



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Síntesi en fase sòlida de nucleopèptids amb una unió fosfat entre serina i un nucleòsid

Jordi Robles i Brau



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0. Spain License.**



**Tesi Doctoral**

**Síntesi en fase sòlida de nucleopèptids  
amb una unió fosfat diester entre serina i un nucleòsid.**

**Jordi Robles i Brau.**



**Programa de Doctorat : Química Orgànica - Química Fonamental  
Bienni 1989 - 1991.**

**Departament de Química Orgànica.  
Facultat de Química. Divisió de Ciències Experimentals i Matemàtiques.  
Universitat de Barcelona.**



BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0700450183

Memòria presentada per  
Jordi Robles i Brau  
per optar al grau de Doctor en Ciències Químiques  
per la Universitat de Barcelona.



Jordi Robles i Brau.

Revisada per :



Dr. Anna Grandas i Sagarra.

Departament de Química Orgànica.  
Universitat de Barcelona.

Barcelona, Maig de 1994.

Vull agrair especialment l'Anna Grandas, directora d'aquesta Tesi, per haver-me guiat en la realització d'aquest treball, però també per haver-me recolzat i aconsellat en els moments més compromesos. Espero per la meua part haver pogut correspondre al seu esforç i dedicació, en una direcció que no crec hagi estat fàcil, sent aquesta la primera ocasió en què ha tingut la oportunitat de realitzar-ho. Per mi, haver estat escollit en tals circumstàncies és motiu d'un agraïment encara més sincer.

He d'agrair igualment l'Enrique Pedroso per haver-me encoratjat constantment al llarg de la realització d'aquest treball, així com també per les suggerències i consells rebuts, per altra part no sempre relacionats amb el projecte.

Tot i que no faig gaire soroll i que molta nosa no puc haver fet, vull agrair els meus companys del laboratori de Pèptids i d'Oligonucleòtids, tant a grans com a petits, a joves i a vells, a presents i a absents, per haver-me fet lloc, tant material com moral, en un grup en què precisament no sobra l'espai. De forma especial, he d'agrair la Maria Concernau, per haver suportat els meus consells, la Yolanda Palom, per haver-me proveït d'enzims i xeringues, i l'ElMostafa Alazzouzi, per haver entès el meu mal francès quan va arribar. Vull també recordar la Marga Gairí i en Xavi Roig, per les bones estones que he pogut gaudir en la seva companyia durant tot aquest temps. També, he d'agrair la Gemma Jou, la Isabel González i la Míriam Royo per haver-me fet riure en més d'una ocasió, però igualment per haver confeccionat els models de la granota. Al Fernando Albericio vull agrair-li els seus crits matiners, però especialment l'encoratjament constant que he rebut de la seva part des del primer moment. D'igual manera, vull agrair l'Ernesto Nicolás per haver-me deixat els seus alumnes, i el seu ordinador quan no en veia. No vull oblidar tampoc la Cristina Carreño, que en més d'una ocasió ha hagut de realitzar les anàlisis d'aminoàcids de productes que no tenien aminoàcids. A la resta de membres del grup que no he mencionat, també gràcies per un o altre motiu insignificant. També vull afegir el meu agraïment a Lászlò Kiss, amb l'ajut del qual han estat preparats alguns dels productes utilitzats en aquest treball.

Vull agrair la M<sup>a</sup> Antònia Molins, en Francisco Càrdenas, i també el Dr. Miguel Feliz, del Servei de Ressonància per haver enregistrat la major part dels espectres de  $^{31}\text{P}$  i  $^1\text{H}$  RMN d'alt camp d'aquest treball. També per a l'enregistrament en circumstàncies especials d'alguns espectres vull recordar la col.laboració dels Dr. Daniel Sainz i Dr. Guillermm Muller del Departament de Química Inorgànica, i del Dr. Francisco Sánchez i els seus col.laboradors del CID-CSIC.

Vull donar també les gràcies a la Irene Fernández i la M<sup>a</sup> Dolors Manuel del Servei d'Espectrometria de masses per haver enregistrat els espectres que figuren en aquest treball. En el mateix sentit també he de recordar el Servei de Masses del CID-CSIC per algun altre espectre enregistrat. Vull també agrair la col.laboració de la M<sup>a</sup> Pilar Navarro en diverses ocasions.

Finalment, vull fer extensiva la meua gratitud al conjunt de membres del Departament de Química Orgànica que en moments diversos i per motius diferents, m'han dedicat el seu temps i atenció, i als quals dec en major o menor grau la realització d'aquest treball.

Als meus pares,  
Roser i Teodor.

"...però que en aquest llibre deixaria de banda expressament la gran química, la química triomfant de les instal·lacions colossals i de les facturacions vertiginoses, perquè aquesta és una obra col·lectiva i per tant anònima. A mi m'interessaven més les històries de la química solitària, inermes i pedestres, a mida de l'home, que amb poques excepcions ha estat la meua: però també ha estat la química dels fundadors, que no treballaven en equip, sinó sols, enmig de la indiferència dels seus temps, normalment sense beneficis, i afrontaven la matèria sense ajuts, amb el cervell i amb les mans, amb la raó i la fantasia."

Primo Levi (1919-1987) a "El sistema periòdic"

## Introducció

1.	Nucleoproteïnes	1
2.	Nucleopèptids : Aplicacions	5
3.	Problemàtica de la síntesi química de nucleopèptids amb unions de tipus fosfat diester : Antecedents	8
4.	Objectius del treball	14

## Capítol 1 : Síntesi de nucleopèptids en fase sòlida mitjançant una estratègia convergent

1.	Disseny d'un esquema de síntesi de nucleopèptids amb un enllaç fosfat serina-nucleòsid basat en una estratègia de tipus convergent	17
1.1	Elecció de l'esquema global de síntesi	18
1.2	Disseny de l'esquema de protecció	19
	a) Estabilitat del nucleopèptid	
	Elecció dels tractaments de desprotecció i desancoratge	22
	b) Elecció de la matriu sòlida i del tipus d'unió del nucleopèptid a la resina	23
	c) Elecció del grup protector de la funció $\alpha$ -amino i dels grups protectors permanents de les cadenes laterals del pèptid	24
	d) Elecció del mètode de síntesi de l'oligonucleòtid i dels grups protectors permanents	26
2.	Obtenció del nucleopèptid Boc-Ser(p <sup>5</sup> TCT)NHcHex (25)	29
2.1	Obtenció del derivat fosforamídit de l'aminoàcid Boc-Ser(P(OCNE)NiPr <sub>2</sub> )-NHcHex (22)	29
2.2	Obtenció de l'oligonucleotidil-resina HO-T-C <sup>Fmoc</sup> -T-suc-NHCH <sub>2</sub> -PS (23)	31
2.3	Acoblament de Boc-Ser(P(OCNE)NiPr <sub>2</sub> )-NHcHex sobre l'oligonucleotidil resina 23	31
2.4	Desprotecció i desancoratge	31
2.5	Purificació i caracterització del nucleopèptid Boc-Ser(p <sup>5</sup> TCT)-NHcHex (25)	33
3.	Intents de preparació del nucleopèptid Ac-Ser(p <sup>5</sup> CATCAT)-Gly-Asp-NH <sub>2</sub> (32)	35
3.1	Obtenció dels pèptids protegits	36
	a) Obtenció dels pèptids Ac-Ser-Gly-Asp(OFm)-NH <sub>2</sub> (28a) i Ac-Asn-Ser-Gly-Asp(OFm)-NH <sub>2</sub> (29)	38

	b) Obtenció del pèptid Ac-Ser-Gly-Asp(OAnpe)-NH <sub>2</sub> ( <b>28b</b> )	40
	c) Obtenció del pèptid Ac-Ser-Gly-Asp(OBzl)-NH <sub>2</sub> ( <b>28c</b> )	41
3.2	Obtenció de les oligonucleotidil-resines C <sup>x</sup> -AY-T-C <sup>x</sup> -AY-T-suc-R	41
	a) Síntesi de l'oligonucleòtid sobre una matriu de poliestirè resina <b>30a</b> : x = Fmoc , y = Fmoc	42
	b) Síntesi de l'oligonucleòtid sobre una matriu de boles de vidre resina <b>30b</b> : x = iBu y = Bz ; resina <b>30c</b> x = iBu y = Dmf	43
3.3	Obtenció dels derivats fosforamidit ( <b>31</b> ) dels pèptids protegits	43
3.4	Acoblament dels pèptids fosforamidit <b>31</b> a les oligonucleotidil-resines <b>30</b>	48
3.5	Desprotecció i desancoratge de la resina dels productes d'acoblament	48
	a) Assajos d'acoblament realitzats sobre l'oligonucleotidil resina <b>30a</b> (matriu de poliestirè; grups protectors Y <sub>1</sub> = Fmoc, Y <sub>2</sub> = Fmoc)	50
	b) Assajos d'acoblament realitzats sobre les oligonucleotidil resines <b>30b</b> i <b>30c</b> (matriu de boles de vidre; grups protectors : resina <b>30b</b> Y <sub>1</sub> = iBu, Y <sub>2</sub> = Bz; resina <b>30c</b> : Y <sub>1</sub> = iBu, Y <sub>2</sub> = Dmf)	51
3.6	Purificació i caracterització dels productes obtinguts en els intents de síntesi mitjançant una estratègia convergent	54
	a) Anàlisi cromatogràfica i electroforètica	54
	b) Anàlisi d'aminoàcids	56
	c) Digestió enzimàtica	56
	d) Estabilitat del producte <b>X</b> als tractaments bàsics	57
	e) Espectres de ressonància	57
	f) Espectres de masses	57
4.	Proves addicionals encaminades a la determinació de l'estructura i mecanisme de formació del producte <b>X</b> en els intents d'obtenció del nucleopèptid Ac-Ser(p <sup>5</sup> CATCAT)-Gly-Asp-NH <sub>2</sub>	58
4.1	Comprovació de la possible identitat del producte <b>X</b> amb l'oligonucleòtid-5'-H-fosfonat Hp <sup>5</sup> CATCAT	58
4.2	Seguiment de la formació de l'enllaç fosfit entre el pèptid i un nucleòsid, i dels productes generats en les etapes posteriors d'oxidació i desprotecció	60
	a) Intents d'obtenció del nucleopèptid Ac-Ser(p <sup>3</sup> T-DMT)-Gly-Asp-NH <sub>2</sub>	60
	b) Intent de síntesi del nucleopèptid Ac-Ser(p <sup>5</sup> T)-Gly-Asp-NH <sub>2</sub>	61
	c) Preparació del nucleopèptid H-Ser(p <sup>5</sup> T)-Gly-Leu-NH <sub>2</sub>	62



4.3	Estudi de la reactivitat dels grups carbamoil enfront de derivats fosfítilants. Aplicació a l'obtenció del derivat N-acilfosforamidat DMT-T-PO(OCNE)NHCOCH <sub>2</sub> Ph. Avaluació de l'estabilitat del derivat N-acilfosforamidat a diferents tractaments	64
	a) Reacció de fenilacetamida amb (2-cianoetoxi)cloro(diisopropilamino)fosfina	64
	b) Obtenció del fosforamidat d'O-2-cianoetil, O-3'-(5'-O-dimetoxitritil)timidinil i N-fenilacetil DMT-T-PO(OCNE)NHCOCH <sub>2</sub> Ph (40)	65
	c) Obtenció del fosforamidat d'O-3'-(5'-O-dimetoxitritil)timidinil i N-fenilacetil, DMT-T-PO(O-)NHCOCH <sub>2</sub> Ph (41) Estabilitat de l'enllaç N-acetilfosforamidat a diferents condicions	67
4.4	Conclusions de les proves realitzades	69
5.	Obtenció dels anàlegs nucleopeptídics Ac-Ser-Gly-Asp-NH-p <sup>5'</sup> T (45) i Ac-Ser-Gly-Asp-NH-p <sup>5'</sup> CATCAT (46)	70
5.1	Síntesi del pèptid protegit Ac-Ser(Ac)-Gly-Asp(OFm)-NH <sub>2</sub> (43)	72
5.2	Obtenció del pèptid fósforodiamidit Ac-Ser(Ac)-Gly-Asp-NH-P(OCNE)NiPr <sub>2</sub> (44)	73
5.3	Acoblament del pèptid fósforodiamidit 44 sobre la resina T-suc-NHCH <sub>2</sub> -PS Obtenció del nucleopèptid Ac-Ser-Gly-Asp-NH-p <sup>5'</sup> T (45)	73
5.4	Acoblament del pèptid fósforodiamidit 44 sobre la resina C <sup>i</sup> Bu-A <sup>Dmf</sup> -T-C <sup>i</sup> Bu-A <sup>Dmf</sup> -T-suc-NHCH <sub>2</sub> -PS Obtenció del nucleopèptid Ac-Ser-Gly-Asp-NH-p <sup>5'</sup> CATCAT (46)	74
6.	Consideracions finals	77

## Capítol 2 : Síntesi de nucleopèptids en fase sòlida mitjançant una estratègia lineal

1.	Disseny de l'estratègia lineal de síntesi	79
1.1	Elecció de l'esquema global de síntesi	79
1.2	Elecció de l'esquema de protecció	81
	a) Elecció de la matriu sòlida	83
	b) Elecció del tipus d'unió a la resina	83
	c) Elecció del grup protector temporal del grup α-amino i dels grups protectors permanents de les cadenes laterals del pèptid	86

	d) Elecció del mètode de síntesi i dels grups protectors permanents de l'oligonucleòtid	86
2	Obtenció del nucleopèptid Phac-Phe-Val-Ser(p <sup>3'</sup> ACT)-Gly-OH (56)	88
2.1	Síntesi de la peptidil-resina Phac-Phe-Val-Ser-Gly-NPE-Leu-NHCH <sub>2</sub> -PS (53)	89
2.2	Obtenció de la nucleopeptidil-resina (55)	90
2.3	Desprotecció i alliberament del nucleopèptid de la resina (55)	90
2.4	Purificació del nucleopèptid Phac-Phe-Val-Ser(p <sup>3'</sup> ACT)-Gly-OH	94
2.5	Caracterització del nucleopèptid Phac-Phe-Val-Ser(p <sup>3'</sup> ACT)-Gly-OH	95
3	Obtenció dels nucleopèptids regioisòmers Phac-Ser(p CATCAT)-Gly-Asp-OH (61a, b)	97
3.1	Síntesi de la peptidil-resina Phac-Ser-Gly-Asp(O <sup>F</sup> m)-NPE-Leu-NHCH <sub>2</sub> -PS (59)	99
3.2	Obtenció de les nucleopeptidil-resines 60a,b	99
3.3	Tractaments de desprotecció i alliberament dels nucleopèptids de les resines 60a,b	100
3.4	Purificació dels nucleopèptids Phac-Ser(p CATCAT)-Gly-Asp-OH (61a: isòmer 3'; 61b: isòmer 5')	101
3.5	Caracterització dels nucleopèptids Phac-Ser(p CATCAT)-Gly-Asp-OH (61a: isòmer 3'; 61b: isòmer 5')	103
4	Comparació de l'estabilitat de diferents nucleopèptids	104
4.1	Estabilitat dels diferents nucleopèptids als tractaments bàsics	104
4.2	Estabilitat a exonucleases dels diferents nucleopèptids	107

### Capítol 3 : Disseny de l'esquema de protecció en síntesi de nucleopèptids.

#### Síntesi de derivats de nucleòsids i aminoàcids, i de compostos patró.

1.	Proves preliminars relacionades amb el disseny de l'esquema de protecció en la síntesi de nucleopèptids	112
1.1	Avaluació de l'estabilitat de la unió fosfat dels derivats Boc-Ser(p T-DMT)-NHcHex (21) a diferents tractaments bàsics	114
	a) Síntesi dels derivats Boc-Ser(PO(OCNE) T-DMT)-NHcHex (20a,b)	114
	b) Proves d'estabilitat dels derivats Boc-Ser(p T-DMT)-NHcHex (21a,b) als tractaments bàsics	115

1.2	Avaluació de la labilitat de diferents grups protectors dels grups amino exocíclics de les nucleobases a diferents tractaments bàsics	118
1.3	Avaluació de la labilitat de diferents grups protectors del grup $\beta$ -carboxil del residu d'àcid aspàrtic a diferents tractaments bàsics	122
1.4	Avaluació de la labilitat de la unió nucleòsid-(succinil-resina) a diferents tractaments bàsics	124
1.5	Avaluació dels espaiadors bifuncionals NPE i Nbb per a la síntesi lineal de nucleopèptids en fase sòlida	127
	a) Avaluació de la labilitat als tractaments bàsics de la unió aminoàcid-resina Boc-Gly-R-Leu-NHCH <sub>2</sub> -PS (R: NPE, Nbb)	127
	b) Avaluació de la unió NPE per a l'obtenció del pèptid Phac-Phe-Val-Ser-Gly-X (54)	129
2	Obtenció de derivats d'aminoàcid emprats a la síntesi de nucleopèptids. Disseny i avaluació del grup 2-(4-acetil-3-nitrofenil)etil com a nou grup protector del grup $\beta$ -carboxil de l'àcid aspàrtic i $\gamma$ -carboxil de l'àcid glutàmic	132
2.1	Obtenció de l'1-[4-(2-hidroxietil)-3-nitrofenil]-1-etanona (64)	132
2.2	Obtenció dels derivats $\beta$ -ester de l'àcid N $^{\alpha}$ - <i>t</i> -butoxicarbonilaspàrtic Boc-Asp(OX)-OH i $\gamma$ -ester de l'àcid N $^{\alpha}$ - <i>t</i> -butoxicarbonilglutàmic Boc-Glu(OX)-OH	134
2.3	Avaluació de l'estabilitat del grup protector 2-(4-acetil-3-nitrofenil)etil als reactius emprats en la síntesi de pèptids	135
3	Obtenció de derivats de nucleòsid emprats en la síntesi dels nucleopèptids	136
3.1	Obtenció dels derivats 3'-O-(2-cianoetil)-N,N-diisopropilfosforamidit dels nucleòsids 5'-O-dimetoxitritil-4-N-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-2'-desoxicitidina i 5'-O-dimetoxitritil-2-N-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-2'-desoxiadenosina (84a,b)	136
3.2	Obtenció dels derivats 5'-O-(2-cianoetil)-N,N-diisopropilfosforamidit dels nucleòsids 3'-O-dimetoxitritiltimidina (89a), 3'-O-dimetoxitritil-4-N-isobutiril-2'-desoxicitidina (89b) i 3'-O-dimetoxitritil-2-N-dimetilaminometilen-2'-desoxiadenosina (89c)	138
4	Obtenció de nucleòsids 3'-N,N-dialquil-H-fosfonamidat. Avaluació de la seva utilització com a intermedis en la síntesi dels oligonucleòtids	140
4.1	Obtenció de 5'-O-Dimetoxitritil-timidina-3'-N,N-dialquil-H-fosfonamidats (91)	141

4.2	Avaluació de 5'-O-Dimetoxitritil-timidina-3'-N,N-dialquil-H-fosfonamidats (91) com a intermedis en la síntesi dels oligonucleòtids	143
5.	Obtenció de nucleòsids i oligonucleòtids emprats com a productes patró	145
5.1	Obtenció dels derivats fosfat de timidinil i d'O-dimetoxitritiltimidinil	145
	a) Obtenció dels isòmers 3' i 5' del fosfat d'O-dimetoxitritiltimidinil (92a,b)	145
	b) Obtenció del fosfat d' O-5'-timidinil (93a)	146
5.2	Obtenció dels derivats H-fosfonat de timidinil i d'O-dimetoxitritiltimidinil	146
	a) Obtenció dels isòmers 3' i 5' dels H-fosfonat i d'O-2-cianoetil i O-dimetoxitritiltimidinil (94a,b)	146
	b) Obtenció dels isòmers 3' i 5' de l'H-fosfonat d'O-dimetoxitritiltimidinil (95a,b)	146
	c) Obtenció de l'H-fosfonat d'O-3'-timidinil (96a)	147
5.3	Obtenció dels oligonucleòtids $^5\text{CATCAT}$ , $p^5\text{CATCAT}$ i $Hp^5\text{CATCAT}$	147
	a) Obtenció de $^5\text{CATCAT}$ (35)	147
	b) Obtenció de $p^5\text{CATCAT}$ (34)	148
	c) Obtenció de $Hp^5\text{CATCAT}$ (33)	148
	d) Obtenció de bis(2-cianoetoxi)diisopropilaminofosfina (98)	149

### Secció experimental :

#### Materials i mètodes generals :

I.	Instrumentació general	151
II.	Cromatografia	151
III.	Síntesi de pèptids	152
IV.	Síntesi d'oligonucleòtids	153
V.	Quantificació d'oligonucleòtids per absorció UV	154
VI.	Determinació de la funcionalització de resines de síntesi	154
VII.	Composició en aminoàcids i nucleòsids	155
VIII.	Reactius de desprotecció i desanclatge de resines	155
IX.	Dissolvents i productes generals	155

## Secció experimental Capítol 1 :

2	Obtenció del nucleopèptid Boc-Ser(p <sup>5</sup> TCT)NHcHex (25)	157
2.1	Síntesi de N <sup>α</sup> - <i>t</i> -butoxicarbonil-L-serina-ciclohexilamida β-O-(2-cianoetil)-N,N-diisopropilfosforamidit (23)	157
2.2	Obtenció de l'oligonucleotidil-resina HO-T-C <sup>Fmoc</sup> -T-suc-NHCH <sub>2</sub> -PS (23)	157
2.3	Acoblament de Boc-Ser(P(OCNE)NiPr <sub>2</sub> )-NHcHex sobre l'oligonucleotidil-resina 23	157
2.4	Desprotecció i desancoratge	157
2.5	Purificació i caracterització	158
2.6	Proves d'estabilitat a tractaments bàsics	158
3	Intents d'obtenció del nucleopèptid Ac-Ser(p <sup>5</sup> CATCAT)-Gly-Asp-NH <sub>2</sub> (32) mitjançant l'estratègia convergent	158
3.1	Obtenció dels pèptids protegits Ac-Ser-Gly-Asp(OX)-NH <sub>2</sub> (X : Fm 28a, X : Anpe 28b, X : Bzl 28c) i Ac-Asn-Ser-Gly-Asp(OFm)-NH <sub>2</sub> (29)	158
	a) Síntesi dels pèptids 28a, 28b i 29	158
	b) Síntesi del pèptid 28c	160
3.2	Preparació de les oligonucleotidil-resines C <sup>x</sup> -A <sup>y</sup> -T-C <sup>x</sup> -A <sup>y</sup> -T-suc-R (30a: x=Fmoc, y=Fmoc, R=NHCH <sub>2</sub> -PS; 30b : x=iBu, y=Bz, R=LCAA-CPG; 30c : x=iBu, y=Dmf, R=LCAA-CPG)	161
3.3	Obtenció dels pèptids O-(2-cianoetil)-N,N-diisopropilfosforamidit 31a, 31b, 31c	161
3.4	Acoblament dels pèptids fosforamidit 31 a les oligonucleotidil-resines 30	162
3.5	Desprotecció i desancoratge de la resina dels productes d'acoblament	162
3.6	Purificació i caracterització dels productes obtinguts en els assajos d'acoblament	162
3.7	Reacció de l'H-fosfonamidat d'O-(2-cianoetil) i N,N-diisopropil (72) amb grups hidroxil	164
	a) H-fosfonamidat d'O-(2-cianoetil) i N,N-diisopropil : H-PO(OCNE)NiPr <sub>2</sub> (72)	164
	b) Intents de fosfilitació d'oligonucleotidil-resines per reacció amb l'H-fosfonamidat 72	164
	c) H-fosfonat d'O-2-cianoetil i O-5'-(3'-O-fenoxiacetil-4-N-toluil)desoxicidina : H-PO(OCNE)-dC <sup>Tol</sup> -Pac (73)	164

4	Proves addicionals encaminades a la caracterització i determinació del mecanisme de formació del producte <b>X</b> en els intents d'obtenció del nucleopèptid Ac-Ser(p <sup>5</sup> CATCAT)-Gly-Asp-NH <sub>2</sub>	165
4.1	Seguiment del procés d'obtenció d'un nucleopèptid, per acoblament d'un pèptid fosforamidat amb un derivat de nucleòsid	165
	a) Intents d'obtenció de Ac-Ser(p <sup>3</sup> T-DMT)-Gly-Asp-NH <sub>2</sub>	165
	b) Intent d'obtenció de Ac-Ser(p <sup>5</sup> T)-Gly-Asp-NH <sub>2</sub>	166
	c) Síntesi de H-Ser(p <sup>5</sup> T)-Gly-Leu-NH <sub>2</sub> ( <b>38</b> )	166
4.2	Proves de reactivitat de grups carbamoil enfront de derivats fosfítants. Aplicació en l'obtenció del derivat N-acilfosforamidat DMT-T-PO(OCNE)NHCOCH <sub>2</sub> Ph. Proves d'estabilitat del derivat N-acilfosforamidat a diferents tractaments	167
	a) Obtenció de (2-cianoetoxi)diisopropilamino(fenilacetamido)fosfina: PhCH <sub>2</sub> CONH-P(OCNE)NiPr <sub>2</sub> ( <b>39</b> )	167
	b) Obtenció del fosforamidat d'O-2-cianoetil, O-3'-(5'-O-dimetoxitritil)timidinil i N-fenilacetil: DMT-T-PO(OCNE)NHCOCH <sub>2</sub> Ph ( <b>40</b> )	168
	c) Fosforamidat d'O-3'-(5'-O-dimetoxitritil)timidinil i N-fenilacetil: DMT-T-PO(O <sup>-</sup> )NHCOCH <sub>2</sub> Ph ( <b>41</b> )	168
	d) Proves d'estabilitat sobre el fosforamidat <b>41</b>	168
5.	Obtenció dels anàlegs nucleopeptídics Ac-Ser-Gly-Asp-NH-p <sup>5</sup> T ( <b>45</b> ) i Ac-Ser-Gly-Asp-NH-p <sup>5</sup> CATCAT ( <b>46</b> )	169
5.1	Síntesi del pèptid Ac-Ser(Ac)-Gly-Asp(OFm)-NH <sub>2</sub> ( <b>43</b> )	169
5.2	Obtenció de Ac-Ser(Ac)-Gly-Asp(OFm)-NH-P(OCNE)NiPr <sub>2</sub> ( <b>44</b> )	169
5.3	Acoblament del pèptid fósfordiamidit <b>44</b> sobre T-suc-NHCH <sub>2</sub> -PS: obtenció de l'anàleg nucleopeptídic <b>45</b>	169
5.4	Acoblament del pèptid fósfordiamidit <b>44</b> sobre CATCAT-suc-NHCH <sub>2</sub> -PS ( <b>97</b> ): obtenció de l'anàleg nucleopeptídic <b>46</b>	170

## Secció Experimental Capítol 2

1.	Obtenció de les peptidil-resines Phac-Phe-Val-Ser-Gly-NPE-Leu-NHCH <sub>2</sub> -PS ( <b>53</b> ) i Phac-Ser-Gly-Asp(OFm)-NPE-Leu-NHCH <sub>2</sub> -PS ( <b>59</b> )	173
1.1	H-Leu-NHCH <sub>2</sub> -PS ( <b>47</b> )	173
1.2	Boc-Gly-NPE-Leu-NHCH <sub>2</sub> -PS ( <b>52a</b> )	173
1.3	Boc-Asp(OFm)-NPE-Leu-NHCH <sub>2</sub> -PS ( <b>58</b> )	173

1.4	Phac-Phe-Val-Ser-Gly-NPE-Leu-NHCH <sub>2</sub> -PS (53) i Phac-Ser-Gly-Asp(O <sup>o</sup> Me)-NPE-Leu-NHCH <sub>2</sub> -PS (59)	174
2	Obtenció del nucleopèptid Phac-Phe-Val-Ser(p <sup>3</sup> ACT)-Gly-OH (56)	174
2.1	Obtenció de la nucleopeptidil-resina (60)	174
2.2	Desprotecció i desancoratge de la resina	174
2.3	Purificació del nucleopèptid 56	175
2.4	Caracterització del nucleopèptid 56	175
2.5	Proves d'estabilitat sobre el nucleopèptid 56	176
3	Obtenció dels nucleopèptids regioisòmers Phac-Ser(p CATCAT)-Gly-Asp-OH (isòmer 3' 61a) i (isòmer 5' 61b)	176
3.1	Obtenció de les nucleopeptidil-resines 60a, 60b	176
3.2	Desprotecció i desancoratge de les resines	177
3.3	Purificació dels nucleopèptids 61a i 61b	177
3.4	Caracterització dels nucleopèptids 61a i 61b	178
3.5	Proves d'estabilitat dels nucleopèptids 61a i 61b	179

### Secció Experimental Capítol 3

1.	Proves preliminars relacionades amb el disseny dels esquemes de protecció en síntesi de nucleopèptids	181
1.1	Proves d'estabilitat de la unió fosfat dels derivats Boc-Ser(p T-DMT)-NHcHex (21a, 21b) a diferents tractaments bàsics	181
	a) Obtenció dels nucleopèptids model Boc-Ser(p T-DMT)-NHcHex (isòmer 3' 21a, isòmer 5' 21b)	181
	b) Proves d'estabilitat dels derivats 21a, 21b a diferents tractaments bàsics	182
1.2	Proves de labilitat de diferents grups protectors de les nucleobases a diferents tractaments bàsics	182
1.3	Proves de labilitat de diferents grups protectors del grup β-carboxil en els derivats Boc-Asp(OX)-OH a diferents tractaments bàsics	183
1.4	Proves de labilitat de la unió nucleòsid-(succinil-resina) a diferents tractaments bàsics	183
1.5	Proves de labilitat a diferents tractaments bàsics de la unió -Gly-R-Leu-NHCH <sub>2</sub> -PS (R: Nbb, NPE)	183
	a) Obtenció de Boc-Gly-Nbb-Leu-NHCH <sub>2</sub> -PS (52b)	183

	b) Proves de labilitat de les aminoacil-resines	
	Boc-Gly-R-Leu-NHCH <sub>2</sub> -PS (R: NPE <a href="#">52a</a> ; Nbb <a href="#">52b</a> )	184
	c) Proves d'alliberament de pèptid de la resina	
	Phac-Phe-Val-Ser-Gly-NPE-Leu-NHCH <sub>2</sub> -PS ( <a href="#">53</a> ):	
	Obtenció dels pèptids Phac-Phe-Val-Ser-Gly-X ( <a href="#">54a-c</a> ; X; OH, OCH <sub>3</sub> , NH <sub>2</sub> )	184
2	Obtenció de derivats d'aminoàcid emprats a la síntesi de nucleopèptids.	
	Obtenció de l'1-[4-(2-hidroxietil)-3-nitrofenil]-1-etanona.	
	Proves d'estabilitat del grup 2-(4-acetil-3-nitrofenil)etil als reactius de síntesi de pèptids	185
2.1	Obtenció de l'1-[4-(2-hidroxietil)-3-nitrofenil]-1-etanona ( <a href="#">64</a> )	185
2.2	Obtenció dels β-esters de l'àcid N <sup>α</sup> - <i>t</i> -butoxicarbonil-L-aspartic: Boc-Asp(OX)-OH X: 2-cianoetil ( <a href="#">65</a> ), 2-(4-nitrofeniletíl) ( <a href="#">66</a> ), 2-(4-acetil-3-nitrofenil)etil ( <a href="#">67</a> )	186
2.3	Obtenció del γ-ester 2-(4-acetil-3-nitrofenil)etíllic de l'àcid N <sup>α</sup> - <i>t</i> -butoxicarbonil-L-glutàmic: Boc-Glu(OAnpe)-OH ( <a href="#">68</a> )	187
2.4	Proves d'estabilitat del grup protector 2-(4-acetil-3-nitrofenil)etil als reactius emprats en la síntesi de pèptids	188
3	Obtenció dels derivats de nucleòsid emprats en la síntesi de nucleopèptids	188
3.1	Obtenció de 5'-O-dimetoxitritil-2'-desoxiribonucleòsids 3'-O-(2-cianoetil)-N,N-diisopropilfosforamidit (derivats dC <sup>Fmoc</sup> <a href="#">84a</a> , dA <sup>Fmoc</sup> <a href="#">84b</a> )	188
3.2	Obtenció de 3'-O-Dimetoxitritil-2'-desoxiribonucleòsids 5'-O-(2-cianoetil)- N,N-diisopropilfosforamidit (derivats: T <a href="#">89a</a> , C <sup>iBu</sup> <a href="#">89b</a> , A <sup>Dmf</sup> <a href="#">89c</a> )	190
4	Obtenció de derivats 3'-N,N-dialquil-H-fosfonamidat de 5'-O-dimetoxitritiltimidina. Avaluació dels derivats 3'-N,N-dialquil-H-fosfonamidats com a intermedis en la síntesi d'oligonucleòtids	193
4.1	Obtenció de clorobis(dialquilamino)fosfines Cl-P(NR <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> (NR <sub>2</sub> : pirrolidino <a href="#">90a</a> , dietilamino <a href="#">90b</a> , dimetilamino <a href="#">90c</a> )	193
4.2	Obtenció de 5'-O-dimetoxitritil-timidina 3'-N,N-dialquil- H-fosfonamidat DMT-T-PO(H)NR <sub>2</sub> (NR <sub>2</sub> : pirrolidino <a href="#">91a</a> , NR <sub>2</sub> ; dietilamino <a href="#">91b</a> )	193
4.3	Assajos d'acoblament sobre T-suc-CPG dels nucleòsids H-fosfonamidat DMT-T-PO(H)NR <sub>2</sub> (NR <sub>2</sub> : pirrolidino <a href="#">91a</a> i dietilamino <a href="#">91b</a> )	194
5	Obtenció dels nucleòsids i oligonucleòtids emprats com a patrons	194
5.1	Obtenció dels derivats fosfat dels nucleòsids timidina i 5'-O-dimetoxitritiltimidina	194
	a) Isòmers 5' i 3' del fosfat d'O-dimetoxitritiltimidinil: p <sup>5'</sup> T-DMT ( <a href="#">92a</a> ), DMT-T <sup>3'</sup> p ( <a href="#">92b</a> )	194
	b) Fosfat d'O-5'-timidinil: p <sup>5'</sup> T ( <a href="#">93a</a> )	194



5.2	Obtenció dels derivats H-fosfonat dels nucleòsids timidina i 5'-O-dimetoxitritimidina	195
	a) Isòmers 5' i 3' de l'H-fosfonat d'O-2-cianoetil i O-dimetoxitritimidinil:	
	5'-CNEO(H)PO-T-DMT (94a) i DMT-T-3'-PO(H)OCNE (94b)	195
	b) Isòmers 5' i 3' de l'H-fosfonat d'O-dimetoxitritimidinil:	
	5'-NH <sub>4</sub> O(H)PO-T-DMT (95a) i DMT-T-3'-PO(H)ONH <sub>4</sub> (95b)	195
	c) H-fosfonat d'O-3'-timidinil: T-3'-PO(H)OEt <sub>3</sub> NH (96a)	195
5.3	Obtenció dels oligonucleòtids 5'CATCAT, p <sup>5</sup> CATCAT i Hp <sup>5</sup> CATCAT	195
	a) 5'CATCAT (35)	195
	b) p <sup>5</sup> CATCAT (34)	195
	c) Hp <sup>5</sup> CATCAT (33)	196
	d) Bis(2-cianoetoxi)diisopropilaminofosfina (98)	196
	<b>CONCLUSIONS</b>	197

## Index de figures :

I.1	Enllaços covalents aminoàcid-nucleòsid en les nucleoproteïnes naturals	1
I.2	Model de replicació per iniciació de proteïna de l'ADN d'adenovirus	3
I.3	Model del complex ternari format per un anàleg de l'antibiòtic camptothecina (7-metil-10-bromoacetamidometilcamptothecina), la topoisomerasa I i l'ADN	4
I.4	Esquemes convergent i lineal en la síntesi d'un nucleopèptid	8
I.5	Trencament de l'enllaç entre el pèptid i l'oligonucleòtid per un mecanisme de $\beta$ -eliminació	9
1.1	Esquema de síntesi d'un nucleopèptid en fase sòlida mitjançant una estratègia de tipus convergent	19
1.2	Esquema de protecció emprat en la síntesi de nucleopèptids mitjançant una estratègia de tipus convergent	21
1.3	Síntesi del nucleopèptid Boc-Ser(p <sup>5</sup> TCT)-NHcHex	30
1.4	Obtenció de BocSer(P(OCNE)NiPr <sub>2</sub> )NHcHex	30
1.5	Obtenció del nucleopèptid Boc-Ser(p <sup>5</sup> TCT)NHcHex	33
1.6	Intents d'obtenció del nucleopèptid Ac-Ser(p <sup>5</sup> CATCAT)-Gly-Asp-OH	36
1.7	Obtenció dels pèptids Ac-Asn-Ser-Gly-Asp(O <sup>F</sup> m)-NH <sub>2</sub> i Ac-Ser-Gly-Asp(OX)-NH <sub>2</sub> (X : Fm, Anpe, Bzl)	37
1.8	Obtenció i purificació del pèptid Ac-Asn-Ser-Gly-Asp(O <sup>F</sup> m)-NH <sub>2</sub>	39
1.9	Possible formació del producte benzilat Ac-Asn-Ser-Gly-Asp(O <sup>F</sup> m <sup>Bzl</sup> )-NH <sub>2</sub> durant la desprotecció amb HF líquid	39
1.10	Oligonucleotidil-resina C <sup>x</sup> -A <sup>y</sup> -T-C <sup>x</sup> -A <sup>y</sup> -T-suc-R	42
1.11	Obtenció dels derivats fosforamidit dels pèptids	44
1.12	Formació de H-PO(OCNE)NiPr <sub>2</sub> com a subproducte en la reacció de fosfitilació	45
1.13	Experiments de fosforilació per part de H-PO(OCNE)NiPr <sub>2</sub> en presència de catalitzadors àcids	46
1.14	Separació de l'excés de fosfina	47
1.15	Intents d'obtenció del nucleopèptid <b>32</b> (assajos 5-8, Taula 1.4)	53
1.16	Anàlisi del producte <b>X</b> per diferents tècniques	55
1.17	Possible mecanisme de formació de l'oligonucleòtid Hp <sup>5</sup> CATCAT en els assajos d'obtenció del nucleopèptid	59
1.18	Diferenciació cromatogràfica dels productes <b>X</b> i Hp <sup>5</sup> CATCAT	59
1.19	Intent d'obtenció del nucleopèptid Ac-Ser(p <sup>3</sup> T-DMT)-Gly-Asp-NH <sub>2</sub>	60
1.20	Esquema d'obtenció del nucleopèptid Ac-Ser(p <sup>5</sup> T)-Gly-Asp-NH <sub>2</sub>	62
1.21	Esquema de síntesi del nucleopèptid H-Ser(p <sup>5</sup> T)-Gly-Asp-NH <sub>2</sub>	62
1.22	Reacció de la fenilacetamida amb Cl-P(OCNE)NiPr <sub>2</sub> en presència de DIEA	65
1.23	Mètodes descrits per a l'obtenció de derivats N-acilfosforamidat	66
1.24	Obtenció de derivats N-acilfosforamidat	66

1.25	Possibles reaccions en què intervé el grup carbamoil en les etapes de fosfitilació del pèptid i d'acoblament sobre l'oligonucleotidil-resina en els assajos de l'estratègia convergent	68
1.26	Estructura de l'antibiòtic fosmidosina i dels possibles anàlegs nucleopeptídics amb un enllaç de tipus N-acilfosforamidat entre el pèptid i l'oligonucleòtid	71
1.27	Esquema de síntesi dels anàlegs nucleopeptídics Ac-Ser-Gly-Asp-NH-p <sup>5</sup> T i Ac-Ser-Gly-Asp-NH-p <sup>5</sup> CATCAT	72
1.28	Obtenció del pèptid fósforodiamidit Ac-Ser(Ac)-Gly-Asp(OFm)-NH-P(OCNE)NiPr <sub>2</sub>	73
1.29	Esquema de síntesi de l'anàleg nucleopeptídic Ac-Ser-Gly-Asp-NH-p <sup>5</sup> T	73
1.30	Esquema de síntesi de l'anàleg nucleopeptídic Ac-Ser-Gly-Asp-NH-p <sup>5</sup> CATCAT	75
2.1	Esquema de síntesi d'un nucleopèptid en fase sòlida mitjançant una estratègia de tipus lineal	81
2.2	Esquema de protecció emprat en la síntesi de nucleopèptids mitjançant una estratègia lineal	82
2.3	Formació de l'enllaç fosfat entre el pèptid i el primer nucleòsid, per mitjà de nucleòsid 3' o 5'-fosforamidits	87
2.4	Esquema de síntesi del nucleopèptid Phac-Phe-Val-Ser(p <sup>3</sup> ACT)-Gly-OH	89
2.5	Seguiment del tractament amb K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> en MeOH/dioxà del producte alliberat de la resina (Zona etapa, experiment 2 de la Taula 2.2)	93
2.6	Obtenció del nucleopèptid Phac-Phe-Val-Ser(p <sup>3</sup> ACT)-Gly-OH	94
2.7	Experiments de digestió enzimàtica sobre el nucleopèptid Phac-Phe-Val-Ser(p <sup>3</sup> ACT)-Gly-OH	96
2.8	Esquema de síntesi dels nucleopèptids regioisòmers Phac-Ser(p <sup>3</sup> CATCAT)-Gly-Asp-OH i Phac-Ser(p <sup>5</sup> CATCAT)-Gly-Asp-OH	98
2.9	Obtenció del nucleopèptid Phac-Ser(p <sup>3</sup> CATCAT)-Gly-Asp-OH	102
2.10	Obtenció del nucleopèptid Phac-Ser(p <sup>5</sup> CATCAT)-Gly-Asp-OH	102
2.11	Acció de les exonucleases sobre oligonucleòtids modificats als extrems 3' o 5'	108
3.1	Esquema de protecció a les estratègies de síntesi convergent i lineal	112
3.2	Obtenció dels derivats Boc-Ser(p T-DMT)-NHcHex	115
3.3	Possible transformació entre els productes en les proves d'estabilitat	116
3.4	Trencament de la unió nucleòsid-succinil-resina	125
3.5	Obtenció de les resines Boc-Gly-R-Leu-NHCH <sub>2</sub> -PS	127
3.6	Mecanismes d'escissió de la unió pèptid-NPE resina	131
3.7	Obtenció de l'1-[4-(2-hidroxietil)-3-nitrofenil]-1-etanona	133
3.8	Mètodes d'obtenció dels derivats Boc-Asp(OX)-OH	135
3.9	Obtenció dels derivats 5'-DMT-dC <sup>Fmoc</sup> -3'-P(OCNE)NiPr <sub>2</sub> i 5'-DMT-dA <sup>Fmoc</sup> -3'-P(OCNE)NiPr <sub>2</sub>	137
3.10	Obtenció dels derivats 5'-iPr <sub>2</sub> N(CNEO)P-T-3'-DMT, 5'-iPr <sub>2</sub> N(CNEO)P-dC <sup>iBu</sup> -3'-DMT i 5'-iPr <sub>2</sub> N(CNEO)P-dA <sup>Dmf</sup> -3'-DMT	138

3.11	Comparació de la reactivitat pels derivats N,N-dialquilfosforamidit i pels derivats N,N-dialquil-H-fosfonamidat	140
3.12	Obtenció de derivats H-fosfonat per hidròlisi de derivats fósforodiamidit	141
3.13	Obtenció dels derivats DMT-T-PO(H)NR <sub>2</sub>	142
3.14	Obtenció dels derivats fosfat de timidinil i d'O-dimetoxitritiltimidinil	145
3.15	Obtenció dels derivats H-fosfonat de timidinil i d'O-dimetoxitritiltimidinil	146
3.16	Obtenció dels oligonucleòtids 5'CATCAT, p <sup>5</sup> CATCAT, Hp <sup>5</sup> CATCAT	147
3.17	Obtenció de (CNEO) <sub>2</sub> PNiPr <sub>2</sub>	149
I	Crus de síntesi dels pèptids Ac-Ser-Gly-Asp(OAnpe)-NH <sub>2</sub> (28b) i Ac-Ser-Gly-Asp(OBzl)-NH <sub>2</sub> (28c)	160
II	Obtenció del nucleopèptid H-Ser(p <sup>5</sup> T)-Gly-Asp-NH <sub>2</sub> (38)	166
III	Obtenció de l'anàleg Ac-Ser-Gly-Asp-NH-p <sup>5</sup> T (45)	170
IV	Obtenció de l'anàleg Ac-Ser-Gly-Asp-NH-p <sup>5</sup> CATCAT (46)	171
V	Diferenciació cromatogràfica dels nucleopèptids regioisòmers 61a i 61b	177

#### Index de Taules :

I.1	Síntesis de nucleopèptids descrites a la bibliografia	11-13
1.1	Labilitat dels grups protectors habituals en els mètodes de síntesi de pèptids i d'oligonucleòtids	20
1.2	Grups protectors de grups carboxil descrits per a la síntesi de pèptids i làbils a condicions bàsiques	25
1.3	Grups protectors de les nucleobases emprats a la síntesi d'oligonucleòtids	27
1.4	Intents d'obtenció del nucleopèptid Ac-Ser(p <sup>5</sup> CATCAT)-Gly-Asp-NH <sub>2</sub> mitjançant una estratègia convergent	49
2.1	Unions pèptid-resina làbils a tractaments bàsics	84
2.2	Intents d'obtenció del nucleopèptid Phac-Phe-Val-Ser(p <sup>3</sup> ACT)-Gly-OH	91
2.3	Estabilitat dels nucleopèptids 25, 56, 61a, 61b, 45 i 46 a diferents tractaments bàsics	105
2.4	Estabilitat enzimàtica de 3' i 5' nucleopèptids	107
3.1	Estabilitat dels nucleopèptids 21a,b a diferents tractaments bàsics	116
3.2	Labilitat de diferents protectors dels grups amino exocíclics de nucleobases a diferents tractaments bàsics	119
3.3	Estabilitat de diferents grups protectors de nucleobases a NH <sub>3</sub> aquós concentrat en dioxà, a temperatura ambient	121
3.4	Labilitat de diferents grups protectors del grup β-carboxil del derivat Boc-Asp(OX)-OH a diferents tractaments bàsics	123

---

3.5	Labilitat de l'enllaç oligonucleòtid-(succinil-resina) a diferents tractaments bàsics	125
3.6	Labilitat de la unió aminoàcid-resina Boc-Gly-R-Leu-NHCH <sub>2</sub> -PS (R : Nbb <u>52a</u> , NPE <u>52b</u> ) a diferents tractaments bàsics	128
3.7	Alliberament de pèptid de la resina Phac-Phe-Val-Ser-Gly-NPE-Leu-NHCH <sub>2</sub> -PS <u>53</u> amb diferents tractaments bàsics	130
3.8	Proves de reacció amb DMT-T-PO(H)NR <sub>2</sub>	144
I	Cicle de síntesi de pèptids	152
II	Cicle de síntesi d'oligonucleòtids	154

**TÈCNIQUES :**

CE :	electroforesi capil·lar
EM :	espectrometria de masses
-CI :	d'ionització química
-EI :	d'impacte electrònic
-ES :	per electrospray
-FAB :	per bombardeig amb àtoms ràpids
HPLC :	cromatografia líquida d'alta eficàcia
IR :	espectroscòpia d'infrarroig
MPLC :	cromatografia líquida de mitja pressió
RMN :	espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear
UV :	espectroscòpia d'ultraviolat-visible

**DISSOLVENTS i REACTIUS :**

ACN :	acetonitril
AcOH :	àcid acètic
AcOEt :	acetat d'etil
Ac <sub>2</sub> O :	anhídrid acètic
AP :	fosfatasa alcalina (E.C. 3.1.3.1)
CPG (o LCAA-CPG) :	boles de vidre de porus controlat, funcionalitzades amb braços aminoalquílics de cadena llarga
DCC :	diciclohexilcarbodiimida
DCM :	diclorometà
DIEA :	N,N-diisopropilètilamina
DMAP :	4-N,N-dimetilaminopiridina
DMF :	N,N-dimetilformamida
EtOH :	etanol
HBTU :	hexafluorofosfat de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluroni
HOBt :	1-hidroxibenzotriazole
MeOH :	metanol
NBA :	alcohol nitrobenzílic
NMI :	N-metilimidazole
oNPT :	5-( <i>o</i> -nitrofenil)tetrazole
PS :	poliestirè- <i>co</i> -1%-divinilbenzè
MBHA :	<i>p</i> -metilbenzohidrilamina
SpPD :	fosfodiesterasa de melsa (E.C. 3.1.16.1)
SVPD :	fosfodiesterasa de verí de serp (E.C. 3.1.4.1)

TEAA :	acetat de trietilamoni
TEAB :	bicarboant de trietilamoni
TBAF :	fluorur de tetrabutilamoni
TCA :	àcid tricloroacètic
TFA :	àcid trifluoroacètic
THF :	tetrahidrofuran
Tris :	tris(hidroximetil)aminometà

**GRUPS PROTECTORS :**

Ac :	acetil
Anpe :	4-acetil-3-nitrofeniletíl
Boc :	<i>t</i> -butoxicarbonil
Bz :	benzoíl
Bzl :	benzil
cHex :	ciclohexil
CNE :	2-cianoetil
Dmf :	N,N-dimetilaminometilè
Dnpe :	2,4-dinitrofeniletíl
DMT :	4,4'-dimetoxitritil
Et :	etil
Fm :	9-fluorenilmetil
Fmoc :	9-fluorenilmetoxicarbonil
iBu :	isobutiril
iPr :	isopropil
Me :	metil
Nbb :	espaiador bifuncional àcid 4-(hidroximetil)-3-nitrobenzoic
Ne :	4-nitroetil
Npe :	4-nitrofeniletíl (no confondre amb NPE)
NPE :	espaiador bifuncional àcid 4-(2-hidroxietil)-3-nitrobenzoic
Pac :	fenoxiacetil
Phac :	fenilacetil
TBDMS :	<i>t</i> -butildimetilsilil
tBu :	<i>t</i> -butil
Tcp :	2,4,5-triclorofenil
TMS :	trimetilsilil
Tol :	toluíl

**UNITATS i MESURES :**

OD <sub>260</sub> :	mesura d'absorbància a 260 nm d'una solució d'oligonucleòtid contingut en 1 mL i mesurada en una cubeta de 1 cm de pas de cel.la
pf:	punt de fusió (°C)
PM:	pes molecular
Rf:	factor de retenció (cromatografia sobre capa fina)
t <sub>R</sub> :	temps de retenció (cromatografia líquida, electroforesi capil.lar)

**ALTRES :**

Ar:	senyals a <sup>1</sup> H RMN pertanyents a anells aromàtics
C <sub>arom</sub> :	senyals a <sup>13</sup> C RMN pertanyents a anells aromàtics
Cq:	senyals a <sup>13</sup> C RMN pertanyents a carbonis quaternaris

**AMINOÀCIDS i PÈPTIDS :**

S'ha seguit la nomenclatura de tres lletres per als aminoàcids.

R <sub>1</sub> -Aa <sup>1</sup> (R <sub>2</sub> )-Aa <sup>2</sup> ...-Aa <sup>n</sup> -R <sub>3</sub>	Aa <sup>i</sup> : aminoàcid
	R <sub>1</sub> : protector extrem amino
	R <sub>2</sub> : protectors cadenes laterals
	R <sub>3</sub> : protector extrem carboxil

**NUCLEÒSIDS, OLIGONUCLEÒTIDS i NUCLEOPÈPTIDS :**

S'ha utilitzat la nomenclatura d'una lletra per als nucleòsids.

R <sub>1</sub> -Nu <sup>R2</sup> -R <sub>3</sub> :	Nu (o dNu): 2'-desoxiribonucleòsid
	R <sub>1</sub> : protector grup hidroxil 5' de desoxiribosa
R <sub>1</sub> -Nu <sup>R2</sup> -PO(OR')-Nu <sup>R2'</sup>	R <sub>2</sub> , R <sub>2'</sub> : protectors grup amino exocíclic de la base
	R <sub>3</sub> : protector grup hidroxil 3' de desoxiribosa
	R': protector enllaç fosfat
p Nu / Nu p	Nucleòsid 5'-fosfat / Nucleòsid 3'-fosfat
H <sub>p</sub> Nu	Nucleòsid 5'-H-fosfonat



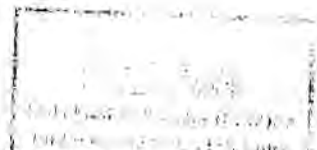
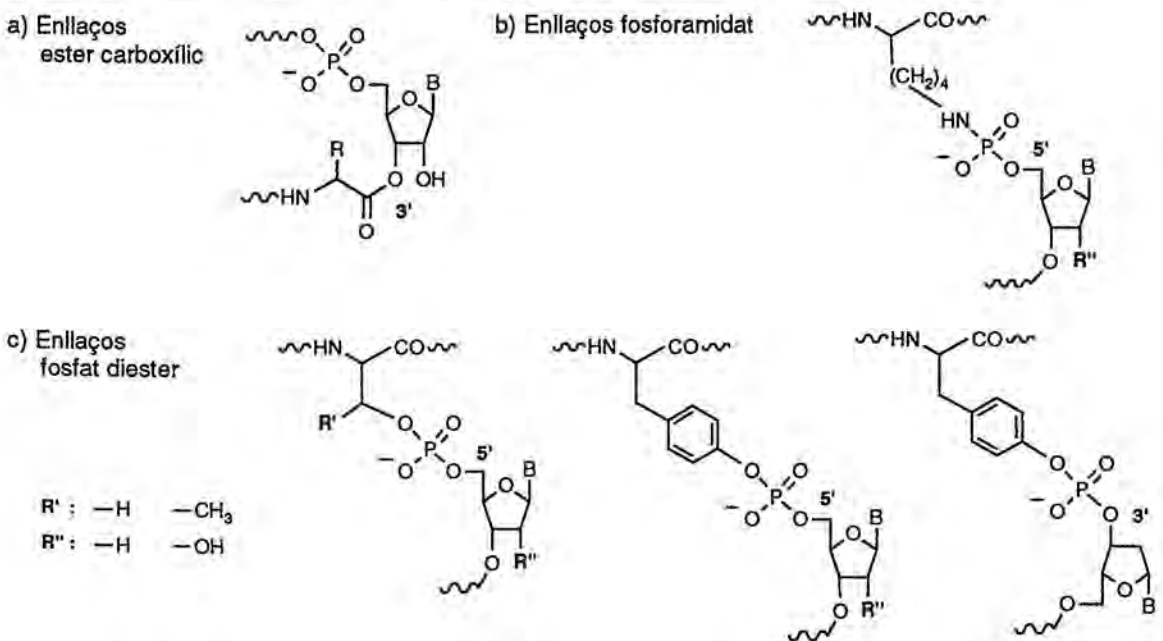
## INTRODUCCIÓ

1. Nucleoproteïnes :

Dins del terme genèric de nucleoproteïnes s'inclouen normalment un conjunt heterogeni de compostos corresponents a diferents tipus d'associació entre un àcid nucleic i una proteïna, ja que s'aplica aquest terme per descriure complexos proteïna-àcid tant si la unió és de tipus covalent com si no ho és. Així per exemple s'anomenen nucleoproteïnes els complexos de les histones amb l'ADN de les cèl·lules eucariotes<sup>1</sup> o el conjunt de proteïnes que formen part dels ribosomes<sup>2</sup>. També s'inclouen dins d'aquest terme els complexos d'àcid nucleic i proteïnes no enzimàtiques relacionats amb els diversos processos de regulació en l'expressió del genoma<sup>3</sup> (repressors, factors d'iniciació, etc). Ara bé cal diferenciar aquest tipus d'associacions, en què la unió no és covalent, de la situació que es dona en compostos constituïts per fragments d'àcid nucleic i proteïna units covalentment, i que per tant constitueixen un tipus de biomolècula diferenciada.

L'exemple probablement més conegut d'híbrid amb unió covalent el constitueixen els intermedis que intervenen en la síntesi de les proteïnes en els ribosomes, en què els aminoàcids que s'incorporen a la proteïna que està sent sintetitzada es troben units a un fragment d'ARNt per mitjà d'un enllaç de tipus ester entre l'extrem C-terminal de la proteïna i l'hidroxil 3' de l'ARN<sup>4</sup> (Fig. I.1.a). Ara bé, en els darrers anys també s'han pogut identificar estructures<sup>5</sup> en què l'enllaç entre el fragment de proteïna i d'àcid nucleic és de tipus fosfat diester, si té lloc amb la participació dels grups hidroxil de les cadenes laterals dels residus de serina, treonina o tirosina (Fig. I.1.c), o de tipus fosforamidat, si els grups implicats en la unió per part de la proteïna són els grups amino de l'extrem N-terminal o de les cadenes laterals de lisina o histidina (Fig. I.1.b).

Figura I.1 : Enllaços covalents aminoàcid-nucleòsid en les nucleoproteïnes naturals



Els diferents complexos nucleoproteínics amb enllaços fosfat o fosforamidat poden ser inclosos en els següents quatre grups :

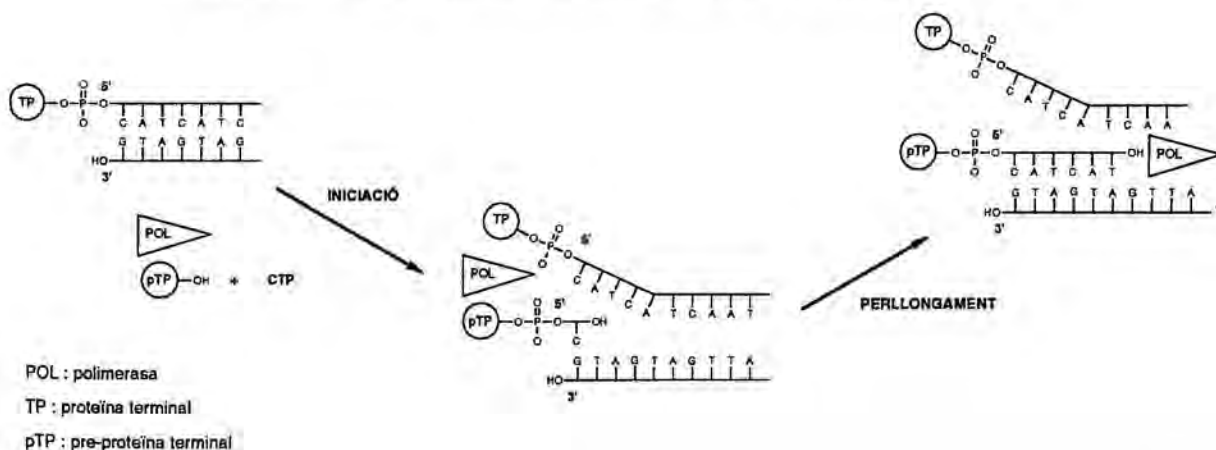
- Complexos enzimàtics amb nucleòsids.
- Nucleoproteïnes virals.
- Complexos intermedis de les topoisomerases amb l'ADN.
- Estructures nucleoproteíniques en els cromosomes.

• Molts enzims necessiten la presència de cofactors com ATP, UDP o NAD per dur a terme la seva funció. En alguna d'aquestes reaccions s'ha pogut observar que l'enzim s'uneix químicament al nucleòsid per mitjà d'un enllaç de tipus fosfat o fosforamidat. Dues semblen ser les funcions principals de la nucleoproteïna intermèdia que es forma. En un primer cas, la reacció de l'enzim amb ATP o NAD comporta la formació d'un intermedi nucleoproteínic actiu, que aporta l'energia necessària per efectuar la transformació del substrat. Com exemple es troben les ADN o ARN ligases, enzims que efectuen la unió de dos oligonucleòtids, en què un d'ells conté un grup fosfat en l'extrem 5'. En la primera etapa del procés, l'enzim reacciona amb una molècula de cofactor (ATP en les ADN ligases d'origen bacterià<sup>6</sup>, NAD en les ADN ligases de cèl.lules eucariotes i bacteriòfags<sup>7</sup>) per donar un derivat fosforamidat en què participa el grup amino d'un residu de lisina de l'enzim i el grup hidroxil 5' d'adenosina<sup>8,9</sup>. En un altre grup d'enzims, la formació d'un derivat nucleoproteínic amb un nucleòsid està relacionada amb la regulació de l'activitat de l'enzim. Per exemple, la inactivació de l'enzim glutamina sintetasa ve donada per la transformació de l'enzim en un derivat en què diferents residus de tirosina es troben formant enllaços de tipus fosfat amb adenosina<sup>10</sup>. En aquest cas a més, l'enzim responsable de la desadenilació, l'adenilil-transferasa és regulada per una altra proteïna, la proteïna P<sub>II</sub>, la qual s'activa també per transformació en un derivat de tipus fosfat entre un residu de tirosina i uridina<sup>11</sup>. Altres enzims que són regulats per formació de derivats nucleoproteínics de tipus fosfat amb adenosina són l'aspartilquinasa III d'*Escherichia Coli*<sup>12</sup>, l'aminoacil-ARNt-sintetasa<sup>13</sup>, i l'ARN-polimerasa d'*Esch. Coli*<sup>14</sup>.

• Un altre conjunt més important de nucleoproteïnes funcionals es troba en un grup de ADN i ARN virus que es caracteritzen per tenir proteïnes covalentment unides als extrems del seu genoma. Els exemples més estudiats els constitueixen el grup d'adenovirus humans<sup>15</sup> i certs bacteriòfags<sup>16</sup>, com ara Ø-29 de *Bacillus subtilis*. Els seus genomes es caracteritzen per estar formats per una doble cadena d'ADN lineal (36000 parells de bases per a adenovirus 2<sup>17</sup> i 18000 parells de bases per a Ø-29<sup>18</sup>) en què la proteïna, anomenada proteïna terminal (55 kDa per a Ad2<sup>19</sup> i 28 kDa per a Ø-29<sup>20</sup>) es troba unida als extrems 5' de les dues cadenes complementàries (Fig. I.1.c). En tots dos casos s'ha pogut determinar el tipus d'enllaç i la posició d'unió de la proteïna a l'àcid nucleic. Per Ad2 ha resultat ser el grup hidroxil del residu de serina 580, que forma un enllaç de tipus fosfat dièster amb el nucleòsid terminal desoxicitidina<sup>21</sup>. La proteïna terminal de Ø-29 es troba unida a

l'ADN a través del grup hidroxil del residu de la serina 232, per mitjà d'un enllaç del mateix tipus amb el nucleòsid terminal desoxiadenosina<sup>22</sup>. El procés de replicació de l'ADN d'aquests virus ha suscitat un gran interès, donat que té lloc per mitjà d'un mecanisme particular (*replicació per iniciació de proteïna*<sup>23</sup>) en què la proteïna terminal hi té un paper fonamental. Així, el procés de replicació (Fig. I.2), que ha estat estudiat tant *in vitro* com *in vivo*<sup>24</sup>, s'inicia amb la complexació d'una molècula lliure d'una pre-proteïna terminal (pPT, que després acabada la replicació és escindida a PT<sup>25</sup>) amb l'ADN polimerasa viral. Aquest complex és conduït al lloc d'inici de la replicació per interacció amb la proteïna terminal PT que es troba unida als extrems 5' de les dues cadenes de l'ADN. En aquest moment, l'ADN polimerasa catalitza la formació d'un derivat fosfat de la pre-proteïna pPT amb el primer nucleòsid (extrem 5') que formarà part de la cadena còpia, i s'inicia la construcció de la nova cadena des de l'extrem 5' (unit a pPT) fins a l'extrem 3'. La cadena que és complementària a la cadena que serveix de motllo va sent desplaçada paulatinament per l'avanç de la força de replicació.

*Figura I.2 : Model de replicació per iniciació de proteïna de l'ADN d'adenovirus*



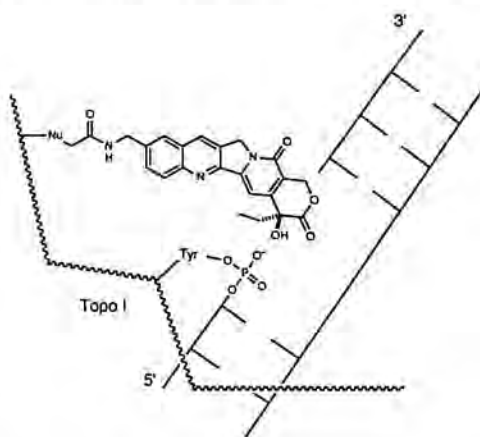
També s'han trobat unions proteïna-àcid nucleic de tipus fosfat dièster en el bacteriòfag PRD1 (unió tirosina-guanosina<sup>26</sup>), i Cp-1 de *Streptococcus pneumoniae*, (unió treonina-adenosina<sup>27</sup>), en plàsmids lineals<sup>28</sup>, en hepadnavirus com el virus de l'hepatitis B humana<sup>29</sup>, ARN virus animals com el Poliovirus (unió Tyr-U)<sup>30</sup>, el virus de la febre aftosa (unió Tyr-U)<sup>31</sup> o el virus de l'hepatitis A, i en altres virus d'origen vegetal. En la major part dels casos només s'ha arribat a establir la presència de la proteïna terminal, i es desconeix si la seva funció és similar a les dels virus que contenen ADN.

- Un tercer tipus de compostos nucleoproteïnics en què s'ha arribat a caracteritzar correspon als complexos intermedis que es generen per l'acció de les topoisomereses sobre l'ADN.

Durant el procés de replicació o transcripció, és necessari que l'ADN es desentortolligui i descabdelli perquè d'aquesta manera les cadenes puguin ser suficientment accessibles als diversos enzims. Alhora, també és necessari que les noves cadenes d'ADN o ARN que se sintetitzen se separin i alliberin. S'ha vist que les topoisomerases són molt importants en tots aquests processos, ja que permeten que tingui lloc el canvi en l'estat topològic de l'hèlix d'ADN tensionada<sup>32</sup>. El seu mecanisme d'acció consisteix en produir el trencament d'una de les cadenes de l'ADN (Topoisomerases I), o bé totes dues cadenes (Topoisomerases II), que una vegada alliberades de tensió s'uneixen novament en la mateixa posició. Els complexos temporals ADN-topoisomerasa han pogut ser aïllats per tractament amb agents desnaturalitzants de SDS o bases, i s'ha pogut comprovar que l'enzim s'uneix a l'ADN mitjançant un enllaç fosfat dièster en què participa una tirosina (específica) de l'enzim. Les topoisomerases de tipus I de cèl.lules eucariotes s'uneixen a l'hidroxil de l'extrem 3' de la cadena que trenquen<sup>33</sup>, mentre que la topoisomerasa I bacteriana<sup>34</sup> i les topoisomerases de tipus II, de cèl.lules eucariotes i de bacteries<sup>35</sup>, generen complexos en què l'enzim està unit a l'hidroxil 5' de les cadenes trencades (Fig. I.3).

Les topoisomerases han provocat recentment un gran interès, en comprovar-se que certs agents antitumorals<sup>36,37,38</sup> i antibiòtics<sup>39,40,41</sup> tenen com a principal blanc de la seva activitat la paralització de l'activitat d'aquests enzims, produint l'acumulació dels complexos ADN-topoisomerasa, molt probablement per formació d'un complex ternari amb l'enzim i l'ADN<sup>42,43</sup> (Fig. I.3). Es desconeix la relació entre l'acumulació del complex i la mort cel.lular, però tot sembla indicar que la paralització dels mecanismes d'expressió de l'ADN en poden ser una de les principals causes<sup>44</sup>.

*Figura I.3 : Model del complex ternari format per un anàleg de l'antibiòtic camptothecina (7-metil-10-bromoacetamidometilcamptothecina), la topoisomerasa I i l'ADN (reproducció de la referència 43).*



• L'ADN cromosòmic que s'aïlla de les cèl.lules conté sempre una petita proporció de material proteínic (<2%), que no s'aconsegueix separar sinó per tractament amb proteases seguit d'hidròlisi bàsica<sup>45</sup>. Aquest fet ha estat interpretat per la presència de proteïnes unides químicament a l'ADN, actuant a mena de ponts o braços que ajuden a estructurar i compactar l'ADN en el nucli<sup>46</sup>. S'ha pogut

comprovar que no es corresponen amb altres proteïnes per les quals se sap que s'uneixen o complexen a l'ADN, i que la seva unió no es produeix a l'atzar<sup>47</sup>. Estudis d'estabilitat química i enzimàtica realitzats sobre ADN que contenen aquest tipus de fragments proteïnics fan pensar que es pugui tractar d'unions de tipus fosfat-triester, en què participen un grup fosfat internucleosídic de la cadena de l'ADN i un residu de cadena lateral hidroxilada en la proteïna<sup>48</sup>. Pel moment es desconeix el tipus d'estructura i funció específica d'aquestes proteïnes.

## 2. Nucleopèptids : Aplicacions

En els darrers anys s'ha efectuat la síntesi de diversos compostos conjugats que contenen un fragment peptídic i un fragment oligonucleotídic units directament per mitjà d'enllaços presents en les nucleoproteïnes naturals, de tipus ester carboxílic<sup>49,50,51,52</sup> (Fig. I.1.a), fosfat diester<sup>53,54,55,56,57,58,59,60,61,62</sup> (Fig. I.1.c) o fosforamidat<sup>63</sup> (Fig. I.1.b).

Són diferents les raons per les quals es pot pensar que els nucleopèptids són molècules de possible interès :

- **Molècules sintèticament elaborades :**

Els nucleopèptids presenten la peculiaritat de ser molècules amb dos esquelets diferents, el peptídic i l'oligonucleotídic, la síntesi dels quals s'ha de dur a terme per mitjà de mètodes sintètics diferents<sup>64,65</sup>. Per tant, qualsevol esquema que pretengui dur a terme la seva síntesi ha de preveure en primer lloc poder compatibilitzar els mètodes de síntesi dels dos fragments. Tant el pèptid com l'oligonucleòtid són a més molècules polifuncionals, el que suposa haver de preveure la utilització dels grups protectors convenients si es volen evitar reaccions no desitjades.

Es dedueix, per tant, que l'obtenció d'un compost híbrid com pot ser un nucleopèptid necessita d'un esquema sintètic elaborat, i que els mètodes sintètics a aplicar han d'haver estat adequadament optimitzats. L'obtenció d'aquests compostos és doncs per si sola un repte sintètic interessant, que pot permetre a més desenvolupar noves metodologies, i aprofundir en l'estudi de la reactivitat dels grups funcionals implicats.

- **Models de nucleoproteïnes :**

Com per qualsevol tipus de biomolècula d'origen similar, els estudis sobre les nucleoproteïnes es troben limitats per les quantitats que es poden aïllar dels medis cel·lulars. Els nucleopèptids constitueixen doncs models idonis per a l'estudi de les nucleoproteïnes ja que permeten reproduir la

zona d'unió entre la proteïna i l'àcid nucleic, i alhora pel fet de ser molècules sintètiques poden ser obtingudes en quantitats suficients i amb el grau de puresa necessari. De fet, ja es coneixen alguns exemples d'utilització de nucleopèptids en estudis de tipus biològic, com ara referents als mecanismes de traducció<sup>66</sup>, o de producció de proteïnes amb aminoàcids no naturals<sup>67,68</sup> i en què s'han emprat molècules sintètiques amb enllaç de tipus ester carboxílic que han servit per obtenir ARNt modificats.

- **Estudi estructural :**

Es desconeixen la majoria dels mecanismes pels quals les proteïnes són capaces de reconèixer certes seqüències específiques dels àcids nucleics, i de com aquests complexos són capaços de provocar la resposta dels sistemes enzimàtics<sup>69</sup>. Per això, s'han emprat gran nombre d'estudis estructurals<sup>70</sup> per cristal·lografia de raigs X i també per ressonància magnètica<sup>71,72</sup> encaminats a esbrinar la natura de les interaccions àcid nucleic-proteïna.

L'ús de models sintètics d'estructura definida com ara els nucleopèptids en què es reproduïx els dominis d'interacció dels complexos d'ADN i proteïna poden ser molt útils per efectuar estudis de tipus preliminar en l'elucidació estructural d'aquests complexos. Fins i tot poden permetre avaluar la influència de cada component sobre l'estructura del complex, ja que es pot variar el lloc d'enllaç entre els dos fragments mitjançant el canvi de la posició de l'aminoàcid amb el que s'estableix la unió. D'altra banda, també poden servir per estudiar l'estructura dels complexos amb drogues, i ajudar d'aquesta forma al disseny de compostos més actius i/o selectius amb activitat antitumoral o antiviral.

- **Aplicació terapèutica :**

Fa algun temps es va observar que en algunes cèl·lules procariotes, el procés d'expressió de certs gens venia regulat per ARN de seqüència complementària als ARNm<sup>73</sup>. Aquesta observació, que s'ha aprofitat en diversos camps (com la millora de la resistència a plagues en certes plantes<sup>74</sup>), ha portat també a dissenyar un conjunt d'estratègies de lluita antiviral i antitumoral per inhibició de l'expressió gènica per mitjà d'oligonucleòtids<sup>75</sup>.

No obstant, per a què els oligonucleòtids puguin dur a terme la seva activitat terapèutica cal que penetrin a la cèl·lula a través de les membranes, que no siguin degradats en el medi cel·lular, i que formin complexos estables amb l'ARN (estratègia antisentit) o l'ADN de doble cadena (estratègia antigen) sobre els que han d'actuar. Els oligonucleòtids no modificats presenten però, problemes en cada un d'aquests aspectes. Amb l'objecte de superar aquestes limitacions ha estat realitzat en els darrers anys un immens treball sintètic destinat a l'obtenció d'anàlegs d'oligonucleòtids per modificació del seu esquelet<sup>76</sup>. De tots ells, els derivats fósforotioat<sup>77</sup> són probablement els més estudiats. S'ha vist per exemple que oligonucleòtids amb enllaços fósforotioat

poden inhibir el creixement o l'expressió de proteïnes en el virus de l'herpes simple<sup>78</sup> i del virus d'immunodeficiència humana<sup>79,80,81</sup>. Recentment, s'ha descrit també el primer exemple d'administració d'un oligonucleòtid fòsforotioat contra un cas de leucèmia<sup>82</sup>.

Amb l'objectiu d'utilitzar-los en la lluita antiviral i antitumoral per control de l'expressió gènica han estat sintetitzats també diferents conjugats peptídic-oligonucleotídics<sup>83</sup>, amb diversos tipus d'unions entre el pèptid i l'oligonucleòtid, però diferents de les que presenten les nucleoproteïnes naturals. El grup més important correspon a oligonucleòtids units a fragments peptídics que faciliten l'entrada a la cèl.lula, com per exemple els conjugats amb polilisina (poli-lisina Pm 15000) i que han estat assajats en oligonucleòtids dirigits contra el virus de la estomatitis reticular<sup>84</sup> i el virus d'immunodeficiència humana<sup>85</sup>. Amb objectius similars s'han obtingut diversos oligonucleòtids units a pèptids que contenen seqüències de transport nuclear<sup>86,87,88</sup> encara que no ha estat assajat el seu efecte. Altres conjugats han estat dissenyats per protegir l'oligonucleòtid de les 3'-exonucleases<sup>89</sup> (enzims majoritàriament responsables de la degradació dels oligonucleòtids en els medis cel.lulars), per actuar com a ribonucleases químiques o per poder predeterminar el blanc de la seva activitat d'un enzim<sup>90</sup>, o per a la introducció de marcadors no radioactius en la detecció dels oligonucleòtids (ex: biotina unida a l'oligonucleòtid per mitjà d'un braç peptídic<sup>91</sup>).

Els nucleopèptids poden ser contemplats doncs com a possibles candidats en aquest tipus d'estratègies antivirals i antitumorals, dissenyant-los per afavorir la penetració cel.lular o millorar les propietats d'estabilitat a les nucleases.

• • • • •

Tot plegat posa de manifest que els nucleopèptids són compostos d'interès i que la seva obtenció pot tenir diverses aplicacions. No és d'estranyar doncs, que en el moment d'inici d'aquest treball s'haguessin descrit ja diferents síntesis, majoritàriament de compostos amb unions de tipus fosfat<sup>53-59</sup>, encara que també amb enllaços de tipus ester<sup>49-51</sup>. No obstant, la diversitat de mètodes sintètics posats en pràctica i els resultats obtinguts indicaven que no es disposava encara d'una metodologia general que permetés abordar l'obtenció de compostos nucleopeptídics d'una certa complexitat.

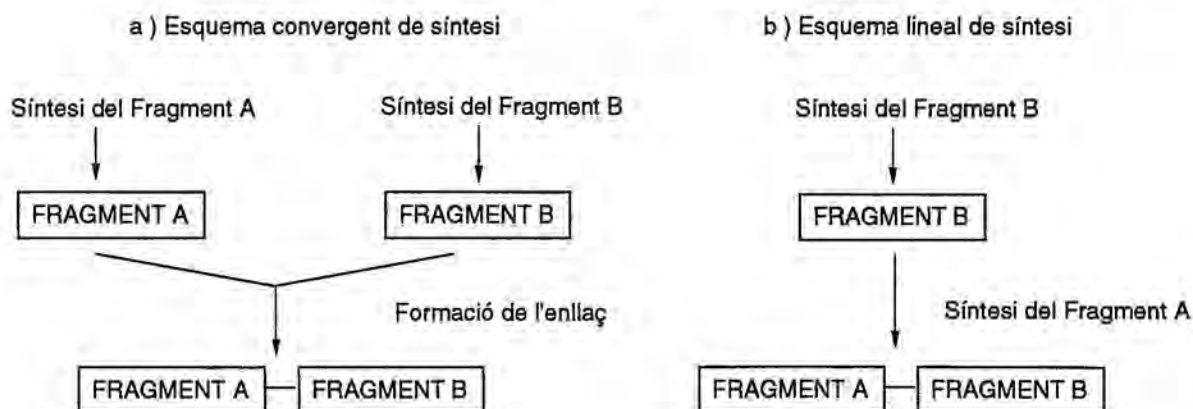
El present projecte ha tingut com a principal objectiu posar a punt una metodologia sintètica que permetés dur a terme la síntesi de nucleopèptids de forma simple i general. En particular, s'ha decidit emprendre la síntesi dels nucleopèptids que contenen enllaços de tipus fosfat diester entre el grup hidroxil de la cadena lateral d'un residu de serina i un dels dos grups hidroxil terminals d'un oligodesoxiribonucleòtid.



### 3. Problemàtica de la síntesi química de nucleopèptids amb unions de tipus fosfat diester : Antecedents

El primer problema que es planteja en voler dur a terme la síntesi d'un nucleopèptid amb un enllaç fosfat diester entre els dos components és el de compatibilitzar els mètodes de síntesi química dels dos fragments, el peptídic i l'oligonucleotídic. En els mètodes habituals de síntesi de pèptids s'utilitzen grups protectors temporals del grup  $\alpha$ -amino làbils als àcids (grup Boc)<sup>64e</sup>, o làbils a les bases (grup Fmoc)<sup>64f</sup>, i grups protectors permanents per a la protecció de les cadenes laterals i del grup carboxil C-terminal làbils a àcids relativament forts. En el cas dels oligonucleòtids<sup>65</sup>, s'empren habitualment grups protectors temporals dels grups hidroxil làbils a àcids febles (grup DMT), i grups que protegeixen permanentment durant la síntesi els grups amino exocíclics, els enllaços fosfat i el grup hidroxil terminal, làbils a les bases. La forma més elegant amb la qual resoldre aquesta qüestió és probablement efectuar la síntesi de la molècula híbrida per mitjà d'una estratègia convergent (Fig. I.4.a). Així, els dos fragments poden ser sintetitzats per separat, i en una etapa final dur a terme la seva unió. Aquesta opció és probablement la més avantatjosa sempre i quan sigui possible disposar d'un mètode òptim per formar l'enllaç entre els dos fragments, que pel seu tamany serà una etapa presumiblement difícil. Una alternativa suposa recórrer a una estratègia de tipus lineal (Fig. I.4.b) facilitada per la natura polimèrica dels dos fragments. Així, una vegada sintetitzat un dels dos fragments, s'efectua la unió del primer monòmer que forma part del segon fragment, i a partir d'aquí es completa la síntesi de la molècula conjugada.

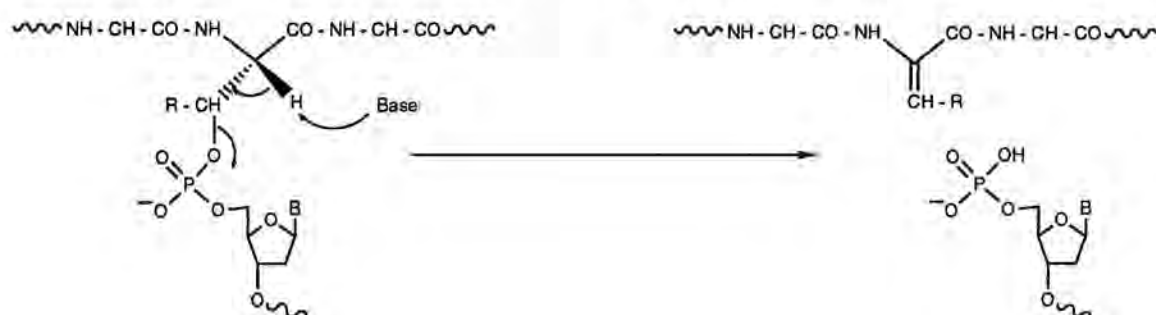
*Figura I.4 : Esquemes convergent i lineal en la síntesi d'un nucleopèptid*



D'altra banda, a part de la compatibilització dels mètodes sintètics, s'ha d'escollir adequadament l'esquema de protecció en un i altre fragment. A fi i a efecte de reduir el nombre d'etapes de desprotecció final, serà desitjable escollir els grups protectors permanents de forma que puguin ser eliminats amb els mateixos tractaments. Més important encara però, serà elegir els grups protectors permanents de manera que les condicions de tractament en l'etapa final de desprotecció no

produeixin la degradació de la molècula sintetitzada. Dues són les limitacions a tenir en compte. En primer lloc, els oligonucleòtids són làbils als àcids ja que poden produir la depurinació dels nucleòsids<sup>92</sup>. Altrament, el tipus d'unió fosfat en què participen els grups hidroxil dels residus de serina o treonina són làbils als tractaments bàsics<sup>93,94</sup>, que provoquen el trencament de l'enllaç per un mecanisme de  $\beta$ -eliminació que condueix a la formació d'un pèptid amb un residu de deshidroalanina i a un oligonucleòtid-fosfat (Fig. I.5).

*Figura I.5 : Trencament de l'enllaç entre el pèptid i l'oligonucleòtid per un mecanisme de  $\beta$ -eliminació*



Com ja s'ha comentat, en el moment d'inici d'aquest treball s'havien descrit diferents síntesis de nucleopèptids amb unions de tipus fosfat. Es tracta de treballs apareguts des del 1984, i que han estat publicats per dos únics grups, el grup holandès dirigit per J.H. van Boom<sup>53-57,59</sup>, i el grup de T. Hata al Japó<sup>58</sup>.

Tots dos grups han optat per dur a terme la síntesi dels nucleopèptids per mitjà d'un esquema de síntesi convergent, en què el fragment peptídic i el fragment oligonucleotídic se sintetitzen per separat, i s'uneixen en l'etapa prèvia a la d'eliminació dels grups protectors permanents. D'aquesta forma s'aconsegueix minimitzar al màxim el primer problema de compatibilitzar els mètodes de síntesi dels dos fragments.

El treball descrit pel primer grup és molt heterogeni ja que s'han assajat molt diverses alternatives, que en la major part dels casos no han tingut continuïtat. Així, són diferents els mètodes que han estat aplicats per dur a terme la síntesi de l'oligonucleòtid i la formació de l'enllaç fosfat entre el pèptid i l'oligonucleòtid. Els treballs inicials han estat realitzats per mitjà del mètode del fosfat-triester<sup>53,54,56,57</sup>, s'ha assajat la metodologia de l'H-fosfonat en un dels exemples<sup>55</sup>, i en els casos més recents s'ha adoptat la metodologia del fosfit-triester que empra derivats de tipus fosforamidit<sup>56,59</sup>. Probablement el punt en què es mostra major variació és en l'elecció dels diferents grups protectors permanents i que comporta la utilització de diferents condicions per procedir a l'eliminació d'aquests grups protectors. Com a dada positiva en el conjunt d'aquests treballs, cal destacar que l'objecte de les síntesis ha abarcat seqüències molt diferents, de les que formen part tant

fragments oligoribonucleotídics<sup>53</sup> com oligodesoxiribonucleòtids<sup>54-57,59</sup>, i en què s'hi inclouen tots els possibles aminoàcids d'unió, serina<sup>54-57</sup>, treonina<sup>54,55</sup> o tirosina<sup>53,55,56,57,59</sup>.

Del conjunt d'esquemes assajats, l'únic que ha tingut continuïtat en l'obtenció de dos altres nucleopèptids (**16**, **17**), la síntesi dels quals ha aparegut durant la realització d'aquest treball<sup>60,61</sup>, correspon a la preparació del nucleopèptid H-Phe-Tyr(p<sup>5</sup>ATAT)-NH<sub>2</sub> (**15**). En aquest cas<sup>59</sup> s'utilitza per primer cop la metodologia de síntesi en fase sòlida per a l'obtenció de l'oligonucleòtid, ja que les síntesis efectuades anteriorment havien estat realitzades exclusivament en solució, i un nou grup protector, el grup 2-(*t*-butildifenilsililoximetil)benzoil (SiOMB), per a la protecció de les nucleobases. En l'etapa de desprotecció cal efectuar un primer tractament amb NH<sub>3</sub> en MeOH per procedir a l'alliberament del nucleopèptid de la resina, s'elimina el grup protector de les nucleobases amb TBAF, i es realitza un darrer tractament amb mercaptopiridina per eliminar el grup protector *o*-nitrofenilsulfenil (NPS) que protegeix el grup α-amino del pèptid.

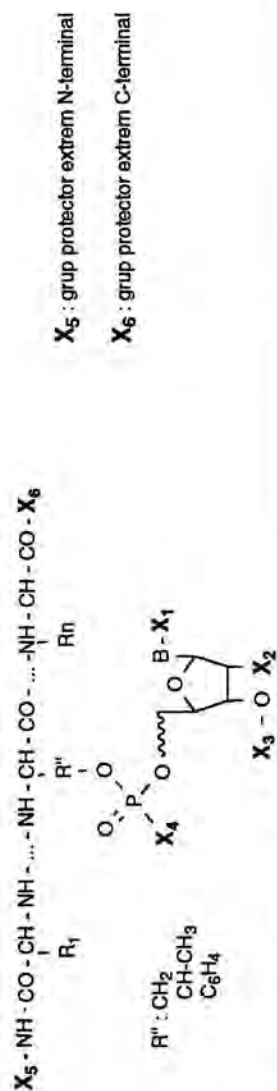
Pel que fa referència al treball dut a terme pel grup de T. Hata<sup>58,62</sup>, s'ha emprat un procediment en solució en què la síntesi de l'oligonucleòtid, i la formació de l'enllaç fosfat entre el pèptid i l'oligonucleòtid s'efectua per mitjà del mètode del fosfat-triester. L'esquema de protecció que utilitzen és completament diferent, en què es realitzen tractaments amb el reactiu (Bu<sub>3</sub>Sn)<sub>2</sub>O, el complex de zinc en acetilacetona o l'HCl aquós diluït per eliminar els diferents grups protectors i obtenir el nucleopèptid desitjat.

En resum, si s'analitzen els diferents treballs publicats és possible concloure :

- S'utilitzen esquemes de protecció diferents dels habitualment emprats en la síntesi dels pèptids i dels oligonucleòtids, la qual cosa obliga a una preparació laboriosa de tots i cadascun dels aminoàcids i nucleòsids de partida.
- A l'etapa de desprotecció del nucleopèptid cal efectuar diversos tractaments per eliminar els diferents grups protectors, el que pot repercutir negativament tant en l'estabilitat del producte com en el rendiment final.

La següent taula resumeix el treball efectuat per aquests dos grups. S'indica per a cada síntesi, el mètode de síntesi, la combinació de grups protectors utilitzada i el conjunt de tractaments que han estat emprats en l'etapa final de desprotecció.

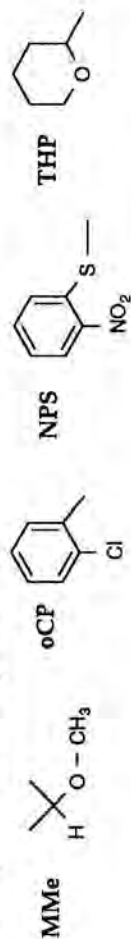
Taula 1.1 : Síntesis descrites de nucleopèptids



- $X_1$  : grup protector nucleobase  
 $X_2$  : grup protector hidroxil 2'  
 $X_3$  : grup protector hidroxil 3'  
 $X_4$  : grup protector enllaç fosfat

Nucleopèptid	Mètode de síntesi <sup>*1</sup>	Grups protectors <sup>*2</sup>						Tractaments desprotecció	Ref.
		X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>		
H-Ala-Tyr(p <sup>5</sup> U)-NH <sub>2</sub> (1)	fosfat triester	--	O-MMe	O-oCP	O-oCP	NPS	NH <sub>2</sub>	i) nitrobenzaldoximat ii) HCl MeOH iii) HCl aq. 0.01 M	53
H-Ala-Tyr(p <sup>5</sup> UU)-NH <sub>2</sub> (2)	fosfat triester	--	O-THP	Ac	O-oCP	NPS	NH <sub>2</sub>	i) nitrobenzaldoximat ii) Et <sub>3</sub> N MeOH/aigua iii) HCl MeOH iv) HCl aq. 0.01 M	54
H-Ala-Aa(p <sup>5</sup> TT)-NH <sub>2</sub> Aa : Ser (3), Thr (4)	fosfat triester	--	H	THP	O-oCP S-Ph(CH <sub>3</sub> )	NPS	NH <sub>2</sub>	i) AgAcO piridina/aigua ii) nitrobenzaldoximat ó TBAF piridina/aigua iii) HCl aq 0.01 M	54

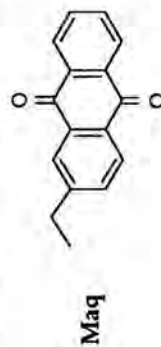
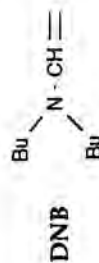
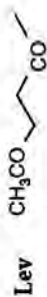
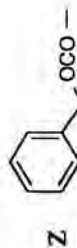
Notes : <sup>\*1</sup> : mètode de síntesi de l'oligonucleòtid, i de formació de l'enllaç entre el pèptid i l'oligonucleòtid; <sup>\*2</sup> Grups protectors : MMe metoximetilidè (grups hidroxil 2' i 3'), oCP 2-clorofenil, NPS 2-nitrofenilsulfenil, THP : tetrahidropirani.



(continua)

Nucleopèptid	Mètode de síntesi <sup>*1</sup>	Grups protectors <sup>*2</sup>						Tractaments desprotecció	Ref.
		X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>		
Z-Aa(p <sup>5</sup> T-THP)-ONBzl (5-Z) Z-Val-Aa(p <sup>5</sup> T-THP)-ONBzl (8,9), Aa: Ser (5,8), Thr (6,9), Tyr (Z)	H-fosfonat	—	H	THP	—	Z	O-NBzl		55
H-Phe-Tyr(p <sup>5</sup> dATAT)-NH <sub>2</sub> (10) H-Ala-Ser(p <sup>5</sup> dATAT)-Ala-OAll (11)	fosfat triester	A : NPS	H	Lev	O-oCP	NPS	NH <sub>2</sub> (10) O-All (11)	i) nitrobenzaldoximat ó TBAF piridina/aigua ii) Bu <sub>3</sub> P dioxà/aigua iii) N <sub>2</sub> H <sub>4</sub> piridina/aigua	56
H-Ala-Ser(p <sup>5</sup> dATAT)-Ala-OAll (11)	fosfit triester	A : NPS	H	Lev	O-All	NPS	O-All	i) piridina/aigua ii) TBAF piridina/aigua iii) Bu <sub>3</sub> P dioxà/aigua iv) N <sub>2</sub> H <sub>4</sub> piridina/aigua	
H-Phe-Tyr(p <sup>5</sup> dGC)-NH <sub>2</sub> (12) H-Phe-Ser(p <sup>5</sup> dGC)-Ala-OH (13)	fosfat triester	C : NPS G : DNB	H	Lev	O-oCP	NPS	NH <sub>2</sub> (12) O-Maq (13)	i) TBAF piridina/aigua ii) mercaptopiridina iii) N <sub>2</sub> H <sub>4</sub> piridina/aigua iv) només per a 13 Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> , NaHCO <sub>3</sub>	57

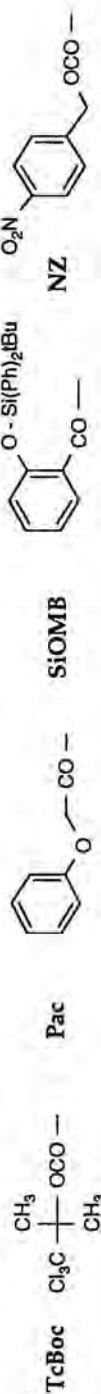
Notes : <sup>\*1</sup> : mètode de síntesi de l'oligonucleòtid, i de formació de l'enllaç entre el pèptid i l'oligonucleòtid; <sup>\*2</sup> Grups protectors : oCP 2-clorofenil, NPS 2-nitrofenilsulfenil, THP : tetrahidropiraniil; Z : benziloxycarbonil, NBzl : 4-nitrobenzil, Lev levulinoil o 4-oxo-pentanoil, All alil, DNB : di(n-butil)aminometilè, Maq 2-(9,10-antraquinolil)metil.



(continua)

Nucleopeptid	Mètode de síntesi <sup>*1</sup>	Grups protectors <sup>*2</sup>						Tractaments desprotecció	Ref.
		X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>		
H-Val-Tyr(p <sup>5</sup> UU)-OH ( <b>14</b> ) fosfat triester		TcBoc	O-THP	TcBoc	S-Ph	TcBoc	O-Pac	i) (Bu <sub>3</sub> Sn) <sub>2</sub> O, piridina ii) Zn-acetilacetona, piridina iii) HCl aq. 0.01 M	58
H-Phe-Tyr(p <sup>5</sup> DATA)-NH <sub>2</sub> ( <b>15</b> ) fosfit triester		A : SiOMB	H	resina <sup>*3</sup>	O-CNE	NPS	NH <sub>2</sub>	i) NH <sub>3</sub> MeOH ii) TBAF piridina/aigua iii) mercaptopiridina	59
H-Ala-Tyr(p <sup>5</sup> UUAAAAC)-NH <sub>2</sub> ( <b>16</b> ) fosfit triester		A : SiOMB C : SiOMB	O-TBDMS	resina <sup>*3</sup>	O-CNE	NPS	NH <sub>2</sub>	i) NH <sub>3</sub> MeOH ii) mercaptopiridina iii) TBAF THF	60
H-Asp-Ser(p <sup>5</sup> dAAAAGTAAGCC)-Glu-OH ( <b>17</b> ) fosfit triester		A : SiOMB C : SiOMB G : SiOMB	H	resina <sup>*4</sup>	O-CNE	NZ	O-NBzl	i) TBAF piridina/aigua ii) Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> , NaHCO <sub>3</sub>	61
H-Ala-Ser(p <sup>5</sup> TT)-Phe-OH ( <b>18</b> ) fosfat triester		TcBoc	H	TcBoc	S-Ph(OMe)	TcBoc	O-Pac	i) (Bu <sub>3</sub> Sn) <sub>2</sub> O ii) Zn acetilacetona/piridina	62

Notes : <sup>\*1</sup> : mètode de síntesi de l'oligonucleòtid, i de formació de l'enllaç entre el pèptid i l'oligonucleòtid; <sup>\*2</sup> Grups protectors : NPS 2-nitrofenilsulfenil, THP : tetrahidropirani, TcBoc tricloro-*t*-butoxicarbonil, Pac fenoxiacetil, SiOMB 2-(*t*-butildifenilsililoximetil)benzoi, CNE 2-cianoetil, NZ 4-nitrobenziloxycarbonil, NBzl 4-nitrobenzil; <sup>\*3</sup> unió succinil de l'oligonucleòtid a la matriu; <sup>\*4</sup> unió oxalil de l'oligonucleòtid a la matriu.



#### 4. Objectius del treball :

El treball que a continuació s'exposa ha tingut com a objectius bàsics el desenvolupament i aplicació de diferents mètodes sintètics per obtenir compostos nucleopeptídics amb enllaços de tipus fosfat, i l'avaluació de la labilitat química i enzimàtica d'aquests compostos.

Així, ens hem proposat dissenyar un esquema de síntesi el més simple i general possible amb la idea de superar la diversitat d'esquemes que fins al moment han estat posats en pràctica, i que es caracteritzen per fer ús de mètodes sintètics i de protecció no habituals. Per a l'elaboració d'aquest nou esquema s'ha cregut necessari :

- Adaptar els mètodes de síntesi i de protecció a les especials característiques d'estabilitat de l'esquelet peptídic i oligonucleotídic i, molt especialment, a la labilitat dels nucleopeptídics en què les unions tenen lloc amb la participació dels residus de serina o treonina.

- Fer ús de la metodologia de síntesi en fase sòlida per facilitar l'obtenció dels productes.

- Utilitzar, sempre que sigui possible, mètodes i grups protectors habituals en la síntesi dels fragments oligonucleotídics i peptídics. Amb això, s'ha intentat facilitar l'obtenció dels productes sintètics de partida, com són els aminoàcids i els nucleòsids, ja que optant per l'ús d'esquemes habituals és possible disposar de productes d'origen comercial.

- Evitar la realització de diferents etapes de desprotecció per a cada una de les funcions al final de la síntesi, la qual cosa podria repercutir en el rendiment d'obtenció del producte final, o fins i tot en la pròpia estabilitat d'aquest producte.

Hem volgut aplicar aquest nou esquema de síntesi a l'obtenció de compostos nucleopeptídics amb enllaços fosfat en què participen els residus de serina que, per les característiques de labilitat d'aquest tipus d'enllaç, probablement comporten la màxima dificultat sintètica. Dins dels productes objectiu, s'ha cregut interessant obtenir un nucleopeptíd amb la mateixa seqüència que alguna de les nucleoproteïnes naturals, concretament la seqüència -Ser(p<sup>5</sup>CATCAT-)-Gly-Asp- que correspon a la zona d'unió de la nucleoproteïna d'adenovirus 2.

Dins del que és l'objectiu sintètic s'inclouen però, altres aspectes diferents com són :

- l'aïllament i purificació dels compostos nucleopeptídics, pels quals cal posar a punt diferents tècniques cromatogràfiques.

- la caracterització dels nucleopeptídics, utilitzant el màxim d'eines al nostre abast com la ressonància magnètica nuclear (<sup>1</sup>H i <sup>31</sup>P) o l'espectrometria de masses.

- l'avaluació de les propietats d'estabilitat química i enzimàtica per a diferents compostos nucleopeptídics en diferents condicions. L'estudi de labilitat a enzims pot ser interessant en vistes a preveure una possible aplicació biomèdica dels nucleopeptídics.

La present Memòria consta de tres capítols, que agrupen els diferents experiments realitzats al llarg del treball.

Dos han estat els esquemes de síntesi assajats. Els resultats obtinguts en l'aplicació d'un i altre esquema són l'objecte de la discussió dels dos primers capítols d'aquesta Memòria. La primera alternativa ha consistit en efectuar la síntesi dels nucleopèptids per mitjà d'una estratègia de tipus convergent que permet sintetitzar per separat els dos fragments i evitar així al màxim els problemes de compatibilitat en els mètodes de síntesi respectius. L'altra alternativa que ha estat contemplada i a la que es dedica el segon capítol de la Memòria ha consistit en dissenyar i aplicar un esquema de síntesi lineal, en què es realitza la construcció dels dos fragments de forma seqüencial.

El darrer capítol es dedica a la discussió de diferents aspectes que, tot i formar part de la temàtica dels anteriors capítols, s'ha cregut convenient separar perquè agrupen un conjunt de dades i de productes que han estat utilitzats en el desenvolupament de totes dues estratègies. D'altra banda inclou proves efectuades amb objectius similars però realitzades en moments diversos del treball, que constitueixen un bloc de dades d'obligada referència en qualsevol plantejament. Per exemple, s'han inclòs el conjunt de proves preliminars que han estat encaminades a l'elecció de grups protectors i de condicions de tractament, i que configuren el disseny dels esquemes de síntesi assajats. També s'hi descriu la síntesi dels productes de partida que ha calgut sintetitzar per obtenir els nucleopèptids, així com la síntesi de derivats de nucleòsids o d'oligonucleòtids que han estat utilitzats com a compostos patró en l'anàlisi i caracterització dels productes obtinguts en els diversos assajos de síntesi dels nucleopèptids. Altres experiments no directament relacionats amb la síntesi de nucleopèptids, la realització dels quals s'ha basat en algun tipus d'observació efectuat en aquells assajos, també es comenten en aquest capítol.



**CAPÍTOL 1:**  
**SÍNTESI DE NUCLEÒTIDS EN FASE SÒLIDA**  
**MITJANÇANT UNA ESTRATÈGIA CONVERGENT**

## 1. Disseny d'un esquema de síntesi de nucleopèptids amb un enllaç fosfat serina-nucleòsid basat en una estratègia de tipus convergent :

En la síntesi de nucleopèptids mitjançant un esquema convergent, la part peptídica i la part oligonucleotídica es construeixen per separat i, en l'etapa clau de la síntesi, s'uneixen per formació de l'enllaç fosfat. Són diferents les raons que justifiquen aquesta elecció:

i) Des del punt de vista sintètic suposa l'opció lògicament més recomanable donat que permet realitzar la síntesi dels dos fragments per separat, purificar-los, i unir-los en una etapa avançada del procés.

ii) Atenent a la problemàtica inherent a la síntesi d'un conjugat peptídico-oligonucleotídic, simplifica en part l'esquema sintètic de protecció, ja que permet triar qualsevol grup protector temporal per efectuar la síntesi de cada component. En haver-se construït els dos fragments per separat, el problema que queda per resoldre és l'elecció dels grups protectors permanents, a eliminar en la darrera etapa.

iii) Tenint en compte les especials característiques d'estabilitat dels nucleopèptids (vegeu la Introducció), redueix el risc de trencament de la unió entre el pèptid i l'oligonucleòtid, ja que l'acoblament de les dues parts té lloc en les etapes finals del procés sintètic.

A l'hora de dur a terme l'obtenció de compostos nucleopeptídics, s'ha cregut doncs adient seguir en primer lloc una estratègia de tipus convergent. De totes formes, s'ha pensat que calia superar la diversitat d'esquemes que fins al moment havien estat emprats per a l'obtenció dels diferents nucleopèptids (vegeu la Introducció). Per això, s'han definit els tres següents objectius :

i) La major part dels exemples descrits en el moment d'emprendre la realització d'aquest projecte es caracteritzava pel fet que tant la síntesi com la formació de l'enllaç entre el pèptid i l'oligonucleòtid es realitzaven en solució. S'ha cregut que es podia aconseguir una simplificació tant en l'obtenció dels respectius fragments com en l'etapa d'unió que segueix si s'adopta una metodologia de síntesi en fase sòlida.

ii) L'elecció dels grups protectors permanents es troba molt limitada per les peculiars característiques d'estabilitat dels nucleopèptids amb unions del pèptid i l'oligonucleòtid en què participen els residus de serina o treonina. És important per tant que els tractaments de l'etapa de desprotecció no produeixin el trencament d'aquest enllaç. Les solucions que fins al moment han estat descrites són molt diverses i, al nostre entendre, massa complexes. En la major part dels casos s'ha optat per grups protectors permanents que no formen part dels esquemes habituals de síntesi dels pèptids o dels oligonucleòtids, i que per tant no permeten disposar d'intermedis d'origen comercial. Per altra banda, s'han emprat grups protectors eliminables en diferents condicions, el que ha obligat a realitzar diferents etapes de desprotecció. Com a segon objectiu s'ha decidit doncs elaborar un esquema de protecció més simplificat, basat en l'ús de grups protectors habituals i en què els

diferents grups protectors permanents puguin ser eliminats en una única etapa, en condicions compatibles amb l'estabilitat del producte.

iii) S'ha considerat útil dissenyar un esquema de síntesi, aplicable a la síntesi dels nucleopèptids més làbils amb un enllaç serina-nucleòsid, i que alhora permetés obtenir altres conjugats més estables. Com es podrà comprovar al llarg d'aquesta Memòria, la major part dels nucleopèptids sintetitzats corresponen precisament a compostos en què participa serina en la formació de l'enllaç amb l'oligonucleòtid.

El disseny d'un nou esquema de síntesi convergent de nucleopèptids implica, a més de l'elecció de l'esquema global de síntesi, que ha d'incloure la definició de les etapes del procés sintètic, l'elecció de l'esquema de protecció. Formen part d'aquest esquema els diferents grups protectors del nucleopèptid, i cal incloure-hi el tipus de resina i el tipus d'unió del nucleopèptid a la resina.

### 1.1 Elecció de l'esquema global de síntesi :

La síntesi del nucleopèptid mitjançant una estratègia convergent en fase sòlida suposa efectuar la unió d'un fragment lliure sobre l'altre fragment que es troba unit a una resina. Com a fragment que s'ancora sobre la resina, s'ha decidit utilitzar un pèptid protegit. Hi ha molta més experiència en síntesi de segments peptídics protegits<sup>95</sup> que no pas en síntesi d'oligonucleòtids protegits. Així, sense allunyar-se excessivament de la metodologia estàndar, el pèptid pot ser sintetitzat en fase sòlida i alliberat com a fragment protegit, a excepció del grup hidroxil que ha de servir per formar l'enllaç amb l'oligonucleòtid. Per la seva banda, l'oligonucleòtid protegit unit a la resina pot ser sintetitzat per qualsevol dels mètodes de síntesi d'oligonucleòtids en fase sòlida. Una vegada construït l'oligonucleòtid, es pot realitzar l'acoblament del pèptid protegit per formació de l'enllaç fosfat.

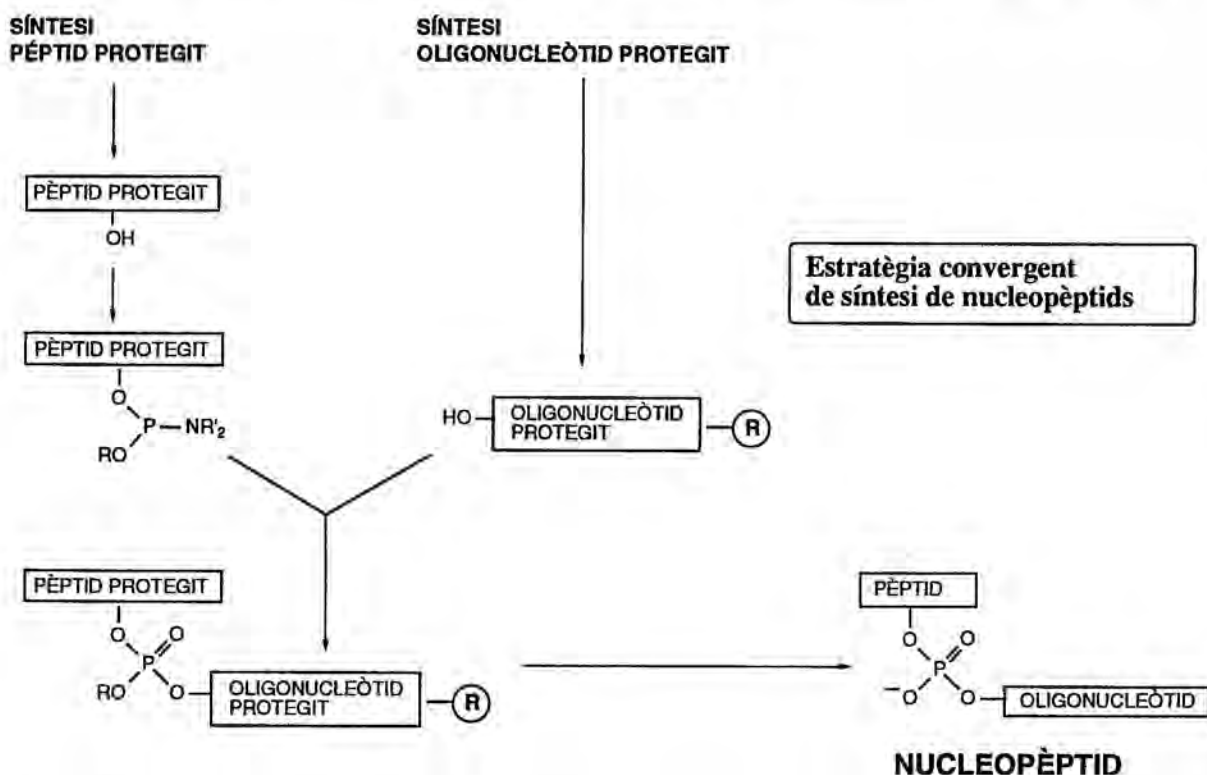
Un cop establert l'ordre d'unió dels fragments sobre la resina, s'ha de decidir el mètode de formació de l'enllaç fosfat entre el pèptid i l'oligonucleòtid. S'ha cregut que una bona opció era emprar el mateix tipus de reacció del mètode habitual de síntesi d'oligonucleòtids que utilitza intermedis de tipus fosforamidit. Tot i que és possible plantejar la fosfitilació de qualsevol dels dos fragments, el pèptid o l'oligonucleòtid unit a la resina, la primera opció és probablement la més recomanable. El pèptid pot ser utilitzat en excés a l'etapa d'acoblament per compensar la inevitable hidròlisi de la funció fosfitilada en el medi de reacció i evitar per tant una disminució del rendiment. A part, el derivat fosforamidit del pèptid pot ser preparat en solució, i en principi, convenientment purificat abans de l'etapa d'acoblament.

La reacció del derivat fosforamidit del pèptid amb el grup hidroxil de l'oligonucleòtid unit a la resina, en presència d'un catalitzador àcid, comporta la formació d'un enllaç de tipus fosfit, el qual s'ha d'oxidar a fosfat per generar el corresponent nucleopèptid protegit i unit a la resina.

La darrera etapa consisteix en efectuar l'eliminació dels grups protectors permanents i l'alliberament de la resina, procés que ha de conduir a l'obtenció del nucleopèptid.

A la següent figura es resumeix l'esquema de síntesi de tipus convergent que ha estat dissenyat :

*Figura 1.1 : Esquema de síntesi d'un nucleopèptid en fase sòlida mitjançant una estratègia de tipus convergent.*



## 1.2 Disseny de l'esquema de protecció :

Com ja s'ha esmentat, en un esquema de síntesi de tipus convergent es minimitza la problemàtica de compatibilització dels mètodes de síntesi de la part peptídica i oligonucleotídica, donat que els dos fragments se sintetitzen per separat. No obstant, a l'etapa d'acoblament del pèptid i l'oligonucleòtid en què es forma l'enllaç de tipus fosfit (Fig. 1.1), per la baixa nucleofília del grup hidroxil, cal que la resta de grups funcionals no directament implicats estiguin protegits. Les funcions que necessiten protecció són :

- i) Les cadenes laterals del pèptid.
- ii) Els grups amino exocíclics de les nucleobases.
- iii) Els enllaços fosfat.

iv) L'extrem hidroxil 3' de l'oligonucleòtid que s'uneix a la resina. En definitiva, aquest enllaç és una forma de protecció permanent, l'eliminació del qual comporta la separació del producte del suport sòlid.

v) Els extrems amino i carboxil del pèptid. S'ha cregut convenient bloquejar-los de forma permanent en forma de grups alquilcarboxamido i carbamoil, respectivament, per facilitar l'obtenció del pèptid protegit.

Per a l'elecció dels diferents grups protectors és important però, tenir en compte una sèrie de factors :

a) Els grups protectors permanents han de ser compatibles amb els mètodes sintètics a utilitzar per a l'obtenció del pèptid i l'oligonucleòtid (Taula 1.1). A part, per simplificar al màxim l'obtenció dels dos fragments, és preferible elegir estratègies convencionals de protecció (permanent i temporal), que permetin utilitzar de sintons d'origen comercial.

Cal tenir en compte que els mètodes habituals de síntesi d'oligonucleòtids es caracteritzen per utilitzar grups protectors permanents (grups benzoil, isobutiril) que són làbils a les bases, i un grup protector temporal del grup hidroxil 5' làbil a tractaments àcids suaus (grup dimetoxitritil).

D'altra banda, els grups protectors permanents utilitzats habitualment en la síntesi dels pèptids (grups de tipus benzil) s'eliminen amb àcids forts, encara que també s'han desenvolupat grups protectors làbils a les bases. La protecció temporal dels grups  $\alpha$ -amino es resol tant amb grups làbils als àcids (grup *t*-butoxicarbonil) com a les bases (grup 9-fluorenilmtoxycarbonil).

*Taula 1.1 : Labilitat dels grups protectors habituals en els mètodes de síntesi de pèptids i d'oligonucleòtids*

	LABILITAT	
	Grup protector temporal	Grup protector permanent
Oligonucleòtid	àcids suaus <sup>*a</sup>	bases <sup>*b</sup>
Pèptid	àcids <sup>*c</sup> o bases <sup>*f</sup>	àcids forts <sup>*d</sup> o bases <sup>*e</sup>  àcids forts <sup>*g</sup>

Notes (tractaments habituals) : <sup>\*a</sup> TCA 3% en DCM; <sup>\*b</sup> NH<sub>3</sub> aq conc; <sup>\*c</sup> TFA 30-50% en DCM; <sup>\*d</sup> HF líq, 0°C; <sup>\*e</sup> no s'utilitzen normalment, piperidina 50% en DMF; <sup>\*f</sup> piperidina 50% en DMF; <sup>\*g</sup> TFA conc.

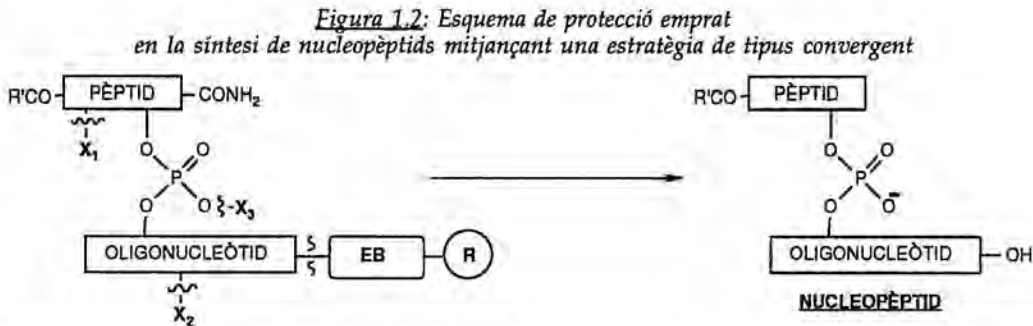
b) Alhora, s'ha d'assegurar que les condicions que produeixen la desprotecció no provoquin problemes d'estabilitat. Com ja s'ha comentat, les principals incompatibilitats que poden sorgir són que els tractaments amb àcids forts produeixen la depurinació dels nucleòsids<sup>92</sup> i que els

nucleopèptids amb unions entre el pèptid i l'oligonucleòtid en què participen els residus de serina i treonina són làbils als tractaments bàsics.

c) Amb l'objectiu de reduir al màxim el nombre d'etapes finals de desprotecció i desancoratge, que podrien repercutir no tan sols en el rendiment final d'obtenció sinó també en la pròpia estabilitat del producte, l'eliminació de tots els grups protectors permanents i l'alliberament del nucleopèptid de la resina haurien de poder-se realitzar amb els mateixos tractaments.

De la valoració d'aquests tres punts, s'ha arribat a la conclusió que la millor opció és elaborar un esquema de protecció en què els grups protectors permanents puguin ser eliminats amb tractaments bàsics. Qualsevol altra opció comportaria haver de renunciar a l'ús d'esquemes de protecció habituals, en especial pel que fa a la part oligonucleotídica (vegeu Taula 1.1). No obstant, la labilitat dels nucleopèptids objectiu d'aquest treball als tractaments bàsics obliga a seleccionar els diferents grups protectors permanents de forma que la seva eliminació pugui ser efectuada en condicions compatibles amb l'estabilitat de la unió fosfat entre el pèptid i l'oligonucleòtid.

El següent esquema resumeix la combinació de grups protectors i resines que han estat utilitzats al llarg dels diversos intents d'aplicació de l'estratègia convergent.

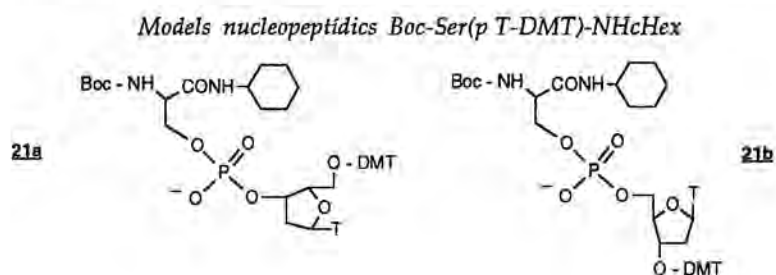


PÈPTID :	Grup protector temporal $\alpha$ -amino :	Boc	Fmoc
	Grup protector permanent cadenes laterals ( $X_1$ ) :	Asp :	Fm o Anpe Bzl
OLIGONUCLEÒTID :	Grup protector permanent amino exocíclic nucleobase ( $X_2$ ) :	C :	Fmoc iBu iBu
		A :	Fmoc Bz Dmf
	Grup protector permanent enllaç fosfat ( $X_3$ ) :	CNE	
	Grup protector temporal hidroxil :	DMT	
UNIÓ DE L'OLIGONUCLEÒTID A LA RESINA		Espaiador bifuncional succinil	
MATRIU SÒLIDA		poliestirè boles de vidre	

A continuació es comenten les variables que s'han tingut en compte per escollir les diferents combinacions de grups protectors que s'indiquen en la taula precedent.

**a) Estabilitat del nucleopèptid: Elecció dels tractaments de desprotecció i desancoratge :**

Per procedir a l'elecció dels grups protectors permanents, s'han avaluat diferents tractaments que poden conduir a l'eliminació d'aquests mateixos grups en l'etapa final de la síntesi. Així, en primer lloc, s'ha cregut important estimar l'estabilitat de les unions fosfat entre un residu de serina i un nucleòsid a les condicions de tractament. La manera de realitzar-ho ha consistit en estudiar el comportament d'uns nucleopèptids model, en particular els regioisòmers Boc-Ser(p T-DMT)-NHcHex (**21**; isòmers 3' i 5'), en ser sotmesos a diferents reactius bàsics (Cap.3, apartat 1.1). L'estabilitat dels compostos ha estat considerada una estimació del comportament d'un nucleopèptid en ser tractat amb el corresponent reactiu. En un estadi més avançat del treball s'ha pogut comprovar però, que algunes de les conclusions derivades d'aquests estudis no eren prou adequades, ja que els models **21** han resultat ser més estables que els nucleopèptids que després han estat sintetitzats (Cap.2, apartat 4.1).



Els diferents reactius bàsics que han estat utilitzats per efectuar les etapes de desprotecció són els següents :

- $K_2CO_3$  0.05 M en MeOH/dioxà :

En un començament ha estat considerada una de les solucions més atractives, ja que és un reactiu que permet realitzar l'eliminació d'un gran ventall de grups protectors així com el trencament de les unions succinil d'oligonucleòtids amb les resines en temps curts. Aquest reactiu havia estat descrit<sup>96,97</sup> per dur a terme l'eliminació de diversos grups protectors en la síntesi d'oligonucleòtids amb enllaços de tipus fosfat metílic, etapa que ha de ser realitzada en condicions suaus per evitar la pèrdua del grup metil o en condicions en què la transesterificació condueixi al mateix producte.

- TBAF.3H<sub>2</sub>O 0.01 M en THF anhidre

El reactiu TBAF.3H<sub>2</sub>O en una dissolució de piridina/aigua ha estat emprat en més d'una ocasió per efectuar l'eliminació de diferents grups protectors en les síntesis de nucleopèptids<sup>54,56,57</sup>.

En el nostre cas, en les síntesis realitzades mitjançant l'estratègia convergent, el seu ús ha estat especialment indicat per efectuar l'eliminació del grup protector 2-(4-acetil-3-nitrofenil)etil d'àcid aspàrtic. Posteriorment, quan han estat realitzades les síntesis per un esquema de tipus lineal (vegeu Cap.2), ha estat el tractament elegit per dur a terme el desancoratge del nucleopèptid de la resina.

- LiOH.H<sub>2</sub>O 0.25 M en MeOH/dioxà/aigua (1.5:1.5:1)

L'espècie reactiva en aquest cas és una base nucleòfila, que s'ha utilitzat normalment per a la saponificació d'esters en condicions suaus<sup>98,99</sup>.

El reactiu ha estat emprat en els intents de síntesi mitjançant l'estratègia convergent en què els grups protectors de la cadena lateral d'aspàrtic han estat els grups benzil o el grup 2-(4-acetil-3-nitrofenil)etil. En aquests casos, altres reactius com K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en MeOH/dioxà produeixen la transesterificació del grup carboxil, i el NH<sub>3</sub> aquós provoca l'obtenció de la corresponent amida (Cap.3, apartat 1.3).

- NH<sub>3</sub> aquós concentrat en dioxà (1:1).

S'ha pogut comprovar que els fosfat diester dels nucleopèptids model **21** són perfectament estables als tractaments amb NH<sub>3</sub> aquós concentrat en dioxà (1:1) a temperatura ambient i fins i tot a 55°C. S'ha utilitzat com a reactiu de desprotecció i desancoratge en alguns dels intents realitzats mitjançant l'estratègia convergent, però ha estat especialment útil en les síntesis realitzades mitjançant l'estratègia lineal. Les proves realitzades sobre alguns dels nucleopèptids sintetitzats posen de manifest que és un reactiu perfectament compatible amb aquest tipus de compostos (Cap.2, apartat 4.1), desmentint les hipòtesis realitzades en aquest sentit per altres autors<sup>56,59,61</sup>.

Havent elegit els tractaments que han mostrat ser compatibles amb l'estabilitat dels nucleopèptids model, s'ha dut a terme l'avaluació de la labilitat de diferents grups protectors permanents en aquestes condicions (Cap.3, apartats 1.2-1.5).

#### **b) Elecció de la matriu sòlida i del tipus d'unió del nucleopèptid a la resina:**

En qualsevol síntesi de nucleopèptids sobre fase sòlida, cal seleccionar el tipus de matriu sòlida sobre el qual dur a terme la síntesi de l'oligonucleòtid i el posterior acoblament del pèptid fosforamidit. A més de considerar el tipus específic de matriu sòlida, s'ha d'escollir també el tipus d'unió que s'estableix entre aquesta i el primer nucleòsid.



• Respecte al tipus de matriu sòlida, dues opcions han estat contemplades en els diversos intents de l'estratègia convergent :

i) El copolímer de poliestirè-1%-divinilbenzè, que ha estat objecte d'aplicació en el nostre grup per dur a terme la síntesi a gran escala d'oligonucleòtids, i per la qual s'ha desenvolupat la metodologia pertinent<sup>100</sup>. Els primers intents de l'estratègia convergent han estat realitzats amb aquesta matriu, ja que en alguns d'ells han estat inclosos tractaments de desprotecció amb TBAF, reactiu en principi incompatible amb l'ús de les boles de vidre (Cap.3, apartat 1.5).

ii) Les boles de vidre de porus controlat (CPG), suport habitualment emprat per a la síntesi dels oligonucleòtids<sup>101</sup>. Ha estat el suport amb el qual s'han realitzat la major part dels intents de síntesi.

• Pel que fa al tipus específic d'enllaç de l'oligonucleòtid a la resina, s'ha optat per una unió de tipus succinil<sup>102</sup>, que és l'habitualment emprada en la síntesi dels oligonucleòtids. Aquest tipus d'unió ha mostrat ser suficientment làbil als diferents tractaments de desancoratge que han estat avaluats (Cap.3, apartat 1.4), pel que no han estat assajades altres tipus d'unions considerades més làbils com les unions oxalil<sup>103</sup> o l'*o*-nitrofeniletil<sup>104</sup>.

#### **c) Elecció del grup protector de la funció $\alpha$ -amino i dels grups protectors permanents de les cadenes laterals del pèptid :**

Per a l'obtenció dels pèptids protegits s'han emprat els dos mètodes habituals de síntesi de pèptids en fase sòlida que empren Boc<sup>64e</sup> o Fmoc-aminoàcids<sup>64f</sup>, en funció dels grups protectors permanents de les cadenes laterals del pèptid protegit (vegeu més avall).

En les seqüències dels nucleopèptids que s'han abordat, l'àcid aspàrtic ha estat, a més de l'aminoàcid d'unió amb l'oligonucleòtid, l'únic aminoàcid trifuncional present. Segons l'esquema de síntesi que ha estat dissenyat, el grup protector de la cadena lateral ha de ser làbil als tractaments bàsics.

Els grups protectors de funcions carboxil utilitzats en la síntesi de pèptids, pels quals s'han descrit condicions de desprotecció amb reactius bàsics<sup>105,106</sup>, tenen estructures de tipus ester molt diverses que queden resumides a la Taula 1.2. Malgrat la seva diversitat, és possible realitzar una classificació atenent al tipus de tractament bàsic que condueix a la seva eliminació en : i) Grups que són eliminats per saponificació o amb reactius nucleòfils, o ii) grups làbils per un mecanisme de  $\beta$ -eliminació, tots ells amb una estructura de grup etil amb substituents electronegatius. Dins d'aquest darrer grup, alguns grups protectors necessiten una etapa prèvia d'oxidació (Taula 1.2, 10, 11) o alquilació (Taula 1.2, 12, 13) abans de ser eliminats.

Taula 1.2 : Grups protectors de grups carboxil descrits per a la síntesi de pèptids i làbils a condicions bàsiques.

A. Grups protectors eliminables per saponificació o amb reactius nucleòfils	
1. Metil 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• LiOH en MeOH aq<sup>98</sup></li> <li>• KOH en MeOH aq<sup>107</sup></li> <li>• Ba(OH)<sub>2</sub> en MeOH aq<sup>108</sup></li> </ul>
2. Benzil 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• M<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en MeOH<sup>109</sup> (R: H)</li> <li>• TBAF en DMF<sup>110</sup> o THF<sup>111</sup> (R: H, NO<sub>2</sub>)</li> </ul>
3. Fenacil 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• TBAF en THF<sup>111</sup></li> <li>• tiofenòxid en DMF<sup>112</sup></li> </ul>
4. 4-Picolil 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• NaOH en dioxà<sup>113</sup></li> </ul>
5. Fenil 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aq pH 11<sup>114</sup></li> </ul>
6. Ftaloil 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• NaOH aq en MeOH<sup>115</sup></li> <li>• N<sub>2</sub>H<sub>4</sub> en MeOH<sup>115</sup></li> <li>• tiofenòxid en DMF<sup>116</sup></li> </ul>
7. 9-Antranilmetil 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• NaOH aq en dioxà<sup>117</sup></li> <li>• CH<sub>3</sub>SNa en DMF<sup>118</sup></li> </ul>
8. Carbamoïlmetil 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• NaOH aq en DMF<sup>119</sup></li> </ul>
9. 4-Sulfobenzil 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• NaOH aq en dioxà</li> <li>• N<sub>2</sub>H<sub>4</sub> en MeOH</li> <li>• NH<sub>3</sub> g en MeOH<sup>120</sup></li> </ul>

B. Grups làbils per β-eliminació	
10. Alquilsulfeniletíl 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• i) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>4</sub></li> <li>• ii) pH 10-11<sup>121,122</sup></li> <li>• i) CH<sub>3</sub>I</li> <li>• ii) pH 10<sup>123</sup></li> </ul>
11. 1,3-Ditianil-2-metil 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• i) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>4</sub></li> <li>• ii) pH 8<sup>124</sup></li> </ul>
12. 2-Piridiletíl 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• i) CH<sub>3</sub>I</li> <li>• ii) Et<sub>2</sub>NH en MeOH<sup>125</sup></li> </ul>
13. 2-(Difenilfosfíno)etil 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• i) CH<sub>3</sub>I</li> <li>• ii) TBAF o K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> aq<sup>126</sup></li> </ul>
14. 2-Alquilsulfoniletíl 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• KCN en dioxà</li> <li>• NaOH aq en dioxà</li> <li>• Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> aq en dioxà<sup>127</sup></li> </ul>
15. 2-Trimetilsililetíl 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• TBAF en DMF<sup>128</sup></li> </ul>
16. 9-Fluoreniletíl 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Et<sub>2</sub>NH o piperidina en DCM<sup>129</sup></li> <li>• TBAF en DMF<sup>110</sup></li> </ul>

En un primer moment s'ha optat pel grup protector 9-fluoreniletíl<sup>129</sup>, que a més de presentar unes excel·lents característiques de labilitat als tractaments de desprotecció assajats com són K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en MeOH/dioxà, LiOH en MeOH/dioxà/aigua i TBAF en THF (Cap.3, apartat 1.3), té l'avantatge de què existeix el derivat Boc-Asp(O<sup>t</sup>Fm)-OH com a producte comercial. De totes formes, com es comentarà més endavant, la baixa solubilitat dels pèptids protegits amb el grup 9-fluoreniletíl en dissolvents usuals, han recomanat assajar altres grups protectors per a l'aminoàcid (apartat 3.1 d'aquest Capítol).

Per solucionar el problema de la solubilitat del pèptid, dues han estat les opcions preses :

• Per un costat, s'ha dut a terme el desenvolupament d'un nou grup protector, el grup 2-(4-acetil-3-nitrofenil)etil (Cap.3, apartat 2). Les proves de labilitat que han estat realitzades sobre el derivat Boc-Asp(OAnpe)-OH (Cap.3, apartat 1.2) mostren que és un grup protector eliminable per tractament amb el reactiu TBAF en THF de forma pràcticament immediata, a similitud del que succeix amb el grup protector 9-fluorenilmetil. També pot ser eliminat amb el reactiu LiOH en MeOH/dioxà/aigua en un temps raonable. Altres reactius, com K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en MeOH/dioxà o l'NH<sub>3</sub> aquós concentrat en dioxà, tot i que produeixen la pèrdua del grup protector en temps curts, no són adequats ja que produeixen l'esterificació o l'amidació del grup carboxil, respectivament. No obstant, el pèptid que ha estat sintetitzat amb aquest grup protector, Ac-Ser-Gly-Asp(OAnpe)-NH<sub>2</sub> millora notablement les propietats de solubilitat respecte a l'anàleg amb el grup protector 9-fluorenilmetil, pel que ha estat utilitzat en alguns dels intents de síntesi del nucleopèptid Ac-Ser(p<sup>5</sup>CATCAT)-Gly-Asp-NH<sub>2</sub> mitjançant l'esquema convergent (apartats 3.4 i 3.5 d'aquest Capítol).

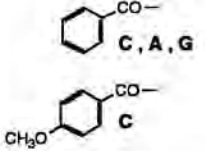
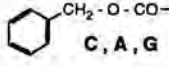
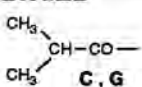
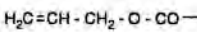
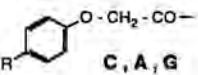
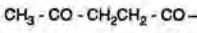
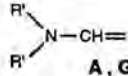
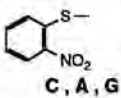
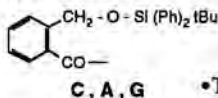
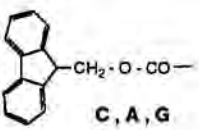
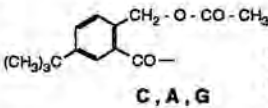
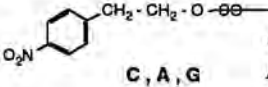
• S'ha provat també el grup benzil<sup>130</sup>, ja que és possible eliminar-lo per tractament amb LiOH en MeOH/dioxà/aigua en un temps raonable (Cap.3, apartat 1.3). El pèptid presenta també millor solubilitat que l'anàleg amb el grup protector fluorenilmetil, el que s'ha aprofitat per efectuar alguns dels intents d'obtenció del nucleopèptid Ac-Ser(p<sup>5</sup>CATCAT)-Gly-Asp-NH<sub>2</sub> mitjançant l'esquema convergent (apartats 3.4 i 3.5 d'aquest Capítol).

#### **d) Elecció del mètode de síntesi de l'oligonucleòtid i dels grups protectors permanents :**

S'ha pensat realitzar la síntesi dels oligonucleòtids seguint la metodologia del fosfit-triester, que utilitza derivats fosforamidit com a intermedis<sup>131</sup>. Es tracta del mètode habitual per sintetitzar els oligonucleòtids ja que els intermedis que s'utilitzen en la síntesi són estables i de fàcil obtenció, les reaccions són ràpides i amb rendiments quantitatius, i presenta poques reaccions secundàries. La protecció temporal del grup hidroxil primari en els nucleòsids ha estat efectuada amb el grup dimetoxitritil (DMT), que és el grup habitualment utilitzat i que és làbil als tractaments àcids suaus. També s'ha mantingut el grup protector 2-cianoetil per l'enllaç fosfat, que ha mostrat ser perfectament làbil al conjunt de tractaments de desprotecció assajats (Cap.3, apartat 1.1). La protecció permanent de les nucleobases ha necessitat ser avaluada entre diferents opcions.

En els mètodes habituals de síntesi d'oligonucleòtids es protegeixen els grups amino exocíclics de les nucleobases amb grups protectors de tipus amida. Normalment no es fa necessària la protecció de les funcions N-H de timina, uracil o guanina, tot i que per la seva acidesa poden ser causa de determinades reaccions secundàries<sup>132</sup>.

**Taula 1.3 : Grups protectors de les nucleobases emprats a la síntesi d'oligonucleòtids**

A. Grups protectors làbils a NH <sub>3</sub> o eliminables per saponificació :	C. Grups protectors eliminables per altres mecanismes
<p>1. Benzoïl / Anisoïl</p>  <p>•NH<sub>3</sub> aq conc<sup>133</sup>                  •NaOH en MeOH/dioxà<sup>132a</sup>                  •H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>/fenol<sup>134</sup>                  •N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O en piridina/AcOH<sup>135</sup></p>	<p>7. Benziloxycarbonil</p>  <p>•H<sub>2</sub> / Pd<sup>148</sup></p>
<p>2. Isobutiril</p>  <p>•NH<sub>3</sub> aq conc<sup>136,137</sup></p>	<p>8. Al·liloxycarbonil</p>  <p>•Pd[P(Ph)<sub>3</sub>]<sub>4</sub> en HCO<sub>2</sub>H/Et<sub>2</sub>NH<sup>149</sup></p>
<p>3. Fenoxiacetil</p>  <p>•NH<sub>3</sub> aq conc<sup>136,138</sup> (R : H, tBu)                  •NaOH-MeOH<sup>139</sup> (R : tBu)                  •H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OH MeOH o N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OH MeOH(R : tBu)<sup>140</sup></p>	<p>9. Levulinoïl</p>  <p>•N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O piridina/AcOH<sup>150</sup></p>
<p>4. Dialquilaminometilè</p>  <p>•NH<sub>3</sub> aq conc<sup>141, 142</sup>                  •N<sub>2</sub>H<sub>4</sub> o H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH<sub>2</sub><sup>141c</sup></p>	<p>10. 2-Nitrofenilsulfenil</p>  <p>•tiocresol/Et<sub>3</sub>N pir.<sup>151</sup>                  •Bu<sub>3</sub>P en dioxà/H<sub>2</sub>O<sup>57</sup></p>
<p>B. Grups protectors làbils per β-eliminació</p>	<p>11. 2-(t-Butildifenilsililoximetil)benzoïl</p>  <p>•TBAF en pir./H<sub>2</sub>O<sup>152</sup></p>
<p>5. 9-Fluorenilmetoxicarbonil</p>  <p>•NH<sub>3</sub> aq conc<sup>143</sup>                  •Et<sub>3</sub>N en piridina<sup>144</sup>                  •DBU 1 M en ACN<sup>145</sup>                  •o-nitrobenzaldoximat de tetrametilguanidina<sup>50</sup>                  •K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en MeOH<sup>96</sup></p>	<p>12. 2-(Acetoximetilbenzoïl)</p>  <p>•NH<sub>3</sub> aq conc<sup>153</sup>                  •K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en MeOH<sup>153</sup>                  •NH<sub>3</sub> g en MeOH<sup>154</sup></p>
<p>6. 2-(4-Nitrofenil)etoxicarbonil</p>  <p>•DBU en piridina, dioxà, ACN o EtOH<sup>146,147</sup></p>	

Els grups isobutiril per a guanina, i benzoïl per a adenina i citosina, introduïts pel grup de H. G. Khorana a principis dels anys seixanta<sup>133</sup>, constitueixen l'esquema de protecció de les nucleobases més habitual. Aquests grups protectors s'eliminen en condicions força enèrgiques com un tractament amb NH<sub>3</sub> aquós concentrat durant un mínim de 6 h a 55 °C. L'extensió dels mètodes sintètics a l'obtenció d'altres anàlegs o derivats d'oligonucleòtids<sup>155</sup> amb problemes específics d'estabilitat ha comportat el disseny d'altres esquemes de protecció basats en grups més làbils o que poden ser eliminats amb reactius alternatius a l'amoniac o als tractaments bàsics. La Taula 1.3

resumeix el conjunt de grups protectors, i les respectives condicions d'eliminació, que han estat objecte de major aplicació en la síntesi d'oligonucleòtids (per a una revisió més exhaustiva, consulteu les referències 156 i 157).

La selecció d'un grup protector per a les nucleobases a utilitzar en la síntesi de nucleopèptids s'ha realitzat tenint en compte dos criteris bàsics. Per un costat s'ha optat per la utilització d'esquemes de protecció coneguts (vegeu la Taula precedent), que simplifiquessin la disponibilitat dels intermedis emprats en la síntesi de l'oligonucleòtid. Per altra banda, s'han elegit els grups protectors que han mostrat ser eliminables amb reactius compatibles amb l'estabilitat dels models nucleopeptídics Boc-Ser(p T-DMT)-NHcHex **21** (Cap.3, apartat 1.2). A continuació es comenten els diferents grups protectors que han estat utilitzats al llarg dels diferents intents realitzats mitjançant l'estratègia convergent :

- El primer grup protector al qual s'ha pensat recórrer, el grup 9-fluorenilmetoxicarbonil, ha resultat ser d'especial interès ja que presenta labilitat a pràcticament tot tipus de tractament bàsic (vegeu Taula 1.3). És un grup protector que ha estat utilitzat en alguna ocasió en la síntesi d'oligonucleòtids<sup>143-145</sup> pel qual, tot i no existir la possibilitat de disposar de derivats comercials, són compostos de fàcil accés per via sintètica. El reactiu  $K_2CO_3$  en MeOH/dioxà, que ja havia estat descrit per efectuar l'eliminació del grup protector (sense dioxà, però)<sup>96</sup>, ha estat utilitzat com a tractament de desprotecció en els intents de síntesi de nucleopèptids en què s'ha decidit emprat aquest grup protector.

- S'han assajat diversos grups protectors d'entre els considerats habituals en la síntesi dels oligonucleòtids, que es caracteritzen per una major labilitat als tractaments amb amoníac aquós concentrat, avaluant la seva labilitat als reactius  $K_2CO_3$  en MeOH/dioxà i LiOH en MeOH/dioxà/aigua (Cap.3, apartat 1.2, Taules 3.2 i 3.3). Tots ells presenten l'avantatge addicional de poder disposar dels corresponents nucleòsids fosforamidit com a derivats comercials.

Segons les proves realitzades, la protecció de citosina i adenina s'ha pogut resoldre utilitzant els grups benzoil<sup>133</sup> i isobutiril<sup>136</sup>, respectivament, que poden ser eliminats amb  $K_2CO_3$  en MeOH/dioxà/aigua o amb LiOH en MeOH/dioxà/aigua en temps no massa llargs (Cap.3, apartat 1.2). S'ha desestimat el grup fenoxiacetil que, tot i que ha mostrat millors característiques de labilitat en les proves realitzades, presenta el desavantatge de què alguns dels nucleòsids protegits són insolubles<sup>138</sup>.

- L'estabilitat del model Boc-Ser(p T-DMT)-NHcHex (**21**) als tractaments amb amoníac ha permès plantejar un esquema de protecció alternatiu als anteriors, basat en grups protectors làbils a aquestes condicions. Per això, s'ha decidit combinar el grup isobutiril per a citosina i el grup dimetilaminometilè per a adenina. Aquest darrer grup presenta millors característiques de

labilitat<sup>141,142</sup> que el grup benzoïl, que és el grup habitualment utilitzat per protegir aquesta nucleobase (Taula 3.3; Cap.3, apartat 1.3).

## 2. Obtenció del nucleopèptid Boc-Ser(p<sup>5'</sup>TCT)NHcHex (**25**) :

El primer exemple d'aplicació de l'estratègia convergent ha correspost al nucleopèptid model Boc-Ser(p<sup>5'</sup>TCT)NHcHex que conté un enllaç serina-nucleòsid làbil a les bases. S'han tingut en compte diferents consideracions en la seva realització :

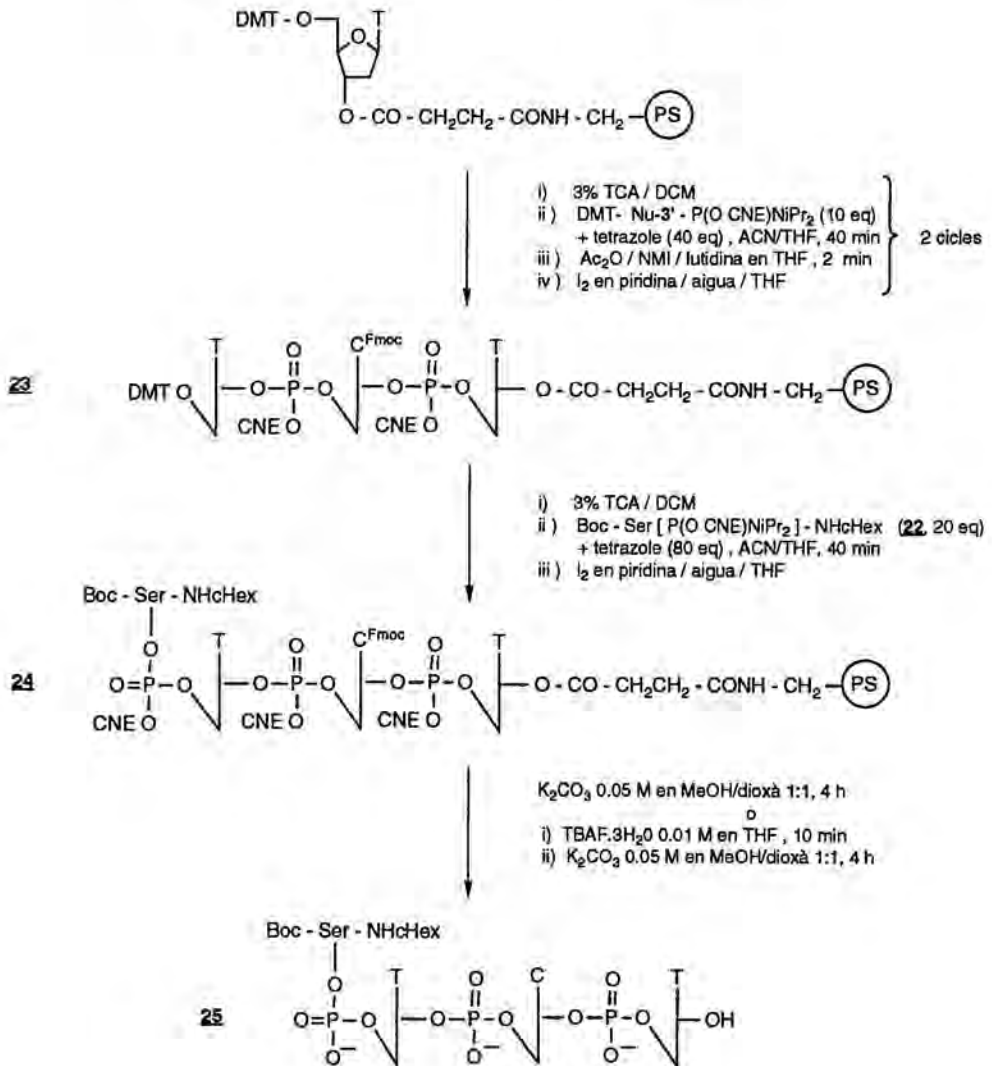
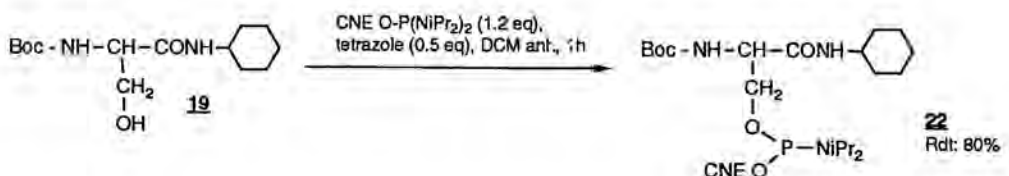
i) S'ha decidit efectuar la síntesi sobre una matriu sòlida de poliestirè per permetre avaluar, entre els tractaments de desprotecció, reactius com TBAF.

ii) Com a grups protectors permanents s'ha decidit emprar el grup 9-fluorenilmetoxicarbonil per a les nucleobases, el grup 2-cianoetil per als enllaços fosfat i una unió de tipus succinil de l'oligonucleòtid a la resina.

La Figura 1.3 resumeix el procés seguit per a l'obtenció del nucleopèptid Boc-Ser(p<sup>5'</sup>TCT)NHcHex.

### 2.1 Obtenció del derivat fosforamidit de l'aminoàcid Boc-Ser(P(OCNE)NiPr<sub>2</sub>)-NHcHex (**22**) :

El primer pas de l'esquema de síntesi convergent implica l'obtenció del derivat fosfilitat de l'aminoàcid. Per això, s'ha partit del derivat Boc-Ser-NHcHex (**19**), producte que ja ha estat emprat per a l'obtenció dels models nucleopeptídics Boc-Ser(p T-DMT)-NHcHex (Cap.3, apartat 1.1). El corresponent derivat (2-cianoetoxi)bis(diisopropilamino)fosforamidit s'ha obtingut (Fig. 1.4) per fosfilitació en dissolució de l'aminoàcid **19** amb (2-cianoetoxi)bis(diisopropilamino)fosfina en presència de tetrazole, seguint la metodologia habitual d'obtenció d'aquests derivats pel cas dels nucleòsids (Cap.3, apartat 3). El producte **22**, en forma d'un oli espès, mostra per <sup>31</sup>P RMN el desplaçament químic esperat per un derivat fosforamidit.

Figura 1.3 : Síntesi del nucleopèptid BocSer( $\gamma^5$ TCT)NHcHexFigura 1.4 : Obtenció de BocSer(P(OCNE)NiPr<sub>2</sub>)NHcHex

## 2.2 Obtenció de l'oligonucleotidil-resina : HO-T-C<sup>Fmoc</sup>-T-suc-NHCH<sub>2</sub>-PS (23) :

S'ha partit de la resina aminometilpoliestirè, a la que s'ha ancorat timidina com a derivat succinat de 5'-O-DMT-timidin-3'-il en presència de DCC i HOBt. Donat que la resina inicial té una alta substitució (1 mmol grups NH<sub>2</sub>/g), s'ha emprat en la reacció un defecte de nucleòsid. La substitució final ha resultat ser de 0.12 mmol DMT per gram de resina, valor que s'ha considerat òptim per dur a terme la síntesi de l'oligonucleòtid.

L'oligonucleòtid s'ha sintetitzat per mitjà d'un muntatge experimental de tipus manual<sup>158</sup>, utilitzant la metodologia de síntesi dels derivats fosforamidit adaptada a l'ús de poliestirè com a resina<sup>100</sup>. L'escala de treball ha estat de 1.2 μmol, i s'han emprat els derivats DMT-dC<sup>Fmoc</sup>-P(OCNE)NiPr<sub>2</sub>, sintetitzat com es descriu més endavant (Cap.3, apartat 3), i DMT-T-P(OCNE)NiPr<sub>2</sub>, d'origen comercial. L'etapa d'acoblament s'ha realitzat afegint al reactor que conté la resina 10 equivalents del derivat fosforamidit dissolt en DCM anhidre i 40 equivalents de tetrazole dissolt en ACN/THF 7:3 (dissolució 1.2 M), i s'ha deixat reaccionar durant 40 min. A continuació s'han realitzat les etapes d'acetilació, oxidació i eliminació del grup protector DMT. El rendiment mig d'incorporació dels dos nucleòsids es pot considerar òptim (96%; Sec. Exp. Cap.1, 2.2).

Com a control de la síntesi del trimer, s'ha desancorat i desprotegit l'oligonucleòtid d'una alíquota de resina per tractament amb una dissolució 0.05 M de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en MeOH/dioxà 1:1, durant 4 h a temperatura ambient (vegeu més endavant). El cru, analitzat per HPLC, mostra un producte únic, amb un excel·lent grau de puresa (superior al 95%).

## 2.3 Acoblament de Boc-Ser(P(OCNE)NiPr<sub>2</sub>)-NHcHex sobre l'oligonucleotidil resina 23 :

L'acoblament del derivat Boc-Ser(P(OCNE)NiPr<sub>2</sub>)-NHcHex (22) s'ha dut a terme en les mateixes condicions que els derivats de nucleòsid, encara que emprant un major nombre d'equivalents respecte a la resina per afavorir la reacció. D'aquesta forma, a l'etapa d'acoblament, s'han afegit al reactor que conté la resina 20 equivalents del derivat fosforamidit 22, dissolt en DCM anhidre i 80 equivalents de tetrazole dissolt en ACN/THF 7:3, i s'ha deixat reaccionar durant 40 min. Acabada la reacció, s'ha realitzat l'etapa d'oxidació amb iode aquós.

## 2.4 Desprotecció i desancoratge :

Per escollir els tractaments de desprotecció i desancoratge s'han tingut en compte els següents resultats de les proves preliminars realitzades (Cap. 3, apartat 1) :

El compost Boc-Ser(p T-DMT)-NHcHex 21, elegit per estimar la compatibilitat dels tractaments bàsics de desprotecció i desancoratge amb l'estabilitat dels nucleopèptids, és perfectament estable durant 24 h al reactiu K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.05 M en MeOH/dioxà 1:1. (Cap.3, apartat 1.1).



A més, aquest reactiu permet una ràpida eliminació dels grups protectors de tipus fluorenilmetoxicarbonil (Cap.3, apartat 1.2), elegits per a la protecció de les nucleobases, i el grup 2-cianoetil (Cap.3, apartat 1.1) que protegeix els enllaços fosfat. A part, el desancoratge d'un oligonucleòtid unit a una resina de poliestirè també es pot produir de forma quantitativa pel mateix tractament en un temps no massa llarg (Cap.3, apartat 1.4).

El tractament amb el reactiu TBAF.3H<sub>2</sub>O 0.01 M en THF anhidre pot produir l'eliminació dels grups protectors cianoetil i fluorenilmetoxicarbonil<sup>159</sup>. S'ha vist que els derivats Boc-Ser(p T-DMT)NHcHex **21** són estables en aquestes condicions (Cap.3, apartat 1.2).

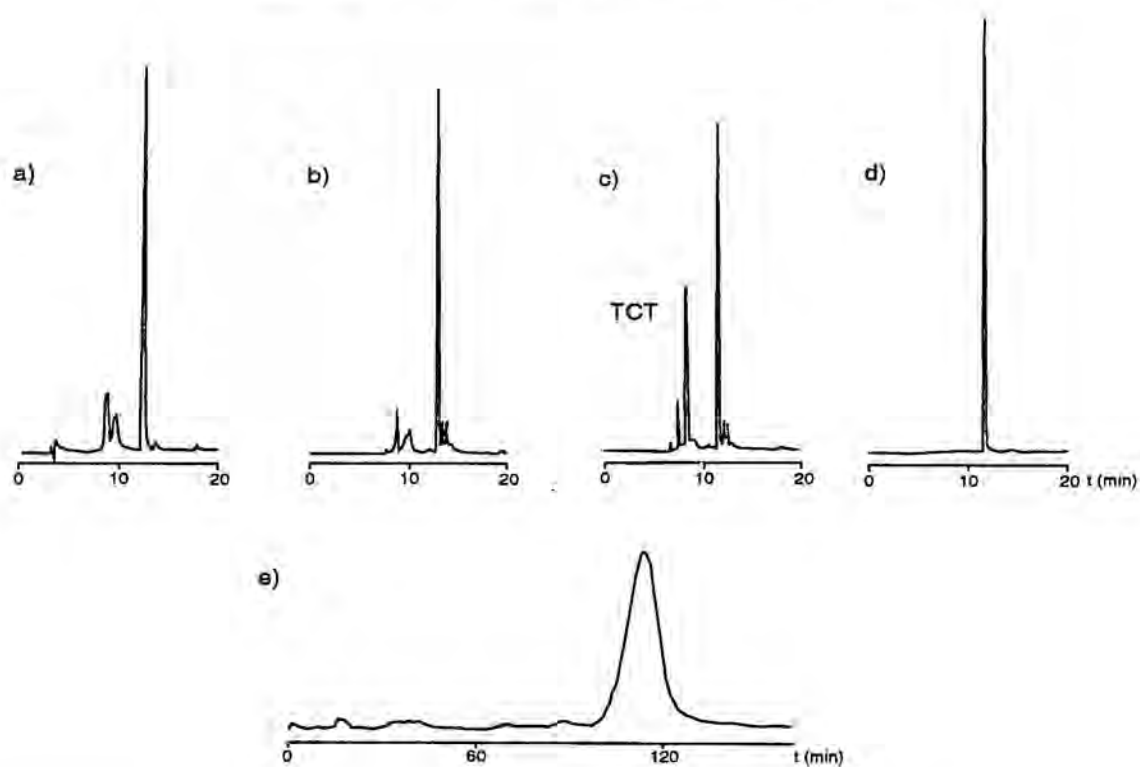
Segons aquestes consideracions, s'han assajat els dos procediments de desprotecció i desancoratge següents :

A) tractament de la resina amb una dissolució 0.05 M de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en MeOH/dioxà durant 4 h, més un segon tractament durant una nit sobre la mateixa resina.

B) una primera etapa de tractament de la resina amb una dissolució 0.01 M de TBAF.3H<sub>2</sub>O en THF anhidre durant 10 min, seguida de desancoratge del producte per tractament amb la dissolució 0.05 M de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en MeOH/dioxà durant 4 h.

Els productes alliberats de les resines, una vegada neutralitzats amb AcOH aq 1% i evaporats a sequedat, han estat redissolts en aigua i analitzats per HPLC en fase reversa. Les quantitats de producte aïllat en cada procediment, determinades per absorció a l'UV, no ofereixen diferències significatives.

L'anàlisi per HPLC del producte alliberat, tant pel procediment A (Fig. 1.5.a) com pel del procediment B (Fig. 1.5.b), mostra un producte majoritari (t<sub>R</sub> 12.0 min, >90% per absorció a 260 nm), acompanyat d'un producte minoritari (t<sub>R</sub> 8.5 min). S'ha pogut comprovar que el producte minoritari coelueix amb l'oligonucleòtid <sup>5</sup>TCT (Fig. 1.5.c). D'aquí es pot deduir que el producte majoritari és el nucleopèptid desitjat, i que el producte minoritari correspon a l'oligonucleòtid que no ha reaccionat a l'etapa d'acoblament.

Figura 1.5 : Obtenció del nucleopèptid BocSer(p<sup>5'</sup>TCT)NHcHex

Cromatogrames a-d : Anàlisi per HPLC en fase reversa (sistema FR-C, gradient 0-100% B en 20 min, 260 nm) :

- a) producte desprotegit i alliberat de la resina amb el tractament A;
- b) producte desprotegit i alliberat de la resina amb el tractament B;
- c) coinjecció del cru procedent del tractament B i l'oligonucleòtid 5' TCT ( $t_R$  8.5 min);
- d) Nucleopèptid purificat

Cromatograma e : Purificació del nucleopèptid per DEAE-Sephadex (gradient tampó TEAB 0.1 M a 0.5 M, 254 nm.)

## 2.5 Purificació i caracterització del nucleopèptid Boc-Ser(p<sup>5'</sup>TCT)-NHcHex (25) :

El nucleopèptid ha estat purificat per elució a través d'una columna de bescanvi aniònic DEAE-Sephadex amb un gradient de concentració del tampó aquós TEAB (Fig.1.5.d). El producte mostra aleshores un grau òptim d'homogeneïtat en ser analitzat per HPLC en fase reversa (Fig. 1.5.e).

El rendiment de síntesi, desprotecció, desancoratge i purificació és clarament satisfactori : 50% (49 OD<sub>260</sub> a partir de 1.2 mmol de DMT-T-suc-resina).

Amb l'objecte de caracteritzar el nucleopèptid Boc-Ser(p<sup>5'</sup>TCT)-NHcHex (25), s'han realitzat els següents experiments :

**a) Digestió enzimàtica i anàlisi de nucleòsids :**

El producte ha estat degradat amb la barreja d'enzims de fosfodiesterasa de verí de serp (SVPD) i fosfatasa alcalina (AP). Aquesta combinació d'enzims s'utilitza habitualment per degradar oligonucleòtids a la barreja de nucleòsids constituents. Per a les nucleoproteïnes en què la unió al pèptid té lloc amb la participació de l'hidroxil primari del nucleòsid o hidroxil 5', s'ha descrit que aquests enzims també produeixen el trencament de la unió fosfat entre el nucleòsid i el pèptid<sup>48</sup>. L'anàlisi per HPLC del producte de digestió mostra efectivament els nucleòsids amb la proporció esperada : dC 1.0, T 1.9 (teòrica: dC 1.0, T 2.0)

**b) Espectres de RMN i de masses :**

S'ha obtingut la sal sòdica del producte, amb la qual s'han enregistrat els espectres següents :

- <sup>31</sup>P RMN que mostra un únic senyal ample centrat a -3.6 ppm.
- <sup>1</sup>H RMN on són especialment diagnòstics de l'estructura en què es troben unitats l'oligonucleòtid i l'aminoàcid els senyals corresponents als protons aromàtics de les nucleobases ( $\delta$  : 7.70, H6 C; 7.55 2 x H5T; 5.91, H5 C) i els protons del grup metil del grup protector Boc (1.76, 9 H).

S'ha enregistrat un espectre de masses per mitjà de la tècnica d'electrospray, que mostra diferents senyals assignables a formes ionitzades de càrrega múltiple del producte.

### 3. Intents de preparació del nucleopèptid

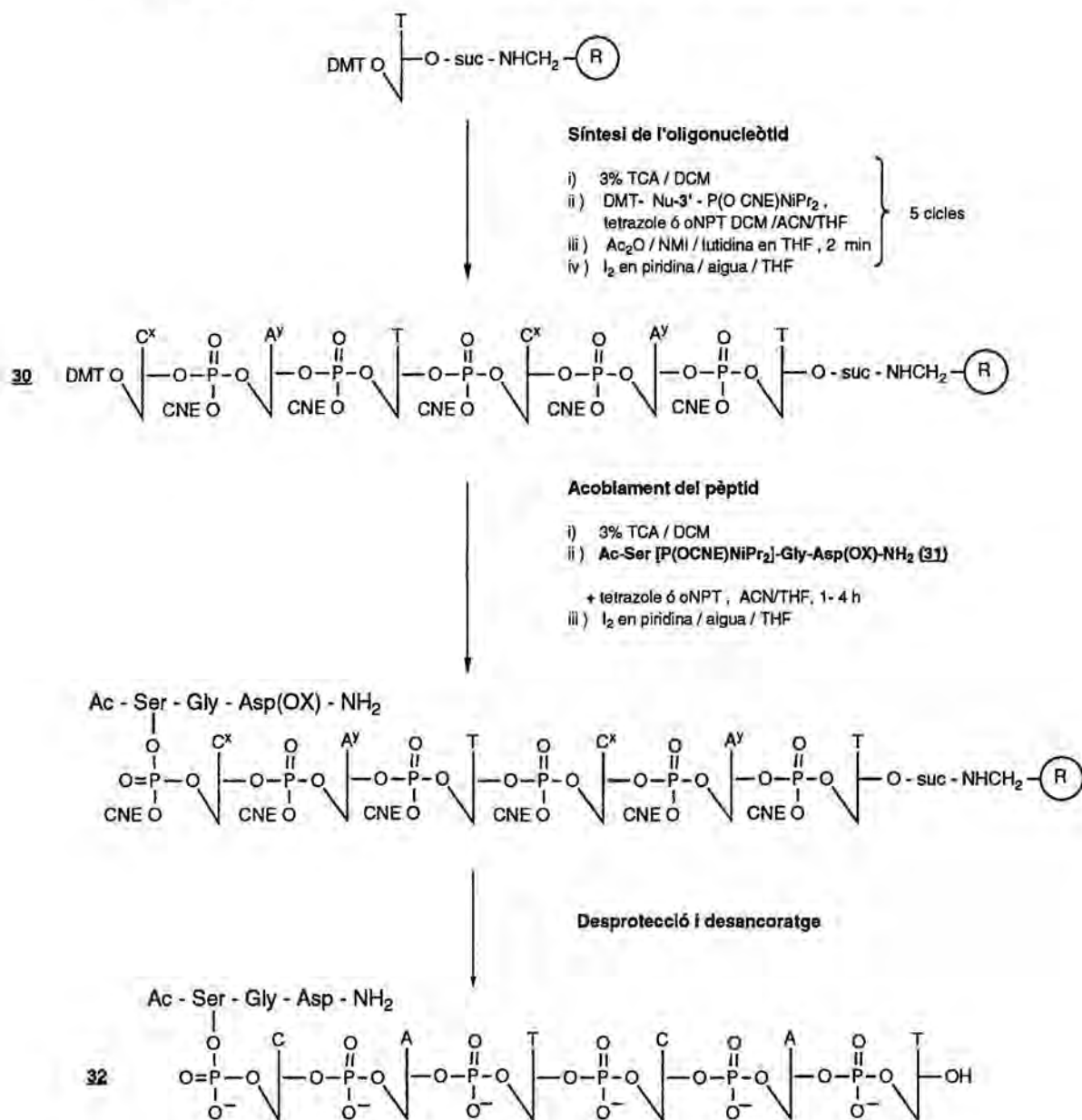
#### Ac-Ser(p<sup>5'</sup>CATCAT)-Gly-Asp-NH<sub>2</sub> (32) :

Els excel·lents resultats en l'obtenció del nucleopèptid Boc-Ser(p<sup>5'</sup>TCT)-NHcHex han permès contemplar la síntesi d'un nucleopèptid més complex, amb el qual estendre l'aplicabilitat de la metodologia. S'ha decidit reproduir una seqüència natural, -Asn-Ser(p<sup>5'</sup>CATCAT)-Gly-Asp-, que forma part de la zona d'unió de la nucleoproteïna d'adenovirus 2<sup>17</sup> (vegeu la Introducció), i que conté, a més de serina un altre aminoàcid trifuncional.

Per a la realització de la síntesi s'ha cregut adequat seguir el mateix esquema que ha estat assajat en l'exemple precedent. No obstant, en aquest cas cal plantejar-se l'obtenció d'un pèptid protegit, el qual, convenientment funcionalitzat com a derivat fosforamidit, s'unirà a l'oligonucleòtid per formació de l'enllaç fosfat en l'etapa d'acoblament.

Com s'explica a continuació, en un inici, es va pensar dur a terme la síntesi del nucleopèptid Ac-Asn-Ser(p<sup>5'</sup>CATCAT)-Gly-Asp-NH<sub>2</sub>. Amb aquest objectiu, s'ha sintetitzat el pèptid protegit Ac-Asn-Ser-Gly-Asp(O<sup>6'</sup>Fm)-NH<sub>2</sub> (apartat 3.1.a), que ha estat fosfitilat per obtenir el corresponent derivat fosforamidit (apartat 3.3), i amb aquest producte s'ha intentat efectuar l'acoblament sobre l'oligonucleòtidil-resina. No obstant, els problemes derivats de la pròpia insolubilitat del pèptid, l'observació de reaccions secundàries lligades a la presència de dos grups carboxamida (vegeu l'apartat 4) i en definitiva, els resultats negatius en els assajos d'acoblament realitzats (apartats 3.5), han dut a desestimar la síntesi del nucleopèptid que conté el residu d'asparagina, i dirigir l'objecte del treball cap a la síntesi del nucleopèptid Ac-Ser(p<sup>5'</sup>CATCAT)-Gly-Asp-NH<sub>2</sub>.

La següent figura resumeix l'esquema general que s'ha seguit per dur a terme els diferents intents d'obtenció del nucleopèptid.

Figura 1.6 : Intents d'obtenció del nucleopèptid Ac-Ser( $p^{5'}$ CATCAT)-Gly-Asp-NH<sub>2</sub>.

### 3.1 Obtenció dels pèptids protegits :

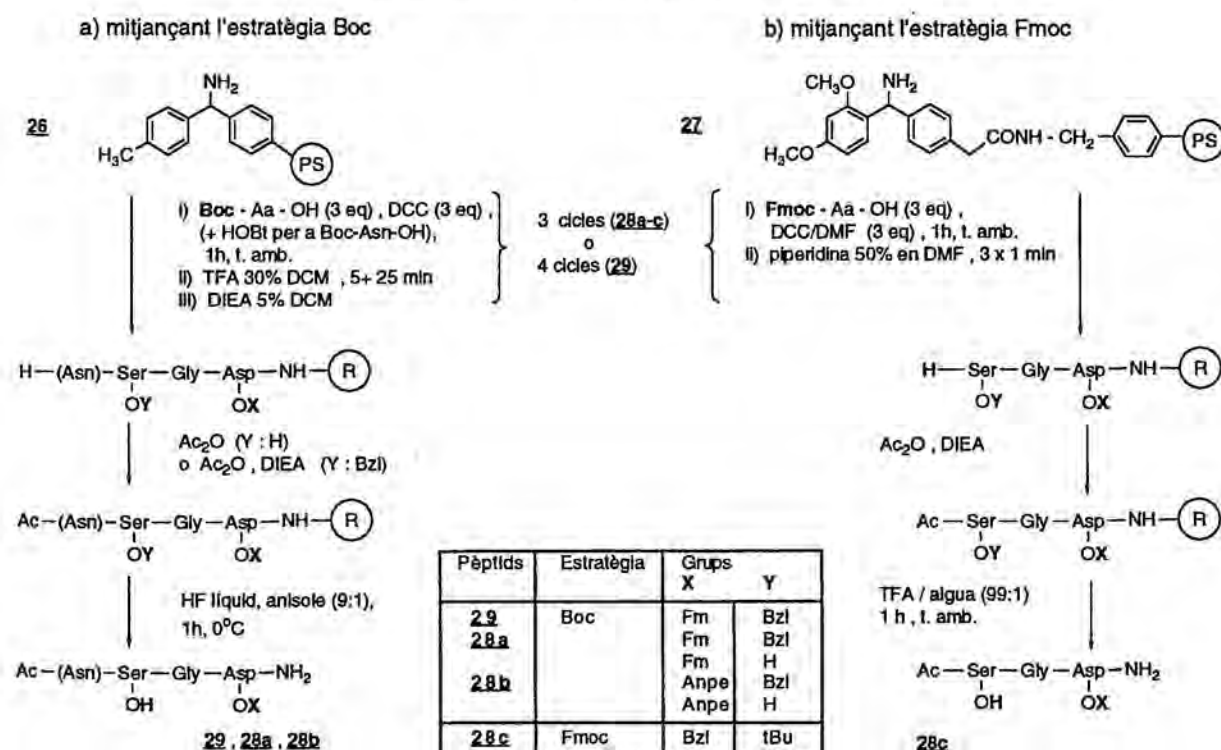
S'ha cregut convenient efectuar la síntesi dels pèptids protegits en fase sòlida, i evitar d'aquesta manera la síntesi, aïllament i purificació dels diferents intermedis d'una síntesi en solució per etapes. A part, amb una elecció adequada de la resina, es pot obtenir directament el pèptid com a derivat amida sense haver d'efectuar una etapa addicional de reacció.

L'àcid aspàrtic és l'únic aminoàcid trifuncional present en la seqüència del nucleopèptid pel qual és necessari elegir un grup protector permanent. No es coneixien precedents que indiquessin que els grups carbamoil de la cadena lateral d'asparagina o de l'extrem C-terminal poguessin interferir en les reaccions de fosfilitació i en la següent etapa d'acoblament, i per tant no han estat protegits. Segons l'esquema que ha estat dissenyat, s'han elegit grups protectors per al residu d'àcid aspàrtic làbils a les bases i estables als tractaments àcids que s'utilitzen en la síntesi del pèptid (HF o TFA). Tres han estat els grups protectors assajats : el grup protector 9-fluorenilmetil, el grup 2-(4-acetil-3-nitrofenil)etil (Anpe), desenvolupat com a part d'aquest treball<sup>160</sup> (Cap 3, apartat 2) i el grup benzil (vegeu l'apartat 1.2.c d'aquest Capítol).

Així, al llarg del treball realitzat s'han obtingut quatre pèptids diferents, els tripèptids Ac-Ser-Gly-Asp(OX)-NH<sub>2</sub>, on X : Fm (**28a**) , Anpe (**28b**) i Bzl (**28c**) i el tetrapèptid Ac-Asn-Ser-Gly-Asp(OFm)-NH<sub>2</sub> (**29**). Els pèptids **28a**, **28b** i **29** han estat sintetitzats mitjançant la metodologia que empra Boc-aminoàcids sobre una resina de tipus *p*-metilbenzidrilamina per tractament amb HF líquid. El tripèptid **28c** s'ha sintetitzat utilitzant Fmoc-aminoàcids sobre una resina de poliestirè funcionalitzada de manera que es pot efectuar la desprotecció i desancoratge per tractament amb TFA concentrat, obtenint-se el pèptid com a derivat amida.

El següent esquema resumeix el camí que s'ha seguit per a l'obtenció dels diferents pèptids :

**Figura 1.7** : Obtenció dels pèptids Ac-Asn-Ser-Gly-Asp(OFm)-NH<sub>2</sub> i Ac-Ser-Gly-Asp(OX)-NH<sub>2</sub> (X : Fm , Anpe i Bzl).



a) Obtenció dels pèptids Ac-Ser-Gly-Asp(O<sub>Fm</sub>)-NH<sub>2</sub> (**28a**) iAc-Asn-Ser-Gly-Asp(O<sub>Fm</sub>)-NH<sub>2</sub> (**29**) :

Per a la síntesi dels pèptids **28a** i **29** s'ha partit d'una resina *p*-metilbenzidrilamina, a la qual s'han acoblat els corresponents Boc-aminoàcids en presència de DCC en barreges de DCM i DMF, i seguint els típics protocols de la metodologia Boc (Mater. Mèt. Gen., apartat III).

L'aminoàcid serina s'ha acoblat bé com a derivat protegit en el grup β-hidroxil amb el grup benzil, o amb el grup hidroxil lliure com a derivat desprotegit. En aquest darrer cas, l'acoblament s'ha realitzat en les mateixes condicions que els altres aminoàcids (DCC, DCM), sense que s'hagin observat en els crus del pèptids obtinguts subproductes apareguts com a resultat d'O-acilació. Per a l'obtenció del tetrapèptid, l'acoblament d'asparagina s'ha realitzat preformant l'ester de benzotriazolil per evitar la deshidratació del grup carbamoil<sup>161</sup>, reacció secundària que s'observa en dur a terme l'acoblament de l'aminoàcid amb activació de DCC.

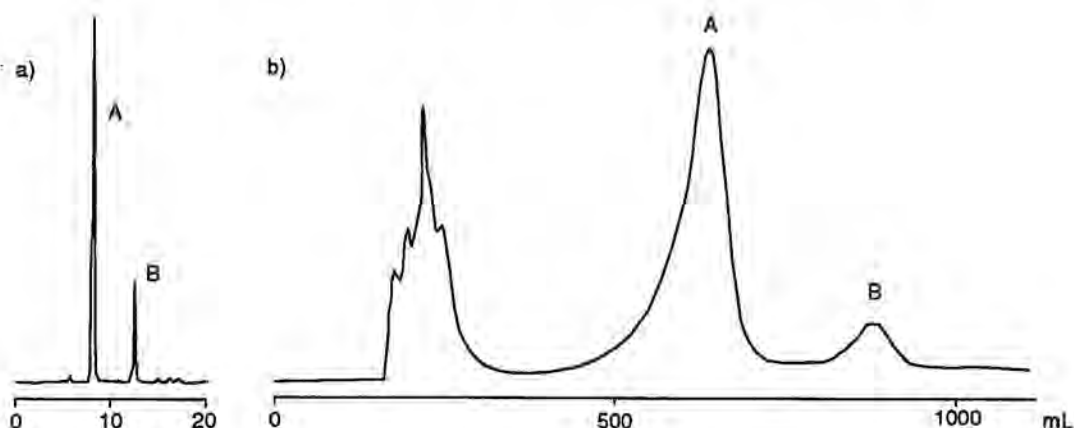
Una vegada incorporats els aminoàcids, l'extrem amino dels pèptids s'ha bloquejat per reacció amb Ac<sub>2</sub>O i DIEA (no s'ha utilitzat DIEA en els pèptids en què el grup hidroxil estava lliure per evitar l'O-acetilació). Havent comprovat la correcta incorporació dels aminoàcids per anàlisi d'aminoàcids de les peptidil-resines, s'ha procedit a efectuar la desprotecció i alliberament dels pèptids **28a** i **29** de les resines per tractament amb HF líquid en presència d'anisole com a captador de cations, durant 1 h a 0°C.

L'anàlisi del tetrapèptid cru **29** mostra la presència de dos productes, **A** i **B**, en una proporció 3:1 (Fig. 1.8.a). Aquests dos productes han pogut ser aïllats mitjançant purificació per MPLC en fase reversa (Fig. 1.8.b), i s'ha dut a terme la seva caracterització. Per a tots dos, les anàlisis d'aminoàcids realitzades mostren la proporció d'aminoàcids a esperar pel teòric pèptid, el que ha fet pensar que un dels dos productes podia ser d'un subproducte amb els dos grups protectors. Havent enregistrat els corresponents espectres de <sup>1</sup>H-RMN, s'ha pogut observar que **A** presenta els senyals a esperar pel pèptid desitjat. Per contra, l'espectre de **B** mostra una zona aromàtica molt complexa, amb una major integració de la prevista (protons del grup fluorenilmetil i grups amida), i un senyal singlet no esperat a 3.85 ppm que integra 2 protons. Això s'ha interpretat suposant que l'anell aromàtic del grup fluorenilmetil ha sofert alquilació per part del catió benzil generat en el procés de desprotecció de la peptidil-resina amb HF líquid (Fig. 1.9). La benzilació de l'anell de fluorè s'ha vist confirmada pel fet que el tractament amb piperidina que elimina el grup protector fluorenilmetil en el pèptid **A** provoca igualment la desprotecció en el producte **B**, generant el pèptid desprotegit. Per altra banda, l'espectre de masses FAB que ha estat enregistrat pel producte **B** dona un senyal de pes molecular que es correspon amb la presència del grup benzil a la molècula<sup>162</sup>.

Resultat similar ha estat obtingut pel tripèptid **28a**, en què la proporció del pèptid benzilat en el cru alliberat de la resina ha estat d'un 30%. Donat que la causa inicial del problema és el grup

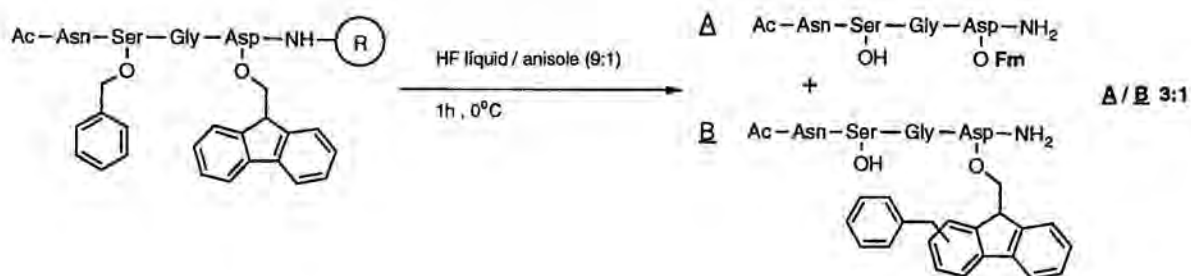
benzil que protegeix temporalment el grup hidroxil de serina, s'ha realitzat una altra síntesi del tripèptid emprant Boc-Ser-OH. Una vegada sintetitzat, l'anàlisi per HPLC del cru de pèptid alliberat per tractament acidolític mostra el tripèptid protegit **28a** com a únic producte.

**Figura 1.8** : Obtenció i purificació del pèptid Ac-Asn-Ser-Gly-Asp(OFm)-NH<sub>2</sub>



- Cromatograma a : Anàlisi per HPLC en fase reversa del cru de síntesi del tetrapèptid Ac-Asn-Ser-Gly-Asp(OFm)-NH<sub>2</sub> **29** (sistema FR-A, gradient lineal 30-80% en 20 min, 300 nm, **A** (t<sub>R</sub> 6.9 min): tetrapèptid **29**, **B** (t<sub>R</sub> 11.0 min): subproducte de benzilació.
- Cromatograma b : Purificació dels pèptids **A** i **B** per MPLC en fase reversa (Sec. exp. Cap.1)

**Figura 1.9** : Possible formació del producte benzilat Ac-Asn-Ser-Gly-Asp(OFm<sup>Bzl</sup>)-NH<sub>2</sub> durant la desprotecció amb HF líquid



Malgrat la reacció secundària, els pèptids **28a** i **29** han estat obtinguts amb rendiments acceptables (35% i 40%). Lògicament, el rendiment ha millorat notablement quan el pèptid **28a** ha estat sintetitzat amb el derivat Boc-Ser-OH (60%).



Cal esmentar que aquesta mateixa reacció secundària ha estat també descrita recentment per altres autors, els quals fins i tot han pogut determinar la posició de benzilació en el carboni 2 de l'anell de fluorè<sup>163</sup>.

#### b) Obtenció del pèptid Ac-Ser-Gly-Asp(OAnpe)-NH<sub>2</sub> (**28b**) :

La baixa solubilitat que han mostrat els pèptids **28a** i **29** en els dissolvents més adequats per dur a terme les reaccions de fosfitilació i acoblament (dissolvents apròtics anhidres) ha dificultat enormement l'obtenció dels corresponents derivats fosforamidit. És conegut que els grups fluorenilmetil i fluorenilmetoxycarbonil influeixen negativament en la solubilitat dels compostos dels que formen part<sup>164,165</sup>, de manera que s'ha optat per canviar el grup protector permanent del residu d'aspàrtic. Una de les solucions preses ha consistit en adoptar el grup protector 2-(4-acetil-3-nitrofeniletíl), que ha estat especialment desenvolupat per oferir característiques de labilitat similars al grup fluorenilmetil i alhora millorar la solubilitat dels pèptids que protegeix (Cap.3, apartat 2; ref. 160).

Les propietats del nou grup protector han permès abordar l'obtenció del tripèptid Ac-Ser-Gly-Asp(OAnpe)-NH<sub>2</sub>. De forma paral·lela als pèptids **28a** i **29**, la síntesi ha estat realitzada sobre una resina de tipus *p*-metilbenzidrilamina utilitzant Boc-aminoàcids. El derivat Boc-Asp(OAnpe)-OH, que ha estat obtingut segons s'explica al Capítol 3 (apartat 2), ha estat acoblat en les condicions habituals (DCC, 1 h, DCM). S'han realitzat dues síntesis, utilitzant Boc-Ser(Bzl)-OH o Boc-Ser-OH per a l'acoblament de serina (vegeu l'anterior apartat) i el producte ha estat alliberat de la resina per tractament amb HF líquid a 0°C durant 1 h. L'anàlisi per HPLC mostra un producte majoritari per a totes dues síntesis (Fig. I Sec. Exp.). S'ha purificat el pèptid **28b** per filtració molecular, i una vegada obtingut, ha estat caracteritzat per anàlisi d'aminoàcids, <sup>1</sup>H-RMN i EM-FAB. El rendiment global de síntesi i purificació ha estat satisfactori per a les dues síntesis, encara que lleugerament millor per la realitzada amb Boc-Ser-OH (64% enfront de 53%).

El pèptid **28b** ha resultat ser soluble en THF. Aquest fet suposa una millora notable de solubilitat respecte a l'anàleg **28a** que estava protegit amb el grup fluorenilmetil, que només és soluble en dissolvents com DMF o NMP.

### c) Obtenció del pèptid Ac-Ser-Gly-Asp(OBzl)-NH<sub>2</sub> (**28c**) :

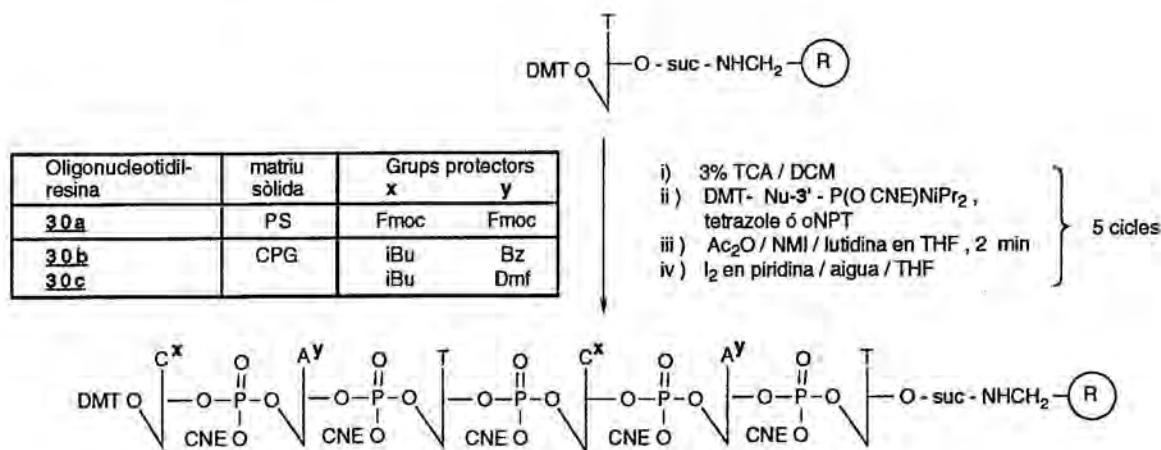
En les proves de labilitat realitzades, s'ha comprovat que el grup benzil com a grup protector del residu d'àcid aspàrtic pot ser eliminat amb el reactiu LiOH en MeOH/dioxà/aigua (Cap.3, apartat 1.3). S'ha cregut interessant explorar la possibilitat d'utilitzar el pèptid **28c**, protegit amb el grup benzil, per dur a terme la síntesi del nucleopèptid.

De totes formes, donat que el grup benzil és làbil als tractaments acidolítics efectuats per a la desprotecció i alliberament dels pèptids sintetitzats amb l'estratègia Boc (tractament amb HF), ha calgut realitzar la síntesi del pèptid **28c** mitjançant l'estratègia que utilitza Fmoc-aminoàcids (Mater. Mèt. Gen., apartat III). En aquest cas, la desprotecció i desancoratge del pèptid es realitza amb TFA, en condicions en les quals el grup benzil és estable. La síntesi ha estat realitzada sobre una resina d'aminometilpoliestirè a la que s'ha ancorat un espaiador bifuncional<sup>166</sup> (resina **27**, Fig. 1.7) que permet obtenir el pèptid amb un grup amida en l'extrem C-terminal en el tractament amb TFA. El derivat que ha estat utilitzat per a l'acoblament de l'àcid aspàrtic, Fmoc-Asp(OBzl)-OH, ha estat obtingut a partir de H-Asp(OBzl)-OH, per reacció amb el cloroformat de 9-fluorenilmetoxycarbonil, i per a l'aminoàcid serina s'ha emprat el derivat Fmoc-Ser(tBu)-OH. Havent acoblat el residu de serina, s'ha bloquejat l'extrem N-terminal amb el grup acetil, per reacció amb Ac<sub>2</sub>O i DIEA. El pèptid **28c** ha estat desprotegit i alliberat de la resina per tractament amb TFA/aigua (99:1). L'anàlisi del cru per HPLC mostra un excel·lent grau d'homogeneïtat, pel que no ha estat necessària cap purificació posterior. El pèptid **28c**, que ha estat obtingut amb un bon rendiment (66%), ha estat caracteritzat mitjançant anàlisi d'aminoàcids, <sup>1</sup>H-RMN i EM-FAB.

El pèptid **28c** mostra també una millor solubilitat que l'anàleg **28a** que es troba protegit amb el grup fluorenilmetil, ja que és soluble en THF.

### 3.2 Obtenció de les oligonucleotidil-resines C<sup>x</sup>-AY-T-C<sup>x</sup>-AY-T-suc-R :

Al llarg dels diversos intents de síntesi del nucleopèptid s'han assajat diferents esquemes de protecció per a la síntesi de les oligonucleotidil-resines. Totes elles han estat efectuades en un sintetitzador automàtic mitjançant el mètode de síntesi del fosfit triester<sup>131</sup>, i realitzant les corresponents adaptacions dels procediments segons l'escala de treball i la matriu sòlida utilitzada (poliestirè o boles de vidre). La següent figura resumeix les diferents oligonucleotidil-resines que han estat sintetitzades:

Figura 1.10 : Oligonucleotidil-resines  $C^x$ - $A^y$ -T- $C^x$ - $A^y$ -T-suc-R

a) Síntesi de l'oligonucleòtid sobre una matriu de poliestirè: resina **30a** x = Fmoc , y = Fmoc

En primer lloc, s'ha adoptat el mateix esquema de protecció que ha estat posat en pràctica per a l'obtenció del primer nucleopèptid **25**, consistent en la protecció de les nucleobases amb el grup fluorenilmetoxicarbonil, els enllaços fosfat protegits amb el grup cianoetil, i amb el grup hidroxil 3' amb una unió de tipus succinil amb la resina. La síntesi s'ha realitzat sobre una matriu sòlida de poliestirè a la que s'ha ancorat el nucleòsid timidina com a derivat succinat d'5'-O-dimetoxitritimidin-3'-il, i a continuació s'ha realitzat l'acoblament de la resta de nucleòsids com a derivats fosforamidit, seguint el procediment de síntesi adaptat a l'ús de poliestirè<sup>100</sup>, i utilitzant *o*-nitrofeniltetrazole com a catalitzador. Respecte als nucleòsids, cal dir que els derivats 5'-O-DMT-dC<sup>Fmoc</sup>-P(OCNE)NiPr<sub>2</sub> i 5'-O-DMT-dA<sup>Fmoc</sup>-P(OCNE)NiPr<sub>2</sub> han estat sintetitzats tal com es descriu a l'apartat 3.1 del Capítol 3, mentre que el derivat 5'-O-DMT-T-P(OCNE)NiPr<sub>2</sub> és d'origen comercial. El rendiment mig d'acoblament dels nucleòsids en les síntesi realitzades (tres lots diferents) ha estat sempre satisfactori (93-97%).

De totes formes, en algun dels intents de síntesi del nucleopèptid s'ha pogut observar que el cru alliberat un cop efectuada l'etapa d'acoblament del pèptid era francament complex. En analitzar per HPLC l'oligonucleòtid procedent d'una alíquota de la mateixa oligonucleotidil-resina emprada a l'assaig d'acoblament per HPLC, s'ha vist que es trobava acompanyat d'una quantitat important d'altres impureses. Aquest resultat no es corresponia amb l'aspecte de l'oligonucleòtid alliberat dels altres lots d'oligonucleotidil-resina **30a**, ni tampoc es podia relacionar amb els rendiments d'acoblament dels nucleòsids durant la síntesi de l'oligonucleotidil-resina. S'ha arribat a la conclusió que els problemes es devien a la inestabilitat del grup protector fluorenilmetoxicarbonil amb el temps o durant la síntesi de l'oligonucleòtid, observació que també han fet altres autors que desaconsellen l'ús d'aquest grup protector ja que s'ha observat que els corresponents derivats

fosforamidit són poc estables en dissolució<sup>136</sup>. Vist això, s'ha cregut convenient explorar l'ús d'altres grups protectors per a les nucleobases.

**b) Síntesi de l'oligonucleòtid sobre una matriu de boles de vidre :**

resina **30b** : x = iBu, y = Bz; resina **30c** : x = iBu , y = Dmf

Basant-nos en l'estabilitat dels models Boc-Ser(p T-DMT)-NHcHex als reactius LiOH en MeOH/dioxà/aigua i NH<sub>3</sub> aquós concentrat en dioxà s'ha redissenyat l'esquema de protecció i s'han adoptat el grups isobutiril per a la protecció de citosina i els grup benzoil o dimetilaminometilè per a adenina. Aquests grups protectors presenten l'avantatge addicional de poder-se disposar dels corresponents derivats de nucleòsid com a productes comercials.

A part, la possibilitat de poder efectuar l'eliminació del grup 2-(4-acetil-3-nitrofeniletíl) (utilitzat per a la protecció del residu d'àcid aspàrtic; vegeu l'anterior apartat) amb el reactiu LiOH en MeOH/dioxà/aigua en substitució de TBAF en THF, ha permès plantejar la síntesi dels oligonucleòtids sobre una matriu de boles de vidre. Tot i que la matriu de poliestirè és plenament compatible amb tots els reactius de desprotecció assajats, la matriu de boles de vidre, un suport rígid que no presenta els problemes d'inflament del poliestirè en dissolvents polars, ofereix l'avantatge de poder-se disposar de nucleosidil-succinil-resines com a productes comercials. En els darrers intents de síntesi del nucleopèptid, s'ha pogut comprovar que és fins i tot possible realitzar tractaments curts amb el reactiu TBAF sobre una matriu de boles de vidre, sense que això provoqui un desancoratge important de producte.

Així, s'ha dut a terme la síntesi de les oligonucleotidil-resines **30b** i **30c**. Totes dues han estat realitzades amb el cicle de síntesi estàndar i emprant tetrazole com a catalitzador en les etapes d'acoblament (Mater. Mèt. Gen., apartat IV). Com es veurà més endavant, la utilització d'una o altra oligonucleotidil-resina en els diferents intents de síntesi del nucleopèptid, juntament amb el grup protector de l'àcid aspàrtic, determina els tractaments de desprotecció a efectuar. La resina **30b**, en què citosina es troba protegida amb el grup isobutiril i adenina amb el grup benzoil, ha estat utilitzada quan s'han efectuat tractaments de desprotecció amb K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en MeOH/dioxà o LiOH en MeOH/dioxà/aigua. La resina **30c**, en què s'ha adoptat el grup dimetilaminometilè per adenina i s'ha mantingut el grup isobutiril per a citosina, ha estat emprada en els intents en què s'han realitzat tractaments de desprotecció amb NH<sub>3</sub> aquós concentrat en dioxà.

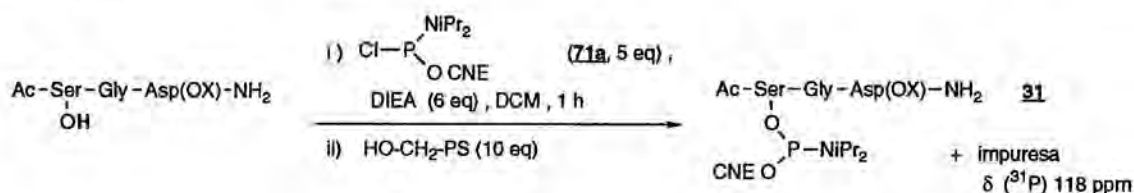
### 3.3 Obtenció dels derivats fosforamidit **31** dels pèptids protegits:

L'obtenció dels derivats fosforamidit **31** s'ha basat en les mateixes reaccions que s'utilitzen per preparar els derivats de nucleòsid, tot i que ha calgut adaptar els procediments a les especials característiques dels pèptids. S'han utilitzat dos mètodes per dur a terme la fosfitilació del pèptid.

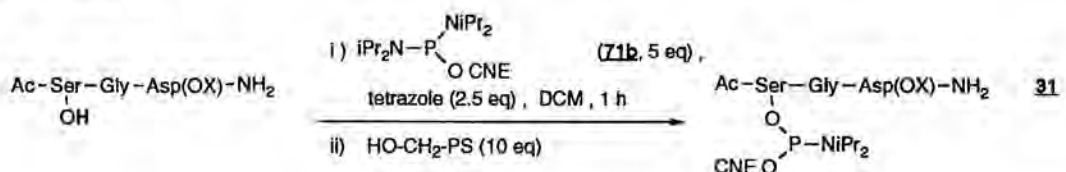
En el primer d'ells, s'ha fet reaccionar el pèptid amb (2-cianoetoxi)cloro(diisopropilamino)fosfina (**71a**) en presència de DIEA<sup>167</sup> (Mètode A, Fig. 1.11). En el segon, la fosfitilació s'ha efectuat per reacció amb (2-cianoetoxi)bis(diisopropilamino)fosfina (**71b**) en presència de tetrazole<sup>168</sup> (Mètode B, Fig. 1.11). En tots dos casos, ha estat necessari emprar un excés del reactiu per facilitar la reacció del pèptid. Acabada la reacció, l'excés del reactiu fosfitilant ha estat eliminat mitjançant l'addició d'hidroximetilpoliestirè al medi de reacció. La fosfina en excés reacciona amb els grups hidroxil de la resina, i pot ser separada del medi que conté el fosforamidit per filtració. La següent figura resumeix l'obtenció dels pèptids fosforamidit **31** pels dos mètodes :

*Figura 1.11 : Obtenció dels derivats fosforamidit dels pèptids.*

a) Mètode **A** :



b) Mètode **B** :



**31a** X : Fm; **31b** X : Anpe; **31c** X : Bzl

Aquesta etapa ha estat una de les de major dificultat en l'aplicació de l'esquema convergent de síntesi. En particular, tres han estat les principals dificultats que ha calgut solucionar i que són objecte de comentari a continuació :

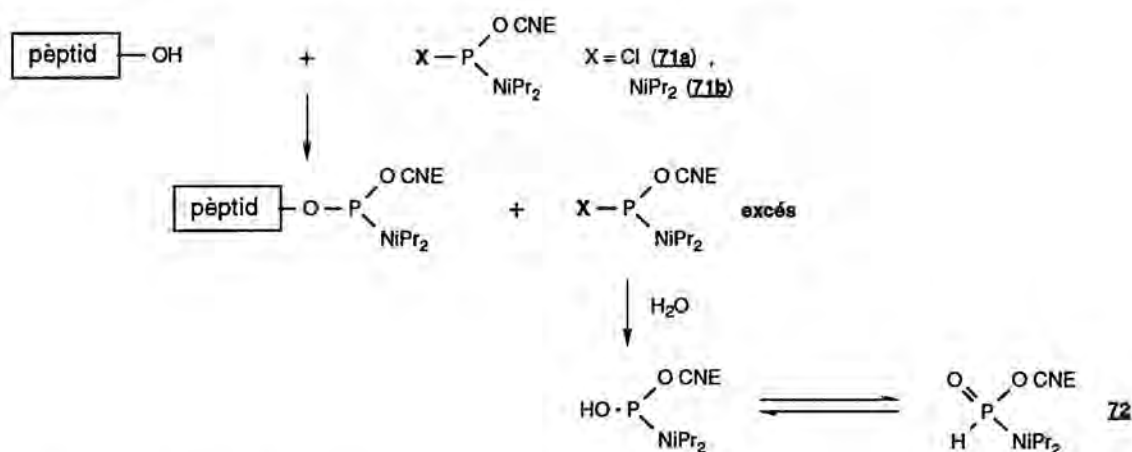
- i) insolubilitat dels pèptids protegits.
- ii) eliminació de l'excés del reactiu fosfitilant.
- iii) minimització de la reacció secundària de fosfitilació del grup carboxil de l'extrem C-terminal del pèptid.

• Els pèptids protegits han resultat ser poc solubles en dissolvents apròtics com DCM, CHCl<sub>3</sub>, ACN i THF que s'utilitzen normalment per dur a terme la reacció de fosfitilació. Així, el tetrapèptid **29** només és soluble en dissolvents com DMF o NMP, els quals pel fet de tenir punts d'ebullició molt alts, dificulten recuperar el pèptid com a sòlid. Tal i com s'explica a l'apartat 3.5.a,

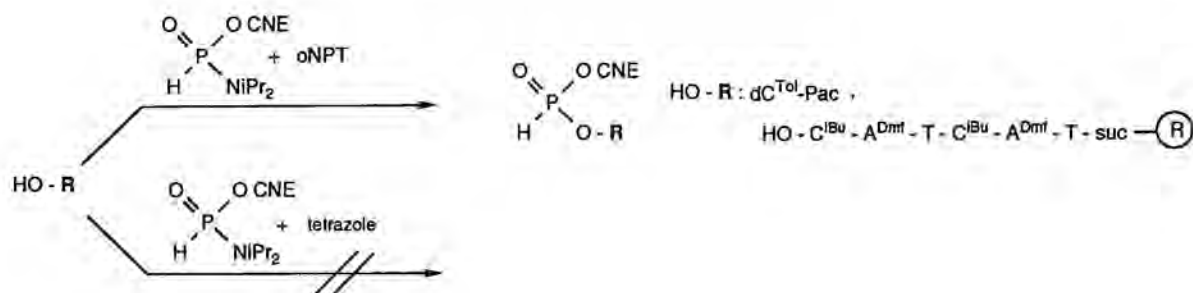
la utilització de NMP no ha donat bons resultats, pel que s'ha decidit descartar la utilització del tetrapèptid en observar-se que el tripèptid, en què no figura el residu d'asparagina, és més soluble.

S'ha aconseguit realitzar la reacció de fosfilitació del tripèptid **28a** en DCM, en el que és inicialment insoluble, utilitzant un excés de la clorofosfina **71a** (5 eq; Mètode A), ja que la pròpia reacció comporta la paulatina solubilització del pèptid. De totes formes, la impossibilitat de dur a terme una convenient purificació del derivat fosforamidit per cromatografia en columna de gel de sílice (en presència de base per evitar la hidròlisi del fosforamidit), en fase reversa, per filtració molecular o per precipitació, han portat a assajar altres pèptids més solubles com **28b** (grup protector Anpe) i **28c** (grup protector Bzl). En aquests casos, tot i que s'ha observat una sensible millora en l'etapa de fosfilitació ja que la solubilització en el medi de reacció és més ràpida, els intents realitzats per purificar el cru de la reacció han estat també infructuosos.

Figura 1.12 : Formació de H-PO(OCNE)NiPr<sub>2</sub> com a subproducte en la reacció de fosfilitació



• Com ja s'ha dit s'ha utilitzat un excés del reactiu fosfilitant per afavorir la reacció dels pèptids. En un principi, es creia que els rentats de la fase orgànica amb dissolucions aquoses, per eliminar les sals d'amoni formades a la reacció i que també produeixen la hidròlisi del reactiu fosfilitant que no ha reaccionat, eren suficient purificació (Fig. 1.12). El producte que es genera per hidròlisi de les fosfines **71a** o **71b**, l'H-fosfonamidat H-PO(OCNE)NiPr<sub>2</sub> (**72**), que no ha estat possible separar del pèptid fosforamidit per la impossibilitat de poder realitzar una purificació convenient, no es considerava una impuresa que pogués interferir en l'etapa d'acoblament. No obstant, en alguns dels intents d'acoblament realitzats, en què s'ha utilitzat *o*-nitrofeniltetrazole com a catalitzador, s'ha observat que el producte alliberat després de l'etapa de desprotecció i desancoratge contenia una proporció anormal de productes de fosforilació de l'oligonucleòtid, no necessàriament generats per trencament de l'enllaç entre el pèptid i l'oligonucleòtid del possible nucleopèptid format (vegeu el proper apartat, Taula 1.4, assajos 1-2).

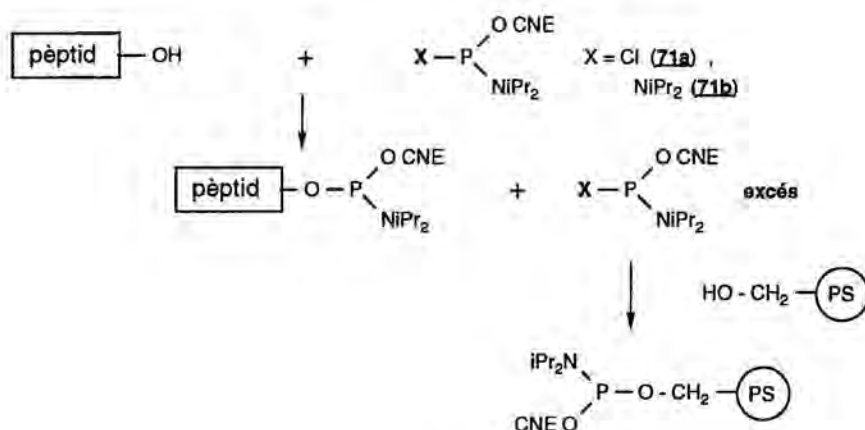
Figura 1.13 : Experiments de fosforilació per part de H-PO(OCNE)NiPr<sub>2</sub> en presència de catalitzadors àcids.

Aquest resultat va fer sospitar que l'H-fosfonamidat **72** podria haver reaccionat amb l'oligonucleòtid, activat pel catalitzador, en competència amb el fosforamidit que a més es troba en defecte respecte a **72**. S'ha volgut comprovar aquesta hipòtesi realitzant uns experiments de reacció de l'oligonucleotidil-resina o el nucleòsid dC<sup>Tol</sup>-Pac<sup>169</sup> amb l'H-fosfonamidat **72** en presència de catalitzadors àcids (Sec. Exp. Cap.1, apartat 3.7). S'ha pogut observar que l'H-fosfonamidat **72** és capaç de reaccionar amb l'oligonucleòtid i amb el nucleòsid en presència d'*o*-nitrofeniltetrazole, generant els corresponents derivats Hp<sup>5'</sup>CATCAT (després de la desprotecció) i H-PO(OCNE)-dC<sup>Tol</sup>-Pac **73** (Fig. 1.13). En presència de tetrazole, catalitzador menys àcid (tetrazole pKa 4.8<sup>170</sup>, *o*-nitrofeniltetrazole pKa 4.0<sup>170</sup>), no s'observa fosforilació apreciable de l'oligonucleòtid o del nucleòsid fins i tot després de 4 h.

Dels resultats obtinguts es pot deduir que és possible realitzar els acoblaments del pèptid fosforamidit en presència del catalitzador menys àcid, tetrazole, sense que l'H-fosfonamidat **72** que contamina el fosforamidit interfereixi en la reacció. De totes formes, s'ha cregut important intentar la separació de l'excés de fosfina abans de realitzar l'etapa d'acoblament, per dues raons. La primera consisteix en què no s'ha volgut descartar la utilització del catalitzador *o*-nitrofeniltetrazole, ja que per la seva major acidesa augmenta la reactivitat dels derivats fosforamidit<sup>171</sup>. Per altra banda, l'excés de l'H-fosfonamidat **72** respecte al pèptid fosforamidit impedeix realitzar un seguiment adequat d'aquest producte per <sup>31</sup>P RMN.

Finalment, s'ha aconseguit separar en bona part l'excés de fosfina una vegada acabada la reacció, afegint hidroximetilpoliestirè en excés (10 eq) a la barreja de reacció. La fosfina que no ha reaccionat amb el pèptid reacciona amb els grups hidroxil de la matriu insoluble i, per tant, una vegada consumida, pot ser separada del pèptid fosforamidit per simple filtració (Fig. 1.14).

Figura 1.14 : Separació de l'excés de fosfina.



• Els productes que han estat obtinguts per mitjà de la reacció amb la clorofosfina **71a** mostren per  $^{31}\text{P}$  RMN, a més dels senyals corresponents als fosforamidits ( $\delta$  145-148 ppm), un senyal no assignable a 116-117 ppm amb una integració aproximada del 50-70% de la presentada pels senyals dels fosforamidits. Una impuresa de desplaçament químic similar havia estat descrita per altres autors en una síntesi d'un nucleopèptid, en què s'havia obtingut també el pèptid fosforamidit per fosfitilació amb la clorofosfina **71a**. En aquell cas s'havia atribuït el subproducte al resultat de la reacció de **71a** amb el grup nitrofenilsulfenil que protegia l'extrem amino del pèptid<sup>59</sup>. Ja que en els nostres pèptids no hi ha cap nitrofenilsulfenil, ha calgut atribuir-ho a altres causes. L'únic punt de coincidència amb el cas descrit és la presència d'un grup amida en l'extrem C-terminal del pèptid, pel que s'ha deduït que aquest era l'origen del subproducte. La simple comparació dels desplaçaments químics<sup>172</sup> en  $^{31}\text{P}$  RMN també permet pensar que es tracta d'un derivat N-acilfósforodiamidit, aparegut com a conseqüència de la reacció de **71a** amb el grup carbamoil del pèptid. Una altra dada que suporta aquesta deducció és el fet que el producte de fosfitilació del tetrapèptid **29** (Ac-Asn-Ser-Gly-Asp(O<sub>F</sub>m)-NH<sub>2</sub>, que conté dos grups carbamoil) mostrava per  $^{31}\text{P}$  RMN un senyal a  $\delta$  117-118 ppm de major intensitat en relació als senyals de fosforamidit, que es pot interpretar com a conseqüència de la possible reacció en els dos grups carbamoil. Aquesta reacció secundària, que ha estat estudiada en vistes a comprovar la reactivitat de l'espècie resultant i que és objecte de discussió més endavant en aquest Capítol, ha pogut ser minimitzada fent servir el mètode B per a l'obtenció dels derivats fosforamidit. La fosfina **71b** és menys reactiva<sup>173</sup>, però per aquesta raó també és més selectiva. El pèptid fosforamidit **31c** obtingut d'aquesta manera pràcticament no mostra la presència de la impuresa, encara que apareix subproducte si els temps de reacció són llargs (més de 2 h).



### 3.4 Acoblament dels pèptids fosforamidit **31** a les oligonucleotidil-resines **30**

L'etapa d'acoblament dels pèptids fosforamidit que ha de conduir a la formació de l'enllaç entre el pèptid i l'oligonucleòtid s'ha efectuat de forma equivalent a la reacció d'un derivat de nucleòsid durant la síntesi d'un oligonucleòtid. En els experiments realitzats, que es resumeixen a la Taula 1.4, s'han utilitzat diferents combinacions de pèptids i oligonucleotidil-resines, amb els que s'han assajat diversos esquemes de protecció i, per tant, diferents condicions de desprotecció.

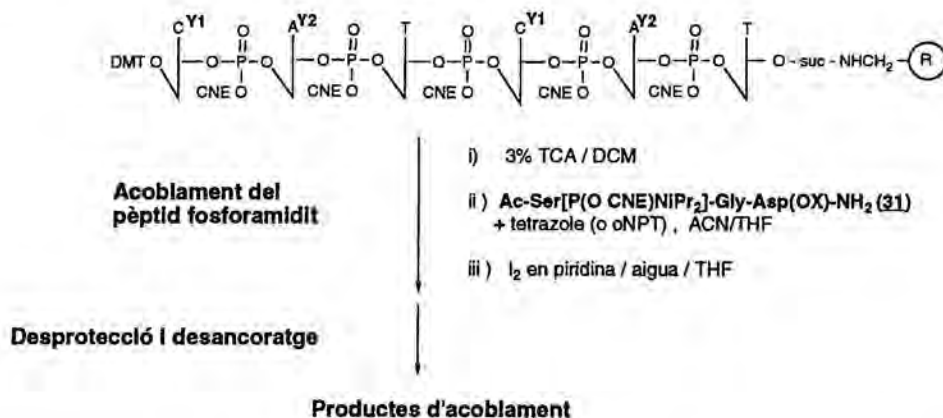
En la realització dels següents experiments s'ha partit del supòsit que el pèptid havia de presentar una baixa reactivitat com a efecte del tamany molecular. Per això s'ha pres com a referència la síntesi convergent de pèptids, on és sabut que la reacció de formació d'enllaços amida entre fragments peptídics és bastant més lenta que la mateixa reacció entre aminoàcids<sup>95</sup>. Per afavorir doncs al màxim l'acoblament del pèptid, s'han emprat en l'etapa d'acoblament dissolucions del pèptid fosforamidit i del catalitzador amb valors de concentració grans (0.25 M i 1 M, respectivament), de manera que l'excés de pèptid respecte al grup hidroxil de l'oligonucleotidil-resina també fos elevat (30-35 eq). En la major part dels casos, s'ha utilitzat el tetrazole com a catalitzador, tot i que també s'ha assajat l'*o*-nitrofeniltetrazole (que per la seva major acidesa pot augmentar la reactivitat dels fosforamidits<sup>171</sup>). També per augmentar el rendiment de l'etapa d'acoblament, s'han efectuat temps de reacció llargs (1 o 4 h). Havent finalitzat l'acoblament, etapa en què s'ha de formar l'enllaç de tipus fosfit entre el pèptid i l'oligonucleòtid, s'ha dut a terme l'oxidació a grup fosfat per tractament amb iode aquós. Cal esmentar que tots els assajos han estat realitzats en el sintetitzador, amb cicles especialment adaptats a l'escala de treball (1 µmol), al temps de reacció (1-4 h) i al tipus de resina (poliestirè o boles de vidre).

### 3.5 Desprotecció i desancoratge de la resina dels productes d'acoblament :

L'elecció dels tractaments finals de desprotecció i desancoratge ha vingut evidentment condicionada per la combinació de grups protectors permanents emprada. Segons l'esquema de protecció és possible distingir dues fases en la realització dels diferents assajos :

i) Els primers experiments s'han efectuat seguint l'esquema de síntesi que ha servit per obtenir el primer nucleopèptid, basat en la utilització d'una matriu sòlida de poliestirè per a la síntesi de l'oligonucleòtid i del grup fluorenilmtoxycarbonil per a la protecció de les nucleobases.

ii) En una segona fase, s'ha modificat l'esquema de protecció de l'oligonucleòtid, realitzant la síntesi sobre una matriu sòlida de boles de vidre, i utilitzant els grups isobutiril per a la protecció de citosina, i benzoil o dimetilaminometilè per a adenina.

**Taula 1.4** : Intents d'obtenció del nucleopèptid Ac-Ser(p<sup>5'</sup>CATCAT)-Gly-Asp-NH<sub>2</sub> mitjançant una estratègia convergent :


	Pèptid fosforamidit		Oligonucleotidil-resina			Temps acobl. t (h)	Desprotecció i desancoratge	Producte majoritari <sup>*a</sup>
	X	Mètode fosf.	Y1	Y2	R			
1.	<b>31a</b>	Fm A <sup>*b</sup>	<b>30a</b>	Fmoc Fmoc	PS	4 <sup>*h</sup>	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> <sup>*c</sup>	pCATCAT
2.	<b>31b</b>	Anpe A <sup>*b</sup>	<b>30a</b>	Fmoc Fmoc	PS	4 <sup>*h</sup>	2a TBAF <sup>*d</sup> K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> <sup>*c</sup> 2b LiOH <sup>*e</sup>	pCATCAT
3.	<b>31a</b>	Fm A <sup>*b</sup>	<b>30a</b>	Fmoc Fmoc	PS	4	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> <sup>*c</sup>	nd <sup>*i</sup>
4.	<b>31b</b>	Anpe A <sup>*b</sup>	<b>30a</b>	Fmoc Fmoc	PS	4	i) TBAF <sup>*d</sup> ii) K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> <sup>*c</sup>	nd <sup>*i</sup>
5.	<b>31a</b>	Fm A	<b>30b</b>	iBu Bz	CPG	4	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> <sup>*c</sup>	X
6.	<b>31b</b>	Anpe A	<b>30b</b>	iBu Bz	CPG	4	LiOH <sup>*e</sup>	X
7.	<b>31c</b>	Bzl A	<b>30b</b>	iBu Bz	CPG	4	LiOH <sup>*e</sup>	X
8.	<b>31a</b>	Fm A	<b>30c</b>	iBu Dmf	CPG	4	NH <sub>3</sub> aq <sup>*g</sup>	X
9.	<b>31c</b>	Bzl B	<b>30b</b>	iBu Bz	CPG	4	LiOH <sup>*e</sup>	pCATCAT
10.	<b>31c</b>	Bzl B	<b>30b</b>	iBu Bz	CPG	1	LiOH <sup>*e</sup>	pCATCAT
11.	<b>31a</b>	Fm B	<b>30c</b>	iBu Dmf	CPG	1	11a NH <sub>3</sub> aq <sup>*g</sup> 11b i) TBAF <sup>*f</sup> ii) NH <sub>3</sub> aq <sup>*g</sup>	X
12.	<b>31b</b>	Anpe B	<b>30c</b>	iBu Dmf	CPG	1	i) TBAF <sup>*f</sup> ii) NH <sub>3</sub> aq <sup>*g</sup>	X

Notes : <sup>\*a</sup> : determinat a partir de l'anàlisi per HPLC (fase reversa o bescanvi aniónic) del cru de síntesi; <sup>\*b</sup> : sense eliminar excés d'agent fosfític (vegeu text); <sup>\*c</sup> : K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.05M en MeOH/dioxà (1:1), 200 eq, 6 h; <sup>\*d</sup> : TBAF.3H<sub>2</sub>O 0.1 M en THF, 100 eq, 3 x 0.5 min; <sup>\*e</sup> : LiOH.H<sub>2</sub>O 0.25M en MeOH/dioxà/H<sub>2</sub>O (1.5:1.5:1), 200 eq, 8 h; <sup>\*f</sup> : TBAF.3H<sub>2</sub>O 0.01 M, 100 eq, 3 x 0.5 min; <sup>\*g</sup> : NH<sub>3</sub> aq conc/dioxà (1:1), 5 mL, 8 h, T.amb; <sup>\*h</sup> : o-nitrofeniltetrazole com a catalitzador; <sup>\*i</sup> : cru de síntesi molt heterogeni.

A continuació es comenten els diferents experiments realitzats, i les conclusions que ha estat possible extreure.

**a) Assajos d'acoblament realitzats sobre l'oligonucleotidil resina 30a  
(matriu de poliestirè, grups protectors  $Y_1 = \text{Fmoc}$ ,  $Y_2 = \text{Fmoc}$ ) :**

Com ja s'ha comentat, en un primer moment s'ha intentat reproduir la seqüència nucleopeptídica Ac-Asn-Ser( $p^5$ CATCAT)-Gly-Asp-NH<sub>2</sub>. Per a tal fi, s'ha assajat l'acoblament del tetrapèptid 29 protegit amb el grup Fm en el residu d'aspàrtic. Aquest pèptid ha presentat molts problemes de solubilització (vegeu l'apartat 3.3 d'aquest Capítol), pel que en l'intent d'acoblament realitzat s'ha emprat un derivat fosforamidit del pèptid 29 que, una vegada preparat, no s'ha aïllat del medi de reacció i s'ha fet reaccionar directament amb la resina en presència de tetrazole. Després de l'acoblament, s'ha efectuat la desprotecció i desancoratge del producte per tractament amb K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en MeOH/dioxà. L'anàlisi per HPLC del producte alliberat només mostra la presència de l'oligonucleòtid CATCAT, pel que cal pensar que no hi ha hagut acoblament del pèptid. El dissolvent que s'ha emprat per efectuar la fosfilitació del pèptid i en què s'ha realitzat l'etapa d'acoblament, NMP, és difícil d'assecar el que podria explicar el nul acoblament de pèptid per hidròlisi de la funció fosforamidit en el medi de reacció. Per evitar problemes similars i evitar l'ús de dissolvents higroscòpics i d'alt punt d'ebullició en la solubilització del pèptid, s'ha cregut adequat abandonar l'ús del tetrapèptid 29 i abordar la síntesi del nucleopèptid Ac-Ser( $p^5$ CATCAT)-Gly-Asp-NH<sub>2</sub>.

El tripèptid 28a, que es troba protegit amb el grup fluorenilmetil (Fm), i el tripèptid 28b, amb el grup 2-(4-acetil-3-nitrofeniletíl) (Anpe), han estat utilitzats en els següents intents d'acoblament (assajos 1 i 2, Taula 1.4). La millor solubilitat dels dos pèptids (més gran per a 28b) ha permès aïllar els corresponents derivats fosforamidit 31a i 31b respectivament, tot i que acompanyats de l'H-fosfonamidat 72 (format per la hidròlisi de l'excés de reactiu fosfilitant que no s'ha separat en acabar la reacció; vegeu l'anterior apartat). L'etapa d'acoblament dels corresponents pèptids fosforamidit 31a i 31b s'ha realitzat en presència del catalitzador *o*-nitrofeniltetrazole, per afavorir la reactivitat de la funció fosforamidit, i durant 4 h. A l'assaig 1, s'ha desprotegit i alliberat el producte format amb K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en MeOH/dioxà. A l'assaig 2, en què el pèptid es troba protegit amb el grup Anpe, s'han provat dos procediments. El primer dels procediments (assaig 2a) ha consistit en un tractament de desprotecció en dues etapes, que ha consistit en efectuar en primer lloc l'eliminació del grup Anpe amb TBAF, i en una segona etapa, l'eliminació de la resta de grups protectors i el desancoratge amb el reactiu K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en MeOH/dioxà (s'havia comprovat que aquest reactiu provoca la transesterificació del grup carboxil que es troba protegit amb el grup Anpe; Cap.3, apartat 1.3). A la segona opció (assaig 2b), s'ha efectuat un únic tractament amb LiOH en

MeOH/dioxà/aigua, que permet realitzar alhora l'eliminació del grup Anpe i de la resta de grups protectors, i que no provoca la reacció de transesterificació. L'anàlisi per HPLC del producte alliberat, tant per a l'assaig 1 com per als assajos 2a i 2b, mostra com a producte majoritari l'oligonucleòtid p<sup>5'</sup>CATCAT. S'ha avaluat la reactivitat de l'H-fosfonamidat 72, que acompanyava com a impuresa els fosforamidits en la reacció d'acoblament, i s'ha vist que és capaç de reaccionar amb el grup hidroxil de l'oligonucleòtid si s'utilitza oNPT com a catalitzador (vegeu l'apartat 3.3 d'aquest Capítol). Per tant, s'ha arribat a la conclusió que l'oligonucleòtid 5'-fosfat pot haver-se generat principalment com a conseqüència d'aquesta reacció secundària, ja que la proporció de l'H-fosfonamidat respecte a pèptid fosforamidit en el medi de reacció és força important (aproximadament 4:1).

Aquests assajos s'han repetit duent a terme l'acoblament dels derivats fosforamidit 31a i 31b (assajos 3 i 4, Taula 1.4), però eliminant prèviament l'excés de fosfina per mitjà de l'addició al medi de reacció de HO-CH<sub>2</sub>-PS (apartat 3.3). L'anàlisi per HPLC dels crus alliberats en cada cas mostra una barreja complexa de productes, que no han pogut ser identificats, però que s'ha relacionat amb la utilització del grup protector Fmoc per a la protecció de les nucleobases (vegeu l'apartat 3.2).

**b) Assajos d'acoblament realitzats sobre les oligonucleotidil resines 30b i 30c**

(matriu de boles de vidre; grups protectors : resina 30b Y<sub>1</sub>= iBu, Y<sub>2</sub> = Bz;

resina 30c : Y<sub>1</sub> = iBu, Y<sub>2</sub> = Dmf) :

Els resultats negatius que fins al moment havien estat obtinguts, lligats a la possible inestabilitat del grup protector fluorenilmetoxicarbonil durant el procés de síntesi de l'oligonucleòtid han plantejat la necessitat de realitzar certs canvis en l'esquema de protecció. Així, s'han utilitzat dues oligonucleotidil-resines : la resina 30b, en què citosina està protegida amb el grup isobutiril i adenina amb el grup benzoil, que s'ha emprat en els casos en què s'han efectuat tractaments de desprotecció amb K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en MeOH/dioxà o LiOH en MeOH/dioxà/aigua, i la resina 30c, en què citosina està protegida amb el grup isobutiril, i adenina amb el grup dimetilaminometilè, utilitzada en els assajos en què s'han realitzat tractaments de desprotecció amb NH<sub>3</sub> aquós concentrat en dioxà. En quan a la part peptídica, s'ha seguit emprant el pèptid fosforamidit 31a, protegit amb el grup Fm, i el pèptid 31b, que conté el grup Anpe. La possibilitat de realitzar tractaments de desprotecció amb LiOH en MeOH/dioxà/aigua ha permès efectuar alguns dels assajos amb el derivat 31c, que es troba protegit amb el grup benzil.

Els assajos 5-7 (Taula 1.4) s'han realitzat duent a terme l'acoblament dels pèptids fosforamidit 31a, 31b i 31c sobre l'oligonucleotidil-resina 30b, mitjançant una etapa d'acoblament de 4 h i en presència de tetrazole. Per a l'assaig 5, en què el grup protector del pèptid és el grup Fm, s'ha efectuat la desprotecció i desancoratge amb K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en MeOH/dioxà. En canvi, per als assajos 6 i 7

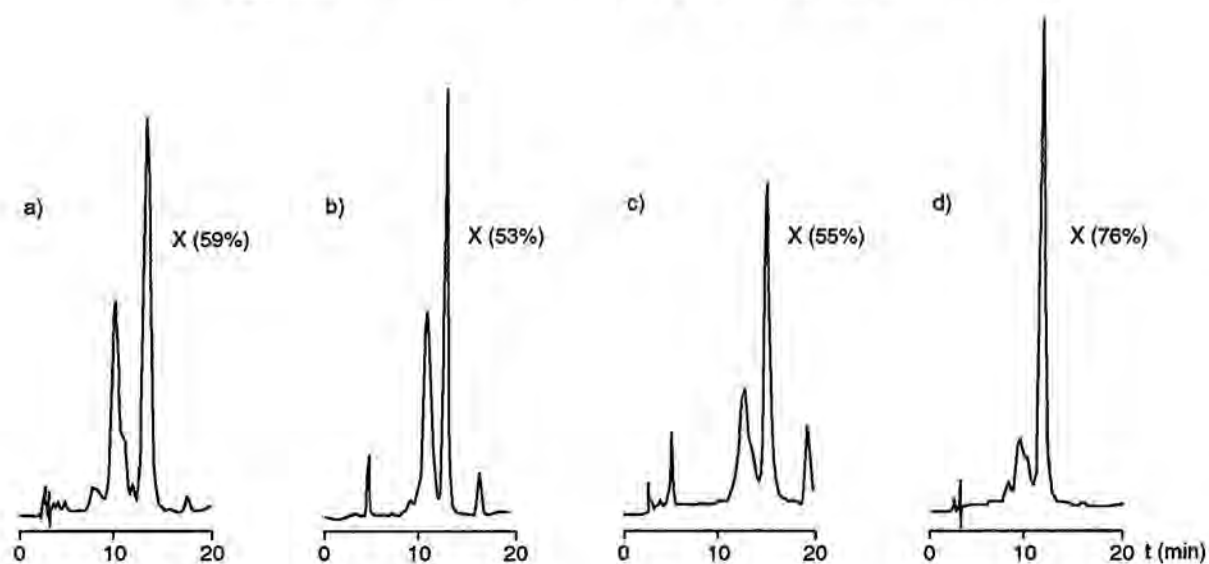
en què els grups protectors del pèptid són els grups Anpe i Bzl, respectivament, s'ha realitzat un tractament de desprotecció i desancoratge amb el reactiu LiOH en MeOH/dioxà/aigua. En analitzar per HPLC en fase reversa els crus alliberats en els tres assajos (Fig. 1.15 a-c), s'ha observat en cada un d'ells un mateix producte majoritari (producte **X**). Aquest producte s'ha comprovat que és diferent de l'oligonucleòtid  $^5\text{CATCAT}$ , producte a obtenir de no haver-se produït acoblament, i diferent del producte de trencament de l'enllaç fosfat en el possible nucleopèptid, l'oligonucleòtid 5'-fosforilat  $p^5\text{CATCAT}$ .

Un resultat similar s'ha obtingut a l'assaig **8**, en el qual s'ha efectuat l'acoblament del pèptid fosforamidit **31a** (grup protector Fm) durant 4 h i en presència de tetrazole, sobre l'oligonucleotidil-resina **30c**. La combinació de grups protectors ha permès dur a terme la desprotecció i desancoratge del producte format per tractament amb  $\text{NH}_3$  aquós concentrat en dioxà. L'anàlisi per HPLC del producte alliberat mostra el mateix producte majoritari **X** dels assajos **5-7**, i en aquest cas pràcticament com a producte únic (Fig. 1.15.d). Aquests resultats han fet pensar que el producte obtingut podia ser el nucleopèptid desitjat. El producte ha estat purificat i s'han realitzat diferents proves de caracterització. Finalment s'ha pogut demostrar que el producte **X** no és un compost nucleopeptídic, sinó un derivat de l'oligonucleòtid  $^5\text{CATCAT}$  (vegeu l'apartat 4).

L'única diferència important entre el darrer grup d'assajos realitzats (assajos **9-12**) i els que s'acaben de comentar es troba en el fet que els pèptids fosforamidit han estat obtinguts per fosfítillació amb la fosfina  $\text{CNEO-P}(\text{NiPr}_2)_2$  en presència de tetrazole (vegeu l'anterior apartat).

Els assajos **9** i **10** s'han realitzat acoblant el derivat fosforamidit **31c** (grup protector Bzl) sobre la resina **30b**, en presència de tetrazole. A la reacció d'acoblament s'han assajat dos temps diferents de reacció, 4 h (assaig **9**) i 1 h (assaig **10**). En tots dos casos, s'ha desprotegit i alliberat el producte de la resina per tractament amb LiOH en MeOH/dioxà/aigua. L'anàlisi per HPLC permet comprovar que el producte majoritari del cru alliberat és l'oligonucleòtid 5'-fosfat  $p^5\text{CATCAT}$ .

Cal recordar que el producte  $p^5\text{CATCAT}$  és el que es genera per trencament de l'enllaç fosfat entre el pèptid i l'oligonucleòtid, pel que s'ha deduït que possiblement s'ha format l'enllaç a l'etapa d'acoblament però, com a resultat del tractament de desprotecció i desancoratge, s'ha fragmentat. Aquesta hipòtesi s'ha vist confirmada en les proves d'estabilitat realitzades posteriorment amb altres nucleopèptids (Cap.2, apartat 4.1). S'ha de destacar però, que aquests resultats no són coherents amb els anteriors. Així, en comparar els resultats dels assajos **7** i **10** es manifesta que, tot i acoblant el mateix fosforamidit **31c** a la mateixa oligonucleotidil-resina **30b** durant el mateix temps, i efectuant la desprotecció en les mateixes condicions, en un cas s'obté el producte **X** (assaig **7**), i en l'altre (assaig **10**), l'oligonucleòtid 5'-fosfat. No s'ha sabut trobar una explicació per aquest fet.

Figura 1.15 : Intents d'obtenció del nucleopèptid **32** (assajos 5-8, Taula 1.4) :

Anàlisi per HPLC en fase reversa dels productes obtinguts en els assajos d'acoblament (sistema FR-C, gradient lineal 15-21% B en 20 mn, 260 nm) : a) assaig **5** ; b ) assaig **6** ; c) assaig **7** ; d) assaig **8**.

Vistos els resultats dels assajos precedents i comptant en aquest estadi amb les dades d'estabilitat del primer nucleopèptid sintetitzat, s'han efectuat dos nous intents d'acoblament (assajos **11** i **12**). Els grups protectors han estat elegits de manera que fos possible efectuar la desprotecció i desancoratge amb  $\text{NH}_3$  aquós concentrat en dioxà, reactiu que ha demostrat ser plenament compatible amb l'estabilitat dels nucleopèptids. No obstant, donat que en un dels assajos s'ha utilitzat el pèptid protegit amb el grup Anpe, pel qual el tractament amb  $\text{NH}_3$  provoca la transformació del grup carboxil en amida, s'ha introduït una etapa prèvia d'eliminació d'aquest grup protector amb TBAF. Tot i la incompatibilitat del reactiu amb les boles de vidre, en els períodes de temps necessaris per efectuar l'eliminació del grup protector (3 min) ha estat factible efectuar aquest tractament. A més, si es comparen els crús procedents del tractament de l'oligonucleotidil-resina amb  $\text{NH}_3$  aquós concentrat o, alternativament, amb el tractament de dues etapes amb TBAF seguit de l' $\text{NH}_3$  aquós concentrat, s'observa que presenten bàsicament el mateix perfil en ser analitzats per HPLC. Per tant, els experiments realitzats han consistit en dur a terme la reacció d'acoblament dels derivats fosforamidit **31a** (grup protector Fm) i **31b** (grup protector Anpe) sobre la resina **30b**, en presència de tetrazole, i durant 1 h. Acabada l'etapa d'acoblament i després de l'oxidació, s'ha procedit a efectuar els tractaments de desprotecció i alliberament del producte. A l'assaig **11**, en què el pèptid es trobava protegit amb el grup Fm, s'han assajat dos possibles procediments. En el primer, s'ha tractat la resina amb  $\text{NH}_3$  aquós concentrat en dioxà a temperatura ambient (assaig **11a**). En el segon, s'ha realitzat un tractament previ amb el reactiu TBAF en THF (3 x 1 min), i a continuació, s'ha tractat la resina amb la dissolució d'amoniac (assaig **11b**). A l'assaig

12, realitzat amb el pèptid protegit amb el grup Anpe, s'ha efectuat el mateix procediment de desprotecció i desancoratge en dos tractaments (TBAF + NH<sub>3</sub>) de l'assaig anterior. L'anàlisi per HPLC dels productes obtinguts en cada assaig, mostra en tots dos casos el producte X que ja havia estat obtingut als assajos 5-8.

### 3.6 Purificació i caracterització dels productes obtinguts en els intents de síntesi mitjançant una estratègia convergent :

La purificació dels productes majoritaris dels crús de síntesi dels assajos descrits s'ha dut a terme per cromatografia de bescanvi aniònic eluint a través d'una columna de DEAE-Sephadex amb un gradient de concentració del tampó aquós TEAB. Les fraccions corresponents al mateix producte han estat reunides i liofilitzades.

En particular, el producte X una vegada purificat, mostra un òptim grau d'homogeneïtat tant per anàlisi per HPLC en fase reversa, com per bescanvi aniònic amb dues columnes diferents. En tots els casos en què ha estat obtingut, el rendiment total (síntesi, desprotecció i purificació) es pot considerar bo : 30-40% (12-16 OD<sub>260</sub> a partir d'una escala 1 μmol d'oligonucleòtid).

Per dur a terme l'anàlisi dels crús, així com la caracterització i assignació dels diferents productes i en especial del producte X, ha calgut utilitzar diferents tècniques, les quals es comenten a continuació. Cal assenyalar abans, però, que tot i que les proves realitzades han permès descartar el producte X com el possible nucleopèptid, no ha estat possible assignar-li una estructura concreta. En el següent apartat d'aquest Capítol es discutiran altres proves que han estat realitzades per poder determinar de forma indirecta l'origen i la natura d'aquest producte.

#### a) Anàlisi cromatogràfica i electroforètica :

S'han emprat tres tècniques diferents amb l'objecte de diferenciar els productes :

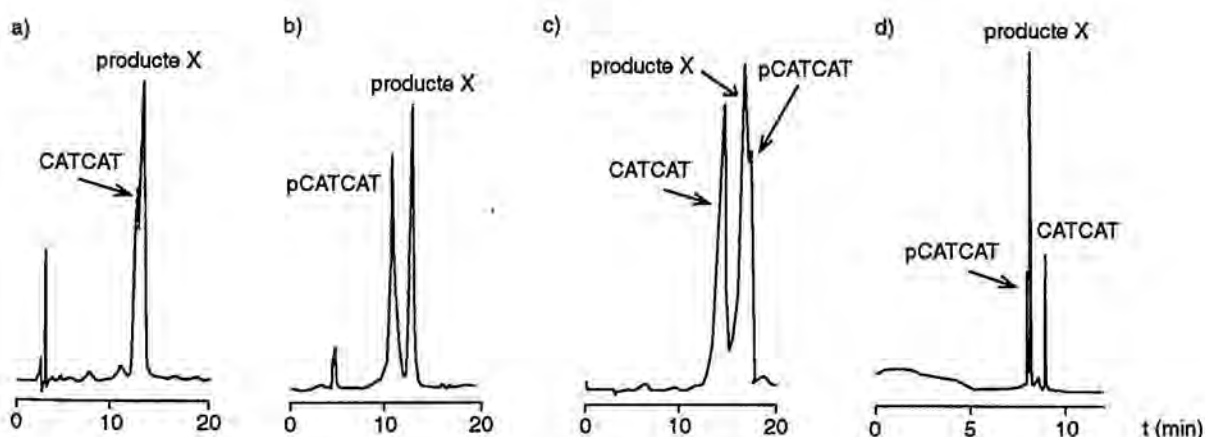
i) HPLC en fase reversa : en les condicions experimentades (columna sílice-C18, amb gradients lineals dels dissolvents A: TEAA 0.01M i B: ACN/aigua 1:1; sistema FR-B), es poden diferenciar productes com l'oligonucleòtid p<sup>5'</sup>CATCAT, subproducte que es genera pel trencament de l'enllaç entre el pèptid i l'oligonucleòtid en el possible nucleopèptid format, i l'oligonucleòtid 5'<sup>5'</sup>CATCAT, producte a esperar de no haver-se produït l'acoblament del pèptid. Tots dos productes han estat sintetitzats i utilitzats com a patrons en les anàlisis dels crús (Cap.3, apartat 5.3). No obstant, no s'han trobat condicions cromatogràfiques d'HPLC en fase reversa en les quals es diferenciïn suficientment els productes 5'<sup>5'</sup>CATCAT i el producte X, producte majoritari aïllat dels assajos 5-8, 11

i 12 de la Taula 1.4. L'ordre d'elució trobat pels diferents productes ha estat (Fig. 1.16 a-b.) :  $p^5$ CATCAT ( $t_R$  10.0 min), producte X ( $t_R$  12.2 min) i  $^5$ CATCAT (12.5-12.8 min, poc resolt respecte X).

ii) HPLC de bescanvi aniònic : és probablement la millor tècnica, ja que permet separar en les mateixes condicions d'anàlisi els diferents productes implicats. S'han utilitzat dos sistemes cromatogràfics, basats en dos tipus de columnes diferents. El primer sistema ha consistit en una columna basada en un bescanviador feble tipus polietilenimino, eluint amb gradients de concentració de  $Na_2HPO_4$  en aigua (sistema BA-A, Fig. 1.16.c). El segon sistema experimentat, i que presenta millor resolució i eficàcia que l'anterior, consta d'una columna amb un bescanviador fort, i en què s'han realitzat gradients de concentració de  $NaH_2PO_4$  pH 6.4 en ACN/aigua (sistema BA-B). Els diferents productes han mostrat el següent ordre d'elució :  $^5$ CATCAT ( $t_R$  A: 12.6 min, B: 7.5 min), producte X ( $t_R$  A: 14.3 min, B: 9.2 min) i  $p^5$ CATCAT ( $t_R$  A: 15.0 min, B: 13.1 min).

iii) Electroforesi capil·lar : s'ha assajat l'anàlisi amb un capil·lar de gel de poliàcrilamida, en un tampó tris-fosfat a pH 7.6, i aplicant una diferència de potencial de -15 kV <sup>174</sup>. No ha estat una tècnica massa utilitzada per a dur a terme les anàlisis, tot i que permet diferenciar els productes implicats en els anteriors assajos (Fig. 1.16.d). Presenta com a principals desavantatges la irreproduïbilitat en el comportament d'elució dels productes, la curta vida mitja de les columnes capil·lars i, sobre tot, l'alt cost d'aquests capil·lars. Indubtablement, la utilització de les columnes de bescanvi aniònic ha resultat molt més avantatjosa.

Figura 1.16 : Anàlisi del producte X per diferents tècniques



Cromatogrames a, b : Anàlisi per HPLC en fase reversa (sistema FR-C, gradient lineal 15-21% en 20 min, 260 nm) de les coinjeccions (a) de l'oligonucleòtid  $^5$ CATCAT i el producte X, i (b) de l'oligonucleòtid  $p^5$ CATCAT i el producte X.

Cromatograma c : Anàlisi per HPLC de bescanvi aniònic (sistema BA-A, gradient lineal 0-50% en 20 min, 260 nm) de la coinjecció dels oligonucleòtids  $^5$ CATCAT,  $p^5$ CATCAT i el producte X.

Cromatograma d : Anàlisi per CGE (Microgel-gel100, -15kV, 260 nm) de la coinjecció dels oligonucleòtids  $^5$ CATCAT,  $p^5$ CATCAT i el producte X.



**b) Anàlisi d'aminoàcids :**

Es tracta sens dubte d'una de les proves més directes per poder determinar l'existència del nucleopèptid, ja que els subproductes més probables de la síntesi, els oligonucleòtids  $5'$ CATCAT i  $p^5$ CATCAT lògicament no han de presentar aminoàcids. Dels productes obtinguts en els diferents assajos realitzats, podia semblar que el producte **X** era el nucleopèptid. Així, l'anàlisi d'aminoàcids realitzada sobre el producte purificat mostra en alguns casos una proporció d'aminoàcids que s'aproxima a la del tèoric producte (Asp 0.6, Gly 1.0, Ser 0.6), encara que sempre amb una quantitat de pèptid (10-30%) molt per sota de la teòrica a esperar de la quantitat de producte utilitzada a l'anàlisi. Aquest fet ha fet sospitar que el producte **X** no fos el nucleopèptid, la qual cosa s'ha pogut confirmar per altres camins (vegeu més avall). Cal creure doncs que aquest pèptid residual és una impuresa que acompanya el producte **X**, i que no ha estat completament separat en la purificació, ja que el seguiment cromatogràfic es realitza per absorció a 254 nm, longitud d'ona en què el pèptid no és observable. Per altra banda, la presència de pèptid en el cru de producte alliberat de la resina es pot considerar lògica si s'ha produït el trencament del nucleopèptid.

**c) Digestió enzimàtica :**

S'han realitzat dos experiments de digestió enzimàtica del producte **X**.

El primer d'ells ha consistit en posar en contacte el producte amb la barreja d'enzims de fosfodiesterasa de verí de serp i fosfatasa alcalina. Aquests enzims es caracteritzen per degradar un oligonucleòtid a la barreja de nucleòsids que el componen i, com s'ha vist en l'anterior nucleopèptid Boc-Ser( $p^5$ TCT)-NHcHex (apartat 2) també són capaços de degradar aquest tipus de compostos. L'anàlisi dels productes de digestió mostra en aquest cas una barreja i proporció de nucleòsids que no es diferencia de l'obtinguda per l'oligonucleòtid  $5'$ CATCAT (dC 1.0, T 1.1, dA 0.9).

S'ha estudiat també l'acció de l'enzim fosfodiesterasa de melsa sobre el producte **X**. Aquest enzim, que és una 5'-exonucleasa, és capaç de degradar un oligonucleòtid a partir de l'extrem 5' a una barreja de nucleòsids 5'-fosfat, si el grup hidroxil 5' no es troba funcionalitzat o bloquejat. Per tant, aquest experiment pot servir per demostrar si el producte **X** és un derivat de l'oligonucleòtid  $5'$ CATCAT en què l'extrem 5' es troba funcionalitzat (si hagués estat el nucleopèptid, la funcionalització de l'extrem 5' seria el pèptid unit a través de l'enllaç fosfat). Un cop sotmès a l'acció de l'enzim (6h, 36°C), l'anàlisi per HPLC no mostra degradació apreciable del producte inicial. Per tant, es pot concloure que el producte **X** és un derivat de l'oligonucleòtid CATCAT amb l'extrem 5' modificat.

**d) Estabilitat del producte X als tractaments bàsics :**

Com s'ha dit, els nucleopèptids en què l'enllaç entre el pèptid i l'oligonucleòtid es produeix amb la participació dels aminoàcids serina o treonina són làbils a les bases, el trencament dels quals genera l'oligonucleòtid amb el grup fosfat terminal i el pèptid amb un residu de deshidroalanina. Per tant, una de les formes amb les que s'ha volgut comprovar si el producte X era el nucleopèptid ha estat estudiar la seva estabilitat als tractaments bàsics. El producte X ha estat tractat amb NaOH aquosa 1 M o piperidina aquosa 1 M (a temperatura ambient i a 55°C) i s'ha seguit la seva evolució per anàlisi per HPLC. S'ha pogut comprovar que el producte X és perfectament estable a aquests tractaments fins i tot després de 24 h. Aquestes característiques d'estabilitat a les bases tan accentuades han estat interpretades com un indicatiu molt clar de que el producte X no era el nucleopèptid. Els resultats dels espectres de masses del producte han confirmat definitivament aquesta hipòtesi.

**e) Espectres de ressonància :**

S'ha obtingut la sal sòdica del producte X, la qual, dissolta en D<sub>2</sub>O, ha servit per enregistrar els espectres de <sup>1</sup>H i <sup>31</sup>P RMN :

L'espectre de <sup>31</sup>P RMN mostra dos senyals ( $\delta$  0.27 i -1.18 ppm) amb una àrea relativa aproximada de 1:5.3. Tot i que els valors de desplaçaments químics no permeten dir quin tipus de funció produeix cada senyal, tot sembla indicar que el producte X conté sis nuclis diferents. Relacionant-ho amb els resultats de l'experiment de digestió amb la fosfodiesterasa de melsa, en què el producte X es comporta com un derivat de l'oligonucleòtid amb l'extrem 5' modificat, es pot pensar que cinc dels senyals corresponen als enllaços fosfat internucleotídics, i el sisè a una funció fosforilada que es troba unida a l'hidroxil 5'.

S'ha enregistrat també un espectre de <sup>1</sup>H RMN. En aquest cas, només es pot confirmar la presència dels nucleòsids a esperar tenint en compte els senyals diagnòstics que presenten els protons de les nucleobases (H8 A, H2 A, H6 C, H6 T) a la zona aromàtica. El fet que els senyals corresponents presentin una integració correcta acaba de descartar una modificació de l'oligonucleòtid a nivell de les nucleobases, fet que ja s'ha comprovat en els experiments de digestió enzimàtica, en què no s'observa cap nucleòsid anòmal en la barreja de digestió.

**f) Espectres de masses :**

S'han enregistrat també espectres de masses del producte X, mitjançant dues tècniques, FAB i electrospray.

Els espectres de masses per la tècnica FAB s'han enregistrat en una matriu de tioglicerol i s'ha realitzat la detecció tant en mode positiu (cations), com en mode negatiu (anions). En tots els casos, els senyals observats permeten descartar definitivament la presència del nucleopèptid, ja que no es relacionen amb la massa molecular a esperar per a aquest compost. Una de les hipòtesis que sembla explicar els senyals observats consisteix en assignar el producte **X** a l'oligonucleòtid amb un grup H-fosfonat a l'extrem 5', Hp<sup>5'</sup>CATCAT, però tal i com es comenta en el proper apartat s'ha pogut comprovar que tampoc no és correcta.

L'espectre enregistrat per la tècnica d'electrospray en mode negatiu mostra senyals que es poden relacionar amb els senyals observats en els espectres FAB, però tampoc no ha estat possible deduir-ne una estructura.

#### 4. Proves addicionals encaminades a la determinació de l'estructura i mecanisme de formació del producte **X** en els intents d'obtenció del nucleopèptid Ac-Ser(p<sup>5'</sup>CATCAT)-Gly-Asp-NH<sub>2</sub> :

El producte **X** ha estat obtingut en experiments d'acoblament diversos i a partir de diferents tractaments de desprotecció i desancoratge de la resina. Amb el doble objectiu d'estudiar l'origen d'aquest subproducte i determinar la seva estructura s'han efectuat un conjunt divers de proves, agrupades en els tres punts següents :

i) Comprovació de la possible identitat del producte **X** amb l'oligonucleòtid Hp<sup>5'</sup>CATCAT (vegeu l'apartat 3.6.f).

ii) Estudi de la formació de l'enllaç entre el pèptid i un nucleòsid, i seguiment dels possibles productes generats en les etapes posteriors d'oxidació i desprotecció. Per això, s'ha intentat dur a terme la síntesi en solució del nucleopèptid Ac-Ser(p<sup>3'</sup>T-DMT)-Gly-Asp-NH<sub>2</sub>, i en fase sòlida dels nucleopèptids Ac-Ser(p<sup>5'</sup>T)-Gly-Asp-NH<sub>2</sub> i H-Ser(p<sup>5'</sup>T)-Gly-Leu-NH<sub>2</sub>.

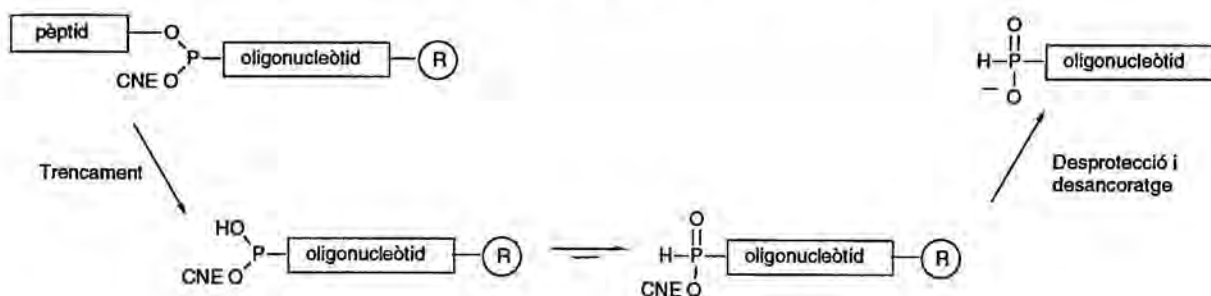
iii) Estudi de la reactivitat dels derivats fosfitilats en els grups carbamoil dels pèptids, i de l'estabilitat de les unions N-acilfosforamidat que es generen per reacció dels anteriors derivats amb compostos hidroxilats.

##### 4.1 Comprovació de la possible identitat del producte **X** amb l'oligonucleòtid-5'-H-fosfonat Hp<sup>5'</sup>CATCAT :

Com s'ha comentat (apartat 3.6.f), la major part dels senyals que apareixen en els espectres de masses, tant els obtinguts per la tècnica FAB com per l'enregistrat per electrospray, poden ser explicats en base a identificar el producte **X** amb l'oligonucleòtid-5'-H-fosfonat Hp<sup>5'</sup>CATCAT. Es podria explicar la seva formació per fragmentació de l'intermedi de tipus fosfit que es genera en la reacció del pèptid i l'oligonucleòtid, tot i que es desconeix la raó per la qual aquest enllaç pot ser més

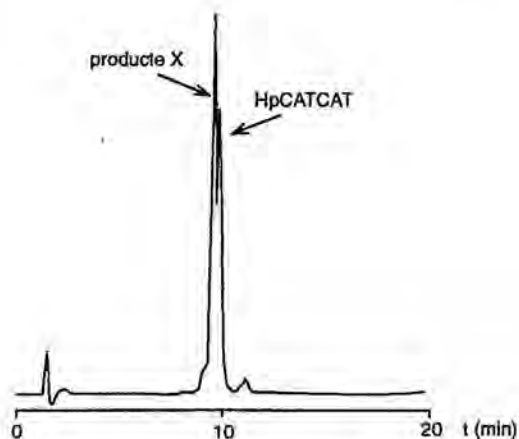
làbil. A partir d'aquí, és raonable pensar que el derivat de tipus H-fosfonat diester que es genera no s'oxidi en la següent etapa, ja que aquests derivats són de més difícil oxidació que els corresponents derivats fosfit<sup>175</sup>. Finalment, l'etapa de desprotecció i desancoratge provocaria la transformació cap al corresponent derivat d'H-fosfonat monoester per eliminació del grup 2-cianoetil, alhora que es produeix l'eliminació de la resta de grups protectors (Fig. 1.17).

**Figura 1.17** : Possible mecanisme de formació de l'oligonucleòtid Hp<sup>5'</sup>CATCAT en els assajos d'obtenció del nucleopèptid.



S'ha intentat comprovar aquesta hipòtesi comparant el producte **X** i l'oligonucleòtid Hp<sup>5'</sup>CATCAT (Cap.3, apartat 5.3.c), en diferents condicions d'anàlisi. Els dos productes tenen temps de retenció molt similars però, en ser analitzats per HPLC de bescanvi aniónic amb un bescanviador fort (sistema BA-B) no coelueixen (Fig. 1.18). Cal deduir, per tant, que els productes **X** i Hp<sup>5'</sup>CATCAT són diferents.

**Figura 1.18** : Diferenciació cromatogràfica dels productes **X** i Hp<sup>5'</sup>CATCAT.



Anàlisi per HPLC de bescanvi aniónic (sistema BA-B, gradient lineal 0-100% en 20 min, 260 nm) de la coinjecció de l'oligonucleòtid 5'-H-fosfonat i el producte **X**.

#### 4.2 Seguiment de la formació de l'enllaç fosfit entre el pèptid i un nucleòsid, i dels productes generats en les etapes posteriors d'oxidació i desprotecció :

Una possibilitat que s'ha plantejat per poder esbrinar quin procés ha conduït a la formació del producte **X** és realitzar un seguiment de cadascuna de les etapes per les quals s'intenta dur a terme l'obtenció del nucleopèptid. No obstant, realitzar un estudi d'aquest tipus amb els productes que s'han intentat sintetitzar presenta bàsicament dos problemes. Per una costat, la quantitat de producte amb què es treballa, que no permet acudir a les tècniques de caracterització usuals. D'altra banda, la pròpia complexitat dels productes dificulta la identificació i la determinació de l'estructura. S'ha cregut doncs que una bona opció era realitzar el seguiment de la reacció amb productes més fàcilment identificables i caracteritzables, com per exemple aquells en què la part oligonucleotídica és un nucleòsid.

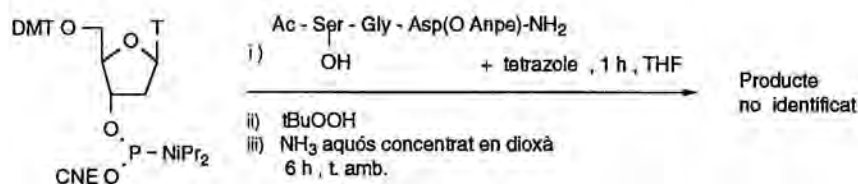
Així, dins d'aquest estudi s'han intentat sintetitzar tres nucleopèptids de seqüència Ac-Ser(p<sup>3</sup>T-DMT)-Gly-Asp-NH<sub>2</sub>, Ac-Ser(p<sup>5</sup>T)-Gly-Asp-NH<sub>2</sub> i H-Ser(p<sup>5</sup>T)-Gly-Leu-NH<sub>2</sub>. Pel primer, l'etapa de formació de l'enllaç entre el pèptid i el nucleòsid s'ha realitzat en solució, mentre que pels altres dos s'ha seguit una metodologia en fase sòlida.

##### a) Intents d'obtenció del nucleopèptid Ac-Ser(p<sup>3</sup>T-DMT)-Gly-Asp-NH<sub>2</sub> :

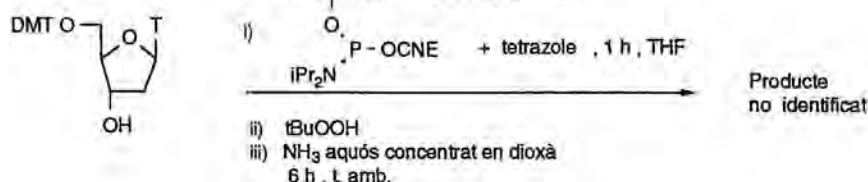
S'ha intentat sintetitzar el nucleopèptid Ac-Ser(p<sup>3</sup>T-DMT)-Gly-Asp-NH<sub>2</sub> per les dues rutes que s'esquematitzen a continuació :

*Figura 1.19 : Intent d'obtenció del nucleopèptid Ac-Ser(p<sup>3</sup>T-DMT)-Gly-Asp-NH<sub>2</sub>*

##### a ) Ruta I



##### b ) Ruta II



A la ruta **L** s'ha fet reaccionar el pèptid Ac-Ser-Gly-Asp(OAnpe)-NH<sub>2</sub> amb DMT-T<sup>3</sup>-P(OCNE)NiPr<sub>2</sub> en presència de tetrazole. A continuació, s'ha realitzat l'oxidació a enllaç fosfat tractant la barreja amb un excés de tBuOOH. L'anàlisi per HPLC mostra la presència d'un producte majoritari (producte **A**), que no es correspon per coinjecció amb productes com DMT-T, DMT-T-PO(OCNE)O<sup>-</sup>, DMT-T-PO(H)OCNE o DMT-T-Hp, que podrien haver-se format durant la síntesi del nucleopèptid objectiu. Tant l'espectre de <sup>1</sup>H RMN enregistrat del producte, com l'anàlisi d'aminoàcids, mostren que el producte **A** no conté pèptid. Cal deduir, doncs, que en les etapes posteriors a la formació de l'enllaç fosfit, s'ha produït el trencament de la molècula.

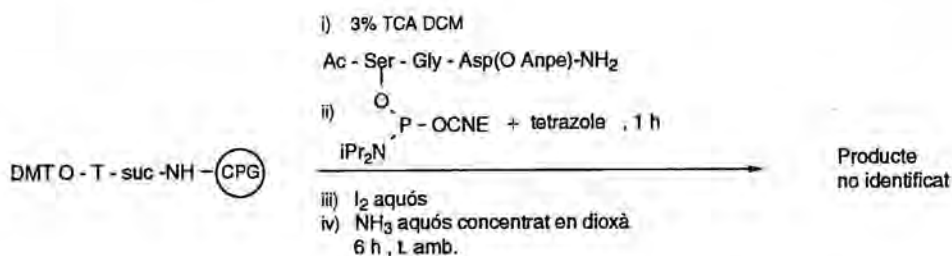
El producte **A** ha estat tractat amb NH<sub>3</sub> aquós concentrat en dioxà a temperatura ambient, i s'observa que es transforma en un producte més polar (producte **B**). Aquest producte tampoc no ha estat possible relacionar-lo amb possibles productes com DMT-T, DMT-T-p o DMT-T-Hp. S'ha intentat caracteritzar el producte **B** mitjançant un espectre de masses per la tècnica FAB, però els senyals majoritaris no s'han pogut assignar a cap producte en concret.

A la ruta **II** (Fig. 1.19), s'ha intentat sintetitzar el nucleopèptid utilitzant l'altra possible alternativa en la formació de l'enllaç fosfit, que consisteix en fer reaccionar el derivat fosforamidit del pèptid amb DMT-T en presència de tetrazole de la mateixa manera que es procedeix en l'esquema de síntesi convergent. Seguint el mateix procediment d'oxidació i obtenció de producte de la ruta **I**, s'obté una barreja del nucleòsid DMT-T (80%), i un altre producte no identificat (**C**, 20%). Aquest producte **C** és diferent del producte **A** de la ruta **I**. Tampoc en aquest cas el producte **C** no conté pèptid, segons s'ha pogut veure a l'espectre de <sup>1</sup>H RMN i l'anàlisi d'aminoàcids, i no es relaciona amb els possibles productes de trencament de l'enllaç en el teòric nucleopèptid entre el pèptid i el nucleòsid, com DMT-T-PO(OCNE)O<sup>-</sup>, DMT-T-PO(H)OCNE o DMT-T-Hp.

Quan el producte **C** es tracta amb NH<sub>3</sub> aquós concentrat en dioxà, s'observa també l'aparició d'un producte més polar **D**, i que és diferent del producte **B** generat a partir d'**A**. El producte **D** tampoc no coelueix amb altres possibles productes relacionats com DMT-T, DMT-T-p o DMT-T-Hp. Per a caracteritzar el producte **D**, se n'han enregistrat espectres de masses per la tècnica FAB i electrospray. Tampoc en aquest cas no han pogut ser interpretats els senyals que s'observen.

#### **b) Intent de síntesi del nucleopèptid Ac-Ser(p<sup>5</sup>T)-Gly-Asp-NH<sub>2</sub> :**

Paral·lelament als experiments anteriors, s'ha intentat dur a terme l'acoblament del derivat fosforamidit del pèptid **28b** sobre una resina T-suc-LCAA CPG (Fig. 1.20), seguint els mateixos procediments amb els que s'han efectuat els intents d'obtenció del nucleopèptid Ac-Ser(p<sup>5</sup>CATCAT)-Gly-Asp-NH<sub>2</sub>. S'han realitzat dos experiments, per veure l'efecte de la duració de l'etapa d'acoblament. A l'experiment **A** la duració d'aquesta etapa ha estat de 5 min, mentre que a l'experiment **B** s'ha deixat reaccionar durant 1 h. A continuació, s'ha realitzat l'etapa

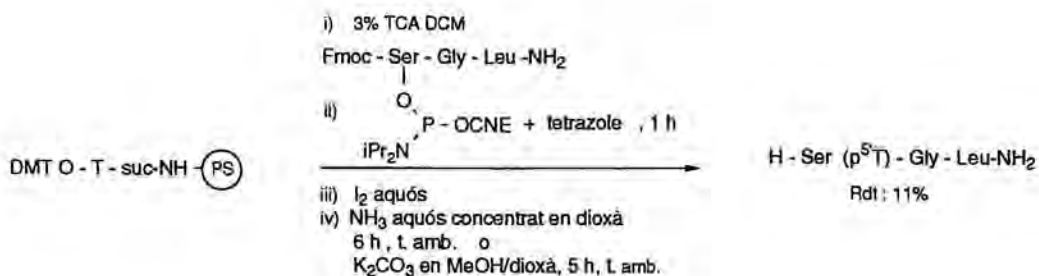
Figura 1.20 : Esquema d'obtenció del nucleopèptid Ac-Ser(p<sup>5'</sup>T)-Gly-Asp-NH<sub>2</sub>

d'oxidació (I<sub>2</sub> aquós). S'ha desprotegit i alliberat el producte de la resina per tractament amb NH<sub>3</sub> aquós concentrat en dioxà durant 6 h a temperatura ambient. Els crus obtinguts en cada experiment han estat analitzats per HPLC en fase reversa, i s'han comparat els productes amb mostres de diferents derivats de timidina, prèviament sintetitzats.

Per a tots dos experiments, l'aspecte del cru analitzat no mostra excessives diferències, pel que cal deduir que la duració de l'etapa d'acoblament no afecta la composició de la barreja de productes que s'obté. No obstant, l'anàlisi per HPLC mostra una barreja complexa de productes en què p<sup>5'</sup>T , T i un producte E són els productes majoritaris. El producte E, que segons l'anàlisi d'aminoàcids no conté pèptid, no s'ha pogut identificar, ja que no ha estat possible interpretar l'espectre de masses que s'ha enregistrat.

### c) Preparació del nucleopèptid H-Ser(p<sup>5'</sup>T)-Gly-Leu-NH<sub>2</sub> :

Els resultats poc coherents dels experiments anteriors han plantejat la realització d'un altre experiment en què es pogués dur a terme un seguiment més efectiu de la reacció d'acoblament. Per això s'ha decidit efectuar un assaig d'acoblament sobre una matriu de poliestirè, per poder enregistrar d'aquesta forma un espectre de <sup>31</sup>P RMN en fase gel de la resina abans de les etapes de desprotecció i desancoratge.

Figura 1.21 : Esquema de síntesi del nucleopèptid H-Ser(p<sup>5'</sup>T)-Gly-Asp-NH<sub>2</sub>

En aquest cas, s'ha emprat el derivat fosforamidit del pèptid Fmoc-Ser-Gly-Leu-NH<sub>2</sub>, (el pèptid ha estat obtingut per Maria Concernau en un treball paral·lel<sup>176</sup> a la realització d'aquesta Tesi), que s'ha preparat per fosfitilació del pèptid mitjançant el mètode B (apartat 3.3). Per dur a terme l'acoblament del pèptid fosforamidit sobre la resina s'ha seguit la mateixa metodologia que ha estat utilitzada en els assajos anteriors sobre poliestirè, adaptada a l'escala de treball d'aquest assaig (6 μmol T-suc-resina). A l'etapa d'acoblament, s'ha fet reaccionar el pèptid fosforamidit amb T-suc-NHCH<sub>2</sub>-PS en presència de tetrazole, durant 4 h (Fig. 1.21). En acabat, s'ha efectuat l'etapa d'oxidació per tractament amb iode aquós, i s'ha enregistrat un espectre de <sup>31</sup>P RMN en fase gel per detectar la formació de l'enllaç entre el pèptid i el nucleòsid. S'observa a l'espectre un únic senyal a -1.71ppm, que correspon a un enllaç de tipus fosfat triester.

A continuació, s'ha procedit a alliberar el producte format de la resina, i per això s'han efectuat dos tractaments diferents. Per un costat, s'ha tractat la resina amb K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en MeOH/dioxà durant 5 h a temperatura ambient, a similitud d'alguns dels intents realitzats anteriorment. Alternativament, s'ha efectuat un tractament amb NH<sub>3</sub> aquós concentrat en dioxà a 55°C durant 5 h. Tot i que ambdós tractaments poden posar en perill l'obtenció del possible nucleopèptid, ha estat necessari realitzar-los per produir un desancoratge efectiu de producte de la resina de poliestirè (Cap.3, apartat 1.4). Els crús de producte alliberats han estat analitzats per HPLC en fase reversa, observant-se que els cromatogrames no ofereixen grans diferències per a un o altre tractament: s'hi observen p<sup>5</sup>T (40%), T (15%) i un producte no identificat G (45%), a més d'altres productes d'eliminació del grup protector Fmoc (Fig. II Sec. Exp.). S'ha considerat oportú aïllar el producte G per HPLC per poder-lo caracteritzar. L'anàlisi d'aminoàcids en aquest cas mostra els aminoàcids a esperar pel possible nucleopèptid (Ser 0.36\*, Gly 0.94, Leu 1.00; \*serina es destrueix parcialment en la hidròlisi prèvia a l'anàlisi). També s'ha enregistrat un espectre de masses per la tècnica d'electrospray, que ha permès assignar definitivament el producte aïllat al nucleopèptid (m/z 577.1 [M-H]<sup>-</sup>).

Aquest resultat, tot i que positiu, és en certa manera sorprenent ja que, en cap dels assajos efectuats anteriorment per obtenir el nucleopèptid objectiu o en els estudis realitzats amb els models que s'acaben de descriure, s'ha pogut obtenir un nucleopèptid. L'únic precedent exitós ha estat la preparació del primer nucleopèptid Boc-Ser(p<sup>5</sup>TCT)-NHcHex (25).



### 4.3 Estudi de la reactivitat dels grups carbamoil enfront de derivats fosfítilants.

Aplicació a l'obtenció del derivat N-acilfosforamidat DMT-T-PO(OCNE)NHCOCH<sub>2</sub>Ph.

Avaluació de l'estabilitat del derivat N-acilfosforamidat a diferents tractaments

En el procés d'obtenció dels derivats fosforamidit dels pèptids per mitjà de la clorofosfina **71a** com a reactiu fosfítilant, s'ha pogut observar l'aparició d'un subproducte que per desplaçament químic a <sup>31</sup>P RMN s'ha relacionat amb una reacció de fosfítilació del grup carbamoil dels pèptids. Aquesta reacció s'ha pogut evitar efectuant la fosfítilació amb la bis(diisopropilamino)fosfina **71b**.

El producte **X**, aïllat en la major part dels intents de síntesi del nucleopèptid Ac-Ser(p<sup>5</sup>CATCAT)-Gly-Asp-NH<sub>2</sub>, ha estat obtingut en assajos en què el pèptid fosforamidit contenia el possible subproducte de fosfítilació, però també en altres en què no estava impurificat. Per tant, cal pensar que no existeix una relació directa entre l'aparició del producte **X** i el subproducte de fosfítilació. No obstant, donat que fins aquest moment no ha estat possible elucidar la natura del producte **X**, s'ha cregut convenient revisar més a fons la reactivitat del grup carbamoil dels pèptids per si podia existir alguna relació amb els resultats obtinguts. S'han avaluat tres aspectes diferents :

- En primer lloc, s'ha estudiat la reacció entre una amida primària i reactius electròfils, com poden ser la clorofosfina **71a** o un fosforamidit activat per un catalitzador àcid.

- Un cop comprovada la possible formació de derivats N-fosfítilats d'amides, s'ha dut a terme la síntesi del producte DMT-T-PO(OCNE)NHCOCH<sub>2</sub>Ph **40**, mitjançant dues rutes que parteixen de fenilacetamida.

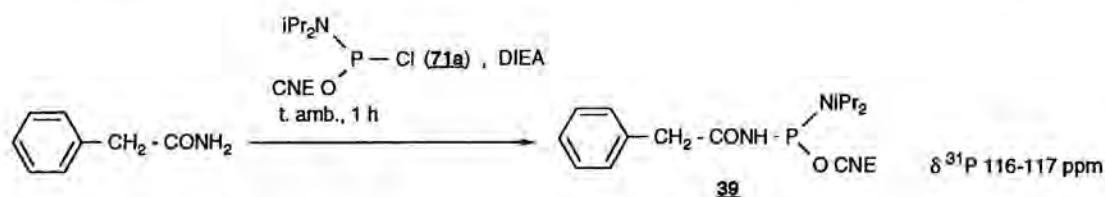
- S'ha estudiat l'estabilitat de l'enllaç N-acilfosforamidat en el derivat **40** per tractament amb diferents reactius.

A continuació, es discuteixen els resultats a que s'ha arribat en cada punt.

#### a) Reacció de fenilacetamida amb

(2-cianoetoxi)cloro(diisopropilamino)fosfina :

En una primera etapa, s'ha tractat d'explicar l'aparició del subproducte que s'observava en la fosfítilació del pèptid amb la clorofosfina **71a**, i que per desplaçament químic de <sup>31</sup>P RMN (δ 117-119 ppm) s'havia relacionat amb el producte de N-reacció amb el grup carbamoil. Per això, s'ha elegit com a model un producte amb una amida primària com fenilacetamida, el qual s'ha fet reaccionar amb la clorofosfina **71a** (2 eq) en presència de DIEA (Fig. 1.22).

Figura 1.22: Reacció de la fenilacetamida amb Cl-P(OCNE)NiPr<sub>2</sub> en presència de DIEA

Al cap de 1 h de reacció, s'ha enregistrat un espectre de <sup>31</sup>P RMN. S'observa un senyal a 116-117 ppm, que confirma per tant els supòsits realitzats en la fosfitilació dels pèptids. De totes formes, s'ha decidit aïllar el productes de fosfitilació per dur a terme la corresponent caracterització. Per això, s'ha addicionat HOCH<sub>2</sub>-PS a les dissolucions de reacció per eliminar l'excés de clorofosfina, i en acabat s'han efectuat els rentats de la fase orgànica amb dissolucions aquoses. Una vegada assecada la dissolució, s'ha obtingut un residu per evaporació del dissolvent. L'enregistrament de l'espectre de <sup>31</sup>P RMN del residu que s'obté mostra pràcticament un únic senyal.

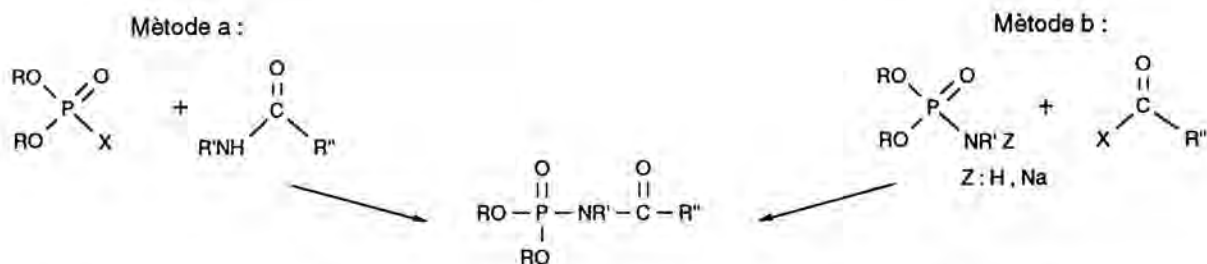
El producte de fosfitilació de la fenilacetamida (producte 39) s'ha caracteritzat enregistrant els espectres de <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C RMN. Sembla que es pot confirmar que el producte és un derivat de N-fosfitilació, ja que l'espectre de <sup>13</sup>C RMN mostra perfectament el senyal assignable al carbonil (δ 172.8, 172.5 ppm). Això es correspon amb el que es deduïa del valor de desplaçament químic que el producte 39 presenta per <sup>31</sup>P RMN (δ 116.7 ppm), proper al d'un derivat de tipus fósfordiamidit (RO-P(NR<sub>2</sub>)<sub>2</sub>, δ 115-125 ppm<sup>172</sup>), i també amb el que es coneix de les reaccions d'alquilació o acilació d'amides primàries o secundàries, en què la reacció sobre el nitrògen està afavorida en presència de bases<sup>177</sup>.

#### b) Obtenció del fosforamidat d'O-2-cianoetil, O-3'-(5'-O-dimetoxitritil)timidinil i

##### N-fenilacetil : DMT-T-PO(OCNE)NHCOCH<sub>2</sub>Ph (40) :

Fins al moment dos són els mètodes que han estat descrits per a l'obtenció de derivats N-acilfosforamidats. En un dels camins, s'obté el derivat per reacció de la sal sòdica d'una amida primària o secundària i el fosfocloridat corresponent<sup>178</sup> (Fig. 1.23, mètode a). En l'altre mètode es fan reaccionar el fosforamidat<sup>179</sup> o la seva sal sòdica i un clorur d'àcid<sup>180</sup> (Fig. 1.23, mètode b).

Figura 1.23 : Mètodes descrits per a l'obtenció de derivats N-acilfosforamidats

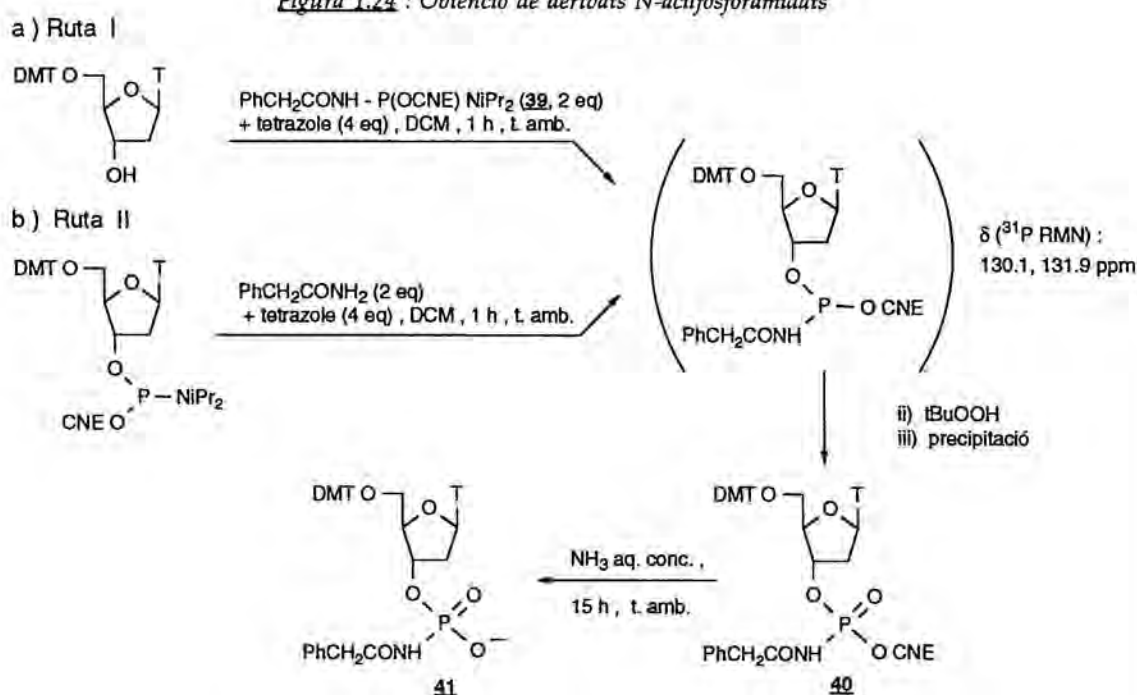


Havent comprovat la possibilitat de poder obtenir un derivat fosfilitat d'una amida primària s'ha volgut avaluar la reactivitat d'aquest tipus de compost. És possible pensar que un compost de tipus N-acil-N',N'-diisopropilfosforodiamidit pugui reaccionar amb un alcohol en les mateixes condicions en què ho fa un N,N-diisopropilfosforamidit per donar un derivat de tipus N-acilfosforamidit, el qual, un cop format pot ser oxidat a N-acilfosforamidat (Fig. 1.24 - Ruta I).

D'altra banda, de la mateixa manera que una amida primària pot reaccionar amb un reactiu electròfil com la clorofosfina **71a**, és possible també imaginar la reacció de l'amida primària amb un altre reactiu electròfil com és un N,N-dialquilfosforamidit activat en medi àcid. La reacció en aquest cas generaria també el derivat N-acilfosforamidit, que podria ser oxidat per donar el corresponent N-acilfosforamidat (Fig. 1.24 - Ruta II).

Aquestes dues possibles reaccions que condueixen a un compost de tipus N-acilfosforamidat s'han assajat en l'obtenció del derivat fosforamidat d'O-2-cianoetil, O-3'-(5'-O-dimetoxitritil)timidinil i N-fenilacetil (DMT-T-PO(OCNE)NHCOCH<sub>2</sub>Ph, **40**).

Figura 1.24 : Obtenció de derivats N-acilfosforamidats



Seguint la ruta **I**, la fosfina **39** (2 eq respecte el nucleòsid) s'ha fet reaccionar amb el nucleòsid DMT-T, en presència de tetrazole (Fig. 1.24). Al cap de 1 h, s'ha enregistrat un espectre de  $^{31}\text{P}$  RMN, el qual mostra tres senyals en la zona de 130-140 ppm, dos dels quals són majoritaris i de desplaçament químic proper ( $\delta$  130.1, 131.9 ppm), pel que podrien correspondre's amb els dos productes diastereòmers resultat de la reacció de la fosfina **39** amb el nucleòsid. Si s'efectua l'oxidació amb tBuOOH, s'observa la pràctica desaparició en menys de 5 min dels senyals a camp baix, per aparèixer nous senyals a la zona dels derivats fosfat ( $\delta$  -2.8, -3.2 ppm). El producte format es recupera de la dissolució, per rentats amb dissolucions aquoses, assecat i posterior evaporació, i finalment es precipita en hexà, obtenint-se un sòlid blanc. Els espectres de ressonància de  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  RMN que han estat enregistrats pel producte es corresponen amb el producte DMT-T-PO(OCNE)NHCOCH<sub>2</sub>Ph.

Segons la ruta **II**, s'ha fet reaccionar la fenilacetamida (2 eq respecte el nucleòsid) amb DMT-T-P(OCNE)NiPr<sub>2</sub> en presència de tetrazole (Fig. 1.24). Al cap de 1 h, s'ha addicionat a la dissolució de reacció tBuOOH, i al cap de 15 min s'ha enregistrat un espectre de  $^{31}\text{P}$  RMN. S'observen dos únics senyals que per desplaçament químic coincideixen amb els derivats N-acilfosforamidat de la ruta **I**. Tot sembla confirmar que el producte de reacció és el mateix que en la ruta **I**, no obstant, donat que les reaccions d'alquilació d'amides en medis neutres àcids o neutres acostumen a donar barreges de productes d'O- i N-alquilació<sup>180</sup>, s'ha volgut comprovar que en aquest cas no hi ha productes d'O-fosforilació. Per això, s'han comparat els espectres de ressonància amb els obtinguts pel producte de la ruta **I**, i no s'han observat diferències significatives. També s'han analitzat els dos productes per HPLC en fase reversa i s'ha pogut veure que coincideixen perfectament. Per tant, s'ha de deduir que és possible obtenir el derivat N-acilfosforamidat **40** per les dues rutes.

Els resultats obtinguts constitueixen una nova metodologia d'obtenció d'aquest tipus de derivats, que transcorre en condicions de reacció molt més suaus i adequades a l'obtenció de productes amb una certa sensibilitat química que les descrites fins al moment.

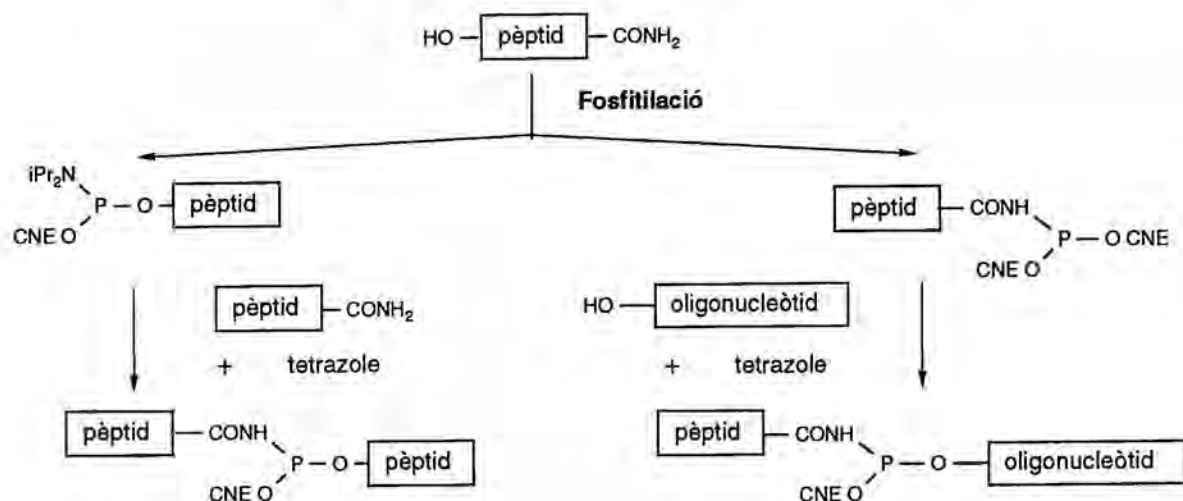
**c) Obtenció del fosforamidat d'O-3'-(5'-O-dimetoxitritil)timidinil i N-fenilacetil,  
DMT-T-PO(O<sup>-</sup>)NHCOCH<sub>2</sub>Ph (**41**)**

**Estabilitat de l'enllaç N-acetilfosforamidat a diferents condicions**

En els assajos anteriors s'han confirmat dos fets: que les amides primàries poden ser fosfilitades amb la clorofosfina **71a** i donar un derivat capaç de reaccionar amb un compost hidroxilat en presència d'un catalitzador àcid, i que també és possible generar un derivat N-acilfosforamidit per reacció d'una amida primària amb un N,N-diisopropilfosforamidit en presència amb un catalitzador àcid. És fàcil d'imaginar que totes dues reaccions poden haver tingut

lloc en els assajos d'acoblament realitzats per obtenir el nucleopèptid Ac-Ser(p<sup>5</sup>CATCAT)-Gly-Asp-NH<sub>2</sub> (32). Per un costat, la carboxamida fosfitilada del pèptid pot haver reaccionat amb el grup l'hidroxil de l'oligonucleòtid (Fig. 1.25). També, és possible que hi hagi hagut una reacció intra- o intermolecular del fosforamidit del pèptid amb l'amida C-terminal (Fig. 1.25).

**Figura 1.25** : Possibles reaccions en què intervé el grup carboxil en les etapes de fosfitilació del pèptid i d'acoblament sobre l'oligonucleotidil-resina en els assajos de l'estratègia convergent



Per tal de comprovar si la formació de possibles derivats de tipus N-acilfosforamidat en l'etapa d'acoblament pot explicar l'aparició dels productes que han estat obtinguts, i poder observar el possible trencament de l'enllaç fosforamidat i l'aparició de productes que puguin ser relacionats amb els anteriors, s'ha assajat l'estabilitat del derivat N-acilfosforamidat **40** als diferents reactius utilitzats en l'obtenció del nucleopèptid. Les úniques dades existents a la bibliografia sobre l'estabilitat de derivats N-acilfosforamidat  $(\text{RO})_2\text{PONHCOR}'$  indiquen que poden ser solvolitzats amb catàlisi àcida o en medi àcid, generant barreges de productes  $(\text{RO})_2\text{POOR}''$  i  $\text{R}'\text{CONHR}''$ <sup>181</sup>. No s'ha estudiat el seu comportament en presència de bases o reactius nucleòfils.

Abans d'estudiar l'estabilitat del derivat N-acilfosforamidat **40** però, donat que els reactius bàsics utilitzats en l'etapa de desprotecció i desancoratge produeixen l'eliminació del grup protector cianoetil de fosfat, s'ha considerat oportú obtenir el derivat fosforamidat diester **41**, que es genera en desprotegir el N-acilfosforamidat **40** (Fig. 1.24) i poder-lo utilitzar així com a patró. Per això, el producte **40** s'ha tractat amb  $\text{NH}_3$  aquós concentrat en dioxà a temperatura ambient durant una nit. Un cop eliminat el dissolvent per evaporació, l'anàlisi per HPLC en fase reversa mostra un únic producte. S'ha purificat el residu per precipitació en hexà, i a continuació s'han enregistrat

espectres de ressonància ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$ ) i de masses (FAB, mode negatiu), els quals han confirmat l'obtenció del fosforamidat **41**.

A continuació, s'han realitzat les diferents proves d'estabilitat sobre el derivat **41**. Com a conclusió general es pot dir que el N-acilfosforamidat **41** és perfectament estable als tractaments bàsics efectuats per realitzar la desprotecció i desancoratge del nucleopèptid, com són els reactius  $\text{K}_2\text{CO}_3$  en MeOH/dioxà o LiOH en MeOH/dioxà/aigua, fins i tot després de 24 h. També s'ha comprovat que el producte és estable a l' $\text{NH}_3$  aquós concentrat en dioxà a una temperatura de  $55^\circ\text{C}$  durant 15 h.

D'altra banda, s'ha intentat esbrinar si el producte podia ser làbil a alguns dels reactius que s'utilitzen en el cicle de síntesi dels oligonucleòtids (acoblament i oxidació). S'ha vist que és estable durant 8 h a una dissolució de tetrazole 1 M en aigua/ACN, i que és estable durant més de 8 h a la dissolució d'oxidació que conté  $\text{I}_2$  en lutidina/aigua/THF.

S'ha assajat l'estabilitat de l'enllaç de tipus N-acilfosforamidat a una dissolució 80% d'AcOH en aigua durant 15 h. L'anàlisi per HPLC mostra un únic producte, que correspon al fosforamidat  $\text{PhCH}_2\text{CONH-PO}(\text{O}^-)\text{-T}$  en base a l'espectre de masses (el tractament àcid produeix la pèrdua del grup protector DMT).

Segons les proves realitzades es pot concloure que l'enllaç N-acilfosforamidat en el derivat **41** és perfectament estable a totes les condicions assajades. És possible doncs descartar la hipòtesi en què es relacionava l'obtenció del producte **X** o de l'oligonucleòtid-5'-fosfat amb els resultats dels assajos de síntesi del nucleopèptid Ac-Ser( $\text{p}^{5'}\text{CATCAT}$ )-Gly-Asp- $\text{NH}_2$  per formació de derivats de tipus N-acilfosforamidit durant l'etapa d'acoblament. S'ha de deduir doncs, per l'estabilitat que mostra el derivat N-acilfosforamidat **41**, que d'haver-se format aquest mateix tipus de derivat en els assajos d'acoblament, s'hagués pogut identificar com a tal en els crús de síntesi.

#### 4.4 Conclusions de les proves realitzades :

Fent una valoració dels resultats obtinguts en les proves realitzades per determinar l'origen del producte **X** s'ha pogut arribar a les següents conclusions :

- Es pot descartar com a origen del producte **X** la labilitat de l'enllaç fosfit que es forma entre el pèptid i l'oligonucleòtid a l'etapa d'acoblament. Cal tenir en compte que el producte **X** no es correspon amb el producte que es generaria per trencament de l'enllaç fosfit pèptid-oligonucleòtid, l'oligonucleòtid  $\text{Hp}^{5'}\text{CATCAT}$ .

- La formació del producte **X** no sembla tenir tampoc cap relació amb els tractaments de desprotecció i desancoratge que es realitzen, ja que ha estat obtingut en assajos en què s'ha tractat la resina amb diferents reactius (Taula 1.4, apartat 3.5).

• També s'ha de descartar la possible relació del producte **X** amb la reactivitat del grup carbamoil dels pèptids. Són diferents els raonaments que es poden fer. El primer d'ells consisteix simplement en veure que ha estat possible obtenir el nucleopèptid H-Ser(p<sup>5</sup>T)-Gly-Leu-NH<sub>2</sub>, que també conté un grup carbamoil, i en què no s'ha observat la formació de derivats amb característiques equivalents a les del producte **X**. També s'ha de tenir en compte que a la literatura s'han descrit la síntesi de nucleopèptids que contenen un grup carbamoil utilitzant una estratègia de tipus convergent amb el mètode del fosfit-triester<sup>56,59,60</sup>. A més, l'estabilitat dels derivats N-acilfosforamidat una vegada formats fa pensar que, d'haver-se generat per reacció del grup carbamoil, s'haurien d'haver observat en els crús en què s'ha obtingut el producte **X**.

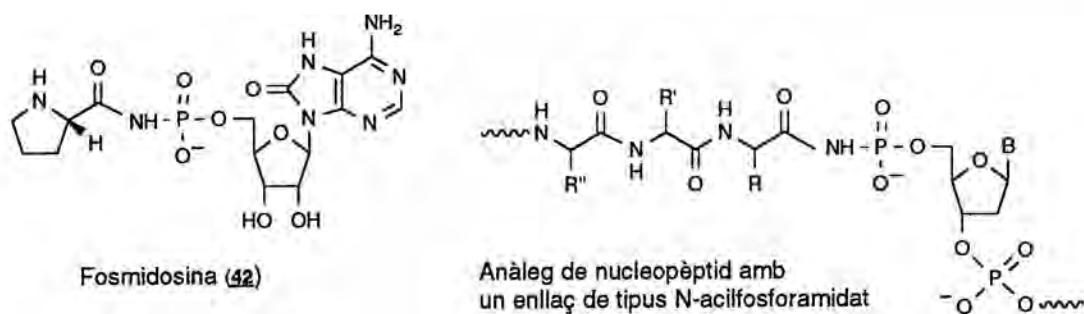
De tot això es desprèn que se segueix sense poder establir un origen ni una estructura pel producte **X**. Potser per donar explicació als resultats obtinguts s'hagin de contemplar altres hipòtesis o realitzar experiments que no s'han efectuat en aquest treball. Arribats a aquest punt doncs, s'ha considerat que calia optar per una altra alternativa més d'acord amb els objectius del projecte. Així, vistos els diversos problemes que ha comportat l'estratègia convergent, s'ha cregut convenient passar a dissenyar un nou esquema de síntesi que permeti sintetitzar els compostos que no ha estat possible obtenir. Com es veurà, aquest és l'objecte de discussió del proper Capítol.

Malgrat tot, els assajos realitzats han servit per abordar la preparació d'un nou tipus de conjugat nucleopeptídic basat en una unió de tipus N-acilfosforamidat, l'obtenció dels quals tot seguit es passa a comentar.

##### 5. Obtenció dels anàlegs nucleopeptídics Ac-Ser-Gly-Asp-NH-p<sup>5</sup>T (**45**) i Ac-Ser-Gly-Asp-NH-p<sup>5</sup>CATCAT (**46**):

La síntesi del derivat DMT-T-PO(O<sup>-</sup>)-NHCOCH<sub>2</sub>Ph **41** ha servit per establir un nou mètode per accedir a enllaços de tipus N-acilfosforamidat, mitjançant un tipus de reacció més simple i en condicions més suaus que els que havien estat descrits fins ara. Recentment s'ha descrit l'aïllament d'un nou tipus d'antibiòtic nucleosídic anomenat fosmidosina<sup>182</sup> (**42**), que ha estat identificat com un derivat N-acilfosforamidat del nucleòsid 8-oxoadenosina i l'aminoàcid prolina, i que pot ser considerat un anàleg nucleopeptídic. Això ens ha fet pensar que seria interessant poder aplicar el nou tipus de reacció per obtenir anàlegs de nucleopèptids amb un enllaç de tipus N-acilfosforamidat entre el pèptid i l'oligonucleòtid (Fig. 1.26).

**Figura 1.26** : Estructura de l'antibiòtic fosmidosina i dels possibles anàlegs nucleopeptídics amb un enllaç de tipus N-acilfosforamidat entre el pèptid i l'oligonucleòtid.



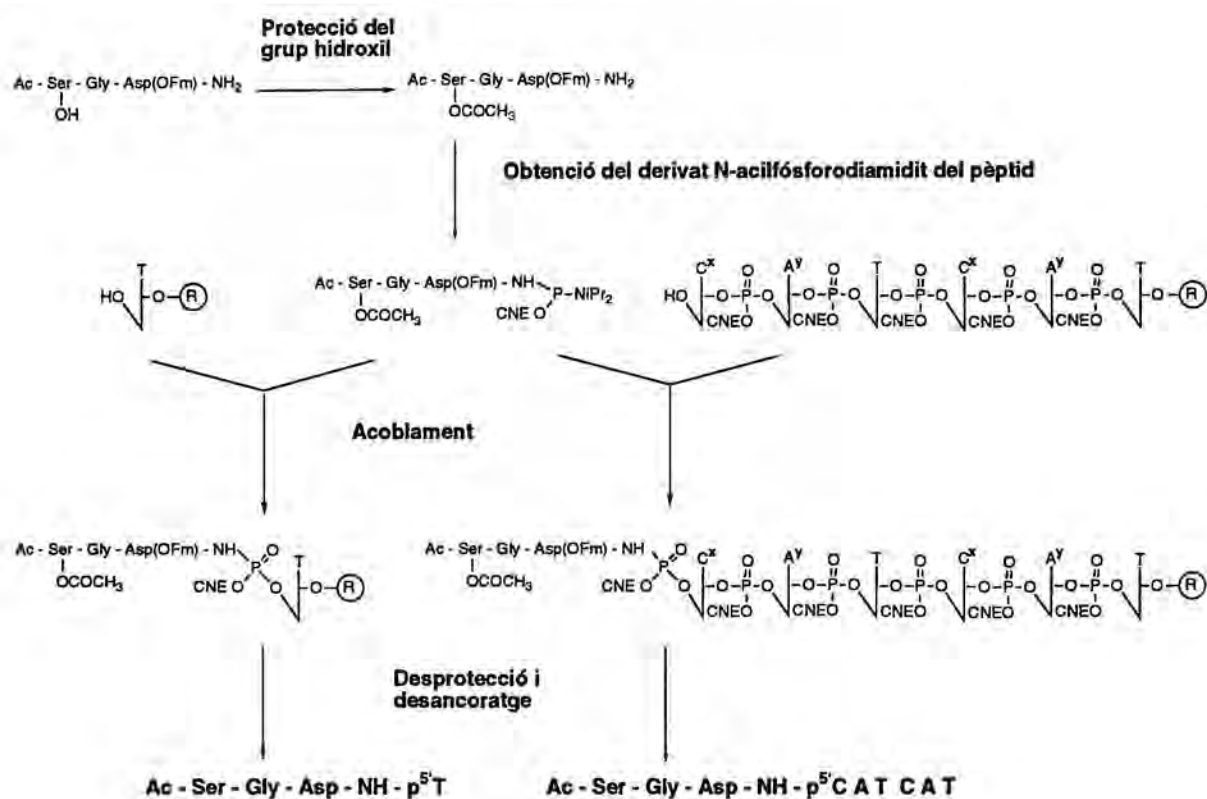
Com a primers productes a sintetitzar s'ha cregut adient intentar aprofitar els intermedis que han estat obtinguts per preparar nucleopèptids amb enllaços fosfat. Cal recordar que els pèptids obtinguts contenen a l'extrem C-terminal el grup carbamoil necessari per formar l'enllaç de tipus fosforamidat amb l'oligonucleòtid.

A més, per a l'obtenció d'aquest tipus d'anàlegs de nucleopèptids es pot seguir essencialment el mateix esquema que ha estat utilitzat en els assajos d'obtenció d'un anàleg de nucleopèptid amb un enllaç de tipus fosfat. Per dur a terme l'acoblament del pèptid amb formació de l'enllaç de tipus N-acilfosforamidat cal disposar d'un derivat fosfilitat en el grup carbamoil del pèptid protegit i aquest producte és possible obtenir-lo per fosfilitació amb la clorofosfina **71a**. Donat que es pretén reproduir la mateixa seqüència peptídica dels anteriors assajos (Ac-Ser-Gly-Asp-), cal protegir el grup  $\beta$ -hidroxil del residu de serina abans d'efectuar l'etapa de fosfilitació. Responent a l'esquema de protecció que ha estat dissenyat, aquest grup protector addicional haurà de ser làbil a les condicions bàsiques d'eliminació dels altres grups protectors permanents.

Així, amb aquesta idea s'han sintetitzat els anàlegs de nucleopèptid Ac-Ser-Gly-Asp-NH-p<sup>5'</sup>T (**45**) i Ac-Ser-Gly-Asp-NH-p<sup>5'</sup>CATCAT (**46**), un de més fàcil caracterització amb un únic nucleòsid, i un de més complex amb un fragment oligonucleotídic més llarg. L'esquema que s'ha seguit queda resumit a la següent figura :



Figura 1.27 : Esquema de síntesi dels anàlegs nucleopeptídics  
*Ac-Ser-Gly-Asp-NH-p<sup>5'</sup>T* i *Ac-Ser-Gly-Asp-NH-p<sup>5'</sup>CATCAT*



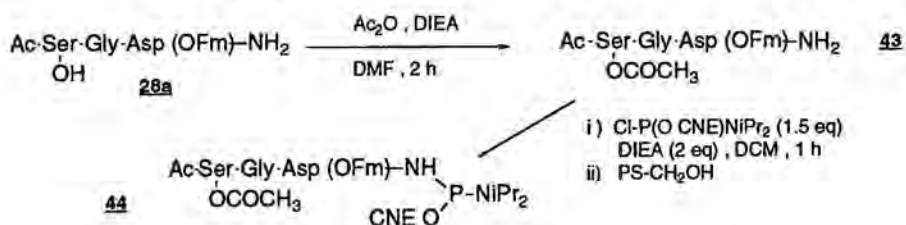
### 5.1 Síntesi del pèptid protegit *Ac-Ser(Ac)-Gly-Asp(O<sup>t</sup>Fm)-NH<sub>2</sub>* (**43**) :

S'ha partit del pèptid *Ac-Ser-Gly-Asp(O<sup>t</sup>Fm)-NH<sub>2</sub>* (**28a**, apartat 3.2), el qual ha calgut protegir en el grup β-hidroxil del residu de serina abans d'efectuar l'etapa de fosfitilació (Fig. 1.28). Com a grup protector s'ha elegit el grup acetil, ja que pot ser eliminat amb qualsevol dels tractaments de desprotecció i desancoratge assajats. Per això, el pèptid, un cop dissolt en DMF, s'ha fet reaccionar amb un excés d'Ac<sub>2</sub>O i DIEA. Al cap de 2 h, s'ha afegit MeOH per eliminar l'excés d'anhidrid, i s'ha evaporat la dissolució a sequedat. S'ha obtingut el pèptid com a sòlid per trituració en èter anhidre i posterior filtració. L'anàlisi per HPLC en fase reversa mostra un únic producte, clarament diferenciat del pèptid **28a** inicial. Els espectres de ressonància (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C RMN) i de masses que han estat enregistrats mostren que es tracta del pèptid acetilat **43**.

**5.2 Obtenció del pèptid fósforodiamidit Ac-Ser(Ac)-Gly-Asp-NH-P(OCNE)NiPr<sub>2</sub> (44) :**

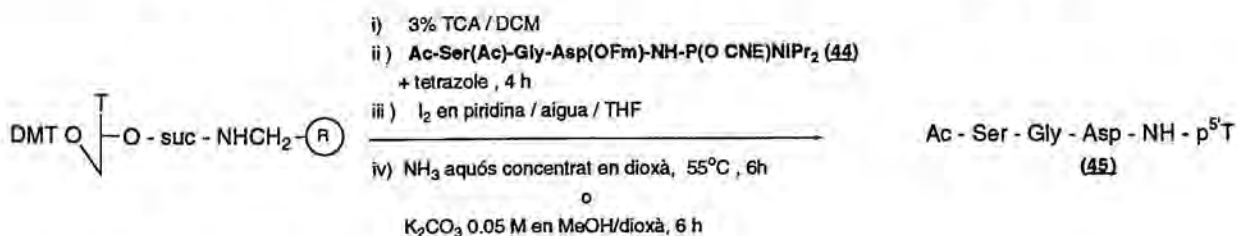
Per obtenir el derivat fosfilitat en el grup carbamoil del pèptid **43** s'ha seguit essencialment el mateix mètode **A** que s'ha utilitzat per sintetitzar els derivats fosforamidit dels pèptids (apartat 3.3). D'aquesta forma, el pèptid un cop suspès en DCM anhidre s'ha fet reaccionar amb la (2-cianoetoxi)cloro(diisopropilamino)fosfina **71a** en presència de DIEA (Fig. 1.28). Al cap d'1 h, s'ha addicionat HOCH<sub>2</sub>-PS a la barreja de reacció per eliminar l'excés de fosfina. Un cop separada la resina per filtració, i rentada i assecada la fase orgànica, s'ha obtingut el producte per evaporació. S'ha enregistrat un espectre de <sup>31</sup>P RMN que efectivament mostra els senyals que han estat assignats a la barreja diastereomèrica del pèptid fósforodiamidit . Per tant, s'ha utilitzat aquest producte sense més purificació en els assajos d'acoblament que s'han efectuat a continuació.

*Figura 1.28 : Obtenció del pèptid fósforodiamidit Ac-Ser(Ac)-Gly-Asp(OFm)-NH-P(OCNE)NiPr<sub>2</sub> .*


**5.3 Acoblament del pèptid fósforodiamidit 44 sobre la resina T-suc-NHCH<sub>2</sub>-PS :**
**Obtenció de l'anàleg nucleopeptídic Ac-Ser-Gly-Asp-NH-p<sup>5</sup>T (45)**

Per dur a terme l'acoblament del pèptid fósforodiamidit **44** sobre la resina T-suc-NHCH<sub>2</sub>-PS s'ha seguit la mateixa metodologia utilitzada en els assajos realitzats sobre una matriu sòlida de poliestirè, amb l'adaptació corresponent a l'escala de treball. El pèptid fósforodiamidit **44** s'ha fet reaccionar durant 4 h en presència de tetrazole, i a continuació s'han efectuat les etapes d'acetilació i oxidació (Fig. 1.29).

*Figura 1.29 : Esquema de síntesi de l'anàleg nucleopeptídic Ac-Ser-Gly-Asp-NH-p<sup>5</sup>T (45)*



Per desprotegir i alliberar el producte de la resina, aquesta s'ha tractat amb  $\text{NH}_3$  aquós concentrat en dioxà durant 6 h a  $55^\circ\text{C}$ . L'anàlisi per HPLC del cru mostra una barreja de productes de la que forma part un producte majoritari amb temps de retenció diferent d'altres productes patró com  $\text{p}^5\text{T}$ ,  $\text{Hp}^5\text{T}$  i  $\text{T}$  (Fig. III Sec. Exp.). S'ha aïllat el producte majoritari mitjançant purificació per HPLC en fase reversa, el que permet obtenir-lo com un producte homogeni en les condicions d'anàlisi amb un rendiment global, calculat a partir de la nucleosidil-resina inicial, del 22% ( $3.8 \text{ OD}_{260}$  a partir de  $2 \mu\text{mol}$ ).

L'anàlisi d'aminoàcids del producte presenta la proporció d'aminoàcids a esperar pel nucleopèptid desitjat (Ser 0.76, Asp 0.96, Gly 1.00). S'ha enregistrat també un espectre de masses en què els senyals que s'observen poden ser atribuïts també al producte d'unió del pèptid i el nucleòsid. Segons aquests resultats, s'ha pogut concloure que el producte és el nucleopèptid desitjat  $\text{Ac-Ser-Gly-Asp-NH-p}^5\text{T}$ .

#### 5.4 Acoblament del pèptid fòsforodiamidit **44** sobre la resina

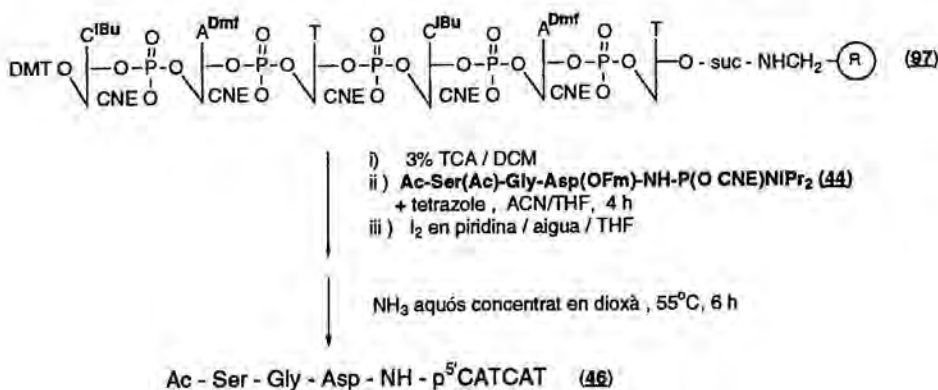
$\text{CiBu}_A\text{Dmf-T-CiBu}_A\text{Dmf-T-suc-NHCH}_2\text{-PS}$  :

Obtenció del nucleopèptid  $\text{Ac-Ser-Gly-Asp-NH-p}^5\text{CATCAT}$  (**46**)

El resultat de l'experiment anterior ha permès plantejar la síntesi d'un anàleg més complex. Per això, s'ha cregut interessant obtenir un compost isòmer del nucleopèptid  $\text{Ac-Ser(p}^5\text{CATCAT)-Gly-Asp-NH}_2$ . En aquest cas però, la unió entre el pèptid i l'oligonucleòtid serà de tipus N-acilfosforamidat, i enllaçarà l'extrem C-terminal del pèptid amb l'hidroxil primari de l'oligonucleòtid,  $\text{Ac-Ser-Gly-Asp-NH-p}^5\text{CATCAT}$ .

Per dur a terme la síntesi del nucleopèptid anàleg s'ha seguit essencialment el mateix procediment que ja s'ha descrit (apartats 3.2 i 3.4). En primer lloc, s'ha sintetitzat l'oligonucleòtid sobre una matriu sòlida de poliestirè seguint la metodologia que emprava nucleòsids fosforamidit i que es troba adaptada a l'ús d'aquest tipus de suport (Cap.3, apartat 5.3.a). Com a grups protectors de les nucleobases s'han elegit isobutiril per a citosina i dimetilaminometilè per a adenina, i s'han mantingut els grups cianoetil per a l'enllaç fosfat i la unió de tipus succinil del primer nucleòsid a la resina. A l'etapa d'acoblament, el pèptid fòsforodiamidit **44** s'ha afegit a l'oligonucleòtid-resina en presència de tetrazole, i s'ha deixat reaccionar durant 4 h. En acabat, s'han realitzat les etapes d'acetilació i d'oxidació. El producte format s'ha desprotegit i desancorat de la resina per tractament amb  $\text{NH}_3$  aquós concentrat en dioxà, a  $55^\circ\text{C}$  durant 6 h.

La següent figura resumeix el procediment seguit :

Figura 1.30 : Esquema de síntesi de l'anàleg nucleopeptídic Ac-Ser-Gly-Asp-NH-p<sup>5'</sup>CATCAT (46)


El producte alliberat de la resina ha estat analitzat per HPLC, tant en fase reversa (Fig. IV Sec. Exp.), com per bescanvi aniònic (Fig. Sec. Exp.). S'ha pogut comprovar que el cru presenta un producte majoritari **A** (40%), acompanyat d'altres impureses, entre les quals es detecta l'oligonucleòtid 5'CATCAT (25%). S'ha decidit aïllar el producte **A** mitjançant purificació per MPLC en fase reversa. Una vegada purificat, el producte **A** mostra un bon grau de puresa (Fig. IV Sec. Exp.), el que ha permès realitzar les corresponents proves de caracterització. Cal afegir que el producte **A** ha estat obtingut amb un 26% de rendiment total, calculat a partir de l'oligonucleotidil-resina (15 OD<sub>260</sub> a partir de 1.5 μmol)

Per caracteritzar el producte **A** s'han realitzat diferents proves, les quals han permès assignar-lo a l'estructura Ac-Ser-Gly-Asp-NH-p<sup>5'</sup>CATCAT, en què la unió entre el pèptid i l'oligonucleòtid és de tipus fosforamidat :

- En primer lloc, s'ha efectuat una anàlisi d'aminoàcids, la qual mostra la proporció d'aminoàcids a esperar pel possible nucleopèptid (Ser 0.70, Asp 0.94, Gly 1.00).

- També s'han realitzat dos experiments de digestió enzimàtica.

En el primer cas, s'ha tractat el producte amb la barreja d'enzims fosfodiesterasa de verí de serp i fosfatasa alcalina. L'anàlisi dels productes de digestió mostra la barreja de nucleòsids en la proporció a esperar per la degradació de l'oligonucleòtid CATCAT (dC 0.9, T 1.0, dA 1.1).

També s'ha volgut observar l'acció de l'enzim fosfodiesterasa de melsa sobre el producte **A**. L'anàlisi del producte que ha estat sotmès a l'acció de l'enzim (6h, 36°C), no mostra cap diferència respecte al producte inicial, la qual cosa confirma que es tracta d'un oligonucleòtid modificat a l'extrem 5', en aquest cas, per unió al pèptid.

- S'han realitzat diferents proves d'estabilitat en vistes a comprovar el tipus d'unió entre el pèptid i l'oligonucleòtid. S'ha observat per exemple que el producte és perfectament estable a una dissolució 1 M de piperidina en aigua a 55°C durant 15 h, i a K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en MeOH/dioxà o LiOH en

MeOH/dioxà/aigua a temperatura ambient durant 6 h. D'altra banda, s'ha pogut observar que el producte és estable a temperatura ambient a AcOH 80%, però es degrada lentament en ser escalfat a 55°C, generant en aquest cas com a producte de trencament p<sup>5</sup>CATCAT. L'estabilitat del producte a les bases i la relativa estabilitat a l'AcOH es corresponen amb el comportament que s'ha observat en el model DMT-T-PO(O<sup>-</sup>)-NHCOCH<sub>2</sub>Ph, tot i en aquest cas, donat que la unió de tipus N-acilfosforamidat té lloc entre el pèptid i l'oligonucleòtid sembla que la molècula és més làbil als àcids.

- La quantitat de producte obtingut ha permès enregistrar un espectre de <sup>1</sup>H RMN. Per això ha calgut obtenir prèviament la sal sòdica del producte **46**, per elució del producte a través d'una columna Dowex en forma de sal sòdica. Resulten diagnòstics d'una estructura en què estan units el pèptid i l'oligonucleòtid, els senyals aromàtics de les nucleobases (H8 A, H2 A, H6 C, H6 T), els senyals del grup metil de timina i el senyal del grup metil d'acetil.

- També s'ha enregistrat un espectre de masses per la tècnica d'electrospray. Els diferents senyals que s'observen poden ser interpretats en base a un producte que es correspon amb l'anàleg de nucleopèptid desitjat.

Aquests dos resultats posen de manifest que és possible accedir a anàlegs nucleopeptídics amb enllaços de tipus N-acilfosforamidat entre el pèptid i l'oligonucleòtid, seguint les metodologies habituals de síntesi pel pèptid i l'oligonucleòtid i, a l'etapa de formació de l'enllaç N-acilfosforamidat, emprant la nova reacció que permet realitzar-la en condicions completament equivalents a la de formació d'un enllaç fosfat triester.

És d'esperar per tant que la senzillesa de la metodologia i els bons rendiments obtinguts permetin abordar la síntesi d'altres conjugats peptídico-oligonucleotídics amb enllaços N-acilfosforamidat que, com la fosmidosina, presentin activitats biològiques interessants.

## 6. Consideracions finals :

L'aplicació de l'esquema convergent ha posat de manifest un conjunt de problemes no previstos a l'inici. Les solucions que s'han plantejat no han comportat els resultats esperats, pel que finalment s'ha optat pel disseny d'un nou esquema de síntesi. Abans, però, s'ha cregut convenient realitzar una anàlisi dels resultats obtinguts, de forma que les seves conclusions poguessin servir per a l'elaboració de la nova estratègia.

Si s'analitzen els problemes trobats en els intents d'obtenció del nucleopèptid Ac-Ser(p<sup>5</sup>CATCAT)-Gly-Asp-NH<sub>2</sub>, s'arriba a la conclusió que un dels principals obstacles ha estat la utilització dels pèptids protegits com a intermedis de la reacció. Per un costat, la baixa solubilitat que han mostrat en general els pèptids protegits ha dificultat l'obtenció del derivat fosforamidit, l'intermedi clau de l'estratègia. Fins i tot una vegada obtinguts, no s'ha pogut realitzar una purificació convenient (per mètodes convencionals) el que ha obligat en alguns casos a utilitzar productes no suficientment purificats en l'etapa d'acoblament.

Per altra banda, és possible que la pròpia estructura del pèptid fosforamidit hagi influït negativament, possibilitant altres camins de reacció alternatius. Resulta sorprenent observar que la síntesi de nucleopèptids de seqüències diferents hagi pogut tenir resultats no tan sols diferents en el rendiment sinó també en el producte obtingut. Per exemple, s'ha obtingut el nucleopèptid H-Ser(p<sup>5</sup>T)-Gly-Leu-NH<sub>2</sub> seguint pràcticament el mateix procediment intentat per obtenir Ac-Ser(p<sup>5</sup>T)-Gly-Asp-NH<sub>2</sub>, la qual cosa en aquest darrer cas no ha estat possible. També, seguint pràcticament la mateixa metodologia, s'ha preparat Ac-Ser-Gly-Asp-NH-p<sup>5</sup>CATCAT, tot i que en aquest cas la unió de tipus N-acilfosforamidat és més estable. Cal no oblidar tampoc un altre fenòmen que s'observa en la síntesi de pèptids, com són les reaccions secundàries lligades a la seqüència d'aminoàcids<sup>183</sup>, i que tenen lloc per mecanismes intramoleculars. No és descartable que el propi producte **X** pugui tenir l'origen en una reacció d'aquest tipus que de moment es desconeix.

És previsible que una futura aplicació dels nucleopèptids comporti haver de sintetitzar seqüències més complexes, per exemple amb fragments més llargs en la part peptídica, i possiblement amb altres residus trifuncionals que necessiten de diferents grups protectors. La problemàtica de la insolubilitat dels pèptids protegits<sup>95,184,185</sup> no és inherent a un tipus especial de seqüència, i per tant és d'esperar que els problemes que s'han observat en el nostre cas no facin sinó augmentar quan s'abordin la síntesi d'altres nous productes.

En base a aquestes reflexions, la principal prioritat que s'ha contemplat en el nou esquema de síntesi ha estat precisament evitar l'ús de fragments peptídics com a intermedis. L'única possibilitat raonable i que pot permetre l'obtenció del nucleopèptid és un esquema lineal, en què la síntesi de la molècula híbrida es realitzi de forma seqüencial.

El proper Capítol es dedica a la discussió del que ha estat la segona part d'aquest treball i en la qual s'ha aplicat una estratègia de tipus lineal per a l'obtenció de diversos compostos nucleopeptídics.

**CAPÍTOL 2:**  
**SÍNTESI DE NUCLEÒTIDS EN FASE SÒLIDA**  
**MITJANÇANT UNA ESTRATÈGIA LINEAL**



## 1. Disseny de l'estratègia lineal de síntesi :

Els resultats obtinguts en els diferents intents de síntesi per mitjà de l'estratègia convergent han posat de manifest la inviabilitat de la metodologia utilitzada i la necessitat d'un replantejament en l'esquema de síntesi.

La metodologia en fase sòlida permet contemplar com a alternativa a l'estratègia convergent un esquema lineal o seqüencial de síntesi. Aquesta opció, que constitueix una via innovadora en l'obtenció dels derivats nucleopeptídics<sup>83</sup> (vegeu la Introducció), ja ha estat utilitzada en altres tipus de conjugats peptídico-oligonucleotídics que no compten però, amb les complicacions estructurals i les limitacions d'estabilitat dels productes que es volen sintetitzar en aquest treball.

El disseny de la nova estratègia s'ha de basar en la definició de dos aspectes :

a) Elecció de l'esquema global de síntesi, en el que s'ha de decidir l'ordre i nombre d'etapes a realitzar en l'obtenció del nucleopèptid.

b) Elecció de l'esquema de protecció. En aquest punt, i donades les especials característiques de labilitat dels nucleopèptids que es pretén sintetitzar, l'esquema haurà de ser elegit en base a poder realitzar les etapes de desprotecció i de desancoratge en condicions compatibles amb l'estabilitat dels productes.

### 1.1 Elecció de l'esquema global de síntesi :

L'estratègia lineal es basa en la construcció seqüencial del nucleopèptid. Per tant és important dissenyar un esquema en el que es compatibilitzin els mètodes de síntesi amb l'estabilitat de la part peptídica, de la part oligonucleotídica, i de la unió entre el pèptid i l'oligonucleòtid. El principal avantatge de l'estratègia convergent residia precisament en poder eludir aquest problema, efectuant la síntesi de les dues parts per separat i unint-les en una etapa final, prèvia als processos de desprotecció i d'alliberament de resina.

Depenent de quin sigui el fragment, el pèptid o l'oligonucleòtid, que primer es faci créixer sobre la resina, es contemplen dues alternatives en la síntesi seqüencial del nucleopèptid. No obstant, cal analitzar cada possibilitat tenint en compte les característiques d'estabilitat del producte que es vol sintetitzar. Com ja s'ha comentat, dues són les principals limitacions que cal considerar en la síntesi d'un nucleopèptid. Per un costat, els oligonucleòtids no poden ser tractats amb àcids forts, ja que produeixen la depurinació dels nucleòsids<sup>92</sup>. Per altra banda, els nucleopèptids en què participen els aminoàcids serina i treonina en la formació de l'enllaç entre el pèptid i l'oligonucleòtid són làbils a les bases<sup>5,93,94</sup>.

- Si s'analitza una ruta en què es realitza en primer lloc la síntesi de l'oligonucleòtid es preveuen dues principals limitacions :

El pèptid només pot créixer a partir de l'aminoàcid C-terminal, a no ser que s'incorpori l'aminoàcid d'unió formant part d'un fragment peptídic. A més, per tal de poder formar l'enllaç fosfat amb l'oligonucleòtid cal ancorar aquest primer fragment peptídic convenientment funcionalitzat com a derivat fosfítilat. Si es recorda, aquesta és la mateixa problemàtica que es plantejava a l'estratègia convergent, i que, en no haver pogut ser convenientment resolta, ha motivat el canvi d'estratègia.

Els tractaments necessaris per dur a terme el perllongament del pèptid, per mitjà de qualsevol dels dos mètodes habituals de síntesi de pèptids, poden provocar els problemes d'estabilitat en el nucleopèptid que s'han mencionat més amunt. Si s'utilitzen Boc-aminoàcids, els tractaments àcids d'eliminació del grup protector temporal poden provocar la depurinació dels nucleòsids. Si es decideix treballar amb Fmoc-aminoàcids, els tractaments bàsics que es duen a terme per eliminar el grup protector temporal poden provocar el trencament de l'enllaç entre el pèptid i l'oligonucleòtid en els nucleopèptids làbils a les bases, i l'eliminació d'alguns dels grups protectors de l'oligonucleòtid. Per tant, de plantejar-se aquest esquema de síntesi, s'hauria de modificar gran part de l'esquema de protecció tant en el pèptid com en l'oligonucleòtid, el que sens dubte ha de repercutir en la senzillesa de l'estratègia.

- L'altra possible ruta, en què el pèptid es construeix en primer lloc, resulta en canvi menys problemàtica :

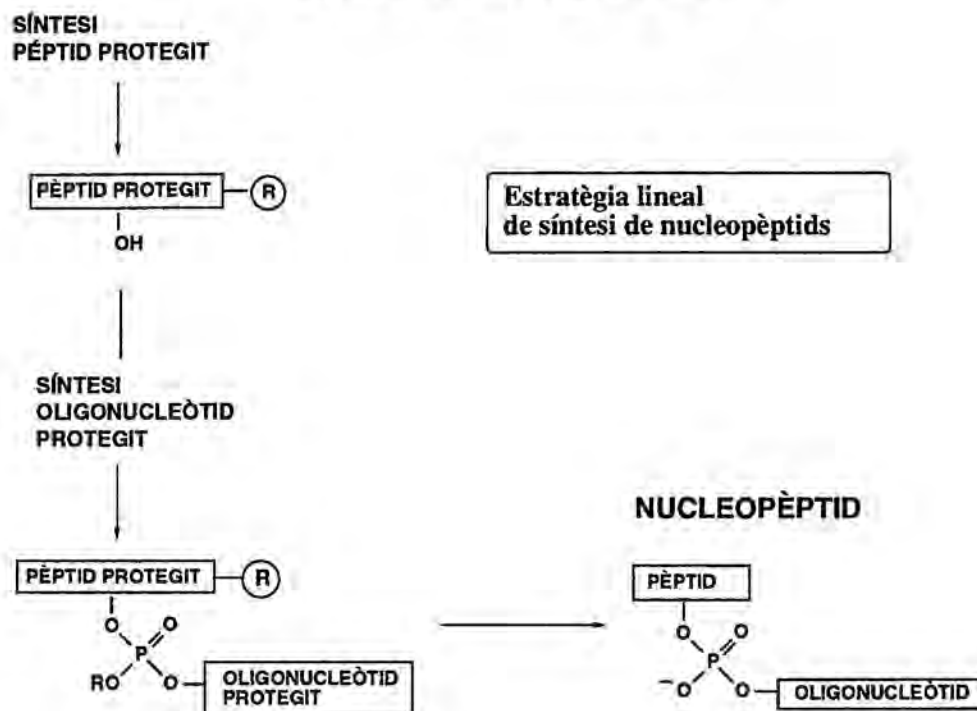
La síntesi de l'oligonucleòtid es realitza sobre el pèptid, el qual pot haver estat sintetitzat per qualsevol dels dos mètodes habituals de síntesi. A més, els mètodes per fer créixer l'oligonucleòtid són compatibles amb la presència d'una cadena peptídica convenientment protegida, i amb la formació d'un enllaç làbil a les bases entre el primer aminoàcid i l'oligonucleòtid. Només cal preveure certs problemes amb la presència d'aminoàcids oxidables en la seqüència del pèptid, si s'utilitza el mètode del fosfit triester per sintetitzar l'oligonucleòtid, ja que es realitza una etapa d'oxidació en cada cicle.

Donat que no es presenten especials problemes de compatibilitat entre les dues parts, es poden emprar mètodes de síntesi habituals, el que ha de facilitar el disseny de l'esquema de protecció.

D'aquestes consideracions es desprèn que la forma més convenient de realitzar la síntesi del nucleopèptid és dur a terme el perllongament de l'oligonucleòtid sobre el pèptid prèviament construït sobre la resina. El grup hidroxil de l'aminoàcid d'unió, únic grup que no haurà d'estar protegit en el pèptid, servirà de lloc d'ancoratge per al primer nucleòsid. Una vegada construït el nucleopèptid protegit sobre la resina, unes condicions adequades de desprotecció i alliberament haurien de permetre obtenir el producte desitjat.

A la següent figura es mostra l'esquema d'obtenció d'un nucleopèptid mitjançant una estratègia lineal de síntesi :

*Figura 2.1 : Esquema de síntesi d'un nucleopèptid en fase sòlida mitjançant una estratègia de tipus lineal*



## 1.2 Elecció de l'esquema de protecció :

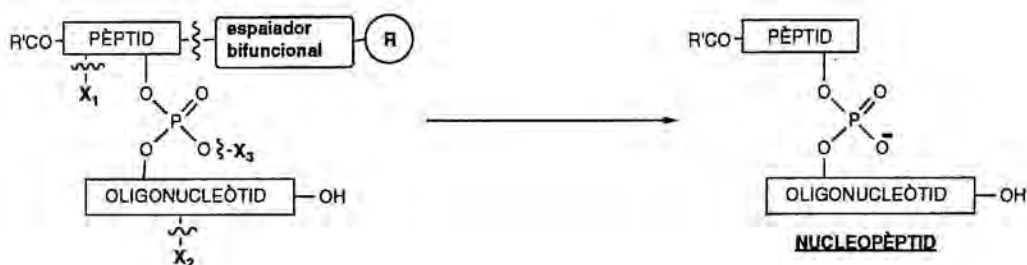
Un dels objectius inicials que han estat definits al començament d'aquest treball ha estat la simplificació de l'esquema de síntesi de nucleopèptids (Cap.1, apartat 1). Per això ha estat d'especial interès dissenyar esquemes de síntesi en què els corresponents intermedis, els derivats d'aminoàcids i els de nucleòsids, formessin part dels esquemes habituals de síntesi de pèptids i d'oligonucleòtids, i que per tant poguessin ser comercialment assequibles.

Per tant, i tenint en compte les mateixes consideracions que en l'estratègia convergent (Cap.1, apartat 1.2), s'ha decidit elaborar un esquema de protecció en què els grups protectors permanents siguin làbils a les bases. Donat que es planteja sintetitzar nucleopèptids amb una possible labilitat a les bases, caldrà que els tractaments que han de conduir a la desprotecció i alliberament del nucleopèptid de la resina siguin compatibles amb l'estabilitat de la unió entre el pèptid i l'oligonucleòtid. Per això, es pot participar de les mateixes conclusions derivades de les proves preliminars encaminades al disseny de l'estratègia convergent, en quan a l'elecció dels grups protectors i tractaments de desprotecció. Es fa necessari en canvi, avaluar un nou tipus d'unió a la

resina, ja que en aquest cas és el pèptid la part que hi està directament unida. A més, donat que s'ha considerat convenient aconseguir l'alliberament del nucleopèptid de la resina en la mateixa etapa d'eliminació de les resta de grups protectors permanents, haurà de ser una unió làbil a les bases, però estable als mètodes de síntesi del pèptid i l'oligonucleòtid.

El següent esquema resumeix a forma d'introducció l'elecció realitzada en cadascun dels punts que configuren l'esquema de protecció de l'estratègia lineal de síntesi, i que es discuteixen a continuació :

*Figura 2.2: Esquema de protecció emprat en la síntesi de nucleopèptids mitjançant una estratègia de tipus lineal*



PÈPTID :	Grup protector temporal α-amino :	Boc
	Grup protector permanent cadenes laterals (X <sub>1</sub> ) :	Fm / Fmoc
OLIGONUCLEÒTID :	Grup protector permanent amino exocíclic nucleobase (X <sub>2</sub> ) :	C: iBu iBu A: Bz Dmf
	Grup protector permanent enllaç fosfat (X <sub>3</sub> ) :	CNE
	Grup protector temporal hidroxil :	DMT
UNIO DEL NUCLEOPÈPTID A LA RESINA		Espaiador bifuncional 2-(2-nitrofenil)etil (NPE)
MATRIU SÒLIDA		poliestirè

**a) Elecció de la matriu sòlida:**

Donat que es pretén realitzar una construcció seqüencial del nucleopèptid (Fig. 2.1), la resina ha de garantir una plena compatibilitat amb els mètodes sintètics del pèptid i de l'oligonucleòtid.

Aquesta consideració ha portat a elegir el copolímer de poliestirè-1%-divinilbenzè com a resina, que al llarg del treball ha estat utilitzada tant per a l'obtenció de pèptids com d'oligonucleòtids. S'ha decidit descartar la utilització de les boles de vidre, ja que dona pitjors resultats en la síntesi de pèptids<sup>186</sup>.

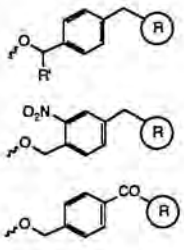
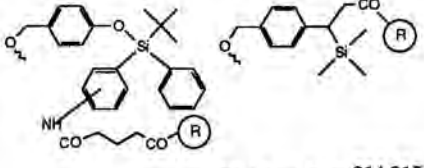
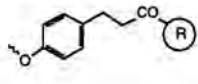
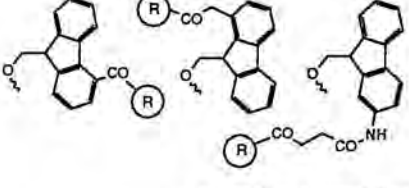
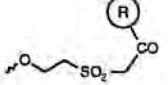
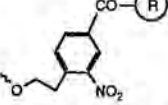
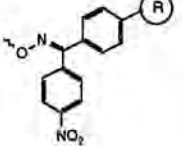
Una altra possibilitat hauria estat emprar una resina de poliestirè funcionalitzada amb polietilenglicol (resina PEG-PS), amb la qual també s'han descrit síntesis de pèptids<sup>187</sup> i d'oligonucleòtids<sup>188</sup>. Aquesta ha estat l'opció escollida per dur a terme recentment, la síntesi d'un conjugat peptídico-oligonucleotídic<sup>87</sup>. No obstant, els excel·lents resultats obtinguts amb el copolímer d'estirè i divinilbenzè l'aplicació de l'estratègia lineal no han fet necessari contemplar la utilització de resines alternatives.

**b) Elecció del tipus d'unió a la resina :**

La síntesi seqüencial del nucleopèptid comporta, segons l'esquema dissenyat (Fig. 2.1), la construcció de la part peptídica en primer lloc, que per tant estarà directament unida a la resina. L'elecció del tipus d'unió del nucleopèptid a la resina es pot doncs intentar resoldre tenint com a referència els tipus d'unions a la resina làbils a les bases que han estat experimentats en l'obtenció de pèptids.

L'alliberament dels pèptids de la resina es realitza habitualment amb àcids forts, com l'HF líquid o el TFA concentrat, ja que el tipus d'enllaç al suport és de tipus ester benzílic o benzhidrilamida. Les condicions bàsiques de desancoratge s'empren fonamentalment per a l'obtenció de pèptids protegits<sup>95</sup> amb grups làbils als àcids. Els tipus d'unions i resines que han estat experimentats, resumits a la Taula 2.1, es poden classificar en diferents grups :

Taula 2.1 : Unions pèptid-resina làbils a tractaments bàsics

<p>1. Unions ester benzílic</p>  <p>NaOH en ROH/dioxà<sup>189,190,191</sup>          Bu<sub>4</sub>NOH en MeOH/dioxà<sup>192</sup>          Et<sub>3</sub>N, NMM<sup>193</sup> o DIEA, ROH<sup>194</sup>          (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OH en DMF<sup>195</sup>          KCN en ROH<sup>196,194</sup>          N<sub>2</sub>H<sub>4</sub> en DMF<sup>197,198</sup>          NH<sub>3</sub> en MeOH<sup>199,200,201</sup>          NH<sub>3</sub> en THF, vapors<sup>202</sup>          RNH<sub>2</sub> o R<sub>2</sub>NH en DCM<sup>194</sup>          K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/Bu<sub>4</sub>NHSO<sub>4</sub> en THF<sup>203</sup>          KCN en 18-c-6<sup>190</sup>          tiofenòxid en DMF<sup>190</sup>          TBAF en DMF<sup>110</sup> o ACN<sup>194</sup></p>	<p>4. Unions silil</p>  <p>TBAF en DMF<sup>214,215</sup></p>
<p>2. Unions ester fenílic</p>  <p>NaOH en MeOH<sup>204,205</sup>          N<sub>2</sub>H<sub>4</sub> en MeOH<sup>204</sup>          NH<sub>3</sub> en MeOH<sup>206,204,205</sup>          H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/NaOH en MeOH<sup>207</sup>          (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OH DMF<sup>208,205</sup></p>	<p>5. Unions làbils per β-eliminació</p>  <p>piperidina o morfolina en DCM/DMF<sup>216,217,218</sup></p>  <p>NaOH en dioxà<sup>219,220,221</sup>          TMG en piridina<sup>221</sup></p>  <p>piperidina en DMF<sup>222</sup>          DBU en dioxà<sup>222</sup>          NH<sub>3</sub> aq conc<sup>87</sup></p>
<p>3. Unions ester d'oxima</p>  <p>N<sub>2</sub>H<sub>4</sub> en CHCl<sub>3</sub> /MeOH<sup>209</sup>          Hidroxipiperidina DCM<sup>210</sup>          H-Aa-OR en AcOH/DCM<sup>211</sup>          H-Aa-O<sup>-</sup>Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup> en DMF<sup>212</sup>          RNH<sub>2</sub> en DCM<sup>213</sup></p>	

• Resines en les que l'enllaç amb el pèptid és de tipus ester benzílic (grup 1) o fenílic (grup 2) : les condicions emprades per a l'alliberament del pèptid inclouen normalment tractaments de saponificació, transesterificació o amb reactius nucleòfils diversos com ara hidrazina, solucions amoniacals, KCN, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> o TBAF. Es caracteritzen per ser tractaments normalment llargs, de 15 a 24 h (a excepció dels tractaments amb TBAF), que produeixen desancoratge amb rendiments moderats.

• Resines en què s'estableix un enllaç de tipus ester d'oxima amb el pèptid (grup 3) : l'alliberament del pèptid es produeix per tractament amb reactius nucleòfils diversos, fins i tot amb

aminoàcids, el que comporta l'acoblament d'un aminoàcid en l'extrem C-terminal del pèptid alliberat.

- Resines en què la unió del pèptid s'estableix a través d'espaiadors bifuncionals (molècules la funció de les quals es servir d'enllaç entre l'oligòmer i el suport sòlid<sup>223</sup>) basats en grups silil (grup 4) : han estat específicament dissenyats per ser làbils als tractaments de desancoratge amb l'ió fluorur. No són compatibles amb els mètodes de síntesi que empen grups protectors del grup  $\alpha$ -amino làbils als àcids.

- Resines en què s'utilitzen espaiadors bifuncionals que formen enllaços tipus ester, làbils en condicions bàsiques per un mecanisme de  $\beta$ -eliminació (grup 5) : Els exemples descrits es basen en estructures de tipus fluorè, o en grups etil amb substituents electronegatius.

Davant la diversitat d'opcions que es presenten, és difícil triar un tipus particular d'unió que per les seves característiques pogués ser el més idoni. La major part dels exemples són compatibles amb els mètodes de síntesi a utilitzar, a excepció de les unions silil que són làbils als àcids, i les condicions de trencament de la unió entre el pèptid i la resina que han estat descrites no coincideixen amb els tractaments suaus que són necessaris en la síntesi dels nucleopèptids.

S'ha decidit doncs optar pels espaiadors bifuncionals disponibles al nostre laboratori, que han permès disposar fàcilment de les respectives resines, per tal de poder avaluar prèviament les seves característiques de labilitat.

Així, s'han escollit la unió 2-(2-nitrofenil)etil (NPE) i la unió 2-nitrobenzil (Nbb).

L'espaiador bifuncional NPE havia estat utilitzat en una fase anterior a aquest projecte per a l'obtenció d'oligonucleòtids<sup>104</sup>. Donada la seva estructura de grup feniletíl amb substituents electronegatius és làbil als tractaments bàsics mitjançant un mecanisme de  $\beta$ -eliminació. Recentment ha estat utilitzat per l'obtenció de pèptids lliures<sup>222</sup> o protegits<sup>185</sup>, alliberats de la resina per tractament amb piperidina 20 % en DMF o DBU 0.1 M en dioxà.

Com ja s'ha dit, també s'ha cregut útil avaluar la unió 2-nitrobenzil (Nbb). L'estructura d'ester benzílic amb substituents electronegatius facilita el mecanisme de trencament per saponificació o transesterificació en condicions suaus. És un tipus d'unió molt versàtil que ha estat emprada fonamentalment per a l'obtenció de pèptids protegits, alliberats de la resina per fotòlisi<sup>224</sup>. A més, és compatible amb tots els mètodes de síntesi de pèptids, tant pel que utilitza  $N^{\alpha}$ -Boc-<sup>225</sup>, com  $N^{\alpha}$ -Fmoc-<sup>226</sup> o fins i tot  $N^{\alpha}$ -ditiasuccinoil-aminoàcids<sup>227</sup>. Les condicions d'alliberament per tractaments bàsics ha permès l'obtenció de pèptids amb diferents funcions ester i amida C-terminal<sup>194</sup>.

Per seleccionar un dels dos tipus d'unió s'han dut a terme proves de labilitat a diferents reactius bàsics, considerats compatibles amb l'estabilitat del nucleopèptid, sobre les resines Boc-Gly-R-Leu-NHCH<sub>2</sub>-PS (R : NPE **52a**, Nbb **52b**; Cap.3, apartat 1.5). Els resultats mostren que totes dues unions presenten característiques adequades de labilitat. De totes formes, a més de les propietats de labilitat de cada unió, s'ha decidit tenir en compte també el mecanisme de trencament de l'enllaç amb el pèptid. Per la resina Nbb, l'única possibilitat d'escissió de l'enllaç ester és per mitjà de l'atac nucleòfil sobre el grup carbonil. S'ha cregut que aquesta circumstància podria ser l'origen de diferents productes amb diferent funcionalitat en l'extrem C-terminal, com a conseqüència de la competència del nucleòfil corresponent (MeO<sup>-</sup>, NH<sub>3</sub> o F<sup>-</sup>) i l'aigua present en el medi. En canvi, per a la unió NPE, el mecanisme més probable d'escissió de l'enllaç ester és el de β-eliminació. Aquest ha estat considerat un punt important de cara a afavorir la homogeneïtat del producte alliberat, ja que independentment de la base utilitzada s'alliberaria el producte amb un grup carboxilat C-terminal (grup sortint en el procés de β-eliminació). Per tant, s'ha escollit la unió NPE per formar part de l'esquema lineal de síntesi.

**c) Elecció del grup protector temporal del grup α-amino i dels grups protectors permanents de les cadenes laterals del pèptid :**

- El grup protector temporal del grup α-amino ha quedat pràcticament definit quan s'ha decidit recórrer a un esquema de protecció permanent làbil a les bases. La síntesi del pèptid s'ha pensat doncs realitzar-la amb l'estratègia Boc (Mater. Mèt. Gen., apartat III) que implica tractaments àcids per a l'eliminació del grup protector temporal.

- Com a grups protectors permanents de les cadenes laterals làbils a les bases, s'ha decidit utilitzar els grups 9-fluorenilmetil o 9-fluorenilmetoxicarbonil, que havien estat escollits també en l'esquema convergent (Cap.1, apartat 1.2.c). Degut a que en cap moment s'ha de contemplar l'aïllament d'intermedis protegits, no s'ha d'esperar cap problema similar als observats per l'ús d'aquest tipus de grup protector en l'estratègia convergent.

- A part, s'ha pensat bloquejar l'extrem N-terminal de forma permanent amb un grup amida.

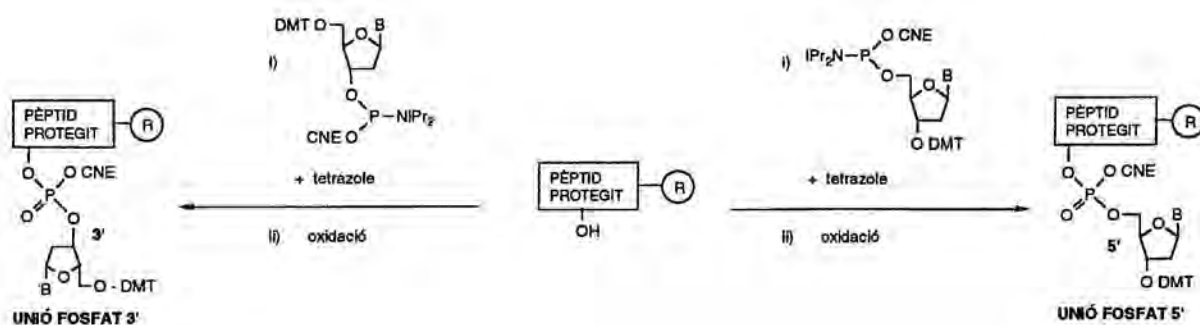
**d) Elecció del mètode de síntesi i dels grups protectors permanents de l'oligonucleòtid :**

- S'ha pensat realitzar la construcció de l'oligonucleòtid sobre la peptidil-resina mitjançant la metodologia del fosfit triester (que emprava derivats fosforamidit), adaptada a l'ús de poliestirè com a suport de síntesi, que s'ha utilitzat en la síntesi d'alguns dels oligonucleòtids d'aquest treball (Cap.1, apartat 2.2).



El tipus d'unió entre el pèptid i el primer nucleòsid de la seqüència depèn de quin sigui l'isòmer de nucleòsid fosforamidit utilitzat. Si es fan servir els isòmers 3', que són els normalment utilitzats en la síntesi d'oligonucleòtids, la unió es produirà amb la participació de l'alcohol secundari del primer nucleòsid. La reproducció d'una unió en què participi l'alcohol primari (Fig. 2.3), a similitud del que succeix en la major part de les nucleoproteïnes amb unions fosfat entre el pèptid i l'oligonucleòtid (vegeu la Introducció), obliga a emprar nucleòsids 5'-fosforamidit que, depenent dels grups protectors de les nucleobases, no són accessibles comercialment i cal sintetitzar.

**Figura 2.3 :** Formació de l'enllaç fosfat entre el pèptid i el primer nucleòsid, per mitjà de nucleòsids 3'- o 5'-fosforamidit.



- L'elecció dels grups protectors dels grups amino exocíclics de les bases vindrà determinada, com ja s'ha establert per a l'estratègia convergent, per les condicions de desprotecció i desancoratge, les quals han estat escollides per ser compatibles amb l'estabilitat del producte. En un principi, s'ha optat per emprar els mateixos grups protectors que en l'estratègia anterior (Cap.1, apartat 1.2.d), com són el grup isobutiril per a citosina i el grup benzoïl o dimetilaminometilè per a adenina, que segons les proves realitzades (Cap.3, apartat 1.2), són làbils a  $\text{NH}_3$  aquós concentrat en dioxà i a altres tractaments bàsics com  $\text{K}_2\text{CO}_3$  en MeOH/dioxà o LiOH en MeOH/dioxà/aigua (excepte per al grup dimetilaminometilè, que és estable a aquests dos darrers tractaments). S'ha desestimat l'ús del grup protector 9-fluorenilmetoxicarbonil, donat que a part de no ser possible disposar comercialment dels corresponents derivats fosforamidit, quan s'ha utilitzat en els primers intents de l'estratègia convergent (Cap.1, apartat 3.2.a) no ha conduït a resultats satisfactoris.

- Per a les altres funcions que resten, s'ha decidit mantenir els grups protectors usuals en la síntesi d'oligonucleòtids, com són el grup protector temporal dimetoxitritil pels grups hidroxil de l'anell de desoxiribosa, làbil als àcids, i el grup permanent 2-cianoetil per l'enllaç fosfat, que és làbil a qualsevol de les condicions bàsiques avaluades (Cap.3, apartat 1.1).

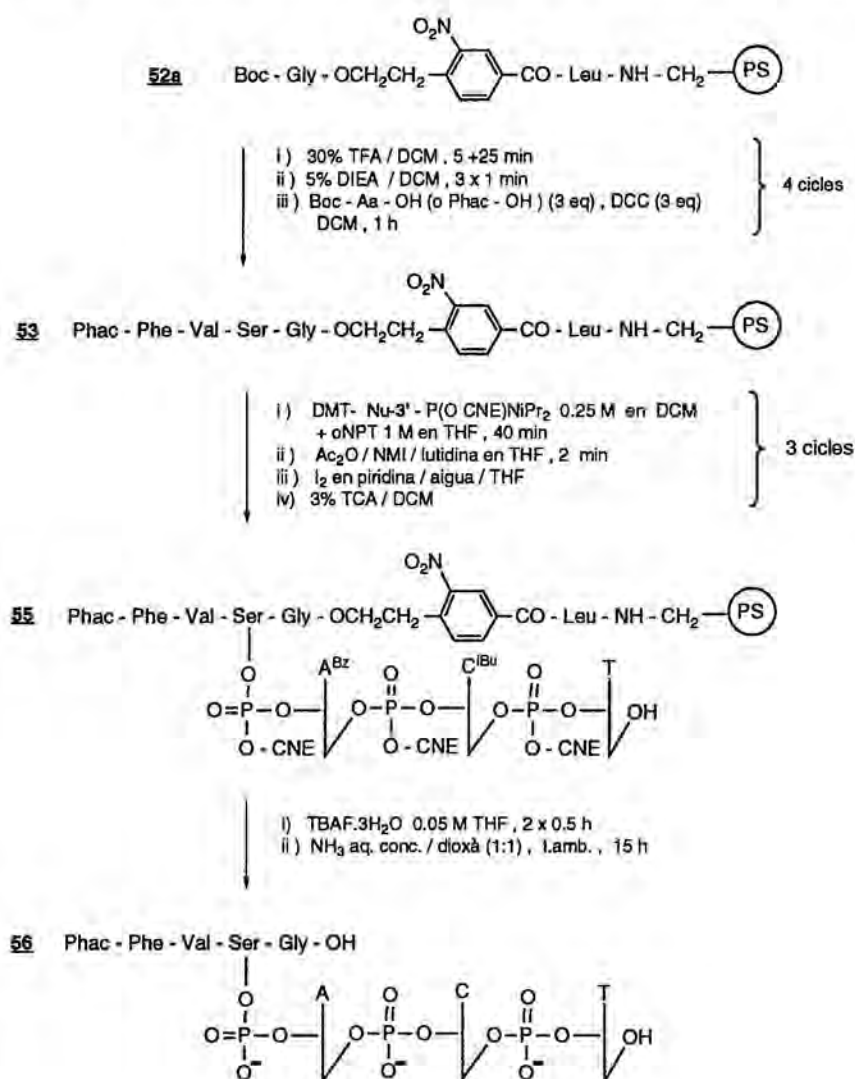
Amb aquest darrer aspecte queda finalitzat el disseny de l'estratègia lineal de síntesi. El proper pas consisteix lògicament en avaluar la seva utilitat per a l'obtenció de nucleopèptids.

## 2. Obtenció del nucleopèptid Phac-Phe-Val-Ser(p<sup>3'</sup>ACT)-Gly-OH (56)

Com a primer objectiu de síntesi per mitjà de l'estratègia lineal s'ha escollit la seqüència -Phe-Val-Ser(p ACT)-Gly-. Tot i no respondre a cap seqüència natural, s'han tingut en compte una sèrie de consideracions en la seva tria :

- S'ha elegit que el residu d'unió a l'oligonucleòtid fos serina, per tal de poder avaluar la compatibilitat de la metodologia amb l'estabilitat de la unió del pèptid i de l'oligonucleòtid.
- A excepció de l'aminoàcid d'unió no s'ha inclòs cap més aminoàcid trifuncional per a simplificar l'obtenció del pèptid.
- L'extrem N-terminal del pèptid s'ha bloquejat en forma d'amida i per això s'ha escollit el grup fenilacetil. Aquest grup junt amb el residu de fenilalanina han servit com a grups cromòfors per facilitar el seguiment cromatogràfic del pèptid. També s'ha pensat que els protons aromàtics dels grups fenil podien servir com a senyals diagnòstic en una possible caracterització per RMN.
- S'han inclòs els tres nucleòsids que havien intervingut en els intents de síntesi mitjançant l'estratègia convergent : timidina, desoxiadenosina i desoxicitidina.

El següent esquema resumeix a mode d'introducció el procés seguit per a l'obtenció del nucleopèptid Phac-Phe-Val-Ser(p ACT)-Gly-OH :

Figura 2.4 : Esquema de síntesi del nucleopèptid Phac-Phe-Val-Ser( $p^3$ ACT)-Gly-OH


## 2.1 Síntesi de la peptidil-resina Phac-Phe-Val-Ser-Gly-NPE-Leu-NHCH<sub>2</sub>-PS (**53**):

S'ha partit de la resina d'aminometilpoliestirè, al què s'ha incorporat prèviament l'aminoàcid leucina per tal que actués com a aminoàcid de referència. Això permet efectuar el càlcul dels rendiments de desancoratge del pèptid, i posteriorment del nucleopèptid, per anàlisi d'aminoàcids de la resina després del tractament. L'aminoàcid C-terminal s'ha ancorat a la resina per un procediment en dues etapes, que es descriu per a l'obtenció de les resines Boc-Gly-R-Leu-NHCH<sub>2</sub>-PS (R: NPE, Nbb), utilitzades en l'avaluació de la labilitat de les unions NPE i Nbb a diferents tractaments bàsics (Cap.3, apartat 1.5). La funcionalització en l'aminoàcid glicina ha resultat ser 0.18 mmol Gly/g resina, amb una relació Gly/Leu de 0.62.

Una vegada acetilats els grups amino sobre resina que no haguessin reaccionat, el subseqüent perllongament del pèptid s'ha efectuat mitjançant la metodologia que emprava Boc-aminoàcids. Per a la incorporació del residu serina s'ha fet servir el derivat Boc-Ser-OH en el que el grup hidroxil de la cadena lateral no es troba protegit, per permetre la construcció directa de l'oligonucleòtid en la següent etapa de l'estratègia. Una vegada ha estat incorporada fenilalanina, l'extrem amino s'ha bloquejat per reacció amb acid fenilacètic en presència de DCC. La correcta unió dels aminoàcids s'ha confirmat per anàlisi d'aminoàcids de la resina **53**, la composició de la qual mostra les proporcions esperades (Phe/Val/Ser/Gly 0.96 : 1.00 : 0.72 : 1.04 amb una relació pèptid/Leu de 0.61.). A part, s'ha pogut comprovar l'homogeneïtat del pèptid, per alliberament de la resina (Cap.3, apartat 1.5.c) i posterior anàlisi per HPLC del producte.

## 2.2 Obtenció de la nucleopeptidil-resina (**55**) :

La construcció de l'oligonucleòtid sobre la peptidil-resina **53** s'ha realitzat pel mateix procediment emprat en la síntesi d'altres oligonucleòtids sobre un suport de poliestirè.

S'han emprat els derivats 3'-fosforamidit dels nucleòsids 5'-DMT-T, 5'-DMT-dCiBu i 5'-DMT-dA<sup>Bz</sup>, tots ells d'origen comercial. L'elecció dels grups protectors de citosina i adenina s'ha efectuat de manera que el ventall de possibles tractaments d'eliminació dels protectors fos el més ampli possible segons les proves de labilitat realitzades (Cap.3, apartat 1.2), en vistes a poder avaluar diferents alternatives en les etapes de desancoratge i desprotecció.

La síntesi, realitzada amb l'ajut del sintetitzador automàtic, s'ha efectuat a una escala de treball de 18 µmol (100 mg de resina) en vistes a disposar de suficient producte per a realitzar diferents proves, com ara l'avaluació de les condicions de desprotecció i d'alliberament, o de caracterització del producte. El cicle de síntesi és essencialment el mateix que el desenvolupat per a la síntesi d'oligonucleòtids sobre un suport de poliestirè a gran escala (>10 µmol), allargant els temps d'acoblament fins a 40 min, i emprant *o*-nitrofeniltetrazole com a catalitzador. Els rendiments obtinguts en l'acoblament dels nucleòsid fosforamidit es poden considerar satisfactoris : 92% per a desoxicitidina, 99% per a timidina (no s'ha quantificat la incorporació del primer nucleòsid).

## 2.3 Desprotecció i alliberament del nucleopèptid de la resina **55**:

Per dur a terme els diferents experiments que han de permetre trobar les millors condicions finals de desprotecció i desancoratge s'han tractat alíquotes de la nucleopeptidil resina **55** (1.2-1.7 µmol) amb diferents reactius bàsics i s'han estudiat diferents aspectes :

- El rendiment d'alliberament, que s'ha determinat per mitjà l'anàlisi d'aminoàcids de la resina que ha estat tractada.

- La puresa del cru alliberat, que s'ha analitzat per HPLC en fase reversa.
- S'ha aïllat el producte majoritari del cru, per cromatografia de bescanvi aniònic (vegeu el proper apartat), i se n'ha analitzat el contingut d'aminoàcids. El nucleopèptid ha de mostrar una composició d'aminoàcids correcta, mentre que el subproducte més probable, l'oligonucleòtid 3'-fosfat TCA<sup>3</sup>p, que es genera per trencament de la unió entre el pèptid i l'oligonucleòtid, lògicament no en presenta. S'ha comprovat també que tots dos productes es poden distingir fàcilment pel seu comportament cromatogràfic per HPLC en fase reversa.

A continuació es comenten les conclusions a les quals s'ha arribat en els diferents intents, i que queden resumides en la següent taula :

*Taula 2.2 : Intents d'obtenció del nucleopèptid Phac-Phe-Val-Ser(p<sup>3</sup>ACT)-Gly-OH :*

Tractament <sup>*a</sup>	t (h)	Producte majoritari <sup>*b</sup>
1. K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> <sup>*c</sup>	6	TCA <sup>3</sup> p (D)
2. i) TBAF <sup>*d</sup> ii) K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> <sup>*c</sup>	0.5 5 min 1 2 4 8	A A / B / C / D <sup>*f</sup> " " " "
3. NH <sub>3</sub> aq <sup>*e</sup> 55°C	15	TCA <sup>3</sup> p (D)
4. i) TBAF <sup>*d</sup> ii) NH <sub>3</sub> aq <sup>*e</sup> t. amb.	0.5 15	nucleopèptid <b>56</b>

Notes : <sup>\*a</sup> intents de desancoratge sobre alíquotes de nucleopeptidil-resina; <sup>\*b</sup> determinats per anàlisi per HPLC del cru alliberat; <sup>\*c</sup> K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.05 M en MeOH/dioxà 1:1; <sup>\*d</sup> TBAF.3H<sub>2</sub>O 0.05 M en THF anh; <sup>\*e</sup> NH<sub>3</sub> aq conc/dioxà (1:1); <sup>\*f</sup> C: nucleopèptid **56**, D: TCA<sup>3</sup>p (vegeu text)

- A l'experiment 1, en què la resina ha estat tractada amb K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.05 M en MeOH/dioxà (1:1), s'observa un únic producte majoritari (t<sub>R</sub> 8.2 min, Fig. 2.5) per anàlisi per HPLC en fase reversa. Una vegada purificat, l'anàlisi d'aminoàcids no mostra presència d'aminoàcids, pel que es conclou que es tracta del producte de trencament del nucleopèptid, l'oligonucleòtid TCA<sup>3</sup>p. Igual resultat s'ha obtingut a l'experiment 3 en què la resina ha estat tractada amb NH<sub>3</sub> aquós concentrat en dioxà (1:1) a 55°C.

- A l'experiment 2 s'ha assajat un tractament en dues etapes. La primera d'elles, realitzada per tractament amb TBAF 0.05 M en THF anhidre, provoca en 0.5 h el total trencament de la unió a la resina (Cap.3, apartat 1.5) i una desprotecció parcial del producte. La segona etapa, que ha de

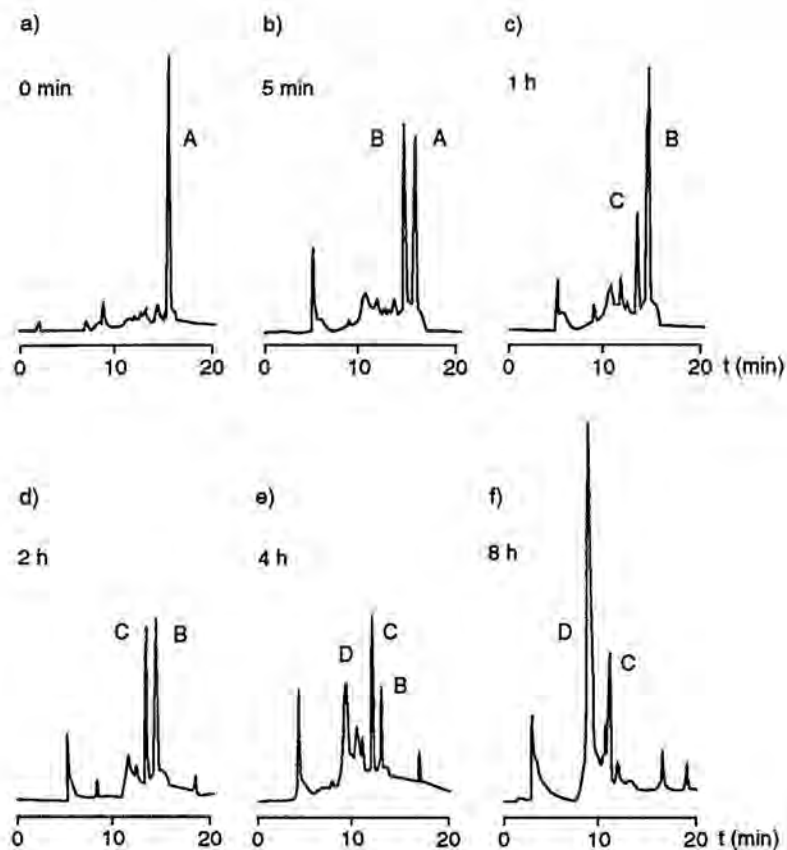
conduir a l'eliminació de la resta de grups protectors, s'ha realitzat amb  $K_2CO_3$  en MeOH/dioxà en les mateixes condicions que a l'experiment 1.

El producte del primer tractament amb fluorur, el producte **A** ( $t_R$  13.0 min, Fig. 2.5.a), ha estat aïllat i s'ha pogut comprovar que presenta una correcta anàlisi d'aminoàcids, el que fa pensar que es pot tractar del nucleopèptid parcialment desprotegit, en el que resten els grups protectors de les nucleobases, isobutiril per a citosina i benzoïl per a adenina. El tractament amb  $K_2CO_3$  en MeOH/dioxà provoca l'evolució del producte intermedi **A** per a temps llargs (8 h) cap al mateix producte que pels assajos 1 i 3, és a dir  $TCA^{3'p}$ , indicat com a producte **D** en els cromatogrames (Fig. 2.5). De totes formes, fent un seguiment del procés s'ha pogut comprovar que té lloc a través de diferents intermedis. El producte inicial, **A**, desapareix ràpidament en ser tractat amb la dissolució de  $K_2CO_3$  en MeOH/dioxà. Als 5 min de tractament resta aproximadament un 50% del producte **A** i s'ha format un nou intermedi, el producte **B** (Fig. 2.5.b). Al cap de 1 h, l'anàlisi mostra la presència de dos productes, **B** i **C**, en una proporció 70:30, respectivament (Fig. 2.5.c). A les 2 h de tractament la proporció dels productes **B** i **C** és ja 60:40 (Fig. 2.5.d), pel que cal deduir que el producte **C** es genera a partir del producte **B**. A les 4 h de tractament, apareix un nou producte, el producte **D**, que és majoritari respecte als anteriors **B** i **C**, amb una proporció 55:30:15 respectivament (Fig. 2.5.e), i que es correspon pel seu  $t_R$  amb  $TCA^{3'p}$ . Després de 8 h de reacció, **D** és pràcticament l'únic producte, restant només una petita proporció del producte **C** (Fig. 2.5.f). Aquesta darrera observació ha fet pensar que el producte **D**, que és  $TCA^{3'p}$ , es podria haver generat a partir del producte **C**, i que per tant aquest producte (**C**) podria ser el nucleopèptid. Els producte intermedi **B** és probablement el nucleopèptid en què resta el grup protector benzoïl d'adenina, ja que la seva eliminació amb  $K_2CO_3$  en MeOH/dioxà és més lenta que la del grup isobutiril de citosina (Cap.3, apartat 1.2).

S'ha aïllat el producte **C** del cru de reacció a les 4 h de tractament, (Fig. 2.5.e; on és aproximadament un 30% del producte total per absorció a l'UV), i se n'ha analitzat el contingut d'aminoàcids. L'anàlisi mostra una correcta proporció dels aminoàcids, pel que cal concloure que el producte **C** és el nucleopèptid desitjat.

Aquest resultat posa de manifest que el nucleopèptid **56** és làbil a  $K_2CO_3$  en MeOH/dioxà, fet que s'ha pogut confirmar en una prova d'estabilitat posterior. S'ha de recordar que en aquestes mateixes condicions, els models Boc-Ser(p T-DMT)-NHcHex, que s'han volgut fer servir per estimar l'estabilitat dels nucleopèptids als diferents tractaments bàsics, són perfectament estables (Cap.3, apartat 1.1). Aquestes dades han estat la primera prova de què l'estabilitat dels nucleopèptids depèn d'altres factors que la simple estructura de l'enllaç, fet que s'ha pogut confirmar amb diverses proves d'estabilitat realitzades posteriorment amb els diferents nucleopèptids sintetitzats al llarg del treball. La discussió i les conclusions que han pogut ser deduïdes d'aquestes proves són objecte d'un proper apartat d'aquest Capítol (apartat 4.1), i per tant seran comentades al seu moment.

**Figura 2.5 :** Seguiment del tractament de desprotecció amb  $K_2CO_3$  en MeOH/dioxà del producte alliberat de la resina (2ona etapa, experiment 2 de la Taula 2.2).



Sistema d'anàlisi FR-B, gradient lineal 0-50% B en 20 min, 260 nm

• El darrer intent d'obtenció del nucleopèptid, concretat a l'experiment 4, s'ha basat en els resultats dels assajos anteriors i de les proves d'estabilitat realitzades amb el nucleopèptid aïllat (vegeu l'apartat 4.1 d'aquest Capítol). S'ha pogut comprovar que el nucleopèptid **56** és perfectament estable a una solució de  $NH_3$  aquós concentrat en dioxà a temperatura ambient. Aquesta observació ha estat aprofitada per dissenyar un nou procediment de desprotecció i desancoratge que sigui compatible amb l'estabilitat del nucleopèptid.

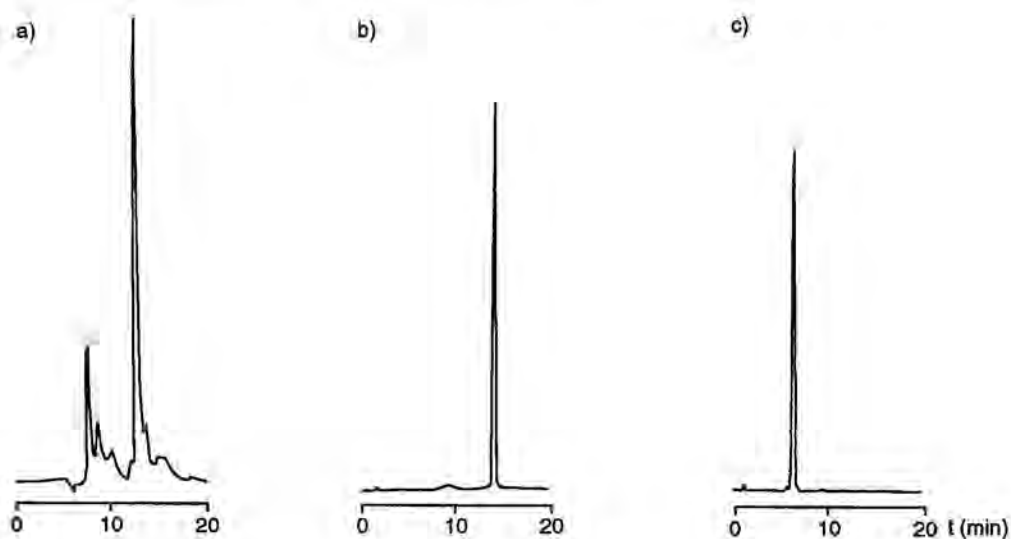
A similitud de l'experiment 2, s'ha dut a terme una primera etapa de desancoratge i parcial desprotecció del producte per tractament amb TBAF 0.05 M. A continuació, s'ha efectuat l'eliminació dels grups protectors de les nucleobases per mitjà d'un tractament amb  $NH_3$  aquós concentrat en dioxà 1:1 a temperatura ambient durant 15 h. Evaporada la dissolució amoniacal i una vegada redissolt el residu en aigua, l'anàlisi per HPLC en fase reversa del cru mostra el nucleopèptid com a producte majoritari (Fig. 2.6.a).

#### 2.4 Purificació del nucleopèptid Phac-Phe-Val-Ser(p<sup>3'</sup>ACT)-Gly-OH :

El producte s'ha pogut purificar i aïllar per cromatografia de bescanvi aniònic sobre una columna DEAE-Sephadex, eluint amb un gradient de concentració del tampó TEAB. L'anàlisi per HPLC en fase reversa (Fig. 2.6.b) i bescanvi aniònic (Fig. 2.6.c) mostren un excel·lent grau d'homogeneïtat del producte purificat.

El producte s'ha obtingut amb un rendiment global de síntesi, desprotecció i desancoratge, i purificació del 40% (24 OD<sub>260</sub> a partir de 3.2 μmol de peptidil-resina), que es pot considerar força satisfactori.

*Figura 2.6 : Obtenció del nucleopèptid Phac-Phe-Val-Ser(p<sup>3'</sup>ACT)-Gly-OH*



- Anàlisi per HPLC en fase reversa (sistema FR-B, gradient lineal 0-50%B en 20 min, 260 nm) :
  - a) cru de síntesi procedent de la desprotecció amb i) TBAF.3H<sub>2</sub>O en THF , ii) NH<sub>3</sub> aquós concentrat/ dioxà;
  - b) nucleopèptid purificat.
- Anàlisi per HPLC de bescanvi aniònic (sistema BA-B, gradient lineal, 0-100% B en 20 min, 260 nm) :
  - c) producte purificat



## 2.5 Caracterització del nucleopèptid Phac-Phe-Val-Ser(p<sup>3'</sup>ACT)-Gly-OH :

La caracterització ha inclòs les diferents proves que a continuació es resumeixen :

### a) Anàlisi d'aminoàcids :

S'observen els aminoàcids esperats amb una correcta proporció. L'aminoàcid serina presenta un valor lleugerament menor del teòric (0.92) ja que es degrada lleugerament en les condicions d'hidròlisi del pèptid, tot i haver-se realitzat en un tub tancat al buit i a 110°C durant 24 h.

### b) Digestió enzimàtica del producte i anàlisi de nucleòsids :

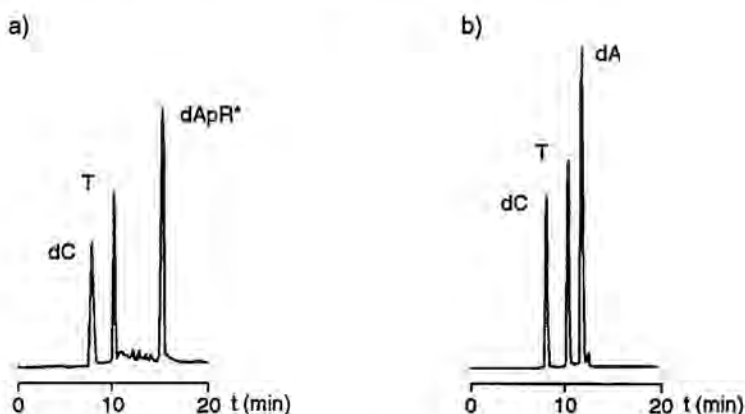
S'han dut a terme diferents experiments :

- La digestió amb fosfodiesterasa de verí de serp (SVPD, 3'-exonucleasa que degrada un oligonucleòtid generant p<sup>5'</sup>dN), i fosfatasa alcalina (AP, enzim que transforma dN<sup>3'</sup>p o p<sup>5'</sup>dN en dN), genera una barreja dels nucleòsids dC i T, i un altre nucleòsid no assignable (Fig. 2.7.a) que, per tractament de la barreja amb piperidina aquosa a 55°C es transforma en dA<sup>3'</sup>p. Això ha fet pensar que podria tractar-se del nucleòsid unit al pèptid, la unió dels quals no seria fragmentable per cap dels dos enzims, i en canvi es trencaria amb piperidina. Així, quan el nucleopèptid es tracta prèviament amb NaOH 1 M a 55°C durant 2 h, per produir la ruptura de l'enllaç entre el pèptid i l'oligonucleòtid, i el producte obtingut, un cop neutralitzat i liofilitzat, se sotmet a les mateixes condicions de digestió anteriors amb SVPD i AP, l'anàlisi només mostra la presència dels nucleòsids amb la proporció esperada (Fig. 2.7.b).

De totes formes, cal assenyalar que el resultat del primer experiment contrasta amb el comportament que caldria esperar d'un oligonucleòtid modificat a l'extrem 3', els quals es caracteritzen per ser resistents a l'acció de 3'-exonucleases com és SVPD<sup>228</sup>. En realitzar l'experiment de digestió enzimàtica en les mateixes condicions sense la presència de l'enzim AP, s'ha comprovat que el producte es degrada molt lentament (50% en 6 h). Per tant, la degradació del nucleopèptid en el primer experiment cal probablement atribuir-la a la presència d'endonucleases com a impureses de l'enzim AP que s'ha utilitzat, ja que com a tal no és capaç de produir la ruptura dels enllaços fosfat-diester internucleotídics.

• La digestió amb fosfodiesterasa de melsa (SpPD), que és una 5'-exonucleasa, produeix una barreja de nucleòsids i nucleòsids 3'-fosfat dC, dC<sup>3'</sup>p, T, T<sup>3'</sup>p, i el mateix nucleòsid no identificable del primer experiment i que se suposa que és el nucleòsid terminal unit al pèptid. En aquest cas caldria esperar que per acció de l'enzim es generessin els nucleòsids dC<sup>3'</sup>p, T<sup>3'</sup>p i el nucleòsid no identificable, pel que la presència de nucleòsids es deu probablement a que l'enzim es troba impurificat amb fosfatases.

*Figura 2.7 : Experiments de digestió enzimàtica sobre el nucleopèptid Phac-Phe-Val-Ser(p<sup>3'</sup>ACT)-Gly-OH*



Anàlisi per HPLC en fase reversa (sistema FR-C, gradient lineal 0-100% B en 20 min, 260 nm) :

- a) digestió enzimàtica amb els enzims SVPD i AP del nucleopèptid.
- b) digestió enzimàtica amb els mateixos enzims del nucleopèptid prèviament hidrolitzat amb NaOH 1 M, 55°C, 1 h.

### c) Espectres de RMN :

S'han enregistrat espectres de <sup>1</sup>H i <sup>31</sup>P de la sal sòdica del producte, dissolta en D<sub>2</sub>O.

• L'espectre de <sup>31</sup>P RMN, realitzat amb desacoblament de banda ampla sobre <sup>1</sup>H, mostra tres senyals (δ 0.9, 0.7, 0.5) que es poden assignar als tres enllaços fosfat de la molècula.

• L'espectre de <sup>1</sup>H RMN presenta senyals en la zona aromàtica que es poden considerar diagnòstics per un compost en què es troben units el pèptid i l'oligonucleòtid. Per un costat s'hi poden observar els senyals aromàtics característics dels protons dels anells de les nucleobases (H8 A, H2 A, H6 C, H6 T), i d'altra banda, els pertanyents als grups fenil del residu de Phe i del grup fenilacetil, tots ells amb les integracions correctes.

**d) Espectres de masses :**

Dues han estat les tècniques emprades :

- S'ha obtingut un espectre mitjançant la tècnica FAB i detecció negativa, i que mostra un senyal assignable a  $[M-H]^-$ .
- S'ha enregistrat un espectre per la tècnica d'electrospray, que permet observar un conjunt de senyals assignables a diferents formes ionitzades de càrrega múltiple del producte.

**3. Obtenció dels nucleopèptids regioisòmers Phac-Ser(p CATCAT)-Gly-Asp-OH (61a,b):**

Els resultats obtinguts en la síntesi de l'anterior nucleopèptid han impulsat a emprendre la síntesi d'un compost amb un major grau de complexitat. S'ha elegit novament la seqüència -Ser(p CATCAT)-Gly-Asp- corresponent a la zona d'unió de la nucleoproteïna d'Adenovirus 2<sup>17</sup>, i que ja s'havia intentat sintetitzar per mitjà de l'esquema convergent (Cap.1, apartat 3).

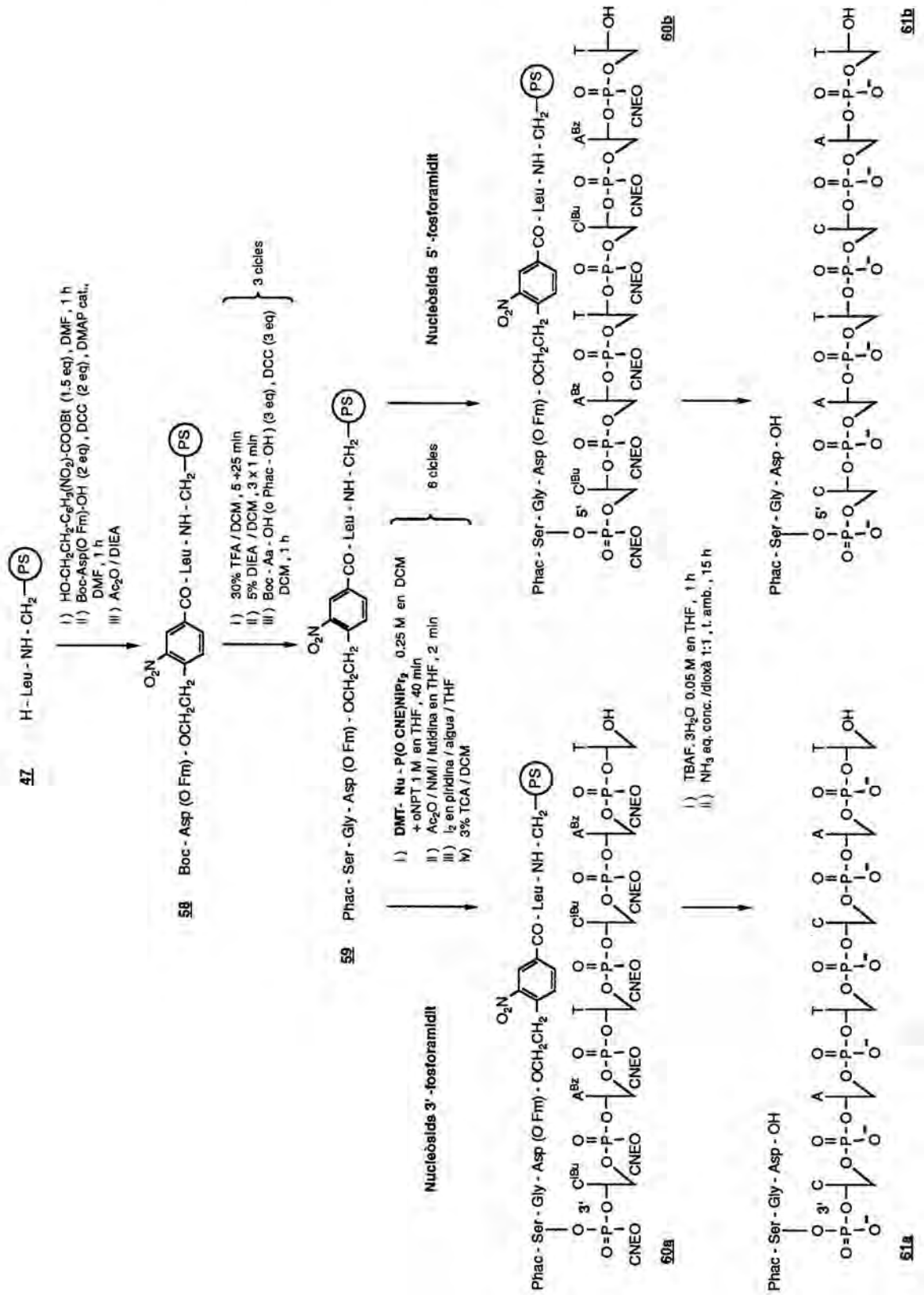
Tot i que s'ha pensat utilitzar el mateix esquema de síntesi lineal que ha permès l'obtenció de l'exemple precedent, ha estat necessari incloure un nou grup protector que no figurava en el cas precedent, degut a la presència d'un aminoàcid trifuncional en la seqüència del pèptid, l'àcid aspàrtic. Com a grup protector s'ha escollit el grup 9-fluorenilmetil.

L'estructura de la nucleoproteïna viral es caracteritza en què la unió fosfat del pèptid i l'oligonucleòtid es produeix entre el grup hidroxil del residu de serina i el grup hidroxil primari del nucleòsid (vegeu la Introducció). La reproducció d'aquest tipus d'enllaç per mitjà de l'esquema lineal comporta la necessitat d'emprar nucleòsids 5'-fosforamidit en l'etapa de construcció de l'oligonucleòtid (vegeu l'apartat 1.2 d'aquest Capítol). Aquests intermedis tot i que han estat emprats en alguna ocasió<sup>229</sup>, no són els habitualment utilitzats.

No obstant, també s'ha pensat efectuar la síntesi de la seqüència isomèrica en què la unió del pèptid i l'oligonucleòtid es produeix amb la participació de l'hidroxil secundari del nucleòsid. L'obtenció dels dos nucleopèptids regioisòmers permetria avaluar diferències en el comportament químic i enzimàtic que fins al moment no han estat estudiades.

L'esquema de síntesi que ha estat utilitzat en l'obtenció dels nucleopèptids regioisòmers Phac-Ser(p CATCAT)-Gly-Asp-OH es resumeix a la següent figura :

Figura 2.8 : Esquema de síntesi dels nucleopèptids regioisòmers Phac-Ser(*p*<sup>3'</sup>CATCAT)-Gly-Asp-OH i Phac-Ser(*p*<sup>5'</sup>CATCAT)-Gly-Asp-OH.



### 3.1 Síntesi de la peptidil-resina

#### Phac-Ser-Gly-Asp(OFm)-NPE-Leu-NHCH<sub>2</sub>-PS (59):

Sobre la resina H-Leu-NHCH<sub>2</sub>-PS (47), en què leucina actua d'aminoàcid de referència, s'ha dut a terme la incorporació de l'espaiador bifuncional NPE. Per això, s'ha preparat l'ester d'hidroxibenzotriazolil de l'àcid 4-(2-hidroxiètil)-3-nitrobenzoic, per reacció de l'àcid amb quantitats equimolars de DCC i HOBt. La barreja de reacció que conté el producte (que no s'aïlla) s'ha afegit sobre la resina i s'ha deixat reaccionar durant 1 h.

Havent comprovat que no quedaven grups amino sense reaccionar, s'ha ancorat el primer aminoàcid de la seqüència, l'àcid aspàrtic, com a derivat Boc-Asp(OFm)-OH (2 eq respecte els grups funcionals sobre la resina), en presència de DCC i catàlisi de DMAP, al llarg d'1 h. S'ha intentat evitar un gran excés d'aminoàcid i un temps de reacció llarg a fi i a efecte d'aconseguir una reducció de la funcionalització de la resina (inicialment de 0.30 mmol Leu/g) fins un valor més òptim per a la síntesi de l'oligonucleòtid. Una vegada acetilats els grups hidroxil que no haguessin reaccionat, la funcionalització de la resina 58 s'ha determinat per anàlisi d'aminoàcids, i ha resultat ser de 0.20 mmol Asp/g resina, amb una relació Asp/Leu de 0.70. Sobre aquesta resina (58) s'ha dut a terme el perllongament de la resta del pèptid, utilitzant la metodologia de síntesi que empra Boc-aminoàcids, de forma completament paral·lela a la utilitzada a l'anterior nucleopèptid.

La correcta incorporació dels aminoàcids s'ha confirmat per anàlisi d'aminoàcids de la resina 59, que també ha servit per determinar-ne la funcionalització. Els valors obtinguts són els següents : Ser / Gly / Asp 0.46\* : 1.01 : 0.97 amb una relació pèptid/Leu de 0.70 (\*el baix valor de serina s'ha d'atribuir a la parcial destrucció que sofreix durant la hidròlisi àcida realitzada abans de l'anàlisi).

### 3.2 Obtenció de les nucleopeptidil-resines (60a, isòmer 3' i 60b, isòmer 5') :

Arribats a aquest punt, i partint de l'experiència adquirida en l'obtenció del nucleopèptid anterior, en especial el que es refereix a les condicions de desprotecció i desancoratge, s'ha considerat convenient millorar l'esquema de protecció de les nucleobases, en vistes a augmentar la seva labilitat. S'ha escollit el grup protector dimetilaminometilè per a adenina (a l'exemple precedent s'ha utilitzat el grup benzoil) i s'ha mantingut el grup isobutiril per a citosina (Cap.1, apartat 1.2.d).

Aquest esquema de protecció ha permès disposar de derivats 3'-fosforamidit dels nucleòsids accessibles comercialment, que han estat utilitzats per a l'obtenció de l'isòmer 3' del nucleopèptid (nucleopeptidil-resina 60a). Els corresponents derivats 5'-fosforamidit dels nucleòsids, necessaris

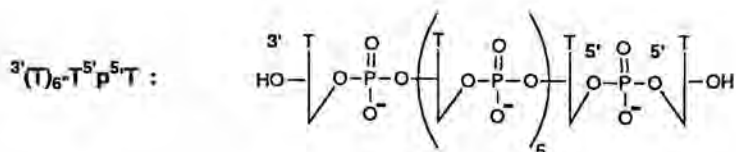
per a l'obtenció de l'altre nucleopèptid regioisòmer (nucleopeptidil-resina **60b**), han estat sintetitzats mitjançant els procediments que es descriuen en el Capítol 3 (apartat 3.2).

La síntesi de l'oligonucleòtid, tant per a l'obtenció d'un isòmer com de l'altre, s'ha basat en la mateixa metodologia (mètode del fosfit triester sobre un suport de poliestirè) que ha estat emprada per a l'obtenció de l'anterior nucleopèptid (vegeu l'apartat 2.2).

Les escales de treball per a l'obtenció de les dues nucleopeptidil-resines han estat però diferents, el que ha comportat petites variacions en quan a volums i temps de reacció. Per a la nucleopeptidil-resina **60a** (isòmer 3') s'ha treballat a una escala inicial de 15  $\mu\text{mol}$  (100 mg de peptidil-resina), mentre que per la nucleopeptidil-resina **60b** (isòmer 5') s'han realitzat dues síntesis amb una escala 2.3  $\mu\text{mol}$  (15 mg) cadascuna. En tots dos casos, l'etapa d'acoblament dels nucleòsids fosforamidit s'ha realitzat en presència d'*o*-nitrofeniltetrazole i s'han obtingut rendiments satisfactoris (92-97%).

Abans de procedir al perllongament de l'oligonucleòtid que ha de permetre obtenir el regioisòmer 5', s'ha dut a terme prèviament la síntesi de l'oligonucleòtid  $3'(\text{T})_6\text{-T}^5\text{P}^5\text{T}$ . Aquesta prova s'ha cregut necessària donat que habitualment en la síntesi d'oligonucleòtids s'utilitzen els isòmers 3'-fosforamidit per facilitar l'acoblament, que d'aquesta forma té lloc sobre un hidroxil primari, amb menor impediment estèric (vegeu Fig. 2.3 a l'apartat 1.2). Per tant, s'ha volgut comprovar que l'acoblament dels isòmers 5'-fosforamidit, que reaccionen amb un grup hidroxil secundari, s'efectua amb la mateixa eficàcia que els isòmers 3', ja que sinó s'hauria de modificar el programa de síntesi del nucleopèptid.

S'ha emprat el derivat 5'-iPr<sub>2</sub>N(CNEO)P-T-DMT, realitzant la síntesi sobre la resina T<sup>3'</sup>-suc-NHCH<sub>2</sub>-PS, amb valors equivalents de funcionalització i escala (2.5  $\mu\text{mol}$ ) als de la resina que s'ha d'utilitzar en la síntesi del regioisòmer 5' de la nucleopeptidil-resina **60b**. Els rendiments obtinguts en cada acoblament han presentat valors satisfactoris (rendiment promig 96%). A més, l'oligonucleòtid, que ha estat alliberat de la resina per tractament amb NH<sub>3</sub> aquós concentrat en dioxà a 55°C, ha mostrat un excel·lent grau d'homogeneïtat per anàlisi per HPLC (dades no incloses).



### 3.3 Tractaments de desprotecció i alliberament dels nucleopèptids de les resines **60a,b** :

Arribats a aquest punt no s'ha fet sinó seguir el procediment que ha permès l'obtenció del

nucleopèptid precedent, i que ha consistit en realitzar dos tractaments :

- En primer lloc s'ha tractat la resina amb una solució de TBAF 0.05 M en THF anhidre, que provoca l'alliberament del nucleopèptid parcialment protegit de la resina.

En un primer intent de desancoratge del 3'-nucleopèptid **61a**, s'ha pogut comprovar que el tractament durant 30 min no era prou eficient per a un desancoratge quantitatiu, segons ha mostrat l'anàlisi d'aminoàcids realitzada sobre la resina tractada. S'ha aconseguit optimitzar-lo allargant el temps de tractament fins 1 h, que permet assolir un rendiment màxim de 80% de desancoratge. Un segon tractament de 1 h sobre la mateixa resina no allibera més producte.

Les mateixes condicions han estat assajades per al desancoratge del 5'-nucleopèptid **61b**, i s'han aconseguit rendiments similars (75%-80%).

Els crus alliberats en aquest estadi per a tots dos isòmers han estat analitzats per HPLC en fase reversa, en què es poden observar productes majoritaris acompanyats d'altres productes.

- La segona etapa de desprotecció sobre els productes alliberats de la resina, s'ha dut a terme mitjançant un tractament amb  $\text{NH}_3$  aquós concentrat en dioxà 1:1 a temperatura ambient durant 15 h.

Per a tots dos isòmers, les anàlisis realitzades per HPLC en fase reversa sobre els respectius crus mostren la presència de productes majoritaris (Fig. 2.9.a : isòmer 3', Fig. 2.10.a : isòmer 5').

### 3.4 Purificació dels nucleopèptids

#### Phac-Ser(p CATCAT)-Gly-Asp-OH (isòmer 3' **61a**, isòmer 5' **61b**)

- La purificació de l'isòmer 3' **61a** s'ha pogut realitzar en una única etapa mitjançant cromatografia de bescanvi aniònic sobre una columna DEAE-Sephadex amb un gradient de concentració del tampó TEAB.

El producte aïllat presenta un grau d'homogeneïtat òptim tant per anàlisi per HPLC en fase reversa (Fig. 2.9.b) com de bescanvi aniònic (Fig. 2.9.c).

El rendiment global de síntesi, desprotecció i desancoratge, i purificació, 50% (95 OD<sub>260</sub> a partir de 4.6  $\mu\text{mol}$  de peptidil-resina) és clarament satisfactori.

- L'isòmer 5' **61b** ha estat purificat en un procés dues etapes :

La primera etapa s'ha realitzat de forma anàloga a l'isòmer 3', per cromatografia de bescanvi aniònic sobre DEAE-Sephadex. La segona etapa de purificació s'ha efectuat per cromatografia de mitja pressió en una columna de fase reversa amb un gradient similar al de les condicions d'anàlisi (Sec. Exp. Cap.2).

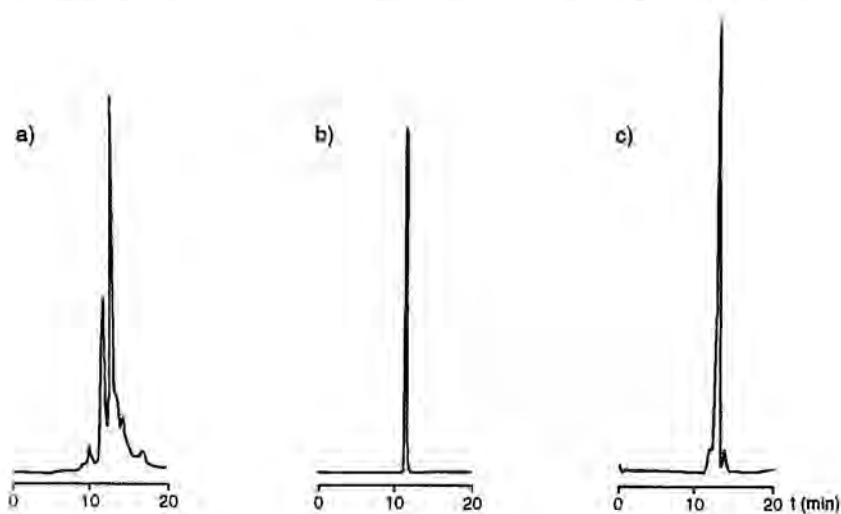
El producte purificat presenta un correcte grau d'homogeneïtat en les mateixes condicions d'anàlisi per HPLC en fase reversa (Fig. 2.10.b) o de bescanvi aniònic (Fig. 2.10.c) de l'isòmer 3'.



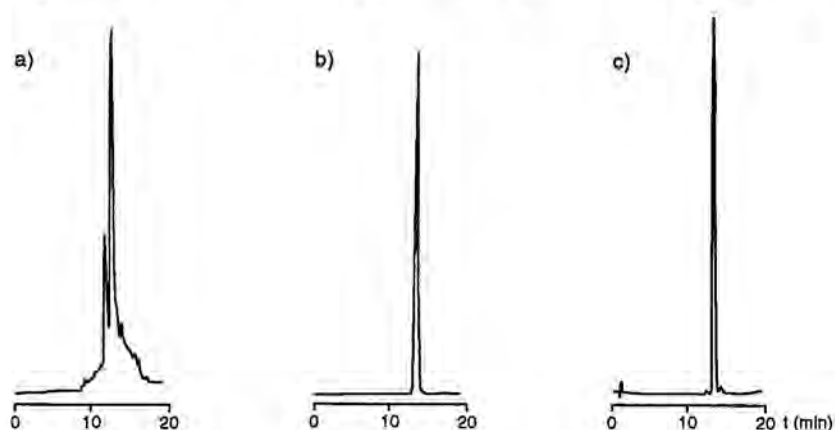
El rendiment global de síntesi, desprotecció i purificació és més baix que en el cas precedent, 30% (56 OD<sub>260</sub> a partir de 4.6 μmol de peptidil-resina), però es pot considerar igualment satisfactori donada l'etapa addicional de purificació.

• Tots dos isòmers són perfectament diferenciables per HPLC en fase reversa, encara que coelueixen en les condicions d'anàlisi per bescanvi aniònic. No obstant, aquestes darreres condicions analítiques han servit per distingir els nucleopèptids dels corresponents oligonucleòtids fosfat (t<sub>R</sub> 13.5 min; isòmer 3' o 5' t<sub>R</sub> 11.9 min), productes que s'han obtingut per trencament de l'enllaç entre el pèptid i l'oligonucleòtid en tractar els nucleopèptids amb piperidina aquosa.

*Figura 2.9 : Obtenció del nucleopèptid Phac-Ser(p<sup>3'</sup>CATCAT)-Gly-Asp-OH .*



*Figura 2.10 : Obtenció del nucleopèptid Phac-Ser(p<sup>5'</sup>CATCAT)-Gly-Asp-OH .*



Figures 2.9 i 2.10 :

• Anàlisi per HPLC en fase reversa (sistema FR-C, gradient lineal 10-25% B en 20 min, 260 nm) : (a) crús de síntesis; (b) productes purificats

• Anàlisi per HPLC per bescanvi aniònic (sistema BA-B, gradient lineal 0-100% B en 20 min, 260 nm) : (c) productes purificats



### 3.5 Caracterització dels nucleopèptids Phac-Ser(p CATCAT)-Gly-Asp-OH

(**61a** : isòmer 3', **61b** : isòmer 5') :

La caracterització dels dos nucleopèptids ha estat realitzada amb el mateix tipus de proves, les quals es resumeixen a continuació :

#### a) Anàlisi d'aminoàcids :

Tots dos isòmers mostren les proporcions d'aminoàcids a esperar. L'aminoàcid serina presenta uns valors lleugerament inferiors als altres degut a la parcial degradació que sofreix en el procés d'hidròlisi àcida, tot i haver estat realitzades a 110°C durant 24 h i en tub desgasat :

isòmer 3': Asp 1.03, Ser 0.93, Gly 1.04.

isòmer 5': Asp 1.00, Ser 0.89, Gly 1.11.

#### b) Digestió enzimàtica i anàlisi de nucleòsids :

- L'isòmer 3' **61a** es degrada amb la barreja d'enzims de fosfodiesterasa de verí de serp (SVPD, 3'-exonucleasa que degrada un oligonucleòtid generant  $p^5Nu$ ) i fosfatasa alcalina (AP, enzim que transforma  $p^5Nu$  o  $Nu^3p$  en Nu). L'anàlisi per HPLC de la barreja de digestió mostra els nucleòsids T i dA en les proporcions adequades, i dC en una proporció baixa (0.6 en comptes de 1.0), junt amb un altre producte no identificat i que s'ha atribuït al nucleòsid desoxicitidina terminal unit al pèptid. Aquest resultat va en el mateix sentit que l'obtingut amb el primer nucleopèptid d'aquest Capítol (vegeu l'apartat 2.5), en què la barreja d'enzims SVPD i AP no produïa el trencament de la unió entre el nucleòsid terminal i el pèptid. De forma equivalent, si el producte es tracta prèviament amb NaOH 1 M a 55°C durant 1 h per generar l'oligonucleòtid TACTAC<sup>3'</sup>p i, un cop neutralitzat i liofilitzat, se sotmet a la barreja d'enzims SVPD i AP, s'observen únicament els nucleòsids no modificats amb una proporció correcta (dC: 0.9, T: 1.0, dA: 0.9).

- L'isòmer 5' **61b** es degrada amb la barreja d'enzims SVPD i AP. L'anàlisi per HPLC mostra els tres nucleòsids dC, T i dA en les proporcions esperades (dC: 1.1, T: 0.9, dA: 1.0). A diferència de l'anterior isòmer no s'observa la presència del nucleòsid anòmal que s'ha assignat al nucleòsid terminal unit al pèptid. Aquest comportament es correspon de fet amb el que es coneix per a les nucleoproteïnes amb unions 5', per les que s'ha observat que SVPD és capaç de fragmentar l'enllaç fosfat entre la proteïna i l'àcid nucleic<sup>48</sup>.

### c) Espectres de RMN :

S'han enregistrat espectres de  $^1\text{H}$  i  $^{31}\text{P}$  amb les respectives sals sòdiques dels dos nucleopèptids, dissoltes en  $\text{D}_2\text{O}$  :

- Els espectres de  $^{31}\text{P}$  RMN han estat obtinguts amb desacoblament de banda ampla sobre  $^1\text{H}$ . L'isòmer 3' només mostra un únic senyal ( $\delta$  2.0).

L'isòmer 5' presenta dos senyals ( $\delta$  3.1, 2.0), amb àrees relatives 1 : 5.

- En els respectius espectres de  $^1\text{H}$  RMN resulten d'especial utilitat els senyals que apareixen a la zona aromàtica, ja que es poden considerar diagnòstics d'un compost en què es troben units el pèptid i l'oligonucleòtid. En tots dos casos, s'observen els senyals atribuïts als protons dels anells de les nucleobases (H8 A, H2 A, H6 C, H6 T), i els pertanyents a l'anell fenílic del grup fenilacetil que bloqueja l'extrem N del pèptid.

### d) Espectres de masses :

S'han obtingut espectres mitjançant la tècnica d'electrospray amb mode negatiu de detecció.

En tots dos casos es mostren diferents senyals que es poden atribuir a formes ionitzades de càrrega múltiple dels productes esperats.

## 4. Comparació de l'estabilitat de diferents nucleopèptids :

### 4.1 Estabilitat dels diferents nucleopèptids als tractaments bàsics :

Alhora que s'han anat obtenint diferents nucleopèptids al llarg d'aquest treball, s'han dut a terme diferents proves per determinar l'estabilitat de cada un d'ells a diferents reactius bàsics. En alguns casos, aquestes proves han servit per elegir condicions de desprotecció i desancoratge, i en altres, han format part de la caracterització dels corresponents nucleopèptids. De totes formes, s'ha cregut interessant agrupar totes les dades en aquest apartat per tal d'establir comparacions i deduir-ne conclusions sobre l'estabilitat relativa dels nucleopèptids sintetitzats. Els resultats es reuneixen a la següent taula, i inclouen a més de les realitzades amb els nucleopèptids amb enllaços fosfat, [25](#), [56](#), [61a](#) i [61b](#), les efectuades amb els anàlegs amb un enllaç de tipus N-acilfosforamidat, [45](#) i [46](#).

Taula 2.3 : Estabilitat dels nucleopèptids **25**, **56**, **61a**, **61b**, **45** i **46** a diferents tractaments bàsics.

Nucleopèptid	Tractament	t (h)	Comportament <sup>a</sup>
Boc-Ser(p <sup>3</sup> T-DMT)-NHcHex ( <b>21a</b> )	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> <sup>b</sup>	24	estables
Boc-Ser(p <sup>5</sup> T-DMT)-NHcHex ( <b>21b</b> )	LiOH <sup>c</sup>	8	estables
	NH <sub>3</sub> aq. conc <sup>d</sup>	55°C 15	estables
Boc-Ser(p <sup>5</sup> TCT)NHcHex ( <b>25</b> )	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> <sup>b</sup>	8	estable
	LiOH <sup>c</sup>	2	85
		8	40
	NH <sub>3</sub> aq. conc <sup>d</sup>	t. amb. 55°C 15	estable
		6	estable
Phac-Phe-Val-Ser(p <sup>3</sup> ACT)-Gly-OH ( <b>56</b> )	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> <sup>b</sup>	1	70
		3	40
	LiOH <sup>c</sup>	1	0
	NH <sub>3</sub> aq. conc <sup>d</sup>	t. amb. 55°C 15	estable
	piperidina aq <sup>e</sup>	1	0
Phac-Ser(p <sup>3</sup> CATCAT)-Gly-Asp-OH ( <b>61a</b> )	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> <sup>b</sup>	1	15
	LiOH <sup>c</sup>	1	0
	piperidina aq <sup>e</sup>	55°C 1	0
Phac-Ser(p <sup>5</sup> CATCAT)-Gly-Asp-OH ( <b>61b</b> )	piperidina aq <sup>e</sup>	55°C 1	0
Ac-Ser-Gly-Asp-NH-p <sup>5</sup> T ( <b>45</b> )	piperidina aq <sup>e</sup>	55°C 15	estable
Ac-Ser-Gly-Asp-NH-p <sup>5</sup> CATCAT ( <b>46</b> )	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> <sup>b</sup>	6	estable
	LiOH <sup>c</sup>	6	estable
	piperidina aq <sup>e</sup>	55°C 22	estable

Notes : <sup>a</sup> Si el producte no és estable s'indica el percentatge de nucleopèptid inalterat que s'observa en l'anàlisi per HPLC (**25**, **45**, **46** : Sec. Exp. Cap.1, apartats 2.6, 5.3 i 5.4; **56**, **61a**, **61b** : Sec. Exp. Cap.2, apartats 2.5 i 3.5; **21a**, **21b** Sec. Exp. Cap.3, apartat 1.1b); <sup>b</sup> K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.05 M en MeOH/dioxà (1:1); <sup>c</sup> LiOH.H<sub>2</sub>O 0.25 M en MeOH/dioxà/aigua (1.5:1.5:1); <sup>d</sup> NH<sub>3</sub> aq conc en dioxà (1:1); <sup>e</sup> piperidina aq 1 M.

L'observació dels resultats de les diferents proves ha permès extreure les següents conclusions :

- Els resultats de les diferents proves indiquen que no hi ha un comportament homogeni de tots els nucleopèptids enfront d'aquests reactius.

- Els tractaments amb K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.05 M en MeOH/dioxà o LiOH 0.25 M en MeOH/dioxà/aigua (1.5:1.5:1) provoquen en major o menor grau el trencament de l'enllaç del pèptid i de l'oligonucleòtid en els nucleopèptids de major talla en què l'enllaç és de tipus fosfat diester (**25**, **56**, **61a** i **61b**), generant el corresponent oligonucleòtid-fosfat. De totes formes, s'observa una major estabilitat amb el reactiu que conté K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Aquests resultats contrasten notablement amb les característiques d'estabilitat dels models Boc-Ser(p T-DMT)-NHcHex **21** que eren estables a aquestes condicions (Cap 3, apartat 1.1). És possible establir una certa gradació d'estabilitats, si es tenen en compte els

resultats amb el reactiu  $K_2CO_3$  en MeOH/dioxà. El nucleopèptid **25**, en què la part peptídica només es troba formada per l'aminoàcid serina, i per tant és el de característiques estructurals més similars als models **21**, és també el de característiques d'estabilitat més properes, ja que és perfectament estable al reactiu al llarg de 8 h. El nucleopèptid **56** ocupa una posició intermèdia, ja que el trencament de l'enllaç es produeix lentament. Els nucleopèptids regioisòmers **61a** i **61b** són els més làbils.

En canvi, el nucleopèptid Ac-Ser-Gly-Asp-NH-p<sup>5'</sup>CATCAT **46**, tal i com era de preveure, és perfectament estable als reactius esmentats. Pel fet de ser un enllaç de tipus N-acilfosforamidat, és estable als tractaments bàsics (vegeu més avall, en què es parla del tractament de piperidina). Aquesta característica ha estat considerada una dada indirecta en la caracterització del tipus d'enllaç que s'estableix entre el pèptid i l'oligonucleòtid.

- Els nucleopèptids són perfectament estables a la dissolució de  $NH_3$  aquós concentrat en dioxà a temperatura ambient. Pel cas particular del nucleopèptid **25**, no hi ha trencament apreciable de l'enllaç entre el pèptid i l'oligonucleòtid fins i tot a una temperatura de 55°C, a similitud del que s'ha observat pels models **21**.

- Els tractaments amb piperidina 1 M a 55°C produeixen una ràpida desaparició del producte inicial en què l'enllaç és de tipus fosfat diester. Aquesta característica de labilitat ha estat aprofitada com a una prova indirecta en la caracterització dels productes **56**, **61a** i **61b**. La desaparició del nucleopèptid per donar el corresponent oligonucleòtid-fosfat es pot considerar diagnòstic del tipus d'enllaç entre el pèptid i l'oligonucleòtid en què participa el residu de serina.

Pel contrari, els nucleopèptids Ac-Ser-Gly-Asp-NH-p<sup>5'</sup>T (**45**) i Ac-Ser-Gly-Asp-NH-p<sup>5'</sup>CATCAT (**46**), en què l'enllaç del pèptid i l'oligonucleòtid és de tipus fosforamidat i s'estableix amb l'extrem amida del pèptid, són perfectament estables a piperidina (Cap 1, apartat 5.3 i 5.4).

En definitiva, s'observa que els models Boc-Ser(p T-DMT)-NHcHex **21** (Cap.3, apartat 1.1) són els més estables de tots els nucleopèptids sintetitzats amb enllaços de tipus fosfat diester (**25**, **56**, **61a** i **61b**). Com es menciona en altres parts d'aquesta Memòria (Cap.3, apartat 1.1), inicialment s'ha volgut reproduir en els models **21** les propietats essencials dels nucleopèptids a sintetitzar. Les propietats d'estabilitat d'aquests compostos han estat considerades com una estimació del comportament dels nucleopèptids, el que ha servit per efectuar una avaluació prèvia dels tractaments bàsics de les etapes de desprotecció i desancoratge. Les conclusions d'aquests estudis han permès dur a terme la síntesi del primer nucleopèptid, Boc-Ser(p<sup>5'</sup>TCT)-NHcHex **25** (Cap.1, apartat 2), però els resultats en l'obtenció del nucleopèptid Phac-Phe-Val-Ser(p<sup>3'</sup>TCT)-Gly-OH **56** han posat de manifest que no són en absolut aplicables de forma general.

Aquests fets porten a pensar que la labilitat als tractaments bàsics dels enllaços fosfat en què participen serina o treonina depèn d'altres factors que la simple estructura de l'enllaç. Per exemple,

en la preparació de certs derivats de deshidroalanina a partir de diferents derivats  $\beta$ -O-fosforilats<sup>230</sup> (o fins i tot  $\beta$ -O-acilats) de serina, ha estat observada una gradació de reactivitat enfront a les bases, que en alguns dels casos ha fet necessaris tractaments amb bases fortes com el 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octà durant 25-30 h<sup>230</sup> per l'obtenció dels productes.

L'explicació del diferent comportament dels nucleopèptids estudiats segurament requereix d'un estudi més exhaustiu que tingui en compte consideracions de tipus estructural, i de la influència dels esquelets peptídic i oligonucleotídic, respectivament. Aquests objectius han quedat fora dels objectius del treball realitzat, i poden ser objecte d'un desenvolupament futur del projecte.

#### 4.2 Estabilitat a exonucleases dels diferents nucleopèptids :

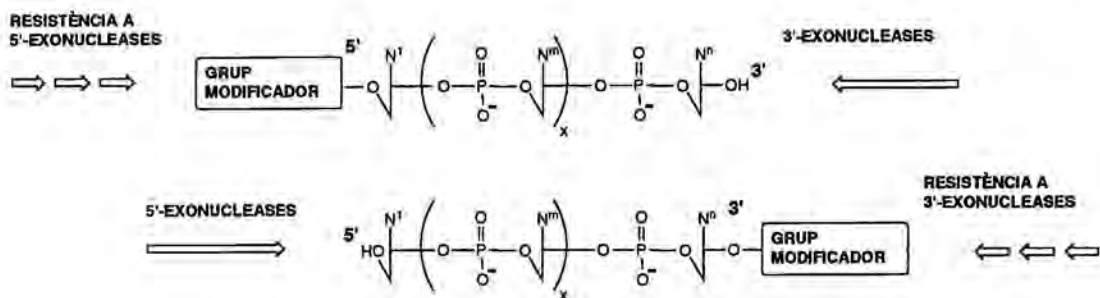
A part de confirmar la composició en nucleòsids, els experiments de digestió amb enzims han servit també per observar diferències en el comportament dels diferents nucleopèptids. La següent taula resumeix els resultats obtinguts, alguns dels quals ja han estat comentats anteriorment per a la caracterització dels productes (**25**, Cap.1, apartat 2.5; **46**, Cap.1, apartat 5.3; **56**, Cap.2, apartat 2.5; **61a**, **61b**, Cap.2, apartat 3.5), i són objecte de discussió a continuació :

*Taula 2.4 : Estabilitat enzimàtica de 3' i 5' nucleopèptids.*

Nucleopèptid <sup>*a</sup>	SVPD / AP <sup>*b</sup>	SVPD <sup>*c</sup>	SpPD <sup>*d</sup>
Boc-Ser(p <sup>5'</sup> TCT)-NHcHex ( <b>25</b> )	dC, T	—	—
Phac-Ser(p <sup>5'</sup> CATCAT)Gly-Asp-OH ( <b>61b</b> )	dC, T, dA	5% <b>61b</b>	estable
Ac-Ser-Gly-Asp-NH-p <sup>5'</sup> CATCAT ( <b>46</b> )	dC, T, dA	—	estable
Phac-Phe-Val-Ser(p <sup>3'</sup> ACT)-Gly-OH ( <b>56</b> )	dC, T dA <sup>3'</sup> pR <sup>*e</sup>	50% <b>56</b>	dC <sup>3'</sup> p, dC, T, T <sup>3'</sup> p, dA <sup>3'</sup> pR <sup>*e</sup>
Phac-Ser(p <sup>3'</sup> CATCAT)Gly-Asp-OH ( <b>61a</b> )	dC, T, dA, dC <sup>3'</sup> pR <sup>*e</sup>	75% <b>61a</b>	—

Notes : <sup>\*a</sup> Les digestions enzimàtiques han estat realitzades segons s'explica a la corresponent Secció experimental (**25** Sec. Exp. Cap.1, apartat 2.5, **46** Sec. Exp. Cap.1, apartat 5.4, **56** Sec. Exp. Cap.2, apartat 2.4, **61a** i **61b** Sec Exp. Cap.2, apartat 3.4); <sup>\*b</sup> Es mostren els nucleòsids que s'observen per anàlisi de la barreja de digestió; <sup>\*c</sup> S'indica la proporció de nucleopèptid que resta inalterat; <sup>\*d</sup> En el cas que el nucleopèptid hagi estat degradat completament, s'indiquen els nucleòsids que s'observen per anàlisi de la barreja de digestió; <sup>\*e</sup> dNpR : nucleòsid modificat, molt probablement unit al pèptid (es degrada en ser tractat amb piperidina al corresponent dNp).

Figura 2.11 : Acció de les exonucleases sobre oligonucleòtids modificats als extrems 3' o 5'.



El mecanisme d'acció de les exonucleases comporta la degradació de l'oligonucleòtid per trencament de les unions fosfat entre els nucleòsids, podent-se distingir les 3'-exonucleases, com la fosfodiesterasa de verí de serp (SVPD), o les 5'-exonucleases, com la fosfodiesterasa de melsa (SpPD), depenent de l'extrem de l'oligonucleòtid pel qual s'inicia el procés<sup>231</sup>. La presència de grups modificadors units al grup hidroxil terminal o bé l'absència d'aquest grup impedeix en principi l'acció del corresponent enzim<sup>232</sup> (Fig. 2.11). Per tant és d'esperar que el 3'-nucleopèptid (que conté el pèptid unit a l'extrem 3' de l'oligonucleòtid), sigui estable a les 3'-exonucleases, i el 5'-nucleopèptid ho sigui a les 5'-exonucleases. S'han dut a terme diferents experiments en què es manifesta aquest comportament :

- El 5'-nucleopèptid **61b** ha mostrat ser estable a SpPD en les mateixes condicions que comporten la pràctica desaparició del 3'-nucleopèptid **61a**. El 5'-nucleopèptid **46**, en què l'enllaç del pèptid i l'oligonucleòtid és de tipus N-acilfosforamidat, també és estable a l'acció de SpPD.

- Quan els nucleopèptids han estat sotmesos a la digestió amb la barreja d'enzims de SVPD i AP, han estat degradats, encara que mostren diferències en quan al trencament de l'enllaç del nucleòsid terminal i el pèptid. Els 5'-nucleopèptids **25** i **61b** (enllaç fosfat), i **46** (anàleg amb un enllaç N-acilfosforamidat) es degraden completament. També es degraden completament els 3'-nucleopèptids **56** i **61a**, en contra del que caldria esperar (vegeu més amunt), però s'observa entre els productes de digestió un nucleòsid que ha estat assignat com el nucleòsid terminal unit al pèptid.

En canvi, quan els experiments han estat realitzats només amb la presència de l'enzim SVPD, ja que es creu que AP pot estar impurificada amb endonucleases, s'observa el comportament a esperar per l'acció d'una 3'-exonucleasa. El 3'-nucleopèptids mostren resistència a la degradació, ja que després de 6 h a 36°C, encara resta un 50% de **56** i un 75% de **61a**. Aquestes mateixes condicions condueixen a una pràctica desaparició de **61b**.

Les dades d'estabilitat a SVPD mostrades pels nucleopèptids amb unions 3' es poden considerar molt interessants ja que confirmen les expectatives d'aplicació biomèdica dels compostos

nucleopeptídics manifestades al començament (vegeu la Introducció). Precisament s'han descrit en les darrers anys diferents exemples<sup>228,233</sup> d'oligonucleòtids modificats en l'extrem 3' com a agents terapèutics antivirals en l'anomenada estratègia antisentit<sup>76</sup>, i que es caracteritzen per presentar major resistència a la degradació en el medi intercel.lular de la que són majoritàriament responsables les 3'-exonucleases<sup>228,234</sup>.

**CAPÍTOL 3 :**  
**DISSENY DE L'ESQUEMA DE PROTECCIÓ EN SÍNTESI DE NUCLEOPÈPTIDS.**  
**SÍNTESI DE DERIVATS DE NUCLEÒSIDS I AMINOÀCIDS,**  
**I DE COMPOSTOS PATRÓ.**



El desenvolupament de les dues estratègies de síntesi de nucleopèptids ha hagut de ser precedit o acompanyat d'un conjunt d'experiments addicionals, i de l'obtenció de diferents productes de partida i de compostos patró. S'ha cregut convenient per facilitar la discussió i el seguiment de la problemàtica que ha anat sorgint en anar posant a punt ambdues estratègies sintètiques (lineal i convergent), que aquest conjunt de dades estiguessin agrupades en un capítol independent dels precedents.

S'ha d'afegir però, que el conjunt de resultats que s'han inclòs en el present Capítol han estat obtinguts en moments molt diversos, i que per tant no han estat sempre disponibles durant la realització dels experiments descrits en els anteriors Capítols.

Els temes centrals sota els quals s'engloben són els següents :

i) Proves relacionades amb el disseny de l'esquema de protecció per a l'obtenció de nucleopèptids, que han consistit en l'avaluació de condicions de desprotecció i desancoratge per a poder efectuar l'elecció dels diferents grups protectors, incloent el tipus de resina i d'unió a la resina.

ii) Obtenció de derivats d'aminoàcids emprats com a intermedis en la síntesi dels nucleopèptids.

iii) Obtenció de derivats de nucleòsids utilitzats com a intermedis en la síntesi dels nucleopèptids.

iv) Síntesi i avaluació de nucleòsids N,N-dialquil-H-fosfonamidat com a intermedis en la síntesi dels oligonucleòtids.

v) Obtenció de diversos derivats de nucleòsids i oligonucleòtids emprats com a compostos patró en la caracterització de diferents productes.

### 1. Proves preliminars relacionades amb el disseny de l'esquema de protecció en la síntesi de nucleopèptids :

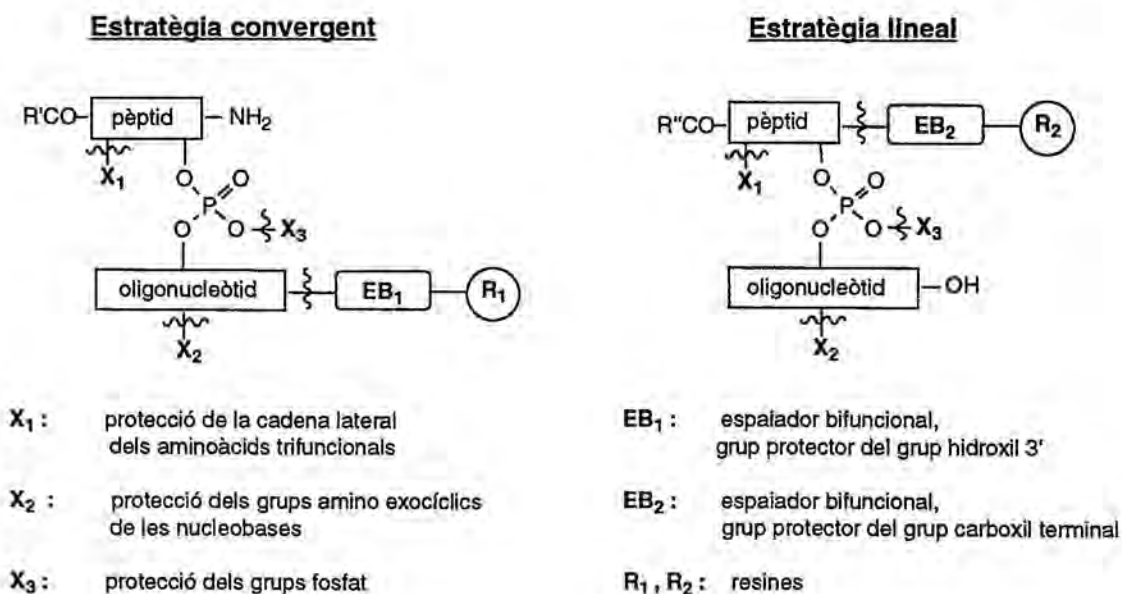
Els dos esquemes de síntesi de nucleopèptids que es discuteixen en aquesta Memòria tenen en comú el fet d'haver triat combinacions de grups protectors permanents làbils a les bases.

La labilitat a les bases dels nucleopèptids en què participen serina o treonina en la formació de l'enllaç entre el pèptid i l'oligonucleòtid obliga, per tant, a una elecció acurada de les condicions bàsiques de desprotecció per evitar el trencament de l'enllaç.

S'ha cregut que una bona manera d'avaluar la compatibilitat entre els reactius de desprotecció i desancoratge i l'estabilitat d'un nucleopèptid en què participa serina en la formació de l'enllaç entre el pèptid i l'oligonucleòtid era observar el comportament en aquestes mateixes condicions d'un model sintètic que reproduís les característiques de l'enllaç. Les dades d'estabilitat als diferents tractaments per al compost model poden ser interpretades aleshores com una estimació del comportament del nucleopèptid en les mateixes condicions.

El criteri d'elecció dels grups protectors, doncs, s'ha de basar en la possibilitat de poder efectuar la desprotecció en condicions compatibles amb l'estabilitat del nucleopèptid. D'altra banda, per simplificar i reduir el nombre de tractaments finals, s'ha cregut convenient que la desprotecció i l'alliberament de la resina es produïssin en la mateixa etapa.

*Figura 3.1 : Esquemes de protecció a les estratègies de síntesi convergent i lineal*



Si es consideren els diferents grups protectors, es poden distingir segons :

i) grups que són comuns a les dues estratègies, com són els grups protectors de les cadenes laterals del pèptid ( $X_1$ ), els de les nucleobases ( $X_2$ ) i els dels grups fosfat ( $X_3$ ).

ii) grups que són diferents per a cada estratègia, com és la unió a la resina. Per a l'estratègia convergent, la part directament unida a la resina és l'oligonucleòtid, el que suposa establir una unió ( $EB_1$ ) del primer nucleòsid amb la resina. A l'estratègia lineal, el pèptid es troba directament unit a la resina, pel que la unió a la resina ( $EB_2$ ) s'estableix a través de l'aminoàcid de l'extrem C-terminal.

Al llarg del treball realitzat, l'àcid aspàrtic ha estat l'únic aminoàcid trifuncional present en les seqüències peptídiques dels nucleopèptids sintetitzats i pel qual ha calgut triar un grup protector convenient ( $X_1$ ). La selecció s'ha realitzat entre diferents grups, algun dels quals havien estat descrits anteriorment però també avaluant noves alternatives.

Per a la protecció dels grups amino exocíclics de les nucleobases ( $X_2$ ) també han estat assajades diferents possibilitats. Tenint en compte que l'esquema de protecció làbil a les bases és l'habitualment utilitzat en la síntesi dels oligonucleòtids, s'ha pogut optar entre diferents grups protectors, per alguns dels quals es disposa de derivats comercials.

La protecció de l'enllaç fosfat ( $X_3$ ) ha estat la més fàcilment resolta ja que s'ha pogut mantenir el grup 2-cianoetil, que és l'habitualment utilitzat en la síntesi dels oligonucleòtids<sup>235</sup> i és làbil a qualsevol de les condicions de desprotecció avaluades (vegeu l'apartat 1.1.b d'aquest apartat).

Pel que fa a l'elecció del tipus de resina ( $R_1$ ,  $R_2$ ) i de la unió ( $EB_1$ ,  $EB_2$ ) del nucleopèptid protegit a la resina, s'ha de tenir en compte que han de ser compatibles amb els mètodes de síntesi de les parts implicades. Com ja s'ha esmentat, cada estratègia ha presentat en aquest punt una problemàtica específica :

Per a l'esquema convergent, on la part directament unida a la resina és l'oligonucleòtid, s'ha pogut mantenir la unió habitual en la síntesi d'oligonucleòtids, a través de l'espaiador bifuncional succinil<sup>102</sup>. Les proves s'han encaminat a determinar la combinació de les millors condicions de desancoratge i de tipus de resina.

Ara bé, a l'esquema lineal el pèptid és la part directament unida a la resina i, a més, la síntesi del nucleopèptid es realitza seqüencialment sobre la mateixa resina. Per tant, ha estat necessari seleccionar un tipus d'unió estable durant la síntesi i, alhora, làbil als tractaments bàsics suaus compatibles amb l'enllaç entre el pèptid i l'oligonucleòtid.

Les proves efectuades per respondre a cadascun dels problemes plantejats en les anteriors punts han estat agrupades de la següent forma :

i) Síntesi dels derivats Boc-Ser(PO(OCNE) T-DMT)-NHcHex com a models nucleopeptídics. Avaluació de l'estabilitat del corresponent enllaç fosfat a diferents tractaments bàsics a emprar en les etapes de desprotecció i desancoratge de resina en els esquemes de síntesi de nucleopèptids, com a mesura de la compatibilitat d'aquests tractaments amb l'estabilitat del nucleopèptid.

ii) Proves de labilitat de diferents grups protectors dels grups amino exocíclics de les nucleobases a diferents condicions bàsiques de tractament.

iii) Proves d'eliminació de diferents grups protectors del grup  $\beta$ -carboxil de l'àcid aspàrtic a diferents condicions bàsiques de tractament.

iv) Proves de trencament de l'enllaç oligonucleòtid-(succinil-resina) a diferents tractaments bàsics, com a model d'enllaç del nucleopèptid amb la resina en l'estratègia convergent.

v) Proves de trencament de la unió aminoàcid-(NPE-resina) i aminoàcid-(Nbb-resina) en diferents condicions bàsiques, com a model de l'enllaç del nucleopèptid amb la resina en l'estratègia lineal.

### 1.1 Avaluació de l'estabilitat de la unió fosfat dels derivats

Boc-Ser(p T-DMT)-NHcHex (21a, 21b) a diferents tractaments bàsics :

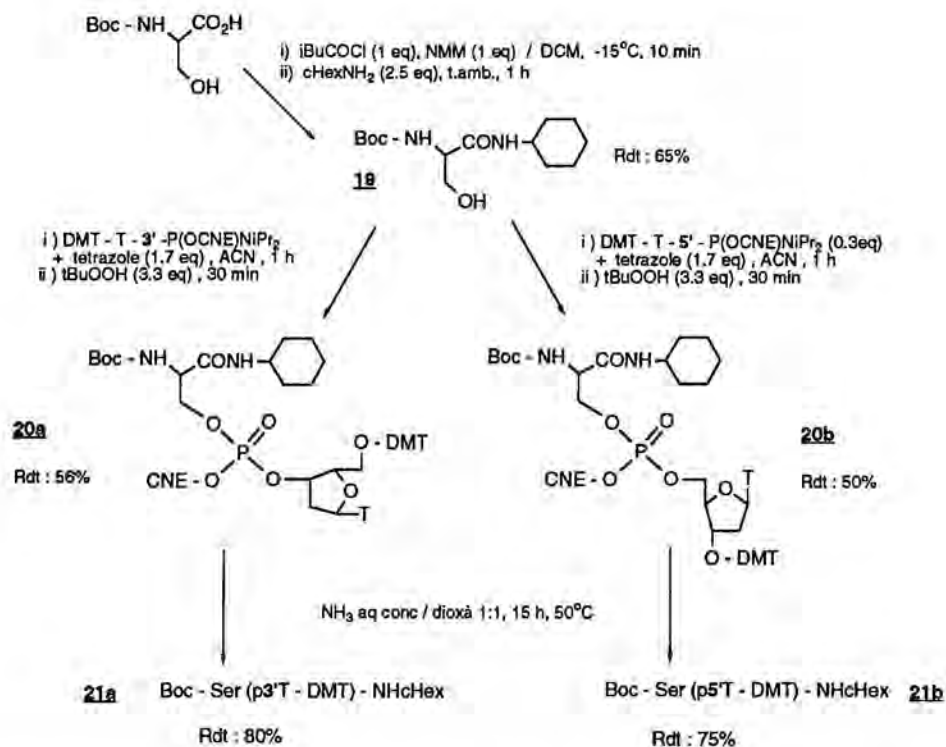
a) Síntesi dels derivats Boc-Ser(PO(OCNE) T-DMT)-NHcHex (20a, 20b) :

S'ha pensat que un model adequat que reproduís l'estructura d'un nucleopèptid làbil a les bases, i alhora fos fàcil de sintetitzar, seria un derivat en el que un grup fosfat unís serina i timidina.

Amb aquest idea, s'han sintetitzat els compostos regioisòmers Boc-Ser(PO(OCNE)<sup>3'</sup>T-DMT)-NHcHex (20a) i Boc-Ser(PO(OCNE)<sup>5'</sup>T-DMT)-NHcHex (20b), els quals han de permetre alhora estudiar l'efecte del tipus d'hidroxil del nucleòsid, secundari (20a) o primari (20b), en l'estabilitat de la unió fosfat.

La síntesi dels derivats Boc-Ser(PO(OCNE)T-DMT)-NHcHex (20a, 20b) s'ha efectuat en un procés de dues etapes, tal com es mostra al següent esquema:

Figura 3.2 : Obtenció dels derivats Boc-Ser(p T-DMT)-NHcHex



En una primera etapa, a partir de l'aminoàcid Boc-Ser-OH, s'ha obtingut el corresponent derivat amida **19**, a través d'un intermedi de tipus anhidrid mixte carbònic-carboxílic<sup>236</sup>, per reacció amb ciclohexilamina. En la segona etapa, s'han fet reaccionar el derivat fosforamidit del nucleòsid (en el cas de l'isòmer 5', vegeu l'apartat 3 d'aquest Capítol) i l'aminoàcid **19** en presència de tetrazole, i una vegada format el derivat fosfit triester, s'ha transformat en el corresponent fosfat per oxidació.

El derivats fosfat-diester **21**, en els que s'ha eliminat el grup protector cianoetil, també han estat obtinguts per tractament dels fosfat-triester **20** amb  $\text{NH}_3$  aq.conc/dioxà durant 15 h a  $55^\circ\text{C}$ .

#### b) Proves d'estabilitat dels derivats Boc-Ser(p T-DMT)-NHcHex (**21a**, **21b**)

als tractaments bàsics :

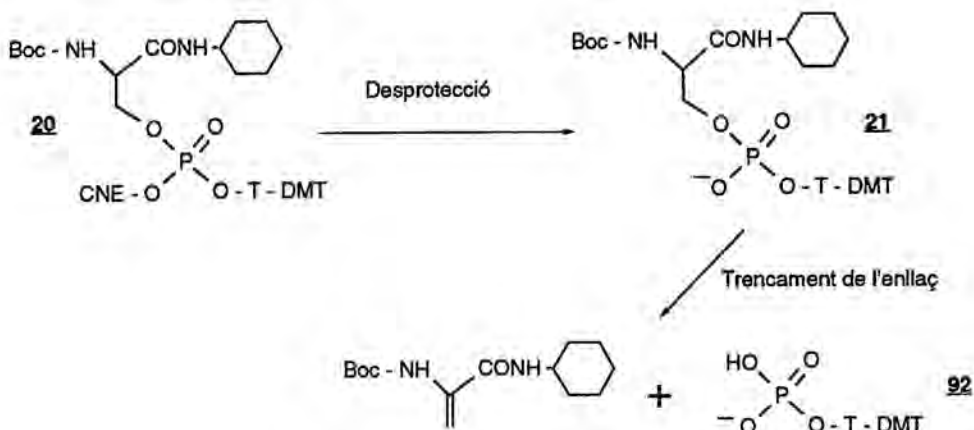
Els experiments han consistit en tractar els derivats fosfat triester **20** amb els diferents reactius bàsics. El seguiment dels productes s'ha realitzat per mitjà de l'anàlisi per HPLC.

El fosfat triester **20** inicial desapareix ràpidament (normalment en menys de 5 min) per a donar el fosfat diester **21**, per pèrdua del grup protector cianoetil de l'enllaç fosfat. Aquest fet ha

posat de manifest que el grup protector 2-cianoetil, utilitzat habitualment per a la protecció de l'enllaç fosfat, és perfectament làbil a qualsevol de les condicions avaluades.

El fosfat-diester **21** que es genera és el producte sobre el qual realment s'ha comprovat l'estabilitat de la unió entre l'aminoàcid i el nucleòsids, que de trencar-se genera el corresponent nucleòsids-fosfat **92**. La següent figura esquematitza la possible transformació dels productes :

*Figura 3.3 : Possible transformació entre els productes en les proves d'estabilitat*



*Taula 3.1 : Estabilitat dels nucleopèptids model **21a,b** a diferents tractaments bàsics*

Tractament <sup>*a</sup>	t (h)	isòmer 3' <b>21a</b>	DMT-T <sup>3'</sup> p	isòmer-5' <b>21b</b>	DMT-T <sup>5'</sup> p
1. K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> <sup>*b</sup> 55°C	4	estable		estable	
	24	estable		estable	
	24	25%	75%	—	—
2. TBAF <sup>*c</sup>	1	estable		95%	5%
	4	65%	35%	70%	30%
3. LiOH <sup>*d1</sup> LiOH <sup>*d2</sup> LiOH <sup>*d3</sup>	8	estable		estable	
	24	75%	25%	70%	30%
	6 3	50% 40%	50% 60%	— —	— —
4. NH <sub>3</sub> aq <sup>*e</sup> tamb. 55°C	24	estable		estable	
	24	estable		estable	
5. oximat <sup>*f</sup>	8	estable		—	
6. piperidina <sup>*g</sup> 55°C	1	95%	5%	90%	10%
	8	25%	75%	12%	88%

Notes : <sup>\*a</sup> el resultat dels tractaments s'ha determinat per anàlisi HPLC; <sup>\*b</sup> K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.05 M en MeOH/dioxà (1:1); <sup>\*c</sup> TBAF 0.1 M en THFanh; <sup>\*d</sup> LiOH 0.25 M en MeOH/dioxà/aigua, <sup>d1</sup> (1.5:1.5:1), <sup>d2</sup> (1:1:0.1), <sup>d3</sup> (1:1:0); <sup>\*e</sup> NH<sub>3</sub> aq conc/dioxà (1:1); <sup>\*f</sup> 2-piridinaldoximat de tetrametilguanidini 0.1 M en THFanh; <sup>\*g</sup> piperidina aq 0.5M.

La Taula 3.1 resumeix el resultat de les diferents proves dutes a terme amb els diferents reactius, i que a continuació es comenten més detingudament :

- El tractament amb  $K_2CO_3$  en MeOH havia estat utilitzat en treballs precedents<sup>97,143-145</sup> per a l'eliminació de diversos grups protectors en la síntesi d'oligonucleòtids amb enllaços fosfat de metil en els quals es necessiten condicions suaus de desprotecció amb una base nucleòfila que deixi inalterats aquests grups fosfat triester. Els fosfat diester **21** han resultat ser perfectament estables al reactiu  $K_2CO_3$  0.05 M en MeOH/dioxà 1:1 (que correspon a la concentració màxima de sal en la barreja de dissolvents). Només per a temperatures de 55°C es produeix la ruptura de l'enllaç.

- Els tractaments amb el reactiu TBAF han estat utilitzats en algunes de les síntesis de nucleopèptids<sup>54,56,57</sup>. Les proves realitzades mostren que els fosfats diester **21** són perfectament estables durant 1 h a TBAF 0.1 M en THF anhidre.

- És ben coneguda la utilització del reactiu LiOH en medis polars com MeOH aquós per a la saponificació d'esters en condicions suaus<sup>98,99</sup>. En assajar l'estabilitat dels fosfat diester **21** a LiOH 0.25 M en MeOH/dioxà/aigua 1.5:1.5:1, s'ha comprovat que són estables durant temps suficientment llargs com ara 8 h, tot i que per a períodes més llargs de temps, 24 h, experimenten un cert trencament de l'enllaç. La presència d'aigua com un dels dissolvents del reactiu té un efecte beneficiós per a l'estabilitat dels models **21**, ja que una reducció del seu contingut provoca un augment apreciable de la inestabilitat de l'enllaç fosfat.

- S'ha pogut comprovar que els fosfat diester **21** són perfectament estables als tractaments de  $NH_3$  aquós concentrat en dioxà (1:1) a temperatura ambient i fins i tot a 55°C durant 15 h, temperatura a les que tractaments com  $K_2CO_3$  en MeOH/dioxà produeixen un trencament important de l'enllaç fosfat.

- Els oximats de tetrametilguanidini han estat clàssicament utilitzats en la síntesi d'oligonucleòtids mitjançant el mètode del fosfat triester per efectuar l'eliminació dels protectors *o*-clorofenil<sup>237</sup> dels enllaços fosfat. El fet que hagués estat utilitzat com a reactiu en algun dels intents precedents de síntesi de nucleopèptids on participava serina com a aminoàcid d'unió<sup>54</sup>, ha justificat l'interès d'incloure'l com a possible tractament a avaluar. Tot i que ha demostrat ser plenament compatible per a temps suficientment llargs amb l'estabilitat del model **21a**, no ha estat emprat donat que no produeix el trencament de la unió succinil d'un nucleòsid amb la resina (vegeu l'apartat 1.4) .

•Havent comprovat que els fosfat diester **21** són prou estables als tractaments bàsics s'ha cregut convenient observar l'abast real de la seva estabilitat per tractament amb bases fortes, a les quals haurien de ser teòricament làbils. Ha resultat sorprenent observar que els models **21** són considerablement estables als tractaments de piperidina aquosa 1 M a 55°C durant 1 h, i que només després de 8 h es pot parlar de trencament de l'enllaç en una extensió força important.

El conjunt de resultats anteriors posa de manifest que no existeix una diferència apreciable d'estabilitat de l'enllaç fosfat en els models **21** depenent del tipus de grup hidroxil del nucleòsid que hi participi, primari o secundari. Aquesta observació ha permès plantejar la síntesi dels nucleopèptids de forma independent al tipus d'unió que es pretengui formar i utilitzar el mateix esquema en l'obtenció de compostos isòmers, com ha estat el cas dels nucleopèptids regioisòmers Phac-Ser(p CATCAT)-Gly-Asp-OH (isòmer 3' **61a**, isòmer 5' **61b**; Cap.3, apartat 3).

## 1.2 Avaluació de la labilitat de diferents grups protectors dels grups amino exocíclics de les nucleobases a diferents tractaments bàsics :

La següent taula resumeix els resultats obtinguts en les proves de labilitat dels diferents grups protectors que han estat avaluats al llarg del treball, i que a continuació es comenten més detingudament. El percentatge d'eliminació dels grups protectors amb els diferents reactius bàsics ha estat determinat per anàlisi per mitjà de l'HPLC o la cromatografia en capa fina.

•El grup protector 9-fluorenilmetoxicarbonil (Fmoc)<sup>143-145</sup> ha estat avaluat per a la protecció dels grups amino de citosina i adenina, en els derivats **83a** i **83b**.

Sotmesos els derivats **83a** i **83b** al reactiu K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en MeOH/dioxà s'observa l'eliminació quantitativa del grup protector en 45 i 60 min, respectivament. El reactiu K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en MeOH havia estat descrit anteriorment per a l'eliminació del grup protector amb resultats similars.

El reactiu 2-piridinaldoximat de tetrametilguanidini permet també una desprotecció quantitativa del derivat de desoxicitidina **83a** en 45 min, resultat que es correspon amb el que havia estat descrit amb anterioritat<sup>50</sup>. No obstant, aquest reactiu no ha estat finalment inclòs com un dels possibles tractaments de desprotecció.

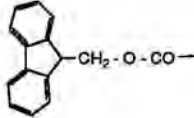
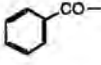
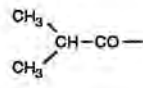
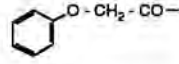
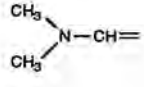
•El grup protector benzoïl (Bz)<sup>133-135</sup>, habitualment emprat per a la protecció d'adenina i citosina, ha estat avaluat en els derivats de desoxiadenosina **76**, de desoxicitidina **75** i de desoxiguanosina **77**.

El reactiu K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en MeOH/dioxà permet una eliminació quantitativa del grup protector en el derivat de desoxiadenosina **76** en 6 h, però en les mateixes condicions, encara és present un 10% del derivat de desoxicitidina **75**.



S'aconsegueix una desprotecció quantitativa del derivat de desoxicitidina **75** amb el reactiu LiOH en MeOH/dioxà/aigua durant 5 h, condicions en què pels derivats de desoxiadenosina i desoxiguanosina encara s'observen percentatges importants dels productes inicials.

Taula 3.2 : Labilitat de diferents protectors dels grups amino exocíclics de nucleobases a diferents tractaments bàsics.

Grup	Substrat	Tractament	t (min)	% Desp <sup>*a</sup>
1. Fmoc 	DMT-dC <sup>Fmoc</sup> ( <b>83a</b> )	oximat <sup>*b</sup>	20	75
			45	100
		K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> <sup>*c</sup>	30	90
			45	100
	DMT-dA <sup>Fmoc</sup> ( <b>83b</b> )	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> <sup>*c</sup>	45	90
			60	100
2. Bz 	DMT-dA <sup>Bz</sup> ( <b>76</b> )	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> <sup>*c</sup>	300	90
			360	100
	DMT-dC <sup>Bz</sup> ( <b>75</b> )	LiOH <sup>*d</sup>	300	90
		K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> <sup>*c</sup>	360	90
		LiOH <sup>*d</sup>	240	90
			300	100
3. iBu 	dCiBu ( <b>85b</b> )	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> <sup>*c</sup>	10	90
			30	100
		LiOH <sup>*d</sup>	15	90
	DMT-dCiBu-PO(H)OCNE <sup>*f</sup> ( <b>79a</b> )	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> <sup>*c</sup>	120	100
	DMT-dGiBu ( <b>78</b> )	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> <sup>*c</sup>	360	75
4. Pac 	dA <sup>Pac</sup> ( <b>80</b> )	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> <sup>*c</sup>	15	90
			30	100
		LiOH <sup>*d</sup>	15	90
			30	100
	dG <sup>Pac</sup> ( <b>81</b> )	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> <sup>*c</sup>	30	90
			60	100
		LiOH <sup>*d</sup>	30	90
			60	100
5. Dmf 	DMT-dA <sup>Dmf</sup> -PO(H)OCNE <sup>*f</sup> ( <b>79b</b> )	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> <sup>*c</sup>	4320	50
	DMT-dG <sup>Dmf</sup> -PO(H)OCNE <sup>*f</sup> ( <b>79c</b> )	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> <sup>*c</sup>	4320	25

Notes : <sup>\*a</sup> determinat per anàlisi de capa fina o HPLC; <sup>\*b</sup> 2-piridinaldoximat de tetrametilguanidini, 0.1M en dioxà; <sup>\*c</sup> K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.05M en MeOH/dioxà (1:1); <sup>\*d</sup> LiOH.H<sub>2</sub>O 0.25M en MeOH/dioxà/aigua (1.5:1.5:1); <sup>\*e</sup> NH<sub>3</sub> aq conc/dioxà (1:1); <sup>\*f</sup> obtinguts per hidròlisi dels corresponents derivats fosforamidit.

• S'ha avaluat el grup protector isobutiril (iBu) en els derivats de desoxicitidina **79a**, **85b** i desoxiguanosina **78**. El reactiu  $K_2CO_3$  en MeOH/dioxà és efectiu per a la desprotecció dels derivats de desoxicitidina **79a** i **85b** (30 i 120 min per a la desprotecció total, respectivament; vegeu Taula), però és massa estable com a grup protector del derivat de desoxiguanosina **78** que només presenta un 75% de desprotecció després de 6 h de tractament.

El tractament de LiOH en MeOH/dioxà/aigua provoca també la desprotecció del derivat de desoxicitidina **85b** en un temps curt (30 min).

• El grup protector fenoxiacetil (Pac), que ha estat descrit<sup>136</sup> com un grup protector alternatiu, molt més làbil als tractaments de desprotecció amb dissolucions d'amoniac que els habitualment utilitzats en la síntesi d'oligonucleòtids, ha estat assajat en els derivats de desoxiadenosina **80** i desoxiguanosina **81**. En tots dos casos, es mostren unes excel·lents característiques de labilitat tant amb el reactiu  $K_2CO_3$  en MeOH/dioxà com per a LiOH en MeOH/dioxà/aigua, ja que el temps de desprotecció se situa entre 15 min i 60 min, sent més ràpida en ambdós casos pel derivat de desoxiadenosina **80**.

• El grup protector dimetilaminometilè (Dmf), que ha estat desenvolupat<sup>141,142</sup> també com a alternativa als grups protectors habituals de tipus amida, no és eliminat satisfactòriament amb el reactiu  $K_2CO_3$  en MeOH/dioxà. Pels derivats de desoxiadenosina **79b** i desoxiguanosina **79c** només s'aconsegueixen després de 72 h un 50% i un 20% de desprotecció, respectivament.

De la Taula 3.2 es desprèn que els grups protectors que presenten les millors propietats de labilitat als reactius  $K_2CO_3$  en MeOH/dioxà i LiOH en MeOH/dioxà/aigua són el grup 9-fluorenilmetoxicarbonil tant per a citosina o adenina, i els grups isobutiril per a citosina i fenoxiacetil per a adenina i guanina, respectivament.

Com ja s'ha comentat anteriorment, la utilització del grup 9-fluorenilmetoxicarbonil ha permès realitzar amb èxit la síntesi del primer nucleopèptid Boc-Ser( $p^5$ TCT)-NHcHex (Cap.1, apartat 2). Ara bé, de totes formes, posteriorment i com a part dels diversos intents de síntesi convergent del nucleopèptid Ac-Ser( $p^5$ CATCAT)-Gly-Asp-NH<sub>2</sub>, la complexitat dels crús obtinguts en la síntesi de l'oligonucleòtid CATCAT, sintetitzat amb grups 9-fluorenilmetoxicarbonil per a la protecció de les nucleobases ha fet desestimar la utilització d'aquest grup protector. L'oligonucleòtid es troba acompanyat d'un percentatge apreciable de productes minoritaris que es podrien haver format per problemes d'estabilitat del grup protector durant el procés de síntesi, observació que es correspon amb l'opinió manifestada per altres autors<sup>136</sup>.

Com a alternativa al grup 9-fluorenilmetoxicarbonil, no s'ha cregut convenient utilitzar el grup fenoxiacetil per a la protecció d'adenina. La millor disponibilitat comercial d'altres derivats, i el coneixement de l'existència de certs problemes, com la insolubilitat d'alguns dels derivats<sup>138</sup> han fet convenient descartar-lo. La protecció d'adenina s'ha pogut solucionar mitjançant el grup

benzoïl (Taula 3.2), ja que es pot eliminar amb NH<sub>3</sub> aquós concentrat en dioxà a temperatura ambient (Taula 3.3), amb K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en MeOH/dioxà o fins i tot amb amb LiOH en MeOH/dioxà/aigua.

L'estabilitat del model Boc-Ser(p T-DMT)-NHcHex (**21**) als tractaments de NH<sub>3</sub> aquós concentrat en dioxà (vegeu l'anterior apartat) ha permès plantejar també un esquema alternatiu de protecció basat en grups làbils a aquest tractament. Com ja s'ha esmentat altres vegades, la raó per la qual s'havia desestimat el tractament amb NH<sub>3</sub> aquós era el temor que pogués provocar el trencament de l'enllaç fosfat entre el pèptid i l'oligonucleòtid. La solució que s'ha adoptat ha consistit en mantenir el grup isobutiril per a citosina i utilitzar el grup benzoïl o bé el grup dimetilaminometilè per a adenina. Aquesta darrera opció ha estat inclosa ja que els grups dimetilaminometilè per a adenina i guanina, i isobutiril per a citosina han estat recentment descrits com un esquema de protecció de les nucleobases que permet tractaments de desprotecció més curts amb NH<sub>3</sub> aquós concentrat en la síntesi dels oligonucleòtids<sup>141,142</sup>. De totes formes, s'ha efectuat una avaluació de la labilitat dels respectius grups protectors amb NH<sub>3</sub> aquós concentrat en dioxà a temperatura ambient (Taula 3.3).

*Taula 3.3 : Estabilitat de diferents grups protectors de nucleobases a NH<sub>3</sub> aquós concentrat en dioxà, a temperatura ambient*

Substrat	% Desprotecció <sup>*a</sup>					
	15 min	30 min	1 h	2 h	4 h	6 h
dC <sup>iBu</sup>	–	--	--	75	90	100
dC <sup>Bz</sup>	–	--	--	--	--	43
dA <sup>Pac</sup>	100					
dA <sup>Dmf</sup>	–	--	--	95		
dA <sup>Bz</sup>				65	80	90
dG <sup>Pac</sup>	52	79	93			
dG <sup>iBu</sup>	–	--	--	--	--	34

Notes : <sup>\*a</sup> determinat per anàlisi HPLC en fase reversa; tots els derivats són d'origen comercial excepte dA<sup>Dmf</sup> que ha estat sintetitzat com s'explica més endavant.

Com era d'esperar, s'ha pogut comprovar que els grups isobutiril per a citosina, i dimetilaminometilè per a adenina són eliminats en temps més curts (6 i 2 h respectivament) que el grup benzoïl habitualment utilitzat per a la protecció de totes dues nucleobases (en 6 h, només 43% de desprotecció per a citosina, i 90% per adenina). Més gran labilitat que el grup protector dimetilaminometilè per a adenina i guanina mostra però, el grup fenoxiacetil. Com s'ha dit abans, s'ha preferit no emprar aquest grup protector ja que presenta problemes de solubilitat per algun dels derivats de nucleòsid, i a més és més econòmic disposar d'altres derivats. Com s'ha vist, l'esquema de protecció que inclou els grups isobutiril per a citosina i benzoïl o dimetilaminometilè per a

adenina ha servit per obtenir els nucleopèptids que han estat sintetitzats per mitjà de l'estratègia lineal (Cap. 2, apartats 2 i 3).

Recentment, com a part del treball realitzat per Maria Concernau<sup>176</sup> per a l'obtenció del nucleopèptid Ac-Tyr(p<sup>3'</sup>ACGT)-Ala-Phe-Gly-NH<sub>2</sub>, s'ha avaluat la utilitat d'un altre tipus de grup protector més làbil, el grup *t*-butilfenoxiacetil. Aquest grup protector<sup>138</sup> presenta les mateixes característiques de labilitat del grup fenoxiacetil però millora les propietats de solubilitat dels derivats de nucleòsid.

### 1.3 Avaluació de la labilitat de diferents grups protectors del grup β-carboxil del residu d'àcid aspàrtic a diferents tractaments bàsics :

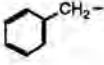

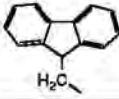
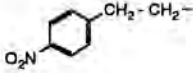
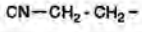
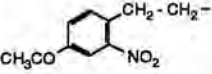
Els assajos han estat realitzats amb els derivats Boc-Asp(OX)-OH, alguns dels quals han estat sintetitzats, tal i com s'explica a l'apartat 2 d'aquest Capítol. Els rendiments de desprotecció s'indiquen a la Taula 3.4 i són motiu de comentari a continuació.

- El grup protector benzil<sup>238</sup> pot ser eliminat en un temps raonable, 1 h, per tractament amb LiOH en MeOH/dioxà/aigua. No obstant, el tractament amb K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en MeOH/dioxà no és adequat ja que s'obté majoritàriament l'ester metílic. Aquest resultat confirma el que s'ha observat en el tractament de diversos pèptids amb un grup ester a l'extrem C-terminal amb carbonats de diferents metalls alcalins (Na, Li, o K), en què la proporció del producte d'hidròlisi enfront del de transesterificació disminueix en fer-ho la quantitat d'aigua del reactiu<sup>109</sup>. Les proves realitzades en aquest sentit, augmentant el contingut d'aigua del reactiu, no milloren els resultats (vegeu Taula 3.4), ja que la desprotecció encara es fa més lenta. Per altra banda, el grup benzil és estable al tractament de TBAF en THF anhidre. Aquest resultat contrasta amb el que s'ha descrit per un pèptid en ser tractat amb TBAF 0.01 M en DMF, condicions que produeixen en 6 h un 77% d'eliminació<sup>110,111</sup> del grup benzil.

- Les proves de labilitat realitzades sobre el derivat que conté el grup ciclohexil<sup>239</sup> el descarten com a possible grup protector. És més estable als tractaments de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en MeOH/dioxà i LiOH en MeOH/dioxà/aigua que els grups 9-fluorenilmetil i el grup benzil. A més, en tots dos tractaments s'obté l'ester metílic com a producte de desprotecció.

- El grup protector 9-fluorenilmetil<sup>129</sup> mostra una excel·lent labilitat al reactiu K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en MeOH/dioxà. En canvi, aquest mateix tractament no és adequat per produir l'eliminació dels grups protectors 2-(4-nitrofenil)etil, 2-cianoetil i 2-(4-acetil-3-nitrofenil)etil, ja que tot i presentar una labilitat òptima, situada entre 30 i 90 min per a una desprotecció quantitativa, i no massa llunyana a l'observada pel grup fluorenilmetil que té lloc en menys de 15 min, produeix la transesterificació del grup β-carboxil.

**Taula 3.4** : Labilitat de diferents grups protectors del grup  $\beta$ -carboxil del derivat Boc-Asp(OX)-OH a diferents tractaments bàsics

Grup X	Tractament	t (min)	% desprotecció* <sup>a</sup>
1. Bzl 	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> * <sup>b</sup>	120	X: Me 90
		180	X: Me 100
	TBAF* <sup>c</sup> LiOH* <sup>f</sup>	240	estable
		30	75
		60	100
2. cHex 	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> * <sup>b</sup> LiOH* <sup>f</sup>	900	X: Me 50
		60	X: Me 75
3. Fm 	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> * <sup>b</sup> TBAF* <sup>c</sup> NH <sub>3</sub> aq* <sup>d</sup> DBU* <sup>e</sup>	15	100
		5	100
		5	100
		5	100
4. Npe 	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> * <sup>b</sup>	30	X: Me 50
		60	X: Me 90
		90	X: Me 100
	TBAF* <sup>c</sup> DBU* <sup>e</sup>	60	75
		120	100
		900	90
5. CNE 	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> * <sup>b</sup> TBAF* <sup>c</sup> DBU* <sup>e</sup>	30	X: Me 100
		30	75
		60	100
		900	75
6. Anpe 	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> * <sup>b</sup>	5	X: Me 50
		30	X: Me 100
	TBAF* <sup>c</sup> DBU* <sup>e</sup> LiOH* <sup>f</sup>	5	100
		900	90
		30	90
	NH <sub>3</sub> aq* <sup>d</sup>	45	100
		30	Boc-Asn-OH 75
		60	Boc-Asn-OH 100

Notes : \*<sup>a</sup> determinat per anàlisi per capa fina o HPLC- s'indica el tipus de producte que s'obté en el cas que no sigui Boc-Asp-OH, és a dir, Boc-Asp(OCH<sub>3</sub>)-OH (X: Me) o Boc-Asn-OH; \*<sup>b</sup> K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.05M en MeOH/dioxà (1:1); \*<sup>c</sup> TBAF 0.01M en THFanh; \*<sup>d</sup> NH<sub>3</sub> aq conc/dioxà (1:1); \*<sup>e</sup> DBU 0.5M en dioxà; \*<sup>f</sup> LiOH 0.25M en MeOH/dioxà/aigua (1.5:1.5:1);

Els tractaments amb el reactiu TBAF.3H<sub>2</sub>O en THF anhidre han permès establir una escala de labilitat dels grups protectors 3 - 6 de la Taula 3.4. L'ió fluorur en un medi anhidre es caracteritza per ser una base inductora de reaccions de deshidrohalogenació<sup>240</sup>, però a part ha demostrat ser un reactiu compatible amb l'estabilitat dels models Boc-Ser(p T-DMT)-NHcHex (**21** ; vegeu l'apartat 1.1 d'aquest Capítol). Aquest reactiu provoca l'eliminació dels grups 9-fluorenilmetil i 2-(4-acetil-3-nitrofenil)etil de forma pràcticament immediata. Els grups 2-cianoetil i 2-(4-nitrofenil)etil presenten una menor labilitat ja que són necessaris tractaments de 60 i 120 min respectivament, per a una desprotecció quantitativa.

Alternativament, encara que no són dades útils pel problema que s'ha plantejat, els grups 9-fluorenilmetil, 2-(4-nitrofenil)etil, 2-cianoetil i 2-(4-acetil-3-nitrofenil)etil poden ser eliminats per tractament amb DBU en dioxà. S'observa una diferència de labilitat apreciable entre els diferents grups, ja que si bé pel grup protector 9-fluorenilmetil la desprotecció és pràcticament immediata, pels altres grups protectors són necessàries més de 15 h.

El reactiu  $\text{NH}_3$  aquós concentrat en dioxà a temperatura ambient ha estat també assajat per a l'eliminació dels grups protectors 9-fluorenilmetil i 2-(4-acetil-3-nitrofenil)etil, respectivament. Pel primer grup, la desprotecció es produeix de forma pràcticament instantànea. L'eliminació del segon grup té lloc més lentament, ja que són necessaris 60 min, i a més es genera Boc-Asn-OH com a producte de desprotecció.

Les característiques de labilitat als diferents reactius junt a la disponibilitat comercial del derivat Boc-Asp(O $\text{Fm}$ )-OH, han estat les raons per les quals s'ha elegit el grup 9-fluorenilmetil per a la protecció del grup  $\beta$ -carboxil d'àcid aspàrtic en el primer esquema de síntesi convergent (Cap.1, apartat 1.2). Posteriorment, els problemes plantejats en la utilització dels pèptids protegits (Cap.1, apartat 3) per la seva baixa solubilitat en dissolvents usuals, han recomanat el canvi de grup protector de l'aminoàcid. Les opcions escollides han estat el grup benzil i per altra banda el grup 2-(4-acetil-3-nitrofenil)etil (vegeu més avall). No obstant, en l'esquema lineal de síntesi, en el qual no hi ha necessitat d'emprar com a intermedis els pèptids protegits (Cap.2, apartat 1), el grup protector 9-fluorenilmetil ha mostrat la seva utilitat en la síntesi dels nucleopèptids regioisòmers Phac-Ser(p CATCAT)-Gly-Asp-OH (**61a** i **61b**), en què l'eliminació del grup protector s'ha efectuat en la mateixa etapa de desancoratge per tractament amb TBAF.3H<sub>2</sub>O en THF anhidre.

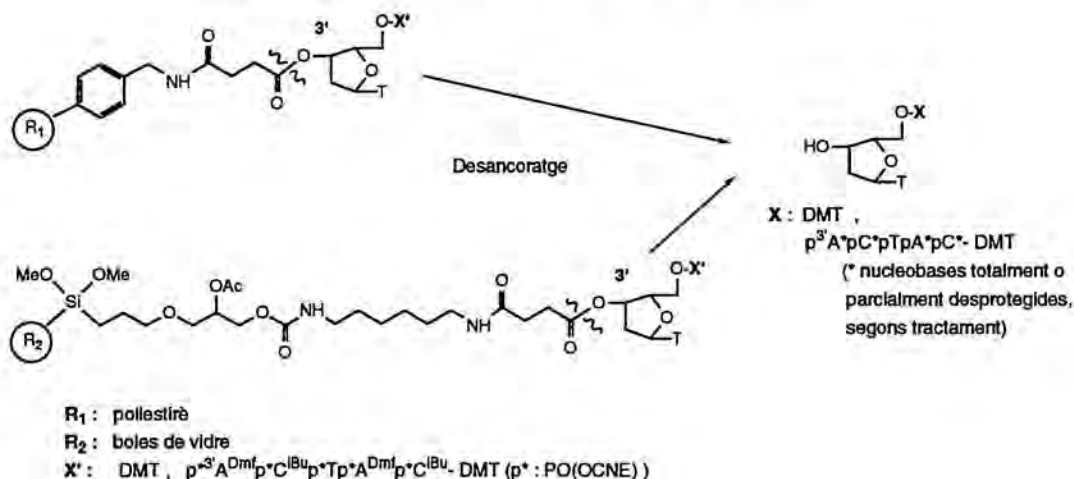
Les dades de labilitat al reactiu TBAF.3H<sub>2</sub>O en THF anhidre permeten contemplar el grup 2-(4-acetil-3-nitrofenil)etil com un grup alternatiu al grup 9-fluorenilmetil per a la protecció de l'àcid aspàrtic. S'ha mostrat igualment com un grup protector versàtil, ja que és làbil en altres condicions en temps suficientment curts encara que més llargs. La dada més favorable l'ofereix sens dubte el pèptid Ac-Ser-Gly-Asp(OAnpe)-NH<sub>2</sub> (**28b**), el qual presenta millor solubilitat que l'anàleg amb el grup protector 9-fluorenilmetil.

#### 1.4 Avaluació de la labilitat de la unió nucleòsid-(succinil-resina) a diferents tractaments bàsics :

La Taula següent resumeix el conjunt de proves realitzades en vistes a poder avaluar la labilitat de DMT-oligonucleotidil-(succinil-resines) a un ventall de possibles reactius de

desancoratge compatibles amb l'estabilitat dels models Boc-Ser(p T-DMT)-NHcHex (21; vegeu l'apartat 1.1 d'aquest Capítol). Els rendiments de desancoratge s'han calculat per mitjà de la determinació de la funcionalització de les resines en grups DMT, abans i després del tractament. Els resultats es comenten a continuació.

Figura 3.4 : Trencament de la unió nucleòsid-succinil-resina



Taula 3.5 : Labilitat de l'enllaç oligonucleòtid-(succinil-resina) a diferents tractaments bàsics.

Resina DMT-X-suc-R <sup>a</sup>		Tractament	t (min)	% Desanc.
X	R			
1.	HNCH <sub>2</sub> -PS	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> <sup>*b</sup>	180	100
	LCAA-CPG			
2.	HNCH <sub>2</sub> -PS	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> <sup>*b</sup>	360	90
	LCCA-CPG			
3.	HNCH <sub>2</sub> -PS  LCAA-CPG	TBAF <sup>*d</sup>	1	2
			60	20
			5	20
			30	100
4.	LCAA-CPG	LiOH <sup>*e</sup>	360	80
5.	HNCH <sub>2</sub> -PS	NH <sub>3</sub> aq <sup>*f</sup>	tamb.	10
			55°C	360
6.	HNCH <sub>2</sub> -PS	N <sub>2</sub> H <sub>4</sub> <sup>*g</sup>	tamb.	7
			55°C	900
7.	HNCH <sub>2</sub> -PS	etanolamina <sup>*h</sup>	tamb.	72
			55°C	240

Notes : <sup>a</sup> els % de desancoratge s'han determinat per la pèrdua de funcionalització de grups DMT de les resines; <sup>b</sup> K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.05 M en MeOH/dioxà (1:1); <sup>c</sup> resina 30b : protector dC iBu, protector dA Bz ; <sup>d</sup> TBAF.3H<sub>2</sub>O 0.01 M en THF anh; <sup>e</sup> LiOH 0.25 M en MeOH/dioxà/aigua (1.5:1.5:1); <sup>f</sup> NH<sub>3</sub> aq conc/dioxà (1:1); <sup>g</sup> N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 0.1 M en piridina/HAcO (4:1); <sup>h</sup> etilendiamina/dioxà 50%.

- Els primers assajos han consistit en avaluar els reactius  $K_2CO_3$  en MeOH/dioxà sobre suports de poliestirè o boles de vidre i LiOH en MeOH aquós sobre un suport de boles de vidre. En tots dos casos s'han aconseguit resultats satisfactoris d'alliberament per a temps de tractament no massa llargs, entre 3 i 6 h. Es pot observar que no existeixen diferències significatives depenent del tipus de resina, poliestirè o boles de vidre. A més, es constata que el desanclatge d'un únic nucleòsid és més ràpid que el d'un oligonucleòtid, malgrat haver utilitzat la mateixa concentració de reactiu.

- El reactiu TBAF·3H<sub>2</sub>O en THF anhidre produeix un baix alliberament d'oligonucleòtid d'un suport de poliestirè, pel que el seu ús s'ha limitat a l'eliminació de cert tipus de grups protectors, com ara el grup 2-(4-acetil-3-nitrofenil)etil de l'àcid aspàrtic en l'estratègia convergent (vegeu l'apartat 2 d'aquest Capítol). En el període de temps normalment necessari per a l'eliminació d'aquest grup protector, entre 1 i 5 min, el percentatge de desanclatge de producte és mínim, pel que l'eliminació de la resta de grups protectors i l'alliberament de resina es pot realitzar en una segona etapa amb un altre reactiu.

Si bé als primers intents de síntesi mitjançant l'estratègia convergent s'havia descartat utilitzar el suport de boles de vidre per la labilitat que presenta a TBAF, s'ha pogut comprovar que també és possible efectuar l'eliminació del grup protector 2-(4-acetil-3-nitrofenil)etil durant 1-2 min sense que es produeixi un desanclatge important de producte.

- Per al suport de poliestirè s'han avaluat altres tractaments diferents als esmentats. La utilització de NH<sub>3</sub> aquós concentrat en dioxà no és probablement una bona opció, ja que necessita un tractament a 55°C durant un llarg període de temps per a produir l'alliberament quantitatiu de l'oligonucleòtid. Aquest resultat contrasta amb el comportament que s'observa en les resines de boles de vidre, en què es pot efectuar el desanclatge d'un oligonucleòtid per tractament amb NH<sub>3</sub> aquós concentrat a temperatura ambient durant 1.5-2 h. Tot i que en el cas que es considera la concentració d'NH<sub>3</sub> és la meitat, hi ha dos factors que poden explicar els baixos rendiments de desanclatge a temperatura ambient en resines de poliestirè, per comparació amb les boles de vidre. En primer lloc, el medi polar del reactiu pot influir negativament en l'inflament adequat de la matriu polimèrica que ha de permetre l'accés del reactiu (vegeu al següent apartat, l'efecte del contingut d'aigua en els rendiments de desanclatge per tractament amb el reactiu de LiOH en MeOH/dioxà/aigua). D'altra banda, el desanclatge de l'oligonucleòtid de resines de boles de vidre ve facilitat pel fet que el braç aminoalquílic que funcionalitza les boles de vidre és de tipus silil, i per tant, és làbil a tractaments bàsics (vegeu Fig. 3.4).

- Altres reactius posats a prova, pel seu caràcter nucleòfil, són la hidrazina, emprada en algun dels intents precedents d'obtenció de nucleopèptids<sup>56,57</sup> i l'etilendiamina. Presenten a més



l'interès de ser reactius que eliminin els grups dimetilaminometilè<sup>141c</sup> que han estat avaluats com a grups protectors de les nucleobases. En cap dels dos casos no s'obtenen resultats satisfactoris, pel que han estat descartats.

### 1.5 Avaluació dels espaiadors bifuncionals NPE i Nbb per a la síntesi lineal de nucleopèptids en fase sòlida :

#### a) Avaluació de la labilitat als tractaments bàsics de la unió aminoàcid-resina

##### Boc-Gly-R-Leu-NHCH<sub>2</sub>-PS (R: NPE, Nbb) :

Dos han estat els espaiadors bifuncionals avaluats (Cap.2, apartat 1.2.b) :

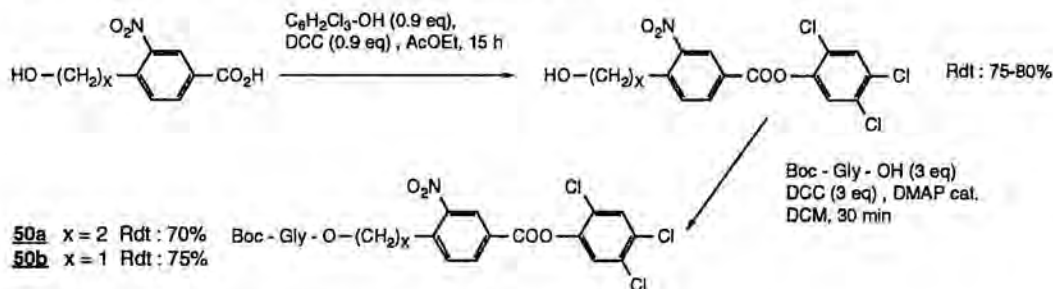
i) la unió 2-nitrofeniletíl (NPE)<sup>222,185</sup>.

ii) la unió 2-nitrobenzil (Nbb)<sup>225</sup>.

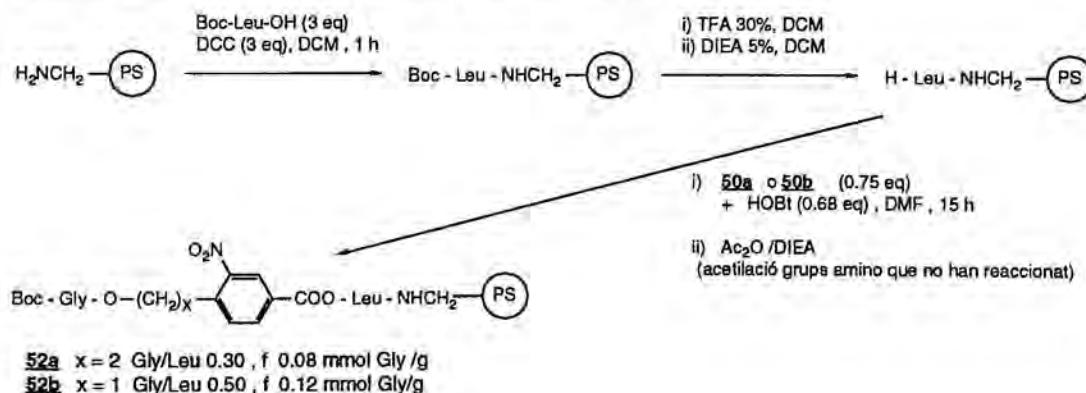
Per avaluar la labilitat de les respectives unions s'han sintetitzat les resines Boc-Gly-R-Leu-NHCH<sub>2</sub>-PS (R: NPE **52a**, Nbb **52b**), segons l'esquema que figura a continuació:

**Figura 3.5** : Obtenció de les resines Boc-Gly-R-Leu-NHCH<sub>2</sub>-PS

a) Obtenció dels derivats Boc-Gly-R-Tcp (R: NPE **50a**, Nbb **50b**) :



b) Obtenció de les resines Boc-Gly-R-Leu-NHCH<sub>2</sub>-PS (R: NPE **52a**, Nbb **52b**) :



S'ha partit del suport comercial aminometilpoliestirè, al què s'hi ha incorporat leucina per tal que actués com a aminoàcid de referència<sup>241</sup>. L'aminoàcid glicina s'ha ancorat a la resina en un procés de dues etapes. En la primera, s'ha obtingut un derivat ester activat (**50a,b**), per reacció de Boc-Gly-OH amb l'ester de 2,4,5-triclorofenil de l'espaiador bifuncional, H-NPE-OTcp (**49a**) o H-Nbb-OTcp (**49b**), en presència de DCC i DMAP. En la segona part, el derivat **50a** o **50b** s'ha incorporat sobre la resina H-Leu-NHCH<sub>2</sub>-PS en presència de HOBt com a catalitzador i DMF com a dissolvent, fent servir un defecte del derivat de l'aminoàcid i HOBt (en quantitats equimolars i 0.75 eq respecte la funció total en grups amino de la resina), al llarg de 15 h a temperatura ambient. D'aquesta manera s'aconsegueix una reducció de la funcionalització de la resina inicial fins a valors menors més adequats per a la síntesi del nucleopèptid, que en aquest cas ha resultat ser de 0.08 mmol Gly/g resina, amb una relació Gly/Leu de 0.30 per a la resina NPE **52a** i 0.12 mmol Gly/g, amb una relació Gly/Leu 0.50 per a la resina Nbb **52b**.

Les proves de labilitat han consistit en sotmetre les corresponents resines als diferents reactius bàsics a avaluar com a possibles tractaments de desancoratge. Els rendiments d'alliberament s'han quantificat per mitjà de l'anàlisi d'aminoàcids de la resina abans i després del tractament. El rendiment de desancoratge es pot calcular per comparació de les relacions Gly/Leu abans i després del tractament.

Els tractaments realitzats així com els resultats obtinguts es resumeixen a la següent taula :

*Taula 3.6 : Labilitat de la unió aminoàcid-resina  
 Boc-Gly-R-Leu-NHCH<sub>2</sub>-PS (R: Nbb **52a**, NPE **52b**) a diferents tractaments bàsics.*

Tractament		t (h)	% Desancoratge <sup>*a</sup>	
			resina Nbb <b>52a</b>	resina NPE <b>52b</b>
1. TBAF <sup>*d</sup>	0.01 M	0.5	82	100
	0.1 M	0.5	85	100
2. K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> <sup>*b</sup>		3	96	100
3. LiOH	0% H <sub>2</sub> O <sup>*c1</sup>	3	94	100
	5% H <sub>2</sub> O <sup>*c2</sup>	3	100	—
	25% H <sub>2</sub> O <sup>*c3</sup>	6	40	35
4. NH <sub>3</sub> aq <sup>*e</sup>	T. amb	3	34	0
	55°C	15	—	100

Notes : <sup>\*a</sup> determinats comparant la relació Gly/Leu abans i després del tractament; <sup>\*b</sup> K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.05 M en MeOH/dioxà (1:1); <sup>\*c</sup> LiOH.H<sub>2</sub>O 0.25M en MeOH/dioxà/aigua, <sup>\*c1</sup> (10:10:0), <sup>\*c2</sup> (10:10:1), <sup>\*c3</sup> (15:15:10); <sup>\*d</sup> TBAF.3H<sub>2</sub>O en THF anh; <sup>\*e</sup> NH<sub>3</sub> aq conc/dioxà (1:1), 1 mL.

De l'observació de les anteriors dades es dedueixen les següents conclusions :

• Les condicions més efectives per a aconseguir l'alliberament de l'aminoàcid són les realitzades amb TBAF·3H<sub>2</sub>O en THF, donat que s'aconsegueixen molt bons rendiments per a la resina Nbb (85%) i valors quantitius per a la resina NPE, per a tractaments curts i amb valors de concentració baixos com 0.01 M.

• El tractament de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en MeOH/dioxà 1:1, encara que necessita de temps més llargs, pràcticament 3 h, també provoca un desancoratge quantitiu.

• El reactiu LiOH en MeOH/dioxà/aigua (1.5:1.5:1) mostra ser poc efectiu per a aconseguir el desancoratge de l'aminoàcid fins i tot per a temps molt llargs (6 h). Adduint-ho a un defectuós inflament de la resina pel contingut d'aigua, s'han assajat tractaments en què s'ha reduït el percentatge d'aigua. Els resultats milloren considerablement per a la resina Nbb en rebaixar el contingut d'aigua fins al 5% o bé eliminant-la completament de la composició del dissolvent, ja que en la meitat de temps del tractament anterior (3 h) s'aconsegueixen rendiments pràcticament quantitius. No obstant, aquestes noves condicions de tractament han estat descartades donat que provoquen un ràpid trencament de l'enllaç fosfat en els models Boc-Ser(p T-DMT)-NHcHex **21** (vegeu l'apartat 1.1 d'aquest Capítol).

• El tractament amb NH<sub>3</sub> aquós concentrat en dioxà a temperatura ambient pràcticament no produeix desancoratge per a la resina NPE **52a**, i molt baix rendiment per a la resina Nbb **52b**. Només s'aconsegueix un trencament quantitiu de la unió NPE per escalfament a 55°C durant un llarg període de temps (15 h).

• Les unions NPE i Nbb presenten característiques de labilitat força semblants, a excepció potser del tractament amb NH<sub>3</sub> aquós concentrat.

La unió NPE ha estat finalment escollida per a efectuar la síntesi dels nucleopèptids (Cap.2, apartat 1.2.b).

#### **b) Avaluació de la unió NPE per a l'obtenció del pèptid Phac-Phe-Val-Ser-Gly-X (**54**) :**

Dos són els factors que no havent estat avaluats en les anteriors proves s'ha cregut necessari estudiar :

• L'efecte de les condicions bàsiques d'alliberament sobre l'homogeneïtat del pèptid alliberat com a conseqüència de possibles fenòmens de racemització o de trencament dels enllaços amida.

• El tipus de funcionalitat en l'extrem C-terminal, la qual depèn del mecanisme de trencament de l'enllaç del pèptid i l'espaiador bifuncional. És d'esperar que la labilitat de la unió NPE per un

mecanisme de  $\beta$ -eliminació assegurí l'obtenció d'un grup carboxilat C-terminal, però aquest fet no ha estat comprovat.

Per a l'avaluació d'aquests factors s'ha cregut útil efectuar les corresponents proves d'alliberament d'un pèptid d'una peptidil-NPE-resina en les condicions de desancoratge dels experiments precedents. Per a tal fi, s'ha escollit la peptidil-resina Phac-Phe-Val-Ser-Gly-NPE-Leu-NHCH<sub>2</sub>-PS (53), que ha estat utilitzada per a l'obtenció del nucleopèptid Phac-Phe-Val-Ser(p<sup>3'</sup>ACT)-Gly-OH (56; Cap.2, apartat 2). El cru alliberat ha estat analitzat per HPLC en fase reversa, i una vegada aïllat i purificat, caracteritzat per tècniques espectroscòpiques.

Els assajos realitzats amb els diferents reactius bàsics es resumeixen a la següent taula, i són objecte de comentari a continuació :

*Taula 3.7 : Alliberament de pèptid de la resina  
 Phac-Phe-Val-Ser-Gly-NPE-Leu-NHCH<sub>2</sub>-PS 53 amb diferents tractaments bàsics :*

Tractament	t (h)	% Desanc.	Productes / (%) <sup>a</sup>
1. TBAF <sup>b</sup>	0.5	100	R-OH
2. K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> <sup>c</sup>	5	100	R-OH (75) R-OMe (25)
3. LiOH <sup>d</sup>	15	30	R-OH
4. NH <sub>3</sub> aq <sup>e</sup>	tamb	< 5	---
	55°C	15	R-NH <sub>2</sub> (80) R-OH (20)

Notes : <sup>a</sup> el tipus de producte (R: Phac-Phe-Val-Ser-Gly-) s'ha determinat per anàlisi HPLC dels filtrats de tractament; <sup>b</sup> TBAF.3H<sub>2</sub>O 0.01 M en THF anh; <sup>c</sup> K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.05 M en MeOH/dioxà (1:1); <sup>d</sup> LiOH 0.25 M en MeOH/dioxà/aigua (1.5:1.5:1); <sup>e</sup> NH<sub>3</sub> aq conc/dioxà (1:1).

- El tractament amb el reactiu TBAF en THF permet un alliberament ràpid i quantitatiu del pèptid, sense que s'observi una disminució de l'eficàcia respecte als resultats observats per a Boc-Gly-NPE-R. El pèptid alliberat és homogeni per anàlisi per HPLC en fase reversa (t<sub>R</sub> 18.8 min) i ha pogut ser caracteritzat per EM-FAB com el derivat àcid C-terminal (m/z 549.8 [M+Na]<sup>+</sup>, 527.6 [M+H]<sup>+</sup>), el que confirma un mecanisme de trencament de l'enllaç ester de nitrofeniletíl entre el pèptid i la resina per un procés de  $\beta$ -eliminació (Fig. 3.6) .

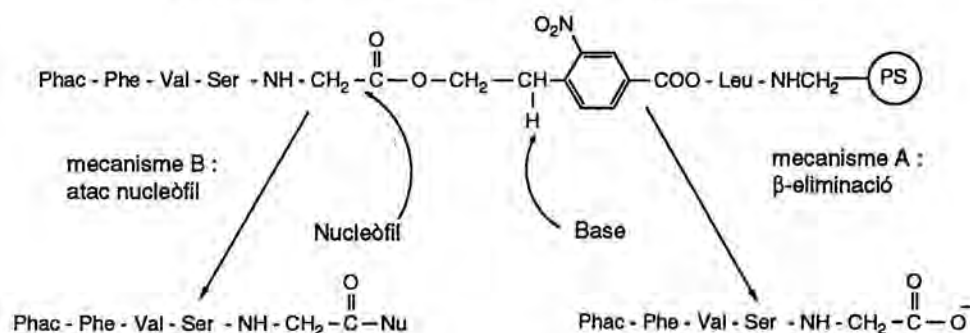
- En tractar la resina amb el reactiu K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en MeOH/dioxà durant 5 h, es produeix un desancoratge quantitatiu de pèptid. Analitzant el cru per HPLC en fase reversa, s'hi poden observar dos productes. El majoritari, present en un 75%, es correspon per coelució (t<sub>R</sub> 18.7 min) amb el derivat àcid C-terminal. El producte minoritari, aproximadament un 25% del cru i que apareix més retintut

en les condicions d'anàlisi ( $t_R$  20.4 min), una vegada aïllat, ha pogut ser caracteritzat mitjançant EM-FAB com el corresponent derivat ester metílic ( $m/z$  563.1  $[M+Na]^+$ ). Aquesta barreja de productes es pot explicar per un doble mecanisme d'alliberament del pèptid de la resina, que si bé procedeix majoritàriament per escissió de l'enllaç ester per  $\beta$ -eliminació, es produeix també per atac nucleòfil de l'ió metòxid sobre el grup carboxil C-terminal, com es mostra a la Figura 3.6:

- El tractament amb LiOH en MeOH/dioxà/aigua produeix, a similitud de les proves realitzades amb la resina Boc-Gly-NPE-R, un alliberament de producte molt baix (30% en 15 h). El cru alliberat, analitzat per HPLC, presenta però el derivat àcid C-terminal com a únic producte i amb un grau d'homogeneïtat acceptable.

- Com havia succeït en les proves amb la resina Boc-Gly-NPE-R, l'enllaç és pràcticament estable al tractament amb  $NH_3$  aquós concentrat en dioxà a temperatura ambient, però s'aconsegueix un desancoratge quantitatiu en ser sotmesa la resina a  $55^\circ C$ . El cru alliberat mostra per anàlisi per HPLC en fase reversa dos productes de característiques cromatogràfiques molt similars (maj.:  $t_R$  18.0 min, min.:  $t_R$  18.8 min), dels quals, el minoritari (aproximadament un 20%) coelueix amb el derivat àcid C-terminal del pèptid. El producte majoritari ha estat aïllat, i, havent-ne enregistrat un espectre per EM-FAB, s'ha pogut caracteritzar com el derivat amida C-terminal del pèptid ( $m/z$  548.3  $[M+Na]^+$ , 526.2  $[M+H]^+$ ). La raó a la qual atribuir l'aparició d'aquest producte com a producte majoritari cal probablement buscar-la en el caràcter nucleòfil i poc bàsic de l'amoniac en dissolució aquosa.

Figura 3.6 : Mecanismes d'escissió de la unió pèptid-NPE-resina



D'acord amb aquests resultats es pot concloure que les millors condicions per a produir l'alliberament del pèptid són el tractament amb TBAF en THF anhidre (reactiu 3; Taula 3.7) ja que, a part de permetre desancoratges quantitativament en períodes de temps curts i en condicions suaus, el producte alliberat presenta un grau d'homogeneïtat adequada. Com ja ha estat comentat (Cap.2), aquestes condicions han estat posteriorment utilitzades per a produir, en una primera etapa de tractament, el desancoratge i desprotecció parcial dels nucleopèptids en l'esquema lineal de síntesi.

## 2. Obtenció de derivats d'aminoàcid emprats a la síntesi de nucleopèptids.

### Disseny i avaluació del grup 2-(4-acetil-3-nitrofenil)etil com a nou grup protector

#### del grup $\beta$ -carboxil de l'àcid aspàrtic i $\gamma$ -carboxil de l'àcid glutàmic en síntesi de pèptids :

Com a part del desenvolupament de l'estratègia convergent s'ha plantejat la necessitat d'avaluar diferents grups protectors per al grup  $\beta$ -carboxil de l'àcid aspàrtic com a forma de millorar les propietats de solubilitat dels pèptids protegits utilitzats en aquesta estratègia com a intermedis. Com es comenta en altres parts d'aquesta Memòria (Cap.1, apartat 3.1 i 3.3), una de les opcions ha consistit en desenvolupar un nou grup protector<sup>160</sup>, el grup 2-(4-acetil-3-nitrofenil)etil, el qual ha estat escollit per les propietats de labilitat a diferents tractaments bàsics per comparació amb altres grups protectors (vegeu l'apartat 1.3 d'aquest Capítol).

Tot això ha comportat l'obtenció dels diferents productes següents i la realització de diverses proves d'estabilitat, la discussió dels quals s'ha pensat agrupar en el present apartat de la següent manera :

i) L'1-[4-(2-hidroxietil)-3-nitrofenil]-1-etanona (**64**), utilitzada com a intermedi en l'obtenció dels derivats protegits de l'àcid aspàrtic i de l'àcid glutàmic amb el grup protector 2-(4-acetil-3-nitrofenil)etil.

ii) Els derivats  $\beta$ -ester 2-(4-acetil-3-nitrofenil)etilic (**67**), 2-cianoetilic (**65**) i 2-(4-nitrofenil)etilic (**66**) de l'àcid  $N^{\alpha}$ -*t*-butoxicarbonil-L-aspàrtic, i  $\gamma$ -ester 2-(4-acetil-3-nitrofenil)etilic de l'àcid  $N^{\alpha}$ -*t*-butoxicarbonil-L-glutàmic (**68**). També s'inclouen els intents d'obtenció dels derivats  $\beta$ -ester 2-(2,4-dinitrofenil)etilic i 2-nitrofeniletílic de l'àcid  $N^{\alpha}$ -*t*-butoxicarbonil-L-aspàrtic, els quals no han pogut ser sintetitzats per la seva extraordinària labilitat.

iii) Avaluació de l'estabilitat del grup protector 2-(4-acetil-3-nitrofenil)etil als reactius habitualment utilitzats en el mètode de síntesi de pèptids que empra Boc-aminoàcids.

### 2.1 Obtenció de l'1-[4-(2-hidroxietil)-3-nitrofenil]-1-etanona (**64**) :

La impossibilitat de poder arribar a la síntesi dels derivats Boc-Asp(ODnpe)-OH i Boc-Asp(ONe)-OH per l'extraordinària labilitat dels grups protectors a les pròpies condicions

d'obtenció han dut definitivament a descartar-los per a la protecció del residu d'àcid aspàrtic (vegeu a continuació). Les dues altres alternatives que en un principi havien estat plantejades, els grups 2-cianoetil i 2-(4-nitrofenil)etil, pels quals s'ha pogut arribar a sintetitzar els corresponents derivats protegits, han demostrat ser massa estables a les proves de labilitat (vegeu la Taula 3.4, apartat 1.3 d'aquest Capítol). Tot plegat ha fet pensar que :

- i) la substitució del grup fenil amb dos grups electronegatius provoca un gran augment de la labilitat.
- ii) el grup nitro incrementa extraordinàriament la labilitat del grup protector respecte al que conté el grup 2-cianoetil com a substituent.

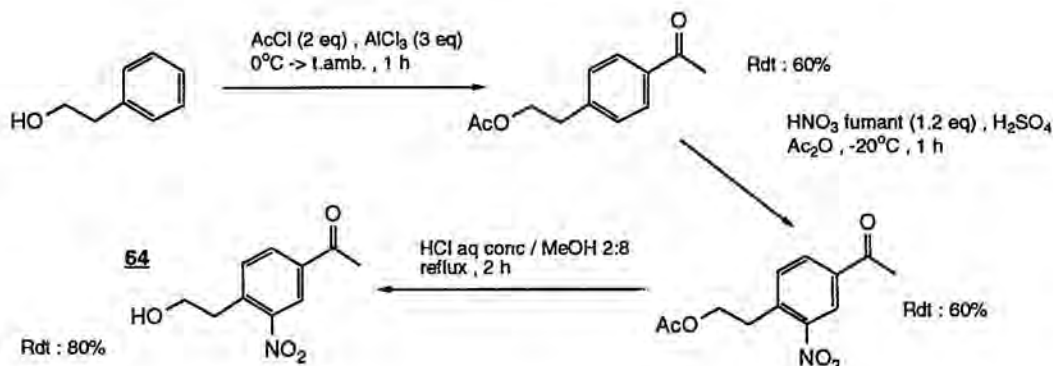
Això ha dut a pensar que un grup protector òptim hauria de comptar amb un grup feniletíl, doblement substituït en l'anell aromàtic, possiblement per un grup nitro i un altre grup menys electronegatiu en les posicions orto i para, per les quals l'efecte inductiu sobre el carboni directament unit a l'anell és màxim. Amb aquests criteris i duent a terme una elecció convenient dels grups que simplifiqués l'obtenció del corresponent alcohol feniletílic (vegeu el següent subapartat), dues opcions han estat contemplades :

- i) un grup cloro o bromo-nitrofeniletíl.
- ii) un grup acetilnitrofeniletíl.

• Els intents d'obtenció d'un derivat d'alcohol cloro o bromo-nitrofeniletílic han estat tots ells infructuosos. Ja sigui per nitració d'un acetat de *p*-clorofeniletíl, o per bromació de l'acetat de *p*-nitrofeniletíl no s'han obtingut sinó barreges d'isòmers difícils d'aïllar i purificar.

• L'obtenció de l'1-[4-(2-hidroxietil)-3-nitrofenil]-1-etanona (**64**) s'ha pogut resoldre mitjançant un procediment de tres etapes resumit a la següent figura :

*Figura 3.7 : Obtenció de l'1-[4-(2-hidroxietil)-3-nitrofenil]-1-etanona*

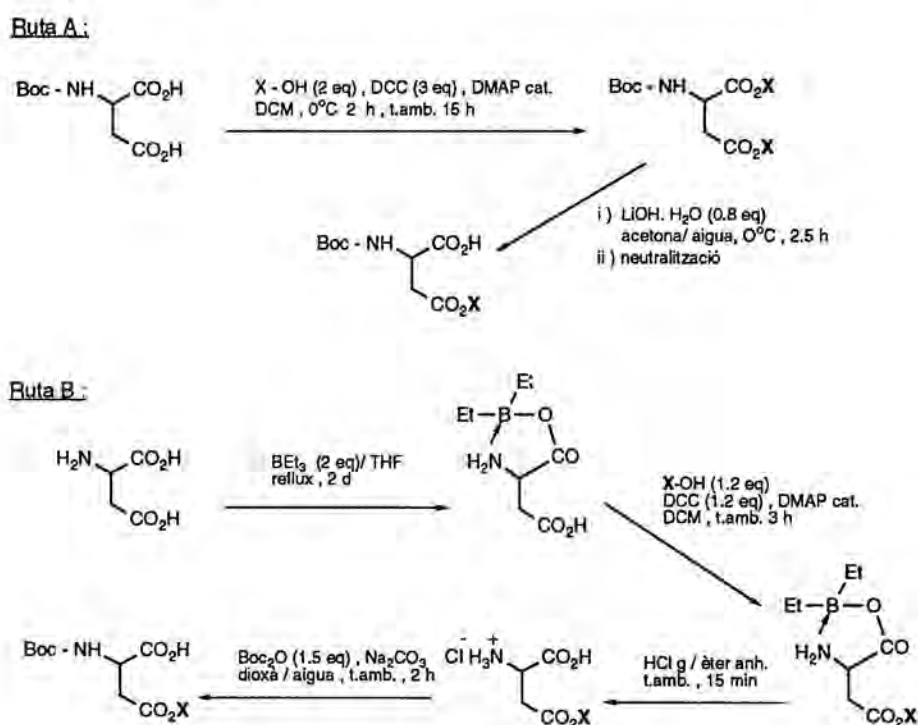


En una primera etapa el feniletanol s'ha acetilat amb el clorur d'acetil i  $\text{AlCl}_3$  per a donar l'acetat de *p*-acetilfeniletil. El següent pas ha correspost a la nitració del grup fenil amb  $\text{HNO}_3$  fumant i  $\text{H}_2\text{SO}_4$  en  $\text{Ac}_2\text{O}$ , el que ha permès obtenir l'acetat de 2-(4-acetil-2-nitrofenil)etil. En la darrera etapa s'ha hidrolitzat l'acetat amb  $\text{HCl}$  conc en  $\text{MeOH}$ . El producte **64** s'ha obtingut amb un rendiment global acceptable (25% a partir de feniletanol).

## 2.2 Obtenció dels derivats $\beta$ -ester de l'àcid $\text{N}^\alpha$ -*t*-butoxicarbonilaspàrtic Boc-Asp(OX)-OH i $\gamma$ -ester de l'àcid $\text{N}^\alpha$ -*t*-butoxicarbonilglutàmic Boc-Glu(OX)-OH :

Els derivats  $\beta$ -ester de l'àcid  $\text{N}^\alpha$ -*t*-butoxicarbonilaspàrtic ja esmentats s'han intentat sintetitzar mitjançant dos mètodes, que s'esquematitzen a continuació :

*Figura 3.8 : Mètodes d'obtenció dels derivats Boc-Asp(OX)-OH*



El mètode A consta de dues etapes<sup>242,243</sup>. S'obté en primer lloc un derivat diester de Boc-Asp-OH, per reacció amb un excés del corresponent alcohol en presència de DCC i quantitats catalítiques de DMAP. En la segona part, s'efectua una hidròlisi selectiva del grup  $\alpha$ -ester per tractament amb una quantitat limitada de  $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$  en aigua i acetona (0.8 eq).



El mètode B és un procediment en quatre etapes<sup>244</sup>. En la primera s'efectua la protecció simultània dels grups  $\alpha$ -amino i  $\alpha$ -carboxil de l'àcid aspàrtic, amb la formació d'un derivat oxazaboralà per reacció amb  $\text{BEt}_3$  seguint una metodologia ja descrita<sup>245</sup>. A continuació s'efectua l'esterificació del grup  $\beta$ -carboxil amb un lleuger excés del corresponent alcohol, DCC i quantitats catalítiques de DMAP. Obtingut l'ester, s'hidrolitza l'oxazaboralà amb bombolleig d'HCl g durant 10 min. El producte final, Boc-Asp(OX)-OH, s'obté per reacció de l'aminoàcid H-Asp(OX)-OH amb un petit excés de dicarbonat de di-*t*-butil en medi bàsic (pH 9)<sup>246</sup>.

•No tots els derivats Boc-Asp(OX)-OH han pogut ser obtinguts. Ha resultat impossible sintetitzar els derivats Boc-Asp(ODnpe)-OH i Boc-Asp(ONe)-OH per qualsevol de les dues rutes abans esmentades. Pel mètode A, una vegada obtingut el corresponent derivat diester Boc-Asp(OX)<sub>2</sub>, no ha estat possible dur a terme l'etapa de desprotecció parcial (etapa 2) que condueix a Boc-Asp(OX)-OH ja que es produeix la hidròlisi no selectiva de tots dos grups ester. En intentar la síntesi per la ruta B, el medi bàsic lleugerament bàsic (pH 8-9) necessari per a la introducció del grup Boc (etapa 4) sobre el derivat H-Asp(OX)-OH provoca igualment la pèrdua dels grups protectors.

•S'ha sintetitzat el derivat Boc-Asp(OCNE)-OH per la ruta A i el derivat Boc-Asp(ONpe)-OH a través de la ruta B.

•El derivat Boc-Asp(OAnpe)-OH ha estat preparat per totes dues rutes, amb rendiments similars (ruta A : 52%, ruta B : 46%), encara que la ruta B ha mostrat donar un producte de major puresa.

Un cop establerta la utilitat del nou grup protector, perquè és estable a les condicions de síntesi de pèptids (vegeu a continuació) i és làbil a tractaments que poden ser utilitzats en la fase final de desprotecció del nucleopèptid (vegeu l'apartat 1.3 d'aquest Capítol), s'ha volgut comprovar la possibilitat d'obtenir el derivat de l'altre residu amb un grup carboxil en la cadena lateral, l'àcid glutàmic. El derivat Boc-Glu(OAnpe)-OH ha pogut ser sintetitzat per la ruta B, de forma totalment equivalent a l'anàleg d'àcid aspàrtic, amb un bon rendiment (30%).

### 2.3 Avaluació de l'estabilitat del grup protector 2-(4-acetil-3-nitrofenil)etil als reactius emprats en la síntesi de pèptids :

Una vegada realitzades les proves de labilitat dels grups protectors que indiquen la utilitat del grup 2-(4-acetil-3-nitrofenil)etil com a alternativa al grup 9-fluorenilmetil, s'ha volgut comprovar l'estabilitat als reactius del cicle de síntesi de pèptids que empra  $\text{N}^\alpha$ -Boc-aminoàcids. No s'ha observat pèrdua significativa del grup protector 2-(4-acetil-3-nitrofenil)etil en el derivat

Boc-Asp(OAnpe)-OH en ser sotmès a les solucions de DIEA 5% en DCM i TFA 30% en DCM fins i tot després de 24 h.

El grup protector 2-(4-acetil-3-nitrofenil)etil també ha demostrat ser perfectament estable a les condicions habituals de desancoratge dels pèptids de la resina mitjançant l'estratègia Boc<sup>64e</sup>, per tractament amb HF/anisole (9:1) a 0°C durant 1 h.

### 3. Obtenció de derivats de nucleòsid emprats en la síntesi dels nucleopèptids :

Al llarg del treball realitzat ha estat necessari sintetitzar diferents derivats de nucleòsid O-(2-cianoetil)-N,N-diisopropilfosforamidit, per a ser emprats com a intermedis en la síntesi de la part oligonucleotídica dels nucleopèptids. En el present apartat es descriu l'obtenció de dos grups diferents de derivats :

i) els derivats 3'-fosforamidit dels nucleòsids 5'-O-dimetoxitritil-4-N-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-2'-desoxicitidina (**84a**) i 5'-O-dimetoxitritil-2-N-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-2'-desoxiadenosina (**84b**), i que han estat utilitzats en moments diversos en els intents realitzats amb l'estratègia convergent.

ii) els derivats 5'-fosforamidit dels nucleòsids 3'-O-dimetoxitritilimidina (**89a**), 3'-O-dimetoxitritil-4-N-isobutiril-2'-desoxicitidina (**89b**) i 3'-O-dimetoxitritil-2-N-dimetilaminometilen-2'-desoxiadenosina (**89c**), que han estat emprats en la síntesi del nucleopèptid Phac-Ser(p<sup>5'</sup>CATCAT)-Gly-Asp-OH mitjançant l'estratègia lineal.

#### 3.1 Obtenció dels derivats 3'-O-(2-cianoetil)-N,N-diisopropilfosforamidit dels nucleòsids 5'-O-dimetoxitritil-4-N-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-2'-desoxicitidina i 5'-O-dimetoxitritil-2-N-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-2'-desoxiadenosina (**84a**, **84b**)

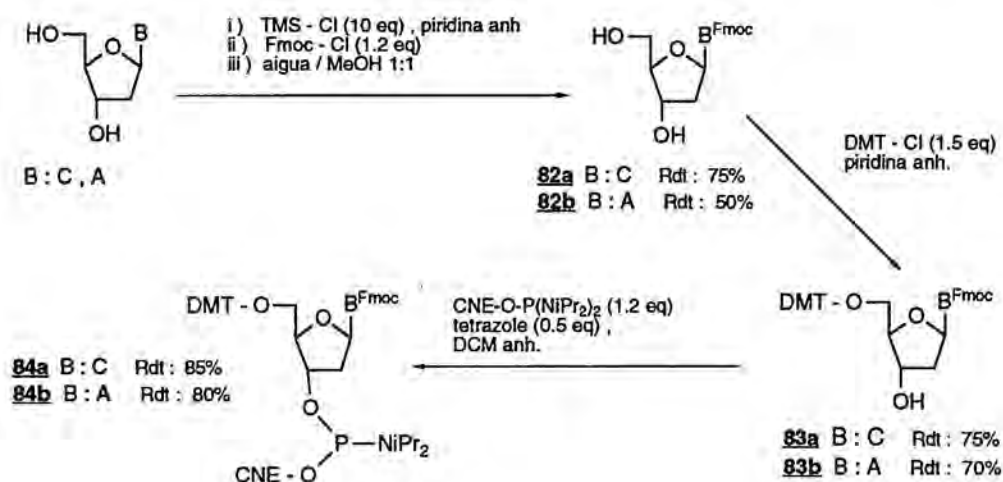
El primer esquema de protecció assajat en l'estratègia convergent (Cap.1, apartat 1.2.d) s'ha basat en l'ús del grup protector 9-fluorenilmetoxicarbonil<sup>143-145</sup> per a la protecció de les nucleobases. Aquesta decisió ha comportat la síntesi dels derivats 3'-O-(2-cianoetil)-N,N-diisopropilfosforamidit dels nucleòsids 5'-O-dimetoxitritil-4-N-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-2'-desoxicitidina (**84a**) i 5'-O-dimetoxitritil-2-N-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-2'-desoxiadenosina (**84b**), intermedis que han estat utilitzats en la síntesi dels oligonucleòtids.

Per a l'obtenció dels derivats s'ha seguit l'esquema de síntesi que es resumeix a la Figura 3.9, basat essencialment en procediments establerts :

Els derivats  $dC^{Fmoc}$  i  $dA^{Fmoc}$  (**82a,b**) s'han obtingut en un sol pas sense aïllament d'intermedis<sup>144b</sup>. Primer, els grups hidroxil han estat protegits temporalment amb el grup trimetilsilil, per reacció del nucleòsid amb un excés de TMS-Cl en piridina anhidra durant 15 min. A continuació, s'ha introduït el grup protector 9-fluorenilmetoxicarbonil, addicionant Fmoc-Cl a la barreja de reacció, i s'ha deixat reaccionar durant 2 h. Finalment s'han hidrolitzat els grups trimetilsilil per addició a la barreja de reacció d'una dissolució d'aigua/MeOH 1:1. Els productes s'han recuperat per evaporació del dissolvent, i precipitació pel derivat de desoxicitidina o extracció pel derivat de desoxiadenosina. En aquest darrer cas, cal separar el producte  $dA^{(Fmoc)_2}$  (aprox. 10-15%) per cromatografia en columna de gel de sílice. Els productes s'han obtingut amb rendiments acceptables.

A continuació s'ha introduït el grup dimetoxitritil sobre l'hidroxil primari per reacció dels nucleòsids amb un petit excés de DMT-Cl en piridina anhidra al llarg d'una nit. Els productes (**83a,b**) han estat purificats sobre columna de gel de sílice i precipitats en hexà, obtenint-se tots dos derivats amb rendiments moderats. Finalment, s'han obtingut els derivats 3'-O-(2-cianoetil)-N,N-diisopropilfosforamidit (**84a,b**) per reacció amb un petit excés de (2-cianoetoxi)-bis(N,N-diisopropilamino)fosfina en presència de tetrazole<sup>173</sup> en DCM anhidre. Els productes, un cop precipitats i assecats, mostren per <sup>31</sup>P RMN el grau de puresa adequat per a la seva utilització en la síntesi dels oligonucleòtids.

Figura 3.9 : Obtenció dels derivats  
 $5'$ -DMT- $dC^{Fmoc}$ - $3'$ -P(OCNE)NiPr<sub>2</sub> i  $5'$ -DMT- $dA^{Fmoc}$ - $3'$ -P(OCNE)NiPr<sub>2</sub>



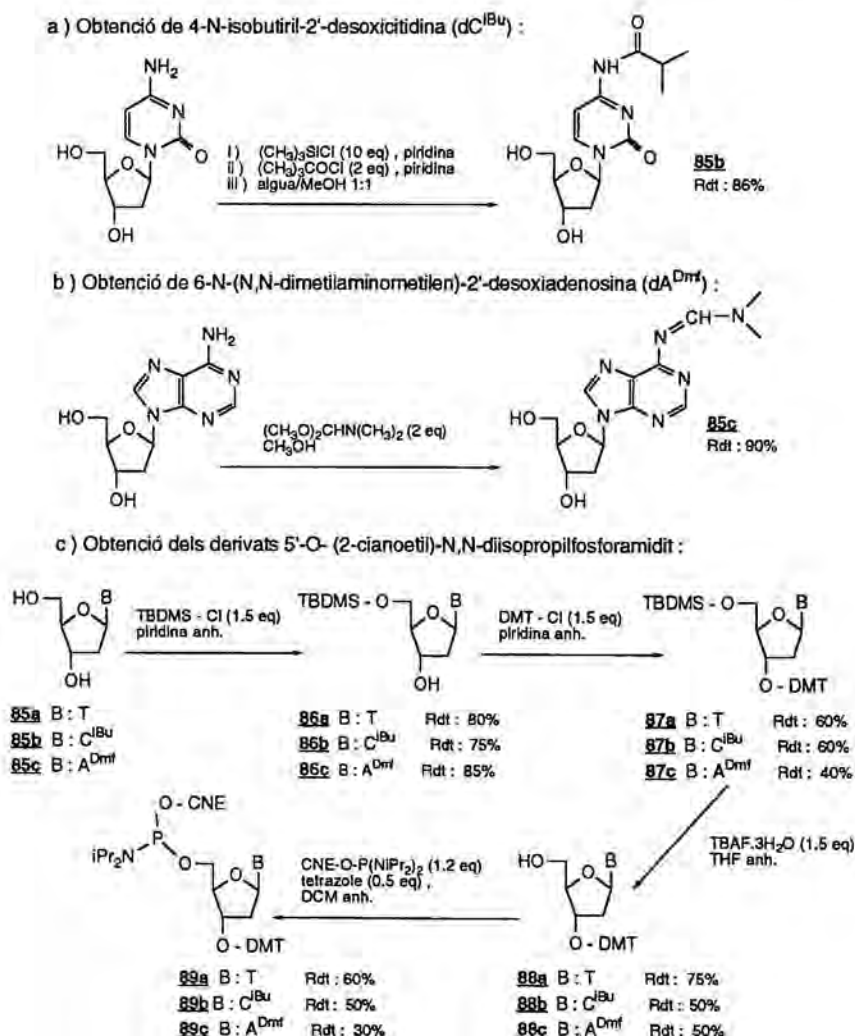
**3.2 Obtenció dels derivats 5'-O-(2-cianoetil)-N,N-diisopropilfosforamidit dels nucleòsids 3'-O-dimetoxitritilimidina (89a), 3'-O-dimetoxitritil-4-N-isobutiril-2'-desoxicitidina (89b) i 3'-O-dimetoxitritil-2-N-dimetilaminometilen-2'-desoxiadenosina (89c) :**

En plantejar-se la síntesi de nucleopèptids per una estratègia lineal, i en particular del nucleopèptid Phac-Ser(p<sup>5</sup>CATCAT)-Gly-Asp-OH (Cap.2, apartat 3), ha calgut utilitzar nucleòsids 5'-fosforamidit com a intermedis a l'etapa de perllongament de l'oligonucleòtid. Havent-se elegit els grups isobutiril per a la protecció de citosina, i el grup dimetilaminometilè per a adenina, s'ha hagut de realitzar l'obtenció dels corresponents nucleòsids, que fins al moment no havien estat descrits. El derivat de timidina, que és un producte comercial, també ha estat sintetitzat.

L'esquema que s'ha seguit per a l'obtenció dels corresponents 3'-O-dimetoxitritil-nucleòsids 5'-fosforamidit queda resumit a continuació :

*Figura 3.10 : Obtenció dels derivats*

*5'-iPr<sub>2</sub>N(CNEO)P-T-3'-DMT, 5'-iPr<sub>2</sub>N(CNEO)P-dC<sup>iBu</sup>-3'-DMT i 5'-iPr<sub>2</sub>N(CNEO)P-dA<sup>Dmf</sup>-3'-DMT*



L'obtenció de qualsevol derivat fosforilat de nucleòsid comporta en primer lloc la introducció dels grups protectors sobre els grups amino exocíclics de les nucleobases, que per la seva major nucleofília interferirien en les etapes de protecció dels grups hidroxil. En el cas que es considera, la protecció amb el grup isobutiril de citosina i dimetilaminometilè per a adenina s'ha realitzat segons procediments descrits<sup>136,141</sup>. Per un costat, partint de desoxicitidina, i en un procediment sense aïllament d'intermedis, s'han protegit els grups hidroxil de forma temporal com a trimetilsilil èters per reacció amb clorur de trimetilsilil en piridina, s'ha introduït aleshores la protecció del grup amino per reacció amb clorur d'isobutiril, i s'han alliberat finalment els grups hidroxil per hidròlisi dels grups silil. El producte (**85b**), que s'ha obtingut per precipitació, s'ha utilitzat directament en les següents etapes. El grup amino de desoxiadenosina es pot protegir directament en una única etapa per reacció amb el dimetilacetal de la N,N-dimetilformamida en MeOH anhidre. El producte (**85c**) s'ha obtingut per evaporació directa de la solució amb el grau de puresa suficient.

Els nucleòsids 5'-fosforamidit s'han sintetitzat per un procediment en quatre etapes. En un primer pas s'ha efectuat la protecció temporal del grup hidroxil primari dels nucleòsids (T, dCiBu, dADmf) en forma de *t*-butildimetilsililèter (derivats **86**) per reacció amb un petit excés del clorur de *t*-butildimetilsilil<sup>247</sup> en piridina durant una nit. La reacció comporta l'aparició d'un petit percentatge de producte disililat a l'hidroxil 3' i 5' (5-10%), que es pot separar fàcilment per cromatografia de columna. La següent etapa ha consistit en la protecció del grup hidroxil secundari amb el grup dimetoxitritil (derivats **87**), grup protector temporal dels grups hidroxil en el cicle de síntesi dels oligonucleòtids, i que s'ha realitzat per reacció amb un petit excés del clorur de dimetoxitritil<sup>133</sup> en piridina anhidra al llarg d'una nit. A continuació s'ha dut a terme l'etapa d'eliminació del protector silil (derivats **88**) per tractament amb TBAF.3H<sub>2</sub>O en THF anhidre al llarg de 2 h<sup>248</sup>. La darrera etapa del procediment ha estat la fosfitilació de l'hidroxil primari (derivats **89**) per reacció amb (2-cianoetoxi)-bis(N,N-diisopropilamino)fosfina en presència de tetrazole<sup>173</sup>.

En general els rendiments de les reaccions efectuades han estat acceptables excepte pels derivats de 6-N-dimetilaminometilen-2'-desoxiadenosina. Aquest resultat es podria intentar relacionar amb l'observació manifestada per certs autors<sup>141c</sup> en què es mencionen problemes d'estabilitat dels derivats formamidina enfront de grups àcids. En el cas que es considera, però, les purificacions per columna sempre han estat realitzades afegint un petit percentatge de Et<sub>3</sub>N (2-5%), per altra part necessària per la presència en la molècula dels grups dimetoxitritil, també làbils als àcids. Malgrat tot, els derivats fosforamidit dels nucleòsids protegits, així com els corresponents derivats fosforamidit han demostrat ser perfectament estables s'han conservat com a sòlids a 4°C i han estat emprats sense problemes en l'obtenció del nucleopèptid Phac-Ser(p<sup>5</sup>CATCAT)-Gly-Asp-OH (**56**, Cap.2, apartat 3).

Aquets derivats han estat obtinguts amb l'ajut de László Kiss, estudiant de la Universitat de Budapest (Hongria), durant una estada en el nostre laboratori (Febrer-Abril 1993) dins d'un programa Tempus.

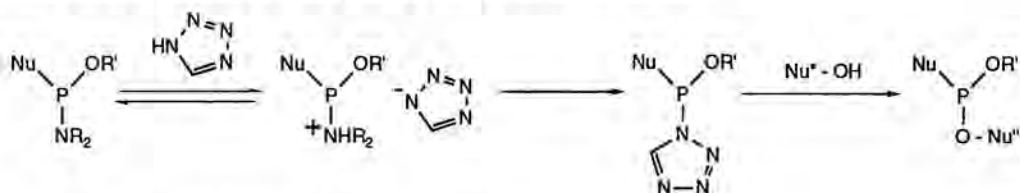
#### 4. Obtenció de nucleòsids 3'-N,N-dialquil-H-fosfonamidat.

Avaluació com a intermedis en la síntesi dels oligonucleòtids :

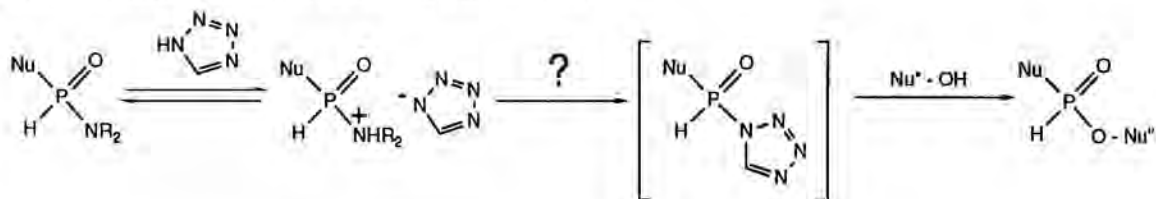
Una reacció secundària observada durant els acoblaments dels pèptids fosforamidit sobre les oligonucleotidil-resines en l'esquema convergent de síntesi (vegeu l'apartat 3.3 del Capítol 1) ha estat la fosforilació de l'oligonucleòtid per part de H-PO(OCNE)NiPr<sub>2</sub> **72** en presència d'*o*-nitrofeniltetrazole. Aquest subproducte, que es trobava en grans quantitats en les primers intents realitzats, prové de la hidròlisi de l'excés de Cl-P(OCNE)NiPr<sub>2</sub> o de (CNEO)-P(NiPr<sub>2</sub>)<sub>2</sub>, utilitzats en l'obtenció del derivat fosforamidit del pèptid.

*Figura 3.11 : Comparació de la reactivitat pels derivats N,N-dialquilfosforamidit i pels derivats N,N-dialquil-H-fosfonamidat*

a) Mecanisme de formació de l'enllaç fosfit per mitjà de derivats fosforamidit :



b) Possible mecanisme de reacció dels derivats H-fosfonamidat :



La reacció de l'H-fosfonamidat H-PO(OCNE)NiPr<sub>2</sub> **72** en presència d'*o*-nitrofeniltetrazole i un compost hidroxilat condueix a la formació d'un derivat diester d'H-fosfonat com s'ha pogut demostrar en les proves realitzades sobre una oligonucleotidil-resina o un nucleòsid (Cap.1, apartat 3.3). Es pot pensar que el mecanisme de reacció de l'H-fosfonamidat **72** és equivalent al d'un fosforamidit. En aquest darrer cas el catalitzador tetrazole activa l'atac nucleòfil sobre l'àtom de fósfor per protonació i posterior formació d'un intermedi tetrazòlid<sup>249</sup> per desplaçament de l'ió amoni (vegeu Fig. 3.11).

D'altra banda, l'enllaç que es forma és de tipus H-fosfonat diester. Aquest tipus d'enllaços normalment s'obtenen amb el metode de síntesi en què s'utilitzen com a sintons els derivats H-fosfonat del nucleòsid<sup>250</sup>.

Aquestes observacions ens han dut a avaluar la possible aplicació dels derivats N,N-dialquil-H-fosfonamidat de nucleòsid com a nous intermedis de la síntesi d'oligonucleòtids. La seva utilització podria fins i tot gaudir de certs avantatges respecte als actuals mètodes de síntesi<sup>251</sup> que empen derivats fosforamidit i H-fosfonat monoester :

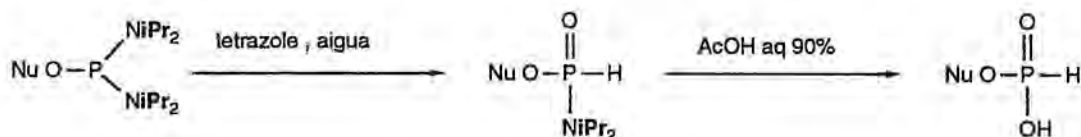
- El mecanisme d'activació sembla ser el mateix que pels derivats fosforamidit, el que permet utilitzar pràcticament els mateixos cicles sintètics sense haver de realitzar gran nombre de canvis.
- Els nucleòsids N,N-dialquil-H-fosfonamidat presentaran probablement millor estabilitat que els corresponents derivats fosforamidit a l'oxidació i a l'hidròlisi.
- A diferència dels derivats d'H-fosfonat DMT-Nu-PO(H)O<sup>-</sup>, els derivats N,N-dialquil-H-fosfonamidats no són compostos salins i higroscòpics.
- La formació d'un enllaç intermedi H-fosfonat diester, estable a la resta de les condicions del cicle de síntesi<sup>250</sup> permet realitzar l'oxidació en una única etapa final una vegada construït l'oligonucleòtid.

#### 4.1 Obtenció de 5'-O-dimetoxitritil-timidina-3'-N,N-dialquil-H-fosfonamidats (91) :

En primer lloc ha calgut trobar un mètode d'obtenció dels derivats N,N-dialquil-H-fosfonamidat que permeti disposar de productes amb el suficient grau de puresa necessari per a ser utilitzats en la síntesi d'oligonucleòtids.

Un dels procediments que s'ha descrit<sup>252</sup> per a l'obtenció dels derivats H-fosfonat de nucleòsid proposa la hidròlisi en dues etapes de derivats tipus bis(N,N-diisopropil)fósforodiamidit, en la que en primer lloc es forma un derivat N,N-diisopropil-H-fosfonamidat.

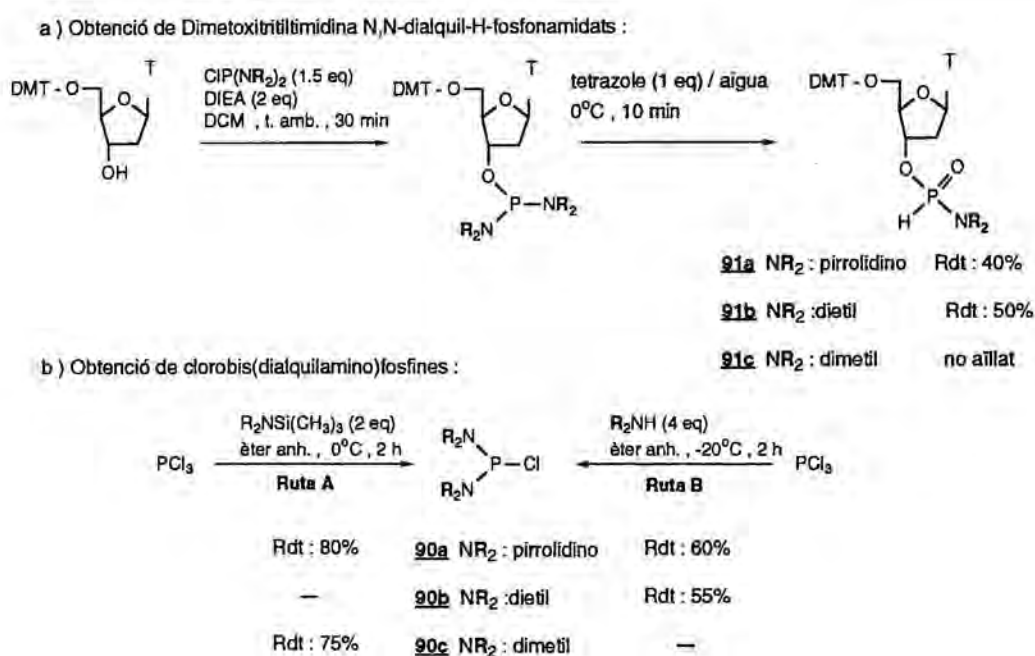
Figura 3.12 : Obtenció de derivats H-fosfonat per hidròlisi de derivats fósforodiamidit



La primera etapa d'hidròlisi que condueix al derivat H-fosfonamidat és possible realitzar-la suau i selectivament mitjançant tetrazole en aigua. La segona etapa, que ha de conduir a l'hidròlisi de l'H-fosfonamidat, necessita d'un medi àcid més fort com ara l'AcOH aquós. D'altra banda, s'ha pogut comprovar que la substitució del grup diisopropilamino pel grup dietilamino<sup>253</sup> permet realitzar la hidròlisi en condicions més suaus.

En base a aquestes reaccions, s'ha dissenyat el procediment per a l'obtenció dels derivats N,N-dialquil-H-fosfonamidat que es resumeix a continuació :

Figura 3.13 : Obtenció dels derivats DMT-T-PO(H)NR<sub>2</sub>



La reactivitat dels derivats fosforamidit es veu afectada per la basicitat del grup amino i de l'impediment estèric dels corresponents substituents<sup>254</sup>. És per això que s'ha cregut convenient disposar de diferents derivats per a avaluar si té lloc aquest efecte sobre la reactivitat dels nous intermedis. S'han intentat sintetitzar els derivats 5'-O-dimetoxitritilimidina H-fosfonamidat amb els grups N,N-tetrametilè (**91a**), N,N-dietil (**91b**) i N,N-dimetil (**91c**). No s'ha contemplat la síntesi del corresponent derivat N,N-diisopropil ja que els resultats abans esmentats (vegeu més amunt) i el comportament de HPO(OCNE)NiPr<sub>2</sub> han fet preveure una baixa reactivitat.

Les clorobis(dialquilamino)fosfines necessàries per a la fosfitilació dels nucleòsids han estat obtingudes per mitjà de dos procediments descrits, a partir de PCl<sub>3</sub> (Fig. 3.13) : i) per reacció amb una trimetilsilildialquilamina (2 eq) a 0°C (derivats dimetilamino i pirrolidino)<sup>255</sup>; ii) per reacció amb la corresponent dialquilamina (4 eq) a -20°C (derivats dietilamino i pirrolidino)<sup>256</sup>.



Partint del derivat protegit de nucleòsid (Fig. 3.13), i en presència de DIEA (2 eq) s'ha obtingut el derivat fósforodiamidit per reacció amb la corresponent clorobis(dialquilamino)fosfina a temperatura ambient. Sense aïllar l'intermedi (que és fàcilment hidrolitzable<sup>165a</sup>) s'ha realitzat la hidròlisi selectiva d'un grup amino amb una quantitat equimolar de tetrazole en aigua afegits directament al medi de reacció, la qual cosa condueix al corresponent derivat N,N-dialquil-H-fosfonamidat (**91**).

Els productes obtinguts per hidròlisi de l'intermedi fósforodiamidit s'han aïllat i purificat per cromatografia de gel de sílice, i s'han caracteritzat per RMN.

Els derivats pirrolidino (**91a**) i dietilamino (**91b**) s'han pogut obtenir amb rendiments acceptables com a barreja de diastereòmers.

No s'ha pogut obtenir el derivat dimetilamino (**91c**), sinó un producte que ha estat caracteritzat com el derivat (DMT-T-O)<sub>2</sub>PN(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (<sup>31</sup>P RMN δ: 141.0). Aquest resultat cal atribuir-lo a una alta reactivitat del derivat intermedi de tipus fósforodiamidit, que en el propi medi d'obtenció pot haver reaccionat amb un altre nucleòsid no fosfitat.

#### 4.2 Avaluació de 5'-O-dimetoxitritil-timidina 3'-N,N-dialquil-H-fosfonamidats (**91**) com a intermedis en la síntesi dels oligonucleòtids :

La utilitat dels derivats N,N-dialquil-H-fosfonamidat (**91**) com a intermedis de la síntesi d'oligonucleòtids ha estat avaluada realitzant proves d'acoblament sobre una oligonucleotidil-resina en presència d'un catalitzador àcid.

Per a la realització dels experiments, efectuats en el sintetitzador automàtic, només ha calgut modificar lleugerament el cicle habitual emprat pels derivats fosforamidit. Els acoblaments s'han dut a terme sobre 0.2 μmol de resina DMT-T-suc-LCAA CPG d'origen comercial. S'han preparat les dissolucions dels derivats N,N-dialquil-H-fosfonamidat i del catalitzador, tetrazole o *o*-nitrofeniltetrazole, utilitzant els mateixos valors de concentració de les dissolucions emprades pels derivats fosforamidit per a la mateixa escala (0.1 M pel derivat de nucleòsid i 0.4 M pel catalitzador), el que ha de servir per a establir una escala de reactivitats relatives. L'etapa d'oxidació ha estat suprimida donat que l'enllaç que es forma és estable als diferents reactius del cicle<sup>250</sup>. A més, s'ha suprimit l'etapa d'acetilació per tal de disposar del mateix nombre de grups reactius en cada cicle d'incorporació i poder utilitzar el mateix suport per a diferents proves d'acoblament.

En les respectives proves, a més de la comparació dels dos derivats N,N-dialquil-fosfonamidat, s'ha intentat comprovar l'efecte en l'etapa d'acoblament de :

a) el temps de reacció.

b) el catalitzador. Per a això s'han assajat tetrazole (pKa 4.8<sup>170</sup>) i *o*-nitrofeniltetrazole (pKa 4.0<sup>170</sup>).

Els resultats obtinguts en les respectives proves d'acoblament s'han expressat com a rendiments parcials d'incorporació i han estat quantificats amb la mesura a l'UV de les solucions obtingudes en l'etapa d'eliminació del grup protector temporal DMT. La taula següent resumeix els resultats obtinguts :

*Taula 3.8 : Proves de reacció amb DMT-T-PO(H)NR<sub>2</sub>*

R'O-PO(H)NR <sub>2</sub>	Rendiments d'acoblament sobre resina <sup>*a</sup>		
	t (min)	Catalitzador	
		tetrazole	<i>o</i> -nitrofeniltetrazole
NR <sub>2</sub> : pirrolidino ( <b>91a</b> )	15	41	39
	60	65	68
NR <sub>2</sub> : dietilamino ( <b>91b</b> )	30	15	17
	60	20	25

Notes: <sup>\*a</sup> determinats per absorció a l'UV de les solucions de detritilació

L'observació dels resultats indica clarament que cap dels dos derivats aconseguix valors mínimament acceptables en els assajos realitzats. El millor dels resultats obtinguts, amb l'ús del derivat pirrolidino **91a** i amb *o*-nitrofeniltetrazole com a catalitzador, ha suposat només un 70% de rendiment al cap de 1 h de reacció. Cal recordar que en les mateixes condicions i escala de síntesi s'aconsegueixen acoblaments quantitius pels derivats fosforamidit en menys d'1 min.

Tanmateix és possible extreure un parell de conclusions dels resultats anteriors :

i) L'augment de la reactivitat en incrementar l'acidesa del catalitzador emprat és clar pel derivat pirrolidino **91a**, però poc significatiu pel derivat dietilamino **91b**.

ii) Es pot establir una escala de reactivitats en funció de la substitució del grup amino :

pirrolidino > dietilamino > diisopropilamino (vegeu resultats amb HPO(OCNE)NiPr<sub>2</sub>, apartat 3.3 del Capítol 1).

Aquesta escala de reactivitats, que no segueix l'ordre de basicitats de les respectives amines<sup>257</sup>, fet a esperar si l'etapa limitant del mecanisme és la protonació prèvia del grup amino, (pK<sub>a</sub> pirrolidina : 11.27, pK<sub>a</sub> Et<sub>2</sub>NH : 10.49, pK<sub>a</sub> iPr<sub>2</sub>NH : 10.96), sembla mostrar una relació d'augment de la reactivitat per disminució de l'impediment estèric en la substitució del grup amino.

Cas de continuar amb aquest tipus de derivats com a intermedis de síntesi en la realització de noves proves, probablement caldria dirigir l'esforç cap a l'optimització de la reactivitat amb l'avaluació d'altres substitucions del grup amino o explorant altres mecanismes d'activació més efectius, que transformessin els derivats dialquil-H-fosfonamidat en espècies intermèdies més reactives. En aquest sentit, cal indicar que recentment s'ha descrit<sup>258</sup> la utilització en síntesi d'un derivat N,N-diisopropil-H-fosfonamidat, que dóna com a intermedi reactiu un derivat clorofosforamidit. No obstant, el desenvolupament futur d'aquest treball queda fora de l'objecte d'aquesta Memòria.

## 5. Obtenció de nucleòsids i oligonucleòtids emprats com a productes patró :

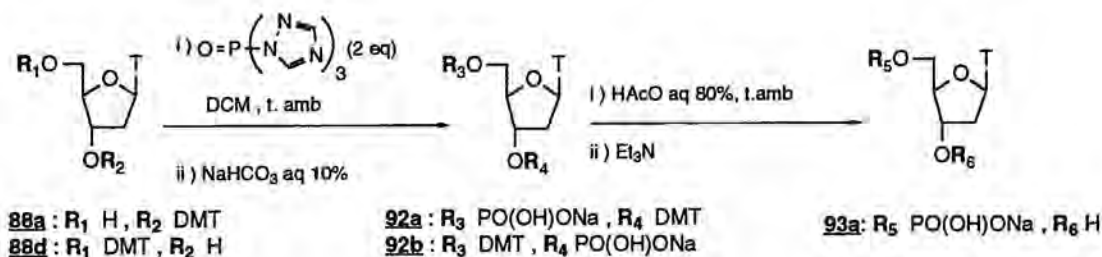
Al llarg del treball, per determinar la composició de diferents barreges de productes en els crús de síntesi ha calgut preparar diferents compostos, la finalitat dels quals ha estat actuar com a productes patró en les tècniques d'anàlisi cromatogràfica que han estat emprades.

A continuació es comenta breument l'obtenció dels diferents derivats :

### 5.1 Obtenció dels derivats fosfat de timidinil i d'O-dimetoxitritiltimidinil :

La següent figura resumeix els diferents derivats que han estat sintetitzats :

Figura 3.14 : Obtenció dels derivats fosfat de timidinil i d'O-dimetoxitritiltimidinil



#### a) Obtenció dels isòmers 3' i 5' del fosfat d'O-dimetoxitritiltimidinil (**92a**, **b**) :

S'han obtingut els derivats per fosforilació del nucleòsid DMT-T (isòmer 3' d'origen comercial, isòmer 5' **88a**, preparat com es descriu en l'apartat 3.2 d'aquest Capítol) amb el reactiu triazolur de fosforil<sup>259</sup> en ACN anhidre a 0°C durant 15 min. El reactiu, triazolur de fosforil, s'ha preparat prèviament per reacció de POCl<sub>3</sub>, triazole i DIEA en ACN anhidre, i que s'ha transferit directament a la dissolució del nucleòsid. Finalitzada la reacció s'ha hidrolitzat l'excés d'agent fosforilant i l'espècie intermèdia (fosfat de dimetoxitritiltimidinil i bistrizolil) amb l'addició de NaHCO<sub>3</sub> aq. El producte s'ha extret de la dissolució aquosa i una vegada evaporada la dissolució, s'ha precipitat sobre hexà.

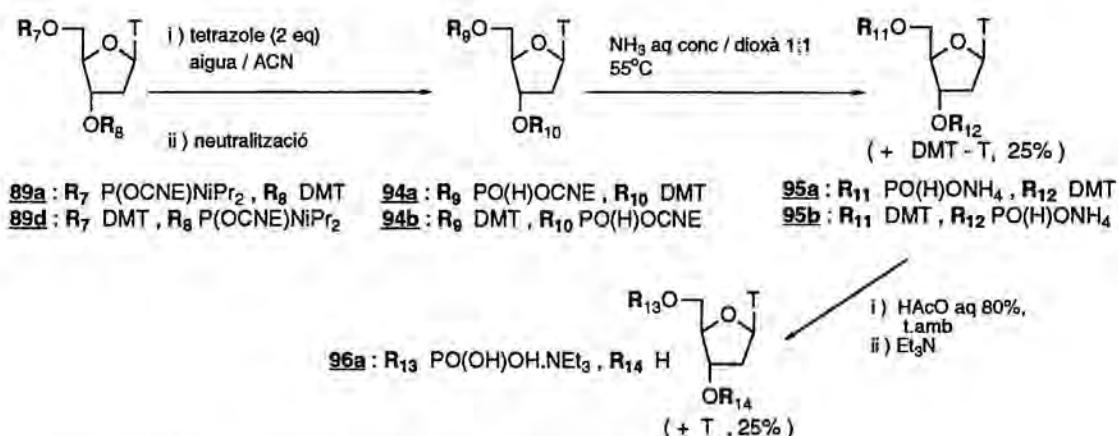
**b) Obtenció del fosfat d' O-5'-timidinil (93a) :**

El producte ha estat obtingut a partir de p<sup>5'</sup>T-DMT (92a; vegeu l'anterior apartat) per eliminació del grup protector dimetoxitritil, mitjançant un tractament amb AcOH 80% durant 1 h. En acabat, s'ha neutralitzat la dissolució amb Et<sub>3</sub>N, i el producte s'ha recuperat per liofilització.

**5.2 Obtenció dels derivats H-fosfonat de timidinil i d'O-dimetoxitritiltimidinil :**

La següent figura esquematitza l'obtenció dels diferents derivats que han estat sintetitzats :

*Figura 3.15 : Obtenció dels derivats H-fosfonat de timidinil i d'O-dimetoxitritiltimidinil*



**a) Obtenció dels isòmers 3' i 5' dels H-fosfonat d'O-2-cianoetil i O-dimetoxitritiltimidinil (94a, b) :**

Han estat obtinguts per hidròlisi dels corresponents derivats fosforamidit (isòmer 3', d'origen comercial; isòmer 5', vegeu l'apartat 3.2), amb tetrazole en una dissolució d'aigua/ACN (1:1), durant 1 h. En acabat, s'ha afegit DCM i s'ha separat l'excés de tetrazole i les sals formades per rentats de la fase orgànica. Evaporat el dissolvent, s'han obtingut productes sòlids per precipitació sobre hexà.

**b) Obtenció dels isòmers 3' i 5' de l'H-fosfonat d'O-dimetoxitritiltimidinil (95a, b) :**

Els productes han estat obtinguts a partir dels corresponents derivats fosfonat diester **94a,b** (vegeu l'anterior apartat) per eliminació del grup protector 2-cianoetil, per tractament amb una dissolució d'NH<sub>3</sub> aquós concentrat en dioxà (1:1) a 55°C durant 2 h. S'ha evaporat el dissolvent i el producte s'ha precipitat sobre hexà a -20°C. L'anàlisi per HPLC revela la presència de DMT-T com

a subproducte (aprox. 25% per a tots dos derivats), la presència del qual cal atribuir-la a la parcial llibertat del grup H-fosfonat als tractaments bàsics<sup>260</sup> (vegeu també l'obtenció de HpCATCAT a l'apartat 5.3 d'aquest Capítol). El producte, usat com a patró en les anàlisis per HPLC, no ha estat necessari purificar-lo.

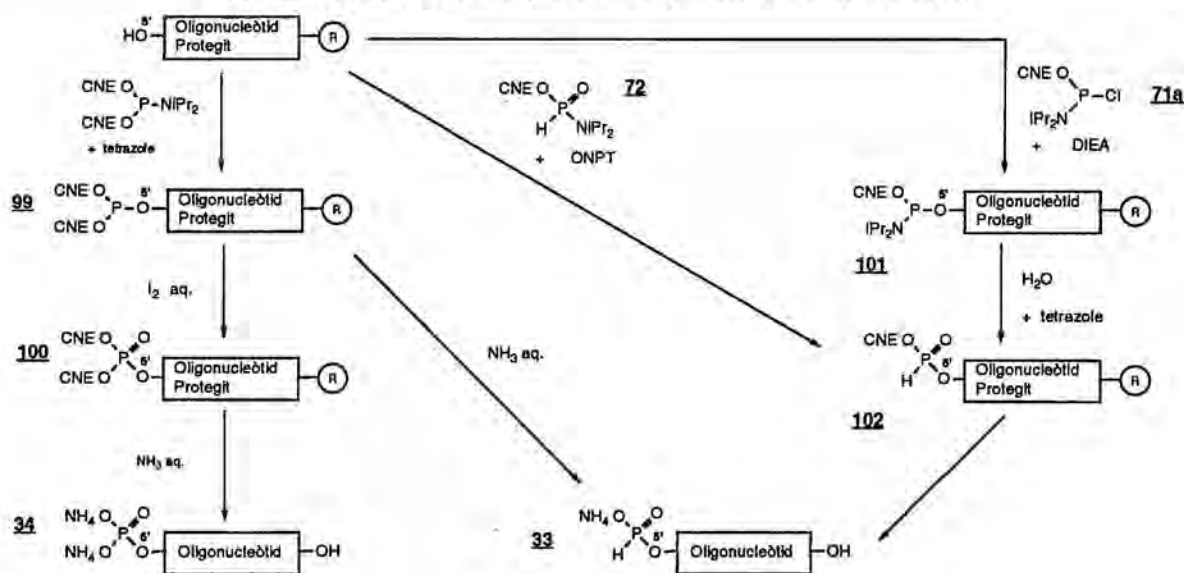
c) Obtenció de l'H-fosfonat d'O-3'-timidinil (96a) :

S'ha emprat el mateix procediment d'eliminació del grup protector dimetoxitritil que pel derivat fosfat 93a, fent servir en aquest cas el derivat l'H-fosfonat monoester 95a (impurificat amb DMT-T, vegeu l'anterior apartat) com a producte de partida.

5.3 Obtenció dels oligonucleòtids 5'CATCAT, p<sup>5'</sup>CATCAT i Hp<sup>5'</sup>CATCAT :

El següent esquema resumeix l'obtenció dels diferents oligonucleòtids, i que es comenten a continuació :

Figura 3.16 : Obtenció dels oligonucleòtids p<sup>5'</sup>CATCAT i Hp<sup>5'</sup>CATCAT



a) Obtenció de 5'CATCAT (35) :

S'ha sintetitzat l'oligonucleòtid sobre una nucleosidil-resina comercial DMT-T-suc-LCAA CPG (escala 1 mmol) amb l'ajut del sintetitzador automàtic emprant la metodologia de síntesi estàndar. S'han utilitzat DMT-T-nucleòsids fosforamidit d'origen comercial, amb grups protectors isobutiril per a citosina, dimetilaminometilè per a adenina i 2-cianoetil per al grup fosfit (oligonucleotidil-resina 97).

L'oligonucleòtid ha estat alliberat de la resina per tractament amb  $\text{NH}_3$  aquós concentrat en dioxà 1:1 a  $55^\circ\text{C}$  durant 6 h. Una vegada separat l'oligonucleòtid de la resina per filtració, i recuperat per liofilització de la solució, s'ha analitzat per HPLC. El producte, que mostra un grau de puresa adequat, ha estat caracteritzat per anàlisi de nucleòsids, prèvia digestió enzimàtica amb fosfodiesterasa de verí de serp i fosfatasa alcalina (dC 1.0, dA 0.9, T 1.1), i per espectrometria de masses mitjançant la tècnica d'electrospray.

**b) Obtenció de  $\text{p}^5\text{CATCAT}$  (34) :**

L'oligonucleotidil-resina CATCAT-suc- $\text{NHCH}_2\text{PS}$  **97** (1  $\mu\text{mol}$ ) protegida amb grups isobutiril per a citosina, dimetilaminometilè per a adenina i 2-cianoetil per als grups fosfat ha estat fosfilitada amb el reactiu bis(2-cianoetoxi)diisopropilaminofosfina(**98**)<sup>261</sup> (vegeu l'apartat d) en presència de tetrazole durant 1 h (resina **99**). A continuació s'ha dut a terme l'oxidació amb  $\text{I}_2$  aquós (resina **100**). Totes dues etapes han estat realitzades en un sintetitzador automàtic.

L'oligonucleòtid-fosfat ha estat desprotegit i alliberat de la resina per tractament amb  $\text{NH}_3$  aquós concentrat en dioxà 1:1 a  $55^\circ\text{C}$  durant 6 h. El producte s'ha recuperat per filtració de la resina, evaporació i posterior liofilització, i ha estat analitzat en les mateixes condicions que el producte anterior. S'ha caracteritzat per espectrometria de masses per mitjà de la tècnica d'electrospray.

**c) Obtenció de  $\text{Hp}^5\text{CATCAT}$  (33) :**

S'ha partit de la mateixa oligonucleotidil-resina (**97**) del producte anterior, obtenint-se el producte per tres vies alternatives (Fig. 3.16) :

a) Per fosfilitació de l'oligonucleotidil-resina amb bis(2-cianoetoxi)-diisopropilaminofosfina (**98**). L'intermedi fosfit (**99**) que s'obté, es pot transformar directament en el corresponent derivat H-fosfonat, per eliminació dels grups cianoetil, en la mateixa etapa de desprotecció i desancoratge amb  $\text{NH}_3$  aquós concentrat en dioxà, i que s'ha realitzat també a  $55^\circ\text{C}$  durant 6 h. L'anàlisi per HPLC de bescanvi aniònic del cru alliberat mostra la presència de dos productes,  $\text{Hp}^5\text{CATCAT}$  com a majoritari (75%) i CATCAT (25%). La presència de producte no fosfilitat es pot atribuir a la labilitat als tractaments bàsics mostrada pels grups H-fosfonat monoester<sup>260</sup>, més que no pas a una deficient fosfilitació de l'oligonucleòtid (vegeu el cas anterior). De fet, a la síntesi de  $\text{p}^5\text{CATCAT}$  s'ha seguit el mateix procediment (excepte l'etapa d'oxidació) i no s'ha detectat la presència de CATCAT.

b) per fosfilitació amb (2-cianoetoxi)cloro(N,N-diisopropilamino)fosfina (**71a**) en presència de DIEA. En aquest cas, l'intermedi que es forma per reacció amb l'oligonucleotidil-resina és de tipus fosforamidit (resina **101**). Per tant, s'ha fet necessari realitzar una etapa d'hidròlisi, prèvia a la desprotecció (en què s'obtidria de realitzar-se directament un derivat

N,N-dialquil-H-fosfonamidat; vegeu l'apartat 4 d'aquest Capítol) en presència d'aigua i tetrazole, per obtenir un derivat H-fosfonat-diester **102**. El producte s'ha desprotegit i desancorat de la mateixa forma que en el cas anterior per tractament amb NH<sub>3</sub> aquós concentrat en dioxà. L'anàlisi per HPLC del cru alliberat mostra igualment una barreja de Hp<sup>5</sup>CATCAT i CATCAT, en una proporció similar al cas anterior (60:40).

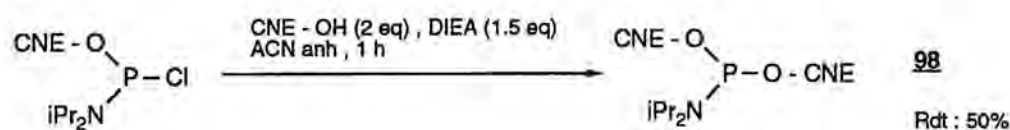
c) per fosfitilació amb l'H-fosfonamidat d'O-2-cianoetil i N,N-diisopropil (**72**), en presència d'o-nitrofeniltetrazole. Aquesta reacció, que es discuteix més detingudament al Capítol 1 (apartat 3.3), provoca l'aparició del derivat H-fosfonat diester **102**, el mateix intermedi que en la segona etapa del procediment anterior. Havent realitzat el mateix tractament de desprotecció i desancoratge de les anteriors ocasions, el cru alliberat mostra per anàlisi per HPLC una barreja de Hp<sup>5</sup>CATCAT i CATCAT amb una proporció menor del primer producte (50:50).

El producte Hp<sup>5</sup>CATCAT obtingut per qualsevol dels tres procediments, ha pogut ser purificat i separat de l'oligonucleòtid CATCAT per HPLC, i ha estat dessalat. Per a la seva caracterització, s'ha enregistrat un espectre de masses per la tècnica d'electrospray, donant valors que s'ajusten al pes molecular esperat.

**d) Obtenció de bis(2-cianoetoxi)diisopropilaminofosfina (**98**) :**

El producte bis(2-cianoetoxi)diisopropilaminofosfina ha estat emprat per a obtenir derivats fosforilats de pèptids i d'oligonucleòtids<sup>261</sup>. L'activació per part d'un àcid feble, com ara tetrazole, permet formar derivats fosfit triester amb grups hidroxil. L'oxidació i posterior eliminació dels grups cianoetil per tractament bàsic condueix a un derivat fosfat.

*Figura 3.17 : Obtenció de (CNEO)<sub>2</sub>PNiPr<sub>2</sub>*



S'ha dut a terme la síntesi de bis(2-cianoetoxi)diisopropilaminofosfina per adaptació del procediment descrit<sup>261</sup>(Fig. 3.17). El derivat (2-cianoetoxi)cloro(diisopropilamino)fosfina (d'origen comercial) s'ha fet reaccionar amb 3-hidroxipropionitril en presència de DIEA en un medi anhidre durant 1 h. El producte, que ha estat extret en un medi orgànic i rentat amb dissolucions aquoses, un cop evaporat a sequedat, s'ha purificat en una columna de gel de sílice, obtenint-se com a oli. Enregistrat un espectre de <sup>31</sup>P RMN, el producte mostra el senyal amb δ esperat (δ 148.9), pel que ha estat emprat directament en la fosforilació dels oligonucleòtids.

**SECCIÓ EXPERIMENTAL :**



## I. Instrumentació general :

Els espectres de **ressonància magnètica nuclear** de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  i  $^{31}\text{P}$  han estat enregistrats en aparells Varian VXR-500, Varian Unity-300 o Gemini-200. Els desplaçaments químics de  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ ) s'expressen com a ppm respecte a tetrametilsilà, mentre que per  $^{31}\text{P}$  s'ha utilitzat  $\text{H}_3\text{PO}_4$  85% com a estàndar extern. A més, els espectres de  $^{13}\text{C}$  i  $^{31}\text{P}$  han estat adquirits amb desacoblament de banda ampla sobre  $^1\text{H}$ . Els experiments de ressonància de  $^{31}\text{P}$  en fase gel<sup>262</sup> de resines s'han realitzat suspent les resines en  $\text{CDCl}_3$  i en tubs especials de fons pla que permeten concentrar la mostra en la zona d'irradiació amb l'ajut d'un èmbol. L'**espectrometria de masses** d'impacte electrònic, ionització química o bombardeig amb àtoms ràpids s'ha realitzat en un aparell Hewlett-Packard 5988 A, fent servir en aquest darrer cas com a matrius alcohol nitrobenzàlic o "magic bullet" (ditioetritol-ditiotreitòl 3:2). Els espectres de masses amb la tècnica d'electrospray<sup>263</sup> s'han obtingut en un aparell VG-Quattro. Les **rotacions específiques** s'han mesurat en un polarímetre Perkin-Elmer 241-MC. Els **punts de fusió** s'han obtingut en un aparell Büchi i no s'han corregit. Els **espectres d'infraroig** s'han enregistrat en un aparell Perkin-Elmer 681 i l'**absorció UV-visible** s'ha detectat en un espectrofotòmetre Perkin-Elmer Lambda 5. Les **anàlisis elementals** han estat realitzades al Servei d'Anàlisi Elemental del CID-CSIC.

## II. Cromatografia :

• La **cromatografia en capa fina** s'ha realitzat sobre cromatofolis de gel de sílice amb suport d'alumini (60 F, 0.2 mm, Merck), amb els següents sistemes de solvents: A,  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH}$  (73:25:2); B,  $\text{AcOEt}/\text{DCM}/\text{Et}_3\text{N}$  (45:45:10); C,  $\text{DCM}/\text{MeOH}$  (90:10); D,  $\text{AcOEt}/\text{hexà}$  (50:50); E,  $\text{DCM}/\text{MeOH}$  (98:2); F,  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH}$  (90:10:2); G,  $\text{AcOEt}/\text{DCM}/\text{piridina}$  (45:45:10); H,  $\text{AcOEt}/\text{hexà}$  (90:10); I,  $\text{AcOEt}/\text{DCM}$  (1:1). La cromatografia en columna s'ha realitzat igualment sobre gel de sílice (Chromagel 60 Å CC, 230-400 mesh, SDS).

• El **revelat de capes fines** que contenen aminoàcids amb grups amino lliures s'ha efectuat mitjançant la prova de ninhidrina. Les plaques es ruixen amb dissolució de ninhidrina 0.01% en acetona i s'escalfen a 110°C durant 1 min. La presència de grups amino es manifesta per l'aparició d'una coloració violada. Si el grup  $\alpha$ -amino es troba bloquejat pel grup protector Boc, s'elimina prèviament sotmetent la capa fina a vapors àcids o escalfant breument en una placa.

Els **nucleòsids** es poden revelar utilitzant un reactiu general per sucres (180 mL d'EtOH, 1 g difenilamina, 100 mL d'AcOH glacial, 3 mL d' $\text{H}_2\text{SO}_4$  conc). El revelat es realitza escalfant a 110°C durant 3 min, donant una coloració blava. En el cas que el nucleòsid es trobi protegit amb el grup dimetoxitritil, s'observa primer el color taronja que presenta el catió  $\text{DMT}^+$  en medi àcid.

• L'**anàlisi per cromatografia líquida d'alta eficàcia** s'ha dut a terme en sistemes Shimadzu, Beckman o Waters. S'han utilitzat columnes Spherisorb o Nucleosil de sílice- $\text{C}_{18}$  (25 x 0.5 cm, 10  $\mu\text{m}$ , flux 1 mL/min) per a l'anàlisi en fase reversa. L'anàlisi de pèptids s'ha realitzat per elució amb gradients lineals d'àcid trifluoroacètic al 0.045% en aigua i 0.036% en ACN (sistema FR-A). Per a l'anàlisi de nucleòsids i els seus derivats, oligodesoxiribonucleòtids i nucleopèptids s'han emprat l'acetat de trietilamoni aquós 0.01 M com a dissolvent A i ACN (sistema FR-B) o ACN/aigua (1:1) (sistema FR-C) com a dissolvents B.

L'anàlisi mitjançant **bescanvi aniònic** d'oligonucleòtids i nucleopèptids s'ha realitzat bé amb una columna HP-PEI Anion 100 (10 x 0.78 cm, Rainin Instruments Co. Inc., suport polietilenimino) amb gradients lineals de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  aq, 0.05 M com a dissolvent A i 0.5 M com a dissolvent B (sistema BA-A), o amb una columna Partisphere SAX (10 x 0.5 cm, 5  $\mu\text{m}$ , Whatman, bescanviador fort) amb gradients lineals de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH 6.4 en ACN/aigua (3:7)<sup>264</sup>, 0.01 M com a dissolvent A i 0.2 M com a dissolvent B (sistema BA-B).

En qualsevol cas, s'han emprat dissolvents qualitat HPLC, l'aigua desionitzada (18.2 m $\Omega$ .cm) s'ha obtingut mitjançant un sistema Millipore Milli-Q plus i els tampons aquosos han estat filtrats (Gelman, 0.45  $\mu\text{m}$ ).

• L'**anàlisi per electroforesi capil.lar**<sup>265</sup> s'ha dut a terme en un aparell Applied Biosystems 270A, emprant un capil.lar Micro-gel 100<sup>R</sup> (50  $\mu\text{m}$  x 50 cm). La separació s'ha realitzat a 30°C amb el tampó de tris-fosfat 75 mM en aigua/MeOH (9:1, pH 7.6), aplicant una diferència de potencial de -15 kV. Les mostres, que contenen 0.5-1 OD<sub>260</sub>/mL, han estat injectades aplicant un voltatge de -5 kV

durant 1-5 s, i donada la irreproduïbilitat en els temps de retenció, ha calgut la coinjecció d'un patró (s'ha utilitzat l'oligonucleòtid CATCAT com a patró, efectuant 2 s d'injecció immediatament abans de fer-ho amb el producte a analitzar). La detecció s'ha realitzat per absorció UV a 260 nm.

• La purificació per filtració molecular de pèptids a través de Sephadex LH-20 (Pharmacia, columna de 80 x 1 cm) s'ha dut a terme eluint els productes en dissolvents com DMF, THF o MeOH, a flux lent (0.5 mL/min). També s'han emprat columnes d'exclusió de Sephadex G-10 (Pharmacia, columna 10 x 0.5 cm) per al dessalat d'oligonucleòtids, eluint-los amb tampó aquós de TEAA 0.01 M o aigua (0.5 mL/min).

La purificació per bescanvi aniònic d'oligonucleòtids i nucleopèptids s'ha realitzat sobre columnes de DEAE-Sephadex (Pharmacia, 15 x 1 cm), eluint a flux lent (0.5 mL/min) mitjançant gradients de tampó aquós d'hidrògenocarbonat de trietilamoni, preparat per dilució d'una dissolució 2 M. Aquesta dissolució es prepara bombollejant diòxid de carboni a través d'una barreja de Et<sub>3</sub>N en aigua fins obtenir una solució neutra.

La purificació per cromatografia líquida de mitja pressió s'ha efectuat utilitzant com a sistema de bombeig un equip Labomatic o una bomba de pistó Milton-Roy (flux 1-10 mL/min), sobre columnes de fase reversa de sílice-C<sub>8</sub> (Lichoprep RP-8, 36-40 µm, Merck) o sílice-C<sub>18</sub> (10 x 2 cm, 40-50 µm, Vydac). En tots els casos s'ha disposat de sistemes auxiliars de detecció UV-Visible (ona fixa o variable), registradors-integradors i col·lectors automàtics de fraccions.

### III. Síntesi de pèptids :

• Els Boc-aminoàcids (excepte Boc-Asp(OA<sub>nc</sub>pe)-OH), Fmoc-aminoàcids (excepte Fmoc-Asp(OBzl)-OH) i les resines per a la síntesi de pèptids s'han obtingut comercialment de Bachem Feinchemikalien AG o de Novabiochem AG.

• Els pèptids han estat sintetitzats per un procediment manual en una xeringa de polipropilè a la que s'hi ha incorporat un disc de polietilè com a filtre connectada a un sistema de filtració. Depenent dels protectors temporals dels grups α-amino, Boc o Fmoc, s'ha seguit un dels dos mètodes generals de síntesi<sup>64</sup>, les etapes dels quals es resumeixen a la següent taula :

*Taula 1 : Cicle de síntesi de pèptids*

	Boc-Aa <sup>64e</sup>	Fmoc-Aa <sup>64f</sup>
1. Rentats :	DCM (x 3)	
2. Eliminació protector α-amino :	i) TFA/DCM 30 % 5 + 25 min ii) DIEA/DCM 5% 3 x 1 min	piperidina/DMF 50% 3 x 1 min
3. Rentats :	DCM (x 3)	DMF (x 3), DCM (x 3)
4. Acoblament : DCM i/o DMF, 0.5-1 h	Boc-Aa-OH o Fmoc-Aa-OH (2-3 eq) + DCC (2-3 eq) <sup>*a</sup>	
5. Rentats :	DCM (x 3), DMF (x 3), MeOH (x 3)	
6. Control acoblament :	prova ninhidrina	

Notes : <sup>\*a</sup> dependent de l'aminoàcid (com ara Asn) cal fer servir l'ester derivat de benzotriazolil, preparat a priori per reacció a 0°C de l'aminoàcid, DCC i HOBT.

Per a tots dos mètodes, el seguiment de cada acoblament es realitza mitjançant l'anàlisi qualitativa de ninhidrina, que consisteix en col·locar una alíquota de resina rentada i assecada en presència de 3 gotes de reactiu A (500 mg ninhidrina en 100 mL d'EtOH) i 1 gota de reactiu B (40 mg de fenol, 2 mL de KCN 1 mM, 100 mL de piridina i 100 mL d'EtOH) durant 2 min a 110°C (en general es realitza la prova amb un blanc sense resina per a poder comprovar millor). Una coloració blava indica la presència de grups amino lliures (per tant, acoblament defectuós que obliga a repetir-lo a partir de l'etapa 3 fent servir però un excés menor d'aminoàcid com ara 0.5-1 eq) i groga la seva absència, fet que permet iniciar el cicle d'incorporació del següent aminoàcid.

•S'han emprat les resines *p*-metilbenzidrilamina (f 0.5-0.8 mmol NH<sub>2</sub>/g) i aminometilpoliestirè (f 0.5-0.7 mmol NH<sub>2</sub>/g).

Els Boc-aminoàcids que s'han ancorat sobre *p*-metilbenzidrilamina (f 0.5-0.8 mmol NH<sub>2</sub>/g), han estat alliberats en forma de carboxamida C-terminal per tractament amb HF anhidre. La resina (200-500 mg) s'ha col·locat en un reactor de tefló especialment dissenyat<sup>266</sup> i s'hi ha afegit 500 µL d'anisole (capturador de cations). Una vegada refredat amb un bany de neu carbònica s'hi ha afegit 5 mL de HF. S'ha mantingut la reacció a 0°C durant 1 h, al final de la qual s'ha eliminat l'àcid per evaporació i posterior neutralització amb èter anhidre.

També s'han realitzat síntesis sobre aminometilpoliestirè utilitzant Boc-aminoàcids, en què la unió entre el primer aminoàcid i la resina es duu a terme amb un espaiador bifuncional làbil a les bases (Cap. 2, apartat 1.2). El desanclatge del pèptid s'ha efectuat com s'explica més endavant en aquesta secció (vegeu l'apartat VIII).

Per la seva banda, per a l'estratègia amb Fmoc-aminoàcids s'han emprat resines tipus aminometilpoliestirè (f 0.5-0.7 mmol NH<sub>2</sub>/g) modificades amb un espaiador bifuncional (Cap. 1, apartat 3.1.c) que permeten l'alliberament i desprotecció del pèptid (en aquest cas també com a carboxamida C-terminal) per acidòlisi amb TFA concentrat (amb un 1% d'aigua com a captador de cations) a temperatura ambient durant 1 h.

#### IV. Síntesi d'oligonucleòtids:

•Els DMT-dCiBu, DMT-dA<sup>Dmf</sup>, DMT-dA<sup>Bz</sup> i DMT-T fosforamidit, les corresponents boles de vidre funcionalitzades amb braços aminoalquílics de cadena llarga (LCAA-CPG, 500Å, 120-150 µm, f aprox 0.05 mmol NH<sub>2</sub>/g) utilitzades per a la síntesi d'alguns dels oligonucleòtids descrits i alguns dels reactius habituals (solució I<sub>2</sub> aq, solucions d'acetilació) s'han adquirit a Applied Biosystems o Cruachem. Per altra banda, l'aminometilpoliestirè emprat a la síntesi d'oligonucleòtids i nucleopèptids, s'ha adquirit a Sigma. La resta de reactius utilitzats s'han preparat com es descriu en els propers apartats, però en els directament implicats en les reaccions d'acoblament (vegeu a continuació, Taula II) cal tenir cura d'emprar reactius i dissolvents estrictament anhidres i manipulats sota una atmosfera inert d'argó. A part, els reactius i dissolvents a utilitzar en el sintetitzador i que no són d'origen comercial o no especialment indicats han estat filtrats (filtres Pro-X<sup>R</sup>, nylon, 0.45 µm 25 mm, Teknokroma).

•Les síntesis d'oligonucleòtids i nucleopèptids s'han dut a terme majoritàriament amb l'ajut d'un sintetitzador automàtic Applied Biosystems model 380 B, però també amb un muntatge experimental de tipus manual<sup>158</sup>, fent servir sempre el mètode general del fosfit-triester que emprava sintons fosforamidit<sup>65,131</sup>. Els cicles de síntesi emprats han estat diferents depenent bàsicament del tipus de suport (boles de vidre o poliestirè<sup>100</sup>). L'escala de treball (petita 0.1-0.2 µmol, mitjana 0.5-2 µmol, gran 10-20 µmol) també implica normalment canvis en els temps parcials de cada etapa. En la següent taula s'indiquen els cicles estàndar corresponents als dos tipus de suport utilitzats per a una escala de treball de 1 µmol i en els que es basen tant els programes de funcionament del sintetitzador com les síntesis realitzades manualment.

Els rendiments individuals de cada acoblament es determinen per la comparació de les mesures de l'absorbància a UV de les solucions provinents de l'etapa d'eliminació del protector DMT, normalment diluïdes amb una solució d'àcid *p*-toluensulfònic 0.1 M en ACN, aprofitant que el catió DMT<sup>+</sup> produït presenta una absorció màxima a l'UV al voltant de 500 nm (vegeu l'apartat VI).

En la síntesi de nucleopèptids, tant per l'acoblament d'un pèptid fosforamidit (estratègia convergent, Capítol 1) com pel perllongament d'un oligonucleòtid sobre una peptidil-resina (estratègia lineal, Capítol 2) s'ha utilitzat el mateix mètode sintètic. Essencialment, els cicles emprats en cada cas poden considerar-se adaptacions dels ja mencionats, les particularitats dels quals es descriuen en el seu moment.

Taula II : Cicle de síntesi d'oligonucleòtids

Etapa	Boles de vidre		Poliestirè	
1. Rentats	ACN HPLC	0.5 min	DCM	0.5 min
2. Eliminació DMT	3% TCA/DCM	1 min	3% TCA/DCM	3 x 0.5 min
3. Rentats	ACN	2 min	DCM	2 x 0.5 min
4. Neutralització	---		DIEA/DCM 2%	0.5 min
5. Rentats	---		DCM	0.5 min
6. Rentats	ACN HPLC	1 min	ACN anh.	1 min
7. Assecat	Ar	0.5 min	Ar	1 min
8. Acoblament	Fosforamidit 0.1 M en ACN anh <sup>*a</sup> + catalitzador 0.4 M <sup>*c</sup> en ACN anh	1 min	Fosforamidit 0.25 M en DCM anh <sup>*b</sup> + catalitzador 1 M <sup>*d</sup> en THFanh	15 min
9. Rentats	ACN HPLC	1 min	THF DCM	0.5 min 1 min
10. Acetilació	Ac <sub>2</sub> O / NMI <sup>*e</sup>	1 min	Ac <sub>2</sub> O / NMI <sup>*e</sup>	2 min
11. Rentats	ACN	1 min	DCM	1 min
12. Oxidació	I <sub>2</sub> aq <sup>*f</sup>	1 min	I <sub>2</sub> aq <sup>*f</sup>	1.5 min
13. Rentats	ACN HPLC	1 min	THF DMF DCM	1 min 1 min 2 x 0.5 min

Notes : <sup>\*a</sup> aprox. 12.5 eq respecte resina (125 µL); <sup>\*b</sup> aprox. 35 eq respecte resina (150 µL respecte 5-10 mg resina f 0.2-0.1 mmol/g); <sup>\*c</sup> tetrazole; <sup>\*d</sup> a vegades s'ha substituït el catalitzador habitual tetrazole per 5-(*o*-nitrofenil)tetrazole; <sup>\*e</sup> reactius afegits al reactor en dues solucions separades A: Ac<sub>2</sub>O/lutidina/THF (1:1:8) i B: NMI 0.25 M en THF; <sup>\*f</sup> I<sub>2</sub> 0.1 M en aigua/piridina/THF (2:20:80).

#### V. Quantificació d'oligonucleòtids per absorció UV :

•La quantitat d'oligonucleòtids i nucleopèptids s'ha determinat mesurant l'absorbància a l'UV al voltant del màxim discret que presenten a 260 nm, en unitats OD<sub>260</sub> (1 OD<sub>260</sub> : oligonucleòtid contingut en 1 mL de dissolució que presenta absorbància unitat, mesurada en una cel.la de pas 1 cm)<sup>267</sup>. Es pot calcular l'equivalència molar d'aquestes unitats tenint en compte l'aproximació de que l'absorció de l'oligonucleòtid es deu a l'efecte acumulat de l'absorció individual de cada base, corregit per un factor lligat al fenòmen d'apilament o "stacking". D'aquesta manera és possible conèixer el coeficient d'extinció molar de l'oligonucleòtid  $\epsilon_{olgn}$  segons :

$$\epsilon_{olgn} = (\sum \epsilon_b) \times f_a$$

on  $\epsilon_b$  són els coeficients individuals de cada base i  $f_a$  el factor de correcció, que es considera 0.9 per a un oligonucleòtid d'única cadena.

#### VI. Determinació de la funcionalització de resines de síntesi :

•S'han utilitzat dos mètodes diferents per a la determinació de la funcionalització en peptidil resines. La primera ha estat l'anàlisi quantitativa d'aminoàcids sobre una alíquota de resina de pes conegut. El segon mètode s'ha basat en la prova de Gisin<sup>268</sup> d'amines lliures.

•La determinació de la funcionalització sobre les oligonucleotidil resines normalment ha implicat l'eliminació sobre una alíquota de pes conegut, del grup DMT terminal amb TCA 3%/DCM, recollint-ne el filtrat i mesurant l'absorbància de la dissolució diluïda amb HClO<sub>4</sub> 70% /EtOH (3:2) a 498 nm on el catió DMT<sup>+</sup> presenta un màxim ( $\epsilon$  71700).

## VII. Composició en aminoàcids i nucleòsids :

• Les anàlisis d'aminoàcids han estat obtingudes en un analitzador Beckmann model System 6300. Les hidròlisis prèvies de les peptidil resines, els pèptids i els nucleopèptids s'han realitzat normalment per tractament amb HCl 12 M/àcid propiònic (1:1) a 150°C (200 µL) en un tub tancat durant 60-90 min. En certs casos, per minimitzar la destrucció de certs aminoàcids com ara serina, s'ha efectuat la hidròlisi del pèptid en un tub tancat al buit, a 110°C durant 24 h. Per a l'anàlisi, els hidrolitzats, evaporats a sequedat, han estat dissolts en tampó citrat de manera que continguessin 2-5 nmols de pèptid en 50 µL.

• Les anàlisis de nucleòsids d'oligonucleòtids i nucleopèptids s'han obtingut prèvia digestió enzimàtica segons tres sistemes diferents. En tots els casos, la digestió s'ha realitzat sobre l'oligonucleòtid liofilitzat (0.5-1 OD<sub>260</sub>), dipositat en un eppendorf, durant 6 h a 36°C, i al que s'ha afegit la solució enzimàtica (50µL per a 1 OD<sub>260</sub>) preparada segons es detalla :

a) La barreja de fosfodiesterasa de verí de serp (EC 3.1.4.1, Sigma) i fosfatasa alcalina (EC 3.1.3.1, Sigma) que escindeixen<sup>271</sup> l'oligonucleòtid a partir de l'extrem 3' produint nucleòsids : es prepara primer una dissolució que conté MgCl<sub>2</sub> 0.1 M (100 µL), Tris.HCl 0.1 M (500 µL) i aigua (400 µL). La solució enzimàtica s'obté dissolent 5 µL de la solució comercial d'AP i una punta d'espàtula de SVPD en la dissolució anterior (100 µL, pH 8).

b) Només fosfodiesterasa de verí de serp, que produeix la hidròlisi de l'oligonucleòtid en nucleòsid-5'-fosfats : es dissol una punta d'espàtula de SVPD liofilitzada en una dissolució 0.05 M de Tris.HCl (100 µL).

c) Fosfodiesterasa de melsa<sup>271</sup> (SpPD, EC 3.1.16.1, Sigma), que genera nucleòsid-3'-fosfats fragmentant a partir de l'extrem 5' : es dissol una punta d'espàtula de SpPD liofilitzada en una dissolució 0.2 M d'AcONH<sub>4</sub> 0.2 M (100 µL, pH 5.4).

Les barreges de digestió s'analitzen per cromatografia HPLC en fase reversa (sistema FR-C, gradient I : isocràtic 5% B 10 min i 5-60% B en 10 min; gradient II : 0-100% B en 20 min; gradient III : isocràtic 5% B 10 min, 5-100% B 10 min). Els diferents productes s'identifiquen per comparació dels temps de retenció amb els dels nucleòsids naturals (t<sub>R</sub>(dC) I: 5.1 min, II: 8.4 min, III: 5.1 min; t<sub>R</sub>(T) I: 10.6 min, II: 10.1 min, III: 15.5 min; t<sub>R</sub>(dA) I: 18.6 min, II: 11.4 min), calculant-se les corresponents proporcions mitjançant els coeficients d'extinció molar coneguts a 260 nm<sup>269</sup> : ε<sub>dC</sub> 7700, ε<sub>T</sub> 8830, ε<sub>dG</sub> 11500, ε<sub>dA</sub> 15200.

## VIII. Reactius de desprotecció i desancoratge de resines :

Els reactius següents s'han utilitzat en els processos de desprotecció i desancoratge d'oligonucleòtids i nucleopèptids: i) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.05M en MeOH/dioxà (1:1), preparat i guardat en estoc; ii) TBAF.3H<sub>2</sub>O (Fluka) 0.01M ó 0.05M en THF anh, i emprat a continuació; iii) LiOH.H<sub>2</sub>O 0.25M en MeOH/dioxà/aigua (1.5:1.5:1), preparat i guardat fins a utilització; iv) NH<sub>3</sub> aq conc (aprox 32%) en dioxà (1:1 v/v), i emprat de seguida. En tots els casos, els reactius sòlids consumits han estat de qualitat síntesi i els dissolvents destil.lats o bé d'una qualitat equivalent. En el cas particular del reactiu i), el K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, prèviament mòlt, s'ha dissolt en MeOH amb sonicació, i a continuació s'hi ha afegit el dioxà

Com a procediment general, les resines a tractar han estat col.locades en xeringues provistes d'un filtre de polietilè i una clau a la sortida, i una vegada afegit el reactiu s'han tapat amb un sèptum, agitant-se suaument al llarg del tractament. En el cas concret de tractaments amb amoníac, degut a la pressió que es genera, les resines han estat en canvi dipositades en vials que puguin ser tancats hermèticament. Un cop acabat el tractament, les resines han estat separades de la solució per filtració.

## IX. Dissolvents i productes generals :

• L'ACN anhidre s'ha obtingut per destil.lació de dissolvent qualitat HPLC sobre CaH<sub>2</sub> en pols, i s'ha guardat sobre troços de CaH<sub>2</sub> i en atmosfera inert fins a la seva utilització. S'ha obtingut

directament THF anhidre per destil·lació sobre sodi metall en presència de benzofenona. El DCM (qualitat Normasolv) ha estat neutralitzat prèviament eluint-lo a través d' $\text{Al}_2\text{O}_3$  bàsica, i en el cas de necessitar-se anhidre s'ha assecat i guardat sobre troços de  $\text{CaH}_2$  en atmosfera d'argó i protegit de la llum. La DIEA s'ha assecat en presència de  $\text{CaH}_2$  i l'èter dietílic sobre fil de sodi. S'ha fet servir dioxà destil·lat sobre KOH i guardat sobre  $\text{Al}_2\text{O}_3$  neutra. La piridina s'ha adquirit anhidra de qualitat Karl-Fischer, i opcionalment s'hi han afegit troços de  $\text{CaH}_2$  per evitar el guany d'humitat. Els altres solvents només s'han destil·lat abans de fer servir. S'ha utilitzat DMF qualitat síntesi de pèptids, fent bombollejant prèviament nitrògen per a eliminar contaminants volàtils i guardant-la sobre tamís molecular activat de 4 Å.

•La (2-cianoetoxi)cloro(diisopropilamino)fosfina i la (2-cianoetoxi)-bis(diisopropilamino)fosfina s'han adquirit a Aldrich o Sigma. L'1-H-tetrazole comercial (Aldrich) s'ha sublimat abans d'utilitzar i el 5-(*o*-nitrofenil)tetrazole s'ha preparat segons s'ha descrit<sup>270</sup>. L'hidroximetilpoliestirè ( $\text{HOCH}_2\text{-PS}$ , f 1mmol OH/g), s'ha adquirit a Bachem Feinchemikalien AG. La dissolució de  $t\text{BuOOH}$  3 M en toluè és també comercial (Fluka) i s'ha emprat directament.

•Els alcohols 3-hidroxipropionitril i 2-nitroetanol s'han obtingut per via comercial (Aldrich, Merck), mentre que el 2-(4-nitrofenil)etanol i el 2-(2,4-dinitrofenil)etanol s'han preparat d'acord a procediments publicats<sup>104,165</sup>. El  $\text{BEt}_3$  utilitzat com a dissolució 1 M en THF s'ha adquirit comercialment.

•També són comercials els reactius següents: clorur de 4,4'-dimetoxitritil, clorur de fluorenilmetoxicarbonil, clorur d'isobutiril, clorur de trimetilsilil, clorur de *t*-butildimetilsilil, el dimetilacetal de la dimetilformamida i els derivats trimetilsililats respectius de pirrolidina i dimetilamina.

## 2. Obtenció del nucleopèptid Boc-Ser(p<sup>5</sup>TCT)NHcHex (25):

### 2.1 Síntesi de N<sup>α</sup>-*t*-butoxicarbonil-L-serina-ciclohexilamida β-O-(2-cianoetil)-N,N-diisopropilfosforamidit (22):

Boc-Ser-NHcHex (19, Sec. Exp. Cap.3, apartat 1.1) s'ha fosfitilat amb (2-cianoetoxi)bis(N,N-diisopropilamino)fosfina i tetrazole seguint el mateix procediment que es descriu pels derivats de nucleòsid (Sec. Exp. Cap.3, apartat 3.1.c). S'ha obtingut el producte com un oli dens, que no necessita de purificació posterior donat que a l'espectre de <sup>31</sup>P RMN no s'observen senyals addicionals de les esperades. Rdt : 80%; Rf (sistema G): 0.70; <sup>31</sup>P RMN (CDCl<sub>3</sub>, 81 MHz) δ : 149.8, 148.8.

### 2.2 Obtenció de l'oligonucleotidil-resina HO-T-C<sup>Fmoc</sup>-T-suc-NHCH<sub>2</sub>-PS (23):

La síntesi en fase sòlida del nucleopèptid s'ha dut a terme sobre 100 mg de DMT-T-suc-NHCH<sub>2</sub>-PS (aquesta Secció, apartat 3.2) amb una substitució en grups DMT de 0.12 mmol/g. L'acoblament dels nucleòsids fosforamidit DMT-dC<sup>Fmoc</sup>-P(OCNE)NiPr<sub>2</sub> (84a, Sec. Exp. Cap.3, apartat 3.1) i DMT-T-P(OCNE)NiPr<sub>2</sub> s'ha realitzat seguint la metodologia del fosfit-triester adaptada al suport de poliestirè ja esmentada (Taula II - Mater. Met. Gen., apartat IV), emprant-se un muntatge experimental de tipus manual.

A diferència del protocol general, les etapes d'acoblament (Taula II - etapa 8) han estat de 45 min cadascuna, emprant-se 10 eq. de nucleòsid fosforamidit (400 μL d'una dissolució 0.3 M en DCM anh) i 40 eq. de tetrazole (400 μL d'una dissolució 1.2 M en ACN/THF 7:3). El rendiment mig d'incorporació dels nucleòsids fosforamidit (determinat a partir de l'absorbància a l'UV del catió DMT<sup>+</sup>) ha resultat ser de 96%.

Com a control de la síntesi s'ha obtingut l'oligonucleòtid 5'TCT<sup>3</sup>, per desprotecció i desancoratge d'una al·lquota de l'oligonucleotidil-resina abans de l'acoblament de l'aminoàcid mitjançant tractament amb K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.05 M en MeOH/dioxà 1:1 durant 4 h a temperatura ambient. HPLC (sistema FR-C, gradient lineal 0-100% B, 20 min, 260 nm) t<sub>R</sub> : 8.5 min (>95% pur).

### 2.3 Acoblament de Boc-Ser(P(OCNE)NiPr<sub>2</sub>)-NHcHex sobre l'oligonucleotidil resina 23:

L'acoblament de l'aminoàcid a l'oligonucleotidil-resina s'ha realitzat de forma equivalent als nucleòsids, durant 40 min i amb catàlisi de tetrazole, excepte en el fet d'haver emprat 20 eq. del corresponent derivat fosforamidit Boc-Ser(P(OCNE)NiPr<sub>2</sub>)-NHcHex (400 μL d'una dissolució 0.6 M en DCM) i 80 eq. de tetrazole.

### 2.4 Desprotecció i desancoratge :

S'han provat dos procediments :

i) La resina s'ha tractat en una primera etapa amb una dissolució 0.01 M TBAF.3H<sub>2</sub>O en THF anh (50 eq) durant 10 min. Una vegada la resina ha estat filtrada i rentada (THF x3), s'han efectuat dos tractaments amb una dissolució 0.05 M de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (100 eq) en MeOH/dioxà (1:1), el primer durant 4 h i el segon durant tota una nit.

ii) S'ha sotmès la resina a tractament amb una dissolució 0.05 M de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (100 eq) en MeOH/dioxà (1:1) durant 4 h. S'ha realitzat un segon tractament durant una nit.

El rendiment d'alliberament de producte s'ha comprovat en cada cas per absorció a l'UV (>95%). Acabat cadascun dels tractaments, s'ha filtrat i rentat la resina amb MeOH, i els filtrats corresponents s'han neutralitzat amb AcOH 1%, abans de concentrar-los a sequedat. Analitzats per HPLC (sistema FR-C, gradient lineal 0-100% B en 20 min., 260 nm), els crús presenten bàsicament un mateix aspecte amb un producte majoritari corresponent al nucleopèptid (t<sub>R</sub>: 12.0 min, >90%), i un de minoritari assignable a TCT (t<sub>R</sub>: 8.5 min).

## 2.5 Purificació i caracterització :

La purificació del cru s'ha realitzat per cromatografia de bescanvi aniònic a través de DEAE-Sephadex, eluint amb un gradient de tampó TEAB de 0.1 a 0.5 M. S'ha obtingut el producte per liofilització de les fraccions corresponents (49 OD<sub>260</sub> a partir de 1.2 μmol inicials de DMT-T-suc-NHCH<sub>2</sub>PS, que suposa un rendiment total del 50%).

La sal sòdica del nucleopèptid **25** s'ha obtingut per elució a través d'una columna Dowex 50W x 4 i, després de ser liofilitzada en D<sub>2</sub>O (x 3), se n'han enregistrat espectres de ressonància :

<sup>1</sup>H RMN (D<sub>2</sub>O, 500 MHz) δ : 7.70 (1H, d, J 7 Hz, H<sub>6</sub> dC), 7.55 (2H, s, 2 x H<sub>5</sub> T), 6.15 (3H, m, 3 x H<sub>1</sub>'), 5.91 (1H, d, J 7 Hz, H<sub>5</sub> dC), 4.40-3.38, 3.60-3.50 (14 H, m, CH<sub>α</sub> Ser, CH<sub>2</sub>β Ser, 3 x H<sub>3</sub>', 3 x H<sub>4</sub>', 6 x H<sub>5</sub>'), 3.40 (1H, m, CH cHex), 2.46-2.10 (6H, m, 6 x H<sub>2</sub>'), 1.76 (9H, m, 3 x CH<sub>3</sub> tBu), 1.60-0.94 (16 H, m, 5 x CH<sub>2</sub> cHex, 2 x CH<sub>3</sub>-5 T).

<sup>31</sup>P RMN (D<sub>2</sub>O, 81 MHz) δ : banda ampla centrada a -3.6 ppm.

El producte també s'ha sotmès a digestió enzimàtica amb el sistema fosfodiesterasa de verí de serp/fosfatasa alcalina (1 OD<sub>260</sub>, 6 h, 36°C - Mater. Mèt. Gen., apartat VII). L'anàlisi per HPLC (sistema FR-C, gradient III) del producte de digestió mostra la proporció de nucleòsids esperada: dC 1.0, T 1.9.

A més, el producte s'ha caracteritzat mitjançant EM: (electrospray, ACN/aigua, mode negatiu) m/z : 590.7 [M-2H]<sup>2-</sup>, 601.7 [M-3H+Na]<sup>2-</sup>, 1182.2 [M-H]<sup>-</sup>, 1204.3 [M-2H+Na]<sup>-</sup>, 1226.4 [M-3H+2Na]<sup>-</sup>, pes molecular estimat : 1183.6, pes molecular teòric (C<sub>43</sub>H<sub>64</sub>O<sub>24</sub>N<sub>9</sub>P<sub>3</sub>) : 1183.95.

## 2.6 Proves d'estabilitat a tractaments bàsics :

S'han tractat fraccions del nucleopèptid **25** (0.5 OD<sub>260</sub>), que han estat prèviament liofilitzades, amb els diferents reactius següents : i) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.05 M en MeOH/dioxà 1:1 (200 μL); ii) LiOH.H<sub>2</sub>O en MeOH/dioxà/aigua 1.5:1.5:1 (200 μL); iii) NH<sub>3</sub> aq conc en dioxà 1:1, a temperatura ambient (200μL); iv) NH<sub>3</sub> aq conc en dioxà 1:1, a 55°C (200 μL).

L'evolució del producte s'ha seguit per anàlisi per HPLC en fase reversa (sistema FR-C, gradient 0-100% B en 20 min, 260 nm), condicions en què el nucleopèptid presenta t<sub>R</sub>: 11.7 min i el producte de trencament de l'enllaç del pèptid i l'oligonucleòtid, p<sup>5'</sup>TCT, t<sub>R</sub> : 8.0 min. Pels tractaments i i ii, s'ha realitzat un control a diferents temps, per anàlisi d'alíquotes de les anteriors dissolucions (50 μL), que han estat neutralitzades abans de ser injectades a l'HPLC. Pels tractaments amb les dissolucions amoniacals, iii i iv, s'ha s'ha efectuat un únic control. En aquest cas, les dissolucions han estat liofilitzades al final del tractament i han estat redissoltes en aigua per dur a terme l'anàlisi.

Els resultats s'exposen a la Taula 2.3 (Cap.2, apartat 4.1).

## 3. Intents d'obtenció del nucleopèptid Ac-Ser(p<sup>5'</sup>CATCAT<sup>3'</sup>)-Gly-Asp-NH<sub>2</sub> (**32**) mitjançant l'estratègia convergent :

### 3.1 Obtenció dels pèptids protegits

Ac-Ser-Gly-Asp(OX)-NH<sub>2</sub> (X : Fm **28a**, X : Anpe **28b**, X : Bzl **28c**) i  
Ac-Asn-Ser-Gly-Asp(OFm)-NH<sub>2</sub> (**29**) :

#### a) Síntesi dels pèptids **28a**, **28b** i **29** :

Els tres pèptids han estat sintetitzats emprant l'estratègia Boc. Els Boc-aminoàcids s'han unit seqüencialment sobre la resina *p*-metilbenzidrilamina (escala 0.5-1 mmol) fent servir els protocols estàndar (Taula I - Mater. Mèt. Gen.). El residu de serina s'ha introduït per acoblament amb DCC amb el grup β-hidroxil protegit (Boc-Ser(Bzl)-OH) o lliure (Boc-Ser-OH). La Boc-asparagina (pèptid **29**) s'ha incorporat en forma d'ester actiu d'hidroxibenzotriazole, obtingut prèviament a l'acoblament per reacció amb quantitats equivalents de HOBt i DCC a 0°C, i afegint directament a la resina la dissolució que s'obté, un cop separada la diciclohexilurea per filtració amb llana de vidre.



Un cop acabada la síntesi, el grup  $\alpha$ -amino N-terminal s'ha acetilat per reacció amb anhídrid acètic (10 eq) i DIEA (10 eq) en DMF durant 30 min (no es fa servir, però, DIEA quan la serina s'incorpora amb el grup  $\beta$ -hidroxil sense protegir). Els pèptids protegits s'han desancorat de la resina per tractament amb HF/anisol (9:1) a 0°C durant 1 h. Després d'haver evaporat l'HF, s'ha rentat la resina amb èter dietílic sec, THF i DMF. Només una part del pèptid **28b** (aprox 25%) s'ha solubilitzat en THF, la resta del producte i els altres pèptids s'han recuperat exclusivament del filtrat de DMF. Després d'haver estat purificats, els pèptids s'han triturat amb èter dietílic sec i s'han separat de la dissolució per centrifugació. Els rendiments finals s'han calculat en relació a les quantitats teòriques a obtenir a partir dels graus de substitució inicials de les resines (Mater. Mèt. Gen., apartat VI).

• *Ac-Ser-Gly-Asp(OFm)-NH<sub>2</sub> (28a)*: a la síntesi realitzada amb Boc-Ser(Bzl)-OH s'ha obtingut un cru que per anàlisi per HPLC mostra dos productes, **A** i **B** en proporció 7:3 respectivament (vegeu també el tetrapèptid **31**). Aquests productes s'han pogut separar per elució amb DMF a través de Sephadex LH-20. **A** s'ha pogut caracteritzar com el pèptid desitjat, mentre que **B** és el subproducte de benzilació de l'anell aromàtic pel grup protector Fm. En canvi, el cru de la síntesi amb Boc-Ser-OH només presenta el producte desitjat, que s'ha purificat igualment per elució amb DMF a través de Sephadex LH-20. El pèptid **A** s'ha obtingut amb un 40% de rendiment total en la síntesi amb Boc-Ser(Bzl)-OH i un 60% en utilitzar Boc-Ser-OH.

*Ac-Ser-Gly-Asp(OFm)-NH<sub>2</sub> (A)*: Anàlisi d'aminoàcids: Ser: 0.5, Gly: 1.1, Asp: 0.9; <sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>, 200 MHz)  $\delta$ : 8.28 (1H, m, NH Gly), 8.08 (2H, m, NH Asp, NH Ser); 7.02 (2H, d, J 2 Hz, Ar), 7.64 (2h, d, J 7 Hz, Ar), 7.42-7.10 (6H, m, Ar, NH<sub>2</sub>), 4.60-4.10 (5H, m, CH<sub>2</sub> Fm, CH Fm, CH $\alpha$  Asp, CH $\alpha$  Ser), 3.72 (2H, m, CH<sub>2</sub> $\alpha$  Gly), 3.56 (2H, m, CH<sub>2</sub> $\beta$  Ser), 1.85 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO); EM (FAB, NBA, Xe, mode positiu) m/z: 497.2 [M+H]<sup>+</sup>, 519 [M+Na]<sup>+</sup>; HPLC (sistema FR-A, gradient lineal 10-55% B en 20 min, 300 nm) t<sub>R</sub>: 17.3 min.

*Ac-Ser-Gly-Asp(OFm<sup>Bzl</sup>)-NH<sub>2</sub> (B)*: HPLC (sistema FR-A, gradient lineal 10-55% B en 20 min, 300 nm) t<sub>R</sub>: 18.1 min.

• *Ac-Ser-Gly-Asp(OAnpe)-NH<sub>2</sub> (28b)*: s'han fet servir per a la seva obtenció Boc-Asp(OAnpe)-OH i Boc-Ser(Bzl)-OH o Boc-Ser-OH, observant-se en ambdós casos un únic compost majoritari a l'anàlisi per HPLC del cru (Fig. 1.a-b). La purificació s'ha realitzat mitjançant filtració molecular a través de Sephadex LH-20 i eluint amb DMF, obtenint-se el pèptid amb un 53% de rendiment total en emprar-se Boc-Ser(Bzl)-OH i un 64% quan s'utilitza Boc-Ser-OH. Anàlisi d'aminoàcids: Ser: 0.7, Gly: 1.1, Asp: 1.0; <sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>, 200 MHz)  $\delta$ : 8.43 (1H, d, J 1.5 Hz, Ar), 8.25 (3H, m, Ar, NH Gly), 8.05 (2H, m, NH Asp, NH Ser), 7.76 (1H, d, J 8 Hz, Ar), 7.24, 7.19 (2H, s, s, NH<sub>2</sub>), 4.55 (1H, m, CH $\alpha$  Asp), 4.25 (3H, m, CH $\alpha$  Ser, CH<sub>2</sub>O), 3.72 (2H, m, CH<sub>2</sub> $\alpha$  Gly), 3.58 (2H, m, CH<sub>2</sub> $\beta$  Ser), 3.23 (2H, m, CH<sub>2</sub>Ar), 2.65 (3H, s, CH<sub>3</sub>COAr), 1.87 (3H, s, CH<sub>3</sub>CONH); EM (FAB, NBA, Xe, mode positiu) m/z: 510 [M+H]<sup>+</sup>, 532 [M+Na]<sup>+</sup>; HPLC analítica (sistema FR-A, gradient lineal 10-55% B en 20 min, 260 nm): t<sub>R</sub>: 12.6 min.

• *Ac-Asn-Ser-Gly-Asp(OFm)-NH<sub>2</sub> (29)*: a l'anàlisi per HPLC del cru de síntesi s'observen dos productes, **A** i **B**, d'àrees relatives 3:1, els quals es poden separar mitjançant MPLC (columna Lichoprep RP-8, gradient lineal 10-80% B en 100 min, on A: aigua/DMF/TFA 75:25:0.5 i B: ACN/DMF/TFA 75:25:0.5, flux: 10 mL/min i detecció a 300 nm). El producte **A** (menor t<sub>R</sub>) es correspon amb el pèptid desitjat, mentre que el subproducte **B** s'ha pogut caracteritzar (<sup>1</sup>H RMN, EM) com el de benzilació de l'anell aromàtic del grup protector Fm.

*Ac-Asn-Ser-Gly-Asp(OFm)-NH<sub>2</sub> (A)*: Rdt: 35%; Anàlisi d'aminoàcids: Ser: 0.8, Gly: 1.0, Asp: 1.9; <sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>, 200 MHz)  $\delta$ : 8.40 (1H, m, NH Gly), 8.1 (2H, d, NH Asp, NH Asn), 8.06 (2H, d, NH Ser), 7.90 (2H, d, Ar), 7.67 (2H, d, Ar Fm), 7.48-7.26 (6H, m, Ar Fm, NH<sub>2</sub> Asp), 7.20, 7.02 (2H, s, s, NH<sub>2</sub> Asn), 4.50 (2H, t, J 6 Hz, CH<sub>2</sub> Fm), 4.37-4.10 (4H, m, CH Fm, CH $\alpha$  Asp, CH $\alpha$  Asn, CH $\alpha$  Ser), 2.95-2.80 (2H, CH<sub>2</sub> $\beta$  Asp, CH<sub>2</sub> $\beta$  Asn), 1.82 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO); EM (FAB, tioglicerol, Xe, mode positiu) m/z: 611 [M+H]<sup>+</sup>; HPLC analítica (sistema FR-A, gradient lineal 30-80% B en 20 min, 300 nm) t<sub>R</sub>: 6.9 min.

*Ac-Asn-Ser-Gly-Asp(OFm<sup>Bzl</sup>)-NH<sub>2</sub> (B)*: Anàlisi d'aminoàcids: Ser: 0.7, Gly: 1.0, Asp: 1.9; <sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>, 200 MHz): essencialment el mateix espectre que per **A** excepte pels senyals  $\delta$  7.40-7.10 (11H, m, Ar Fm, NH<sub>2</sub> Asn, Ar Bzl) i 3.85 (2H, s, ArCH<sub>2</sub>Ar'); MS (FAB, tioglicerol, Xe, mode positiu) m/z: 701 [M+H]<sup>+</sup>, 723 [M+Na]<sup>+</sup>; HPLC analítica (sistema FR-A, gradient lineal 30-80% B en 20 min, 300 nm) t<sub>R</sub>: 11.0 min.

b) Síntesi del pèptid **28c**

## • Fmoc-Asp(OBzl)-OH :

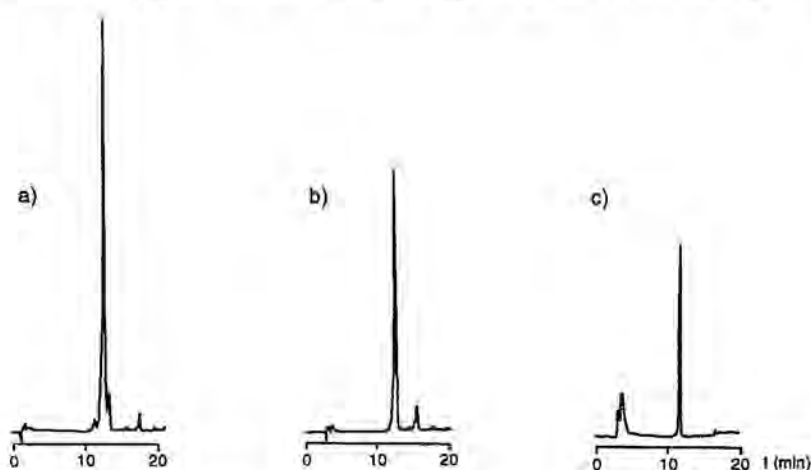
H-Asp(OBzl)-OH (3g, 13.4 mmol), dissolt en DCM, es tracta amb TMS-Cl (5.2 mL, 40.2 mmol) i DIEA (5 mL, 27 mmol)<sup>271</sup>, i s'escalfa a reflux durant 30 min. A continuació, es refreda la dissolució amb un bany de gel i s'hi afegeix Fmoc-Cl (2.4 g, 10 mmol). Es retira el bany i es manté la reacció durant 1.5 h. S'afegeix NaHCO<sub>3</sub> aq 5% i la corresponent fase aquosa es renta amb èter (x 2). S'acidifica la fase aquosa amb HCl 1 M fins a pH 2 i a continuació s'extreu amb AcOEt (x 2). La fase orgànica s'asseca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i s'evapora a sequedat. El residu, dissolt en èter, es decolora sobre carbó actiu. Després d'evaporar el dissolvent s'obté el producte com un sòlid blanc (2.5 g, 42%); Rf (sistema A) : 0.60; pf : 132-134°C (Lit 131-133<sup>272</sup>); [α]<sub>D</sub>: -59.1° (CHCl<sub>3</sub>, c 1.04); <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) δ : 9.35 (1H, m, COOH), 7.80-7.27 (13H, m, Ar Fmoc, Ar Bzl), 5.92 (1H, d, J 6 Hz, NH), 5.18 (2H, s, CH<sub>2</sub> Bzl), 4.75 (1H, m, CHα Asp), 4.42 (2H, m, CH<sub>2</sub> Fm), 4.25 (1H, m, CH Fm), 3.05 (2H, m, CH<sub>2</sub>β Asp).

• Ac-Ser-Gly-Asp(OBzl)-NH<sub>2</sub> (**28c**) :

Com a primer pas ha calgut funcionalitzar la resina d'aminometil-poliestirè amb un espaiador bifuncional (AM linker, Millipore<sup>R</sup>) que permeti el desancoratge en condicions àcides més suaus. Aquest compost, l'àcid *p*-[(*R*,5)-α-[1-(9H-fluoren-9-il)-metoxiformamido]-2,4-dimetoxibenzil]-fenoxiacètic<sup>166</sup> (3 eq respecte a la resina) s'incorpora afegint-lo juntament amb HOBt (3 eqs) i, al cap de 5 min, HBTU (3 eq) i N-metilmorfolina (6 eq) en DMF. La suspensió s'agita de tant en tant, fins que a les 3 h l'assaig de ninhidrina resulta negatiu. S'han emprat Fmoc-aminoàcids per a la síntesi del pèptid, els quals s'han anat incorporant seguint el procediment estàndar de l'estratègia Fmoc (Taula I - Mater. Mèt. Gen.).

El pèptid protegit unit a resina s'ha desancorat finalment per tractament amb TFA/aigua (95:5) durant 1 h a temperatura ambient, filtrant la resina i rentant de nou amb solució TFA/aigua. Els corresponents filtrats s'han concentrat, i el pèptid s'ha precipitat sobre èter sec, separant-lo per centrifugació. L'anàlisi per HPLC indica que no és necessària purificació posterior (Fig. I.c). S'obté un sòlid blanc. Rdt total : 66% (215 mg); anàlisi d'aminoàcids: Ser: 0.6, Gly: 1.2, Asp: 0.8; <sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>, 200 MHz) δ : 8.28 (1h, t, NH Gly), 8.12 (2H, m, NH Asp, NH Ser), 7.37 (5H, s, Ar), 7.26, 7.22 (2H, s, s, NH<sub>2</sub>), 5.10 (2H, m, CH<sub>2</sub>Ar), 4.60 (1H, m, CHα Asp), 4.25 (1H, m, CHα Ser), 3.73 (2H, m, CH<sub>2</sub>β Ser), 3.59 (2H, d, CH<sub>2</sub>α Gly), 2.75 (2H, m, CH<sub>2</sub>β Asp), 1.87 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO); EM (FAB, NBA, Xe, mode positiu) m/z : 431 [M+H]<sup>+</sup>, 409 [M+Na]<sup>+</sup>; HPLC analítica (sistema FR-A, gradient lineal 10-55% B en 20 min, 260 nm) t<sub>R</sub> : 11.5 min.

Figura I : crus de síntesi dels pèptids Ac-Ser-Gly-Asp(OAnpe)-NH<sub>2</sub> (**28b**) i Ac-Ser-Gly-Asp(OAnpe)-NH<sub>2</sub> (**28c**)



a) pèptid **28b**, emprant Boc-Ser(Bzl)-OH; b) pèptid **28b**, emprant Boc-Ser-OH; c) pèptid **28c**

**3.2 Preparació de les oligonucleotidil-resines C<sup>x</sup>-AY-T-C<sup>x</sup>-AY-T-suc-R**  
**(30a : x=Fmoc, y=Fmoc, R=NHCH<sub>2</sub>-PS; 30b : x=iBu, y=Bz, R=LCAA-CPG;**  
**30c : x=iBu, y=Dmf, R=LCAA-CPG)**

**a) Síntesi sobre matriu de poliestirè : resina 30a:**

Les síntesi s'han dut a terme en un sintetitzador Applied Biosystems 380 B seguint els procediments estàndar que fan compatible la metodologia de fosfit triester amb l'ús de poliestirè (Taula II - Mater. Mèt. Gen), i emprant 5'-O-dimetoxitritil-2'-desoxinucleòsids 3'-O-(2-cianoetil)-N,N-diisopropilfosforamidit (derivats de dC<sup>Fmoc</sup> i dA<sup>Fmoc</sup> sintetitzats com es descriu a Sec. Exp. Cap.3, apartat 3.1, i el derivat de T d'origen comercial).

S'ha funcionalitzat prèviament la resina aminometilpoliestirè (500 mg, 1 mmol NH<sub>2</sub>/g) per reacció amb el succinat de 5'-O-DMT-timidin-3'-il<sup>102</sup> (65 mg, 0.125 mmol), DCC (22 mg, 0.138 mmol) i HOBt.H<sub>2</sub>O (16 mg, 0.138 mmol) en DCM (8 mL), agitant suaument al llarg d'una nit. Els grups amino que no han reaccionat s'han acetilat amb Ac<sub>2</sub>O (900 µL, 20 mmol) i DIEA (1200 µL, 20 mmol) en DMF durant 30 min. La funcionalització del suport ha resultat ser de 0.1 mmol de DMT per gram de resina.

Les síntesis han estat realitzades sobre 10 µmol de 5'-O-DMT-T-succinil resina (100 mg) efectuant etapes d'acoblament (Taula II- etapa 8) de 30 min i emprant tetrazole (1M en THF/ACN 3:7, 40 eq) com a catalitzador. Després d'haver incorporat el darrer nucleòsid de la seqüència no s'ha dut a terme l'eliminació del grup DMT terminal, que no s'ha realitzat fins a la reacció d'acoblament del pèptid fosforamidit (vegeu més endavant). El rendiment mig d'acoblament ha resultat ser de 96% (no inclou el del darrer nucleòsid), determinat mitjançant la mesura de l'absorbància de les solucions de DMT<sup>+</sup>.

S'ha controlat la puresa de l'oligonucleòtid completament desprotegit 5'CATCAT alliberant-lo d'una alíquota de resina (5 mg) per tractament amb 3% TCA/DCM i NH<sub>3</sub> aq concentrat en dioxà (1:1) a 55°C durant 6 h, i analitzant-lo per HPLC (Sec. Exp. Cap.3, apartat 5.3).

**b) Síntesi sobre matriu de boles de vidre : resines 30b i 30c:**

Els oligonucleòtids han estat també preparats mitjançant l'estratègia del fosfit triester fent servir la metodologia estàndar sobre suport de boles de vidre (Taula II, Mater. Mèt. Gen.). Tots els derivats O-(2-cianoetil)-N,N-diisopropilaminofosforamidit (DMT-T, DMT-dC<sup>iBu</sup>, DMT-dA<sup>Bz</sup> i DMT-dA<sup>Dmf</sup>.) i el suport DMT-T-suc-LCAA-CPG s'han obtingut comercialment (Applied Biosystems). Les oligonucleòtid-resines 30b, 30c s'han preparat a una escala 1 µmol (programa d'Applied Biosystems ce102a). Les eficiències d'acoblament han resultat ser del 98% per mesura de l'absorbància de DMT<sup>+</sup>. La puresa dels productes s'ha controlat com a l'apartat anterior.

**3.3 Obtenció de pèptids O-(2-cianoetil)-N,N-diisopropilfosforamidit (31a, 31b, 31c) :**

**a) Mètode A :**

El pèptid protegit 28a, 28b o 28c (65 mmol), coevaporat amb ACN anhidre (x 3), se suspèn en DCM (1 mL) sota atmosfera d'argó i a continuació s'hi afegeixen DIEA (60 µL, 390 µmol, 6 eq) i (2-cianoetoxi)cloro(diisopropilamino)fosfina<sup>167</sup> (70 µL, 325 µmol, 5 eq). Al cap de 1 h, el pèptid normalment s'ha dissolt. Per a eliminar l'excés d'agent fosfitilant, la solució es dilueix amb DCM (10 mL) i s'hi afegeix hidroximetil-poliestirè (HOCH<sub>2</sub>-PS, Bachem, 0.8 g, f 0.8 mmol OH/g, 650 µmol, 10 eq). La barreja s'agita durant 2 h més. La resina se separa per filtració i es renta amb DCM (25 mL, neutralitzat a través d'alúmina bàsica). Els filtrats es renten amb TEAB 1M (x 2) i aigua (x 2), s'assequen sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i s'evaporen a sequetat. El producte es controla mitjançant <sup>31</sup>P RMN (δ 145-148 ppm) i es troba normalment acompanyat de quantitats variables de clorofosfina hidrolitzada (δ 14 ppm) i un producte desconegut (δ 117 ppm - Cap. 1, apartat 3.3). En cap cas no s'han pogut trobar condicions de purificació adequades, pel que aquests crus s'han emprat directament en els experiments d'acoblament.

### b) Mètode B :

Alternativament, els pèptids fosforamidit s'han preparat per fosfilitació amb (2-cianoetoxi)bis(diisopropilamino)fosfina<sup>168</sup> (5 eq) i tetrazole (2.5 eq). Aquest procediment ha permès obtenir productes més purs on pràcticament no figura el producte H-PO(OCNE)NiPr<sub>2</sub> (Capítol 1, apartat 3.3). A part d'això s'ha seguit el mateix procediment que en l'apartat anterior.

### 3.4 Acoblament dels pèptids fosforamidit **31** a les oligonucleotidil-resines **30** :

Els diferents intents efectuats, així com el resultat de cada un d'ells, es resumeixen en la Taula 1.4 (Cap.1, apartat 3.4).

Les reaccions s'han dut a terme a una escala d'1 μmol d'oligonucleotidil-resina **30a**, **30b** o **30c** amb l'ajut del sintetitzador automàtic i seguint bàsicament l'esquema d'acoblament d'un nucleòsid-fosforamidit tant sobre suport de boles de vidre com per a poliestirè (Taula II - Mater. Mèt. Gen.).

Com a procediment general, els pèptids fosforamidit **31** (aprox. 50 μmol) han estat prèviament assecats per coevaporació amb ACN anh (x 3) i trasvassats en DCM anh a un vial assecat a 110°C i adaptable al sintetitzador, se n'ha evaporat el dissolvent amb corrent d'argó i s'han assecat novament en un dessecador al buit de bomba. Just abans de l'acoblament i sota una atmosfera inert d'argó s'han dissolt (200 μL), bé en ACN anh (a vegades amb un 10-25% de THF anh) per a acoblaments sobre suports de boles de vidre, o en DCM anh o THF anh per als realitzats sobre poliestirè. Ocasionalment ha calgut filtrar les solucions per a eliminar-ne els residus insolubles.

Després d'eliminar el grup protector DMT del nucleòsid terminal sobre l'oligonucleotidil-resina **30** (Taula II, etapes 1-6), l'etapa d'acoblament (etapa 8) s'ha dut a terme fent entrar al reactor 240 μL de solució de tetrazole 1 M en ACN/THF (3:7) i 160 μL de la solució de pèptid fosforamidit **31** 0.25 M, el que equival aproximadament a 38 eq d'excés de pèptid respecte a l'oligonucleòtid-resina. El temps de reacció s'ha mantingut entre 1 i 4 h. En acabat, no es realitza l'etapa d'acetilació (etapes 10-11) i es passa directament a les etapes finals d'oxidació i rentats (etapes 12-13).

### 3.5 Desprotecció i desancoratge de la resina dels productes d'acoblament :

Els diferents tractaments de desprotecció i desancoratge que s'han efectuat es resumeixen a la Taula 1.4 (Cap.1, apartat 3.4).

Una vegada efectuat l'acoblament del pèptid fosforamidit (vegeu l'anterior apartat), les corresponents resines s'han tractat amb 200 eq de reactiu respecte al nombre de grups reactius de la resina quan s'ha emprat K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.05 M en MeOH/dioxà (1:1) o LiOH 0.25 M en MeOH/dioxà/aigua (1.5:1.5:1) al llarg de 6 i 8 h respectivament. Per als tractaments en dues etapes, la primera d'elles s'ha realitzat amb 100 eq d'una dissolució de TBAF 0.01 M (0.1 M en els assajos **2** i **4**) en THF anh (procés previ d'eliminació del protector Anpe, però que també elimina grups Fm i CNE) que no provoca un desancoratge significatiu de producte. Els tractaments amb NH<sub>3</sub> aq conc s'han dut a terme amb 5 mL d'una solució 1:1 en dioxà, durant tota una nit.

El producte s'obté per filtració i rentat de la resina amb MeOH (x 2) i dioxà (x 2). Reunits els filtrats, s'han neutralitzat amb AcOH aq 10% (excepte per als filtrats que contenen NH<sub>3</sub>, que s'ha eliminat evaporant) i a continuació s'han evaporat a sequedat. Els crus així obtinguts s'han analitzat aleshores per HPLC sobre fase reversa (sistema FR-C, gradient lineal 19-21% B en 20 min, 260 nm).

De forma habitual, s'ha realitzat un segon tractament de desprotecció i desancoratge (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, LiOH o NH<sub>3</sub>) sobre la mateixa resina durant tota una nit, encara que la major part del producte (aprox. 90% per absorbància UV a 260 nm) ja havia estat alliberada en el tractament previ.

### 3.6 Purificació i caracterització dels productes obtinguts en els assajos d'acoblament :

Per a la purificació, els crus s'han cromatografiat sobre una columna DEAE-Sephadex eluint amb un gradient de força iònica amb el tampó TEAB (0.2 M a 1 M; detecció de l'elució per absorbància

a 254 nm). Les corresponents fraccions, després de l'anàlisi per HPLC, s'han juntat i liofilitzats. Després de cada purificació s'han obtingut 12-16 OD<sub>260</sub> de producte, el que implicaria un rendiment total (síntesi, desprotecció, desancoratge i purificació) del 30-40% (en base a que la síntesi de l'oligonucleòtid s'ha efectuat a una escala de 1 µmol).

Tres han estat les tècniques cromatogràfiques (Mater. Mèt. Gen.) utilitzades per a l'anàlisi dels productes:

- HPLC sobre fase reversa (sistema FR-C, gradient lineal 19-21% B en 20 min, 260 nm).

- HPLC de bescanvi aniónic, pel qual s'han utilitzat dos tipus de columnes: i) un suport amb un bescanviador feble tipus polietilenimino (sistema BA-A, gradient lineal 0-50 % B en 20 min); ii) columna amb un bescanviador fort tipus sal d'amoni quaternària (sistema BA-B, bescanviador fort, gradient lineal 0-100% B en 20 min - detecció 260 nm)

- Electroforesi capil·lar sobre gel (sistema CGE, Micro-gel<sub>100</sub>, -15kV, detecció 260 nm).

Els temps de retenció dels diferents productes identificats per a cadascuna de les tècniques s'indiquen en la següent taula, sent **X** el producte aïllat en la major part dels experiments (Taula 1.4 Cap.1, apartat 3.5):

	sistema FR-C 15-21% B 20'	sistema BA-A 0-50% B 20'	sistema BA-B 0-100% B 20'	sistema CGE -15 kV <sup>a</sup>
producte <b>X</b>	12.2	14.3	9.2	-1.1
<sup>5</sup> CATCAT <sup>b</sup>	12.8	12.6	7.5	0.0
p <sup>5</sup> CATCAT <sup>b</sup>	10.0	15.0	13.1	-0.3
Hp <sup>5</sup> CATCAT <sup>b</sup>	-----	-----	9.5 <sup>c</sup>	---

Notes : <sup>a</sup> expressats com a diferències dels t<sub>R</sub> per coinjecció d'un patró; <sup>b</sup> preparats com s'indica a la Sec. Exp. Cap.3, apartat 5.3; <sup>c</sup> no coelueix per coinjecció amb el producte **X**.

Les anàlisis d'aminoàcids s'han realitzat sobre els productes purificats (1 OD<sub>260</sub>).

El producte **X** (1 OD<sub>260</sub>) ha estat sotmès a una digestió enzimàtica amb la barreja de fosfodiesterasa de verí de serp i fosfatasa alcalina en les mateixes condicions que els oligonucleòtids (0.5-1 OD<sub>260</sub>, 6 h, 36°C; Mater. Mèt. Gen.). L'anàlisi dels nucleòsids per HPLC (sistema FR-C, gradient I) no revela cap diferència respecte al que s'obté per a l'oligonucleòtid CATCAT (C(1) : 1.0, T(1) : 1.1, A(1) : 0.9 - Sec. Exp. Cap.3, apartat 5.3). En canvi, el producte es manté inalterat en ser tractat amb fosfodiesterasa de melsa (0.5 OD<sub>260</sub>, 6 h, 36°C), enzim que degrada completament <sup>5</sup>CATCAT<sup>3'</sup> a una barreja de nucleòsids i nucleòsid-fosfats.

El producte **X**, purificat i liofilitzat, (aprox 1 OD<sub>260</sub>) ha estat sotmès a diferents reactius (Cap.1, apartat 3.6.d) per determinar la seva estabilitat. L'anàlisi de la solució, prèviament neutralitzada o liofilitzada ha estat efectuada per HPLC (sistemes FR-C i BA-A en les condicions esmentades en l'anterior apartat).

S'ha obtingut la sal sòdica del producte **X** per elució a través de Dowex 50W x 4, 1 x 5 cm, en forma sòdica. Les corresponents fraccions han estat liofilitzades. El residu ha estat redissolt en D<sub>2</sub>O i reliofilitzat en D<sub>2</sub>O (x 3). S'ha dissolt en D<sub>2</sub>O (aprox. 1mM) i s'han enregistrat els espectres de RMN: <sup>31</sup>P RMN (81 MHz, ac. 15 hr) δ : 0.27, -1,18 (àrees relatives 1: 5.3); <sup>1</sup>H RMN (500 MHz) δ : 8.49, 8.48 (2H, s, s, 2 x H8 A), 8.21, 8.20 (2H, s, s, 2 x H2 A), 7.66, 7.63 (2H, d, d, J 7.5, 7.5 Hz, 2 x H6 C), 7.59, 7.45 (2H, s, s, 2 x H6 T), 6.45, 6.27, 6.15 (6H, m, 6 x H1'), 6.04 (2H, m, 2 x H5 C), 5.00-3.50 (H3', H4', H5'), 2.94, 2.38, 2.21 (12H, m, 12 x H2'), 1.83, 1.78 (6H, s, s, 2 x CH<sub>3</sub>-5 T).

També s'ha obtingut l'espectre de masses per al producte **X** mitjançant les tècniques de FAB i electrospray : FAB (tioglicerol, Xe, detecció negativa) m/z : 1880, 1901, 1923, 1945, 1971; FAB (el mateix, detecció positiva) m/z : 1882, 1904, 1925, 1947, 1970; ES (aigua/ACN, detecció negativa) m/z : 463.9, 619.0, 626.2, 633.4, 678.1.

### 3.7 Reacció de l'H-fosfonamidat d'O-(2-cianoetil) i N,N-diisopropil (**72**) amb grups hidroxil :

#### a) H-fosfonamidat d'O-(2-cianoetil) i N,N-diisopropil : H-PO(OCNE)NiPr<sub>2</sub> (**72**) :

S'hidrolitza (2-cianoetoxi)cloro(diisopropilamino)fosfina, dissolta en DCM i en presència de DIEA (1.2 eq), afegint-li TEAB 1 M. Se separa la fase aquosa i la fase orgànica es torna a rentar amb TEAB 1 M, s'asseca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i s'evapora a sequedat. El producte s'asseca per coevaporació amb ACN anh (x 2). S'obté un oli incolor. <sup>31</sup>P RMN (81 MHz) δ : 14.1

#### b) Intents de fosfitilació d'oligonucleotidil-resines per reacció amb l'H-fosfonamidat **72** :

S'han realitzat a similitud dels intents d'acoblament dels pèptids fosforamidit (apartat 3.3 d'aquesta Secció). Per això s'han preparat dissolucions de l'H-fosfonamidat **72** 0.25 M en DCM, i s'han assajat dos catalitzadors diferents : tetrazole, de concentració 1M en ACN/THF (7:3), o *o*-nitrofeniltetrazole, també de concentració 1 M en THF. Els assajos s'han realitzat sobre la resina CATCAT-suc-NHCH<sub>2</sub>-PS **97** (Sec. Exp. Cap.3, apartat 5.3; escala 1µmol). El producte, després de l'etapa d'oxidació, s'ha desprotegit i alliberat de la resina per tractament amb NH<sub>3</sub> aq conc/dioxà (1:1) durant tota una nit a 55°C. El productes, recuperats per filtració de la resina i evaporació de la solució s'han analitzat per HPLC (sistema BA-B, gradient lineal 0-100% en 20 min, 260 nm). Els resultats han estat els següents :

i) En l'intent en què s'ha utilitzat tetrazole com a catalitzador només s'allibera l'oligonucleòtid (tr: 7.7 min).

ii) Els dos assajos realitzats en presència d'*o*-nitrofeniltetrazole mostren una barreja de productes en què pràcticament no s'observa CATCAT, el que s'interpreta com a resultat de la reacció de l'H-fosfonamidat **72** amb l'oligonucleòtid. Així, si després de l'etapa de reacció amb l'H-fosfonamidat **72**, no s'efectua ni oxidació ni acetilació (Mater. Mèt. Gen., Taula II, etapes 10-12), s'allibera l'oligonucleòtid-5'-fosfonat Hp<sup>5'</sup>CATCAT (vegeu l'apartat 5.3 del Capítol 3) com a producte majoritari. Si es realitza en canvi l'etapa d'oxidació, s'aïlla l'oligonucleòtid-5'-fosfat p<sup>5'</sup>CATCAT (vegeu també l'apartat 5.3 del Capítol 3).

#### c) H-fosfonat d'O-2-cianoetil i O-5'-(3'-O-fenoxiacetil-4-N-toluïl)desoxicitidinil : H-PO(OCNE)-dC<sup>Tol</sup>-Pac (**73**) :

El nucleòsid, 3'-O-fenoxiacetil-4-N-toluïl-2'-desoxicitidina<sup>169</sup>, assecat per coevaporació amb ACN anh (x 2), dissolt en ACN anh i en atmosfera d'argó, s'ha fet reaccionar amb l'H-fosfonamidat **72** (5 eq respecte nucleòsid) en presència d'un catalitzador àcid (20 eq), tetrazole o *o*-nitrofeniltetrazole. Per tots dos casos, s'ha seguit la reacció al llarg de 4 h per cromatografia en capa fina. Tot seguit, s'ha diluït amb DCM, i la solució corresponent s'ha rentat amb NaHCO<sub>3</sub> aq 5% i NaCl sat, s'ha assecat sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i s'ha evaporat a sequedat. El residu s'ha precipitat sobre hexà/èter.

Per a l'assaig amb tetrazole, no s'ha aïllat cap producte diferent de l'inicial, fet que ja es posava de manifest per capa fina.

En canvi, per a la prova amb *o*-nitrofeniltetrazole com a catalitzador, el producte inicial (sistema C, Rf: 0.75) evoluciona fins que al cap de 2 h pràcticament ha desaparegut. Al final del procés s'ha aïllat un producte que s'ha pogut caracteritzar com el corresponent H-fosfonat diester **73**: Rdt: 70%, Rf (sistema C): 0.70, <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) δ : 8.80, 5.30 (1H, d, J 700 Hz, P-H), 8.67 (1H, m, NH-4), 8.17 (1H, d, J 7 Hz, H6), 7.65-6.85 (10H, m, Ar, H5), 6.25 (1H, m, H1'), 4.70 (2H, m, CH<sub>2</sub>Ar), 4.50-4.30 (4H, m, H3', H4', CH<sub>2</sub>OP), 2.80 (2H, m, CH<sub>2</sub>CN), 2.51 (3H, s, CH<sub>3</sub>Ar), 2.25 (1H, m, H2'); <sup>31</sup>P RMN (CDCl<sub>3</sub>, 81 MHz) δ : 7.5, 6.8.

4. Proves addicionals encaminades a la determinació de l'estructura i mecanisme de formació del producte **X** en els intents d'obtenció del nucleopèptid Ac-Ser(p<sup>5'</sup>CATCAT)-Gly-Asp-NH<sub>2</sub> :

4.1 Seguiment del procés d'obtenció d'un nucleopèptid, per acoblament d'un pèptid fosforamidit amb un derivat de nucleòsid :

a) Intents d'obtenció d'Ac-Ser(p<sup>3'</sup>T-DMT)-Gly-Asp-NH<sub>2</sub> :

• Ruta I : reacció d'Ac-Ser-Gly-Asp(OAnpe)-NH<sub>2</sub> (**28b**) amb DMT-T-P(OCNE)NiPr<sub>2</sub> :

El pèptid **28b** (apartat 3.1 d'aquesta Secció; 2 eq respecte al nucleòsid), prèviament assecat per coevaporació amb ACN anh, s'ha suspès en THF anhidre i, sota una atmosfera inert d'argó, s'hi han afegit DMT-T-fosforamidit (100 mg, 0.13 mmol) i tetrazole (4 eq respecte nucleòsid). S'ha deixat reaccionar durant 1 h. En acabat, s'ha diluït una alíquota de la dissolució amb CDCl<sub>3</sub> anhidre i se n'ha enregistrat un espectre de <sup>31</sup>P RMN, podent-s'hi observar la presència d'un senyal majoritari (δ 139.0 ppm). A continuació s'ha afegit a la dissolució tBuOOH 3 M en toluè (10 eq). Passats 10 min s'ha diluït amb DCM, i la corresponent solució s'ha rentat amb NaHCO<sub>3</sub> aq 5% (x 2) i NaCl sat, s'ha assecat sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i s'ha evaporat a sequedat. El residu s'ha dissolt en DCM i s'ha precipitat sobre hexà, obtenint-se un sòlid blanc per centrifugació i decantació (65 mg).

Realitzat un espectre <sup>1</sup>H RMN (dades no incloses) s'ha pogut comprovar que si bé es correspon amb un derivat de DMT-T, no hi apareixen senyals assignables al pèptid presumiblement unit, en especial els de la zona aromàtica pertanyents al grup protector Anpe (δ 8.5-7.5) de la cadena lateral d'aspàrtic. L'anàlisi del producte per HPLC (sistema FR-B, gradient lineal 20-100 % B en 20 min, 260 nm) mostra un únic compost majoritari (t<sub>R</sub> 14.5 min), el qual per tractament amb NH<sub>3</sub> aq conc en dioxà 1:1 (1 h, t amb) o TBAF 0.01 M en THF (1 h, t amb) evoluciona en ambdós casos donant un mateix producte (t<sub>R</sub> 8.6 min).

Per HPLC analític s'han aïllat els dos productes (t<sub>R</sub> 14.5 i 8.6 min, respectivament), i s'ha pogut comprovar que cap dels dos productes no presenta anàlisi d'aminoàcids positiu ni coelueixen per HPLC amb altres derivats possibles com DMT-Tp (t<sub>R</sub> 9.0 min - Sec. Exp. Cap.3, apartat 5.1), DMT-T (t<sub>R</sub> 13.8 min), DMT-T-PO(H)OCNE o DMT-THp (t<sub>R</sub> 13.6 i 9.0 min respectivament - Sec. Exp. Cap.3, apartat 5.2).

A part, del producte de tractament amb NH<sub>3</sub> (t<sub>R</sub> 8.6 min) se n'ha obtingut també un espectre de masses, el qual tampoc no ha donat informació sobre la seva estructura: (FAB, "magic bullet", mode negatiu) m/z : 652.3, 651.1, 349.1.

• Ruta II : reacció d'Ac-Ser(P(OCNE)NiPr<sub>2</sub>)-Gly-Asp(OAnpe)-NH<sub>2</sub> (**31b**) amb DMT-T :

El pèptid fosforamidit **31b** (150 μmol), obtingut per fosfilitació del pèptid **28b** amb (2-cianoetoxi)bis(diisopropilamino)fosfina i tetrazole segons s'ha descrit a aquesta Secció (apartat 3.3 - Mètode B), s'ha dissolt en DCM anhidre, i en una atmosfera inert d'argó, s'hi han afegit DMT-T (60 mg, 75 μmol) i a continuació tetrazole (4 eq respecte pèptid). S'ha deixat reaccionar durant 1 h, al final de la qual s'ha enregistrat un espectre de <sup>31</sup>P RMN, en el qual s'observa un senyal majoritari (δ 139.0 ppm). A partir d'aquí s'ha seguit el mateix procediment que a l'apartat anterior (oxidació amb tBuOOH, rentats de la fase orgànica amb dissolucions aquoses i precipitació). S'ha obtingut un sòlid blanc (55 mg).

L'anàlisi per HPLC (sistema FR-B, gradient lineal 20-100% B 20 min, 260 nm) mostra un producte majoritari que coelueix amb DMT-T (t<sub>R</sub> 13.5 min, 80%) acompanyat d'un de minoritari (t<sub>R</sub> 17.1 min, 20%). En realitzar una purificació per MPLC sobre una columna de sílica C<sub>18</sub> (gradient lineal 20 a 100 % B, on A: aigua i B: ACN; Mater. Mèt. Gen.) s'ha aïllat el producte minoritari del cru (10 mg). Aquest s'ha intentat caracteritzar enregistrant-ne espectres de <sup>31</sup>P RMN, on s'observa un senyal a -3.4 ppm, i <sup>1</sup>H RMN, on es pot veure que és un derivat de DMT-T que no presenta indicis del pèptid com ara els senyals aromàtics del protector Anpe (8.5-7.5 ppm). Per anàlisi d'aminoàcids sobre una alíquota de producte (0.5 OD<sub>260</sub>, aprox 60 nmol) tampoc s'hi observen quantitats apreciables de pèptid. A similitud del producte de l'apartat anterior, tampoc coelueix amb cap dels possibles productes relacionats com poden ser DMT-T, DMT-T-p, DMT-T-Hp, Tp o T.

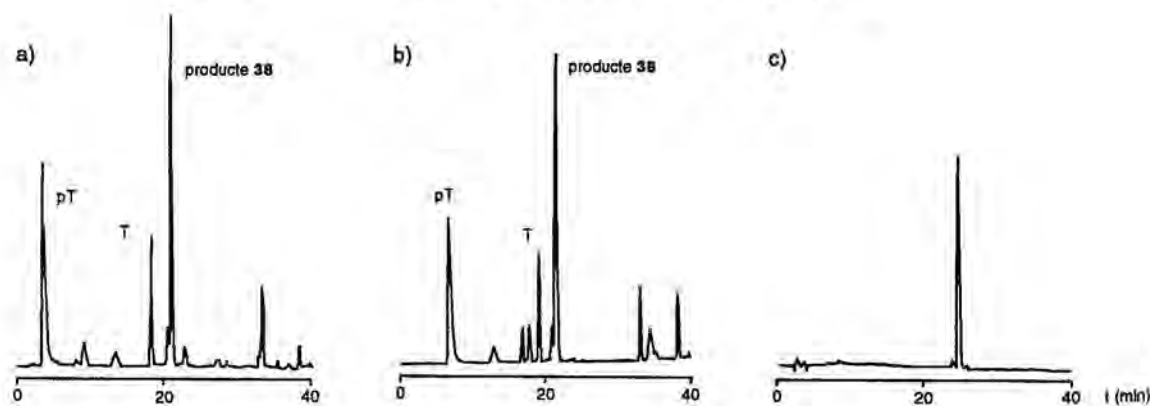
El producte obtingut (5 mg), tractat amb  $\text{NH}_3$  aq conc/dioxà 1:1 a temperatura ambient durant 2 h, evoluciona cap un producte estable ( $t_R$  11.8 min), que s'ha purificat per HPLC en les mateixes condicions analítiques. S'han enregistrat espectres de masses, les dades del qual no han permès dilucidar l'estructura. EM (FAB, "magic bullet", Xe, mode negatiu)  $m/z$  : 905, 868, 846, 623 [(DMT-Tp)-H]<sup>-</sup>, 496.9 [(DMT-Tp)-timina]<sup>-</sup>; EM (electrospray, MeOH/aigua, mode negatiu)  $m/z$  : 869.0, 845.0, 706.2.

#### b) Intent d'obtenció de H-Ser(p<sup>5</sup>T)-Gly-Asp-NH<sub>2</sub> (38):

S'han preparat solucions 0.25 M del pèptid fosforamidit **31b** en THF anh i 1 M de tetrazole en ACN/THF (7:3), les quals s'han utilitzat directament per dur a terme l'acoblament amb l'ajut del sintetitzador automàtic seguint el procediment ja esmentat en aquesta Secció (apartat 3.3). La prova s'ha realitzat sobre 0.2  $\mu\text{mol}$  de DMT-T-suc-LCAA-CPG d'origen comercial, afegint en l'etapa d'acoblament 200  $\mu\text{L}$  de solució de fosforamidit i 200  $\mu\text{L}$  de la del catalitzador al reactor que conté la resina. Dos han estat els experiments realitzats variant el temps de reacció d'aquesta etapa, en un cas 5 min (**A**) i en l'altre 1 h (**B**). En acabat s'ha dut a terme directament l'oxidació sense acetilació prèvia. La desprotecció i alliberament de resina s'ha realitzat en tots dos casos tractant-la amb  $\text{NH}_3$  aq conc/dioxà 1:1 a temperatura ambient durant 6 h. El producte s'ha recuperat per filtració de la resina i evaporació de la solució.

Els crus dels dos experiments (4 i 5 OD<sub>260</sub> respectivament) s'han analitzat per HPLC (Fig. II; sistema FR-C, isocràtic 5% B 10 min, gradient 5-25% B en 10 min i gradient 25-100% B en 20 min, 260 nm). El resultat és idèntic per tots dos, observant-se una barreja de p<sup>5</sup>T ( $t_R$  6.4 min, 40%), T ( $t_R$  10.5 min, 20%), dos productes desconeguts minoritaris ( $t_R$  18.4 i 19.0 min, aprox 10%) i un darrer producte ( $t_R$  30 min, 30%). Juntats els dos crus, s'ha aïllat el producte de major  $t_R$  per HPLC en les condicions analítiques. S'ha realitzat l'anàlisi d'aminoàcids sobre una alíquota (0.2 OD<sub>260</sub> aprox 23 nmol), però no s'hi observa quantitat apreciable de pèptid. També s'ha intentat caracteritzar enregistrant un espectre de masses, però les dades obtingudes no han permès deduir la seva estructura. EM (electrospray, MeOH/aigua, mode negatiu)  $m/z$  : 346.0, 693.2.

Figura II : Obtenció del nucleopèptid H-Ser(p<sup>5</sup>T)-Gly-Asp-NH<sub>2</sub> (38)



a) cru de síntesi de l'experiment A; cru de síntesi de l'experiment B; c) nucleopèptid **38** purificat

#### c) Síntesi de H-Ser(p<sup>5</sup>T)-Gly-Leu-NH<sub>2</sub> (38)

##### • Fmoc-Ser[P(OCNE)NiPr<sub>2</sub>]-Gly-Leu-NH<sub>2</sub> (37) :

El pèptid fosforamidit **37** s'ha obtingut per fosfilitació del pèptid Fmoc-Ser-Gly-Leu-NH<sub>2</sub><sup>176</sup> (HPLC (sistema FR-A, gradient lineal 10-78% B en 30 min):  $t_R$  22.1 min) amb (2-cianoetoxi)bis(N,N-diisopropilamino)fosfina (5 eq) en presència de tetrazole (2.5 eq), seguint la metodologia ja esmentada (mètode B, apartat 3.2b)

<sup>31</sup>P RMN (acetona-d<sub>6</sub>, 81 MHz)  $\delta$  : 154.1, 154.0.



• **H-Ser(p<sup>5</sup>T)-Gly-Leu-NH<sub>2</sub> (38) :**

En aquest experiment s'ha seguit bàsicament la metodologia assenyalada per als acoblaments dels pèptid fosforamidit sobre oligonucleotidil-resines (apartat 3.3 d'aquesta Secció). Per això, s'han preparat una dissolució del pèptid fosforamidit **37** en THF anh (800 µL, dissolució 0.25 M) i una dissolució de tetrazole en THF anh (800 µL, 1 M). A l'etapa d'acoblament, s'han fet arribar iguals volums de les dues dissolucions al reactor del sintetitzador que conté la resina T-suc-NHCH<sub>2</sub>-PS (apartat 3.1a d'aquesta Secció; 60 mg, f 0.10 mmol/g). S'ha deixat reaccionar al llarg de 4 h, al final de les quals s'han dut a terme les etapes d'acetilació i d'oxidació (Taula II, etapes 10-13 - Mater. Mèt. Gen.). Una vegada la resina ha estat rentada i assecada, s'ha dipositat en un tub de ressonància i s'ha suspès en CDCl<sub>3</sub>, a fi i a efecte d'enregistrar-ne un espectre de <sup>31</sup>P en fase gel (Mater. Mèt. Gen., CDCl<sub>3</sub>, 81 MHz). S'hi observa un únic senyal a -1.72 ppm.

El producte format s'ha desprotegit i alliberat de la resina (alíquotes de 10 mg, aprox 2 µmol) mitjançant dos tractaments diferents : i) NH<sub>3</sub> aq conc en dioxà (1:1, 2 mL) a 55 °C durant 5 h o ii) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.05 M en MeOH/dioxà (1:1, 2 mL) durant 5 h a temperatura ambient. Les corresponents dissolucions, una vegada separades de la resina per filtració (pel tractament ii, neutralització amb AcOH) s'han evaporat a sequedat. Els corresponents residus, dissolts en aigua i havent-ne separat els sòlids insolubles per filtració, s'han analitzat per HPLC (sistema FR-B, isocràtic 2.5% B durant 10 min, gradient lineal 2.5-12.5% B en 10 min i 12.5-100% B durant els darrers 10 min, 260 nm). L'aspecte del cromatograma és similar per a tots dos crús, en els que apareixen pT (t<sub>R</sub> 5.0 min, 40%), T (t<sub>R</sub> 20 min, 15%) i un altre producte no identificat (t<sub>R</sub> 21.7 min, 45%), a més dels productes d'eliminació del protector Fmoc (t<sub>R</sub> 30-35 min, que absorbeixen a 300 nm).

El producte desconegut majoritari s'ha aïllat per purificació per HPLC en les anteriors condicions amb un rendiment total del 11% (2 OD<sub>260</sub> a partir de 2 µmol de T ancorada a resina).

Una alíquota del producte purificat i liofilitzat (0.5 OD<sub>260</sub>) s'ha sotmès a hidròlisi àcida i del corresponent hidrolitzat se n'ha analitzat el contingut en aminoàcids. L'anàlisi mostra els aminoàcids esperats en la proporció correcta pel teòric nucleopèptid: Ser 0.36\*, Gly 0.94, Leu 1.00 (l'aminoàcid serina es destrueix parcialment en l'hidròlisi àcida prèvia a l'anàlisi). S'ha completat la caracterització enregistant-ne un espectre de masses per la tècnica d'electrospray (eluent ACN/aigua, mode negatiu) : m/z 577.1 [M-H]<sup>-</sup>, (pes molecular teòric del nucleopèptid **38** C<sub>21</sub>H<sub>35</sub>O<sub>11</sub>N<sub>6</sub>P 578.52).

#### 4.2 Proves de reactivitat de grups carbamoïl enfront de derivats fosfítants.

Aplicació en l'obtenció del derivat N-acilfosforamidat DMT-T-PO(OCNE)NHCOCH<sub>2</sub>Ph.

Proves d'estabilitat del derivat N-acilfosforamidat a diferents tractaments

##### a) Obtenció de (2-cianoetoxi)diisopropilamino(fenilacetamido)fosfina :

PhCH<sub>2</sub>CONH-P(OCNE)NiPr<sub>2</sub> (**39**) :

Es parteix de fenilacetamida<sup>273</sup> (300 mg, 2.2 mmol) que, un cop assecada per coevaporació amb ACN anh (x 3), es dissolt en DCM anhidre sota atmosfera inert d'argó amb (2-cianoetoxi)cloro(diisopropilamino)fosfina (1040 µL, 4.4 mmol) en presència de DIEA (1100 µL, 6.5 µmol). Al cap de 1 h, es dilueix amb DCM anh i s'hi afegeix HOCH<sub>2</sub>-PS (5 eq). Es manté la suspensió amb agitació al llarg d'1 h. A continuació se separa la resina per filtració, i la solució resultant es renta amb NaHCO<sub>3</sub> aq 5% (x 2) i NaCl sat, s'asseca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i finalment s'evapora a sequedat. S'obté un oli groc. Rdt: 85%; Rf (sistema B) : 0.75; <sup>31</sup>P RMN (CDCl<sub>3</sub>, 81 MHz) δ : 116.7 ; <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) δ : 7.30 (5H, m, Ar), 6.22 (1H, m, NH), 3.85 (2H, m, CH<sub>2</sub>O), 3.56 (2H, s, CH<sub>2</sub>Ar), 3.45 (2H, m, CH iPr), 2.57 (2H, m, CH<sub>2</sub>CN), 1.17 (12H, m, CH<sub>3</sub> iPr); <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) δ : 172.8, 172.5 (CO), 133.9, 128.4, 128.0, 126.4 (C<sub>arom</sub>), 116.7 (CN), 59.3, 58.7 (CH<sub>2</sub>OP), 56.8 (CH iPr), 43.7, 43.5, 43.3 (CH<sub>3</sub> iPr, CH<sub>2</sub>Ar), 19.4, 19.3 (CH<sub>2</sub>CN).

**b) Preparació del fosforamidat d'O-2-cianoetil, O-3'-(5'-O-dimetoxitritil)timidinil i N-fenilacetil : DMT-T-PO(OCNE)NHCOCH<sub>2</sub>Ph (40)**

• **Ruta I :**

Es fan reaccionar DMT-T (273 mg, 0.5 mmol) i la fosfina **39** (1 mmol), prèviament assecats per coevaporació amb ACN anh, dissolts en DCM anh i sota atmosfera inert d'argó, en presència de tetrazole (280 mg, 4 mmol) durant 1 h. A continuació, el fosforamidit format s'oxida afegint-hi una solució de tBuOOH 3 M en toluè (10 eq). Al cap de 15 min, es dilueix amb DCM, i la solució resultant es renta amb NaHCO<sub>3</sub> aq 5% (x 2) i dissolució saturada de NaCl, s'asseca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i finalment s'evapora a sequedat. El residu, dissolt en DCM, es precipita sobre hexà. S'obté un sòlid blanc. Rdt : 80%. (Vegeu la ruta II per a la caracterització).

• **Ruta II :**

DMT-T-3'-P(OCNE)NiPr<sub>2</sub> (150 mg, 0.2 mmol) i fenilacetamida (55 mg, 0.4 mmol), assecats prèviament per coevaporació amb ACN anh, es deixen reaccionar dissolts en DCM anh i sota una atmosfera inert d'argó en presència de tetrazole (56 mg, 0.8 mmol) al llarg de 1 h. A partir d'aquí se segueix el mateix procediment d'oxidació i rentats que en el mètode anterior. Rdt : 85%.

Rf (sistema C) : 0.45, Rf (sistema H) : 0.15; pf : 86-88°C; <sup>31</sup>P RMN (CDCl<sub>3</sub>, 81 MHz) δ : -2.5, -3.2; <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) δ : 9.25 (1H, s, NH-3), 7.56 (1H, s, H6), 7.30-7.20 (14H, m, Ar DMT, Ph), 6.83 (4H, d, J 8 Hz, Ar DMT), 6.50-6.40 (1H, m, H1'), 4.45-4.10 (4H, m, H3', H4', CH<sub>2</sub>OP), 3.77 (6H, s, CH<sub>3</sub>O), 3.50-3.20 (4H, m, H5', CH<sub>2</sub>Ph), 2.65-2.30 (4H, m, H2', CH<sub>2</sub>CN), 1.40 (3H, s, CH<sub>3</sub>-5); <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) δ : 173.0 (CO), 164.0 (C4), 158.8 (C<sub>arom</sub>), 150.5 (C2), 144.1, 135.5, 135.0, 133.5 (3xC<sub>arom</sub>, C6), 130.1, 128.1, 128.0, 129.3, 128.8, 127.6, 127.3, 113.3 (C<sub>arom</sub>-H), 116.5 (CN), 111.9 (C5), 87.2, 84.4 (C4', C1', Cq DMT), 63.3 (C5'), 62.6, 62.4 (CH<sub>2</sub>OP), 55.3 (CH<sub>3</sub>O), 44.1, 43.9 (CH<sub>2</sub>Ph), 19.5, 19.4 (CH<sub>2</sub>CN), 11.7 (CH<sub>3</sub>-5); IR (film) : 2320 (CN st), 1265 (P=O st) cm<sup>-1</sup>; HPLC analítica (sistema FR-B, gradient lineal 20-100% B en 20 min, 260 nm) t<sub>R</sub> : 17.1 min.

**c) Fosforamidat d'O-3'-(5'-O-dimetoxitritil)timidinil i N-fenilacetil : DMT-T-PO(O<sup>-</sup>)NHCOCH<sub>2</sub>Ph (41)**

Es dissol directament el N-acilfosforamidat **40** en NH<sub>3</sub> aq conc/dioxà (1:1) i es deixa durant 15 h a temperatura ambient. L'endemà, s'evapora el solvent fins a sequedat. El residu es redissol en DCM i es renta amb NaHCO<sub>3</sub> aq 5% (x 2) i dissolució saturada de NaCl. S'asseca la fase orgànica sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, s'evapora a sequedat i el producte obtingut, redissol en DCM, es precipita finalment sobre hexà. S'obté un sòlid blanc. Rdt : 85% ; pf : 94-96°C; <sup>31</sup>P RMN (CD<sub>3</sub>OD, 81 MHz) δ : -8.8; <sup>1</sup>H RMN (CD<sub>3</sub>OD, 200 MHz) δ : 9.65 (1H, s, H6), 7.4-7.0 (14H, m, Ar DMT, Ar Ph), 6.85 (4H, d, J 8 Hz, Ar DMT), 6.40-6.30 (1H, m, H1'), 3.82 (6H, s, CH<sub>3</sub>O), 3.50 (2H, m, CH<sub>2</sub>Ph), 3.40-3.20 (2H, m, H5'), 2.40-2.20 (2H, m, H2'), 1.42 (3H, s, CH<sub>3</sub>-5); <sup>13</sup>C RMN (CD<sub>3</sub>OD, 50 MHz) δ : 175.4, 175.3 (CO), 165.6 (C4), 158.8 (C<sub>arom</sub>), 151.3 (C2), 144.4, 135.1, 135.0, 134.6 (3xC<sub>arom</sub>, C6), 130.3, 129.3, 129.1, 128.3, 128.1, 127.7, 127.3, 113.4 (C<sub>arom</sub>-H), 111.7 (C5), 87.3, 85.4 (C4', C1', Cq DMT), 64.1 (C5'), 55.4 (CH<sub>3</sub>O), 44.3, 44.1 (CH<sub>2</sub>Ph), 11.6 (CH<sub>3</sub>-5); HPLC analítica (sistema FR-B, gradient lineal 20-100% B en 20 min, 260 nm) t<sub>R</sub> : 11.4 min; EM (FAB, "magic bullet", Xe, mode negatiu) m/z : 740 [M-H]<sup>-</sup>, 614.7 [M-timina]<sup>-</sup>, 438.4 [M-DMT]<sup>-</sup>.

El mateix producte s'ha pogut obtenir també per tractament del N-acilfosforamidat **40** amb LiOH 0.25 M en MeOH/dioxà/aigua (1.5:1.5:1) durant 4 h a temperatura ambient.

**d) Proves d'estabilitat sobre el fosforamidat 41:**

S'ha dissolt directament el producte **41** (1 mg, 1.4 μmol) en la solució de reactiu a assajar (25-100 eq). L'evolució del producte s'ha seguit per anàlisi per HPLC de petites alíquotes de les solucions, prèviament neutralitzades amb AcOH aq 1% (sistema FR-B, gradient lineal 20-100% B en 20 min, 260 nm). Els tractaments assajats han estat els següents : i) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.05 M en MeOH/dioxà (1:1); ii) LiOH 0.25 M en MeOH/dioxà/aigua (1.5:1.5:1); iii) NH<sub>3</sub> aq conc/dioxà (1:1) a 55 °C. En cap d'ells s'ha observat cap canvi respecte al producte inicial fins i tot a temps llargs (15-24 h).

També s'ha assajat l'estabilitat del producte **41** a condicions àcides, en particular a HAcO aq 80% (500  $\mu$ L enfront 5 mg de **41**). Aquest tractament tot i que elimina el protector DMT però no provoca el trencament de la unió fosforamidat fins i tot després de 15 h. El producte, PhCH<sub>2</sub>CONH-PO(O<sup>-</sup>)-T, es recupera diluint la solució amb aigua, rentant la corresponent fase aquosa amb èter (x 3) i eliminant l'aigua per liofilització. HPLC analítica (sistema FR-B, isocràtic 2.5 % B durant 10 min, gradient lineal 2.5-12.5% B en 10 min, gradient 12.5-100% B en 5 min i isocràtic 100% B durant 5 min, 260 nm) t<sub>R</sub> : 26.1 min (en les mateixes condicions t<sub>R</sub>(T): 19.2 min); EM (electrospray, ACN/aigua, mode negatiu) m/z : 899 [2M-2H+Na]<sup>-</sup>, 877 [2M-H]<sup>-</sup>, 438 [M-H]<sup>-</sup>.

## 5. Obtenció dels anàlegs nucleopeptídics Ac-Ser-Gly-Asp-NH-p<sup>5</sup>T (**45**) i Ac-Ser-Gly-Asp-NH-p<sup>5</sup>CATCAT (**46**) :

### 5.1 Síntesi del pèptid Ac-Ser(Ac)-Gly-Asp(O<sub>F</sub>m)-NH<sub>2</sub> (**43**) :

El pèptid Ac-Ser-Gly-Asp(O<sub>F</sub>m)-NH<sub>2</sub> (**28a**), dissolt en DMF, s'ha acetilat afegint Ac<sub>2</sub>O (10 eq) en presència de DIEA (10 eq). Al cap de 2 h, s'ha afegit MeOH i s'ha evaporat a sequedat. El residu s'ha triturat en èter anhidre i s'ha separat el pèptid **43** per centrifugació, obtenint-se en forma de sòlid blanc. Rdt : 85%; <sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>, 200 MHz)  $\delta$  : 8.40-8.10 (3H, m, NH Gly, NH Asp, NH Ser), 7.88 (2H, d, J 7 Hz, Ar), 7.65 (2H, d, J 7 Hz, Ar), 7.43-7.10 (6H, m, 4 x Ar, NH<sub>2</sub>), 4.53-4.00 (7H, m, CH Fm, CH<sub>2</sub> Fm, CH $\alpha$  Ser, CH $\alpha$  Asp, CH<sub>2</sub> $\alpha$  Gly), 3.70 (2H, m CH<sub>2</sub> $\beta$  Ser), 2.87-2.52 (2H, m, CH<sub>2</sub> $\beta$  Asp), 1.98 (3H, s, CH<sub>3</sub>CON), 1.85 (3H, s, CH<sub>3</sub>COO); <sup>13</sup>C RMN (DMSO-d<sub>6</sub>, 50 MHz)  $\delta$  : 172.4, 170.6, 170.4, 170.1, 169.6, 168.7 (6 x CO), 143.8, 140.9 (C<sub>arom</sub>), 128.0, 127.4, 125.5, 120.4 (4 x C<sub>arom</sub>-H), 66.2 (CH<sub>2</sub> Fm), 59.7 (CH<sub>2</sub> $\beta$  Ser), 52.0 (CH $\alpha$  Ser), 49.2 (CH $\alpha$  Asp), 46.3 (CH Fm), 42.5 (CH $\alpha$  Gly), 36.2 (CH<sub>2</sub> $\beta$  Asp), 22.7 (CH<sub>3</sub>-CON), 20.9 (CH<sub>3</sub>-COO); EM (FAB, NBA, Xe, mode positiu) m/z : 539.4 [M+H]<sup>+</sup>, 522.4 [M-NH<sub>2</sub>]<sup>+</sup>; HPLC analítica (sistema FR-A, gradient lineal 10-78% B en 30 min, 220 i 300 nm) t<sub>R</sub> : 22.2 min (en les mateixes condicions, tripèptid **28a** t<sub>R</sub> : 21.0 min).

### 5.2 Obtenció de Ac-Ser(Ac)-Gly-Asp(O<sub>F</sub>m)-NH-P(OCNE)NiPr<sub>2</sub> (**44**) :

El tripèptid **43**, assecat per coevaporació amb ACN anh (x 3), s'ha suspès en DCM anh, sota una atmosfera inert d'argó, i s'ha afegit DIEA (3 eq) i (2-cianoetioxi)cloro-(N,N-diisopropilamino)fosfina (2 eq). S'ha deixat reaccionar durant 1 h, durant la qual el pèptid se solubilitza completament, i en acabat i havent diluït amb més DCM anh s'ha afegit HOCH<sub>2</sub>-PS (5 eq). S'ha agitat la suspensió durant 1 h més, al final de la qual s'ha separat la resina per filtració. La corresponent solució s'ha rentat amb NaHCO<sub>3</sub> aq 5% (x 2) i NaCl sat, s'ha assecat sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i s'ha evaporat finalment a sequedat. L'obtenció del fósforodiamidit **44** s'ha confirmat enregistrant un espectre de <sup>31</sup>P RMN :  $\delta$  (CDCl<sub>3</sub>, 81 MHz) 118.4, 118.0 ppm.

### 5.3 Acoblament del pèptid fósforodiamidit **44** sobre T-suc-NHCH<sub>2</sub>-PS : obtenció de l'anàleg nucleopeptídic **45**

El pèptid fósforodiamidit **44**, assecat per coevaporació amb ACN anh i dissolt en THF anh (800  $\mu$ L, 0.25 M), i una dissolució de tetrazole en THF (800  $\mu$ L, 0.25 M) s'han afegit conjuntament al reactor de síntesi que conté T-suc-NHCH<sub>2</sub>-PS (60 mg, f 0.1 mmol/g) seguint bàsicament la metodologia esmentada per als acoblaments de pèptids fosforamidit (apartat 3.3 d'aquesta Secció). S'ha deixat reaccionar durant 4 h, al final de les quals s'han dut a terme les etapes d'acetilació i oxidació.

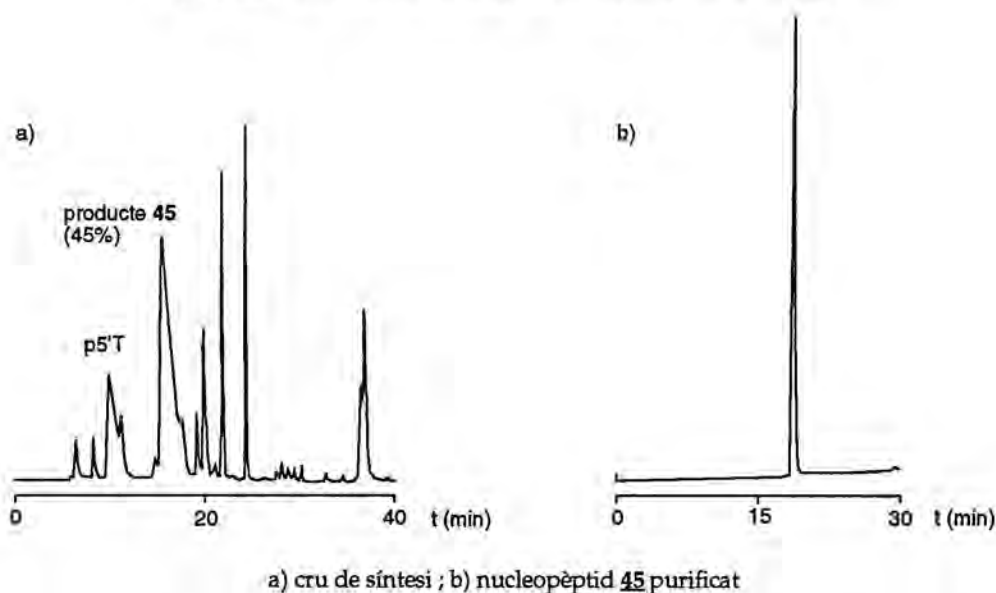
Per a l'alliberament del producte format s'ha tractat una alíquota de resina (10 mg, aprox 2  $\mu$ mol) amb NH<sub>3</sub> aq conc en dioxà (1:1, 2 mL) durant 5 h a t. amb. En acabat, la corresponent solució, separada de la resina per filtració, s'evapora a sequedat. El residu s'ha dissolt en aigua, s'han filtrat els sòlids insolubles i s'ha analitzat per HPLC (sistema FR-B, isocràtic 2.5% B durant 10 min, gradient lineal 2.5-12.5% B en 10 min i 12.5-100% B durant 10 min més, 260 nm). S'hi observen (Fig. III) com a productes majoritaris p<sup>5</sup>T (t<sub>R</sub> 9.5 min, 10%) i un producte amb t<sub>R</sub> 15.8 min (45%), a part d'altres impureses (t<sub>R</sub> 18.7, 20.6, 23.5 i 34 min, 30% en total).

El producte majoritari ha estat purificat per HPLC en les mateixes condicions analítiques, obtenint-se amb un 22% de rendiment total (3.8 OD<sub>260</sub> a partir de 2 μmol inicials de T unida a resina).

Sobre el producte aïllat i liofilitzat s'ha realitzat una anàlisi d'aminoàcids (1/2 OD<sub>260</sub>), podent-se observar la quantitat i proporcions d'aminoàcids a esperar pel teòric anàleg nucleopeptídic : Ser 0.76, Asp 0.96, Gly 1.00. A part s'ha enregistrat un espectre de masses per la tècnica d'electrospray, el resultat del qual es correspon també amb el producte d'unió del pèptid al nucleòsid (eluent ACN/aigua, mode negatiu) m/z : 643 [M-2H+Na]<sup>-</sup>, 621 [M-H]<sup>-</sup>, 310 [M-2H]<sup>2-</sup> (pes molecular teòric producte **45** C<sub>21</sub>H<sub>31</sub>N<sub>6</sub>O<sub>14</sub>P 622.48).

S'han dut a terme també proves d'estabilitat del producte (alíquotes de 1/2 OD<sub>260</sub> sobre les que s'han afegit 100 μL de la corresponent solució), sotmetent-lo a AcOH aq 80% i piperidina aq 1 M, i seguint-ne l'evolució per anàlisi HPLC en les condicions abans esmentades. En cap dels dos casos no s'ha observat transformació apreciable del producte inicial **45** fins i tot després de 15 h.

Figura III : Obtenció de l'anàleg Ac-Ser-Gly-Asp-NH-p<sup>5</sup>T (**45**)



#### 5.4 Acoblament del pèptid fósforodiamidit **44** sobre CATCAT-suc-NHCH<sub>2</sub>-PS (**97**): obtenció de l'anàleg nucleopeptídic **46**

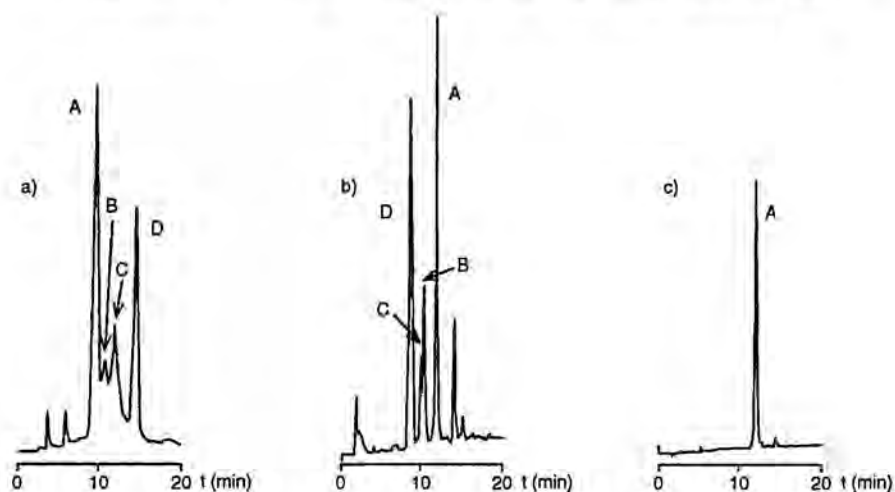
El procediment pel qual el pèptid fósforodiamidit **44** s'ha acoblat sobre la resina CATCAT-suc-NHCH<sub>2</sub>-PS **97** (Sec. Exp. Cap.3, apartat 5.3) és idèntic a l'esmentat en l'anterior apartat, excepte pel fet d'haver-se realitzat a una escala menor (15 mg de resina amb f 0.10 mmol/g). A l'etapa d'acoblament, s'han afegit al reactor que conté la resina 200 μL d'una dissolució 0.25 M del pèptid fósforodiamidit **44** 0.25 M en THF anh. i 200 μL de tetrazole 1 M en THF anh. La reacció s'ha mantingut durant 2 h, al final de les quals s'han realitzat les etapes d'acetilació i oxidació.

Per procedir a la desprotecció i alliberament del producte format, el conjunt de la resina s'ha tractat amb NH<sub>3</sub> aq conc en dioxà (1:1, 5 mL) durant 15 h a 55°C. Separada la resina per filtració, la solució ha estat evaporada a sequedat. El residu s'ha dissolt en aigua, se n'han filtrat els sòlids insolubles i s'ha analitzat per HPLC en fase reversa (sistema FR-C, gradient lineal 15-21% B en 20 min i 21-100% durant 10 min més, 260 nm). En el cromatograma (Fig. IV) s'hi observen fonamentalment quatre pics, corresponents a un producte majoritari (**A**, t<sub>r</sub> 9.3 min, 40%), dos productes poc resolts (**B** t<sub>r</sub> 10.6, **C** 11.7 min, 35% en total), el segon dels quals coelueix amb Hp<sup>5</sup>CATCAT (Sec. Exp. Cap.3, apartat 5.3.c), i un darrer (**D** t<sub>r</sub> 13.7 min, 25%) que coelueix amb

CATCAT. Millor resolució i eficàcia s'aconsegueix per HPLC de bescanvi aniònic (BA-B, gradient lineal 0-100% B en 20 min, 260 nm), on se segueixen observant quatre pics majoritaris que es corresponen amb els trobats per fase reversa encara que en diferent ordre degut al diferent mecanisme de separació ( $t_R$  8.2 min **D** 24%, 10.0 min **C** 25%, 11.4 min **A** 39% i 13.7 min 12%).

El producte majoritari **A** ha estat purificat per MPLC sobre fase reversa de sílice-C<sub>18</sub> (Mater. Mèt. Gen. - gradient lineal 15-25% B on A: TEAA 0.05 M i B: ACN/aigua, detecció 254 nm). Després de concentrar les fraccions corresponents s'ha obtingut el producte amb un 26% de rendiment total (15 OD<sub>260</sub> a partir de 1.5  $\mu$ mol d'oligonucleòtid unit a resina).

Figura IV : Obtenció de l'anàleg Ac-Ser-Gly-Asp-NH-p<sup>5</sup>CATCAT (**46**)



a) cru de síntesi, analitzat per HPLC en fase reversa; b) cru de síntesi, analitzat per HPLC de bescanvi aniònic; c) nucleopèptid **46** purificat, analitzar per HPLC de bescanvi aniònic

Sobre el compost **A**, aïllat i liofilitzat, s'ha realitzat una anàlisi d'aminoàcids (0.5 OD<sub>260</sub>), que mostra una quantitat i proporció dels aminoàcids esperables pel producte d'unió del pèptid a l'oligonucleòtid (Ser 0.70, Asp 0.94, Gly 1.00), l'anàleg **46**. També se n'ha realitzat anàlisi de nucleòsids, prèvia digestió enzimàtica (Mater. Mèt. Gen.). El producte resulta completament degradat per la barreja de fosfodiesterasa de verí de serp i fosfatasa alcalina a la mescla de nucleòsids dC, T i dA en la proporció esperada (sistema FR-C, gradient I; dC 0.9, T 1.0, dA 1.1), però es manté perfectament estable a fosfodiesterasa de melsa (el nucleopèptid presenta  $t_R$  17.7 min en les condicions d'anàlisi dels nucleòsids).

S'ha obtingut la sal sòdica del producte **46**, eluint-lo a través de Dowex 50Wx4 en forma sòdica. Havent-se liofilitzat les fraccions corresponents, s'ha redissolt en D<sub>2</sub>O i reliofilitzat en D<sub>2</sub>O (x 3). Novament dissolt en D<sub>2</sub>O (20 OD<sub>260</sub>/mL, aprox. 0.8 mM), s'han enregistrat els espectres de <sup>1</sup>H RMN i EM: <sup>1</sup>H RMN (D<sub>2</sub>O, 500 MHz)  $\delta$ : 8.27, 8.25 (2H, s, s, 2xH<sub>2</sub> A), 7.06 (2H, s, 2xH<sub>8</sub> A), 7.44, 7.38 (2H, d, d, J 7.5, 7.5 Hz, 2xH<sub>6</sub> C), 7.34, 7.18 (2H, s, s, 2xH<sub>6</sub> T), 6.20, 6.01, 5.90 (6H, m, 6xH<sub>1</sub>'), 5.82, 5.78 (2H, d, d, J 7.5, 7.5 Hz, 2xH<sub>5</sub> C), 4.50-3.00 (H<sub>3</sub>', H<sub>4</sub>', H<sub>5</sub>', CH $\alpha$  Ser, CH<sub>2</sub> $\alpha$  Gly, CH $\alpha$  Asp, CH<sub>2</sub> $\beta$  Ser), 2.72-2.09 (14H, m, 12xH<sub>2</sub>', CH<sub>2</sub> $\beta$  Asp), 1.93 (3H, s, CH<sub>3</sub> Ac), 1.58, 1.52 (6H, s, s, 2xCH<sub>3</sub>-5 T); EM (electrospray, eluent aigua/MeOH 1:1, mode negatiu) m/z: 723.9 [M-5H+2Na]<sup>3-</sup>, 716.8 [M-4H+Na]<sup>3-</sup>, 709.1 [M-3H]<sup>3-</sup>, 537.1 [M-5H+Na]<sup>4-</sup>, 531.6 [M 4H]<sup>4-</sup>, pes molecular estimat 2130.7, pes molecular teòric del producte **46** (C<sub>69</sub>H<sub>92</sub>O<sub>43</sub>N<sub>24</sub>P<sub>6</sub>): 2131.46.

Sobre el producte s'han realitzat proves d'estabilitat afegint a diferents alíquotes del producte **46** (0.5 - 0.2 OD<sub>260</sub>) les corresponents solucions a assajar (100  $\mu$ L), controlant-ne l'evolució per anàlisi HPLC de bescanvi aniònic (sistema BA-B, gradient lineal 0-100% B en 20 min, 260 nm). El producte es manté estable als tractaments amb piperidina aq 1 M tant a t. amb (22 h) com a 55°C (15 h), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.05 M en MeOH/dioxà (1:1) (6 h), LiOH 0.25 M en MeOH/dioxà/aigua (1.5:1.5:1) (6 h) i HAcO aq 80% a t. amb. (22 h). En canvi, en aquestes darreres condicions però a una temperatura de 55°C es transforma completament en p<sup>5</sup>CATCAT ( $t_R$  14.7 min).

## 1. Obtenció de les peptidil-resines Phac-Phe-Val-Ser-Gly-NPE-Leu-NHCH<sub>2</sub>-PS (53) i Phac-Ser-Gly-Asp(O<sub>F</sub>m)-NPE-Leu-NHCH<sub>2</sub>-PS (59) :

### 1.1 H-Leu-NHCH<sub>2</sub>-PS (47) :

S'ha partit d'aminometil-poliestirè (2 g, f 0.42 mmol NH<sub>2</sub>/g), al qual una vegada suspès en DCM, s'ha ancorat Boc-Leu-OH (3 eq) en presència de DCC (3 eq), durant 1 h. Havent rentat la resina, (DCM, DMF i MeOH), s'ha comprovat mitjançant l'assaig de ninhidrina l'absència de grups amino sense reaccionar. Abans de procedir a l'ancoratge de l'espaiador bifuncional, s'ha eliminat el grup protector Boc, amb TFA/DCM 30% (5+25 min). A continuació, s'han neutralitzat els grups amino amb DIEA/DCM 5% (x 3), i s'ha rentat (DCM, MeOH) i assecat la resina. S'ha determinat la funcionalització de la resina per anàlisi d'aminoàcids (Mater. Mèt. Gen., apartat VII), que ha resultat ser de 0.30 mmol Leu/g resina.

### 1.2 Boc-Gly-NPE-Leu-NHCH<sub>2</sub>-PS (52a) :

S'ha optat per realitzar l'acoblament de l'espaiador bifuncional, l'àcid 4-hidroxietil-3-nitrobenzoic<sup>104</sup> (espaiador NPE), en forma de derivat del primer aminoàcid<sup>274</sup>, Boc-Gly-Nbb-OTcp. L'ester de triclorofenil de l'espaiador bifuncional, H-NPE-OTcp<sup>104</sup> (390 mg, 1 mmol), s'ha fet reaccionar amb Boc-Gly-OH (526 mg, 3 mmol) en presència de DCC (618 mg, 3 mmol) i una quantitat catalítica de DMAP, durant 30 min a temperatura ambient. Un cop filtrada la diciclohexilurea, s'ha diluït el residu amb DCM, i s'ha rentat amb NaHCO<sub>3</sub> aq 5% (x 2) i solució saturada de NaCl. S'ha assecat la dissolució sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i s'ha evaporat a sequedat. El residu s'ha purificat sobre una columna de gel de sílice eluint amb hexà/AcOEt (3:1), obtenint-se el producte en forma d'espuma groga (374 mg, 70%).

**Boc-Gly-NPE-OTcp (50a)** : espuma groga; Rdt : 70%; Rf (sistema A) : 0.80; <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) δ : 8.75 (1H, d, J 2 Hz, Ar); 8.44 (1H, dd, J 2 Hz, 6 Hz, Ar), 7.61 (2H, m, Ar, Ar'), 7.46 (1H, s, Ar'), 5.16 (1H, m, NH), 4.51 (2H, t, J 6 Hz, CH<sub>2</sub>O), 3.88 (2H, d, J 6 Hz, CH<sub>2</sub>α), 3.38 (2H, t, J 6 Hz, CH<sub>2</sub>Ar), 1.45 (9H, s, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) δ : 170.8 (COO Gly), 162.0 (COOAr'), 156.2 (NHCOO), 150.3, 146.0, 139.4 (C<sub>arom</sub>), 134.6, 134.0, 131.7, 127.3, 125.7 (C<sub>arom</sub>-H), 80.6 (Cq), 64.5 (CH<sub>2</sub>O), 42.8 (CH<sub>2</sub>α), 33.0 (CH<sub>2</sub>Ar), 28.8 (CH<sub>3</sub>); EM (FAB, NBA, Xe, mode positiu) m/z : 549 [M+H]<sup>+</sup>, 449 [M-Boc+2H]<sup>+</sup>, 374 [M-(Boc-Gly-O)]<sup>+</sup>.

El derivat de l'aminoàcid i l'espaiador bifuncional Boc-Gly-NPE-OTcp (50a) s'ha ancorat a l'amino-acil resina 47 (1 g, f 0.30 mmol Leu/g), emprant 0.75 eq del derivat respecte a la resina, en presència de HOBt (0.9 eq respecte l'aminoàcid 50a), en DMF i agitant suaument al llarg d'una nit. En acabat, havent rentat la resina (DMF), s'han acetilat els grups amino que no han reaccionat amb Ac<sub>2</sub>O (10 eq) i DIEA (10 eq), en DMF durant 30 min. Una vegada la resina ha estat rentada i assecada, s'ha quantificat la incorporació d'aminoàcid per anàlisi d'aminoàcids d'una alíquota, la qual ha mostrat un valor de 0.18 mmol Gly/g, i una relació Gly/Leu igual a 0.62.

### 1.3 Boc-Asp(O<sub>F</sub>m)-NPE-Leu-NHCH<sub>2</sub>-PS (58) :

S'ha optat per un procediment en dues etapes<sup>104</sup>.

En primer lloc, s'ha incorporat a l'aminoacil-resina 47 (1 g, f 0.30 mmol Leu/g) l'espaiador bifuncional NPE. Per això, s'ha preparat l'ester actiu de benzotriazolil H-NPE-OBt, per reacció de l'àcid (95 mg, 0.45 mmol) amb DCC (93 mg, 0.45 mmol) i HOBt (64 mg, 0.45 mmol) en DMF durant 10 min. Després de filtrar la diciclohexilurea formada, s'ha filtrat la dissolució, que conté l'ester actiu de l'espaiador bifuncional, s'ha afegit directament a la resina, i s'ha completat el volum de dissolvent amb més DMF fins a una correcta suspensió de la resina. S'ha deixat reaccionar al llarg d'1 h. Havent rentat (DMF, DCM, MeOH) i assecat la resina, s'ha comprovat que no conté grups amino sense reaccionar mitjançant l'assaig de ninhidrina (resina 51).

En la segona etapa s'ha ancorat a la resina 51 el primer aminoàcid com a Boc-Asp(O<sub>F</sub>m)-OH (2 eq respecte a Leu), en presència de DCC (2 eq) i amb catàlisi de DMAP (0.2 eq) durant 1 h. Havent rentat i assecat la resina, s'ha efectuat una anàlisi d'aminoàcids d'una alíquota de

l'aminoacil-resina per determinar el rendiment d'incorporació de l'aminoàcid, que ha resultat ser del 72% respecte leucina. A continuació, s'han acetilat els grups hidroxil i els grups amino lliures sobre la resina per tractament amb  $\text{Ac}_2\text{O}$  (10 eq) i DIEA (10 eq), en DMF i durant 30 min. Una vegada la resina **58** ha estat rentada i assecada, s'ha realitzat una altra anàlisi d'aminoàcids d'una alíquota de resina, per determinar la funcionalització final de l'aminoacil-resina, que ha mostrat el valor de 0.20 mmol Asp/g, amb una relació Asp/Leu de 0.70.

#### 1.4 Phac-Phe-Val-Ser-Gly-NPE-Leu-NHCH<sub>2</sub>-PS (**53**) i Phac-Ser-Gly-Asp(O<sub>2</sub>Fm)-NPE-Leu-NHCH<sub>2</sub>-PS (**59**) :

La incorporació dels aminoàcids a les aminoacil-resines **52a** (1 g, f 0.18 mmol Gly/g resina) i **58** (1 g, f 0.20 mmol Asp/g) respectivament, s'ha dut a terme fent servir la metodologia ja esmentada per a la síntesi d'altres peptidil-resines, emprant Boc-aminoàcids com a sintons (Taula I, Mater. Mèt. Gen.).

Per a la incorporació de serina s'ha utilitzat Boc-Ser-OH<sup>185</sup>, de forma que el pèptid unit a resina pugui presentar l'hidroxil lliure sobre el qual fer créixer la part oligonucleotídica. Al final, el grup  $\alpha$ -amino terminal s'ha bloquejat per reacció amb àcid fenilacètic i DCC (3 eq de cadascun) durant només 0.5 h per evitar la reacció amb l'hidroxil lliure del residu de serina.

La correcta incorporació dels aminoàcids s'ha verificat finalment per anàlisi d'aminoàcids sobre una alíquota de les respectives peptidil-resines :

**53** Phe/Val/Ser/Gly 0.96 : 1.00 : 0.72 : 1.04 amb una relació pèptid/Leu de 0.61.

**59** Ser/Gly/Asp 0.46\* : 1.01 : 0.97 amb una relació pèptid/Leu de 0.70

(\*parcialment destruït en les condicions d'hidròlisi del pèptid - Mater. Mèt. Gen.)

## 2. Síntesi del nucleopèptid Phac-Phe-Val-Ser(p<sup>3</sup>ACT)-Gly-OH (**56**) :

### 2.1 Síntesi de la nucleopeptidil-resina (**55**) :

L'acoblament dels nucleòsids 3'-fosforamidits (dA<sup>Bz</sup>, dC<sup>iBu</sup>, T, tots ells d'origen comercial) sobre la peptidil-resina **53** s'ha dut a terme amb la mateixa metodologia utilitzada per a la síntesi dels oligonucleòtids sobre un suport de poliestirè (Taula II - Mater. Mèt. Gen.). L'escala escollida en aquest cas ha estat de 18  $\mu\text{mol}$  (100 mg de resina).

Els acoblaments s'han realitzat amb 800  $\mu\text{L}$  d'una dissolució 0.25 M de nucleòsid fosforamidit en DCM anh. i 800  $\mu\text{L}$  de la dissolució 1 M d'*o*-nitrofeniltetrazole en THF anh., amb un temps de reacció de 40 min. La resta d'etapes (rentats, acetilació i oxidació) s'ha realitzat de forma idèntica a les efectuades en l'obtenció de la resta d'oligonucleòtids (Sec. Exp. Cap.1, apartat 3.2). Els rendiments d'acoblament per a cada nucleòsid (excepte pel primer, ja que l'hidroxil sobre el qual s'ancora no està protegit amb el grup DMT), mesurats a partir de les dissolucions de detritllació, es poden considerar satisfactoris : C 92%, T 99%.

### 2.2 Desprotecció i desanclatge de la resina :

#### a) Proves preliminars :

El procediment seguit per a l'alliberament del producte és completament equivalent a l'utilitzat sobre la peptidil-resina **53** en les proves d'alliberament de pèptid (Sec. Exp. Cap.3, apartat 1.5.c). Les proves realitzades així com els resultats obtinguts s'exposen a la Taula 3.7 (Cap.3, apartat 1.5).

En general s'han utilitzat alíquotes de 10-15 mg de la resina **55** (1.2-1.7  $\mu\text{mol}$  segons funcionalització de pèptid), emprant 250 eq de reactiu i 6 h pels tractaments amb  $\text{K}_2\text{CO}_3$  0.05 M en MeOH/dioxà (1:1), 100 eq de TBAF 0.05 M en THF anh durant 0.5 h, i 5-10 mL i 15 h de tractament per a  $\text{NH}_3$  aq conc/dioxà (1:1). En acabar el tractament que produeix el desanclatge i desprotecció parcial o total del producte, es recull per filtració la corresponent solució, a la que s'hi afegeixen els rentats de la resina amb MeOH ( $\times 3$ ), i es neutralitzen amb AcOH glacial abans de concentrar a sequedat. En els tractaments en dues etapes, en què a la primera d'elles ja es produeix l'alliberament

del producte (tractament amb TBAF), el corresponent filtrat junt amb els rentats de la resina es neutralitza i s'evapora a sequedat abans de tractar-lo amb el segon reactiu. El residu final, evaporat a sequedat, es redissol en aigua, se separen els sòlids insolubles per filtració i es liofilitza.

El seguiment de cada tractament s'ha realitzat per anàlisi per HPLC de les corresponents solucions (sistema FR-B, gradient lineal 0-50% B en 20 min). La identificació prèvia dels dos únics productes obtinguts al llarg de tots els tractaments, el nucleopèptid desitjat **56** ( $t_R$  : 10.8 min) i el trinucleòtid-3'-fosfat  $5'$ TCA $3'$ p ( $t_R$  : 7.8 min, producte de trencament de l'enllaç fosfat amb el pèptid), s'efectua per anàlisi d'aminoàcids dels productes purificats, mostrant que només el producte **56** en presenta.

#### b) Obtenció del nucleopèptid **56**:

El nucleopèptid **56** s'ha obtingut com a resultat del següent tractament amb dues etapes :

i) Alliberament i desprotecció parcial per tractament de la nucleopeptidil-resina **55** (20 mg, 3  $\mu$ mol) amb una dissolució 0.05 M de TBAF.3H<sub>2</sub>O en THF anhidre (6 mL, 300  $\mu$ mol) durant 0.5 h. Separada la resina per filtració, el filtrat i els rentats posteriors de la resina amb MeOH ( $\times$  3) s'han juntat i neutralitzat amb AcOH glacial, i s'han evaporat a sequedat. L'anàlisi d'aminoàcids de la resina, una vegada rentada i assecada, mostra que s'ha produït un desancoratge quantitatiu.

ii) Desprotecció final per tractament del residu amb una dissolució d'NH<sub>3</sub> aquós concentrat en dioxà 1:1 (15 mL) durant 15 h a temperatura ambient. En acabat, s'ha evaporat la dissolució a sequedat. El residu s'ha redissol en aigua, i els sòlids insolubles s'han separat per filtració. Finalment, s'ha liofilitzat la dissolució.

#### 2.3 Purificació del nucleopèptid **56** :

•El producte s'ha purificat per elució sobre una columna de bescanvi aniònic de DEAE-Sephadex, amb un gradient de concentració de tampó aquós TEAB de 0.4 M a 1 M, detecció de l'elució per absorció a 254 nm - Mater. Mèt. Gen.). Les fraccions que contenen el producte s'han liofilitzat. Cap més purificació s'ha fet necessària. La homogeneïtat del producte purificat ha estat comprovada per anàlisi per HPLC en fase reversa (sistema FR-C, gradient 0 a 50% B en 20 min,  $t_R$  10.8 min) i per bescanvi aniònic (sistema BA-B, gradient 0 a 100% B en 20 min,  $t_R$  6.8 min).

•El nucleopèptid **56** s'ha obtingut amb un rendiment total (síntesi, alliberament, desprotecció i purificació) d'aprox. 40% (24 OD<sub>260</sub> a partir de 3.2  $\mu$ mol de peptidil-resina).

#### 2.4 Caracterització del nucleopèptid **56** :

•Les digestions enzimàtiques realitzades han comprès diferents experiments :

Per una banda, la barreja de fosfodiesterasa de verí de serp i fosfatasa alcalina (6h, 36°C - Mater. Mèt. Gen. VII) produeix la barreja de dC, T (en proporció 0.8 : 1.1) i un producte ( $t_R$ : 14.4 min) que difereix de dA (sistema d'anàlisi per HPLC FR-C, gradient II). Aquesta mescla, una vegada liofilitzada, s'ha sotmès a tractament amb piperidina aquosa 1M, a 36°C durant 1h, i en acabat s'ha neutralitzat i liofilitzat. L'anàlisi de la barreja mostra que el nucleòsid estrany s'ha transformat en dA $3'$ p, la qual cosa fa pensar que el producte amb  $t_R$  14.4 min podria ser el producte híbrid pèptid-dA.

En un altre experiment, el nucleopèptid s'ha tractat prèviament amb una dissolució 1 M de NaOH a 55°C durant 2 h. Havent-se neutralitzat i liofilitzat, el residu ha estat sotmès a la barreja d'enzims anteriors en les mateixes condicions. En acabat, s'ha realitzat l'anàlisi de la barreja (sistema FR-C, gradient II, que mostra els tres nucleòsids, dC, T i dA en les proporcions esperades (0.9, 1.0 i 1.1, respectivament)

La digestió amb fosfodiesterasa de melsa (Mater. Mèt. Gen. VII; sistema d'anàlisi per HPLC FR-C, gradient II) produeix en canvi una barreja dels nucleòsids i nucleòsid-3'-fosfats, dC, dCp, T i Tp i el mateix producte del primer experiment.

S'ha realitzat un quart experiment de digestió enzimàtica sotmetent el nucleopèptid només a l'acció de la fosfodiesterasa de verí de serp, en les mateixes condicions dels experiments anteriors



(Mater. Mèt. Gen.). L'anàlisi (sistema FR-C, gradient I) del producte mostra una parcial digestió del nucleopèptid inicial ( $t_R$  20.4 min). La comparació de les àrees dels pics dels nucleòsid-fosfat i el nucleopèptid, tenint en compte els coeficients d'extinció molars respectius (Mater. Mèt. Gen. V), ha permès determinar la proporció de nucleopèptid no degradat, que ha resultat ser 50%.

- Del producte purificat i liofilitzat (1 OD<sub>260</sub>) se n'ha obtingut també l'anàlisi d'aminoàcids (Mater. Mèt. Gen. VII; hidròlisi àcida a 150°C, 1 h) : Phe 1.00 , Val 0.91 , Ser 0.44 , Gly 1.09.

La hidròlisi àcida també s'ha realitzat en condicions més suaus a les habituals, consistents en dur-la a terme a 110°C durant 24 h en un tub tancat al buit. D'aquesta manera s'ha aconseguit evitar al màxim la destrucció de l'aminoàcid serina, pel qual ara l'anàlisi mostra una proporció de 0.92.

- S'ha obtingut la sal sòdica del producte, eluint-lo a través de Dowex 50W x 4 (1 x 5 cm) en forma de sal sòdica. Les fraccions corresponents han estat liofilitzades, redissoltes en D<sub>2</sub>O i reliofilitzades tres vegades. Del producte, novament dissolt en D<sub>2</sub>O (20 OD<sub>260</sub>/mL, aprox. 1 mM), s'han enregistrat els espectres de ressonància :

<sup>1</sup>H RMN (D<sub>2</sub>O, 500 MHz)  $\delta$  : 8.21 (1H, s, H8 A), 7.91 (1H, s, H2 A), 7.38-7.36 (2H, m, H6 C, H6 T), 7.11, 6.94, 6.87, 6.73 (10H, m, Ar Phe, Phac), 6.12, 6.00, 5.92 (3H, m, 3xH1'), 5.76 (1H, d, J 8 Hz, H5 C), 5.00-3.50 (H3', H4', H5', CH $\alpha$  Phe, CH $\alpha$  Ser, CH $\alpha$  Val, CH<sub>2</sub> Gly, CH<sub>2</sub> Phac), 3.31 (2H, m, CH<sub>2</sub> $\beta$  Phe), 2.80-2.00 (7H, m, 6xH2', CH $\beta$  Val), 1.67 (3H, s, CH<sub>3</sub>-5 T), 0.72, 0.70 (6H, dd, CH<sub>3</sub>  $\gamma$  Val).

<sup>31</sup>P RMN (D<sub>2</sub>O, 121 MHz, referència externa P(OCH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)  $\delta$  : 0.9, 0.7, 0.5.

- Els espectres de masses també s'han obtingut amb el producte en forma de sal sòdica (forma totalment protonada C<sub>56</sub>H<sub>71</sub>O<sub>25</sub>N<sub>14</sub>P<sub>3</sub>, PM 1433.18) :

FAB (2 OD<sub>260</sub>/50 $\mu$ L, matriu glicerol/TFA/aigua, Xe, mode negatiu) m/z : 1432 [M-H]<sup>-</sup>.

electrospray (20 OD<sub>260</sub>/mL, ACN/aigua, mode negatiu) m/z : 477.8 [M-3H]<sup>3-</sup>, 716.1 [M-2H]<sup>2-</sup>, 727.1 [M-3H+Na]<sup>2-</sup>, 738.1 [M-4H+2Na]<sup>2-</sup>.

## 2.5 Proves d'estabilitat sobre el nucleopèptid 56:

Per a la realització de les proves d'estabilitat, el nucleopèptid liofilitzat (1 OD<sub>260</sub>) s'ha tractat amb les solucions a assajar (100  $\mu$ L) controlant la seva evolució en les condicions d'anàlisi per HPLC esmentades. Els resultats s'exposen a la Taula 2.3 (Cap.2, apartat 4.1).

El producte que es genera per fragmentació del nucleopèptid s'ha pogut caracteritzar com TCA<sup>3</sup>p ja que no presenta aminoàcids, i quan ha estat sotmès a les condicions de digestió enzimàtica amb fosfodiesterasa de verí de serp i fosfatasa alcalina (vegeu més amunt), s'ha degradat completament a la barreja de nucleòsids a esperar (dC 0.9, T 1.1, dA 1.0).

## 3. Obtenció dels nucleopèptids regioisòmers Phac-Ser(p CATCAT)-Gly-Asp-OH (isòmer 3' 61a i isòmer 5' 61b) :

### 3.1 Obtenció de les nucleopeptidil-resines (60a, 60b) :

S'ha emprat la peptidil-resina 58 (apartat 1.4 d'aquesta Secció) per a tots dos casos. Per a l'obtenció de la resina 60a, s'ha realitzat una síntesi a una escala de 15  $\mu$ mol (100 mg resina), mentre que per 60b s'han dut a terme dues síntesis a una escala de 2.3  $\mu$ mol (15 mg) cadascuna. L'acoblament dels nucleòsids fosforamidit (T, dCiBu, dA<sup>Dmf</sup> : derivats 3'-fosforamidit per a 60a i d'origen comercial, o 5'-fosforamidit per a 60b i sintetitzats com es descriu a la Sec. Exp. Cap.3, apartat 3.2) s'ha realitzat fent servir la mateixa metodologia, i que ha estat emprada per a la síntesi del nucleopèptid 56, fent les pertinents adaptacions respecte a l'escala de treball. S'han utilitzat dissolucions 0.25 M dels fosforamidits en DCM anhidre i 1 M d'o-nitrofeniltetrazole en THF anhidre. No s'han observat diferències significatives en els rendiments d'acoblament dels respectius 3'- i 5'-fosforamidits (92-97%).

### 3.2 Desprotecció i desancoratge de les resines :

S'han mantingut els mateixos procediments i tractaments de desprotecció i alliberament de producte de la resina que van permetre l'obtenció del nucleopèptid **56** :

i) S'ha tractat la nucleopeptidil-resina (15-20 mg, 2-3  $\mu\text{mol}$ ) amb una dissolució de TBAF 0.05M en THF anh (100 eq). La duració del tractament efectuada per a l'obtenció de l'anterior nucleopèptid, 30 min, ha mostrat produir rendiments baixos de desancoratge (50-60%), pel que ha estat perllongat fins 1 h. Acabat el tractament, s'ha separat la dissolució de la resina per filtració, i s'ha rentat la resina amb MeOH ( $\times 3$ ). Els filtrats han estat reunits i evaporats a sequedat. Els rendiments de desancoratge, determinats per anàlisi d'aminoàcids sobre la resina, una vegada tractada, rentada i assecada, han estat 70-80% per a tots dos casos.

ii) Sobre el residu precedent de l'anterior etapa s'ha realitzat el segon tractament amb una dissolució d' $\text{NH}_3$  aquós concentrat en dioxà 1:1 (5mL/ $\mu\text{mol}$  producte), durant 15 h i a temperatura ambient. En acabat, s'ha evaporat a sequedat la dissolució. El residu s'ha redissolt en aigua, i s'han separat els sòlids insolubles per filtració. La dissolució ha estat finalment liofilitzada.

De forma similar al cas anterior, el seguiment del procés s'ha dut a terme per anàlisi per HPLC de les solucions del producte (sistema FR-C, gradient lineal 0-50% B en 20 min, 50-100% B en 10 min i isocràtic 100% B durant 5 min més). En tots dos casos, els nucleopèptids es presenten com a productes majoritaris: nucleopèptid **61a**  $t_R$ : 12.2 min (80%), nucleopèptid **61b**  $t_R$ : 11.8 min (68%).

### 3.3 Purificació dels nucleopèptids **61a** i **61b** :

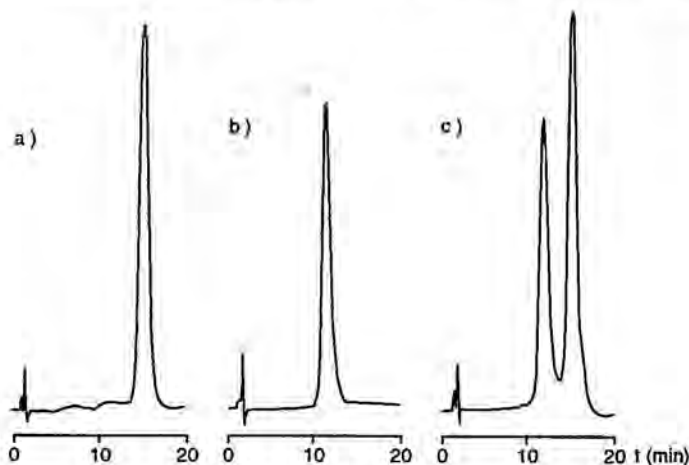
•Els nucleopèptids s'han purificat a través una columna de bescanvi aniònic tipus DEAE-Sephadex per elució amb un gradient del tampó aquós TEAB (de 0.2 M a 1 M, detecció de l'elució per absorció a 254 nm). Les corresponents fraccions s'han concentrat per liofilització. Si bé per al nucleopèptid **61a** no és necessària cap més etapa, per a **61b** ha calgut realitzar una segona etapa de purificació per MPLC sobre sílice- $\text{C}_{18}$  (gradient lineal 10-25% on A: TEAA 0.05 M i B: ACN/aigua 1:1, 254 nm, Mater. Mèt. Gen. II).

Els corresponents productes han estat obtinguts amb un rendiment total (síntesi, desprotecció, desancoratge i purificació) de 50% per a **61a** (95 OD<sub>260</sub> a partir de 4.6  $\mu\text{mol}$  de peptidil-resina) i 30% per a **61b** (56 OD<sub>260</sub> a partir 4.6  $\mu\text{mol}$ ).

A part, la puresa dels productes ha estat verificada per anàlisi per HPLC en fase reversa (Fig. V; sistema FR-C, gradient lineal 15 a 21% B en 20 min) i per bescanvi aniònic (sistema BA-B, gradient lineal 0 a 100% B en 20 min) :

<b>Nucleopèptid 61a</b> :	sistema FR-C, $t_R$ : 15.8 min,	sistema BA-B, $t_R$ : 11.9 min
<b>Nucleopèptid 61b</b> :	sistema FR-C, $t_R$ : 12.1 min,	sistema BA-B, $t_R$ : 11.9 min.

*Figura V : Diferenciació cromatogràfica dels nucleopèptids regioisòmers **61a** i **61b**.*



a) nucleopèptid **61a** (isòmer 3'); b) nucleopèptid **61b** (isòmer 5'); c) coinjecció dels nucleopèptids

### 3.4 Caracterització dels nucleopèptids **61a** i **61b** :

• Han estat realitzades les anàlisis d'aminoàcids dels productes purificats i liofilitzats (1 OD<sub>260</sub>), realitzant les hidròlisi àcides prèvies a l'anàlisi en tubs desgassats al buit, i a 110°C durant 24 h :

**Nucleopèptid 61a** : Asp/Ser/Gly 1.03 / 0.93 / 1.04  
**Nucleopèptid 61b** : Asp/Ser/Gly 1.00 / 0.89 / 1.11.

• S'han efectuat diferents experiments de digestió enzimàtica :

**Nucleopèptid 61a** :

La barreja de fosfodiesterasa de verí de serp i fosfatasa alcalina (1 OD<sub>260</sub> - Mater. Mèt. Gen., VII) produeix la completa degradació del producte. L'anàlisi (sistema FR-C, gradient I) mostra una proporció de dC més baixa de l'esperada (0.6 en comptes de 1), i a més un nucleòsid no identificat (t<sub>R</sub> : 18.7 min). En canvi, si es tracta prèviament el producte **61a** amb NaOH aq 1M (1h, 55°C - vegeu també el nucleopèptid **56**) i, una vegada neutralitzada i liofilitzada la dissolució, es duu a terme la digestió en les mateixes condicions anteriors, només s'observen els nucleòsids dC, T i dA en les proporcions esperades (0.9, 1.0 i 0.9, respectivament).

També s'ha realitzat l'experiment de digestió sotmetent el nucleopèptid només a l'acció de l'enzim fosfodiesterasa de verí de serp (0.5 OD<sub>260</sub> - Mater. Mèt. Gen. VII). L'anàlisi (sistema FR-C, gradient I) del producte de digestió mostra el nucleopèptid (t<sub>R</sub> 19.1 min) encara com a producte majoritari. La comparació de les àrees dels pics dels nucleòsid-fosfats i del nucleopèptid, tenint en compte els valors respectius dels coeficients d'extinció molar, han permès calcular el valor de la proporció de nucleopèptid no degradat, que és aprox. 75% (vegeu també el nucleopèptid **56**).

**Nucleopèptid 61b** :

Ha estat sotmès a l'acció de la barreja d'enzims de fosfodiesterasa de verí de serp i fosfatasa alcalina. L'anàlisi dels productes de digestió mostra els tres nucleòsids en les proporcions esperades (dC(1):1.1, T(1):0.9, dA(1):1.0).

S'ha assajat també el tractament amb l'enzim fosfodiesterasa de melsa (1 OD<sub>260</sub> - Mater. Mèt. Gen., VII). L'anàlisi del producte (sistema FR-C, gradient I) tractat mostra el nucleopèptid pràcticament inalterat (t<sub>R</sub> : 17.4 min).

L'experiment de digestió amb només la presència de fosfodiesterasa de verí de serp (vegeu el nucleopèptid **61a**) provoca, segons mostra l'anàlisi realitzat (sistema FR-C, gradient I), la pràctica desaparició del nucleopèptid (t<sub>R</sub> 18.8 min). El càlcul realitzat en base a les àrees dels pics permet estimar un 5% de nucleopèptid no degradat.

• S'han obtingut les sals sòdiques dels nucleopèptids **61a** i **61b**, per elució a través d'una columna Dowex 50W x 4 en forma de sal sòdica. Les fraccions corresponents han estat liofilitzades. A continuació, s'han redissolt en D<sub>2</sub>O i s'han liofilitzats, tres vegades. Per a l'enregistrament dels espectres de ressonància, s'han dissolt en D<sub>2</sub>O (30-35 OD<sub>260</sub>/mL, aprox. 0.8-1 mM).

Els mateixos productes dissolts en aigua (30-35 OD<sub>260</sub>/mL) han servit per a obtenir els respectius espectres de masses per la tècnica d'electrospray.

**Nucleopèptid 61a** :

<sup>1</sup>H RMN (D<sub>2</sub>O, 500 MHz) δ : 8.24, 8.17 (2H, s, s, 2xH8 A), 7.98, 7.94 (2H, s, s, 2xH2 A), 7.59, 7.54 (2H, d, d, J 7.5 Hz, 2xH6 C), 7.21, 7.18 (2H, s, s, 2xH6 T), 7.06 (5H, m, Ar), 6.19, 6.10, 6.04, 5.84, 5.80 (6H, m, 6xH1'), 5.75, 5.68 (2H, d, d, J 7.4 Hz, 2xH5 C), 5.00-3.50 (H3', H4', H5', CHα Ser, CH<sub>2</sub>α Gly, CHα Asp, CH<sub>2</sub>β Ser, CH<sub>2</sub>Ar), 2.80-2.00 (14H, m, 12xH2', CH<sub>2</sub>β Asp), 1.72, 1.68 (6H, s, s, 2xCH<sub>3</sub>-5 T).

<sup>31</sup>P RMN (D<sub>2</sub>O, 121 MHz) δ : 2.0 (banda ampla).

EM (electrospray, ACN/aigua, mode negatiu) m/z : 735.2 [M-3H]<sup>3-</sup>, 556.9 [M-5H+Na]<sup>4-</sup>, 551.6 [M-4H]<sup>4-</sup>, pes molecular estimat : 2209.2, pes molecular teòric (C<sub>75</sub>H<sub>95</sub>O<sub>44</sub>N<sub>23</sub>P<sub>6</sub>): 2208.55.

**Nucleopèptid 61b** :

<sup>1</sup>H RMN (D<sub>2</sub>O, 500 MHz) δ : 8.38, 8.24 (2H, s, s, 2xH8 A), 7.98, 7.93 (2H, s, s, 2xH2 A), 7.40 (1H, m, H6 C), 7.36 (2H, m, H6 C, H6 T), 7.21 (1H, s, H6 T), 7.13-7.04 (5H, m, Ar), 6.23, 6.18, 6.03, 5.97, 5.92 (6H, m, 6xH1'), 5.80 (1H, d, J 7.3 Hz, H5 C), 5.70 (1H, m, H5 C), 4.90-3.50 (H3', H4', H5',

CH $\alpha$  Ser, CH $_{2\alpha}$  Gly, CH $\alpha$  Asp, CH $_{2\beta}$  Ser, CH $_{2\beta}$  Ar), 2.76-2.10 (14H, m, 12xH $_{2'}$ , CH $_{2\beta}$  Asp), 1.60, 1.53 (6H, s, s, 2xCH $_{3-5}$  T).

$^{31}\text{P}$  RMN (D $_2$ O, 121 MHz)  $\delta$  : 3.1, 2.0 (aprox. 1:5).

EM (electrospray, ACN/aigua, mode negatiu) m/z : 742.7 [M-4H+Na] $^{3-}$ , 735.3 [M-3H] $^{3-}$ , 557.3 [M-5H+Na] $^{4-}$ , 551.4 [M-4H] $^{4-}$ , 445.0 [M-6H+Na] $^{5-}$ , 441.0 [M-5H] $^{5-}$ , pes molecular estimat : 2209.5, pes molecular teòric (C $_{75}$ H $_{95}$ O $_{44}$ N $_{23}$ P $_6$ ): 2208.55.

### 3.5 Proves d'estabilitat dels nucleopèptids **61a** i **61b** :

S'han dut a terme amb alíquotes liofilitzades dels nucleopèptids purificats (1 OD $_{260}$ ), a les que s'han afegit els corresponents reactius a assajar (100  $\mu$ L). Els resultats es resumeixen a la Taula 2.3 (Cap.2, apartat 4.1).

El seguiment dels tractaments s'ha dut a terme per anàlisi per HPLC (sistema BA-B, gradient lineal 0-100% B en 20 min) neutralitzant prèviament les mostres a injectar. En aquestes condicions d'anàlisi, els productes **61a** i **61b** presenten t $_R$ : 11.8 min, p $^5$ CATCAT $^{3'}$  (Sec. Exp. Cap.3, apartat 5.3.b) t $_R$ : 12.6 min (coelueix amb  $^5$ TACTAC $^{3'}$ p) i  $^5$ CATCAT $^{3'}$  (Sec. Exp. Cap.3, apartat 5.3.a) t $_R$ : 7.0 min.

1. Proves preliminars relacionades amb el disseny dels esquemes de protecció en síntesi de nucleopèptids :

1.1 Proves d'estabilitat de la unió fosfat dels derivats Boc-Ser(p T-DMT)-NHcHex (21) a diferents tractaments bàsics :

a) Obtenció dels nucleopèptids model

Boc-Ser(p T-DMT)-NHcHex (isòmer 3' **21a**, isòmer 5' **21b**) :

$N^{\alpha}$ -*t*-Butoxicarbonil-L-serinil-ciclohexilamida (Boc-Ser-NHcHex) (19) :

Se suspèn Boc-Ser-OH.H<sub>2</sub>O (2 g, 9 mmol) en DCM, i la solució es refreda a -15°C. S'afegeixen N-metilmorfolina (1 mL, 9 mmol) i cloroformiat d'isobutil (1.2 mL, 9 mmol). Al cap de 10 min, s'hi afegeix ciclohexilamina (2.6 mL, 22.5 mmol)<sup>236</sup>. La suspensió s'agita durant 15 min més, es retira el bany i es manté l'agitació 1 h més a temperatura ambient. El residu es dilueix amb DCM (25 mL) i es renta amb KHSO<sub>4</sub> aq 1 M (x 2) i dissolució saturada de NaCl (x 2). La fase orgànica s'asseca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i s'evapora a sequedat. El producte es purifica per elució sobre columna de gel de sílice amb un gradient de 0-2% de MeOH en CHCl<sub>3</sub>, i finalment es cristal·litza d'AcOEt i hexà, obtenint-se un sòlid blanc (1.7 g, 65%). Rf (sistema A) : 0.75; [α]<sub>D</sub> : +34.8° (CHCl<sub>3</sub>, c 0.97); pf : 112-114°C; <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) δ : 6.72 (1H, NHcHex), 5.62 (1H, NHBoc), 4.10 (OH), 3.80-3.60 (3H, m, CH<sub>2</sub>β, CHα), 3.40 (1H, m, CH cHex), 1.80-1.20 (m, CH<sub>2</sub> cHex, CH<sub>3</sub> tBu); <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) δ : 170.8 (CONH), 156.7 (NHCOO), 80.9 (Cq tBu), 63.3 (CH<sub>2</sub> β), 55.5 (CHα), 48.7 (CH cHex), 33.2 (CH<sub>2</sub> cHex), 28.8 (CH<sub>3</sub> tBu), 25.9 (CH<sub>2</sub> cHex), 25.1 (CH<sub>2</sub> cHex); IR (KBr) : 3500-3200, 1700, 1640, 1535, 1250, 1235 cm<sup>-1</sup>; anal, calc per C<sub>14</sub>H<sub>26</sub>O<sub>4</sub>N<sub>2</sub> (PM 286.19) C: 58.70, H: 9.16, N: 9.79, trobat C: 58.68, H: 9.10, N: 9.90; EM (FAB, NBA, Xe, mode positiu), m/z : 287 [M+H]<sup>+</sup>, 309 [M+Na]<sup>+</sup>.

Fosfat d'O-( $N^{\alpha}$ -*t*-butoxicarbonilserinilciclohexilamida), O-2-cianoetil i O-dimetoxitritilimidinil (20a, b) :

DMT-T-P(OCNE)NiPr<sub>2</sub> (isòmer 3' o 5', aquest darrer preparat segons l'apartat 3.2) i **19** (3 eq), assecats per coevaporació amb ACN sec, se suspenen en DCM (5 mL). Sota atmosfera d'argó, s'hi afegeix tetrazole (5 eq) i s'agita la barreja durant 2 h a temperatura ambient. A continuació s'hi afegeix tBuOOH 3 M en toluè (10 eq) i es manté l'agitació durant 30 min més. La suspensió resultant es dilueix amb DCM i es renta amb NaHCO<sub>3</sub> aq 10% (x 2) i NaCl sat. La fase orgànica s'asseca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i s'evapora a sequedat. El residu es purifica per elució a través columna de gel de sílice amb DCM/MeOH/Et<sub>3</sub>N (98:2:1). El producte es precipita sobre hexà.

isòmer 3' (**20a**) : Rdt : 56%; Rf (sistema B) : 0.35, (sistema C) : 0.60; pf : 120-122°C; <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) δ : 9.15 (1H, NH<sub>3</sub>), 7.65 (1H, s, H6); 7.40-7.20 (9H, m, Ar); 6.84 (4H, d, J 8.5 Hz, Ar), 6.50-6.30 (2H, m, H-1', NHcHex), 5.60 (1H, m, NHBoc), 4.50-4.10 (m, H3', H4', CHα, CH<sub>2</sub>β, CHcHex, CH<sub>2</sub>OP), 3.80 (6H, s, CH<sub>3</sub>O), 3.35 (2H, m, H5'), 3.35 (2H, m, H5'), 2.85-2.60 (3H, m, H2', CH<sub>2</sub>CN), 2.30 (1H, m, H2'), 1.80-1.10 (m, CH<sub>2</sub> cHex, CH<sub>3</sub> tBu, CH<sub>3</sub>-5); <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) δ : 167.4 (CONH), 163.7 (C4), 158.8 (C<sub>arom</sub>-OMe), 155.4 (NHCOO), 150.4 (C2), 144.8 (C<sub>arom</sub>), 135.9, 130.2, 127.3, 113.5 (C<sub>arom</sub>-H), 111.5 (C5), 87.5, 84.2, 84.0 (Cq DMT, C4', C1'), 73.8 (C3'), 68.0 (CH<sub>2</sub>OP), 62.9, 62.2 (C5', CH<sub>2</sub>β), 55.3 (CH<sub>3</sub>O), 54.6 (CHα), 48.5, 48.1 (CH cHex), 39.0 (C2'), 32.7, 25.4, 24.7 (CH<sub>2</sub> cHex), 28.3 (CH<sub>3</sub> tBu), 19.7 (CH<sub>2</sub>CN), 11.8 (CH<sub>3</sub>-5); <sup>31</sup>P RMN (CDCl<sub>3</sub>, 81 MHz) δ : -2.2; HPLC analítica (sistema FR-B, gradient lineal 20-100% B en 20 min, 260 nm) t<sub>R</sub> : 17.0 min.

isòmer 5' (**20b**) : Rdt : 50%; Rf (sistema C) : 0.50; pf : 124-126°C; <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) δ : 7.50-7.20 (9H, m, Ar); 6.87 (4H, d, J 8.5 Hz, Ar), 6.50-6.30 (2H, m, H-1', NHcHex), 5.65 (1H, m, NHBoc), 4.25-3.60 (8H, m, H3', H4', H5', CHα, CH<sub>2</sub>β, CHcHex, CH<sub>2</sub>OP), 3.80 (6H, s, CH<sub>3</sub>O), 2.70 (2H, m, CH<sub>2</sub>CN), 1.89 (3H, s, CH<sub>3</sub>-5), 1.80-1.10 (m, CH<sub>2</sub> cHex, CH<sub>3</sub> tBu); <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) δ : 168.0 (CONH), 164.0 (C4), 158.8 (C<sub>arom</sub>-OMe), 157.5 (NHCOO), 150.3 (C2), 144.0 (C<sub>arom</sub>), 135.6 (C6), 135.9, 130.2, 128.2, 113.4 (C<sub>arom</sub>-H), 111.5 (C5), 87.5, 84.7, 83.9 (Cq DMT, C4', C1'), 73.8 (C3'), 68.9 (CH<sub>2</sub>OP), 62.9 (C5'), 62.3 (CH<sub>2</sub>β), 55.3 (CH<sub>3</sub>O), 54.3 (CHα), 48.5 (CH cHex), 39.6 (C2'), 28.3 (CH<sub>3</sub> tBu), 24.5, 25.5 (CH<sub>2</sub> cHex), 19.6 (CH<sub>2</sub>CN), 12.4 (CH<sub>3</sub>-5); <sup>31</sup>P RMN (CDCl<sub>3</sub>, 81 MHz) δ : -3.4, -3.8; HPLC (sistema FR-B, gradient lineal 20-100% B en 20 min, 260 nm) t<sub>R</sub> : 16.2 min.

**Sal amònica del fosfat d'O-(N<sup>α</sup>-*t*-butoxicarbonilserinilciclohexilamida) i O-dimetoxitritilimidinil (21a,b) :**

Es tracta el fosfat triester **20a** o **20b** amb NH<sub>3</sub> aq conc/dioxà (1:1) (20 mL) durant tota una nit a 55 °C. La solució s'evapora i el residu, dissolt en DCM, es precipita sobre hexà.

**isòmer 3' (21a) :** Rdt : 80%; Rf (sistema C) : 0.10; pf : 152-154°C (descomposició); <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) δ : 7.62 (1H, s, H6), 7.40-7.25 (9H, m, Ar), 7.43 (4H, d, J 8 Hz, Ar), 6.40 (2H, m, H1', NHcHex), 5.94 (1H, m, NHBoc), 4.40-3.90 (6H, m, H3', H4', CHα, CH<sub>2</sub>β, CH cHex), 3.77 (6H, s, CH<sub>3</sub>O), 3.45-3.20 (2H, m, H5'), 2.72, 2.30 (2H, m, H2'), 1.80-1.20 (m, CH<sub>2</sub> cHex, CH<sub>3</sub> tBu, CH<sub>3</sub>-5); <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) δ : 164.0 (C4), 158.7 (C<sub>arom</sub>-OMe), 156.0 (NHCOO), 144.3 (C<sub>arom</sub>), 135.4, 130.1, 128.0, 113.3 (C<sub>arom</sub>-H), 115.2 (C5), 85.0, 84.4 (Cq DMT, C4', C1'), 64.2 (C5'), 63.8 (CH<sub>2</sub>β), 55.2 (CH<sub>3</sub>O), 47.6 (CH cHex), 32.5, 25.7, 25.2 (CH<sub>2</sub> cHex), 28.3 (CH<sub>3</sub> tBu), 11.4 (CH<sub>3</sub>-5); <sup>31</sup>P RMN (CDCl<sub>3</sub>, 81 MHz) δ : -2.8; EM (FAB, "magic bullet", Xe, mode negatiu), m/z : 892.2 [M - H]<sup>-</sup>, 623.2 [(DMT-Tp) - H]<sup>-</sup>, 589.2 [M - DMT]<sup>-</sup>; HPLC (sistema FR-B, gradient lineal 20-100% B en 20 min, 260 nm) t<sub>R</sub> : 11.0 min.

**isòmer 5' (21b) :** Rdt : 75%; Rf (sistema C) : 0.10; pf : 148-150°C (descomposició); <sup>1</sup>H RMN (CD<sub>3</sub>OD, 200 MHz) δ : 7.85 (1H, s, H6), 7.65-7.35 (m, Ar), 7.01 (1H, m, H1'), 4.50-3.60 (m, H3', H4', H5', CHα, CH<sub>2</sub>β, CH cHex), 3.80 (6H, s, CH<sub>3</sub>O), 2.15-1.20 (m, CH<sub>2</sub> cHex) 2.01 (3H, m, CH<sub>3</sub>-5), 1.57 (m, CH<sub>3</sub> tBu); <sup>13</sup>C RMN (CD<sub>3</sub>OD, 50 MHz) δ : 171.2 (CONH), 166.5 (C4), 160.3 (C<sub>arom</sub>-OMe), 152.6 (C2), 146.8 (C<sub>arom</sub>), 137.9, 137.6 (C6, C<sub>arom</sub>), 131.5, 129.4, 129.0, 128.1, 114.3 (C<sub>arom</sub>-H), 112.2 (C5), 88.7, 86.2, 84.4 (Cq DMT, C4', C1'), 76.6 (C3'), 66.7, 66.5 (C5', CH<sub>2</sub>β), 55.8 (CH<sub>3</sub>O), 40.1 (C2'), 28.7 (CH<sub>3</sub> tBu), 26.6, 26.0 (CH<sub>2</sub> cHex), 12.7 (CH<sub>3</sub>-5); <sup>31</sup>P RMN (CDCl<sub>3</sub>, 81 MHz) δ : -2.0, -2.5; EM (FAB, "magic bullet", Xe, mode negatiu), m/z : 891.1 [M - H]<sup>-</sup>, 791.1 [M - Boc]<sup>-</sup>, 623.7 [(pT-DMT) - H]<sup>-</sup>, 589.4 [M - DMT]<sup>-</sup>, 365.2 [Boc-Ser(p)-NHcHex - H]<sup>-</sup>, 321.1 [pT - H]<sup>-</sup>; HPLC (sistema FR-B, gradient lineal 20-100% B en 20 min, 260 nm) t<sub>R</sub> : 10.3 min

**b) Proves d'estabilitat dels derivats 21a, 21b a diferents tractaments bàsics :**

S'ha dissolt directament el fosfat triester **20a** o **20b** (5 mg, 5 μmol) en cadascuna de les solucions bàsiques a assajar (25-100 eq. respecte el nucleòsid, excepte per a NH<sub>3</sub> aq conc en dioxà, en què s'han emprat 5 mL). L'evolució del fosfat triester **20** (producte de l'eliminació del grup protector cianoetil) s'ha seguit, prèvia neutralització de la solució amb AcOH aq 1%, mitjançant anàlisi per HPLC (sistema FR-B, gradient lineal 20-100% B en 20 min, 260 nm). Els tractaments realitzats i els resultats corresponents es comenten a la Taula 3.1 (Cap. 3, apartat 1.1).

**1.2 Proves de labilitat de diferents grups protectors de les nucleobases a diferents tractaments bàsics :**

S'han tractat petites quantitats (5-10 mg) dels nucleòsids protegits amb la corresponent dissolució de reactiu (10-15 eq. ó 250 μL per a la solució d'NH<sub>3</sub>) i s'ha seguit l'evolució del producte per anàlisi mitjançant cromatografia en capa fina (sistema C). Els resultats es comenten a la Taula 3.2 (Cap. 3, apartat 1.2).

Pel cas particular dels protectors FOD<sup>R</sup> (protecció dimetilaminometilè per adenina i guanina, i isobutiril per citosina<sup>142</sup>, d'Applied Biosystems), dels quals no es disposa dels corresponents nucleòsids protegits no fosforilats (només els corresponents derivats 3'-fosforamidit són comercials), les proves han estat realitzades sobre els derivats H-fosfonat d'O-2-cianoetil, obtinguts per hidròlisi (tetrazole en ACN/aigua 9:1) dels corresponents 3'-fosforamidits, extracció amb aigua i precipitació sobre hexà. Aquests tractaments produeixen a més la pèrdua del protector CNE, generant-se els corresponents derivats H-fosfonat monoester, pel que el seguiment de la reacció cal realitzar-lo per HPLC (sistema FR-B, gradient lineal 20-100% B, 20 min, 260 nm), prèvia neutralització de la solució abans d'injectar.

### 1.3 Proves de labilitat de diferents grups protectors del grup $\beta$ -carboxil en els derivats Boc-Asp(OX)-OH a diferents tractaments bàsics :

La labilitat dels derivats Boc-Asp(OX)-OH a condicions de desprotecció bàsiques s'ha determinat observant la desaparició de l'èster i l'aparició de Boc-Asp-OH (o altres derivats, com ara l'èster metílic), ja sigui mitjançant l'anàlisi per cromatografia en capa fina (sistema A) o per HPLC (sistema FR-A, gradient lineal 30-100% B en 20 min, 220 nm). Les proves s'han realitzat sobre aprox 1  $\mu$ mol d'aminoàcid, utilitzant un mínim de 10 eq de reactiu. Els tractaments i els resultats corresponents es descriuen a la Taula 3.4 (Cap.3, apartat 1.3).

### 1.4 Proves de labilitat de la unió nucleòsid-(succinil-resina) a diferents tractaments bàsics :

Els tractaments s'han efectuat sobre alíquotes de DMT-T-suc-resina o DMT-CATCAT-suc-resina (5-10 mg - Mater. Mèt. Gen. VIII) de pes conegut, a les que s'han afegit les corresponents dissolucions (s'han fet servir 50 eq de reactiu per a les DMT-T-suc-resines i 100 eq per a DMT-CATCAT-suc-resines). El rendiment de trencament de l'enllaç nucleòsid-resina s'ha determinat per comparació de la funcionalització en grups DMT (Mater. Mèt. Gen. VI) abans i després del tractament, havent eliminat el corresponent reactiu per rentat, i a continuació havent assecat la resina. Les dades obtingudes són les que comenten a la Taula 3.5 (Cap.3, apartat 1.4).

### 1.5 Proves de labilitat a diferents tractaments bàsics de la unió -Gly-R-Leu-NHCH<sub>2</sub>-PS (R : Nbb, NPE) :

#### a) Obtenció de Boc-Gly-Nbb-Leu-NHCH<sub>2</sub>-PS (**52b**) :

S'ha partit de l'aminoacil resina Boc-Leu-NHCH<sub>2</sub>-PS (**47**), preparada segons s'ha descrit a la Secció Experimental del Capítol 2 (apartat 1.1a)

Per a l'acoblament de l'espaiador bifuncional, l'àcid 4-hidroximetil-3-nitrobenzoic<sup>275</sup> (espaiador Nbb), s'ha preparat el derivat Boc-Gly-Nbb-OTcp<sup>274</sup>, preparat de forma idèntica a l'anàleg NPE (vegeu Sec. Exp. Cap.2, apartat 1.1). L'èster de triclorofenil de l'espaiador bifuncional, H-Nbb-OTcp (150 mg, 0.4 mmol), obtingut prèviament per reacció de l'àcid amb triclorofenol en presència de DCC i HOBt<sup>104</sup>, s'ha fet reaccionar amb Boc-Gly-OH (210 mg, 1.2 mmol) en presència de DCC (247 mg, 1.2 mmol) i una quantitat catalítica de DMAP, durant 30 min a temperatura ambient. Després d'haver filtrat la dicitohexilurea, s'ha diluït el residu amb DCM i s'ha rentat amb NaHCO<sub>3</sub> aq 5% (x 2) i solució saturada de NaCl. S'ha assecat la dissolució sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i s'ha evaporat a sequedat. El residu s'ha purificat sobre una columna de gel de sílice eluint amb hexà/AcOEt (3:1). S'ha obtingut el producte com una espuma groga per evaporació de les fraccions corresponents (160 mg, 75%).

**Boc-Gly-Nbb-OTcp (50b)** : Rf (sistema A) : 0.80; <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz)  $\delta$  : 8.92 (1H, d, J 2Hz, Ar), 8.46 (1H, dd, J 2, 8 Hz, Ar), 7.85 (1H, d, J 8 Hz, Ar), 7.63, 7.47 (2H, s, s, Ar'), 5.70 (2H, s, CH<sub>2</sub>Ar), 5.17 (1H, m, NH), 4.07 (2H, d, J 6 Hz, CH<sub>2</sub> $\alpha$ ), 1.47 (9H, s, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz)  $\delta$  : 170.4 (COO Gly), 161.8 (COOAr'), 156.0 (NHCOO), 147.8, 145.8, 138.3 (C<sub>arom</sub>), 135.5, 131.7, 129.8, 129.4, 127.6 (C<sub>arom</sub>-H), 80.5 (Cq), 63.7 (CH<sub>2</sub>O), 43.0 (CH<sub>2</sub> $\alpha$ ), 28.8 (CH<sub>3</sub>); EM (FAB, NBA, Xe, mode positiu) m/z : 461 [M-(CH<sub>3</sub>)CO]<sup>+</sup>.

El derivat **50b** s'ha ancorat a la leucinil-resina **47** (500 mg, 0.30 mmol Leu/g), prèvia eliminació del grup protector Boc. La resina, suspesa en la mínima quantitat de DMF, es fa reaccionar amb 0.75 eq del derivat **50b** en presència de HOBt (0.9 eq respecte l'aminoàcid), amb agitació suau al llarg d'una nit. Havent rentat la resina (DMF, DCM), s'han acetilat els grups amino que no han reaccionat amb Ac<sub>2</sub>O (10 eq) i DIEA (10 eq) en DMF durant 30 min. Novament, després de rentar i assecat, s'ha quantificat la incorporació d'aminoàcid sobre la resina **52b** per anàlisi d'aminoàcids, obtenint-se una funcionalització de 0.12 mmol Gly/g, amb una relació Gly/Leu de 0.50.

**b) Proves de labilitat de les aminoacil-resines****Boc-Gly-R-Leu-NHCH<sub>2</sub>-PS (R: NPE 52a; Nbb 52b) :**

Les proves de desancoratge han consistit en tractar alíquotes de les respectives resines 52a (preparada segons Sec. Exp. Cap.2, apartat 1.1) i 52b amb els diferents reactius (100 eqs respecte a l'aminoàcid Gly) i, en acabat, una vegada rentades i assecades, realitzant les anàlisis d'aminoàcids. La comparació de la proporció Gly/Leu amb el valor inicial ha permès quantificar el rendiment de l'alliberament de l'aminoàcid. Els tractaments i els resultats corresponents es resumeixen a la Taula 3.6 (Cap. 3, apartat 1.5.b).

**c) Proves d'alliberament de pèptid de la resina****Phac-Phe-Val-Ser-Gly-NPE-Leu-NHCH<sub>2</sub>-PS (53) :****Obtenció dels pèptids Phac-Phe-Val-Ser-Gly-X (54a-c ; X: OH, OCH<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>) :**

Les proves s'han realitzat sobre alíquotes de peptidil-resina 53 (10-15 mg, f 0.13 mmol Gly/g, obtinguda com s'explica a Sec. Exp. Cap.2, apartat 1.4) que han estat tractades amb els corresponents reactius en les condicions indicades (Taula 3.7, Cap.3, apartat 1.5.b). En general s'han emprat 100 eq de reactiu respecte el pèptid, excepte per NH<sub>3</sub> aq conc/dioxà en què ha estat 1 mL de dissolució.

L'anàlisi d'aminoàcids de les resines després de cada tractament, una vegada rentades i assecades, ha permès determinar el rendiment d'alliberament de pèptid. Per altra banda s'ha recollit la solució que prové de cada tractament, la qual junt amb els rentats de la resina (3 x MeOH), s'ha neutralitzat i evaporat a sequedat i s'ha analitzat per HPLC (sistema FR-A, gradient lineal 10-80% B en 30 min, 260 nm). Aquesta darrera dada és la que possibilita conèixer la qualitat del pèptid alliberat així com el tipus de funcionalització en l'extrem C-terminal (Phac-Phe-Val-Ser-Gly-X, on X:OH t<sub>R</sub> 18.8 min, X: OCH<sub>3</sub> t<sub>R</sub> 20.4 min i X: NH<sub>2</sub> t<sub>R</sub> 18.0 min). Els tractaments realitzats i els corresponents resultats s'exposen a la Taula 3.7 (Cap.3, apartat 1.5.b).

**Phac-Phe-Val-Ser-Gly-OH** : se n'ha obtingut una major quantitat per tractament de 500 mg de peptidil-resina (66 μmol) amb TBAF 0.01 M en THF (100 eq) durant 0.5 h. El pèptid, una vegada alliberat de la resina, neutralitzat i evaporat, s'ha purificat per elució amb MeOH sobre una columna de Sephadex LH-20 (Mater. Mèt. Gen. II). Rdt : 35%; <sup>1</sup>H RMN (CD<sub>3</sub>OD, 200 MHz) δ : 7.20-7.10 (10H, m, Ar Phe, Ar Phac), 4.55 (1H, m, CH<sub>α</sub> Phe), 4.25 (1H, m, CH<sub>α</sub> Ser), 4.00-3.80 (3H, m, CH<sub>2</sub> Gly, CH<sub>α</sub> Val), 3.69 (2H, s, CH<sub>2</sub>Ph), 3.22, 2.78 (2H, m, CH<sub>2</sub>β Phe), 2.12 (1H, m, CH<sub>2</sub>β Val), 0.92 (6H, m, CH<sub>3</sub>γ Val); EM (FAB, NBA, Xe, mode positiu) m/z : 549.8 [M+Na]<sup>+</sup>, 527.6 [M+H]<sup>+</sup>.

**Phac-Phe-Val-Ser-Gly-OCH<sub>3</sub>** : s'ha obtingut com a producte minoritari del tractament de la resina amb K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.05 M (aprox. 25% del cru total, on el producte majoritari és el pèptid-OH; vegeu Cap.3, apartat 1.5.b). S'ha purificat una petita alíquota del cru de tractament amb K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> per HPLC, i el pèptid així obtingut s'ha caracteritzat per EM : FAB, NBA, Xe, mode positiu, m/z : 563.1 [M+Na]<sup>+</sup>.

**Phac-Phe-Val-Ser-Gly-NH<sub>2</sub>** : s'obté com a producte majoritari (aprox. 80% del cru, on apareix també com a producte minoritari el pèptid-OH) del tractament de la resina amb NH<sub>3</sub> aq conc / dioxà 1:1, a 55°C durant 6 h (vegeu Cap.3, apartat 1.5.b). Del cru alliberat de la resina i evaporat a sequedat, se n'ha purificat una alíquota per HPLC (vegeu més amunt), producte que ha estat emprat per a la caracterització per EM : FAB, NBA, Xe, mode positiu, m/z : 548.3 [M+Na]<sup>+</sup>, 526.2 [M+H]<sup>+</sup>.



**2. Obtenció de derivats d'aminoàcid emprats a la síntesi de nucleopèptids.****Obtenció de l'1-[4-(2-Hidroxietil)-3-nitrofenil]-1-etanona.****Proves d'estabilitat del grup 2-(4-acetil-3-nitrofenil)etil als reactius de síntesi de pèptids :****2.1 Obtenció de l'1-[4-(2-hidroxietil)-3-nitrofenil]-1-etanona (64):****a) Acetat de 2-(4-acetilfenil)etil (62) :**

S'afegeix gota a gota una dissolució de 2-feniletanol (20 g, 164 mmol) en DCM (25 mL) a una suspensió de  $\text{AlCl}_3$  (68.3 g, 512 mmol) en DCM, refredada amb un bany de gel. Quan el sòlid s'ha dissolt del tot, s'hi afegeix  $\text{CH}_3\text{COCl}$  (23 mL, 325 mmol). Al cap de 30 min, es retira el bany de gel i es continua l'agitació durant 1 h a temperatura ambient. Es refreda la solució a  $-20^\circ\text{C}$ , i es destrueix l'excés d' $\text{AlCl}_3$  afegint-hi  $\text{HCl}$  aq 10% en gel. Les sals formades es filtren i el filtrat, diluït amb èter (100 mL), es renta amb  $\text{HCl}$  aq 10% (x 3) i  $\text{NaHCO}_3$  aq 10% (x 3), s'asseca sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  i s'evapora a sequedat. Es purifica el residu per elució a través columna de gel de sílice amb un gradient de 0-2% de MeOH en DCM, obtenint-se el producte **62** com un oli groc (20g, 60%). Rf (sistema D) : 0.4, (sistema E) : 0.6;  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz)  $\delta$  : 7.90 (2H, d, J 8 Hz, Ar), 7.32 (2H, d, J 8 Hz, Ar), 4.30 (2H, t, J 7 Hz,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.00 (2H, t, J 7 Hz,  $\text{CH}_2\text{Ar}$ ), 2.58 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{CO}$ );  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz)  $\delta$  : 195.0 (COAr), 170.7 (COO), 143.4, 136.7 ( $\text{C}_{\text{arom}}$ ), 128.9, 128.4 ( $\text{C}_{\text{arom-H}}$ ), 64.0 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ), 34.8 ( $\text{CH}_2\text{Ar}$ ), 26.4 ( $\text{CH}_3\text{COAr}$ ), 20.7 ( $\text{CH}_3\text{COO}$ ); IR (film) : 1735, 1680, 1240  $\text{cm}^{-1}$ .

**b) Acetat de 2-(4-acetil-2-nitrofenil)etil (63) :**

Es dissol **62** (7 g, 34 mmol) en  $\text{Ac}_2\text{O}$  (20 mL) i es refreda a  $-20^\circ\text{C}$ . Gota a gota, s'hi afegeix  $\text{H}_2\text{SO}_4$  96% (1.7 mL) en  $\text{Ac}_2\text{O}$  (10 mL), i a continuació  $\text{HNO}_3$  fumant (1.7 mL, 41 mmol), refredat a  $-20^\circ\text{C}$ . Al cap de 1 h, la solució s'aboca sobre gel (100 mL). El producte s'extreu amb èter (x 2) i la fase orgànica resultant es renta amb  $\text{NaHCO}_3$  aq 10% (x 3) i aigua, s'asseca sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  i s'evapora a sequedat. El residu es purifica per elució a través d'una columna de gel de sílice amb un gradient de 0-2% de MeOH en DCM. S'obté el producte **63** com un oli groc (5.1 g, 60%). Rf (sistema D) : 0.30, (sistema E) : 0.65;  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz)  $\delta$  : 8.48 (1H, d, J 2 Hz, Ar), 8.12 (1H, dd, J 2, 8 Hz, Ar), 7.52 (1H, d, J 8 Hz,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 4.38 (2H, t, J 7 Hz,  $\text{CH}_2\text{Ar}$ ), 2.66 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{COAr}$ ), 2.02 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{COO}$ );  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz)  $\delta$  : 195.3 (COAr), 170.5 (COO), 137.7, 137.0, 134.3 ( $\text{C}_{\text{arom}}$ ), 133.0, 131.8 ( $\text{C}_{\text{arom-H}}$ ), 63.2 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ), 32.1 ( $\text{CH}_2\text{Ar}$ ), 26.5 ( $\text{CH}_3\text{COAr}$ ), 20.6 ( $\text{CH}_3\text{COO}$ ); IR (film) : 1735, 1685, 1525, 1355, 1240  $\text{cm}^{-1}$ .

**c) 1-[4-(2-hidroxietil)-3-nitrofenil]-1-etanona (Anpe-OH, 64) :**

S'escalfa a reflux **63** (5.1 g, 20 mmol) en  $\text{HCl}$  aq conc/MeOH 2:8 (100 mL) durant 2 h a  $60^\circ\text{C}$ , i la solució resultant es concentra a sequedat. El residu es purifica a través de columna de gel de sílice eluint amb  $\text{AcOEt}$ /hexà (1:1). S'obté un oli groguenc (3.2 g, 77%). Rf (sistema D): 0.20, (sistema E) : 0.25, (sistema F) : 0.50;  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz)  $\delta$  : 8.43 (1H, d, J 2 Hz, Ar), 8.20 (1H, dd, J 2, 8 Hz, Ar), 7.55 (1H, d, J 8 Hz, Ar), 3.96 (2H, t, J 7 Hz,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 3.22 (2H, t, J 7 Hz,  $\text{CH}_2\text{Ar}$ ), 2.64 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{COAr}$ ), 2.20 (1H, OH);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz)  $\delta$  : 195.3 (CO), 138.8, 136.1, 134.5 ( $\text{C}_{\text{arom}}$ ), 133.2, 131.7, 124.4 ( $\text{C}_{\text{arom-H}}$ ), 61.9 ( $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 35.9 ( $\text{CH}_2\text{Ar}$ ), 26.5 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ); IR (film) : 3420, 1695, 1535, 1360  $\text{cm}^{-1}$ ; anal, calc per  $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{O}_4\text{N}$  (PM 209.20) C: 57.40, H: 5.30, N: 6.70, trobat C: 57.20, H: 5.10, N: 6.68; EM (EI) m/z : 210  $[\text{M}]^+$ , 194, 179, 162, 120, 77, 43.

**2.2 Obtenció dels  $\beta$ -esters de l'àcid  $N^{\alpha}$ -*t*-butoxicarbonil-L-aspartic Boc-Asp(OX)-OH :**  
**X: 2-cianoetil (65) , 2-(4-nitrofenilet) (66) i 2-(4-acetil-3-nitrofenil)etil (67):**

**a) Ruta A :**

**Boc-Asp(OX)<sub>2</sub> :**

Boc-Asp-OH i el corresponent alcohol (2 eq) se suspenen en DCM i es refreda en un bany de gel. S'hi afegeix de mica en mica DCC (3 eq) dissolta en DCM al llarg de 2 h, i a continuació 4-dimetilaminopiridina (0.1 eq). Es retira el bany i es deixa durant tota una nit. La barreja es refreda per afavorir la precipitació de diciclohexilurea. Al cap de 30 min se separa el precipitat per filtració. El filtrat es dilueix amb DCM i es renta amb NaHCO<sub>3</sub> aq 5% (x 2) i KHSO<sub>4</sub> aq 1M, s'asseca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i s'evapora a sequedat. El residu es purifica sobre columna de gel de sílice eluint amb un gradient de 0-5% de MeOH en DCM.

**Boc-Asp(OCne)<sub>2</sub> :** sòlid blanc; Rdt : 85%; Rf (sistema F) : 0.75; <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz)  $\delta$  : 5.65 (1H, NH), 4.30-3.90 (5H, m, CH $\alpha$ , CH<sub>2</sub>O), 3.10-2.90 (6H, m, CH<sub>2</sub>CN, CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 1.46 (9H, s, CH<sub>3</sub> tBu).

**Boc-Asp(ODnpe)<sub>2</sub> :** espuma taronja; Rdt : 75%; Rf (sistema A) : 0.75; <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz)  $\delta$  : 8.72 (2H, d, Ar); 8.43 (2H, dd, Ar), 7.60 (2H, d, Ar), 5.54 (1H, m, NH), 4.45-4.00 (5H, m, CH $\alpha$ , CH<sub>2</sub>O), 3.30-3.00 (6H, m, CH<sub>2</sub>Ar, CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 1.47 (9H, s, CH<sub>3</sub> tBu).

**Boc-Asp(ONe)<sub>2</sub> :** espuma incolora; Rdt : 60%; Rf (sistema A) : 0.70; <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz)  $\delta$  : 5.62 (1H, NH), 4.30-3.95 (7H, m, CH<sub>2</sub>NO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>O, CH $\alpha$ ), 3.10-2.90 (2H, m, CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 1.48 (9H, s, CH<sub>3</sub> tBu).

**Boc-Asp(OAnpe)<sub>2</sub> :** espuma groga; Rdt : 68%; Rf (sistema F) : 0.70; <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz)  $\delta$  : 8.48 (2H, s, Ar), 8.12 (2H, dd, J 2, 7 Hz, Ar), 7.54 (2H, m, Ar), 4.52-4.24 (3H, m, CH $\alpha$ , CH<sub>2</sub>O), 3.30 (2H, m, CH<sub>2</sub>Ar), 3.10-2.80 (2H, m, CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 2.66 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 1.43 (9H, s, CH<sub>3</sub> tBu); IR (film) : 3340, 2950-2875, 1720-1680, 1530, 1350, 1250, 1220, 1150 cm<sup>-1</sup>.

**Boc-Asp(OX)-OH :**

A una dissolució de Boc-Asp(OR)<sub>2</sub> en acetona, refredada en un bany de gel, s'hi afegeix una solució de LiOH·H<sub>2</sub>O (0.8 eq) en aigua al llarg de 1.5 h<sup>242</sup>. Es deixa que la barreja arribi a temperatura ambient i es manté la reacció durant 0.5 h més, després del qual s'elimina l'acetona per evaporació. La fase aquosa resultant es dilueix i es renta amb AcOEt (x 2). Refredant amb un bany de gel s'acidifica fins a pH 2 amb HCl aq 10%. El producte, Boc-Asp(OR)-OH, s'extreu amb AcOEt (x 2), i la corresponent fase orgànica s'asseca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i s'evapora a sequedat.

**Boc-Asp(OCne)-OH :** sòlid blanc, cristal·litzat amb AcOEt/hexà; Rdt : 85%; Rf (sistema A) : 0.80; pf : 78-80 °C; [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> : +33.5 ° (CHCl<sub>3</sub>, c 1.00); <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz)  $\delta$  : 5.36 (1H, NH), 4.30-4.10 (3H, m, CH<sub>2</sub>O, CH $\alpha$ ), 3.10 (2H, m, CH<sub>2</sub>CN), 2.90 (2H, m, CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 1.45 (9H, s, CH<sub>3</sub> tBu); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz)  $\delta$  : 175.0 (COOH), 170.6 (COOR), 155.4 (OCONH), 80.9 (Cq tBu), 50.7 (CH $\alpha$ ), 50.8 (CH<sub>2</sub>O), 37.7 (CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 32.8 (CH<sub>2</sub>CN), 28.7 (CH<sub>3</sub> tBu); IR (film) : 3350, 2945, 2860, 2275, 1715, 1650, 1175 cm<sup>-1</sup>; anal, calc per C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>O<sub>6</sub>N<sub>2</sub> (PM 286.28) C: 50.35, H: 6.34, N: 9.79, trobat C: 50.02, H: 6.85, N: 9.43; HPLC (sistema FR-A, gradient lineal 30-100% B en 20 min, 220 nm) t<sub>R</sub> : 14.6 min.

**Boc-Asp(OAnpe)-OH :** espuma groga; Rdt : 76%; Vegeu el mètode B per a la caracterització.

**b) Ruta B :**

**HCl·H-Asp(OX)-OH :**

El derivat 2,2-dietil-5-oxotetrahidro-1,3,2-oxazaborolà de l'àcid aspàrtic (preparat com es descriu a la literatura<sup>245</sup>) de l'àcid aspàrtic es dissol en DCM i s'hi afegeix l'alcohol (X-OH) i DCC (1.2 eq de cadascun). La barreja s'agita durant 3 h a temperatura ambient. Es refreda amb un bany de gel per promoure la precipitació de diciclohexilurea i es filtra. El corresponent filtrat

s'evapora a sequedat, es redissol en èter anhidre i, refredat en un bany de gel, s'hi bombolleja HCl g durant 10 min. El sòlid que es forma es decanta, es renta amb èter (x 2) i s'asseca.

**HCl·H-Asp(ONpe)-OH** : espuma groga; Rdt : 80%; Rf (sistema A) : 0.30;  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 200 MHz)  $\delta$  : 8.14 (2H, d, J 9 Hz, Ar), 7.46 (2H, d, J 9 Hz, Ar), 4.42 (2H, t, J 7 Hz,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.90 (1H, m,  $\text{CH}\alpha$ ), 3.10-2.80 (4H, m,  $\text{CH}_2\text{Ar}$ ,  $\text{CH}_2\beta$ ); IR (film) : 3500-2500, 1740, 1520, 1345  $\text{cm}^{-1}$ .

**HCl·H-Asp(ODnpe)-OH** : espuma taronja; Rdt : 75%; Rf (sistema A) : 0.35;  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 200 MHz)  $\delta$  : 8.35 (1H, d, J 2 Hz, Ar), 8.12 (1H, dd, J 2, 8 Hz, Ar), 7.46 (1H, d, J 8 Hz, Ar), 4.25-3.80 (3H, m,  $\text{CH}_2\text{O}$ ,  $\text{CH}\alpha$ ), 3.15-2.80 (4H, m,  $\text{CH}_2\text{Ar}$ ,  $\text{CH}_2\beta$ ); IR (film) : 3500-2600, 1750, 1540, 1350  $\text{cm}^{-1}$ .

**HCl·H-Asp(OAnpe)-OH** : espuma groga; Rdt : 75%; Rf (sistema A) : 0.15;  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 200 MHz)  $\delta$  : 8.50 (1H, s, Ar), 8.23 (1H, d, J 7 Hz, Ar), 7.68 (1H, d, J 7 Hz, Ar), 4.45 (3H, m,  $\text{CH}\alpha$ ,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.30 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{Ar}$ ), 3.00 (2H, m,  $\text{CH}_2\beta$ ), 2.64 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ); IR (film) : 3650-2300, 1740, 1685, 1610, 1535, 1350  $\text{cm}^{-1}$ .

### Boc-Asp(OX)-OH :

Es dissol HCl·H-Asp(OX)-OH en dioxà/aigua 2:1 i es porta a pH 9 afegint-hi  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  aq 10%. La dissolució es refreda amb un bany de gel i s'afegeix lentament dicarbonat de di-*t*-butil ( $\text{Boc}_2\text{O}$ , 1.5 eq)<sup>246</sup>. La reacció es continua al llarg de 2 h mantenint el pH a valor 9 afegint-hi més dissolució de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Quan la reacció s'ha completat en base a l'anàlisi en capa fina, es refreda amb un bany de gel i s'acidifica amb HCl aq 10% fins a pH 2 i s'extreu amb èter (x 3). La fase orgànica s'asseca sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  i s'evapora a sequedat. El residu es purifica per elució a través columna de gel de sílice amb barreges AcOEt/MeOH/AcOH.

**Boc-Asp(ONpe)-OH** : sòlid groguenc després de precipitar sobre èter/hexà; Rdt : 60%; Rf (sistema A) : 0.85; pf: 62-64 °C;  $[\alpha]_D$  : +25.0° ( $\text{CHCl}_3$  c 1.02);  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz)  $\delta$  : 8.22 (2H, d, J 9 Hz, Ar), 7.42 (2H, d, J 9 Hz, Ar), 5.50 (1H, d, J 7 Hz, NH), 4.39 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.76 (1H, m,  $\text{CH}\alpha$ ), 3.10-2.75 (4H, m,  $\text{CH}_2\beta$ ,  $\text{CH}_2\text{Ar}$ ), 1.45 (9H, s,  $\text{CH}_3$  tBu);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz)  $\delta$  : 174.4 (COOH), 171.4 (COOR), 156.1 (OCONH), 147.0, 146.1 ( $\text{C}_{\text{arom}}$ ), 130.3, 124.2 ( $\text{C}_{\text{arom-H}}$ ), 80.8 (Cq tBu), 64.9 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ), 50.2 ( $\text{CH}\alpha$ ), 28.6 ( $\text{CH}_3$  tBu); IR (film) : 3340, 2980-2975, 1740-1710, 1520, 1350, 1160  $\text{cm}^{-1}$ ; EM (Cl,  $\text{NH}_3$ ) m/z : 400 [ $\text{M}+\text{NH}_4$ ]<sup>+</sup>; anal, calc per  $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_8\text{N}_2$  (PM 382.37) C: 53.40, H: 5.80, N: 7.33, trobat C: 53.90, H: 6.01, N: 6.98; HPLC (sistema FR-A, gradient lineal 30-100% B en 20 min, 220 nm)  $t_R$  : 12.3 min.

**Boc-Asp(OAnpe)-OH** : espuma groga; Rdt : 64%; Rf (sistema A) : 0.65;  $[\alpha]_D$  : +22.6° ( $\text{CHCl}_3$ , c 1.97); UV(EtOH):  $\lambda_{\text{max}}=234$  nm  $\epsilon=35500$ ;  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz)  $\delta$  : 8.46 (1H, d, J 8 Hz, Ar), 8.10 (1H, dd, J 1.5, 8 Hz, Ar), 7.50 (1H, d, J 8 Hz, Ar), 5.55 (1H, d, J 7 Hz, NH), 4.45 (1H, m,  $\text{CH}\alpha$ ), 4.40 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.28 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{Ar}$ ), 3.10-2.80 (2H, m,  $\text{CH}_2\beta$ ), 2.63 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 1.40 (9H, s,  $\text{CH}_3$  tBu);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz)  $\delta$  : 196.7 (COCH<sub>3</sub>), 174.8 (COOH), 170.7 (COOR), 155.5 (OCONH), 137.5, 136.7, 134.2 ( $\text{C}_{\text{arom}}$ ), 133.2, 132.1, 124.7 ( $\text{C}_{\text{arom-H}}$ ), 80.4 (Cq tBu), 63.9 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ), 49.6 ( $\text{CH}\alpha$ ), 36.4 ( $\text{CH}_2\beta$ ), 32.3 ( $\text{CH}_2\text{Ar}$ ), 28.1 ( $\text{CH}_3$  tBu), 26.5 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ); IR (film) : 3500-2700, 1745, 1720, 1710, 1695, 1530, 1370, 1230, 1180  $\text{cm}^{-1}$ ; EM (Cl,  $\text{CH}_4$ ) m/z : 451 [ $\text{M}+\text{C}_2\text{H}_5$ ]<sup>+</sup>, 441 [ $\text{M}+\text{CH}_5$ ]<sup>+</sup>, 425 [ $\text{M}+\text{H}$ ]<sup>+</sup>; HPLC (sistema FR-A, gradient lineal 30-100% B en 20 min, 220 nm)  $t_R$  : 11.4 min.

**Boc-Asp(OAnpe)-OH.(cHex)<sub>2</sub>NH** : És possible disposar d'un derivat sòlid de Boc-Asp(OAnpe)-OH per obtenció de la corresponent sal de diciclohexilamoni : a una solució de Boc-Asp(OAnpe)-OH en èter, refredada en un bany de gel, s'hi afegeix diciclohexilamina (1 eq). La solució s'evapora a sequedat, obtenint-se un sòlid groguenc. pf: 60-62°C; anal, calc per  $\text{C}_{31}\text{H}_{47}\text{O}_9\text{N}_3$  (PM 605.33) C: 61.45, H: 7.82, N: 6.94, trobat C: 61.08, H: 8.15; N: 6.36.

### 2.3 Obtenció del $\gamma$ -ester 2-(4-acetil-3-nitrofenil)etilic de l'àcid $\text{N}^\alpha$ -*t*-butoxicarbonil-L-glutàmic: Boc-Glu(OAnpe)-OH (68):

S'ha obtingut essencialment com el derivat d'àcid aspàrtic, a través de la ruta B.

**HCl·H-Glu(OAnpe)-OH** : espuma taronja; Rdt : 70%; Rf (sistema A) : 0.25;  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 200 MHz)  $\delta$  : 8.4 (1H, d, J 2 Hz, Ar), 8.15 (1H, dd, J 2, 7 Hz, Ar), 7.62 (1H, d, J 7 Hz, Ar), 3.90-3.60 (3H,

m, CH $\alpha$ , CH<sub>2</sub>O), 3.30-3.00 (4H, m, CH<sub>2</sub>Ar, CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 2.62 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.35-2.10 (2H, m, CH<sub>2</sub> $\gamma$ ); IR (film) : 3375, 2980, 2875, 2600-2000, 1740, 1690, 1540, 1350, 1130 cm<sup>-1</sup>.

**Boc-Glu(OAnpe)-OH** : sòlid groguenc després de precipitar sobre èter/hexà; Rdt : 40%; Rf (sistema A) : 0.65; [α]<sub>D</sub> : +2.2° (CHCl<sub>3</sub>, c 0.92); pf : 52-54°C; <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) δ : 8.50 (1H, d, J 2 Hz, Ar), 8.08 (1H, dd, J 2, 7 Hz, Ar), 7.52 (1H, d, J 7 Hz, Ar), 5.42 (1H, m, NH), 4.36 (2H, m, CH<sub>2</sub>O), 3.80-3.70 (1H, m, CH $\alpha$ ), 3.26 (2H, t, J 7 Hz, CH<sub>2</sub>Ar), 2.97 (2H, m, CH<sub>2</sub> $\beta$ ), 2.62 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2.23 (2H, m, CH<sub>2</sub> $\gamma$ ), 1.40 (9H, s, CH<sub>3</sub> tBu); <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) δ : 194.0 (COCH<sub>3</sub>), 173.2 (COOH), 171.3 (COOR), 154.0 (OCONH), 138.2 (C<sub>arom</sub>), 131.5, 122.9 (C<sub>arom</sub>-H), 79.2 (C<sub>q</sub> tBu), 61.8 (CH<sub>2</sub>O), 50.8 (CH $\alpha$ ), 30.5 (CH<sub>2</sub> $\gamma$ ), 28.6, 28.3 (CH<sub>2</sub> $\beta$ , CH<sub>2</sub>Ar), 26.4 (CH<sub>3</sub> tBu), 25.6 (CH<sub>3</sub>CO); IR (film) : 3340, 2980-2800, 1740, 1720, 1695, 1540, 1370, 1160 cm<sup>-1</sup>; MS (CI, NH<sub>3</sub>) m/z : 456 [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>; anal, calc per C<sub>20</sub>H<sub>26</sub>O<sub>9</sub>N<sub>2</sub> (PM 438.44) C : 54.79, H : 5.98, N : 6.39, trobat C : 54.13, H : 5.43, N : 6.67.

#### 2.4 Proves d'estabilitat del grup protector 2-(4-acetil-3-nitrofenil)etil als reactius emprats en la síntesi de pèptids :

L'estabilitat de Boc-Asp(OAnpe)-OH als diferents reactius utilitzats en la síntesi de pèptids s'ha comprovat dissolent el producte en le reactiu corresponent a assajar (DIEA 5% en DCM i TFA 30% en DCM), de manera que la concentració de l'aminoàcid sigui aproximadament 10 mM. En cap cas no s'observa pèrdua del grup Anpe (s'elimina però el grup Boc en el tractament àcid) després de 24 h mitjançant anàlisi per cromatografia en capa fina (sistema A o butanol/aigua/piridina/AcOH 15:15:12:3, respectivament). També s'ha assajat l'estabilitat del grup Anpe al tractament amb HF/anisole 9:1 a 0°C, 1 h. Després d'evaporar l'HF, l'aminoàcid redissolt en aigua no presenta tampoc pèrdua del protector (butanol/aigua/piridina/AcOH 15:15:12:3).

### 3. Obtenció dels derivats de nucleòsid emprats en la síntesi de nucleopèptids :

#### 3.1 Obtenció de 5'-O-dimetoxitritil-2'-desoxiribonucleòsids 3'-O-(2-cianoetil)-N,N-diisopropilfosforamidit (derivats dC<sup>Fmoc</sup> **84a**, dA<sup>Fmoc</sup> **84b**) :

##### a) N-(9-Fluorenilmetoxicarbonil)-2'-desoxiribonucleòsids (derivats **82a**, **82b**) :

S'ha seguit essencialment el procediment descrit<sup>144</sup>:

Els nucleòsids, prèviament coevaporats amb piridina anhidra (x 2), se suspenen en piridina anhidra, i s'hi afegeix lentament TMS-Cl (10 eq). Acabada l'addició es deixa reaccionar durant 15 min. A continuació, s'afegeix a la barreja Fmoc-Cl (1.2 eq) i es deixa reaccionar durant 2 h. S'hidrolitzen els grups sili i l'excés de clorur d'àcid per addició d'aigua/MeOH (1:1). El control per capa fina (sistema C) mostra als 15 min la desaparició del producte siliat. S'eliminen els dissolvents per evaporació.

Pel derivat de desoxicitidina (**82a**), s'afegeix aigua al residu obtingut per evaporació, i se sacseja fins que precipita un sòlid blanc. A continuació s'afegeix un volum idèntic d'AcOEt i se sacseja novament. El producte apareix com a precipitat a l'interfase dels dissolvents. Se separa el sòlid per filtració, es renta amb aigua (x 2) i AcOEt (x 2), i s'asseca finalment en un dessecador. L'anàlisi per capa fina (sistema C) mostra un producte pel que no és necessària cap purificació posterior.

En el cas del derivat de desoxiadenosina (**82b**), es dissol el residu en AcOEt i es renta amb àcid cítric 10% en aigua (x 2), i aigua (x 2). La fase orgànica s'asseca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i s'evapora a sequedat. L'anàlisi per capa fina (sistema C) mostra el producte acompanyat del derivat diacilat dA<sup>(Fmoc)</sup><sub>2</sub> (aprox. 10-15%). El producte es purifica per elució amb DCM/MeOH (95:5) a través d'una columna de gel de sílice. Les fraccions corresponents es junten i s'evaporen, obtenint-se un sòlid blanc.

dC<sup>Fmoc</sup> (**82a**) : Rdt: 75%; Rf (sistema C) : 0.28; pf : 128-130°C; <sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>, 200 MHz) δ : 8.95 (1H, m, NH), 8.38 (1H, d, J 7.4 Hz, H6), 7.94 (2H, d, J 7.0 Hz, Ar), 7.87 (2H, d, J 7.0 Hz, Ar), 7.55-7.30 (4H, m, Ar), 7.04 (1H, d, J 7.4 Hz, Ar), 6.18 (1H, m, H1'), 4.42 (2H, m, CH<sub>2</sub> Fm), 4.37 (3H, m, CH Fm, H3'), 3.95 (1H, m, H4'), 3.66 (2H, m, H5'), 2.33 (1H, m, H2'), 2.05 (1H, m, H2''); <sup>13</sup>C RMN (DMSO-d<sub>6</sub>, 50 MHz) δ : 162.9 (C4), 154.5 (C2), 153.4 (NHCOO), 143.7 (C6), 144.9, 141.0 (C<sub>arom</sub>), 128.0, 127.4, 125.7, 120.3 (C<sub>arom</sub>-H), 94.4 (C5), 88.1 (C4'), 86.4 (C1'), 70.1 (C3'), 67.1 (CH<sub>2</sub> Fm), 61.1 (C5'), 46.4 (CH Fm), 42.0 (C2').

**dA<sup>Fmoc</sup> (82b)** : Rdt: 50%; Rf (sistema C): 0.30 (dA<sup>Fmoc</sup>)<sub>2</sub>: 0.35; pf : 148-150°C; <sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>, 200 MHz) δ : 10.9 (1H, m, NH), 8.67 (1H, s, H8), 8.64 (1H, s, H2), 7.86 (4H, m, Ar), 7.37 (4H, m, Ar Fm), 6.42 (1H, m, H1'), 5.37 (1H, m, HO-3'), 5.05 (1H, m, HO-5'), 4.40 (2H, m, CH<sub>2</sub> Fm), 4.30 (2H, m, CH Fm, H3'), 3.90 (1H, m, H4'), 3.60 (1H, m, H5'), 2.75 (1H, m, H2'), 2.35 (1H, m, H2'); <sup>13</sup>C RMN (DMSO-d<sub>6</sub>, 50 MHz) δ : 153.8 (NHCOO), 152.0 (C4), 151.6 (C8), 150.1 (C2), 149.8 (C6), 143.3, 141.1 (C<sub>arom</sub>), 142.9 (C5), 127.8, 1327.1, 124.9, 120.0 (C<sub>arom</sub>-H), 88.9 (C4'), 86.6 (C1'), 71.9 (C3'), 68.0 (CH<sub>2</sub> Fm), 62.7 (C5'), 46.7 (CH Fm), 41.0 (C2').

**b) 5'-O-Dimetoxitritil-N-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-2'-desoxiribonucleòsids (derivats 83a, 83b) :**

El nucleòsid (82a, 82b) assecat per coevaporació amb piridina anhidra (x 2), es dissol en el mateix dissolvent sota atmosfera inert en un baló protegit de la llum. S'hi afegeix el clorur de dimetoxitritil sòlid (DMT-Cl, 1.5 eq) i es deixa reaccionar durant tota una nit. En acabat, s'hi afegeix MeOH per destruir l'excés de clorur de tritil, i s'evapora a sequedat. El residu es purifica per columna de gel de sílice eluint amb DCM/Et<sub>3</sub>N (99:1) i quantitats creixents de MeOH (0-5%). El producte s'obté per concentració de les fraccions corresponents i posterior precipitació sobre hexà.

**DMT-dC<sup>Fmoc</sup> (83a)** : Rdt : 75%; Rf (sistema C): 0.40; pf : 144-146°C; <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) δ : 8.60 (1H, m, NH), 8.25 (1H, d, J 7.5 Hz, H6), 7.75 (2H, d, J 7.0 Hz, Ar), 7.58 (2H, d, J 7.0 Hz, Ar), 7.45-7.20 (13H, m, Ar, Ar'), 6.90 (1H, d, J 7.5 Hz, H5), 6.82 (4H, d, J 9 Hz, Ar'), 6.30 (1H, m, H1'), 4.45 (2H, m, CH<sub>2</sub> Fm), 4.30-4.10 (2H, m, CH Fm, H3'), 3.76 (6H, s, CH<sub>3</sub>O), 3.45 (3H, m, H4', H5'); <sup>13</sup>C RMN (DMSO-d<sub>6</sub>, 50 MHz) δ : 162.2 (C4), 158.6 (C4, C<sub>arom</sub>), 155.0 (C2), 152.2 (NHCOO), 148.8 (C<sub>arom</sub>), 144.2, 141.2 (C<sub>arom</sub>), 143.8 (C6), 138.2, 135.5 (C<sub>arom</sub>), 130.0, 128.0, 127.9, 127.0, 125.0, 120.0, 113.2 (C<sub>arom</sub>-H), 92.5 (C5), 87.4 (Cq DMT), 86.8, 86.5 (C4', C1'), 71.5 (C3'), 67.4 (CH<sub>2</sub> Fm), 63.5 (C5'), 55.1 (CH<sub>3</sub>O), 46.6 (CH Fm), 42.0 (C2').

**DMT-dA<sup>Fmoc</sup> (83b)** : Rdt: 70%; Rf (sistema C): 0.45; pf : 118-120°C; <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) δ : 9.25 (1H, m, NH), 8.69 (1H, s, H8), 8.13 (1H, s, H2), 7.74 (1H, d, J 7.0 Hz, Ar), 7.62 (1H, d, J 7.0 Hz, Ar), 7.50-7.25 (13H, m, Ar, Ar'), 6.76 (4H, d, J 9.0 Hz, Ar'), 6.48 (1H, m, H1'), 4.72 (1H, m, HO-3'), 4.62 (2H, m, CH<sub>2</sub> Fm), 4.32 (1H, m, CH Fm), 4.22 (1H, m, H3'), 4.10 (1H, m, H4'), 3.73 (6H, s, CH<sub>3</sub>O), 3.40 (2H, m, H5'), 2.82 (1H, m, H2'), 2.58 (1H, m, H2''); <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) δ : 158.5 (C<sub>arom</sub>), 152.6 (C4), 151.2 (C8), 143.4, 144.4, 141.2, 135.5 (C<sub>arom</sub>), 129.9, 128.0, 127.5, 127.1, 124.9, 120.0, 113.1 (C<sub>arom</sub>-H), 86.5 (Cq DMT), 86.3, 84.7 (C4', C1'), 72.2 (C3'), 67.6 (CH<sub>2</sub> Fm), 63.6 (C5'), 56.1 (CH<sub>3</sub>O), 46.8 (CH Fm), 40.2 (C2').

**c) 5'-O-Dimetoxitritil-N-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-2'-desoxiribonucleòsids 3'-O-(2-cianoetil)-N,N-diisopropilfosforamidit (derivats 84a i 84b) :**

Els DMT-nucleòsids (83a i 83b) assecats per coevaporació amb ACN anh (x 3) i dissolts en DCM anh sota una atmosfera inert d'argó, es fan reaccionar amb (2-cianoetoxi)bis(diisopropilamino)fosfina (1.2 eq) i tetrazole (0.5 eq) durant 1 h. Diluïda la dissolució amb DCM neutre, es renta amb NaHCO<sub>3</sub> aq 5% (x 2) i dissolució saturada de NaCl sat, s'asseca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i s'evapora a sequedat. Realitzant una precipitació sobre hexà fred del residu s'obtenen productes suficientment purs tant per anàlisi per capa fina com per <sup>31</sup>P RMN, de manera que no s'ha efectuat una purificació posterior.

**DMT-dC<sup>Fmoc</sup>-3'-P(OCNE)NiPr<sub>2</sub> (84a)** : Rdt: 85%; Rf (sistema G) : 0.60; <sup>31</sup>P RMN (CDCl<sub>3</sub>, 81 MHz) δ : 147.9; <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) δ : 8.60 (1H, m, NH), 8.22, 8.28 (1H, d, d, J 8, 8 Hz, H6), 7.78 (2H, d, J 7 Hz, Ar Fm), 7.60 (2H, d, J 7 Hz, Ar Fm), 7.45-7.25 (13H, m, Ar Fm, Ar DMT), 6.85 (4H, d, J 9 Hz, Ar DMT), 6.30 (1H, m, H1'), 4.62 (2H, m, CH iPr), 4.48 (2H, m, CH<sub>2</sub> Fm), 4.30-4.20 (2H, m, CH Fm, H3'), 3.78 (6H, s, MeO), 3.65-3.30 (5H, m, H4', H5', CH<sub>2</sub>OP), 2.80-2.40 (3H, m, H2', CH<sub>2</sub>CN), 2.28 (1H, m, H2'), 1.30-1.12 (12H, m, CH<sub>3</sub> iPr).

**DMT-dA<sup>Fmoc</sup>-3'-P(OCNE)NiPr<sub>2</sub> (84b)** : Rdt: 80%; Rf (sistema G) : 0.70; <sup>31</sup>P RMN (CDCl<sub>3</sub>, 81 MHz) δ : 148.2; <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) δ : 8.62 (1H, s, H8), 8.18 (1H, s, H2), 7.75 (2H, d, J 7 Hz, Ar Fm), 7.62 (2H, d, J 7 Hz, Ar Fm), 7.40-7.15 (13H, m, Ar Fm, Ar DMT), 6.78 (1H, d, J 9 Hz, Ar DMT), 6.48 (1H, m, H1'), 4.76 (2H, m, CH iPr), 4.62 (2H, d, J 7 Hz, CH<sub>2</sub> Fm), 4.32 (1H, m, CH Fm),

4.15 (1H, m, H3'), 3.76 (6H, s, MeO), 3.70-3.30 (5H, m, H4', H5', CH<sub>2</sub>OP), 2.92 (1H, m, H2'), 2.80-2.60 (3H, m, H2', CH<sub>2</sub>CN), 1.30-1.10 (12H, m, CH<sub>3</sub> iPr).

### 3.2 Obtenció de 3'-O-dimetoxitritil-2'-desoxiribonucleòsids

5'-O-(2-cianoetil)-N,N-diisopropilfosforamidit (derivats: T **89a**, CiBu **89b**, A<sup>Dmf</sup> **89c**) :

#### a) 4-N-Isobutiril-2'-desoxicitidina (**85b**) :

S'ha seguit el procediment descrit<sup>136</sup> introduint-hi certes modificacions. Es parteix de l'hidroclorur de desoxicitidina (5g, 19 mmol), el qual primer es coevapora amb piridina anhidra (x 3) i una vegada redissolt en piridina anh, s'hi afegeix gota a gota clorur de trimetilsilil (24 mL, 190 mmol), i a continuació, clorur d'isobutiril (4.0 mL, 38 mmol). Es deixa reaccionar durant 3 h. La barreja es tracta aleshores amb aigua/MeOH (1:1) durant 1 h. En acabat s'evapora el solvent, i el residu obtingut se suspèn en una barreja aigua/1,2-dicloroetà 1:1 (25 mL) agitant-la vigorosament. El nucleòsid, que és insoluble en les dues fases, se separa per filtració i després d'assecar-lo s'obté com un sòlid blanc (5.7 g, 86%). Rf (sistema C) : 0.25; <sup>1</sup>H RMN (MeOH, 200 MHz) δ : 8.42 (1H, d, J 7 Hz, H6), 7.63 (1H, d, J 7 Hz, H5), 6.27 (1H, m, H1'), 4.40 (1H, m, H3'), 3.97 (1H, m, H4'), 3.65 (2H, m, H5'), 2.78 (2H, m, CH iBu), 2.19 (1H, m, H2'), 1.25 (6H, d, J 7 Hz, CH<sub>3</sub> iBu).

#### b) 6-N-(N,N-Dimetilaminometilen)-2'-desoxiadenosina (**85c**) :

S'ha seguit essencialment el procediment que es troba descrit<sup>141</sup>. Es parteix del monohidrat de 2'-desoxiadenosina (5g, 19 mmol), que s'asseca per coevaporació amb piridina anh (x 2). A continuació es dissol en MeOH (10 mL, assecat sobre tamís molecular de 3 Å), i s'hi afegeix el dimetilacetal de la dimetilformamida (5.0 mL, 38 mmol). Es manté la reacció sota atmosfera inert durant 5 h, i en acabat s'evapora el solvent. S'obté el nucleòsid com a sòlid blanc, que no es purifica (5.1 g, 90%). Rf (sistema C) : 0.20; pf : 188-190°C (Lit <sup>141a</sup> 192-196°C); <sup>1</sup>H RMN (CD<sub>3</sub>OD, 200 MHz) δ : 8.94 (1H, s, CH Dmf), 8.42 (1H, s, H8), 8.03 (2H, s, H2), 6.28 (1H, t, H1'), 4.63 (1H, m, H3'), 4.13 (1H, m, H4'), 3.82 (2H, m, H5'), 2.90-2.80 (1H, m, H2'), 3.21, 3.18 (6H, s, s, CH<sub>3</sub> Dmf).

#### c) 5'-O-*t*-Butildimetilsilil-2'-desoxiribonucleòsids (**86a**, **86b**, **86c**) :

Es parteix del nucleòsid corresponent (T, dA<sup>Dmf</sup> **85b** o dCiBu **85c**), el qual s'asseca per coevaporació amb piridina anh (x 2). Es dissol sota atmosfera inert en piridina anh, i s'hi afegeix gota a gota una dissolució del clorur de *t*-butildimetilsilil en piridina anhidra (TBDMS-Cl, 1.5 eq). Es deixa reaccionar al llarg d'una nit. En acabat, s'hi afegeix MeOH per a destruir l'excés de clorur de silil, i s'evapora el solvent. El residu es purifica directament a través de columna de gel de sílice, eluint amb DCM i quantitats creixents de MeOH (0 a 10%). El producte s'obté per evaporació directa de les fraccions corresponents.

5'-TBDMS-T (**86a**) : sòlid groguenc. Rdt : 80% ; Rf (sistema C): 0.40; pf : 166-168°C; <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) δ : 9.20 (1H, m, NH-3), 7.53 (1H, s, H6), 6.38 (1H, m, H1'), 4.42 (1H, m, H3'), 4.08 (1H, m, H4'), 3.87 (2H, m, H5'), 2.40, 2.10 (2H, m, H2'), 1.92 (3H, s, CH<sub>3</sub>-5), 0.92 (9H, s, CH<sub>3</sub> tBu), 0.11 (6H, s, CH<sub>3</sub>Si); <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) δ : 163.8 (C4), 150.7 (C2), 135.4 (C<sub>arom</sub>, C6), 110.9 (C5), 87.3, 85.0 (C4', C1'), 72.6 (C3'), 63.6 (C5'), 41.1 (C2'), 25.9 (CH<sub>3</sub> tBu), 16.3 (CqSi), 12.5 (CH<sub>3</sub>-5), -5.5, -5.9, (CH<sub>3</sub>Si).

5'-TBDMS-dC <sup>i</sup>Bu (**86b**) : sòlid blanc. Rdt : 75%; Rf (sistema C): 0.45; pf : 74-76°C; <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) δ : 9.06 (1H, m, NH-3), 8.39 (1H, d, J 7.5 Hz, H6), 7.57 (1H, d, J 7.5 Hz, H5), 6.40 (1H, m, H1'), 4.47 (1H, m, H3'), 4.15 (1H, m, H4'), 3.90 (2H, m, H5'), 2.73, (2H, m, H2', CH iBu), 2.14 (1H, m, H2'), 1.23 (6H, d, J 6.8 Hz, CH<sub>3</sub> iBu), 0.88 (9H, s, CH<sub>3</sub> tBu), 0.11, 0.09 (6H, s, s, CH<sub>3</sub>Si); <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) δ : 178.0 (CO iBu), 162.4 (C4), 156.0 (C2), 144.8 (C<sub>arom</sub>, C6), 96.6 (C5), 87.8, 87.3 (C4', C1'), 71.5 (C3'), 62.9 (C5'), 42.4 (C2'), 25.8 (CH<sub>3</sub> tBu), 36.5 (CH iBu), 19.0 (CH<sub>3</sub> iBu), -5.5, -5.6 (CH<sub>3</sub>Si).

5'-TBDMS-dA<sup>Dmf</sup> (**86c**) : sòlid blanc higroscòpic. Rdt : 85% ; Rf (sistema C): 0.30; <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) δ : 8.94 (1H, s, CH Dmf), 8.53 (1H, s, H8), 8.19 (1H, s, H2), 6.55 (1H, m, H1'), 4.60 (1H, m, H3'), 4.11 (1H, m, H4'), 3.85 (2H, m, H5'), 3.25, 3.20 (6H, s, s, CH<sub>3</sub> Dmf), 2.80-2.50 (2H, m,

H2'), 0.89 (9H, s, CH<sub>3</sub> tBu), 0.08 (6H, s, CH<sub>3</sub>Si); <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) δ : 159.0 (CH Dmf), 158.2 (C8), 152.5 (C6), 139.9 (C2), 87.0, 84.1 (C4', C1'), 72.3 (C3'), 63.6 (C5'), 41.3, 41.2 (CH<sub>3</sub> Dmf), 35.2 (C2'), 25.9 (CH<sub>3</sub> tBu), 17.4 (CqSi), -5.5, -5.4 (CH<sub>3</sub>Si).

**d) 5'-O-*t*-Butildimetilsilil-3'-O-dimetoxitritil-2'-desoxiribonucleòsids (87a, 87b, 87c) :**

S'ha seguit el mateix procediment que ha estat emprat per a l'obtenció dels derivats DMT-dN<sup>Fmoc</sup> (vegeu l'apartat 3.1.b d'aquesta Secció), partint en aquest cas dels nucleòsids **86a-c**.

**5'-TBDMS-T-3'-DMT (87a)** : sòlid groc. Rdt : 60%; Rf (sistema C): 0.75; pf : 96-98°C; <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) δ : 8.80 (1H, m, NH-3), 7.60-7.25, (10H, m, Ar DMT, H6), 6.92 (4H, d, J 9 Hz, Ar DMT), 6.50 (1H, m, H1'), 4.56 (1H, m, H3'), 4.15 (1H, m, H4'), 3.80, 3.38 (2H, m, H5'), 3.90 (6H, s, CH<sub>3</sub>O), 2.20, 1.80 (2H, m, H2'), 2.06 (3H, s, CH<sub>3</sub>-5), 0.90 (9H, s, CH<sub>3</sub> tBu), 0.10, 0.05 (6H, s, s, CH<sub>3</sub>Si); <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) δ : 163.7 (C4), 158.6 (C<sub>arom</sub>), 150.3 (C2), 145.0 (C<sub>arom</sub>), 136.4, 135.4 (C<sub>arom</sub>, C6), 130.2, 130.1, 128.2, 127.9, 127.0, 113.2 (C<sub>arom</sub>-H), 110.8 (C5), 87.2 (Cq DMT), 86.6, 84.8 (C4', C1'), 74.9 (C3'), 63.5 (C5'), 55.2 (CH<sub>3</sub>O), 39.9 (C2'), 25.7 (CH<sub>3</sub> tBu), 19.0 (CqSi), 12.4 (CH<sub>3</sub>-5), -5.5, -5.8 (CH<sub>3</sub>Si).

**5'-TBDMS-dC<sup>i</sup>Bu-3'-DMT (87b)** : sòlid blanc. Rdt : 60%; Rf (sistema C): 0.70; pf : 110-112°C; <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) δ : 8.58 (1H, m, NH-3), 8.30 (1H, d, J 8 Hz, H6), 7.60-7.35 (10H, m, Ar DMT, H5), 6.92 (4H, d, J 8.5 Hz, Ar DMT), 6.57 (1H, m, H1'), 4.35 (1H, m, H3'), 4.12 (1H, m, H4'), 3.70, 3.20 (2H, m, H2'), 3.90 (6H, s, CH<sub>3</sub>O), 2.46, 1.74 (2H, m, H2'), 2.73 (1H, m, CH iBu), 1.32 (6H, d, J 7 Hz, CH<sub>3</sub> iBu), 0.88 (9H, s, CH<sub>3</sub> tBu), 0.11, 0.05 (6H, s, s, CH<sub>3</sub>Si); <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) δ : 176.8 (CO iBu), 161.9 (C4), 158.7 (C<sub>arom</sub>), 155.2 (C2), 145.1, 144.8 (C<sub>arom</sub>, C6), 136.3 (C<sub>arom</sub>), 130.2, 130.1, 128.3, 128.0, 127.0, 113.2 (C<sub>arom</sub>-H), 96.1 (C5), 87.2 (Cq DMT), 87.5, 87.4 (C4', C1'), 75.1 (C3'), 63.4 (C5'), 55.2 (CH<sub>3</sub>O), 41.8 (C2'), 25.7 (CH<sub>3</sub> tBu), 36.7 (CH iBu), 18.9 (CH<sub>3</sub> iBu), -5.5, -5.8 (CH<sub>3</sub>Si).

**5'-TBDMS-dA<sup>Dmf</sup>-3'-DMT (87c)** : sòlid groguenc. Rdt : 40%; Rf (sistema C): 0.50; pf : 80-82°C; <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) δ : 9.02 (1H, s, CH Dmf), 8.63 (1H, s, H8), 8.18 (1H, s, H2), 7.60-7.30 (9H, m, Ar DMT), 6.04 (4H, d, J 8.3 Hz, Ar DMT), 6.68 (1H, m, H1'), 4.50 (1H, m, H3'), 4.16 (1H, m, H4'), 3.75, 3.40 (2H, m, H5'), 3.87 (3H, s, CH<sub>3</sub>O), 2.65, 2.10 (2H, m, H2'), 3.33, 3.29 (6H, s, s, CH<sub>3</sub> Dmf), 0.88 (9H, s, CH<sub>3</sub> tBu), 0.08 (6H, s, CH<sub>3</sub>Si); <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) δ : 159.2 (CH Dmf), 157.9 (C8), 152.4 (C6), 145.1 (C<sub>arom</sub>), 139.4 (C2), 136.3 (C<sub>arom</sub>), 130.2, 130.1, 128.2, 127.8, 126.9, 113.2 (C<sub>arom</sub>-H), 87.3 (Cq DMT), 86.8, 84.0 (C4', C1'), 74.9 (C3'), 63.5 (C5'), 55.1 (CH<sub>3</sub>O), 41.4, 40.6 (CH<sub>3</sub> Dmf), 35.1 (C2'), 25.8 (CH<sub>3</sub> tBu), 18.2 (CqSi), -5.5, -5.8 (CH<sub>3</sub>Si).

**e) 3'-O-Dimetoxitritil-2'-desoxiribonucleòsids (88a, 88b, 88c) :**

El corresponent nucleòsid (**87a**, **87b** o **87c**) s'asseca per coevaporació amb ACN anh (x 2). Sota atmosfera inert d'argó es dissol en THF anh, i tot seguit s'hi afegeix TBAF·3H<sub>2</sub>O sòlid (1.5 eq respecte nucleòsid). Es deixa reaccionar al llarg de 2 h, al final de les quals s'hi afegeix MeOH per neutralitzar l'excés de fluorur. El residu, un cop evaporat a sequedat, es purifica sobre columna de gel de sílice eluint amb barreges de DCM/Et<sub>3</sub>N (99:1) i quantitats creixents de MeOH (0 a 5%). El producte purificat, obtingut per evaporació de les fraccions de columna corresponents, es precipita finalment sobre hexà/èter.

**T-3'-DMT (88a)** : sòlid groc. Rdt : 75%; Rf (sistema C): 0.50, (sistema G): 0.45; pf : 116-118°C; <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) δ : 7.50-7.25 (9H, m, Ar DMT), 6.84 (4H, d, J 9 Hz, Ar DMT), 6.15 (1H, m, H1'), 4.38 (1H, m, H3'), 3.97 (1H, m, H4'), 3.65, 3.30 (2H, m, H5'), 3.80 (CH<sub>3</sub>O), 2.16 (1H, m, H2'), 1.85 (CH<sub>3</sub>-5); <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) δ : 163.6 (C4), 158.7 (C<sub>arom</sub>), 150.2 (C2), 145.0 (C<sub>arom</sub>), 137.2, 136.3 (C<sub>arom</sub>, C6), 130.2, 128.2, 128.0, 127.8, 113.2 (C<sub>arom</sub>-H), 110.9 (C5), 86.6 (Cq), 87.5, 87.2 (C4', C1'), 74.2 (C3'), 62.6 (C5'), 55.2 (CH<sub>3</sub>O), 38.6 (C2'), 12.4 (CH<sub>3</sub>-5).

**dC<sup>i</sup>Bu-3'-DMT (88b)** : sòlid groguenc. Rdt : 50%; Rf (sistema C): 0.50, (sistema G): 0.40; pf : 143-145°C; <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) δ : 8.78 (1H, m, NH-3), 8.07 (1H, d, J 7 Hz, H6), 7.50-7.15 (10H, m, Ar DMT, H5), 6.81 (4H, d, J 8.8 Hz, Ar DMT), 6.20 (1H, m, H1'), 4.36 (1H, m, H3'), 3.90 (1H, m, H4'), 3.65, 3.20 (2H, m, H5'), 3.76 (6H, s, CH<sub>3</sub>O), 2.22, 1.85 (2H, m, H2'), 2.62 (1H, m, CH iBu), 1.18 (6H, d, J 6.7 Hz, CH<sub>3</sub> iBu); <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) δ : 178.3 (CO iBu), 162.3 (C4), 158.7 (C<sub>arom</sub>), 155.4 (C2), 145.9, 145.1 (C<sub>arom</sub>, C6), 136.3 (C<sub>arom</sub>), 130.2, 128.3, 128.0, 127.1, 113.3 (C<sub>arom</sub>-H), 96.6

(C5), 87.2 (Cq), 89.4, 87.4 (C4', C1'), 74.3 (C3'), 62.3 (C5'), 55.2 (CH<sub>3</sub>O), 40.2 (C2'), 36.6 (CH iBu), 19.0 (CH<sub>3</sub> iBu).

*dA<sup>Dmf</sup>-3'-DMT (88c)* : sòlid blanc. Rdt : 50%; Rf (sistema C): 0.45, (sistema G): 0.10; pf : 122-124°C; <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) δ : 8.92 (1H, s, CH Dmf), 8.42 (1H, s, H8), 7.90 (1H, s, H2), 7.50-7.20 (9H, m, Ar DMT), 6.84 (4H, d, J 8.8 Hz, Ar DMT), 6.30 (1H, m, H1'), 4.63 (1H, m, H3'), 4.00 (1H, m, H4'), 3.78 (6H, s, CH<sub>3</sub>O), 2.80, 1.80 (2H, m, H2'), 3.24, 3.18 (6H, s, s, CH<sub>3</sub> Dmf); <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) δ : 159.6 (CH Dmf), 158.2, 158.7 (C2, C<sub>arom</sub>), 151.7 (C6), 145.2 (C<sub>arom</sub>), 141.4 (C2), 136.4 (C<sub>arom</sub>), 130.2, 128.2, 128.0, 127.0, 113.3 (C<sub>arom</sub>-H), 88.8, 88.2 (C4', C1'), 87.3 (Cq), 75.7 (C3'), 63.3 (C5'), 55.2 (CH<sub>3</sub>O), 41.4, 39.6 (CH<sub>3</sub> Dmf), 35.2 (C2').

**f) 3'-O-Dimetoxitritil-2'-desoxiribonucleòsids**

**5'-O-(2-cianoetil)-N,N-diisopropilfosforamidit (89a, 89b, 89c) :**

Se segueix el mateix procediment ja esmentat per a la fosfilitació d'altres derivats (aquesta Secció, apartat 3.1.c) amb l'agent fosfilitant (2-cianoetoxi)bis(N,N-diisopropilamino)fosfina (1.2 eq) en presència de tetrazole sòlid (0.5 eq) durant 1 h. El residu obtingut després dels rentats de la fase orgànica amb dissolucions aquoses de NaHCO<sub>3</sub> 5%, assecat sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i evaporació a sequedat, es purifica a través d'una columna de gel de sílice per elució amb hexà/DCM/piridina (derivats C<sup>iBu</sup> 89b, T 89a : 50:50:5; derivat A<sup>Dmf</sup> 89c : gradient de 50:50:5 a 25:75:5). El producte, recuperat per evaporació de les fraccions corresponents, es precipita sobre hexà fred (-20°C) i s'asseca en un dessecador al buit durant tota una nit.

*5'-iPr<sub>2</sub>N(CNEO)P-T-3'-DMT (89a)* : sòlid groc. Rdt : 60%; Rf (sistema G): 0.50; <sup>31</sup>P RMN (CDCl<sub>3</sub>, 81 MHz) δ : 148.6, 147.9; <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) δ : 8.82 (NH-3), 7.50-7.30 (10H, m, Ar DMT, H6), 6.85, 6.84 (4H, d, d, J 8.5 Hz, Ar DMT), 6.40 (1H, m, H1'), 4.28 (1H, m, H3'), 3.95 (1H, m, H4'), 3.79 (6H, s, CH<sub>3</sub>O), 3.70-3.30 (5H, m, H5', CH iPr, CH<sub>2</sub>OP), 2.56, 2.46 (2H, m, CH<sub>2</sub>CN), 1.88 (3H, s, CH<sub>3</sub>-5), 1.20-1.10 (12H, m, CH<sub>3</sub> iPr); <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) δ : 163.7 (C4), 158.7 (C<sub>arom</sub>), 150.3 (C2), 145.0 (C<sub>arom</sub>), 136.4, 136.2 (C6, C<sub>arom</sub>), 130.2, 128.3, 128.0, 127.1, 113.5 (C<sub>arom</sub>-H), 117.5 (CN), 110.6 (C5), 87.2 (Cq), 86.7, 85.0 (C4', C1'), 74.9, 74.6 (C3'), 64.5, 63.0 (C5'), 58.4 (CH<sub>2</sub>OP), 55.7 (CH<sub>3</sub>O), 43.1, 42.8 (CH iPr), 39.9, 39.6 (C2'), 20.4, 20.2 (CH<sub>2</sub>CN), 24.7, 24.5 (CH<sub>3</sub> iPr), 12.5, 12.4 (CH<sub>3</sub>-5).

*5'-iPr<sub>2</sub>N(CNEO)P-dC<sup>iBu</sup>-3'-DMT (89b)* : sòlid blanc. Rdt : 50%; Rf (sistema G): 0.45; <sup>31</sup>P RMN (CDCl<sub>3</sub>, 81 MHz) δ : 147.9, 147.5; <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) δ : 8.68 (1H, m, NH-3), 8.02 (1H, d, 7 Hz, H6), 7.50-7.20 (10H, m, Ar DMT, H5), 6.40 (1H, m, H1'), 4.37 (1H, m, H3'), 3.92 (1H, m, H4'), 3.78 (6H, s, CH<sub>3</sub>O), 3.65-3.10 (5H, m, H5', CH iPr, CH<sub>2</sub>OP), 2.80-2.30 (3H, m, CH iBu, CH<sub>2</sub>CN), 1.80-1.50 (2H, m, H2'), 1.30-0.95 (12H, m, CH<sub>3</sub> iBu, CH<sub>3</sub> iPr); <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) δ : 177.2 (CO iBu), 162.2 (C4), 158.7 (C<sub>arom</sub>), 155.1 (C2), 145.4, 145.2 (C<sub>arom</sub>, C6), 136.3, 136.1 (C<sub>arom</sub>), 130.2, 128.3, 128.2, 127.1, 113.5 (C<sub>arom</sub>-H), 117.6 (CN), 96.2, 96.1 (C5), 86.8, 87.3, 86.4 (Cq, C4', C1'), 75.3, 74.5 (C3'), 64.0, 63.9 (C5'), 58.3, 57.9 (CH<sub>2</sub>OP), 55.2 (CH<sub>3</sub>O), 43.1, 42.9 (CH iPr), 41.6, 40.9 (C2'), 36.6 (CH iBu), 24.7, 24.5 (CH<sub>3</sub> iPr), 20.3, 20.1 (CH<sub>2</sub>CN), 19.1, 18.9 (CH<sub>3</sub> iBu).

*5'-iPr<sub>2</sub>N(CNEO)P-dA<sup>Dmf</sup>-3'-DMT (89c)* : sòlid blanc. Rdt : 30%; Rf (sistema G): 0.20; <sup>31</sup>P RMN (CDCl<sub>3</sub>, 81 MHz) δ : 148.5, 148.0; <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) δ : 8.94, 8.92 (1H, ss, CH Dmf), 8.55, 8.54 (1H, s, s, H8), 8.20, 8.13 (1H, s, s, H2), 7.50-7.20 (9H, m, Ar DMT), 6.86 (4H, d, J 8 Hz, Ar DMT), 6.57 (1H, m, H1'), 4.44 (1H, m, H3'), 4.08 (1H, m, H4'), 3.77 (6H, s, CH<sub>3</sub>O), 3.70-3.40 (5H, m, H5', CH iPr, CH<sub>2</sub>OP), 3.23, 3.17 (6H, s, s, CH<sub>3</sub> Dmf), 2.65-2.00 (4H, m, H2', CH<sub>2</sub>CN), 1.15-0.95 (6H, m, CH<sub>3</sub> iPr); <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) δ : 159.7 (CH Dmf), 158.6, 158.0 (C2, C<sub>arom</sub>), 152.4 (C6), 145.6 (C<sub>arom</sub>), 139.3 (C8), 136.1 (C<sub>arom</sub>), 130.1, 128.1, 127.9, 127.0 (C<sub>arom</sub>-H), 117.6 (CN), 87.2, 87.1 (Cq), 85.9, 85.8, 84.2, 84.0 (C4', C1'), 75.2, 74.5 (C3'), 63.9, 63.5, 63.2, 62.9 (C5'), 58.5, 58.0 (CH<sub>2</sub>OP), 55.1 (CH<sub>3</sub>O), 41.1, 40.1 (CH<sub>3</sub> Dmf), 35.0 (C2'), 24.5, 24.3 (CH<sub>3</sub> iPr), 20.2, 20.0 (CH<sub>2</sub>CN).



**4. Obtenció de derivats 3'-N,N-dialquil-H-fosfonamidat de 5'-O-dimetoxitritilimidina. Avaluació dels derivats 3'-N,N-dialquil-H-fosfonamidat com a intermedis en la síntesi d'oligonucleòtids :**

**4.1 Obtenció de clorobis(dialquilamino)fosfines**

**Cl-P(NR<sub>2</sub>)<sub>2</sub> (NR<sub>2</sub> : pirrolidino **90a**, dietilamino **90b**, dimetilamino **90c**) :**

Dos mètodes han estat utilitzats, essent tots dos adaptacions de procediments descrits :

**a) Mètode A<sup>255a</sup>.**

Sobre una dissolució de PCl<sub>3</sub> en èter anhidre, refredada amb un bany de gel i sota una atmosfera inert d'argó, s'afegeix lentament el corresponent derivat Me<sub>3</sub>SiNR<sub>2</sub> (2eq; NR<sub>2</sub>: pirrolidino o dimetilamino). Acabada l'addició es deixa reaccionar al llarg de 2 h. Llavors s'eliminen els residus insolubles per filtració sota atmosfera inert i la corresponent solució es concentra a sequedat. Les fosfines així obtingudes no requereixen una posterior purificació.

**90a (NR<sub>2</sub>: pirrolidino)** : oli groc; Rdt : 80%; <sup>31</sup>P RMN (CDCl<sub>3</sub>, 121 MHz) δ : 161.2 (Lit<sup>255a</sup> δ : 163.0); <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) δ : 3.26 (4H, m, CH<sub>2</sub>N), 1.78 (4H, m, CH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) δ : 49.2 (CH<sub>2</sub>N, d, <sup>2</sup>J<sub>CP</sub> 18 Hz), 26.5 (CH<sub>2</sub>, d, <sup>3</sup>J<sub>CP</sub> 6 Hz).

**90c (NR<sub>2</sub>: dimetilamino)** : oli groguenc; Rdt : 75%; <sup>31</sup>P RMN (CDCl<sub>3</sub>, 121 MHz) δ : 159.2; <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) δ : 2.74 (d, <sup>3</sup>J<sub>HP</sub> 12 Hz); <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) δ : 38.9 (d, <sup>2</sup>J<sub>CP</sub> 16 Hz).

**b) Mètode B<sup>256b</sup>.**

Sobre una dissolució de PCl<sub>3</sub> en èter anhidre, refredada amb un bany a -20°C i sota una atmosfera inert d'argó, s'hi afegeix molt lentament la corresponent amina R<sub>2</sub>NH (4.2 eq, NR<sub>2</sub>: dietilamino). Acabada l'addició es manté la reacció durant 2 h deixant que la temperatura arribi a ser l'ambiental. Les sals formades s'eliminen aleshores per filtració sota atmosfera inert i la solució resultant es concentra a sequedat. El producte obtingut no requereix de purificació.

**90b (NR<sub>2</sub>: dietilamino)** : oli groguenc; Rdt : 55%; <sup>31</sup>P RMN (CDCl<sub>3</sub>, 121 MHz) δ : 160.9 (Lit<sup>256b</sup> δ : 159.2); <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) δ : 3.16 (4H, m, CH<sub>2</sub>), 1.14 (6H, t, J 6 Hz, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) δ : 41.2 (CH<sub>2</sub>, d, <sup>2</sup>J<sub>CP</sub> 17 Hz), 13.8 (CH<sub>3</sub>, d, <sup>3</sup>J<sub>CP</sub> 6 Hz).

**4.2 Obtenció de 5'-O-dimetoxitritil-timidina 3'-N,N-dialquil-H-fosfonamidat DMT-T-PO(H)NR<sub>2</sub> (NR<sub>2</sub> : pirrolidino **91a**, NR<sub>2</sub> : dietilamino **91b**)**

A una dissolució de DMT-T en DCM anh i sota una atmosfera inert d'argó, s'afegeixen DIEA anh (1.5 eq) i a continuació la corresponent clorofosfina **90** (1.2 eq; NR<sub>2</sub>: pirrolidino, dietilamino o dimetilamino). Al cap de 0.5 h es refreda la dissolució amb un bany de gel i s'hi afegeix una dissolució aquosa de tetrazole (1 M, 0.8 eq). Només 10 min després es dilueix amb DCM i la corresponent solució es renta amb NaHCO<sub>3</sub> aq 5% (x 2) i NaCl sat. Seguidament s'asseca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i s'evapora fins a sequedat. El residu que s'obté es purifica eluint-lo a través d'una columna de gel de sílice amb barreges hexà/DCM/Et<sub>3</sub>N (pirrolidino 10:90:5, dietilamino 0:100:5, dimetilamino 25:75:5). S'evaporen les corresponents fraccions i el residu obtingut, dissolt en DCM, es precipita dissolt en DCM sobre hexà refredat a -20°C. Els productes recuperats per centrifugació s'assequen en un dessecador al buit de bomba.

**91a (NR<sub>2</sub>: pirrolidino)** : sòlid groc; Rdt : 50%; Rf (sistema B) : 0.55; <sup>31</sup>P RMN (CDCl<sub>3</sub>, 121 MHz) δ : 15.4, 15.1; <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) δ : 9.05 (1H, m, NH-3), 6.89 (1H, d, J<sub>PH</sub> 634 Hz, H-P), 7.58, 7.54 (1H, s, s, H6), 7.40-7.20 (9H, m, Ar DMT), 6.81 (4H, d, J 9Hz, Ar DMT), 6.44 (1H, m, H1'), 5.15 (1H, m, H3'), 4.22 (1H, m, H4'), 3.79 (6H, s, CH<sub>3</sub>O), 3.70-3.30 (2H, m, H5'), 3.20-3.00 (2H, m, CH<sub>2</sub>N), 2.70-2.35 (2H, m, H2'), 1.90-1.75 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 1.45-1.40 (3H, s, s, CH<sub>3</sub>-5); <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) δ : 163.8 (C4), 158.8 (C<sub>arom</sub>), 150.4 (C2), 144.1 (C<sub>arom</sub>), 135.3, 135.1 (C<sub>arom</sub>, C6), 130.1, 128.1, 128.0, 127.2, 113.3 (C<sub>arom</sub>-H), 111.5 (C5), 87.2 (Cq), 84.9, 84.8, 84.4 (C4', C1'), 74.7 (C3'), 63.2, 63.1 (C5'), 55.3 (CH<sub>3</sub>O), 45.4 (CH<sub>2</sub>N), 39.5 (C2'), 26.2 (CH<sub>2</sub>), 11.7 (CH<sub>3</sub>-5).

**91b** (NR<sub>2</sub>: dietilamino): sòlid blanc; Rdt: 40%; Rf (sistema B): 0.50; <sup>31</sup>P RMN (CDCl<sub>3</sub>, 121 MHz) δ: 16.6, 16.4; <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) δ: 6.82 (1H, d, J<sub>PH</sub> 640 Hz, H-P), 7.64, 7.63 (1H, s, s, H6), 7.40-7.20 (9H, m, Ar DMT), 6.83 (4H, d, J 9 Hz, Ar DMT), 6.47 (1H, m, H1'), 5.08 (1H, m, H3'), 4.25 (1H, m, H4'), 3.79 (6H, s, CH<sub>3</sub>O), 3.62-3.30 (2H, m, H5'), 3.12-2.85 (2H, m, CH<sub>2</sub> Et), 2.60-2.20 (2H, m, H2'), 1.40, 1.36 (3H, s, s, CH<sub>3</sub>-5), 1.15-1.00 (3H, m, CH<sub>3</sub> Et); <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz) δ: 163.5 (C4), 158.8 (C<sub>arom</sub>), 150.3 (C2), 144.1 (C<sub>arom</sub>), 135.4, 135.0 (C<sub>arom</sub>, C6), 130.1, 128.1, 128.0, 127.3, 113.3 (C<sub>arom</sub>-H), 112.5 (C5), 85.0, 84.4 (C4', C1'), 74.5 (C3'), 63.2 (C5'), 55.3 (CH<sub>3</sub>O), 39.5 (C2'), 37.9 (CH<sub>2</sub> Et), 14.3 (CH<sub>3</sub> Et), 11.7 (CH<sub>3</sub>-5).

(DMT-T-O)<sub>2</sub>PN(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>: s'obté en lloc del corresponent N,N-dimetil-H-fosfonamidat desitjat: sòlid blanc; Rdt: 30%; Rf (sistema B): 0.50; <sup>31</sup>P RMN (CDCl<sub>3</sub>, 121 MHz) δ: 141.0; <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz) δ: 7.60 (1H, s, H6), 7.40-7.20 (9H, m, Ar DMT), 6.85 (4H, d, J 9 Hz, Ar DMT), 4.95 (1H, m, H3'), 4.13 (1H, m, H4'), 3.80 (6H, s, CH<sub>3</sub>O), 3.50-3.30 (5H, m, CH<sub>3</sub>N, H5'), 2.60-2.20 (2H, m, H2'), 1.46 (3H, s, CH<sub>3</sub>-5).

#### 4.3 Assajos d'acoblament sobre T-suc-CPG dels nucleòsids H-fosfonamidat DMT-T-PO(H)NR<sub>2</sub> (NR<sub>2</sub>: pirrolidino **91a** i dietilamino **91b**):

S'han preparat solucions dels nucleòsids H-fosfonamidat **91a** i **91b** 0.1 M en ACN/DCM anh (9:1) i 0.4 M dels catalitzadors, en ACN anh per a tetrazole i en THF anh per a oNPT. Les proves s'han dut a terme sobre 0.2 μmol de DMT-T-suc-LCAA-CPG (d'origen comercial). A l'etapa d'acoblament s'han afegit conjuntament al reactor 125 μL de solució de H-fosfonamidat i 125 μL de la de catalitzador. Acabat el temps de reacció per a aquesta etapa, no s'ha efectuat l'acetilació, de forma que en cada cicle es disposés del mateix nombre de grups hidroxil capaços de reaccionar. Tampoc no s'ha realitzat l'oxidació ja que no es necessària en formar-se un enllaç estable tipus H-fosfonat diester. Els resultats obtinguts s'exposen a la Taula 3.8 (vegeu Cap. 3, apartat 4.2) com a rendiments parcials d'acoblament respecte a la substitució inicial de resina, i que s'han determinat per comparació de l'absorció a l'UV de les solucions provinents de l'etapa d'eliminació del grup protector DMT.

### 5. Obtenció dels nucleòsids i oligonucleòtids emprats com a patrons.:

#### 5.1 Obtenció dels derivats fosfat dels nucleòsids timidina i 5'-O-dimetoxitritilimidina:

##### a) Isòmers 3' i 5' del fosfat d'O-dimetoxitritilimidinil: p<sup>5</sup>T-DMT (**92a**) i DMT-T<sup>3</sup>p (**92b**):

En un reactor de vidre, prèviament assecat a 110°C, provist de filtre i clau, i sota atmosfera inert d'argó es prepara l'agent fosforilant de triazolur de fosforil<sup>259</sup>. Es parteix de POCl<sub>3</sub> (2 eq respecte nucleòsid; assecat prèviament sobre Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> neutra) dissolt en DCM anh, al que s'afegeixen DIEA (7 eq) i triazole (6 eq). S'agita manualment i al cap de 15 min, es transfereix per pressió d'argó sobre una dissolució de DMT-T (isòmer 5' o 3', 100-200 mg; aquest darrer preparat segons l'apartat 18.5) en DCM anh, i refredada en un bany de gel. Al cap de 30 min, s'hi afegeix NaHCO<sub>3</sub> aq 5% per a destruir l'excés d'agent fosforilant. Diluïda la dissolució amb més DCM, es renta amb NaHCO<sub>3</sub> aq 5% (x 2) i NaCl sat, s'asseca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i s'evapora a sequedat. El producte, dissolt en DCM, es precipita sobre hexà (Rdt: 50-55%).

HPLC (sistema FR-B, gradient lineal 20-100% B en 20 min, 260 nm): isòmer 5' (**92a**): t<sub>R</sub> 8.3 min; isòmer 3' (**92b**): t<sub>R</sub> 8.3 min (coelueixen per coinjecció).

##### b) Fosfat d'O-5'-timidinil: p<sup>5</sup>T (**93a**):

Es tracta el corresponent derivat **92a** amb HAcO aq 80% durant 1 h a temperatura ambient. En acabat es neutralitza la solució amb Et<sub>3</sub>N i es renta amb èter (x 3) per a extreure els productes d'eliminació del protector. S'obté el fosfat com a sòlid per liofilització de la solució (Rdt: 65%). HPLC (sistema FR-C, isocràtic 5% B 10 min, gradient 5-25% B 10 min, 260 nm) t<sub>R</sub>: 6.0 min.

## 5.2 Obtenció dels derivats H-fosfonat dels nucleòsids timidina i 5'-O-dimetoxitritiltimidina :

### a) Isòmers 5' i 3' de l'H-fosfonat d'O-2-cianoetil i O-dimetoxitritiltimidinil : 5'-CNEO(H)PO-T-DMT (94a) i DMT-T-3'-PO(H)OCNE (94b) i :

El corresponent DMT-T-fosforamidit (isòmer 3' d'origen comercial, isòmer 5' obtingut segons l'apartat 3.2 d'aquesta secció) es dissol en una barreja d'aigua/ACN (1:1), i a continuació s'hi afegeix tetrazole sòlid (2 eq respecte nucleòsid). Es deixa reaccionar durant 1 h. En acabat es dilueix amb DCM i es renta amb NaHCO<sub>3</sub> aq 5% (x 2) i dissolució saturada de NaCl. S'asseca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i s'evapora a sequedat. El residu, dissolt en DCM, es precipita sobre hexà fred, obtenint-se els corresponents H-fosfonat diesters com a sòlids blancs (Rdt : 75-80%). HPLC (sistema FR-B, gradient lineal 20-100% B en 20 min, 260 nm) : isòmer 5' (94a) : t<sub>R</sub> 13.6 min; isòmer 3' (94b) : t<sub>R</sub> 13.8 min;

### b) Isòmers 5' i 3' de l'H-fosfonat d'O-dimetoxitritiltimidinil : 5'-NH<sub>4</sub>O(H)PO-T-DMT (95a) i DMT-T-3'-PO(H)ONH<sub>4</sub> (95b) :

Es tracta el corresponent H-fosfonat diester 94 amb NH<sub>3</sub> aq conc/dioxà (1:1) a 55°C durant 2 h. A continuació s'evapora el dissolvent, i el residu obtingut dissolt en DCM es precipita sobre hexà fred. S'obté el H-fosfonat monoester 95 com a barreja, junt amb DMT-T (isòmers 3' o 5', aprox 25 %) que es genera com a conseqüència de la parcial labilitat dels H-fosfonats monoester<sup>260</sup> als tractaments bàsics. No ha estat necessari purificar els productes ja que només han estat emprats com a patrons en les anàlisis per HPLC. HPLC (sistema FR-C, gradient lineal 20-100% B en 20 min, 260 nm) : isòmer 5' (95a) t<sub>R</sub> 8.5 min; isòmer 3' (95b) t<sub>R</sub> 8.5 min; DMT-T (isòmer 5' o 3') t<sub>R</sub> 14.0 min.

### c) H-fosfonat d'O-3'-timidinil: T-3'-PO(H)OEt<sub>3</sub>NH (96a) :

S'utilitza el mateix procediment descrit per a l'obtenció del derivat fosfat 93a, partint en aquest cas del derivat DMT-T-3'-PO(H)ONH<sub>4</sub> (95a). HPLC (sistema FR-C, isocràtic 5% B 10 min, 5-25% B 10 min, 260 nm) t<sub>R</sub> : 12.0 min (impurificat amb aprox 25% T t<sub>R</sub> 10.3 min).

## 5.3 Obtenció dels oligonucleòtids 5<sup>5</sup>CATCAT , p<sup>5</sup>CATCAT i Hp<sup>5</sup>CATCAT :

### a) 5<sup>5</sup>CATCAT (35) :

S'ha sintetitzat l'oligonucleotidil-resina DMT-CiBu<sub>A</sub>DmfTCiBu<sub>A</sub>DmfT-suc-NHCH<sub>2</sub>-PS (97), emprant nucleòsids fosforamidit d'origen comercial (Applied Biosystems).

L'oligonucleòtid s'ha desprotegit i alliberat de la resina (97) per tractament amb 3% TCA/DCM (eliminació del grup DMT del darrer nucleòsid) i NH<sub>3</sub> aq concentrat en dioxà (1:1) a 55°C durant 6 h (desancoratge i eliminació de protectors- Materials i mètodes generals). El producte (35), separat de la resina per filtració i després liofilitzat, s'ha analitzat per HPLC de fase reversa (sistema FR-C, gradient lineal 19-21% B en 20 min, 260 nm, t<sub>R</sub> 12.8 min), i s'ha determinat el seu contingut en nucleòsids per digestió enzimàtica amb fosfodiesterasa de verí de serp i fosfatasa alcalina (1 OD<sub>260</sub>, 6 h, 36°C - Mater. Mèt. Gen., apartat VII) i anàlisi per HPLC (sistema FR-C, gradient I; dC: 1.0, dA: 0.9, T: 1.1). També ha estat caracteritzat per EM (electrospray, ACN/aigua, mode negatiu) : 437.0 [M-4H]<sup>4-</sup>, 583.0 [M-3H]<sup>3-</sup>, 874.3 [M-2H]<sup>2-</sup>, pes molecular estimat : 1751.6, pes molecular teòric (C<sub>58</sub>H<sub>75</sub>O<sub>34</sub>N<sub>20</sub>P<sub>5</sub>): 1751.23.

### b) p<sup>5</sup>CATCAT (34) :

L'oligonucleòtid-5'-fosfat s'ha obtingut per fosfitilació de l'oligonucleotidil-resina 97 (escala 1 μmol, prèviament desprotegida amb 3% TCA/DCM i continguda en un reactor del sintetizador automàtic), amb volums iguals de les dissolucions 0.25 M de (CNEO)<sub>2</sub>PNiPr<sub>2</sub> (98; vegeu el proper apartat) en THF anh i 1 M d'oNPT en THF anh, durant 1 h. En acabat, s'ha dut a terme l'oxidació del fosfit format amb I<sub>2</sub> en dissolució aquosa. El producte (34) s'ha obtingut per desprotecció i desancoratge de la resina per tractament amb NH<sub>3</sub> aq conc/dioxà (1:1) a 55°C durant 6 h, separació

de la resina per filtració, i posterior liofilització de la dissolució. HPLC (sistema BA-B, gradient lineal 0-100% en 20 min, 260 nm)  $t_R$ : 13.3 min; EM (electrospray, ACN/aigua, mode negatiu): 609.1 [M-3H]<sup>3-</sup>, 616.4 [M-4H+Na]<sup>3-</sup>, 914.2 [M-2H]<sup>2-</sup>, 925.2 [M-3H+Na]<sup>2-</sup>, pes molecular estimat: 1830.7, pes teòric (C<sub>58</sub>H<sub>76</sub>O<sub>37</sub>N<sub>20</sub>P<sub>6</sub>): 1831.19.

**c) Hp<sup>5</sup>CATCAT (33):**

S'ha obtingut per diferents rutes:

i) Seguint el mateix procediment que per **34**, per fosfitilació amb (CNEO)<sub>2</sub>PNiPr<sub>2</sub> (**98**) i oNPT, excepte que l'etapa d'oxidació en aquest cas no es realitza. S'obté aleshores un fosfit triester 5'-terminal sobre la resina, que en ser desprotegit en el procés de tractament amb NH<sub>3</sub> aq conc en dioxà es converteix en l'H-fosfonat 5'-terminal desitjat. L'anàlisi per HPLC (sistema BA-B, gradient lineal 0-100% en 20 min, 260 nm) mostra la presència a més del producte desitjat ( $t_R$ : 9.7 min) d'un 25% de l'oligonucleòtid no fosforilat CATCAT ( $t_R$ : 7.8 min), probablement originat per la major labilitat dels grups H-fosfonats monoester als tractaments bàsics<sup>260</sup>.

ii) Per fosfitilació de la resina **97**, amb Cl-P(OCNE)NiPr<sub>2</sub> (**71a**) en presència de DIEA en DCM anhidre. Per a això s'ha preparat una dissolució 0.2 M en clorofosfina (**71a**) i 0.6 M en DIEA en DCM anhidre. L'etapa de fosfitilació, duta a terme en el sintetitzador automàtic, ha consistit en fer arribar al reactor que conté la resina **97** volums iguals de la dissolució fosfitilant i DCM anhidre (a l'ampolla 9). Al cap de 1 h de reacció, una vegada eliminats els reactius per filtració, s'ha hidrolitzat el fosforamidit format tractant la resina amb una dissolució de tetrazole 1 M en aigua/THF (1:99) durant 1 h. El producte s'ha alliberat i desprotegit de la mateixa forma que en el mètode anterior, per tractament amb NH<sub>3</sub> aq conc en dioxà (1:1) durant 15 h a 55°C. L'anàlisi del cru per HPLC mostra una proporció 60:40 de HpCATCAT i CATCAT (vegeu el mètode i).

iii) Per fosfitilació de la resina **97** amb HPO(OCNE)NiPr<sub>2</sub> (**72**) i oNPT (vegeu Cap.1, apartat 3.3). Per a tal fi, s'han preparat dissolucions 0.25 M de l'H-fosfonamidat **72** en DCM anh. i 1 M de oNPT en THF anh. A l'etapa de fosfitilació, s'ha fet arribar al reactor que conté la resina iguals volums de les dissolucions anteriors, i s'ha deixat reaccionar durant 3 h. A continuació, s'ha efectuat la desprotecció i desancoratge del producte amb NH<sub>3</sub> aq conc en dioxà (1:1) durant 15 h a 55°C. Analitzat el cru per HPLC, s'observa una barreja 50:50 de HpCATCAT i CATCAT.

El producte HpCATCAT s'ha purificat mitjançant HPLC en les mateixes condicions d'anàlisi del cru, i s'ha dessalat per elució a través Sephadex G-10 amb també TEAA 0.01M. S'ha caracteritzat el producte aïllat, enregistrant un espectre de masses mitjançant la tècnica d'electrospray (MeOH/aigua, mode negatiu):  $m/z$  452.9 [M-4H]<sup>4-</sup>, 458.3 [M-5H+Na]<sup>4-</sup>, 463.7 [M-6H+2Na]<sup>4-</sup>, 604.0 [M-3H]<sup>3-</sup>, 611.3 [M-4H+Na]<sup>3-</sup>, 618.6 [M-5H+2Na]<sup>3-</sup>, 626.0 [M-6H+3Na]<sup>3-</sup>, 907.1 [M-2H]<sup>2-</sup>, 918.0 [M-3H+Na]<sup>2-</sup>, 928.3 [M-4H+2Na]<sup>2-</sup>, 939.2 [M-5H+3Na]<sup>2-</sup>, 950.3 [M-6H+4Na]<sup>2-</sup>, pes molecular estimat: 1815.9, pes molecular teòric: 1815.2.

**d) Bis(2-cianoetoxi)diisopropilaminofosfina (98):**

A una dissolució de Cl-P(OCNE)NiPr<sub>2</sub> (**71a**, 500 µL, 2.3 mmol) en ACN anh (2 mL) i sota una atmosfera inert d'argó, s'afegeixen DIEA anh (600 µL, 3.5 mmol) i 3-hidroxipropionitril (280 µL, 4.4 mmol; assecat sobre tamís molecular). Es deixa reaccionar durant 1 h. A continuació es dilueix la dissolució amb DCM (10 mL), es renta amb NaHCO<sub>3</sub> aq sat (x 2) i dissolució saturada de NaCl, s'asseca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i s'evapora a sequedat. El residu es purifica per cromatografia sobre gel de sílice eluint amb *t*-butil metil èter / hexà (3:1). S'obté un oli incolor (310 mg, 50%).  $R_f$  (sistema I): 0.85; <sup>31</sup>P RMN (CDCl<sub>3</sub>, 81 MHz)  $\delta$ : 148.9; <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz)  $\delta$ : 4.10-3.40 (3H, CH<sub>2</sub>O, CH), 2.65 (2H, t, J 7 Hz, CH<sub>2</sub>CN), 1.14 (6H, d, J 7 Hz, 2 x CH<sub>3</sub>).

**CONCLUSIONS**

- El nucleopèptid Boc-Ser(p<sup>5'</sup>TCT)-NHcHex ha estat obtingut per mitjà d'un esquema de síntesi convergent, en què se sintetitzen per separat els dos fragments, el derivat d'aminoàcid i l'oligonucleòtid, que en l'etapa final s'uneixen per formació de l'enllaç fosfat. L'oligonucleòtid ha estat sintetitzat en fase sòlida sobre una matriu de poliestirè per mitjà de la metodologia del fosfit triester. Per a la protecció de l'oligonucleòtid s'ha elegit una combinació de grups protectors làbils a les bases, constituïda pel grup fluorenilmetoxicarbonil per a citosina, el grup cianoetil per a l'enllaç fosfat i una unió de tipus succinil amb la resina. El fosforamidit del derivat de l'aminoàcid Boc-Ser-NHcHex s'ha fet reaccionar amb l'oligonucleotidil-resina en presència de tetrazole, i a continuació s'ha efectuat l'oxidació de l'enllaç fosfit a fosfat. La desprotecció i alliberament del nucleopèptid de la resina s'ha realitzat per mitjà d'un tractament bàsic compatible amb l'estabilitat de l'enllaç fosfat diester serina-nucleòsid.

- S'han dut a terme diversos intents per a l'obtenció del nucleopèptid Ac-Ser(p<sup>5'</sup>CATCAT)-Gly-Asp-NH<sub>2</sub>, que reproduïx la seqüència de la zona d'unió de la nucleoproteïna d'adenovirus 2, emprant un esquema de tipus convergent igual a l'anterior.

S'han preparat tres pèptids protegits diferents de seqüència Ac-Ser-Gly-Asp(OX)-NH<sub>2</sub>, en què s'han assajat com a grup protector X els grups benzil, 9-fluorenilmetil i 2-(4-acetil-3-nitrofenil)etil, que ha estat especialment desenvolupat en aquest treball. En la síntesi del pèptid protegit amb el grup fluorenilmetil s'ha observat una reacció secundària en tractar la peptidil-resina Ac-Ser(Bzl)-Gly-Asp(OFm)-NH-R amb HF anhidre. El grup protector 2-(4-acetil-3-nitrofenil)etil (Anpe), sobre el qual no té lloc aquesta reacció secundària, mostra unes característiques de labilitat adequades als tractaments amb TBAF en THF anhidre, pel que ha estat emprat com a alternativa al grup 9-fluorenilmetil. A més, el pèptid protegit amb el grup 2-(4-acetil-3-nitrofenil)etil presenta també millor solubilitat que l'anàleg amb el grup fluorenilmetil.

L'oligonucleòtid ha estat sintetitzat per mitjà d'una metodologia en fase sòlida tant sobre poliestirè com sobre boles de vidre. La utilització de grups fluorenilmetoxicarbonil per protegir les nucleobases ha conduït en alguns casos a oligonucleòtids força impurs, pel que s'han assajat altres grups protectors com el grup isobutiril per a citosina, i els grups benzoïl o dimetilaminometilè per a adenina.

Els pèptids Ac-Ser-Gly-Asp(OX)-NH<sub>2</sub> es caracteritzen per mostrar poca solubilitat en dissolvents apròtics idonis per efectuar la fosfitilació i l'acoblament, el que ha dificultat l'obtenció i corresponent purificació dels derivats de tipus fosforamidit. Els derivats fosforamidit dels pèptids s'han intentat acoblar a l'oligonucleotidil-resina en presència de tetrazole, efectuant a continuació una etapa d'oxidació. La desprotecció i alliberament del producte format s'ha dut a terme per mitjà de diferents tractaments bàsics segons els grups protectors utilitzats. En la major part dels intents

s'ha aïllat un subproducte, molt probablement format per trencament d'alguna estructura nucleopeptídica, que no ha estat possible identificar.

- En les reaccions d'obtenció dels fosforamidits dels pèptids s'ha observat que els grups carbamoïl del pèptid reaccionen amb agents fosfitilants com les clorofosfines, o també, però més lentament, amb les bisdiisopropilaminofosfines. Els derivats de tipus N-acilfósforodiamidit que es generen poden reaccionar amb grups hidroxil si s'activen per catàlisi àcida. Amb l'objecte d'estudiar la reactivitat dels grups carbamoïl, i l'estabilitat dels corresponents productes de reacció, ha estat preparat el derivat N-acilfosforamidat DMT-T-PO(O<sup>-</sup>)NHCOCH<sub>2</sub>Ph. Les conclusions deduïdes han servit per obtenir els anàlegs nucleopeptídics amb un enllaç pèptid-oligonucleòtid de tipus N-acilfosforamidat Ac-Ser-Gly-Asp-NH-p<sup>5'</sup>T i Ac-Ser-Gly-Asp-NH-p<sup>5'</sup>CATCAT. Els enllaços de tipus N-acilfosforamidat d'aquests derivats han mostrat ser estables a les bases.

- L'H-fosfonamidat H-PO(OCNE)NiPr<sub>2</sub> es genera per hidròlisi dels agents fosfitilants emprats en l'obtenció dels derivats fosforamidit. S'ha comprovat que aquest derivat és capaç de reaccionar amb grups hidroxil en presència d'*o*-nitrofeniltetrazole, però no amb tetrazole. Tenint en compte aquesta observació, s'ha volgut comprovar la utilitat dels derivats N,N-dialquil-H-fosfonamidat com a possibles intermedis en la síntesi des oligonucleòtids. Per això s'han sintetitzat derivats DMT-T-PO(H)NR<sub>2</sub> amb diferents grups dialquilamino, i s'ha avaluat la seva reactivitat en presència de catalitzadors àcids. En cap de les condicions assajades, els rendiments de les reaccions d'acoblament no són acceptables.

- El nucleopèptid Phac-Phe-Val-Ser(p<sup>3'</sup>ACT)-Gly-OH ha estat el primer producte sintetitzat per mitjà d'una estratègia lineal. El principal avantatge respecte a l'estratègia de tipus convergent és la seva major simplicitat ja que s'evita l'ús dels pèptids protegits com a intermedis que cal purificar, fosfitilar i acoblar. En l'esquema lineal que s'ha dissenyat, la síntesi del nucleopèptid s'inicia amb la construcció del fragment peptídic sobre la resina i sobre el grup hidroxil del residu de serina, no protegit, es duu a terme el perllongament de l'oligonucleòtid pel mètode del fosfit triester. Respecte a l'altra possible alternativa que comportaria la síntesi de l'oligonucleòtid en primer lloc, aquest esquema presenta l'avantatge d'evitar la possible degradació tant del fragment oligonucleotídic, com de l'enllaç entre el pèptid i l'oligonucleòtid durant els tractaments efectuats per eliminar els grups protectors temporals (Boc o Fmoc) en sintetitzar el pèptid. D'altra banda, l'esquema utilitzat permet obtenir nucleopèptids en què l'aminoàcid d'unió es troba en qualsevol posició de la seqüència.

Igual que en l'anterior estratègia, s'ha escollit una combinació de grups protectors permanents que s'eliminen amb tractaments bàsics. En aquest cas s'han triat els grups isobutiril per a la protecció de citosina, benzoïl per a adenina, i cianoetil per als enllaços fosfat. Per a la unió del nucleopèptid a

la resina, s'ha emprat l'espaiador bifuncional que forma un enllaç de tipus ester 2-nitrofenilètilic amb l'extrem C-terminal del pèptid. Aquest enllaç és làbil per  $\beta$ -eliminació en condicions bàsiques compatibles amb l'estabilitat de l'enllaç entre el pèptid i l'oligonucleòtid. La síntesi del nucleopèptid s'ha realitzat sobre una matriu de poliestirè.

Una vegada construït el nucleopèptid sobre la resina, s'ha dut a terme la desprotecció i alliberament del producte amb un primer tractament amb el reactiu TBAF.3H<sub>2</sub>O en THF anhidre, que produeix el desanclatge del producte i una desprotecció parcial, seguit d'una segona etapa de tractament amb NH<sub>3</sub> concentrat/dioxà a temperatura ambient per acabar d'eliminar els grups protectors de les nucleobases. El cru de síntesi així obtingut conté com a producte majoritari el nucleopèptid desitjat, que s'ha aïllat amb un rendiment molt satisfactori.

- Utilitzant l'esquema de síntesi lineal, s'ha dut a terme la síntesi de dos nucleopèptids regioisòmers amb la seqüència de la zona d'unió de la nucleoproteïna d'adenovirus 2, Phac-Ser(p<sup>3</sup>CATCAT)-Gly-Asp-OH i Phac-Ser(p<sup>5</sup>CATCAT)-Gly-Asp-OH. En aquest cas s'ha explorat la possibilitat d'unir el pèptid a l'extrem 3' o 5' de l'oligonucleòtid, per la qual cosa s'han utilitzat nucleòsids 3'- o 5'-fosforamidit, respectivament. S'han elegit el grup isobutiril per protegir citosina, el grup dimetilaminometilè per a adenina i el grup cianoetil per a l'enllaç fosfat. Aquesta combinació de protectors ha permès disposar de nucleòsids 3'-fosforamidit d'origen comercial, mentre que els corresponents derivats 5'-fosforamidit, 5'-iPr<sub>2</sub>N(CNEO)P-T-DMT, 5'-iPr<sub>2</sub>N(CNEO)P-dC<sup>iBu</sup>-DMT i 5'-iPr<sub>2</sub>N(CNEO)P-dA<sup>Dmf</sup>-DMT han estat especialment sintetitzats. Respecte a la part peptídica, s'ha escollit el grup fluorenilmetil per a la protecció permanent del residu d'àcid aspàrtic.

Una vegada sintetitzats els dos nucleopèptids, la desprotecció i desanclatge dels nucleopèptids s'ha efectuat seguint el mateix procediment en dues etapes posat en pràctica per obtenir l'anterior nucleopèptid. En tots dos casos, els crus de síntesi mostren els nucleopèptids com a productes majoritaris. Els rendiments d'obtenció dels nucleopèptids, una vegada aïllats i purificats, han estat també satisfactoris.

- En general, la caracterització dels nucleopèptids ha consistit primer en comprovar el contingut en aminoàcids prèvia hidròlisi àcida del producte, i també, una vegada sotmesos a digestió enzimàtica, en analitzar per HPLC la proporció en nucleòsids del producte digerit. Com a part dels experiments de digestió enzimàtica, s'ha pogut observar que els 5'-nucleopèptids es degraden completament a la barreja de nucleòsids si es tracten amb els enzims fosfodiesterasa de verí de serp (SVPD), que és una 3'-exonucleasa, i fosfatasa alcalina (AP), però que són estables a l'acció d'una 5'-exonucleasa com la fosfodiesterasa de melsa (SpPD). La barreja d'enzims de SVPD i AP degrada completament els 3'-nucleopèptids a una barreja de tots els nucleòsids excepte el



nucleòsid unit al pèptid. En canvi, si els 3'-nucleopèptids es tracten només amb SVPD presenten resistència a la digestió. Els 3'-nucleopèptids són degradats per complet quan es tracten amb SpPD.

L'enregistrament dels espectres de  $^1\text{H}$  i  $^{31}\text{P}$  RMN mostra alguns senyals diagnòstic que es coresponen amb els productes esperats. Ara bé, a més de la composició en aminoàcids i en nucleòsids, la prova definitiva que confirma les estructures dels nucleopèptids sintetitzats la proporcionen els espectres de masses obtinguts amb la tècnica d'electrospray que per primera vegada s'ha utilitzat amb aquest tipus de productes.

- S'ha efectuat una avaluació de l'estabilitat a reactius bàsics dels diferents nucleopèptids sintetitzats amb un enllaç serina-nucleòsid de tipus fosfat diester. S'ha pogut constatar que els diferents nucleopèptids presenten una estabilitat diferent que es posa de manifest per exemple en el fet que els nucleopèptids Boc-Ser(p T-DMT)-NHCHex i Boc-Ser(p<sup>5'</sup>TCT)-NHCHex són estables a reactius com  $\text{K}_2\text{CO}_3$  en MeOH/dioxà, mentre que els altres nucleopèptids es degraden ràpidament en aquestes condicions. Malgrat que no es disposa de suficients dades, tot sembla indicar que els nucleopèptids de major tamany són els més làbils, i que els que contenen enllaços fosfat diester serina-timidina són els més estables.

## REFERÈNCIES

- 1 Morse, R.H.; Simpson, R.T.; *Cell*, **1988**, *54*, 285-289.
- 2 Noller, H.F.; *Annu. Rev. Biochem.*, **1991**, *60*, 191-227.
- 3 Zamecnik, P.; *Trends Biochem. Sci.*, **1984**, *9(11)*, 464.
- 4 Julius, D.J.; Fraser, T.H.; Rich, A.; *Biochemistry*, **1979**, *18*, 604.
- 5 Juodka, B.A.; *Nucleosides and Nucleotides*, **1984**, *3(5)*, 445-483.
- 6 Laipis, P.J.; Oliver, B.M.; Ganesan, A.T.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; **1969**, *62*, 289
- 7 Tsukuda, K.; Ichimura, M.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1971**, *42*, 156.
- 8 Gumport, R.I.; Lehman, I.R.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1971**, *68*, 2559-2563.
- 9 Juodka, B.A.; Markuckas, A.Y.; Sneckute, M.A.; Zilinskiene, V.J.; Drigin, Y.; *Bioorg. Khimiya*, **1980**, *6*, 1733-1734.
- 10 Shapiro, B.M.; Stadtman, E.R.; *J. Biol. Chem.*, **1968**, *243*, 3769-3771
- 11 Adler, S.P.; Purich, D.; Stadtman, E.R.; *J. Biol. Chem.*, **1975**, *250*, 6264-6272.
- 12 Niles, E.G.; Westhead, E.W.; *Biochemistry*, **1973**, *12*, 1723-1729.
- 13 Krajevsky, A.A.; Kiseliiov, L.L.; Gottikh, B.P.; *Mol. Biol.*, **1973**, *7*, 769-775.
- 14 Chelala, C.A.; Hirschbein, L.; Torres, H.N.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1971**, *68*, 152-154.
- 15 a) Kelly, T.J.; Wold, M.S.; Li, J.; *Adv. Virus Res.*, **1988**, *34*, 1-42; b) Challberg, M.D.; Kelly, T.J.; *Annu. Rev. Biochem.*, **1989**, *58*, 671-717.
- 16 Salas, M. a "The Bacteriophages"; Ed. Calendar, R; Plenum Press, Nova York, **1988**, Vol. 1, pàg. 169-191.
- 17 a) Gingeras, T.R.; Sciaky, D.; Gelinias, R.E.; Bing-Dong, J.; Yen, C.E.; Kelly, Bullock, P.A.; Parsons, B.L.; O'Neill, K.E.; Roberts, R.J.; *J. Biol. Chem.*, **1982**, *257* (22), 13475-13491. b) Smart, J.E.; Stillman, B.W.; *J. Biol. Chem.*, **1982**, *257*(22), 13499-13506.
- 18 a) Yoshikawa, H.; Friedmann, T.; Ito, J.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1981**, *78*, 1336-1340. b) Escarmis, C.; Salas, M.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1981**, *78*, 1446-1450.
- 19 Rekossh, D.M.K., Russell, W.C.; Bellett, A.J.D.; Robinson, A.J.; *Cell*, **1977**, *11*, 282-295.
- 20 Salas, M.; Mellado, R.P.; Viñuela, E.; Sogo, J.M.; *J. Mol. Biol.*, **1978**, *119*, 269-271.
- 21 Desiderio, S.V.; Kelly, T.J.J.; *J. Mol. Biol.*, **1981**, *145*, 319-337.
- 22 Hermoso, J.M.; Méndez, E.; Soriano, F.; Salas, M.; *Nucleic Acids Res.*, **1985**, *13*, 7715-1128.
- 23 Salas, M; *Annu. Rev. Biochem.*, **1991**, *60*, 39-71.
- 24 Sogo, J.M.; García, J.A.; Peñalva, M.A.; Salas, M.; *Virology*, **1982**, *116*, 1-18.
- 25 Challberg, M.D.; Desiderio, S.V.; Kelly, T.J.Jr.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; **1980**, *77*, 5105-5109.
- 26 Bamford, D.H.; Mindich, L.; *J. Virol.*, **1984**, *50*, 309-315.
- 27 García, P.; Hermoso, J.M.; García, J.A.; García, E.; López, R.; *J. Virol.* , **1986**, *58*, 31-35.
- 28 Referència 23, pàg. 56-59.
- 29 Gerlich, W.H.; Robinson, W.S.; *Cell*, **1980**, *21*, 801-809.
- 30 a) Lee, Y.F.; Nomoto, A.; Detjen, B.; Wimmer, E.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; **1977**, *74*, 59-63; b) Racaniello, V.R.; Baltimore, D.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; **1981**, *78*, 4887-4891.
- 31 a) Caroll, A.R.; Rowlands, D.J.; Clarke, B.E.; *Nucleic Acids Res.*, **1974**, *12*, 2461-2472; b) Paul, A.V.; Tada, H.; van der Helm, K.; Wissel, T.; Kiehn, R.; *Virus Res.*, **1987**, *8*, 153-171.
- 32 a) Wang, J.C.; *Annu. Rev. Biochem.*, **1985**, *54*, 665-697; b) Wang, J.C.; *Biochim. Biophys. Acta*, **1987**, *909*, 1-9.
- 33 Prell, B.; Vosberg, H.-P.; *Eur. J. Biochem.*, **1980**, *108*, 389-398.
- 34 Depew, R.E.; Liu, L.F.; Wang, J.C.; *J. Biol. Chem.*, **1978**, *253*, 511-518.
- 35 Liu, L.F.; Rowe, T.C.; Yang, L.; Tewey, K.M.; Chen, G.L.; *J. Biol. Chem.*, **1983**, *258*, 15365-15370.
- 36 Nelson, E.M.; Tewy, K.M.; Liu, L, L.F.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1984**, *81*, 1361-1365.
- 37 Pommier, Y.; Zwelling, L.A.; Mattern, M.R.; Erickson, L.C.; Kerrigan, D.; *Cancer Res.*, **1983**, *43*, 5718-5724.
- 38 Goldsmith, M.A.; Carter, S.K.; *Eur. J. Cancer*, **1973**, *9*, 477-482.
- 39 Gellert, M.; *Annu. Rev. Biochem.*, **1981**, *50*, 879-910.
- 40 a) Hsinag, Y.H.; Hertzberg, R.; Hecht, S.; Liu, L.F.; *J. Biol. Chem.*, **1985**, *260*, 14873-14878. b) Hertzberg, R.P.; Bushy, R.W.; Caranfa, M.J.; Holden, K.G.; Johnson, R.K.; Hecht, S.M.; Kingsbury, W.D.; *J. Biol. Chem.*, **1990**, *265*, 19287-19292.

- 41 Fang, S.-D.; Wang, L.K.; Hecht, S.M.; *J. Org. Chem.*, **1993**, *58*(19), 5025-5027.
- 42 Heretzberg, R.P.; Caranfa, M.J.; Hecht, S.M.; *Biochemistry*, **1989**, *28*, 4629-4638.
- 43 Hertzberg, R.P.; Busby, R.W.; Caranfa, M.J.; Holden, K.G.; Johnson, R.K.; Hecht, S.M.; Kingsbury, W.D.; *J. Biol. Chem.*, **1990**, *265*(31), 19287-19295.
- 44 Liu, L.F.; *Annu. Rev. Biochem.*, **1989**, *58*, 351-375.
- 45 Hershey, H.V.; Werner, D.; *Nature*, **1976**, *262*, 148-150.
- 46 Werner, D.; Krauth, W.; Hershey, H.V.; *Biochim. Biophys. Acta*, **1980**, *608*, 243-258.
- 47 Werner, D.; Neuer-Nitsche, B.; *Nucleic Acids Res.*, **1989**, *17*(5), 6005-6015.
- 48 Juodka, B.; Pfütz, M.; Werner, D.; *Nucleic Acids Res.*, **1991**, *19*(23), 6391-6398.
- 49 Nyilas, A.; Foldesi, A.; *Nucleosides and Nucleotides*, **1989**, *8*(4), 557-567.
- 50 a) Happ, E.; Scalfi-Happ, C.; Chladek, S.; *J. Org. Chem.*, **1987**, *52*, 5387-5391; b) Hagen, M.D.; Scalfi-Happ, C.; Happ, E.; Chladek, S.; *J. Org. Chem.*, **1988**, *53*, 5040-5045.
- 51 Hotoda, H.; Saito, R.; Sekine, M.; Hata, T.; *Tetrahedron*, **1990**, *46*(4), 1181-1190.
- 52 Montero, J.-L.; Criton, M.; Dewynter, G.-F.; Imbach, J.-L.; *Tetrahedron Lett.*, **1991**, *32*(39), 5357-5358.
- 53 Schattenkerk, C.; Wreesmann, C.T.J.; de Graaf, M.J.; van der Marel, G.A.; van Boom, J.H.; *Tetrahedron Lett.*, **1984**, *25*(45), 5197-5200.
- 54 Kuyil-Yeheskiely, E; van der Klein, P.A.M; Viesser, G.M; van der Marel, G.A; van Boom, J.H; *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas*, **1986**, *105*, 69-70.
- 55 Kuyil-Yeheskiely, E; Tromp, C.M; Schaeffer, A.H; van der Marel, G.A; van Boom, J.H; *Nucleic Acids Res.*, **1987**, *15*, 1807-1818.
- 56 Kuyil-Yeheskiely, E; Tromp, C.M; Lefeber, A.W.M; van der Marel, G.A; van Boom, J.H; *Tetrahedron*, **1988**, *44*(20), 6515-6523.
- 57 Kuyil-Yeheskiely, E; Dreef-Tromp, C.M; Geluk, A; van der Marel, G.A; van Boom, J.H; *Nucleic Acids Res.*, **1989**, *17*(8), 2897-2905.
- 58 Hotoda, H.; Ueno, Y.; Sekine, M.; Hata, T.; *Tetrahedron Lett.*, **1989**, *30*(16), 2217-2120.
- 59 Dreef-Tromp, C.M; van Dam, E.M.A; van den Elst, H; van der Marel, G.A; van Boom, J.H; *Nucleic Acids Res.*, **1990**, *18*(22), 6491-6495.
- 60 Dreef-Tromp, C.M.; van den Elst, H.; van den Boogart, J.E.; van der Marel, van Boom, J.H.; *Nucleic Acids Res.*, **1992**, *20*(10), 2435-2439.
- 61 Dreef-Tromp, C.M.; van der Maarel, J.C.M.; van den Elst, H.; van der Marel, G.A.; van Boom, J.H.; *Nucleic Acids Res.*, **1992**, *20*(15), 4015-4020.
- 62 Ueno, Y.; Saito, R.; Hata, T.; *Nucleic Acids Res.*, **1993**, *21*(19), 4451-4457.
- 63 Zarytova, V.F.; Ivanova, E.M.; Yarmolyuk, S.I.; *Nucleosides and Nucleotides*, **1991**, *10*(1-3), 681-683.
- 64 a) Meinhofer, J; a "The Peptides: Analysis, Synthesis and Biology"; Eds. Meienhofer, J; Gross, E; Academic Press, New York, **1979**, pàg 264-276; b) Barany, G.; Merrifield, R.B.; a "The Peptides: Analysis, Synthesis and Biology", Vol. 2, Eds. Meienhofer, J; Gross, E; Academic Press, New York, **1979**, pàg 1-284; c) Barany, G.; Kneib-Cordonier, N.; Mullen, D.G.; *Int. J. Peptide Protein Res.*, **1987**, *30*, 705-739; d) Fields, G.B; Noble, R.L; *Int. J. Peptide Protein Res.*, **1990**, *35*, 161-214; e) Stewart, J.M; Young, J.D; "Solid Phase Peptide Synthesis: a Practical Approach"; Pierce Chemical Co., Rockford, Illinois, **1989**; f) Atherton, E; Sheppard, R.C; "Solid Phase Peptide Synthesis: a Practical Approach"; IRL Press, Oxford, **1989**.
- 65 a) "Oligonucleotide Synthesis: a Practical Approach"; Ed. Gait, M.J; IRL Press, Oxford, **1984**; b) Sonveaux, E.; *Bioorganic Chem.*, **1986**, *14*, 274-325; c) Bannwarth, W.; *Chimia*, **1987**, *41*(9), 302-317; d) Engels, J.W.; Uhlman, E.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1989**, *28*, 716-734; e) "Oligonucleotides and analogues: a Practical Approach"; Ed. Eckstein, F.; IRL Press, Oxford, **1991**; f) Beaucage, S.L.; Iyer, R.P.; *Tetrahedron*, **1992**, *48*(12), 2223-2311.
- 66 Chladek, S.; Sprinzl, M.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1985**, *24*, 371-391.
- 67 Robertson, S.A.; Ellman, J.A.; Schultz, P.G.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, *113*, 2722-2729.
- 68 Bain, J.D.; Wacker, D.A.; Kuo, E.E.; Lyttle, M.H.; Chamberlin, A.R.; *J. Org. Chem.*, **1991**, *56*, 4615-4625.
- 69 a) Travers, A.A.; *Annu. Rev. Biochem.*, **1989**, *58*, 427-452; b) Travers, A.A.; *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **1992**, *2*(1), 71-77.
- 70 a) Harrison, S.C.; *Nature*, **1991**, *353*, 715-719; b) Schelif, R.; *Science*, **1988**, *241*, 1182-1187.

- 71 Kaptein, R.; *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **1993**, *3*(1), 50-56.
- 72 a) Lamerichs, R.J.J.N.; Boelens, R.; van der Marel, G.A.; van Boom, J.H.; Kaptain, R.; Buck, R.; Fera, B.; Ruterjans, H.; *Biochemistry*, **1989**, *28*, 2985-2991; b) Otting, G.; Quian, Y.-Q.; Billeter, M.; Mueller, M.; Affolter, M.; Gehring, W.J.; Wüthrich, K.; *EMBO J.*; **1990**, *9*, 3085-3092.
- 73 a) Green, P.J.; Pines, O.; Inouye, M.; *Annu. Rev. Biochem.*, **1986**, *55*, 569-597; b) Eguchi, Y.; Itoh, T.; Tomizawa, J.-I.; *Annu. Rev. Biochem.*, **1991**, *60*, 631-652.
- 74 van der Krol, A.R.; Mol, J.N.M.; Stuitje, A.R.; *Gene*, **1988**, *72*, 45-50.
- 75 Riordan, M.L.; Martin, J.C.; *Nature*, **1991**, *350*, 442-443.
- 76 a) Uhlmann, E.; Peyman, A.; *Chem. Rev.*, **1990**, *90*(4), 543-584; b) Hélène, C.; Toulmé, J.-J.; *Biochim. Biophys. Acta*, **1990**, *1049*, 99-125; c) Englisch, U.; Gauss, D.H.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1991**, *30*(6), 613-722
- 77 derivats fósforotioat  
Eckstein, F.; *Annu. Rev. Biochem.*, **1985**, *54*, 367-402.
- 78 Gao, W.; Stein, C.A.; Cohen, J.S.; Dutchman, G.E.; Cheng, Y.-C.; *J. Biol. Chem.*, **1989**, *264*, 11521-11526.
- 79 a) Matsukura, M.; Shinozuka, K.; Zon, G.; Mitsuya, H.; Reitz, M.; Cohen, J.S.; Broder, S.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; **1987**, *84*, 7706-7710; b) Matsukura, M.; Zon, G.; Shinozuka, K.; Robert-Guroff, M.; Shimada, T.; Stein, C.A.; Mitsuya, H.; Wong-Staal, F.; Cohen, J.S.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; **1989**, *86*, 4244-4248.
- 80 Majumdar, C.; Stein, C.A.; Cohen, J.S.; Broder, S.; Wilson, S.H.; *Biochemistry*, **1989**, *28*, 1340-1346.
- 81 Agrawal, S.; Ikeuchi, T.; Sun, D.; Sarin, P.S.; Konopka, A.; Maizel, J.; Zamecnik, P.C.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1989**, *86*, 6553-6557.
- 82 Bayever, E.; Iversen, P.; Smith, L.; Spinolo, J.; Zon, G.; *Antisense Res. Dev.*, **1992**, 109-110.
- 83 a) Goodchild, J.; *Bioconjugate Chem.*, **1990**, *1*(3), 165-187; b) Ref. 155.c, pàg 10478-10481.
- 84 Lemaitre, M.; Bayard, B.; Lebleu, B.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; **1987**, *84*, 648-652
- 85 Matsukura, M.; Zon, G.; Shinozuka, K.; Stein, C.A.; Mitsuya, H.; Cohen, J.S.; Broder, S.; *Gene*, **1988**, *72*, 343-347.
- 86 Eritja, R.; Pons, A.; Escarceller, M.; Giralt, E.; Albericio, F.; *Tetrahedron*, **1991**, *47*(24), 4113-4120.
- 87 García de la Torre, B.; *Tesi Doctoral*, Universitat de Barcelona, **1993**; pàg. 109-141.
- 88 Arar, K.; Monsigny, M.; Mayer, R.; *Tetrahedron Lett.*, **1993**, *34*(50), 8087-8090.
- 89 Juby, C.D.; Richardson, C.D.; Brousseau, R.; *Tetrahedron Lett.*, **1991**, *32*(7), 879-882
- 90 a) Corey, D.R.; Schultz, P.G.; *Science*, **1987**, *238*, 1401-1403; b) Zuckermann, R.N.; Corey, D.R.; Schultz, P.G.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, *110*, 1614-1615.
- 91 a) Haralambidis, J.; Duncan, L.; Angus, K.; Tregear, G.W.; *Nucleic Acids Res.*, **1990**, *18*, 493-499; b) Tong, G.; Lawlor, J.M.; Tregear, G.W.; Haralambidis, J.; *J. Org. Chem.*, **1993**, *58*, 2223-2231.
- 92 Zoltewicz, J.A.; Clark, D.F.; Sharpless, T.W.; Grahe, G.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1970**, *92*, 1741-1750.
- 93 Shabarova, Z.E.; a "Progress in Nucleic Acids Research and Molecular Biology"; Davidson, J.N.; Colum, W.E.; vol. 10, Academic Press, **1970**, pàg. 145-182; b) vegeu ref. 5
- 94 a) Photaki, I.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, *85*, 1123-1126; b) Riley, G.; Turnbull, J.H.; Wilson, W.; *J. Chem. Soc.*, **1957**, 1373-1376.
- 95 Lloyd-Williams, P.; Albericio, F.; Giralt, E.; *Tetrahedron*, **1993**, *49*(48), 11065-11133.
- 96 Kuijpers, W.H.A.; Huskens, J.; Koole, L.H.; van Boeckel, C.A.A.; *Nucl. Acids Res.*, **1990**, *18*(17), 5197-5205.
- 97 Kuijpers, W.H.A.; Huskens, J.; van Boeckel, C.A.A.; *Tetrahedron Lett.*, **1990**, *31*(46), 6729-6732.
- 98 Corey, E.J.; Szekely, I.; Shiner, C.S.; *Tetrahedron Lett.*, **1977**, 3529-3532.
- 99 de Bont, H.B.A.; Liskamp, R.M.J.; O'Brian, C.A.; Erkelens, C.; Veeneman, G.H.; van Boom, J.H.; *Int. J. Peptide Protein Res.*, **1989**, *33*, 115-123.
- 100 a) Bardella, F.; Giralt, E.; Pedroso, E.; *Tetrahedron Lett.*, **1990**, *31*, 6231-6234.  
b) Montserrat, F.X.; Grandas, A.; Eritja, R.; Pedroso, E.; *Tetrahedron*, **1994**, *50*(8), 2617-2622.
- 101 Ref. 65.f, pàg. 2227-2233

- 102 Matteucci, M.D.; Caruthers, M.H.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, *103*, 3185-3191
- 103 Alul, R.H.; Singman, C.N.; Zhang, G.; Letsinger, R.L.; *Nucleic Acids Res.*, **1991**, *19*(7), 1527-1532.
- 104 a) Eritja, R.; Robles, J.; Fernández-Forner, D.; Albericio, F.; Giralt, E.; Pedroso, E.; *Tetrahedron Lett.*, **1991**, *32*, 1511-1514; b) Eritja, R.; Robles, J.; Aviñó, A.; Albericio, F.; Pedroso, E.; *Tetrahedron*, **1992**, *20*, 4171-4182.
- 105 Roeske, R.W.; a "The Peptides: Analysis, Synthesis and Biology"; Vol. 3, Eds. Meienhofer, J.; Gross, E.; Academic Press, Nova York, **1981**, pàg 101-136.
- 106 Greene, T.W.; Wuts, P.G.M.; "Protective Groups in Organic Synthesis"; 2a. Edició, John Wiley and Sons, Nova York, **1991**.
- 107 Honda, M.; Hirata, K.; Sueoka, H.; Katsuki, T.; Yamaguchi, M.; *Tetrahedron Lett.*, **1981**, *22*, 2679-2682.
- 108 Inoue, K.; Sakai, K.; *Tetrahedron Lett.*, **1977**, 4063-4066.
- 109 Kaestle, K.L.; Anwer, M.K.; Audhya, T.K.; Goldstein, G.; *Tetrahedron Lett.*, **1991**, *32*(3), 327-330.
- 110 Ueki, M.; Kai, K.; Amemiya, M.; Horino, H.; Oyamada, H.; *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1988**, 414-416.
- 111 Namikoshi, M.; Kundu, B.; Rinehart, K.L.; *J. Org. Chem.*, **1991**, *56*, 5464-5466.
- 112 Yang, C.C.; Merrifield, R.B.; *J. Org. Chem.*, **1976**, *41*, 1032-1041.
- 113 Camble, R.; Garner, R.; Young, G.T.; *J. Chem. Soc. C*, **1969**, 1911-1916.
- 114 Kenner, G.W.; Seely, J.H.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1972**, *94*, 3259-3260.
- 115 Nefkens, G.H.L.; Tesser, G.I.; Nivard, R.J.F.; *Rec. Trav. Chim. Pays Bas*, **1963**, *82*, 941.
- 116 Sheehan, J.C.; Daves, G.D.; *J. Org. Chem.*, **1964**, *29*, 2006-2008.
- 117 Stewart, F.H.C.; *Aust. J. Chem.*, **1965**, *18*, 1699-1702.
- 118 Kornblum, N.; Scott, A.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1974**, *96*, 590-591.
- 119 a) Martínez, J.; Lauer, J.; Castro, B.; *Tetrahedron Lett.*, **1983**, *24*, 5219-5222; b) Martínez, J.; Lauer, J.; Castro, B.; *Tetrahedron*, **1985**, *41*, 739-743.
- 120 a) Hubbuch, A.; Bindewald, R.; Föhles, J.; Naithani, V.K.; Zahn, H.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1980**, *19*(5), 394-396; b) Bindewald, R.; Hubbuch, A.; Danho, W.; Büllsbach, E.E.; Föhles, J.; Zahn, H.; *Int. J. Peptide Protein Res.*, **1984**, *23*, 368-375.
- 121 Hardy, P.M.; Rydon, H.N.; Thompson, R.C.; *Tetrahedron Lett.*, **1968**, 2525-2526.
- 122 Amaral, M.J.S.A.; *J. Chem. Soc. C*, **1969**, 2495-2497.
- 123 Amaral, M.J.S.A.; Barrett, G.C.; Rydon, H.N.; Willett, J.E.; *J. Chem. Soc. C*, **1966**, 807-813.
- 124 a) Kunz, H.; Waldman, H.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1983**, *22*, 62; b) Waldman, H.; Kunz, H.; *J. Org. Chem.*, **1988**, *53*, 4172-4175.
- 125 a) Kessler, H.; Becker, G.; Kogler, H.; Wolff, M.; *Tetrahedron Lett.*, **1984**, *25*, 3971-3974; b) Kunz, H.; Kneip, M.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1984**, *23*, 716-717.
- 126 a) Chantreux, D.; Gamet, J.P.; Jacquier, R.; Verducci, J.; *Tetrahedron*, **1984**, *40*, 3087-3090; b) Kiso, Y.; Kimura, T.; Shimokura, M.; Narukami, T.; *J. Chem. Soc. Chem Commun.*, **1988**, 287-289.
- 127 Miller, A.W.; Stirling, C.J.M.; *J. Chem. Soc. C*, **1968**, 2612-2617.
- 128 Sieber, P.; *Helv. Chim. Acta*, **1977**, *60*, 2711-2716.
- 129 a) Bedanrek, M.A.; Bodansky, M.; *Int. J. Peptide Protein Res.*, **1983**, *21*, 196-201; b) Kessler, H.; Siegmeyer, R.; *Tetrahedron Lett.*, **1983**, *24*, 281-282.
- 130 Bayer, E.; Jung, G.; Hagenmeier, H.; *Tetrahedron*, **1968**, *24*, 4853-4864.
- 131 a) Caruthers, M.H.; *Science*, **1985**, *230*, 281-285; b) Caruthers, M.H.; Barone, A.D.; Beaucage, S.L.; Dodds, D.R.; Fischer, E.F.; McBride, L.J.; Matteucci, M.; Stabinsky, Z.; Tang, J.-Y.; *Methods in Enzymology*, **1987**, *154*, 287-313; c) Atkinson, T.; Smith, M.; a "Oligonucleotide Synthesis: a Practical Approach"; Ed. Gait, M.J.; IRL Press, Oxford, **1984**, pàg 35-81; d) Brown, T.; Brown, D.J.S.; a "Oligonucleotides and analogues: a Practical Approach"; Ed. Eckstein, F.; IRL Press, Oxford, **1991**, pàg 1-24; e) ref. 65.e
- 132 Ref. 65.f pàg 2249-2251.
- 133 a) Khorana, H.G.; Turner, A.F.; Vizsolyi, J.P.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1961**, *83*, 686-692; b) Schaller, H.; Weimann, G.; Lerch, B.; Khorana, H.G.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, *85*, 3821-3827

- 134 Barnet, R.W.; Letsinger, R.L.; *Tetrahedron Lett.*, **1981**, *22*, 991-994.
- 135 Letsinger, R.L.; Miller, P.S.; Granis, G.W.; *Tetrahedron Lett.*, **1968**, 2621-2624.
- 136 a) Schulhof, J.C; Molko, D; Teoule, R; *Tetrahedron Lett.*, **1987**, *28*, 51-54; b) Schulhof, J.C; Molko, D; Teoule, R; *Nucl. Acids Res.*, **1987**, *15*, 397-416.
- 137 a) Ref. 133. b) Büchi, H.; Khorana, H.G.; *J. Mol. Biol.*, **1972**, *72*, 251-288.
- 138 Sinha, N.D.; Davis, P.; Usman, N.; Pérez, J.; Hodges, R.; Kremsky, J.; Casale, R.; *Biochimie*, **1993**, *75*(1-2), 13-23.
- 139 Köster, H.; Kulikowski, K.; Liese, T.; Heikens, W.; Kohli, V.; *Tetrahedron*, **1981**, *37*, 363-369.
- 140 Polushin, N.N.; Morocho, A.M.; Chen, B.-C.; Cohen, J.S.; *Nucleic Acids Res.*, **1994**, *22*(4), 639-645.
- 141 a) Zemlicka, J.; Holy, A.; *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **1967**, *32*, 3159-3161; b) Arnold, L.; Tocik, Z.; Bradkova, E.; Hostomsky, Z.; Paces, V.; Smrt, J.; *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **1989**, *54*, 523-532; c) McBride, L.J.; Kierzek, R.; Beaucage, S.L.; Caruthers, M.H.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, *108*, 2040-2048.
- 142 a) Vu, H.; McCollum, C.; Jacobson, K.; Theisen, P.; Vinayak, R.; Spies, E.; Andrus, A.; *Tetrahedron Lett.*, **1990**, *31*, 7269-7272; b) Vinayak, R.; Anderson, P.; McCollum, C.; Hampel, A.; *Nucleic Acids Res.*, **1992**, *20*, 1265-1269.
- 143 Heikkilä, J.; Chattopadhyaya, J.; *Acta Chem. Scand., Ser. B*, **1983**, *37*, 263-264.
- 144 a) Ref. 143; b) Koole, L.H.; Moody, H.M.; Broeders, N.L.H.L.; Quaedflieg, P.J.L.M.; Kuijpers, W.H.A.; van Genderen, M.H.P.; Coenen, A.J.J.M.; van der Wal, S.; Buck, H.M.; *J. Org. Chem.*, **1989**, *54*, 1657-1664.
- 145 Webb, T.R.; Matteucci, M.D.; *Nucleic Acids Res.*, **1986**, *14*, 7661-7674.
- 146 a) Himmelsbach, F.; Schulz, B.S.; Trichtinger, T.; Charubala, R.; Pfeleiderer, W.; *Tetrahedron*, **1984**, *40*, 59-72; b) Pfeleiderer, W.; Schwarz, M.; Schirmeister, H.; *Chem. Scr.*, **1986**, *26*, 147-154; c) Stengele, K.-P.; Pfeleiderer, W.; *Tetrahedron Lett.*, **1990**, *31*(18), 2549-2552.
- 147 Fernández-Fórner, D.; Palom, Y.; Ikuta, S.; Pedroso, E.; Eritja, E.; *Nucl. Acids Res.*, **1990**, *18*(19), 5729-5734.
- 148 Watkins, B.E.; Kiely, J.S.; Rapoport, H.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1982**, *104*, 5702-5708.
- 149 a) Hayakawa, Y.; Kato, H.; Uchiyama, M.; Kajino, H.; Noyori, R.; *J. Org. Chem.*, **1986**, *51*, 2400-2402; b) Hayakawa, Y.; Wakabayashi, S.; Kato, H.; Noyori, R.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, *112*, 1691-1696.
- 150 Ogilvie, K.K.; Nemer, M.J.; Hakimelahi, G.H.; Proba, Z.A.; *Tetrahedron Lett.*, **1982**, *23*, 2615-2618.
- 151 Heikkilä, J.; Balgobin, N.; Chattopadhyaya, J.; *Acta Chem. Scand. B*, **1983**, *37*, 857-862.
- 152 a) Dreef-Tromp, C.M.; Hoogerhout, P.; van der Marel, G.A.; van Boom, J.H.; *Tetrahedron Lett.*, **1990**, *31*(3), 427-430; b) Ref. 60, 61
- 153 a) Kuijpers, W.H.A.; Huskens, J.; van Boeckel, C.A.A.; *Tetrahedron Lett.*, **1990**, *31*(46), 6729-6732; b) Kuijpers, W.H.A.; Huskens, J.; Koole, L.H.; van Boeckel, C.A.A.; *Nucleic Acids Res.*, **1990**, *18*, 5197-5205.
- 154 Kuijpers, W.H.A.; Kuyl-Yeheskiely, E.; van Boom, J.H.; van Boeckel, C.A.A.; *Nucleic Acids Res.*, **1993**, *21*(15), 3493-3500.
- 155 a) Beaucage, S.L.; Iyer, R.P.; *Tetrahedron*, **1993**, *49*, 1925-1963; b) Beucage, S.L.; Iyer, R.P.; *Tetrahedron*, **1993**, *49*, 6123-6194; c) Beaucage, S.L.; Iyer, R.P.; *Tetrahedron*, **1993**, *49*(46), 10441-10488.
- 156 Referència 65. f pàg. 2242-2259
- 157 Referència 65.b pàg. 283-290.
- 158 Bardella, F.; *Tesi Doctoral*, Universitat de Barcelona, **1991**, pàg 59.
- 159 Ueki, M.; Amemiya, M.; *Tetrahedron Lett.*, **1987**, *28*(52), 6617-6620.
- 160 Robles, J.; Pedroso, E.; Grandas, A.; *Synthesis*, **1993**, *12*, 1261-1266.
- 161 Mojsov, S.; Mitchell, A.R.; Merrifield, R.B.; *J. Org. Chem.*, **1980**, *45*, 555-560.
- 162 Robles, J.; Pedroso, E.; Grandas, A.; *Int. J. Peptide Protein Res.*, **1994**, *43*, 359-362.
- 163 Grode, S.H.; Strother, D.S.; Runge, T.A.; Dobrowolski, P.J.; *Int. J. Peptide Protein Res.*, **1992**, *40*, 538-545.
- 164 a) Carlquist, M.; *Acta Chem. Scand.*, **1987**, *41*, 494-498; b) Ramage, R; Blake, A.J; Florence, M.R; Gray, T; Raphy, G; Roach, P.L; *Tetrahedron*, **1991**, *47*, 8001-8024.

- 165 a) Royo, M; García-Echeverría, C; Giralt, E; Eritja, R; Albericio, F; *Tetrahedron Lett.*, **1992**, 33(17), 2391-2394; b) Acedo, M; Albericio, F; Eritja, R; *Tetrahedron Lett.*, **1992**, 33(34), 4989-4992.
- 166 Rink, H.; *Tetrahedron Lett.*, **1987**, 28, 3787-3790.
- 167 Sinha, N.D.; Biernat, J.; McManus, J.; Köster, H.; *Nucleic Acids Res.*, **1984**, 12, 4539-4557.
- 168 a) Nielsen, J.; Taagard, M.; Marugg, J.; van Boom, J.H.; Dahl, O; *Nucleic Acids Res.*, **1986**, 14, 7391-7403; b) Moore, M.F.; Beaucage, S.L.; *J. Org. Chem.*, **1985**, 50, 2019-2025.
- 169 Producte proporcionat per A. Grandas
- 170 Kaczmarek, J.; Smagowski, H.; Grzonkam Z.; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. II*, **1979**, 1670-1674.
- 171 a) Froehler, B.C.; Matteucci, M.D.; *Tetrahedron Lett.*, **1983**, 24(31), 3171-3174; b) Pon, R.T.; *Tetrahedron Lett.*, **1987**, 28(32), 3643-3646.
- 172 Tebby, J.C.; "Handbook of Phosphorus-31 Nuclear Magnetic Resonance Data"; CRC Press, **1991**, Capítols 4 i 5, pàg. 65-91 i 93-119.
- 173 Sinha, N.D.; Biernat, J.; Küster, H.; *Tetrahedron Lett.*, 24(52), 5843-5846.
- 174 "Evaluating and Isolating Synthetic Oligonucleotides"; Applied Biosystems Inc., **1992**, pàg. 6.11-6.17
- 175 Hammond, P.R.; Brown, D.M.; *J. Chem. Soc.*, **1960**, 4229-4232.
- 176 Concernau, M.; *Tesi de Llicenciatura*, Univeristat de Barcelona, **1994**.
- 177 Challis, B.C.; Challis, J.A.; a "Comprehensive Organic Chemistry"; Eds. Barton, D.; Ollis, W.D.; Pergamon Press Ltd, **1979**, Volum 2, Capítol 9.9, pàg. 957-1065.
- 178 a) Kirsanov, A.V.; Makitra, R.G.; *Zh. Obshch. Khim.*, **1958**, 28, 35.  
b) Mizrahi, V.; Modro, T.A.; *J. Org. Chem.*, **1982**, 47, 3533-3539.
- 179 Challis, B.C.; Iley, J.N.; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, **1987**, 1489-1494.
- 180 a) Matrosov, G.I.; Gilyarov, V.A.; Kabachnik, K.; *Izv. Akad. Nauk. S.S.S.R., Ser. Khim.*, **1967**, 1465; b) Stec, W.J.; Oleruszek, A.; Lesiak, K.; Uznanski, B., Michaelski, J.; *J. Org. Chem.*, **1976**, 41, 227-232; c) Hendrickse, T.F.; Mizrahi, V.; Modro, T.A.; *Phosphorus Sulphur*, **1984**, 20, 93.
- 181 Mizrahi, V.; Modro, T.A.; *J. Org. Chem.*, **1983**, 48, 3030-3037.
- 182 Phillips, D.R.; Uramoto, M.; Isono, K.; McCloskey, J.A.; *J. Org. Chem.*, **1993**, 58, 854-859.
- 183 Ref. 64.b, pàg. 169-249; b) Ref. 64.c pàg. 727-730; c) Ref. 64.d pàg. 191-195.
- 184 Rizo, J; *Tesi Doctoral*, Universitat de Barcelona, **1988**, pàg. 12-25
- 185 Gairí, M; *Tesi Doctoral*, Universitat de Barcelona, en preparació.
- 186 Albericio, F.; Pons, M.; Pedroso, E.; Giralt, E.; *J. Org. Chem.*, **1989**, 54, 360-366.
- 187 a) Bayer, E.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1991**, 30, 113-216.  
b) Barany, G.; Albericio, F.; Solé, N.A.; Griffin, G.W.; Kates, S.A.; Hudson, D.; a "Peptides 1992. Proceedings of the Twenty-Second European Peptide Symposium"; Eds. Schneider, C.H.; Eberle, A.N.; **1993**, Escom Science Publishers B.V., Leiden; pàg. 267-268.
- 188 a) Gao, H.; Gaffney, B.L.; Jones, R.A.; *Tetrahedron Lett.*, **1991**, 32, 5477-5480; b) Wright, P.; Lloyd, D.; Rapp, W.; Andrus, A.; *Tetrahedron Lett.*, **1993**, 34, 3373-3376.
- 189 Merrifield, R.B.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, 85, 2149-2154.
- 190 Tam, J.P.; Cunningham, R.; Rundles, W.F.; Erikson, B.W.; Merrifield, R.B.; *Tetrahedron Lett.*, **1977**, 4001-4004.
- 191 a) Giralt, E.; Celma, C.; Ludevid, M.D.; Pedroso, E.; *Int. J. Peptide Protein Res.*, **1987**, 29, 647-656; b) Celma, C.; Albericio, A.; Pedroso, E.; Giralt, E.; *Peptide Res.*, **1992**, 5, 62-71.
- 192 Birr, C.; Wengert-Müller, M.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1979**, 18, 147-148.
- 193 Beyerman, H.; Hindriks.; de Leer, E.W.B.; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1968**, 1668.
- 194 Nicolás, E.; Clemente, J.; Perelló, M.; Albericio, F.; Pedroso, E.; Giralt, E.; *Tetrahedron Lett.*, **1992**, 33(16), 2183-2186.
- 195 Barton, M.A.; Lemieux, R.V.; Savoie, J.Y.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1973**, 95, 4501-4506.
- 196 Moore, G.; McMaster, D.; *Int. J. Peptide Protein Res.*, **1978**, 11, 140-148.
- 197 a) Kessler, W.; Iselin, B.; *Helv. Chim. Acta*, **1966**, 49, 1330-1344; b) Ohno, M.; Anfinse, C.B.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1967**, 89, 5994-5995.
- 198 Mizoguchi, T.; Shigezane, K; Takamura, N; *Chem. Pharm. Bull.*, **1969**, 17, 411.
- 199 a) Bodansky, M.; Sheehan, J.I.; *Chem. Ind. (London)*, **1964**, 1423-1424; b) Wright, D.E.; Agarwal, N.S.; Hruby, V.J.; *Int. J. Peptide Protein Res.*, **1980**, 15, 271-278.



- 200 Mizoguchi, T; Shigezane, K.; Takamura, N.; *Chem. Pharm. Bull.*, **1970**, *18*, 1465-1674.
- 201 a) Atherton, E.; Logan, C.J.; Sheppard, R.C.; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, **1981**, 538-546; b) Brown, E.; Sheppard, R.C.; Williams, B.J.; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, **1983**, 1161-1167.
- 202 Bray, A.M.; Valerio, R.M.; Maeji, N.J.; *Tetrahedron Lett.*, **1993**, *34*, 4411-4144.
- 203 Anwer, M.K.; Spatola, A.F.; *Tetrahedron Lett.*, **1992**, *33*, 3121-3124.
- 204 Inukai, I; Nakano, K.; Murakami, M.; *Bull. Chem. Soc. Japan*, **1968**, *41*, 182-186
- 205 Rivaille, P.; Gautron, J.P.; Castro, B.; Milhaud, G.; *Tetrahedron*, **1980**, *36*, 3413-3419.
- 206 Marshall, D.L.; Liener, I.E.; *J. Org. Chem.*, **1970**, *35*, 867-868.
- 207 Kenner, G.W.; *Angew. Chem.*, **1979**, *71*, 741-742.
- 208 Hudson, D.; Kenner, G.W.; Sharpe, R.; Szelke, M.; *Int. J. Peptide Protein Res.*, **1979**, *19*, 177-185.
- 209 DeGrado, W.F.; Kaiser, E.T.; *J. Org. Chem.*, **1980**, *45*, 1295-1300.
- 210 Findeis, M.A.; Kaiser, E.T.; *J. Org. Chem.*, **1989**, *54*, 3478-3482.
- 211 DeGrado, W.F.; Kaiser, E.T.; *J. Org. Chem.*, **1982**, *47*, 3258-3261.
- 212 Landsbury, P.T.Jr.; Hendrix, J.C.; Loffman, A.I.; *Tetrahedron Lett.*, **1989**, *30*, 4915-4918.
- 213 Lobl, T.J.; Maggiora, L.L.; *J. Org. Chem.*, **1988**, *53*, 1979-1981.
- resines silil
- 214 a) Mullen, D.G.; Barany, G.; *Tetrahedron Lett.*, **1987**, *28*(5), 491-494; b) Mullen, D.G.; Barany, G.; *J. Org. Chem.*, **1988**, *53*, 5240-5248.
- 215 a) Ramage, R.; Barron, C.A.; Bielecki, S.; Holden, R.; Thomas, D.W.; *Tetrahedron Lett.*, **1987**, *28*(35), 4105-4108; b) Ramage, R.; Barron, C.A.; Bielecki, S.; Holden, R.; Thomas, D.W.; *Tetrahedron*, **1992**, *48*(3), 499-514.
- 216 Mutter, M.; Bellof, D.; *Helv. Chim. Acta*, **1984**, *67*, 2009-2016.
- 217 Liu, Y.Z.; Ding, S.H.; Chu, J.Y.; Fleix, A.M.; *Int. J. Peptide Protein Res.*, **1990**, *35*, 95-98.
- 218 Rabanal, F.; Giralt, E.; Albericio, F.; *Tetrahedron Lett.*, **1992**, *33*, 1775-1778.
- 219 Katti, S.B.; Misra, P.K.; Haq, W.; Mathur, K.B.; *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1992**, 843-844.
- 220 Schwyzer, R.; Felder, E.; Falli, P.; *Helv. Chim. Acta*, **1984**, *67*, 1316-1327.
- 221 a) Tesser, G.I.; Buis, J.T.W.A.R.M.; Wolters, E.T.M.; Bothé-Helmes, E.G.A.M.; *Tetrahedron*, **1976**, *32*, 1069-1072; b) Buis, J.T.W.A.R.M.; Tesser, G.I.; Nivard, R.J.F.; *Tetrahedron*, **1976**, *32*, 2321-2325.
- 222 Albericio, F.; Giralt, E.; Eritja, R.; *Tetrahedron Lett.*, **1991**, *32*, 1515-1519.
- 223 Referència 64.b, pàg 57; b) Referència 64.c pàg. 707.
- 224 Referència 225, 226 i 227.
- 225 a) Giralt, E.; Albericio, F.; Pedroso, E.; Granier, C.; van Rietschoten, J.; *Tetrahedron*, **1982**, *38*, 1193-1208; b) Giralt, E.; Eritja, E.; Pedroso, E.; Granier, C.; van Rietschoten, J.; *Tetrahedron*, **1986**, *42*, 691-698; c) Albericio, F.; Granier, C.; Labbe-Jullie, C.; Seagar, M.; Couraud, F.; van Rietschoten, J.; *Tetrahedron*, **1987**, *43*, 5961-5971; d) Albericio, F.; Nicolás, E.; Josa, J.; Grandas, A.; Pedroso, E.; Giralt, E.; Granier, C.; van Rietschoten, J.; *Tetrahedron*, **1987**, *43*, 5961-5971; e) Grandas, A.; Albericio, F.; Josa, J.; Giralt, E.; Pedroso, E.; Sabatier, J.M.; van Rietschoten, J.; *Tetrahedron*, **1989**, *45*, 4637-4648; f) Lloyd-Williams, P.; Albericio, F.; Giralt, E.; *Int. J. Peptide Protein Res.*, **1991**, *37*, 58-60; g) Lloyd-Williams, P.; Gairí, M.; Albericio, F.; Giralt, E.; *Tetrahedron*, **1991**, *47*, 9867-9880; h) Lloyd-Williams, P.; Gairí, M.; Albericio, F.; Giralt, E.; *Tetrahedron*, **1993**, *49*(44), 10069-10078; i) Bayer, E.; Dengler, M.; Hemmasi B.; *Int. J. Peptide Protein Res.*, **1985**, *25*, 178-186; j) Pillai, V.N.R.; Renil, M.; Haridasan, V.K.; *Indian J. Chem.*, **1991**, *30B*, 205-212.
- 226 Kneib-Cordonier, N.; Albericio, F.; Barany, G.; *Int. J. Peptide Protein Res.*, **1990**, *35*, 527-538.
- 227 Barany, G.; Albericio, F.; *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, *107*, 4936-4942.
- 228 Gamper, H.B.; Reed, M.W.; Cox, T.; Virosco, J.S.; Adams, A.D.; Gall, A.A.; Scholler, J.K.; Meyer, R.B.Jr.; *Nucleic Acids Res.*, **1993**, *21*(1), 145-150.
- 229 Koga, M; Moore, M.F; Beaucage, S.L; *J. Org. Chem.*, **1991**, *56*, 3757-3759.
- 230 a) Paquet, A; *Tetrahedron Lett.*, **1990**, *31*(37), 5269-5272; b) Ranganathan, D; Shah, K; Vaish, N; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1992**, 1145-1147.
- 231 a) McLaughlin, L.W; Piel, N; a "Oligonucleotide Synthesis: a Practical Approach"; Ed. Gait, M.J; IRL Press, Oxford, **1984**, pàg 117-133; b) Bergmeyer, H.V; Grassi, M; Walter, H.E; a

- "Methods of Enzymatic Analysis"; Vol 2, Ed. Bergmeyer, H.V; VCH, Weinheim-Deerfield Beach, 3ª Edició, 1983, pàg 117-133
- 232 Tdd, D.M.; Warenius, H.M.; *Br. J. Cancer*, 1989, 60, 343-350.
- 233 a) Saison,-Behmoaras, T.; Tocque, B.; Rey, I.; Chassignol, M.; Thuong, N.T.; Helene, C.; *EMBO J.*; 1991, 10, 1111-1118; b) Orson, F.M.; Thomas, D.W.; McShan, W.M.; Kessler, D.J.; Hogan, M.E.; *Nucleic Acids Res.*, 1991, 19, 3435-3441.
- 234 a) Shaw, J.-P.; Kent, K.; Bird, J.; Fishback, J.; Frehler, B.; *Nucleic Acids Res.*, 1991, 19, 747-750; b) Dagle, J.M.; Walder, J.A.; Weeks, D.L.; *Nucleic Acids Res.*, 1990, 18, 4751-4757.
- 235 Sinha, N.D.; Biernat, J.; McManus, J.; Köster, H.; *Nucleic Acids Res.*, 1984, 12, 4539-4557.
- 236 a) Perich, J.W.; Johns, R.B.; *J. Org. Chem.*, 1988, 53, 4103-4105; b) Bodansky, M.; Bodansky, A.; "The Practice of Peptide Synthesis"; Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, 1984, pàg. 103-114.
- 237 Reese, C.B; Yau, L; *Tetrahedron Lett.*, 1978, 45, 4443-4446
- 238 Bayer, E.; Jung, G.; Hagenmeier, H.; *Tetrahedron*, 1968, 24, 4853-4864.
- 239 Tam, J.P.; Wong, T.; Riemen, M.W.; Tjoeng, F.; Merrifield, R.B.; *Tetrahedron Lett.*, 1979, 4033-4034.
- 240 Clark, J.H.; *Chem. Rev.*, 1980, 80, 429-452.
- 241 Albericio, F; Kneib-Cordonier, N; Biancalana, S; Gera, L; Masada, R.I; Hudson, D; Barany, G; *J. Org. Chem.*, 1990, 55, 3730-3743.
- 242 Bryant, P.M; Moore, R.H; Pimlott, P.J; Young, G.T; *J. Chem. Soc.*, 1959, 3868-3873.
- 243 Rizo, J.; Albericio, F.; Romero, G.; García-Echevarría, C.; Claret, J.; Muller, C.; Giralt, E.; Pedroso, E.; *J. Org. Chem.*, 1988, 5389-5390.
- 244 Albericio, F; Nicolás, E; Rizo, J; Ruiz-Gayo, M; Pedroso, E; Giralt, E; *Synthesis*, 1990, 119-122.
- 245 Nefkens, G.H; Zwanenburg, B; *Tetrahedron Lett.*, 1983, 39, 2995-2998.
- 246 Moroder, L; Hallet, A; Wünsch, E; Keller, O; Wersen, G; *Z. Hoppe Seyler's Physiol. Chem.*, 1976, 357, 1651.
- 247 a) Ogilvie, K.K.; Iwacha, D.J.; *Tetrahedron Lett.*, 1973, 4, 317-319.  
b) McGee, D.P.C.; Martin, J.C.; Webb, A.S.; *Synthesis*, 1983, 540-541.
- 248 a) Corey, E.J.; Venkateswarlu, A.; *J. Am. Chem. Soc.*, 1972, 94, 6190-6191.  
b) Stawinski, J.; Strömberg, R.; Thelin, M.; Westman, E.; *Nucleic Acids Res.*, 1988, 16(19), 9285-9298.
- 249 Dahl, B.H.; Nielsen, J.; Dahl, O.; *Nucleic Acids Res.*, 1987, 15(4), 1729-1743.
- 250 a) Froehler, B.C.; Ng, P.G.; Matteucci, M.D.; *Nucleic Acids Res.*, 1986, 14, 5399-5407;  
b) Garegg, P.J.; Lindh, I.; Regberg, T.; Stawinski, J.; Stromberg, R.; *Tetrahedron Lett.*, 1986, 27(34), 4051-4054; c) Gaffney, B.L.; Jones, R.A.; *Tetrahedron Lett.*, 1988, 29, 2619-2622; d) Gao, H.; Gaffney, B.L.; Jones, R.A.; *Tetrahedron Lett.*, 1991, 32(40), 5477-5480.
- 251 Referència 65c, 65.d
- 252 Marugg, E.; Burik, A.; Tromp, M.; van der Marel, G.A.; van Boom, J.H.; *Tetrahedron Lett.*, 1986, 27, 2271-2274.
- 253 Marugg, J.E.; Tromp, M.; Kuyil-Yeheskiely, E.; van der Marel, G.A.; van Boom, J.H.; *Tetrahedron Lett.*, 1986, 27(23), 2661-2664.
- 254 a) McBride, L.J.; Caruthers, M.H.; *Tetrahedron Lett.*, 1983, 24(3), 245-248; b) Moore, M.F.; Beaucage, S.L.; *J. Org. Chem.*, 1985, 50, 2019-2025.
- 255 a) Brill W.K.-D; Nielsen, J; Caruthers, M.H; *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, 113, 3972-3980.  
b) Houben-Weyl Methoden der Organischen Chemie Bd E1, Organische Phosphorverbindungen, H.G. Thieme, Verlag, Stuttgart, 1982, pàg. 389.
- 256 a) Referència 255b, pàg. 388-389; b) King, R.B.; Sundaram, P.M.; *J. Org. Chem.*, 1984, 49, 1784-1789; c) Noth, H.; Vetter, H.J.J.; *Chem. Ber.*, 1961, 94, 1505-1510
- 257 *Handbook of Chemistry and Physics*. Eds. Weast, R.C.; Astle, M.J.; CRC Press, Inc., 61a Ed., 1980.
- 258 a) Wada, T; Ishikawa, K; Hata, T; *Tetrahedron Lett.*, 1990, 31, 6363-6366; b) Wada, T; Ishikawa, K; Hata, T; *Tetrahedron*, 1993, 49, 2043-2054.
- 259 Katagiri, N.; Itakura, K.; Narang, S.A.; *J. Am. Chem. Soc.*, 1979, 97, 7332-7340
- 260 a) Hammond, P.R.; *J. Chem. Soc.*, 1962, 2521-2522; b) Gibbs, D.E.; Larsen, C.; *Synthesis*, 1983, 410-413.
- 261 Bannwarth, W.; Trzeciak, A.; *Helv. Chim. Acta*, 1987, 70, 175-186.

- 262 a) Giralt, E.; Albericio, F.; Bardella, F.; Eritja, R.; Feliz, M.; Pedroso, E.; Pons, M.; Rizo, J.; "Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis : Peptides, Polypeptides and Oligonucleotides"; Ed. Epton, R.E.; SPCC Ltd, Birmingham 1990, pàg. 111-120; b) Bardella, F.; Eritja, E.; *Bioorg. Medicinal Chem. Lett.*, 1993, 3(12), 2793-2796.
- 263 a) Smith, R.D.; Loo, J.A.; Edmonds, C.G.; Barinaga, C.J.; Udseth, H.R.; *Anal. Chem.*, 1990, 62, 882-889; b) Light-Wahl, K.J.; Springer, D.L.; Winger, B.E.; Edmonds, C.G.; Camp II, D.G.; Thrall, B.D.; Smith, R.D.; *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, 115, 803-804
- 264 Scanlon, D; Haralambidis, J; Southwell, C; Turton, J; Tregear, G; *J. Chromatogr.*, 1984, 336, 189-198
- 265 a) Engelhardt, H.; Beck, W.; Kohr, J.; Schmitt, T.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1993, 32, 629-649; b) Kuhr, W.G.; *Anal. Chem.*, 1990, 62, 403R-414R; c) Cohen, A.Sc.; Nagarian, D.R.; Paulus, A.; Guttman, A.; Smith, J.A.; Karger, B.L.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, 85, 9660-9663; d) Ref. 174.
- 266 Stewart, J.M.; Young, J.D.; "Solid Phase Peptide Synthesis"; Freeman, W.H., San Francisco, 1968, pàg. 41-44.
- 267 Referència 65e, pàg. 20.
- 268 Gisin, B.F.; *Anal. Chim. Acta*; 1972, 58, 248
- 269 Referència 65.a pàg 126.
- 270 Finnegan, W.G.; Henry, R.A.; Lofquist, R.J.; *J. Am. Chem. Soc.*, 1958, 80, 3908-3911.
- 271 Bolin, D.R.; Sytwu, I.-I.; Humiec, F.; Meienhofer, J.; *Int. J. Peptide Protein Res.*, 1989, 33, 353-359.
- 272 Referència 64.d, pàg. 177.
- 273 Alsina, J.; *Tesi de Llicenciatura*, Universitat de Barcelona, 1993, pàg 10.
- 274 a) Albericio, F; Barany, G; *Int. J. Peptide Protein Res.*, 1985, 26, 92-97; b) Ref. 194
- 275 Giralt, E; Albericio, F; Andreu, D; Eritja, R; Martín, P; Pedroso, E; *Anales de Química*, 1981, 77C, 120-125.

