>13</sup>C-RMN** (75.5 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  58.2 (CH<sub>3</sub>), 60.4 (C<sub>5'</sub>), 68.1 (C<sub>3'</sub>), 82.6 (C<sub>2'</sub>), 84.2 (C<sub>4'</sub>), 87.6 (C<sub>1'</sub>), 102.2 (C<sub>5</sub>), 141.7 (C<sub>6</sub>), 151.4 (C<sub>2</sub>), 166.1 (C<sub>4</sub>) ppm.

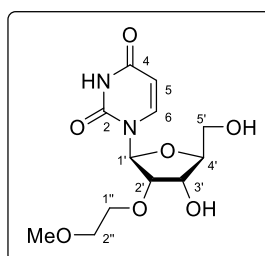
**EMAR** (ESI<sup>+</sup>,  $m/z$ ):

-Calculada para C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 259.0925. Encontrada: 259.0928

-Calculada para C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>6</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 281.0744. Encontrada: 281.0747

-Calculada para C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>KN<sub>2</sub>O<sub>6</sub> [M+K]<sup>+</sup>: 297.0483. Encontrada: 297.0486

<b>2'-O-(2-Metoxietil)-L-uridina (63)</b>
---



Sólido blanco

**Pf:** 116-118 °C

**Rf:** 0.77 (30% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

**Fórmula molecular:** C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>

**Masa molecular:** 302.28 g/mol

**IR:** ν 3235, 3005, 2990, 1647 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (300.13 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 3.22 (s, 3H, O-*Me*), 3.44 (t, 2H, H<sub>2''</sub>, *J* = 4.8 Hz), 3.62 (m, 4H, H<sub>5'</sub> + H<sub>1''</sub>), 3.85 (q, 1H, H<sub>4'</sub>, *J* = 3.1 Hz), 3.94 (t, 1H, H<sub>2'</sub>, *J* = 5.0 Hz), 4.09 (q, 1H, H<sub>3'</sub>, *J* = 5.0 Hz), 5.06 (d, 1H, OH<sub>3'</sub>, *J* = 5.7 Hz), 5.16 (t, 1H, OH<sub>5'</sub>, *J* = 5.0 Hz), 5.65 (d, 1H, H<sub>5</sub>, *J* = 8.1 Hz), 5.84 (d, 1H, H<sub>1'</sub>, *J* = 5.1 Hz), 7.92 (d, 1H, H<sub>6</sub>, *J* = 8.1 Hz), 11.35 (sa, 1H, NH) ppm.

**<sup>13</sup>C-RMN** (75.5 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 58.1 (CH<sub>3</sub>), 60.6 (C<sub>5'</sub>), 68.4 (C<sub>3'</sub>), 69.0 (C<sub>1''</sub>), 71.2 (C<sub>2''</sub>), 81.4 (C<sub>2'</sub>), 85.1 (C<sub>4'</sub>), 86.2 (C<sub>1'</sub>), 101.8 (C<sub>5</sub>), 140.5 (C<sub>6</sub>), 150.6 (C<sub>2</sub>), 163.2 (C<sub>4</sub>) ppm.

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*):

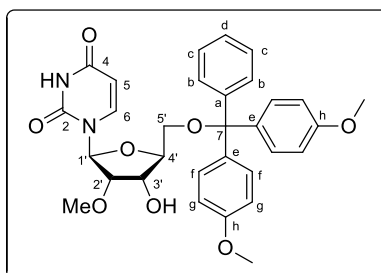
-Calculada para C<sub>12</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 303.1187. Encontrada: 303.1190

-Calculada para C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>7</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 325.1006. Encontrada: 325.0997

-Calculada para C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>KN<sub>2</sub>O<sub>7</sub> [M+K]<sup>+</sup>: 341.0746. Encontrada: 341.0736

Parte Experimental -----

**5'-O-(4,4'-Dimetoxitritil)-2'-O-metil-L-uridina (64)**



Sólido blanco

**Pf:** descompone a partir de 97 °C

**R<sub>f</sub>:** 0.44 (5% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

**Fórmula y masa moleculares:** C<sub>31</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub> y 560.59 g/mol

**IR:** ν 3326, 3010, 2990, 1643, 1520 cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H-RMN** (300.13 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 3.54 (m, 2H, H<sub>5'</sub>), 3.64 (s, 3H, O-Me), 3.73 (m, 1H, H<sub>2'</sub>), 3.76 (s, 6H, Me-DMT), 3.99 (d, 1H, H<sub>4'</sub>, *J* = 7.9 Hz), 4.47 (dd, 1H, H<sub>3'</sub>, *J* = 7.7, 5.5 Hz), 5.27 (d, 1H, H<sub>5'</sub>, *J* = 8.2 Hz), 5.96 (s, 1H, H<sub>1'</sub>), 6.84 (d, 4H, H<sub>g</sub>, *J* = 8.8 Hz), 7.28 (m, 7H, H<sub>c</sub> + H<sub>d</sub> + H<sub>f</sub>), 7.38 (d, 2H, H<sub>b</sub>, *J* = 7.5 Hz), 8.03 (d, 1H, H<sub>6</sub>, *J* = 8.1 Hz) ppm.

**<sup>13</sup>C-RMN** (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 55.4 (2 O-CH<sub>3</sub>, DMT), 58.9 (O-CH<sub>3</sub>), 61.3 (C<sub>5'</sub>), 68.5 (C<sub>3'</sub>), 83.4 (C<sub>4'</sub>), 84.2 (C<sub>2'</sub>), 87.15 (C<sub>1'</sub>), 87.24 (C<sub>7</sub>), 102.3 (C<sub>5</sub>), 113.4 (4C<sub>g</sub>), 127.3, 128.2, 128.3, 130.25, 130.34 (2C<sub>b</sub> + 2C<sub>c</sub> + C<sub>d</sub> + 4C<sub>f</sub>), 135.2 (C<sub>e</sub>), 135.4 (C<sub>e</sub>), 140.2 (C<sub>6</sub>), 144.5 (C<sub>a</sub>), 150.2 (C<sub>2</sub>), 158.8 (C<sub>h</sub>), 158.9 (C<sub>h</sub>), 163.3 (C<sub>4</sub>) ppm.

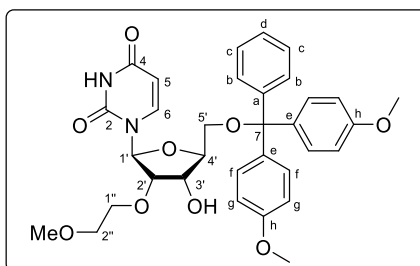
**EMAR** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*):

-Calculada para C<sub>31</sub>H<sub>33</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 561.2231. Encontrada: 561.2210

-Calculada para C<sub>31</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>8</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 583.2051. Encontrada: 583.2028

-Calculada para C<sub>31</sub>H<sub>32</sub>KN<sub>2</sub>O<sub>8</sub> [M+K]<sup>+</sup>: 599.1790. Encontrada: 599.1765

**5'-O-(4,4'-Dimetoxitritil)-2'-O-(2-metoxietil)-L-uridina (65)**



Sólido blanco

**Pf:** descompone a partir de 30 °C

**R<sub>f</sub>:** 0.67 (10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

**Fórmula y masa moleculares:** C<sub>33</sub>H<sub>36</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub> y 604.65 g/mol

**IR:** ν 3330, 3010, 2990, 1647, 1521 cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H-RMN** (300.13 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 3.38 (s, 3H, O-Me), 3.52 (m, 2H, H<sub>5'</sub>), 3.59 (m, 2H, H<sub>2''</sub>), 3.78 (m, 1H, H<sub>1''</sub>), 3.80 (s, 6H, Me-DMT), 4.01 (dd, 1H, H<sub>2'</sub>, *J* = 5.0, 2.5 Hz), 4.09 (m, 2H, H<sub>1''</sub> + H<sub>4'</sub>), 4.44 (t, 1H, H<sub>3'</sub>, *J* = 5.7 Hz), 5.28 (d, 1H, H<sub>5</sub>, *J* = 8.2 Hz), 5.95 (d, 1H, H<sub>1'</sub>, *J* = 2.4 Hz), 6.84 (m, 4H, H<sub>g</sub>), 7.17 (m, 2H, H<sub>c</sub>), 7.28 (m, 5H, H<sub>d</sub> + H<sub>f</sub>), 7.38 (m, 2H, H<sub>b</sub>), 7.97 (d, 1H, H<sub>6</sub>, *J* = 8.2 Hz) ppm.

**<sup>13</sup>C-RMN** (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 55.4 (2 O-CH<sub>3</sub>, DMT), 59.0 (O-CH<sub>3</sub>, MOE), 61.7 (C<sub>5'</sub>), 68.9 (C<sub>3'</sub>), 70.4 (C<sub>1''</sub>), 71.8 (C<sub>2''</sub>), 83.3 (C<sub>2'</sub>), 83.5 (C<sub>4'</sub>), 87.1 (C<sub>7</sub>), 87.9 (C<sub>1'</sub>), 102.2 (C<sub>5</sub>), 113.2, 113.4 (4C<sub>g</sub>), 127.2, 127.9, 128.1, 128.3, 129.3, 130.2, 130.3 (2C<sub>b</sub> + 2C<sub>c</sub> + C<sub>d</sub> + 4C<sub>f</sub>), 135.2 (C<sub>e</sub>), 135.5 (C<sub>e</sub>), 140.2 (C<sub>6</sub>), 144.5 (C<sub>a</sub>), 150.4 (C<sub>2</sub>), 158.77 (C<sub>h</sub>), 158.80 (C<sub>h</sub>), 163.6 (C<sub>4</sub>) ppm.

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*):

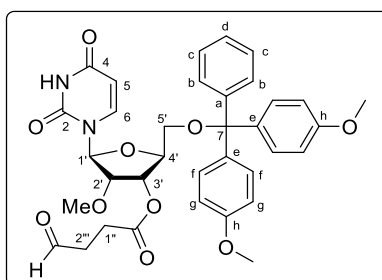
-Calculada para C<sub>33</sub>H<sub>37</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 605.2494. Encontrada: 605.2489

-Calculada para C<sub>33</sub>H<sub>36</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>9</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 627.2313. Encontrada: 627.2310

-Calculada para C<sub>33</sub>H<sub>36</sub>KN<sub>2</sub>O<sub>9</sub> [M+K]<sup>+</sup>: 643.2052. Encontrada: 643.2049

Parte Experimental -----

**5'-O-(4,4'-Dimetoxitritil)-3'-O-succinil-2'-O-metil-L-uridina (66)**

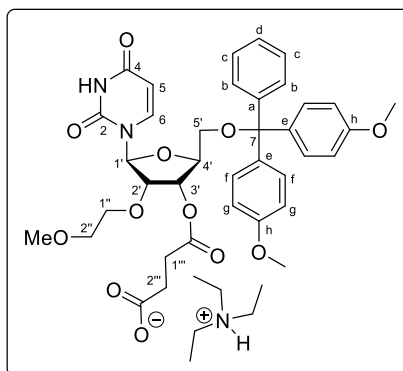


Sólido blanco

**Fórmula y masa moleculares:** C<sub>35</sub>H<sub>36</sub>N<sub>2</sub>O<sub>10</sub> y 644.67 g/mol

<sup>1</sup>H-NMR (300.13 MHz, MeOD-d<sub>4</sub>): δ 2.62 (m, 4H, H<sub>1''</sub> + H<sub>2''</sub>), 3.45 (s, 3H, O-Me), 3.51 (m, 2H, H<sub>5'</sub>), 3.79 (s, 6H, Me-DMT), 4.14, 4.23 (2m, 2H, H<sub>2'</sub> + H<sub>4'</sub>), 5.30 (d, 1H, H<sub>5</sub>, J = 8.1 Hz), 5.32 (m, 1H, H<sub>3'</sub>), 5.94 (m, 1H, H<sub>1'</sub>), 6.89 (d, 4H, H<sub>arom</sub>, J = 8.9 Hz), 7.32 (m, 7H, H<sub>arom</sub>), 7.41 (m, 2H, H<sub>arom</sub>), 7.93 (d, 1H, H<sub>6</sub>, J = 8.1 Hz) ppm.

**5'-O-(4,4'-Dimetoxitritil)-3'-O-succinil-2'-O-(2-metoxietil)-L-uridina (67)**



Sólido blanco

R<sub>f</sub>: 0.38 (10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

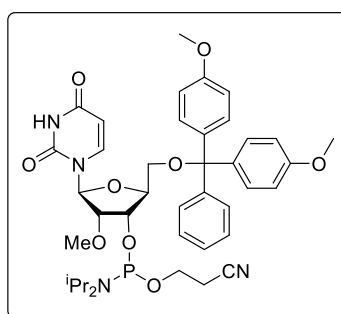
**Fórmula y masa moleculares:** C<sub>43</sub>H<sub>55</sub>N<sub>3</sub>O<sub>12</sub> y 805.92 g/mol

**<sup>1</sup>H-NMR** (300.13 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1.18 (t, 9H, Me-Et<sub>3</sub>N, *J* = 7.3 Hz), 2.55, 2.68 (2m, 4H, H<sub>1'''</sub> + H<sub>2'''</sub>), 2.93 (q, 6H, CH<sub>2</sub>-Et<sub>3</sub>N, *J* = 7.3 Hz), 3.29 (s, 3H, O-Me), 3.47 (m, 4H, 2H<sub>5'</sub> + 2H<sub>2''</sub>), 3.68 (m, 1H, H<sub>1''</sub>), 3.78 (s, 6H, Me-DMT), 3.83 (m, 1H, H<sub>1''</sub>), 4.27 (m, 1H, H<sub>4'</sub>), 4.34 (t, 1H, H<sub>2'</sub>, *J* = 4.6 Hz), 5.29 (d, 1H, H<sub>5'</sub>, *J* = 7.7 Hz), 5.30 (m, 1H, H<sub>3'</sub>), 6.00 (d, 1H, H<sub>1'</sub>, *J* = 4.1 Hz), 6.83 (d, 4H, H<sub>arom</sub>, *J* = 7.7 Hz), 7.25, 7.34 (2m, 9H, H<sub>arom</sub>), 7.86 (d, 1H, H<sub>6'</sub>, *J* = 8.2 Hz) ppm;

**<sup>13</sup>C-NMR** (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.8 (3 CH<sub>3</sub>, Et<sub>3</sub>N), 30.4, 31.4 (C<sub>1'''</sub> + C<sub>2'''</sub>), 44.9 (3 N-CH<sub>2</sub>, Et<sub>3</sub>N), 55.4 (2 O-CH<sub>3</sub>, DMT), 59.1 (O-CH<sub>3</sub>, MOE), 62.1 (C<sub>5'</sub>), 70.4 (C<sub>3'</sub>), 70.6 (C<sub>1''</sub>), 72.3 (C<sub>2''</sub>), 81.3, 81.4 (C<sub>2'</sub> + C<sub>4'</sub>), 87.4 (C<sub>7</sub>), 87.6 (C<sub>1'</sub>), 102.3 (C<sub>5</sub>), 113.4, 127.3, 128.16, 128.22, 130.2, 130.3 (2C<sub>b</sub> + 2C<sub>c</sub> + C<sub>d</sub> + 4C<sub>f</sub> + 4C<sub>g</sub>), 135.1 (C<sub>e</sub>), 135.3 (C<sub>e</sub>), 140.3 (C<sub>6</sub>), 144.3 (C<sub>a</sub>), 150.4 (C<sub>2</sub>), 158.8 (2C<sub>h</sub>), 163.4 (C<sub>4</sub>), 172.9 (C=O), 177.3 (C=O) ppm.

Parte Experimental -----

**3'-(2-Cianoetil-*N,N*-diisopropilfosforamiditil)-5'-*O*-(4,4'-dimetoxitritilo)-2'-*O*-metil-L-uridina (70)**



Sólido blanco

**R<sub>f</sub>**: 0.61 y 0.68 (20% Hexano/AcOEt)

**Fórmula y masa moleculares**: C<sub>40</sub>H<sub>49</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub>P y 760.32 g/mol

**<sup>31</sup>P-RMN** (121.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 150.39 y 150.90 ppm

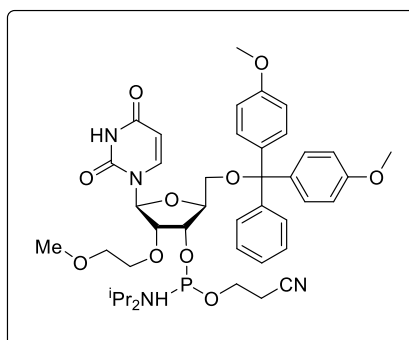
**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*):

-Calculada para C<sub>40</sub>H<sub>50</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub>P [M+H]<sup>+</sup>: 761.3310. Encontrada: 761.3307

-Calculada para C<sub>40</sub>H<sub>49</sub>N<sub>4</sub>NaO<sub>9</sub>P [M+Na]<sup>+</sup>: 783.3129. Encontrada: 783.3122



**3'-(2-Cianoetil-*N,N*-diisopropilfosforamiditil)-5'-*O*-(4,4'-dimetoxitritilo)-2'-*O*-(2-metoxietil)-L-uridina (71)**



Sólido blanco

**R<sub>f</sub>**: 0.44 y 0.53 (20% Hexano/AcOEt)

**<sup>31</sup>P-RMN** (121.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 150.15 y 150.21 ppm

**Fórmula y masa moleculares**: C<sub>42</sub>H<sub>53</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub>P y 804.35 g/mol

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*):

-Calculada para C<sub>42</sub>H<sub>54</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub>P [M+H]<sup>+</sup>: 805.3572. Encontrada: 805.3568

-Calculada para C<sub>42</sub>H<sub>53</sub>N<sub>4</sub>NaO<sub>10</sub>P [M+Na]<sup>+</sup>: 827.3392. Encontrada: 827.3384

-Calculada para C<sub>42</sub>H<sub>53</sub>KN<sub>4</sub>O<sub>10</sub>P [M+K]<sup>+</sup>: 843.3131. Encontrada: 843.3131

