

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 533 769**

51 Int. Cl.:

C07C 237/10 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

C07K 5/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2009 E 09719041 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.02.2015 EP 2268607**

54 Título: **Derivados de ácidos nucleicos peptídicos con buena penetración celular y fuerte afinidad por el ácido nucleico**

30 Prioridad:

14.03.2008 KR 20080023658

11.11.2008 KR 20080111459

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

15.04.2015

73 Titular/es:

**CTI BIO (100.0%)
4th Floor 1236-9 Gaepo-dong Gangnam-gu
Seoul 135-964, KR**

72 Inventor/es:

**CHUNG, SHIN;
LEE, JONG-OOK;
KIM, HEUI-YEON;
PARK, HYUN-JIN y
KIM, MI-RAN**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 533 769 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

Descripción

Derivados de ácidos nucleicos peptídicos con buena penetración celular y fuerte afinidad por el ácido nucleico.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a derivados de ácidos nucleicos peptídicos químicamente modificados para mostrar buena penetración celular y fuerte afinidad por el ácido nucleico.

10 Breves descripciones de los dibujos

La Figura 1 proporciona los cromatogramas de HPLC antes y después de la purificación del Oligo 17 por HPLC de fase inversa.

La Figura 2 proporciona un espectro de masa MALDI-TOF para un lote purificado del Oligo 17.

15 La Figura 3 proporciona gráficos de cambios de absorbancia con la temperatura para el Oligo 17 contra el ADN complementario o no coincidente.

Las Figura 4(a) y 4(b) proporcionan imágenes de microscopía confocal (al objetivo 63x) 1, 2, 3 y 24h después de que células HeLa se trataron con el Oligo 1 y el Oligo 2 a 5µM, respectivamente.

20 Las Figuras 5(a) y 5(b) proporcionan imágenes de microscopía confocal (al objetivo 63x) 0.5 y 1h después de que células MCF-7 se trataron con el Oligo 6 y el Oligo 7 a 2.5µM, respectivamente.

Las Figuras 6(a) y 6(b) proporcionan imágenes de microscopía confocal (al objetivo 40x) 6 o 24h después de que las células HeLa se trataron con el Oligo 1 y el Oligo 6 a 1µM, respectivamente.

25 Las Figuras 7(a) y 7(b) proporcionan imágenes de microscopía confocal (objetivo 40x) 24h después de que las células JAR se trataron con el Oligo 21 y el Oligo 28 a 2µM, respectivamente.

Las Figuras 7(c) y 7(d) proporcionan imágenes de microscopía confocal (al objetivo 40x) 24h después de que las células A549 se trataron con el Oligo 21 y el Oligo 28 a 2µM, respectivamente.

25 Las Figuras 7(e) y 7(f) proporcionan imágenes de microscopía confocal (al objetivo 40x) 12h después de que las células HeLa se trataron con el Oligo 21 y el Oligo 28 a 2µM, respectivamente.

30 La Figura 7(g) proporciona imágenes de microscopía confocal (al objetivo 40x) 24h después de que las células HeLa se trataron con el Oligo 21 a 2µM.

Las Figuras 8(a), 8(b) y 8(c) proporcionan imágenes de microscopía confocal (al objetivo 40x) 24h después de que las células HeLa, A549, y JAR se trataron con 2µM del Oligo 22, respectivamente.

35 La Figura 9 proporciona resultados de la transferencia de tipo Western para células JAR tratadas con 5µM o 10µM del Oligo 9, 5µM o 10µM del Oligo 10, cotratamiento con los oligómeros a 5µM o 10µM cada uno, y blanco (sin tratamiento con oligómero).

La Figura 10 es la estructura representativa de los oligómeros de PNA de esta invención.

Antecedentes de la invención

40 Los oligonucleótidos se han usado para diversos propósitos biológicos que incluyen la inhibición antisentido de la expresión genética, PCR (reacción en cadena de la polimerasa), análisis diagnóstico por chips de genes, y así sucesivamente. A partir de que los oligonucleótidos interactúan de una forma específica por la secuencia con ácidos nucleicos tales como ADN y ARN ellos son muy útiles para modular predeciblemente procesos biológicos que involucran ADN o ARN dentro de la célula. A diferencia de los fármacos pequeñas moléculas, sin embargo los oligonucleótidos no penetran rápidamente las membranas de las célula de mamíferos, y por lo tanto apenas afectan los procesos biológicos dentro de las célula a menos que se modifiquen o formulen apropiadamente para penetrar rápidamente la membrana plasmática.

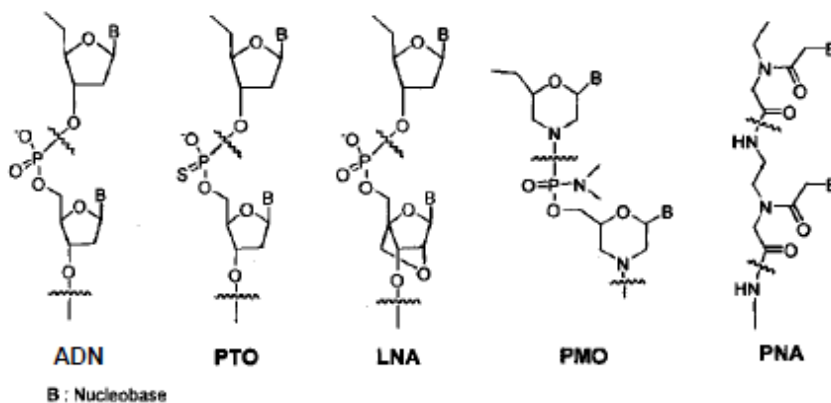
50 **Proteínas como objetivos de fármaco:** Las proteínas median diversas funciones celulares. No sería sorprendente encontrar que la mayoría de los fármacos comerciales actualmente muestran actividad terapéutica por la modulación de funciones de la proteína(s) Por ejemplo, el fármaco antiinflamatorio no esteroide aspirina inhibe las enzimas llamadas ciclooxigenasas para su actividad antiinflamatoria. El Losartan se une a y antagoniza la función de un receptor de transmembrana llamado receptor de angiotensina II para su actividad antihipertensiva. La Rosiglitazona activa selectivamente un receptor intracelular llamado receptor γ activado por proliferador de peroxisoma (PPAR γ) para provocar su actividad antidiabética. El Etanercept es una proteína de fusión que se une a una citocina llamada factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), y neutraliza la actividad biológica del TNF- α para su actividad anti-reumática. El Herceptin es un anticuerpo monoclonal para el tratamiento del cáncer de mama por la unión selectiva al erbB2 sobre-expresado en ciertos tipos de células de cáncer de mama.

60 **Inhibición antisentido de la síntesis de proteína:** Las proteínas se codifican por el ADN (ácido nucleico 2-deoxiribosa). En respuesta a la estimulación celular, el ADN se transcribe para producir el pre-ARNm (ácido ribonucleico pre-mensajero) en el núcleo. La porción(s) intrón del pre-ARNm se empalma enzimáticamente lo que produce el ARNm (ácido ribonucleico mensajero), que después se transloca al compartimiento citosólico. En el citosol, un complejo de la

maquinaria traduccional llamado ribosoma se une al ARNm y lleva a cabo la síntesis de proteína a medida que detecta la información genética codificada por el ARNm. (Biochemistry vol 41, 4503-4510, 2002; Cancer Res. vol 48, 2659-2668, 1988).

5 Un oligonucleótido que se une al ARNm o pre-ARNm en una manera específica por la secuencia se llama oligonucleótido antisentido (AO). AO puede unirse fuertemente a un ARNm e inhibir la síntesis de proteína por el ribosoma a lo largo del ARNm en el citosol. AO necesita estar presente dentro de la célula con el fin de inhibir la síntesis de su proteína objetivo. AO puede unirse fuertemente a un pre-ARNm en el núcleo y afectar el empalme del pre-ARNm, lo que produce un ARNm de secuencia alterada y consecuentemente una proteína alterada.

10



25

Oligonucleótidos no naturales: Los oligonucleótidos de ADN o ARN son susceptibles a la degradación por las endonucleasas endógenas, lo que limita su utilidad terapéutica. Hasta la fecha, muchos tipos de oligonucleótidos no naturales se han desarrollado y estudiado intensivamente. (Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. vol 33, 533-540, 2006) Algunos de ellos muestran una estabilidad metabólica prolongada en comparación al ADN y el ARN. Se proporcionaron anteriormente estructuras químicas para algunos de los oligonucleótidos no naturales representativos. Tales oligonucleótidos predeciblemente se unen a un ácido nucleico complementario como hacen el ADN o el ARN.

35

El oligonucleótido fosforotioato (PTO) es un análogo del ADN con uno de los átomos de oxígeno de la cadena principal de fosfato remplazado con un átomo de azufre por monómero. Tal cambio estructural pequeño hace a PTO comparativamente resistente a la degradación por nucleasas. (Ann. Rev. Biochem. vol 54, 367-402, 1985).

40 Para reflejar la similitud estructural de PTO y ADN, ambos penetran pobremente la membrana celular en la mayoría de los tipos celulares de mamíferos. Para algunos tipos de células que expresan abundantemente transportador(es) para el ADN, sin embargo, ADN y PTO muestran buena penetración celular. Los PTO administrados sistémicamente se conoce que se distribuyen rápidamente al hígado y al riñón. (Nucleic Acids Res. vol 25, 3290-3296, 1997).

45 Con el fin de facilitar la penetración celular de PTO in vitro, se practica popularmente la lipofección. Sin embargo, la lipofección altera físicamente la membrana celular, causa citotoxicidad, y por lo tanto no sería ideal para el uso terapéutico a largo plazo.

50 Durante los últimos 20 años, los PTO antisentido y variantes de PTO se evaluaron clínicamente para tratar cánceres, trastornos inmunológicos, enfermedades metabólicas, y así sucesivamente. (Biochemistry vol. 41, 4503-4510, 2002; Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. vol 33, 533-540, 2006) Muchos de tales fármacos antisentido candidatos no han tenido éxito debido en parte a la pobre penetración celular de PTO. Con el fin de superar la pobre penetración celular, se necesita administrar el PTO a una dosis alta para la actividad terapéutica. Sin embargo, se conoce que los PTO se asocian con toxicidades dependientes de la dosis tales como aumento del tiempo de coagulación, activación del complemento, nefropatía tubular, activación de las células de Kupffer, y estimulación inmune que incluye esplenomegalia, hiperplasia linfoide, infiltración de células mononucleares. (Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. vol 33, 533-540, 2006).

55

60 Se encontró que muchos PTO antisentido muestran una actividad clínica adecuada para enfermedades con una contribución significativa del hígado y el riñón. ISIS-301012 (mipomersen) es un análogo de PTO que inhibe la síntesis de apoB-100, una proteína involucrada en el transporte del colesterol por las LDL. Mipomersen manifiesta actividad clínica adecuada en una cierta población de pacientes de aterosclerosis probablemente debido a su distribución preferencial al hígado. (www.medscape.com/viewarticle/556073: Consultada el 19 febrero de 2009) ISIS-113715 es un

análogo del PTO antisentido que inhibe la síntesis de la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B), y se encontró que muestra actividad terapéutica en pacientes de diabetes tipo II. (Curr. Opin. Mol. Ther. vol 6, 331-336, 2004).

5 En el oligonucleótido fosforamidita morfolino (PMO), la cadena principal de fosfato y 2-deoxirribosa de ADN se rempazan con fosforamidita y morfolina, respectivamente. (Appl. Microbiol. Biotechnol. vol 71, 575-586, 2006) Mientras que la cadena principal del ADN está cargada negativamente, la cadena principal de PMO no está cargada. Así la unión entre PMO y ARNm está libre de repulsiones electrostáticas entre las cadenas principales, y tiende a ser más fuerte que entre el ADN y el ARNm. A partir de que PMO es estructuralmente muy diferente del ADN, transportador(es) hepáticos que reconocen el ADN no deberían reconocer a PMO. Sin embargo, el PMO no penetra rápidamente la membrana celular.

10 El ácido nucleico peptídico (PNA) es un polipéptido con N-(2-aminoetil)glicina como la cadena principal de la unidad, y se descubrió por Nielsen y colaboradores. (Science vol 254, 1497-1500, 1991) Como el ADN y el ARN, PNA además se une selectivamente al ácido nucleico complementario [Nature (Londres) vol 365, 566-568, 1992] Al igual que PMO, la cadena principal de PNA no está cargada. Así la unión entre PNA y ARN tiende a ser más fuerte que aquella entre ADN y ARN. A partir de que PNA es estructuralmente notablemente diferente del ADN, el transportador hepático que reconoce ADN no debería reconocer a PNA, y mostraría un perfil de distribución en los tejidos muy diferente al de ADN o PTO. Sin embargo, PNA además penetra pobremente las membranas celulares de mamíferos. (Adv. Drug Delivery Rev. vol 55, 267-280, 2003).

20 En el ácido nucleico bloqueado (LNA), el anillo de ribosa de la cadena principal del ARN está restringido estructuralmente para aumentar la afinidad de unión por el ARN o el ADN. Así, los LNA se pueden considerar como derivados de alta afinidad del ADN o el ARN. (Biochemistry vol 45, 7347-7355, 2006).

25 **Mecanismos antisentido:** El mecanismo antisentido difiere en dependencia de los tipos de AO. La ARNsa H reconoce un híbrido de ARNm con ADN, ARN, o PTO, y degrada la porción híbrida del ARNm. Así, la actividad antisentido de PTO se amplifica significativamente por la ARNsa H. Entretanto, la ARNsa H no reconoce un híbrido de ARNm con PMO, PNA, o LNA. En otras palabras, PMO, PNA y LNA deben depender puramente del bloqueo estérico del ARNm para su actividad antisentido. (Biochemistry vol 41, 4501-4510, 2002).

30 Para oligonucleótidos con la misma afinidad de unión por el ARNm, PTO debe por lo tanto mostrar una actividad antisentido más fuerte que PMO, PNA, y LNA. Para AO de bloqueo estérico tales como PMO, PNA, y LNA, se desea una fuerte afinidad por ARNm para la actividad antisentido.

35 **La actividad antisentido de PNA:** La afinidad de unión de PNA por ARNm podría aumentar a medida que aumenta la longitud de PNA hasta un cierto punto. Sin embargo, la actividad antisentido de PNA no parece siempre aumentar con la longitud de PNA. Hubo casos en los que la actividad antisentido de PNA alcanzó la actividad máxima de 12 a 13-meros y disminuyó después. (Nucleic acids Res. vol 32, 4893-4902, 2004) Por otro lado, la actividad antisentido óptima se alcanzó con PNA de 15 a 18-meros contra un cierto ARNm, lo que refleja que la accesibilidad estructural del sitio de unión objetivo del ARNm sería importante. (Biochemistry vol 40, 53-64, 2001).

40 En muchos casos, se ha informado que los PNA inhiben la síntesis de proteína por el ribosoma a nivel micromolar bajo buenas condiciones de penetración celular. (Science vol 258, 1481-85, 1992; Biochemistry vol 40, 7853-7859, 2001; Nucleic acids Res. vol 32, 4893-4902, 2004) Sin embargo, se encontró que los PNA dirigidos a una posición altamente accesible del ARNm muestran actividad antisentido a nivel sub-micromolar (Neuropeptides vol 38, 316-324, 2004; Biochemistry vol 40, 53-64, 2001) o aun a un nivel sub-nanomolar (Nucleic acids Res. vol 36, 4424-4432, 2008) bajo buenas condiciones de transfección.

45 Adicionalmente a dirigirse a un sitio altamente accesible en el ARNm, se requerirá una fuerte afinidad de unión de PNA por el ARNm para una buena actividad antisentido. A diferencia de ADN, PTO, y LNA, la cadena principal de PNA no está cargada. Los PNA tienden a agregar y a hacerse menos adecuados para la unión al ARN según su tamaño aumenta. Se desea mejorar la afinidad de unión de los PNA por el ARNm sin aumentar la longitud de PNA. La incorporación de los monómeros de PNA con una carga puntual sería beneficiosa para prevenir la agregación de PNA.

50 **Estrategias de penetración celular para PNA:** Los PNA no penetran rápidamente la membrana celular y tienden a mostrar una pobre actividad antisentido a menos que se transfecten apropiadamente. En los primeros años, la actividad antisentido de PNA se evaluó mediante microinyección (Science vol 258, 1481-85, 1992) o electroporación (Biochemistry vol 40, 7853-7859, 2001). La microinyección y la electroporación son invasivas e inapropiadas para propósitos terapéuticos. Con el fin de mejorar la penetración celular, se desarrollaron varias estrategias. (Adv. Drug Delivery Rev. vol 55, 267-280, 2003; Curr. Top. Med. Chem. vol 7, 727-737, 2007).

55 Los PNA se suministran eficazmente dentro de la células por la incorporación covalente de péptidos que penetran la célula (Neuropeptides vol 38, 316-324, 2004), lipofección después de la formación del híbrido con un ADN

complementario (Biochemistry vol 40, 53-64, 2001), lipofección de PNA con una 9-aminoacridina unida covalentemente. (Nucleic Acids Res. vol 32, 2695-2706, 2004), lipofección de PNA con aniones fosfonato unidos covalentemente (Nucleic Acids Res. vol 36, 4424-4432, 2008), y así sucesivamente. Además la penetración celular se mejoró por la unión de PNA a una molécula lipofílica tal como adamantano (Bioconjugate Chem. vol 10, 965-972, 1999) o un grupo anfifílico tal como tetrafenil fosfonio. (Nucleic Acids Res. vol. 29, 1852-1863, 2001) Sin embargo, tal modificación covalente es poco probable que aumente la afinidad de unión por el ARNm a pesar de mejorar marcadamente la penetración celular.

PNA con un CPP unido covalentemente: Los péptidos que penetran células (CPPs) son polipéptidos que muestran una buena penetración celular, y tienen múltiples cargas positivas de los residuos de arginina o lisina. Hasta la fecha se han descubierto muchos CPP tales como transportan, penetratin, NLS (señal de localización celular), y Tat. Se conoce que los CrPP portan eficientemente una carga unida covalentemente al interior de la célula. Los PNA con un CPP unido covalentemente además mostraron buena penetración celular.

Aunque algunos PNA con un CPP unido covalentemente mostraron IC_{50} antisentido alrededor de 100nM (Neuropeptides vol.38, 316-324, 2004), IC_{50} antisentido micromolares prevalecen para tales PNA.

Los PNA con un CPP covalentemente unido se componen de dos porciones, el dominio PNA hidrofóbico y el dominio CPP cargado positivamente. Tal PNA tiende a agregarse y atraparse en endosomas dentro de la célula, y no estaría disponible para la inhibición antisentido de la síntesis de proteína. (Curr. Top. Med. Chem. vol 7, 727-737, 2007; Nucleic Acids Res. vol 33, 6837-6849, 2005) Además, un CPP de este tipo unido covalentemente apenas aumenta la afinidad de unión del PNA por el ARNm.

PNA con una cadena quiral principal: Ha habido intentos de introducir un sustituyente quiral en la cadena principal del PNA de 2-aminoetil-glicina (Aeg). Por ejemplo, la solubilidad acuosa de PNA mejoró significativamente por la incorporación de monómero(s) de PNA con una cadena principal de 2-aminoetil-lisina en lugar de Aeg. (Angew. Chem. Int. Ed. Engl. vol 35, 1939-1941, 1996).

Mediante la introducción de la cadena principal de L-(2-amino-2-metil)etil-glicina en lugar de Aeg, la afinidad de unión de PNA por ADN y ARN mejoró significativamente. Un 10-mero de PNA con toda la cadena principal de L-(2-amino-2-metil)etil-glicina en lugar de 2-aminoetil-glicina mostró un aumento de 19°C y 10°C en la T_m contra el ADN y ARN complementarios, respectivamente. Aunque tal aumento no parece ser proporcional al número de sustitución con L-(2-amino-2-metil)etil-glicina. (J. Am. Chem. Soc. vol 128, 10258-10267, 2006).

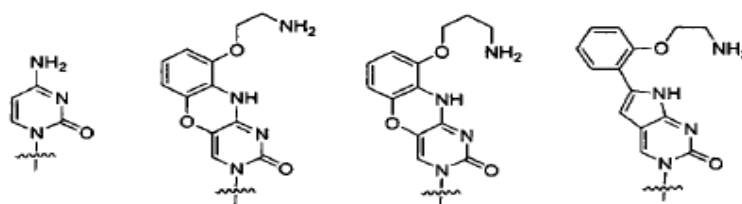
GPNA: Se informó que la penetración celular de PNA mejoró notablemente con la incorporación de monómeros con una cadena principal de 2-aminoetil-arginina en lugar de Aeg. (J. Am. Chem. Soc. vol 125, 6878-6879, 2003) Tales PNA se denominan 'GPNA' ya que tienen una porción de guanidinio en la cadena principal.

Se informó que GPNA con la cadena principal de 2-aminoetil-D-arginina tenían una afinidad más fuerte por ADN y ARN que los correspondientes GPNA con la de 2-aminoetil-L-arginina. (Chem. Commun. 244-246, 2005) Para un 10-mero de GPNA con 5 monómeros de GPNA con la cadena principal de 2-aminoetil-D-arginina hubo un aumento de 7°C en la T_m (temperatura de fusión) contra el ADN complementario en comparación al PNA correspondiente no modificado. (Bioorg. Med. Chem. Lett. vol 16, 4931-4935, 2006).

Se informó que un 16-mero de GPNA antisentido contra EGFR-TK humano mostró actividad antitumoral a partir de la administración ip (intra peritoneal) en ratones atímicos desnudos, aunque la actividad antisentido in vitro no se documentó para el GPNA antisentido en la técnica anterior. (Documento WO 2008/061091).

PNA con Nucleobase Modificada: Al igual que los casos con ADN, se han intentado modificaciones de nucleobases para mejorar la afinidad del PNA por los ácidos nucleicos.

Los PNA con la adenina remplazada con 2,6-diaminopurina se evaluaron por su afinidad por el ADN complementario o el ARN. Se encontró que la sustitución con 2,6-diaminopurina provocó un incremento de 2.5 ~ 6°C en la T_m por remplazo. (Nucleic Acids Res. vol 25, 4639-4643, 1997).



Citosina y citosinas modificadas

5

10

15

20

Los PNA con la citosina remplazada con 9-(2-aminoetoxi)fenoxazina se evaluaron por su afinidad por el ADN complementario o el ARN. Una sustitución sencilla con 9-(2-aminoetoxi)fenoxazina provocó un incremento de 10.7 ~ 23.7°C en la T_m , aunque tal incremento dependió notablemente de la secuencia de nucleótidos. La nucleobase 9-(2-aminopropoxi)fenoxazina además indujo un gran aumento en la T_m . Debido a un enorme aumento de la T_m , el monómero de PNA con ya sea 9-(2-aminoetoxi)-fenoxazina o 9-(2-aminopropoxi)fenoxazina como un remplazo de citosina se denomina 'abrazadera-G'. (Org. Lett. vol 4, 4395-4398, 2002) Sin embargo, no se informaron los datos de penetración celular para PNA con abrazadera(s)-G.

25

Los PNA con citosina remplazada con ya sea 6-{2-(2-aminoetoxi)fenil}-pirrolocitosina o 6-{2,6-di(2-aminoetoxi)fenil}pirrolocitosina se evaluaron por su afinidad por el ADN complementario o el ARN. Una sola sustitución con ya sea 6-{2-(2-aminoetoxi)fenil}pirrolocitosina o 6-{2,6-di(2-aminoetoxi)-fenil}pirrolocitosina aumento la T_m por 3 ~ 11.5°C. (J. Am. Chem. Soc. vol. 130, 12574-12575, 2008) Sin embargo, tales PNA no se evaluaron para la penetración celular.

30

Otros usos de los PNA: Mediante la unión estrecha a un microARN, el PNA puede inhibir la función regulatoria del microARN, lo que lleva a un aumento en el nivel de expresión de la proteína(s) regulada directamente por el microARN. (RNA vol. 14, 336-346, 2008) Por la unión estrecha a una ribonucleoproteína tal como la telomerasa, el PNA puede modular la función celular de la ribonucleoproteína. (Bioorg. Med. Chem. Lett, vol. 9, 1273-78, 1999) Por la unión estrecha a cierta porción de un gen en el núcleo, el PNA puede modular el nivel de transcripción del gen. (Biochemistry vol 46, 7581-89, 2007.)

35

40

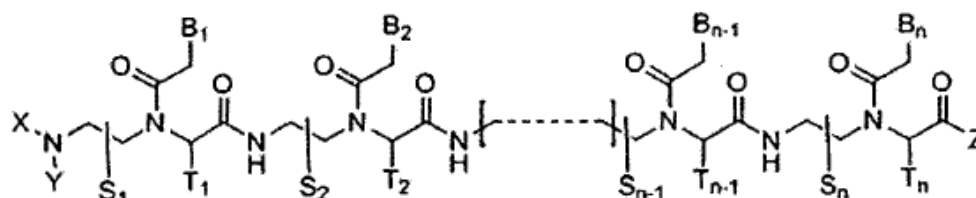
A partir de que el PNA se une fuertemente al ADN y el ARN, y discrimina sensiblemente un solo par de bases no coincidentes, el PNA sería adecuado para la detección de alta fidelidad de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP). A partir de que el PNA se une fuertemente al ADN y el ARN con alta especificidad por la secuencia, el PNA puede encontrar otras varias aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico que involucran el ADN o el ARN. (FASEB vol. 14, 1041-1060, 2000).

Resumen de la invención

45

La presente invención proporciona un ácido nucleico peptídico derivado de la **Fórmula I** o una sal farmacéuticamente aceptable de este:

50



55

Fórmula I

60

en donde

n es un entero igual a o mayor que 5;

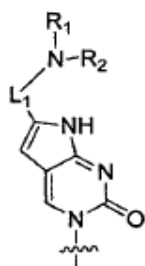
$S_1, S_2, \dots, S_{n-1}, S_n, T_1, T_2, \dots, T_{n-1}, T_n$ independientemente representan radicales hidrógeno, deuterio, alquilo sustituido o no sustituido, o arilo sustituido o no sustituido;

X y Y independientemente representan radicales hidrógeno, deuterio, alquilo sustituido o no sustituido, acilo sustituido o no sustituido, sulfonilo sustituido o no sustituido, o arilo sustituido o no sustituido;

Z representa radicales hidroxilo, alquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, o amino sustituido o no sustituido;

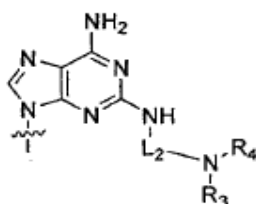
5 B₁, B₂, ..., B_{n-1}, y B_n son independientemente seleccionadas de nucleobases naturales que incluyen adenina, timina, guanina, citosina y uracilo, y nucleobases no naturales; y, al menos una de B₁, B₂, ..., B_{n-1}, y B_n es independientemente seleccionada de nucleobases no naturales representadas por la **Fórmula II**, **Fórmula III**, o **Fórmula IV**:

10

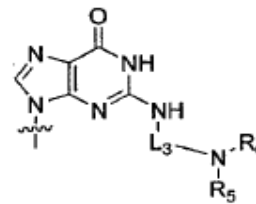


Fórmula II

15



Fórmula III



Fórmula IV

20

en donde

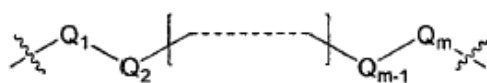
R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ y R₆ se seleccionan independientemente de radicales alquilo sustituido o no sustituido, e hidrógeno;

25

y, L₁, L₂ y L₃ son un enlazador covalente representado por la Fórmula V que conecta un grupo amino básico a la porción responsable de las propiedades de apareamiento de las nucleobase:

en donde

30



Fórmula V

35

Q₁ y Q_m son radicales metileno sustituido o no sustituido (-CH₂-), y Q_m está directamente enlazado al grupo amino básico;

Q₂, Q₃, ..., y Q_{m-1} son independientemente seleccionados de radicales metileno sustituido o no sustituido, oxígeno (-O-), azufre (-S-), y amino sustituido o no sustituido [-N(H)-, o -N(sustituyente)-]; y, m es un número entero de 2 a 15.

40

Un oligómero de PNA de la Fórmula I muestra una afinidad de unión por el ácido nucleico y penetración celular mejoradas en comparación a su correspondiente oligómero de PNA 'no modificado'. Los oligómeros de PNA de esta invención son útiles para inhibir o modular específicamente por la secuencia funciones celulares y fisiológicas mediadas por los ácidos nucleicos o moléculas fisiológicamente activas que tiene un dominio de ácido nucleico tales como las ribonucleoproteínas. Además los oligómeros de PNA de esta invención son útiles para propósitos de diagnóstico debido a su capacidad de unión específica por la secuencia de los ácidos nucleicos.

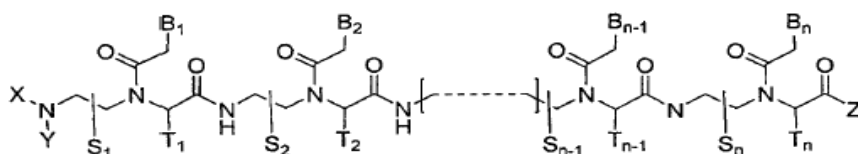
45

Descripción de la invención

50

La presente invención proporciona una nueva clase de oligómeros de PNA representados por la **Fórmula I**, o una sal farmacéuticamente aceptable de estos:

55



Fórmula I

60

en donde

n es un entero igual a o mayor que 5;

$S_1, S_2, \dots, S_{n-1}, S_n, T_1, T_2, \dots, T_{n-1},$ y T_n independientemente representan radicales hidrógeno, deuterio, alquilo sustituido o no sustituido, o arilo sustituido o no sustituido;

5 X y Y independientemente representan radicales hidrógeno, deuterio, hidroxilo, alquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, amino sustituido o no sustituido, alquilo sustituido o no sustituido, acilo sustituido o no sustituido, sulfonilo sustituido o no sustituido, o arilo sustituido o no sustituido;

Z representa radicales hidrógeno, deuterio, hidroxilo, alquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, amino sustituido o no sustituido, alquilo sustituido o no sustituido, o arilo sustituido o no sustituido;

10 $B_1, B_2, \dots, B_{n-1},$ y B_n son independientemente seleccionadas de nucleobases naturales que incluyen adenina, timina, guanina, citosina y uracilo, y nucleobases no naturales; y,

al menos una de $B_1, B_2, \dots, B_{n-1},$ y B_n independientemente representa una nucleobase no natural con un radical amino sustituido o no sustituido covalentemente unido a la porción responsable de sus propiedades de apareamiento de las nucleobase.

15 Un oligómero de PNA de esta invención muestra penetración celular y unión al ácido nucleico mejoradas en comparación con su correspondiente oligómero de PNA 'no modificado'. En esta invención, oligómero de PNA 'no modificado' se refiere a un oligómero de PNA de la **Fórmula I**, en donde $S_1, S_2, \dots, S_{n-1}, S_n, T_1, T_2, \dots, T_{n-1},$ y T_n son radicales hidrógeno; y $B_1, B_2, \dots, B_{n-1},$ y B_n son independientemente seleccionadas de nucleobases naturales que comprenden adenina, timina, guanina, y citosina.

20 Un oligómero de PNA de esta invención penetra rápidamente la membrana celular de mamíferos, y puede afectar o alterar las funciones celulares por la unirse específicamente por la secuencia a un ácido nucleico o una nucleoproteína dentro de la célula.

25 Un oligómero de PNA de la **Fórmula I** puede inhibir potentemente la síntesis de proteína ribosomal por unirse fuertemente al ARNm. Un oligómero de PNA de la presente invención puede unirse fuertemente al pre-ARNm y alterar el empalme del pre-ARNm a ARNm. Más aun, un oligómero de PNA de la presente invención puede unirse fuertemente a un microARN, e inhibir la degradación del ARNm inducida por el microARN.

30 Un oligómero de PNA de la **Fórmula I** puede predeciblemente unirse al dominio del ácido nucleico de una ribonucleoproteína, por ejemplo la telomerasa, y modular su función(es) fisiológica(s). Un oligómero de PNA de la presente invención puede unirse a un gen y modular la transcripción del gen. Un oligómero de PNA de la Fórmula I puede unirse a un gen viral o su transcrito, e inhibir la proliferación del virus. Un oligómero de PNA de esta invención puede afectar funciones celulares diferentes de aquellas descritas anteriormente por unirse específicamente por la secuencia a un ácido nucleico o una nucleoproteína dentro de la célula de mamífero. Adicionalmente, un oligómero de PNA de la presente invención puede unirse fuertemente a un ARNm bacteriano, ácido nucleico, o gen, e inhibir la proliferación bacteriana o alterar los perfiles de biosíntesis bacteriana.

40 Un oligómero de PNA de esta invención es altamente sensible a una base no coincidente en la unión a su contraparte de ADN complementario, y sería apropiado para detectar polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) con alta fidelidad. Los oligómeros de PNA de la presente invención se unen fuertemente a sus ADN complementarios con alta especificidad por la secuencia, y pueden ser útiles para el perfilado de genes. Un oligómero de PNA de la **Fórmula I** puede ser útil para sondear o localizar una molécula que porta un ácido nucleico tal como el telómero dentro de la célula si se etiqueta apropiadamente con un cromóforo, por ejemplo un fluoróforo. Los oligómeros de PNA de esta invención pueden ser útiles para una variedad de propósitos de diagnóstico o analíticos diferentes de aquellos detallados anteriormente.

50 Un oligómero de PNA de la presente invención posee buena solubilidad acuosa en comparación al correspondiente oligómero de PNA 'no modificado', y puede usarse como una solución disuelto en agua, salina, o un amortiguador. Un oligómero de PNA de la Fórmula I puede formularse con un lípido catiónico tal como la lipofectamina. Un oligómero de PNA de esta invención puede hibridar con un ADN complementario y el híbrido resultante puede formularse con un lípido catiónico.

55 Un oligómero de PNA de esta invención puede formularse en una variedad de dosificaciones que incluyen pero sin limitarse a formulación inyectable, aerosol nasal, tableta, gránulos, cápsulas duras, cápsulas suaves, formulación liposomal, suspensión oral, formulación transdérmica, y así sucesivamente.

60 Un oligómero de PNA de la presente invención puede administrarse a un sujeto en una dosis terapéuticamente efectiva, que variará en dependencia de la indicación, vía de administración, esquema de dosificación, situaciones del sujeto, y así sucesivamente.

Un oligómero de PNA de la presente invención puede administrarse a un sujeto por una variedad de vías que incluyen

pero no se limitan a inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intraperitoneal, inhalación nasal, administración oral, aplicación transdérmica, y así sucesivamente.

5 Un oligómero de PNA de la **Fórmula I** puede administrarse a un sujeto en conjunto con un adyuvante farmacéuticamente aceptable que incluyen pero sin limitarse a ácido cítrico, ácido clorhídrico, ácido tartárico, ácido esteárico, polietilenglicol, polipropilenglicol, etanol, bicarbonato de sodio, agua destilada, ácido hialurónico, lípido catiónico tal como la lipofectamina, almidón, gelatina, talco, ácido ascórbico, aceite de oliva, aceite de palma, metilcelulosa, óxido de titanio, sodio carboximetilcelulosa, edulcorante, preservativo, y así sucesivamente.

10 Un oligómero de PNA de la presente invención, en dependencia de la presencia del grupo(s) funcional básico o ácido en él, puede usarse neutralizado con una cantidad equivalente de un ácido o base farmacéuticamente aceptable que incluyen pero sin limitarse a hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, ácido clorhídrico, ácido metanosulfónico, ácido cítrico, y así sucesivamente.

15 Los oligómeros de PNA preferidos abarcan los oligómeros de PNA de la Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable de estos:

en donde

n es un entero igual a o mayor que 5 pero menor que o igual a 30;

$S_1, S_2, \dots, S_{n-1}, S_n, T_1, T_2, \dots, T_{n-1},$ y T_n son radicales hidrógeno;

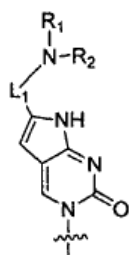
X y Y son independientemente seleccionados de radicales hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido, acilo sustituido o no sustituido, sulfonilo sustituido o no sustituido, y arilo sustituido o no sustituido;

Z representa radicales hidrógeno, hidroxilo, alquilo sustituido o no sustituido, amino sustituido o no sustituido, alquilo sustituido o no sustituido, o arilo sustituido o no sustituido;

25 $B_1, B_2, \dots, B_{n-1},$ y B_n son independientemente seleccionadas de nucleobases naturales que incluyen adenina, timina, guanina, citosina y uracilo, y nucleobases no naturales; y,

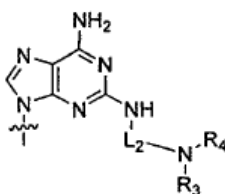
al menos una de $B_1, B_2, \dots, B_{n-1},$ y B_n es independientemente seleccionada de nucleobases no naturales representadas por la **Fórmula II**, **Fórmula III**, o **Fórmula IV**:

30

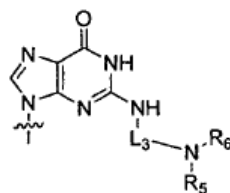


Fórmula II

35



Fórmula III



Fórmula IV

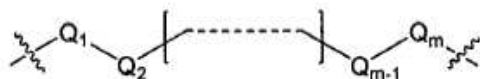
40

en donde

45 R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 y R_6 son independientemente seleccionados de radicales alquilo sustituido o no sustituido, hidrógeno, hidroxilo, y alquilo sustituido o no sustituido; y,

L_1, L_2 y L_3 son un enlazador covalente representado por la **Fórmula V** que conecta un grupo amino básico a la porción responsable de las propiedades de apareamiento de las nucleobase:

50



Fórmula V

55

en donde

Q_1 y Q_m son radicales metileno sustituido o no sustituido ($-CH_2-$), y Q_m está directamente enlazado al grupo amino básico;

60 Q_2, Q_3, \dots, Q_{m-1} son independientemente seleccionados de radicales metileno sustituido o no sustituido, oxígeno ($-O-$), azufre ($-S-$), y amino sustituido o no sustituido [$-N(H)-$, o $-N(\text{sustituyente})-$]; y,

m es un entero igual a o mayor que 2 pero menor que o igual a 15.

Los oligómeros de PNA de interés particular comprenden los oligómeros de PNA de la **Fórmula I**, o una sal farmacéuticamente aceptable de estos:

- 5 en donde
 n es un entero igual a o mayor que 8 pero menor que o igual a 25;
 $S_1, S_2, \dots, S_{n-1}, S_n, T_1, T_2, \dots, T_{n-1},$ y T_n son radicales hidrógeno;
 X y Y son independientemente seleccionados de radicales hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido, y acilo sustituido o no sustituido;
 10 Z representa radicales hidroxilo, o amino sustituido o no sustituido;
 $B_1, B_2, \dots, B_{n-1},$ y B_n son independientemente seleccionadas de nucleobases naturales que incluyen adenina, timina, guanina, citosina y uracilo, y nucleobases no naturales;
 al menos dos de $B_1, B_2, \dots, B_{n-1},$ y B_n son independientemente seleccionadas de nucleobases no naturales representadas por la **Fórmula II, Fórmula III, o Fórmula IV**;
 15 R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 y R_6 son independientemente seleccionados de radicales alquilo sustituido o no sustituido, e hidrógeno;
 Q_1 y Q_m son radicales metileno sustituido o no sustituido, y Q_m está directamente enlazado al grupo amino básico;
 $Q_2, Q_3, \dots,$ y Q_{m-1} son independientemente seleccionados de radicales metileno sustituido o no sustituido, oxígeno, y amino ; y,
 20 m es un entero igual a o mayor que 2 pero menor que o igual a 12.

Los oligómeros de PNA de alto interés comprenden los oligómeros de PNA de la **Fórmula I**, o una sal farmacéuticamente aceptable de estos:

- 25 en donde,
 n es un entero igual a o mayor que 10 pero menor que o igual a 25;
 $S_1, S_2, \dots, S_{n-1}, S_n, T_1, T_2, \dots, T_{n-1},$ y T_n son radicales hidrógeno;
 X y Y son independientemente seleccionados de radicales hidrógeno, y acilo sustituido o no sustituido;
 30 Z representa radicales hidroxilo, alquilo, o amino sustituido o no sustituido; y,
 $B_1, B_2, \dots, B_{n-1},$ y B_n son independientemente seleccionadas de nucleobases naturales que incluyen adenina, timina, guanina, citosina y uracilo, y nucleobases no naturales;
 al menos tres de $B_1, B_2, \dots, B_{n-1},$ y B_n son independientemente seleccionadas de nucleobases no naturales representadas por la **Fórmula II, Fórmula III, o Fórmula IV**;
 35 R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 y R_6 son independientemente seleccionados de radicales alquilo sustituido o no sustituido, e hidrógeno;
 Q_1 y Q_m son radicales metileno, y Q_m está directamente enlazado al grupo amino básico;
 $Q_2, Q_3, \dots,$ y Q_{m-1} son independientemente seleccionados de radicales metileno, oxígeno, y amino; y,
 40 m es un entero igual a o mayor que 2 pero menor que o igual a 10.

Los oligómeros de PNA de más alto interés abarcan los oligómeros de PNA de la **Fórmula I**, o una sal farmacéuticamente aceptable de estos:

- 45 en donde,
 n es un entero igual a o mayor que 10 pero menor que o igual a 20;
 $S_1, S_2, \dots, S_{n-1}, S_n, T_1, T_2, \dots, T_{n-1},$ y T_n son radicales hidrógeno;
 X y Y son independientemente seleccionados de radicales hidrógeno, y acilo sustituido o no sustituido;
 Z representa radicales hidroxilo, o amino sustituido o no sustituido;
 50 $B_1, B_2, \dots, B_{n-1},$ y B_n es independientemente seleccionada de nucleobases naturales que incluyen adenina, timina, guanina, citosina y uracilo, y nucleobases no naturales;
 al menos tres de $B_1, B_2, \dots, B_{n-1},$ y B_n son independientemente seleccionadas de nucleobases no naturales representadas por la **Fórmula II, Fórmula III, o Fórmula IV**;
 $R_1, R_3,$ y R_5 son radicales hidrógeno, y $R_2, R_4,$ y R_6 independientemente representan radicales hidrógeno, o amidinilo sustituido o no sustituido;
 55 Q_1 y Q_m son radicales metileno, y Q_m está directamente enlazado al grupo amino básico;
 $Q_2, Q_3, \dots,$ y Q_{m-1} son independientemente seleccionados de radicales metileno, oxígeno, y amino; y,
 m es un entero igual a o mayor que 2 pero menor que o igual a 10.

Los oligómeros de PNA de máximo interés comprenden los oligómeros de PNA de la **Fórmula I**, o una sal farmacéuticamente aceptable de estos:


- 60 en donde,
 n es un entero igual a o mayor que 10 pero menor que o igual a 20;

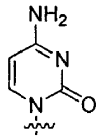
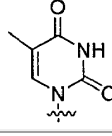
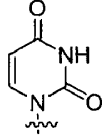
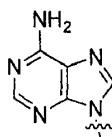
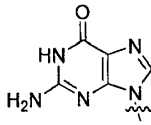
S₁, S₂, ..., S_{n-1}, S_n, T₁, T₂, ..., T_{n-1}, y T_n son radicales hidrógeno;
 X y Y son independientemente seleccionados de radicales hidrógeno, y acilo sustituido o no sustituido;
 Z representa radicales hidroxilo, o amino sustituido o no sustituido;
 B₁, B₂, ..., B_{n-1}, y B_n son independientemente seleccionadas de adenina, timina, guanina, citosina, y nucleobases no naturales;
 al menos tres de B₁, B₂, ..., B_{n-1}, y B_n son independientemente seleccionadas de nucleobases no naturales representadas por la **Fórmula II**, **Fórmula III**, o **Fórmula IV**;
 R₁, R₃, y R₅ son radicales hidrógeno, y R₂, R₄, y R₆ independientemente representa radicales hidrógeno o amidinilo;
 Q₁ y Q_m son radicales metileno, y Q_m está directamente enlazado al grupo amino básico;
 Q₂, Q₃, ..., y Q_{m-1} son independientemente seleccionados de radicales metileno, y oxígeno; y,
 m es un entero igual a o mayor que 2 pero menor que o igual a 8.

Los oligómeros de PNA específicos de fuerte interés comprenden los oligómeros de PNA de la **Fórmula I**, o una sal farmacéuticamente aceptable de estos:

en donde
 n es un entero igual a o mayor que 8 pero menor que o igual a 20;
 S₁, S₂, ..., S_{n-1}, S_n, T₁, T₂, ..., T_{n-1}, y T_n son radicales hidrógeno;
 X es un radical hidrógeno;
 Y representa radicales hidrógeno, o acilo sustituido o no sustituido;
 Z representa radicales hidroxilo, o amino sustituido o no sustituido;
 B₁, B₂, ..., B_{n-1}, y B_n son independientemente seleccionadas de adenina, timina, guanina, citosina, y nucleobases no naturales;
 al menos tres de B₁, B₂, ..., B_{n-1}, y B_n son independientemente seleccionadas de nucleobases no naturales representadas por la **Fórmula II**, **Fórmula III**, o **Fórmula IV**;
 R₁, R₃, y R₅ son radicales hidrógeno, y R₂, R₄, y R₆ independientemente representan radicales hidrógeno o amidinilo;
 L₁ representa -(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-, -CH₂-O-(CH₂)₂-, o -CH₂-O-(CH₂)₃- con el extremo derecho directamente enlazado al grupo amino básico; y,
 L₂ y L₃ son independientemente seleccionados de -(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-, -(CH₂)₃-O-(CH₂)₂-, -(CH₂)₂-O-(CH₂)₃-, -(CH₂)₂-, -(CH₂)₃-, -(CH₂)₄-, -(CH₂)₅-, -(CH₂)₆-, -(CH₂)₇-, y -(CH₂)₈- con el extremo derecho está directamente enlazado al grupo amino básico.

Los términos y abreviaturas usados anteriormente para los oligómeros de PNA de esta invención se ilustran en la tabla más abajo.

| Término/Abreviatura | Ilustración o definición |
|---------------------|---|
| oligómero | oligonucleótido. |
| hidrógeno | átomo de hidrógeno (-H) solo |
| deuterio | átomo de deuterio (-D) solo |
| alquilo | radical alquilo recto o ramificado |
| arilo | grupo aromático tal como fenilo, piridilo, furilo, naftilo, etc |
| metileno | -(CH ₂)- |
| acilo | '-C(O)-' sustituido con radicales hidrógeno, alquilo, o arilo |
| sulfonilo | '-S(O) ₂ -' sustituido con radicales alquilo, o arilo |
| alquiloxi | 'R-O-' donde R es un radical alquilo sustituido o no sustituido |
| oxígeno | '-O-' |
| azufre | '-S-' |
| amidinilo |  |

| | | | |
|----|----|--------------|--|
| 5 | 5 | citosina (C) |  |
| 10 | 10 | timina (T) |  |
| 15 | 15 | uracilo (U) |  |
| 20 | 20 | adenina (A) |  |
| 25 | 25 | guanina (G) |  |

35 Procedimientos generales de síntesis

Para la caracterización de las moléculas de esta invención se registró el espectro de NMR en un espectrómetro de NMR Varian Mercury 300MHz, Bruker Avance 400MHz, o Varian Inova 500MHz. Se empleó ya sea un Bruker Daltonics Ultraflex MALDI-TOF o un sistema de trampa de iones Agilent LC/MS para la determinación del peso molecular. Los oligómeros de PNA se analizaron y purificaron por HPLC C₁₈- de fase inversa ya sea en un HPLC Hewlett Packard 1050 o un HPLC Shimadzu LC-6AD. A menos que se indique de otra manera, se usó gel de sílice para la separación cromatográfica de las pequeñas moléculas preparadas en esta invención. El punto de fusión se informa no corregido.

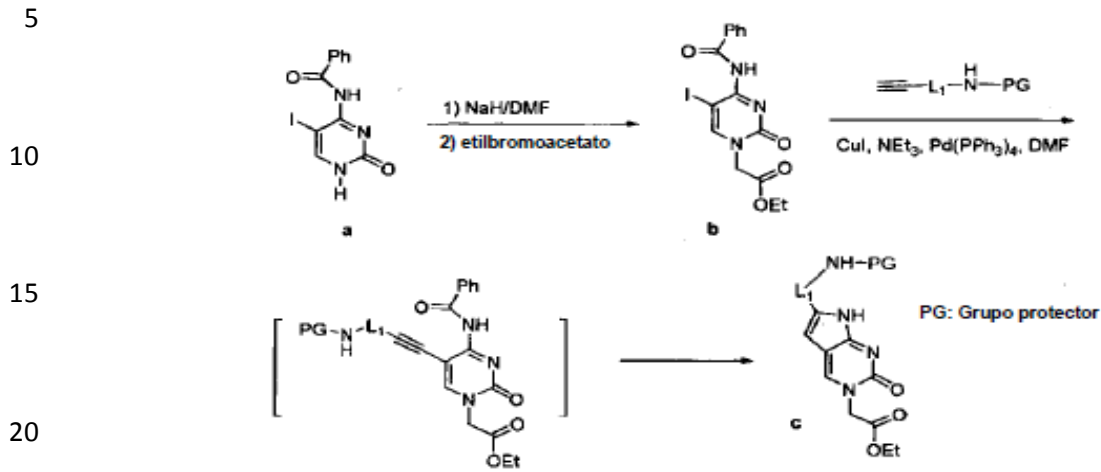
Los derivados de nucleobases no naturales usados para la síntesis de monómeros de PNA de esta invención se prepararon de acuerdo a uno de los métodos (Métodos A, B, y C) proporcionados más abajo o con modificación(es) menor de ellos, a menos que se detalle de otra forma en ejemplos reales sintéticos.

Método A: Los derivados 6-alkil-pirollocitosina se sintetizaron protegidos adecuadamente de acuerdo al Esquema 1 o con variación(es) menor de este. Tales derivados 6-alkil-pirollocitosina se usaron para sintetizar monómeros de PNA que contienen una nucleobase representados por la **Fórmula II** como un equivalente de citosina.

Primero el compuesto **a** se desprotonó con NaH y después se alquiló con etilbromoacetato para obtener el compuesto **b**. El compuesto **b** se sometió a un acoplamiento catalizado por paladio con el derivado acetileno terminal de **a** que se anuló in situ al producto **c** de acuerdo con la literatura. (Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids vol 22, 1029-1033, 2003).

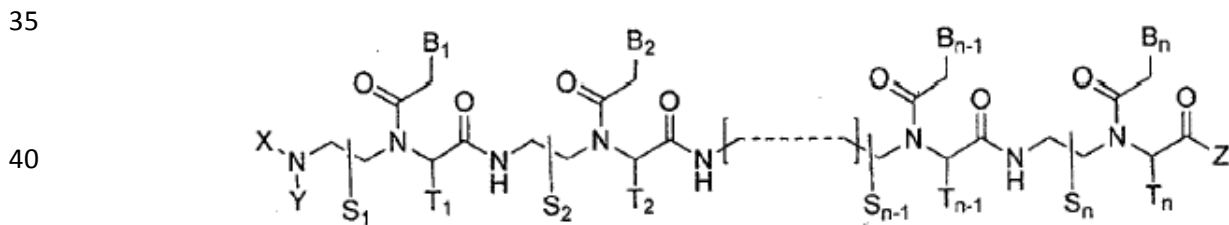
60

Esquema 1



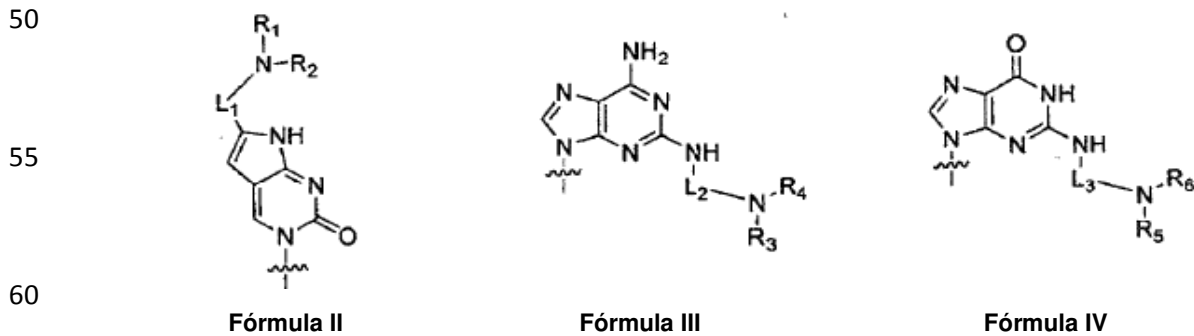
25 Método B: Los derivados 2,6-diaminopurina se sintetizaron protegidos adecuadamente de acuerdo al Esquema 2 o con variación(es) menor de este. Tales derivados 2,6-diamino-purina se usaron para sintetizar monómeros de PNA que contienen una nucleobase representada por la **Fórmula III** como un equivalente de adenina.

30 Primero la 2-haloadenina reaccionó con una diamina a alta temperatura para obtener el compuesto **d**, que después reaccionó con Boc_2O para dar el compuesto **e**. El compuesto **e** se desprotonó con NaH, y se alquiló con etilbromoacetato para obtener el compuesto **f**. El grupo amino aromático del compuesto **f** se protegió ya sea con el grupo Cbz o Boc para producir el compuesto **g**.



Fórmula I

45 Método C: Derivados N-alkilados de guanina se sintetizaron adecuadamente protegidos de acuerdo con el esquema 3 o con variaciones menores de este. Tales derivados de guanina se usaron para sintetizar monómeros de PNA que contienen una nucleobase representada por la **Fórmula IV** como un equivalente de guanina.



Primero la 2-haloadenina reaccionó con una diamina a alta temperatura para obtener el compuesto **h**, que después reaccionó con Boc₂O para dar el compuesto **i**. El compuesto **i** se desprotonó con NaH, y se alquiló con etilbromoacetato para obtener el compuesto **j**.

5

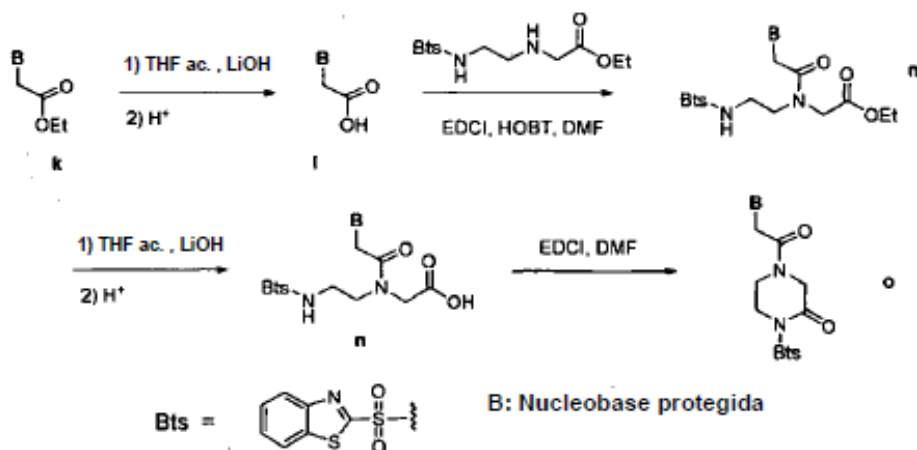
Se sintetizaron dos tipos de monómeros de PNA de acuerdo con ya sea el Método D o el Método E para preparar oligómeros de PNA de la **Fórmula I**. Los oligómeros de PNA se prepararon por Panagene, Inc. (www.panagene.com, Daejeon, Corea del Sur) por medio del uso de monómeros de PNA del tipo o del esquema 4 por pedido de CTI Bio. Alternativamente, los monómeros de PNA de tipo q del esquema 5 se usaron en-casa para la síntesis de oligómeros de PNA de acuerdo con el método descrito en la técnica anterior o con modificación(es) menor de estos. (USP 6,133,444)

10

Método D: Los monómeros de PNA con una nucleobase modificada se prepararon de acuerdo con el esquema 4 o con variación(es) menor de estos protegidos adecuadamente para el método de síntesis del oligómero de PNA descrito en la literatura. (Org. Lett. vol. 9, 3291-3293, 2006) En el Esquema 4, el compuesto **k** puede corresponder al compuesto c del esquema 1, al compuesto **g** del esquema 2, o al compuesto **j** del esquema 3, sin embargo puede no limitarse necesariamente a uno de estos compuestos éster.

15

Esquema 4



20

25

30

35

40

Primero el éster **k** se sometió a hidrólisis alcalina para proporcionar el ácido **i**, que después se acopló con etil N-[2-(N-(2-benzotiazolinil)sulfonilamino)etil]glicinato para obtener el compuesto **m**. El compuesto **m** se hidrolizó ligeramente con LiOH para dar el ácido **n**, que se hizo cíclico por la reacción de acoplamiento EDCI para obtener el monómero de PNA modificado **o**. La estructura química para el monómero de PNA **o** se asumió como en el Esquema 4 a lo largo de esta invención, dado que tales monómeros de PNA asignados han rendido exitosamente oligómeros de PNA en la literatura. (Org. Lett. vol 9, 3291-3293, 2006).

45

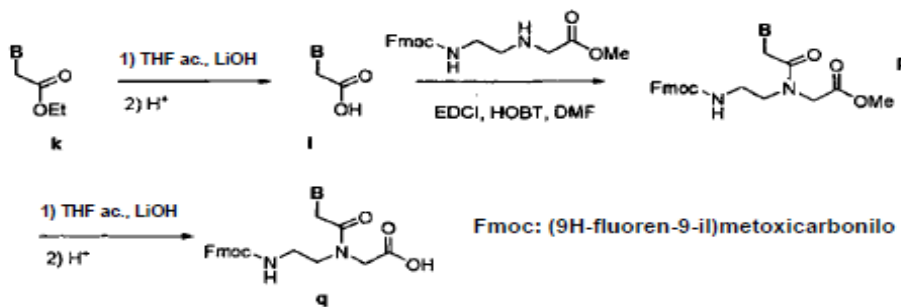
Método E: Alternativamente, los monómeros de PNA con una nucleobase modificada se prepararon de acuerdo con el esquema 5 o con variación(es) menor(es) de este protegidos adecuadamente para el método de síntesis del oligómero de PNA descrito en la técnica anterior. USP 6,133,444) En el Esquema 5, el compuesto **k** puede corresponder al compuesto **c** del esquema 1, al compuesto **g** del Esquema 2, o al compuesto **j** del Esquema 3, sin embargo puede no limitarse necesariamente a uno de estos compuestos éster.

50

55

60

Esquema 5



Primero el ácido I se acopló con etil N-[2-{N-(9H-fluoren-9-il)amino}etil]-glicinato para obtener el compuesto p por una reacción de acoplamiento EDCI. Después el compuesto p se hidrolizó ligeramente con LiOH para obtener el monómero de PNA q con una nucleobase modificada.

Los siguientes ejemplos contienen descripciones detalladas de los métodos de preparación para los compuestos de esta invención. Las descripciones detalladas de estos ejemplos se presentan para propósitos ilustrativos solamente y no deben interpretarse como una restricción a la presente invención. La mayoría de estas descripciones detalladas caen dentro del alcance, y sirven para ejemplificar los PROCEDIMIENTOS SINTÉTICOS GENERALES descritos anteriormente que forman una parte de la invención. Las abreviaturas usadas en los siguientes ejemplos se definen en la siguiente tabla.

| Categoría | Designación |
|--------------------|--|
| ¹ H NMR | Resonancia magnética nuclear de protones. Al presentar los datos de NMR, abreviaturas ampliamente aceptadas se usaron como sigue: s para singulete, d para doblete, t para triplete, q para cuarto, m para multiplete, br para amplio, J para constante de acoplamiento, CDCl ₃ para cloroformo deuterado, DMSO _{d6} para DMSO hexa-deuterado, y así sucesivamente. |
| MS | Espectroscopia de masas Al presentar los datos de MS, se usaron abreviaturas popularmente aceptadas como sigue: MALDI-TOF para ionización desorción láser asistida por matriz tiempo de vuelo, ESI para ionización por electrospray, MW para peso molecular, (m+1) para MH ⁺ máximo de ion, (m+23) para MNa ⁺ máximo de ión, etc. |
| Solventes | Se usaron abreviaturas ampliamente aceptadas para los solventes como sigue: THF para tetrahidrofurano, MC para cloruro de metileno, DMF para dimetilformamida, EtOH para etanol, MeOH para metanol, DMSO para dimetilsulfóxido, EA para acetato de etilo, y así sucesivamente. |
| Reactivos | Se usaron abreviaturas popularmente aceptadas para los reactivos como sigue: NaH para hidruro de sodio, HCl para ácido clorhídrico, EDCI para hidrocloreuro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida, HOBT para 1-hidroxi-benzotriazol, Boc para t-butiloxycarbonil, Boc ₂ O para Boc anhídrido o di-t-butil-dicarbonato, Cbz para benziloxycarbonilo, Fmoc para (9H-fluoren-9-il)-metoxycarbonilo, Bts para (benzo[d]tiazol-2-sulfonilo), Bts-Cl para cloruro de (benzo-[d]tiazol-2-sulfonilo), TFA para ácido trifluoacético, TEA para trietil-amina, DIEA para N,N-diisopropiletilamina, LiOH para hidróxido de litio, Aeg para N-(2-aminoetil)glicina, Fmoc-Aeg-OH para N-[2-{(9H-fluoren-9-il)-metoxycarbonilo}amino-etil]glicina, Fmoc-Aeg-OMe para metil N-[2-(Fmoc-amino)etil]-glicinato, Fmoc-Aeg-OtBu para t-butil N-[2-(Fmoc-amino)etil]-glicinato, Fmoc-Aeg-OSu para N-succinil N-[2-(Fmoc-amino)-etil]-glicinato, HBTU para O-(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurano hexafluorofosfato, DCC para 1,3-diciclohexilcarbodiimida, y así sucesivamente. |
| Otros | Se usaron abreviaturas ampliamente aceptadas para las terminologías como sigue: mp para punto de fusión, °C para grado en Celcius, h para hora, min para minuto, g para gramo, mg para miligramo, kg para kilogramo, l para litro, ml para mililitro, M para mol/l, comp. para compuesto, ac. para acuoso, TA para temperatura ambiente, y así sucesivamente. |

Ejemplo 1: Preparación de 3-((t-butoxicarbonil)amino)-1-propanol (1).



5

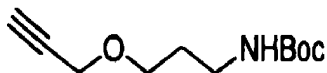
A 14g de 3-amino-1-propanol disueltos en 150ml de THF y 150ml de agua, se añadió en forma de gotas durante 30min 40.7g de Boc₂O disueltos en 100ml de THF. Después que la mezcla de reacción se agitó por 24h, el THF se eliminó a presión reducida. La capa ac. resultante se extrajo con 200ml de EA, y la capa orgánica se lavó con 0.5M ácido cítrico ac. y con agua destilada, y después se secó sobre sulfato magnésico anhidro. El sulfato magnésico se filtró, y el filtrado resultante se concentró al vacío para dar 25g del comp. **1** como un líquido incoloro. ¹H NMR (400MHz; CDCl₃): δ 4.84 (br s, 1H), 3.66 (t, J = 5.6 Hz, 2H), 3.28 (q, J = 6.0 Hz, 2H), 3.05 (br s, 1H), 1.66 (m, 2H), 1.45 (s, 9H).

Ejemplo 2: Preparación de etil ((N-benzoil)-5-iodocitosina-1-il)acetato (2).

A una solución agitada de 8.3g de N-benzoil-5-iodocitosina disueltos en 60ml de DMF, se añadió a 0°C 1.06g de 55% NaH en aceite mineral, y la solución se agitó a temperatura ambiente por 2h. Después que 2.7ml de bromoacetato de etilo se añadieran a la mezcla de reacción, la solución de reacción se agitó por otras 24h a temperatura ambiente, a lo cual siguió la eliminación del solvente a presión reducida. El residuo resultante se disolvió y el material insoluble se filtró. El filtrado se lavó dos veces con cloruro amónico saturado ac., se secó sobre sulfato magnésico anhidro, y se concentró al vacío. El residuo resultante se purificó por cromatografía de columna (1:1 hexano/EA) para producir 6.5g del comp. **2** (comp. **b** en el Esquema 1) como un sólido amarillo. mp 154-5°C. ¹H NMR (400MHz; CDCl₃) δ 13.31 (br s, 1H), 8.37 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 7.69 (s, 1H), 7.55 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 7.46 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 4.49 (s, 2H), 4.27 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 1.32 (t, J = 7.2 Hz, 3H).

Ejemplo 3: Preparación de 3-{3-(t-butoxicarbonilamino)propiloxi}-1-propino (3).

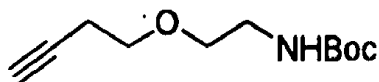
30



A 6.5g de 55% NaH en aceite mineral dispersados en 150ml de THF a 0°C, se añadieron en forma de gotas durante 15 min 25g del comp. **1**, y la mezcla se agitó por 1h. Después que 17.5ml de bromuro de propargilo (80% solución de tolueno) se añadieran en forma de gotas durante 30min, la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente por 20h. La reacción se apagó al añadir lentamente 250ml de agua y el THF se eliminó a presión reducida. Después, la mezcla ac. resultante se extrajo con 250ml de EA, la cual se lavó 3 veces con 250ml de agua. La capa orgánica se secó sobre sulfato magnésico anhidro, y el sulfato magnésico se filtró. El filtrado resultante se concentró al vacío y se sometió a cromatografía de columna (5:1 hexano/EA) para proporcionar 22.7g del comp. **3** como un líquido amarillo. ¹H NMR (400 MHz; DMSO-d₆) δ 6.78 (t, J = 5.2 Hz, 1H), 4.09 (d, J = 2.4 Hz, 2H), 3.43-3.39 (m, 3H), 2.95 (q, J = 6.4 Hz, 2H), 1.60 (m, 2H), 1.37 (s, 9H).

Ejemplo 4: Preparación de 4-{2-(t-butoxicarbonilamino)etoxi}-1-butino (4)

45

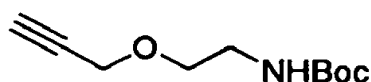


50

A 3.8g de 4-(2-azidoetoxi)-1-butino disueltos en 17ml de THF, se añadieron 7.2g de trifenilfosfina y 0.7ml de agua, y la mezcla de reacción se agitó por 8h, a lo cual siguió la eliminación del solvente a presión reducida. Después, el residuo resultante se disolvió en 20ml de EA y se extrajo dos veces con 10ml 1M HCl ac. Carbonato sódico ac. se añadió a la capa ac. para ajustar el pH a 9 ~ 10. 5.96g de Boc₂O disueltos en 15ml de THF se añadieron a la solución, y la mezcla de reacción se agitó por 12h. Después que el THF se eliminó al vacío, la solución resultante se extrajo con EA. La capa orgánica se lavó con 0.5M ácido cítrico ac., y se secó sobre sulfato magnésico anhidro. La capa orgánica se concentró y se purificó por cromatografía de columna (9:1 hexano/EA) para proporcionar 3.4g del comp. **4** como un aceite amarillo. ¹H NMR (400MHz; CDCl₃) δ 4.95 (s, 1H), 3.58 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 3.53 (t, J = 5.0 Hz, 2H), 3.32 (m, 2H), 2.46 (m, 2H), 2.00 (t, J = 2.8 Hz, 1H), 1.45 (s, 9H).

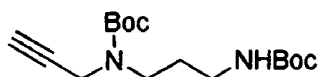
60

Ejemplo 5: Preparación de 3-{2-(t-butoxicarbonilamino)etoxi}-1-propino (5).



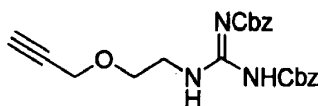
5 20g de 2-((t-butoxycarbonylamino)ethoxy)prop-1-yne reaccionaron y se purificaron siguiendo de manera similar el procedimiento descrito en el [Ejemplo 3](#) para proporcionar 23.7g del comp. **5** como un aceite amarillo pálido. $^1\text{H NMR}$ (400MHz; DMSO-d_6) δ 6.81 (t, 1H), 4.11 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H), 3.41 (m, 3H), 3.07 (q, $J = 6.0$ Hz, 2H), 1.38 (s, 9H).

10 [Ejemplo 6](#): Preparación de 3-[N-(3-(t-butoxycarbonylamino)propil)-N-(t-butoxi-carbonil)amino]-1-propino (6)



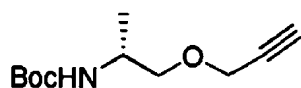
15 A una solución agitada de N-[3-(t-butoxycarbonylamino)propil]-N-(2-propinil)amina disueltos en 83ml de THF y 95ml de agua, se añadieron en forma de gotas 42g de Boc_2O a temperatura ambiente. La solución de reacción se agitó por 1.5h, y se concentró al vacío. La capa ac. resultante se extrajo con EA. La capa de EA se lavó en serie con 0.5M ácido cítrico ac. y salmuera, se secó sobre sulfato magnésico anhidro, se concentró a presión reducida, y se purificó por cromatografía de columna (1:1 hexano/EA) para dar 19g del comp. **6** como un aceite amarillo. $^1\text{H NMR}$ (400MHz; CDCl_3) δ 5.26 (br s, 0.6H), 4.74 (br s, 0.4H), 4.07 (br s, 1H), 3.98 (br s, 1H), 3.40 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 3.13 (m, 2H), 2.21 (t, 1H), 1.73 (m, 2H), 1.49 (s, 9H), 1.45 (s, 9H).

25 [Ejemplo 7](#): Preparación de 3-[2-[2,3-bis(benciloxycarbonyl)guanidino]-etoxi]-1-propino (7)



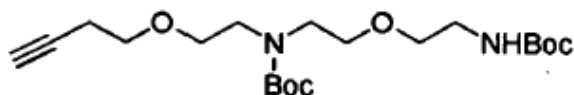
30 A una solución agitada de 10.9g del comp. **5** disueltos en 110ml de MC, se añadieron 110ml de TFA a 0°C en forma de gotas durante 2h, y la mezcla de reacción se agitó por otras 3h. La solución de reacción se concentró a presión reducida y el residuo resultante se disolvió en 40ml de MC a 0°C , a lo cual se añadieron 12.3ml de TEA y después 8.8g de 1,3-bis(benciloxycarbonyl)-2-(metiltio)pseudourea a temperatura ambiente. La solución de reacción se agitó por 4h y se lavó dos veces con agua. La capa orgánica se secó sobre sulfato magnésico anhidro, se concentró al vacío, y se sometió a cromatografía de columna (5:1 hexano/EA) para proporcionar 9.8g del comp. **7** como un sólido blanco. $^1\text{H NMR}$ (400MHz; DMSO-d_6) δ 11.72 (s, 1H), 8.58 (s, 1H), 7.40-7.35 (m, 10H), 5.18 (s, 2H), 5.12 (s, 2H), 4.18 (d, 2H), 3.67-3.66 (m, 4H), 2.43 (t, 1H).

40 [Ejemplo 8](#): Preparación de 2-((t-butoxycarbonylamino)-1-(2-propinil-1-oxi))-(R)-propano (8).



45 10.8g de t-butil (R)-1-hidroxiopropan-2-ilcarbamato reaccionaron y se purificaron siguiendo de manera similar el procedimiento descrito en el [Ejemplo 3](#) para proporcionar 10.1g del comp. **8** como un aceite amarillo. $^1\text{H NMR}$ (500MHz; DMSO-d_6) δ 6.63 (d, 1H), 4.11 (d, 2H), 3.60 (m, 1H), 3.37-3.33 (m, 2H), 3.26-3.23 (m, 1H), 1.38 (s, 9H), 1.05 (d, 3H).

50 [Ejemplo 9](#): Preparación de N-[2-[2-(t-butoxycarbonylamino)etoxi]etil]-N-[2-[(3-butinil)-1-oxi]etil]-N-(t-butoxycarbonyl)amina (9).



60

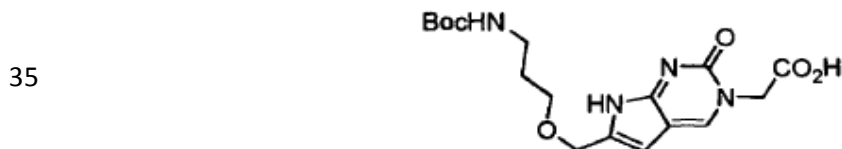
A una solución agitada de 5g de 2-((3-butiril)-1-oxi)etil metanosulfonato y 5.32g de 2-[2-(t-butoxicarbonil)amino]etil-1-oxi]etilamina en 60ml de acetonitrilo, se añadió en forma de gotas 3.6g de carbonato potásico disueltos en agua a 0°C. La solución de reacción se dejó calentar lentamente hasta la temperatura ambiente y se agitó por otras 24h, y después se concentró a presión reducida. El residuo resultante se disolvió en MC y se lavó con agua. La capa orgánica se concentró y se disolvió en 80ml de THF y 80ml de agua, a lo cual se añadieron 8.4g de Boc₂O disueltos en 50ml de THF. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente por 16h, a lo cual siguió la eliminación de THF al vacío y la extracción con EA. La capa orgánica se lavó en serie con 0.5M ácido cítrico ac., agua, y salmuera. La capa orgánica se secó sobre sulfato sódico anhidro, se concentró, y se purificó por cromatografía de columna (hexano → 1:4 EA/hexano) para obtener 2.45g del comp. **9** como un aceite amarillo pálido. ¹H NMR (400MHz; CDCl₃) δ 5.08 (br s, 0.5H), 4.93 (br s, 0.5H), 3.61-3.46 (m, 12H), 3.31 (m, 2H), 2.48 (m, 2H), 1.99 (t, 1H), 1.48 (s, 9H), 1.46 (s, 9H).

Ejemplo 10: Preparación de etil 2-[6-{3-(t-butoxicarbonilamino)propil-1-oxi}-metil-2-oxo-2H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-3(7H)-il]acetato (10).



A una solución agitada de 6.5g del comp. **2** disueltos en 120ml de DMF, se añadieron en serie 580mg de CuI, 4.2ml de TEA, 9.74g del comp. **3**, y 1.76g de Pd(PPh₃)₄. Después, la mezcla de reacción se agitó por 24h a 50°C con protección para la luz, y se concentró a presión reducida. El residuo resultante se disolvió en 250ml EtOH y se agitó a reflujo por 18h. Después, la solución se concentró al vacío y se sometió a separación cromatográfica (95:5 EA/EtOH) para obtener 2.3g del comp. **10** como un sólido/espuma roja oscura. ¹H NMR (400MHz; DMSO-d₆) δ 11.30 (br s, 1H), 8.37 (s, 1H), 6.78 (m, 1H), 6.19 (s, 1H), 4.70 (s, 2H), 4.37 (s, 2H), 4.14 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 3.42 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 2.98 (m, 2H), 1.63 (m, 2H), 1.36 (s, 9H), 1.20 (t, J = 7.2 Hz, 3H).

Ejemplo 11: Preparación de ácido 2-[6-{3-(t-butoxicarbonilamino)propil-1-oxi}metil-2-oxo-2H-pirrolo-[2,3-d]pirimidin-3(7H)-il]acético (11).



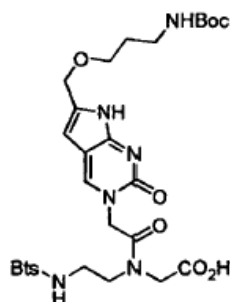
A 3.3g del comp. **10**, se añadieron 15ml de THF, 30ml de agua, y después 760mg de LiOH, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente por 20 min. Después que el THF se eliminó a presión reducida, la solución resultante ac. se lavó con éter de dietilo. La capa ac. se acidificó hasta pH 3 con 1M HCl ac. y se extrajo con EA. La capa orgánica se secó sobre sulfato sódico anhidro y se concentró al vacío para producir 2.46g del comp. **11** como un sólido blanco. ¹H NMR (400MHz; DMSO-d₆) δ 11.05 (s, 1H), 8.16 (s, 1H), 6.79 (t, 1H), 6.12 (s, 1H), 4.35 (s, 2H), 4.23 (s, 2H), 3.41 (t, 2H), 2.97 (q, J = 6.4 Hz, 2H), 1.64 (m, 2H), 1.36 (s, 9H).

Ejemplo 12: Preparación de etilN-[2-((benzo[d]tiazol-2-sulfonil)amino)-etil]-N-[2-[6-{3-(t-butoxicarbonilamino)propil-1-oxi}metil-2-oxo-2H-pirrolo-[2,3-d]pirimidin-3(7H)-il]acetil]glicinato (12).



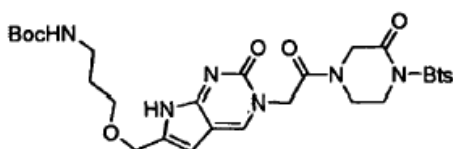
A 4.0g del comp. **11** y 3.6g de etil N-[2-((benzo[d]tiazol-2-sulfonyl)amino)etil]glicinato disueltos en 30ml de DMF, se añadieron a temperatura ambiente 2.42g de EDCI y 1.70g de HOBt. La mezcla de reacción se agitó por 8h. Después que el solvente se eliminó al vacío, el residuo resultante se disolvió en MC, y se lavó con 1M HCl ac. y después con agua. La capa de MC se concentró a presión reducida y se purificó por cromatografía de columna (95:5 MC/MeOH) para obtener 4.6g del comp. **12** como un sólido/espuma amarilla. ¹H NMR (400MHz; DMSO_{d6}) δ 11.09 (br s, 1H), 8.74 (s, 0.6H), 8.58 (s, 0.4H), 8.27 (m, 1H), 8.20-8.14 (m, 2H), 7.66 (m, 2H), 6.56 (br s, 1H), 6.16 (m, 1H), 4.91 (s, 1.2H), 4.73 (s, 0.8H), 4.38 (s, 2.6H), 4.17 (m, 0.9H), 4.07 (m, 2.5H), 3.67 (m, 1.1H), 3.49-3.44 (m, 4H), 3.26 (m, 0.9H), 3.01 (m, 2H), 1.66 (m, 2H), 1.38 (s, 9H), 1.24 (t, J = 7.0 Hz, 1.2H), 1.17 (t, J = 7.0 Hz, 1.8H).

Ejemplo 13: Preparación de N-[2-((benzo[d]tiazol-2-sulfonyl)amino)etil]-N-[2-[6-{3-(t-butoxicarbonilamino)propil-1-oxi}metil-2-oxo-2H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-3(7H)-il]acetil]glicina (**13**).



4.5g del comp. **12** y 670mg de LiOH se dispersaron en 20ml de THF y 20ml de agua, y se agitó a temperatura ambiente por 20min. THF se eliminó al vacío, y la solución resultante ac. se lavó con éter de dietilo. La capa ac. se acidificó hasta pH 3 con 1M HCl ac., y se extrajo con EA. La capa de EA se secó sobre sulfato sódico anhidro y se concentró a presión reducida para proporcionar 4.4g del comp. **13** como un sólido amarillo oscuro. ¹H NMR (400MHz; DMSO_{d6}) δ 11.32 (br s, 1H), 8.36 (m, 1H), 8.28 (m, 1.6H), 8.22 (s, 0.4H), 7.73 (m, 2H), 6.78 (m, 1H), 6.20 (s, 1H), 4.94 (s, 1.2H), 4.84 (s, 0.8H), 4.52 (s, 0.8H), 4.37 (s, 2H), 4.30 (s, 1.2H), 4.26 (m, 1.2H), 4.07 (m, 2H), 3.87 (m, 0.8H), 3.43 (m, 2H), 2.99 (m, 2H), 1.63 (m, 2H), 1.37 (s, 9H).

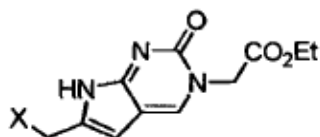
Ejemplo 14: Preparación de 1-((benzo[d]tiazol-2-sulfonyl))-2-oxo-4-[6-{3-(t-butoxicarbonilamino)propil-1-oxi}metil-2-oxo-2H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-3(7H)-il]acetil]piperazina (**14**).



4.4g del comp. **13** y 1.49g de EDCI en 50ml de DMF se agitaron a temperatura ambiente por 16h. Después que la mezcla de reacción se concentró al vacío, el residuo resultante se disolvió en 50ml de MC. La solución de MC se lavó en serie con 1M HCl ac. y agua, se concentró al vacío, y después se purificó por cromatografía de columna (acetona) para obtener 1.5g del comp. **14** como un sólido/espuma marrón. ¹H NMR (400MHz; DMSO_{d6}) δ 11.25 (br s, 1H), 8.36 (m, 1H), 8.29 (m, 1H), 8.25 (s, 0.6H), 8.19 (0.4H), 7.72 (m, 2H), 6.78 (t, J = 5.2 Hz, 1H), 6.18 (s, 1H), 4.92 (s, 1.2H), 4.82 (s, 0.8H), 4.51 (s, 0.8H), 4.37 (s, 2H), 4.29 (s, 1.2H), 4.23 (m, 1.2H), 4.06 (m, 2H), 3.87 (m, 0.8H), 3.41 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 2.98 (q, J = 6.8 Hz, 2H), 1.62 (m, 2H), 1.36 (s, 9H). MS/ESI (m+23/MNa⁺) = 682.2 (observado), PM = 659.8 (C₂₈H₃₃N₇O₈S₂).

A partir de derivados de acetileno **4 ~ 9**, derivados de pirollocitosina **15 ~ 20** se prepararon siguiendo de manera similar el procedimiento descrito en el **Ejemplo 10**. Datos espectrales y físicos para los comp. **15 ~ 20** se proporcionan en la tablas más abajo.

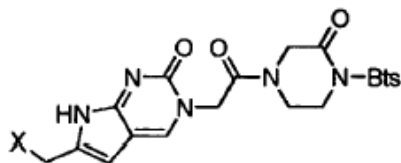
Ejemplos 15 ~ 20: Datos analíticos para derivados de pirollocitosina 15~ 20.



| Comp. | Material de partida | X | Datos espectrales & físicos |
|-------|---------------------|---|---|
| 15 | 4 | | $^1\text{H NMR}$ (400MHz; DMSO-d_6) δ 11.12 (s, 1H), 8.27 (s, 1H), 6.79 (t, $J = 5.4$ Hz, 1H), 6.00 (s, 1H), 4.68 (s, 2H), 4.14 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H), 3.65 (t, $J = 6.6$, 2H), 3.39 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 3.08 (m, 2H), 2.78 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 1.37 (s, 9H), 1.20 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H). Sólido/espuma verde pálida. |
| 16 | 5 | | $^1\text{H NMR}$ (400MHz; DMSO-d_6) δ 11.35 (s, 1H), 8.39 (s, 1H), 6.87 (t, $J = 5.2$ Hz, 1H), 6.21 (s, 1H), 4.70 (s, 2H), 4.41 (s, 2H), 4.15 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H), 3.43 (m, 2H), 3.12 (m, 2H), 1.38 (s, 9H), 1.21 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H). Sólido/espuma amarilla pálida. |
| 17 | 6 | | $^1\text{H NMR}$ (400MHz; DMSO-d_6) δ 11.20 (br s, 0.6H), 8.86 (br s, 0.4H), 8.57 (s, 0.2H), 8.35 (s, 0.8H), 6.83-6.76 (m, 1H), 6.00 (s, 0.8H), 5.76 (s, 0.2H), 4.75 (s, 0.3H), 4.70 (s, 1.7H), 4.55 (s, 0.3H), 4.30 (s, 1.7H), 4.14 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H), 3.18 (m, 2H), 2.90-2.88 (m, 2H), 1.58 (m, 2H), 1.40-1.36 (m, 18H), 1.20 (t, 3H). Sólido/espuma marrón. |
| 18 | 7 | | $^1\text{H NMR}$ (400MHz; DMSO-d_6) δ 11.57 (s, 1H), 11.33 (s, 1H), 8.50 (m, 1H), 8.37 (s, 1H), 7.44-7.31 (m, 10H), 6.22 (s, 1H), 5.22 (s, 2H), 5.03 (s, 2H), 4.70 (s, 2H), 4.44 (s, 2H), 4.14 (q, 2H), 3.57-3.53 (m, 4H), 1.21 (t, 3H). Sólido marrón pálido. |
| 19 | 8 | | $^1\text{H NMR}$ (500MHz; DMSO-d_6) δ 11.32 (s, 1H), 8.38 (s, 1H), 6.71 (d, 1H), 6.20 (s, 1H), 4.70 (s, 2H), 4.41 (m, 2H), 4.14 (q, 2H), 3.65 (m, 1H), 3.37-3.34 (m, 1H), 3.26-3.22 (m, 1H), 1.37 (s, 9H), 1.20 (t, 3H), 1.02 (d, 3H). Sólido marrón pálido. |
| 20 | 9 | | $^1\text{H NMR}$ (500MHz; DMSO-d_6) δ 11.13 (s, 1H), 8.25 (s, 1H), 6.73 (s, 1H), 5.99 (s, 1H), 4.68 (s, 2H), 4.12 (q, 2H), 3.67 (t, 2H), 3.48~3.27 (m, 10H), 3.04 (q, 2H), 2.78 (t, 2H), 1.38 (s, 9H), 1.36 (s, 1H), 1.19 (t, 3H). Sólido marrón. |

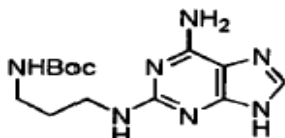
A partir de los derivados de pirrolocitosina **15**, **16**, **17**, y **20**, se prepararon monómeros de PNA citosina modificada **21** ~ **24** siguiendo de manera similar los procedimientos descritos en los Ejemplos 11 ~ 14. Los datos espectrales y físicos para los comps. **21** ~ **24** se proporcionan en la tabla más abajo.

Ejemplos 21 ~ 24: Datos analíticos para monómeros de PNA citosina 21 ~ 24.



| Comp. | Material de partida | X | Datos espectrales & físicos |
|-------|---------------------|---|--|
| 21 | 15 | | $^1\text{H NMR}$ (400MHz; DMSO_{d6}) δ 11.06 (s, 1H), 8.36 (m, 1H), 8.28 (m, 1H), 8.14 (s, 0.6H), 8.08 (2, 0.4H), 7.72 (m, 2H), 6.78 (t, 1H), 5.98 (s, 1H), 4.91 (s, 1.2H), 4.80 (s, 0.8H), 4.51 (s, 0.8H), 4.29 (s, 1.2H), 4.24 (m, 1.2H), 4.06 (m, 2H), 3.86 (m, 0.8H), 3.64 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 3.38 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 3.07 (m, 2H), 2.78 (m, 2H), 1.37 (s, 9H). MS/ESI ($m+1$) = 660.2 (observado), PM = 659.8 ($\text{C}_{28}\text{H}_{33}\text{N}_7\text{O}_8\text{S}_2$). Sólido/espuma marrón. |
| 22 | 16 | | $^1\text{H NMR}$ (400MHz; DMSO_{d6}) δ 11.31 (s, 1H), 8.36 (m, 1H), 8.30-8.27 (m, 1.6H), 8.22 (s, 0.4H), 7.73 (m, 2H), 6.87 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 6.20 (m, 1H), 4.94 (s, 1.2H), 4.83 (s, 0.8H), 4.52 (s, 0.7H), 4.41 (s, 2.1H), 4.30 (s, 1.1 H), 4.25 (m, 1.2H), 4.06 (m, 2H), 3.87 (m, 0.8H), 3.42 (t, 2H), 3.12 (m, 2H), 1.38 (s, 9H). MS/ESI ($m+1$) = 646.2 (observado), PM = 645.7 ($\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{N}_7\text{O}_8\text{S}_2$). Sólido/espuma roja. |
| 23 | 17 | | $^1\text{H NMR}$ (400MHz; DMSO_{d6}) δ 11.16 (br s, 1H), 8.36 (m, 1H), 8.28 (m, 1H), 8.21 (s, 0.6H), 8.15 (s, 0.4H), 7.73 (m, 2H), 6.77 (br s, 1H), 6.00 (br s, 1H), 4.92 (s, 1.2H), 4.82 (s, 0.8H), 4.52 (s, 0.9H), 4.30 (s, 3.1H), 4.25 (m, 1.2H), 4.07 (m, 2H), 3.87 (m, 0.8H), 3.19 (m, 2H), 2.89 (m, 2H), 1.59 (m, 2H), 1.41-1.36 (m, 18H); MS/ESI ($m+23/\text{MNa}^+$) = 781.3 (observado), PM = 758.9 ($\text{C}_{33}\text{H}_{42}\text{N}_8\text{O}_9\text{S}_2$). Sólido/espuma roja. |
| 24 | 20 | | $^1\text{H NMR}$ (500MHz; DMSO_{d6}) δ 11.10 (m, 1H), 8.35 (m, 1H), 8.28 (m, 1H), 8.14 (s, 0.6H), 8.08 (s, 0.4H), 7.72 (m, 2H), 6.76 (m, 1H), 5.97-5.96 (s, 1H), 4.90 (s, 1.2H), 4.80 (s, 0.8H), 4.51 (s, 0.8H), 4.29 (s, 1.2H), 4.25 (t, 1.2H), 4.08-4.04 (m, 2H), 3.86 (t, 0.8H), 3.66 (m, 2H), 3.47 (m, 2H), 3.41 (m, 2H), 3.32-3.30 (m, 4H), 3.27 (m, 2H), 3.04 (m, 2H), 2.77 (m, 2H), 1.37 (s, 9H), 1.35 (s, 9H). MS/ESI ($m+23/\text{MNa}^+$) = 869.3 (observado), PM = 847.0 ($\text{C}_{37}\text{H}_{50}\text{N}_8\text{O}_{11}\text{S}_2$). Sólido amarillo. |

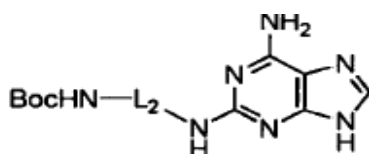
Ejemplo 25: Preparación de 2-{3-(t-butoxicarbonilamino)propil}amino-adenina (25).



6.8g de 2-cloroadenina disueltos en 68ml de 1,3-diaminopropano y 68ml de monometoxietanol se agitaron a reflujo por 24h, y la mezcla de reacción se concentró al vacío. El residuo resultante se disolvió en 100ml de THF y 100ml de agua, a lo cual se añadieron lentamente 60g de BoC_2O disueltos en 70ml de THF. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente por 6h, y después el solvente orgánico se eliminó a presión reducida. La capa ac. resultante se extrajo dos veces con 100ml de EA. La capa orgánica se lavó con 0.5M ácido cítrico ac. y con salmuera, y se secó sobre sulfato magnésico anhidro. La capa orgánica se concentró a presión reducida y se sometió a separación cromatográfica (1:10 MeOH/MC) para obtener 4.07g de un comp. protegido con dos grupos Boc. Este compuesto se disolvió en 100ml MeOH, a lo cual se añadieron lentamente 45ml carbonato sódico saturado ac.. La solución de reacción se agitó a 50°C por 1h, y después se concentró al vacío. El residuo resultante se disolvió en 50ml MeOH y el material insoluble se filtró. Después, el filtrado se concentró para proporcionar 3.16g del comp. **25** como un sólido blanco. $^1\text{H NMR}$ (400MHz; DMSO_{d6}) δ 12.11 (br s, 1H), 7.63 (s, 1H), 6.78 (t, 1H), 6.55 (s, 2H), 6.07 (t, 1H), 3.20 (q, 2H), 2.96 (q, 2H), 1.60 (m, 2H), 1.37 (s, 9H).

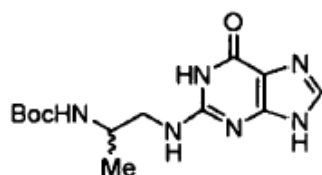
A partir de 2-cloroadenina y una diamina adecuada, los derivados 2,6-diaminopurina **26** ~ **30** se prepararon siguiendo de manera similar el procedimiento descrito en el Ejemplo 25. Datos espectrales y físicos para los compuestos **26** ~ **30** se proporcionan en la tabla más abajo.

Ejemplos 26 ~ 30: Datos analíticos para los derivados de 2,6-diaminopurina 26 ~ 30.



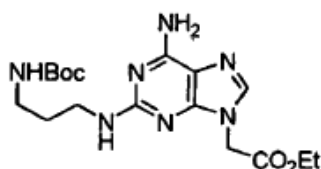
| Comp. | Diamina de partida | L2 | Datos espectrales & físicos |
|-------|--------------------|---------------------|---|
| 26 | | $-(\text{CH}_2)_2-$ | $^1\text{H NMR}$ (400MHz; DMSO_{d6}) δ 12.20 (br s, 1H), 7.66 (s, 1H), 6.84 (t, 1H), 6.62 (s, 2H), 6.10 (t, 1H), 3.25 (q, 2H), 3.08 (q, 2H), 1.36 (s, 9H). Sólido amarillo pálido. |
| 27 | | $-(\text{CH}_2)_4-$ | $^1\text{H NMR}$ (500MHz; DMSO_{d6}) δ 12.07 (br s, 1H), 7.63 (s, 1H), 6.75 (s, 1H), 6.50 (s, 2H), 6.02 (s, 1H), 3.18 (q, 2H), 2.91 (q, 2H), 1.48-1.36 (m, 13H). Sólido verde amarillento. |
| 28 | | $-(\text{CH}_2)_5-$ | $^1\text{H NMR}$ (400MHz; DMSO_{d6}) δ 12.14 (br s, 1H), 7.65 (s, 1H), 6.77 (t, 1H), 6.55 (s, 2H), 6.01 (s, 1H), 3.17 (m, 2H), 2.89 (q, 2H), 1.48 (m, 2H), 1.41-1.36 (m, 11H), 1.26 (m, 2H). Sólido espuma amarilla pálida. |
| 29 | | $-(\text{CH}_2)_7-$ | $^1\text{H NMR}$ (500MHz; DMSO_{d6}) δ 12.11 (br s, 1H), 7.64 (s, 1H), 6.78 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 6.56 (s, 2H), 6.04 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H), 3.17 (td, $J = 6.3, 6.3$ Hz, 2H), 2.88 (td, $J = 6.7, 6.7$ Hz, 2H), 1.49-1.47 (m, 2H), 1.36-1.31 (m, 11H), 1.29-1.22 (m, 6H). Sólido verde amarillento. |
| 30 | | | $^1\text{H NMR}$ (500MHz; DMSO_{d6}) δ 12.15 (s, 1H), 7.64 (s, 1H), 6.84 (t, 1H), 6.56 (s, 2H), 6.05 (t, 1H), 3.48 (t, 2H), 3.39-3.34 (m, 4H), 3.07 (q, 2H), 1.37 (s, 9H). Espuma amarilla. |

Ejemplo 31: Preparación de 2-[2-(t-butoxicarbonilamino)-2-metil]etil]-amino-1H-purin-6(9H)-ona (**31**).



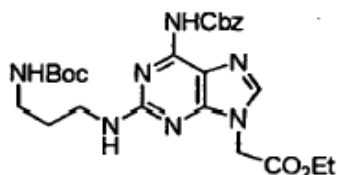
11g de 2-clorohipoxantina y 4.96ml de 1,2-diaminopropano(racémico) se dispersaron en 33ml de monometoxietanol, y se agitó por 24h a 130°C. El solvente se eliminó al vacío, y el residuo resultante se disolvió en 97ml de THF y 97ml de agua, a lo cual se añadieron lentamente 22.8g de Boc₂O disueltos en 64ml de THF. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente por 6h, y EA se añadió a la solución. El precipitado resultante se recogió por filtración para obtener el comp. **31** como un sólido gris. ¹H NMR (500MHz; DMSO_{d6}) δ 12.42 (s, 1H), 10.44 (br s, 1H), 7.61 (s, 1H), 6.76 (d, 1H), 6.27 (m, 1H), 3.67 (m, 1H), 3.32 (m, 1H), 3.14 (m, 1H), 1.36 (s, 9H), 1.02 (d, 3H).

Ejemplo 32: Preparación de etil 2-[6-amino-2-{3-(t-butoxicarbonilamino)-propil}amino-9H-purin-9-il]acetato (**32**).



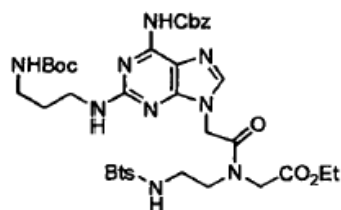
A una solución agitada de 3.16g del comp. **25** disueltos en 100ml de DMF, se añadieron 480mg de 55% NaH en aceite mineral. La solución de reacción se agitó por 2h, después de lo cual se añadieron lentamente 1.98ml de bromoacetato de etilo. 2h más tarde, la mezcla de reacción se concentró al vacío, y se purificó por cromatografía de columna (1:10 EtOH/EA) para dar 2.92g del análogo de diaminopurina **32** como un sólido amarillo pálido. ¹H NMR (400MHz; DMSO_{d6}) δ 7.67 (s, 1H), 6.80 (t, 1H), 6.71 (s, 2H), 6.28 (t, 1H), 4.85 (s, 2H), 4.15 (q, 2H), 3.20 (q, 2H), 2.94 (q, 2H), 1.57 (m, 2H), 1.37 (s, 9H), 1.21 (t, 3H).

Ejemplo 33: Preparación de etil 2-[6-(benciloxicarbonil)amino-2-{3-(t-butoxi-carbonilamino)propil}amino-9H-purin-9-il]acetato (**33**).



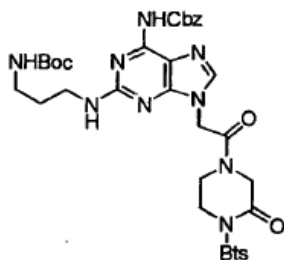
A una solución agitada de 4.68g del comp. **32** disueltos en 100ml de DMF, se añadieron a temperatura ambiente 13.2g de N-(benciloxicarbonil)-N'-metil-imidazolio triflato. 12h más tarde, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida, y se sometió a cromatografía de columna (5% MeOH en MC) para producir 5.4g del comp. **33** como un sólido blanco. ¹H NMR (400MHz; DMSO_{d6}) δ 10.19 (s, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.45-7.33 (m, 5H), 6.88 (t, 1H), 6.77 (t, 1H), 5.18 (s, 2H), 4.94 (s, 2H), 4.16 (q, 2H), 3.25 (q, 2H), 2.95 (q, 2H), 1.60 (m, 2H), 1.36 (s, 9H), 1.21 (t, 3H).

Ejemplo 34: Preparación de etil N-[2-{2-(benzo[d]tiazol)sulfonil}amino-etil]-N-[2-[6-(benciloxicarbonil)amino-2-{3-(t-butoxicarbonilamino)-propil}amino-9H-purin-9-il]acetil]glicinato (**34**).



5.4g del comp. **33** y 950mg de LiOH se disolvieron en 40ml de THF y 40ml de agua, y se agitó a temperatura ambiente por 1h. El THF se eliminó al vacío, y la solución ac. resultante se acidificó hasta pH 3 con 1M HCl ac., y después se extrajo con EA. La capa orgánica se secó sobre sulfato sódico anhidro y se concentró a presión reducida. El residuo resultante y 2.92g de etil 2-N-[2-((benzo[d]tiazol-2-sulfonyl)amino)etil]glicinato se disolvieron en 240ml de DMF, a lo cual se añadieron a temperatura ambiente 1.95g de EDCI y 1.38g de HOBt. La mezcla de reacción se agitó por 20h, se concentró a presión reducida, y se disolvió en MC. La solución de se lavó con 1M HCl ac., se concentró al vacío, y después se purificó por cromatografía de columna (5% MeOH/MC) para obtener 2.7g del comp. **34** como una espuma amarilla pálida. ¹H NMR (400MHz; DMSO_{d6}) δ 10.18 (m, 1H), 8.97 (br s, 0.6H), 8.80 (br s, 0.4H), 8.28 (d, 1H), 8.18 (m, 1H), 7.80 (s, 0.6H), 7.76 (s, 0.4H), 7.66 (m, 2H), 7.46-7.32 (m, 5H), 6.77 (m, 2H), 5.18 (s, 2H), 5.10 (s, 1.2H), 4.89 (s, 0.8H), 4.45 (s, 0.8H), 4.17 (q, 0.8H), 4.07-4.00 (m, 2.4H), 3.68 (m, 1.2H), 3.47 (m, 1.2H), 3.41 (m, 0.9H), 3.22 (m, 2.7H), 2.94 (m, 2H), 1.59 (m, 2H), 1.36 (s, 9H), 1.31-1.12 (m, 3H).

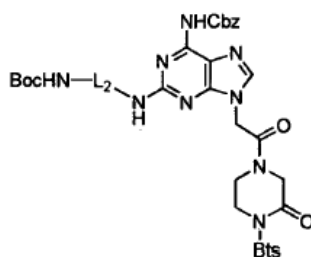
Ejemplo 35: Preparación de 1-(benzo[d]tiazol-2-sulfonyl)-2-oxo-4-[[6-(bencil-oxicarbonil)amino-2-(3-(t-butoxicarbonilamino)propilamino)-9H-purin-9-yl]-acetil]piperazina (35).

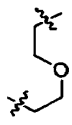


2.7g del comp. **34** y 340mg de LiOH se dispersaron en 15ml de THF y 20ml de agua, y se agitó por 30 min a temperatura ambiente. El THF se eliminó a presión reducida. Después, la capa ac. resultante se acidificó hasta pH 3 con 1M HCl ac., y se extrajo con EA. La capa de EA se secó sobre sulfato sódico anhidro y se concentró al vacío para obtener 2.48g de un producto crudo. El producto crudo y 716mg de EDCI disueltos en 70ml de DMF se agitaron a temperatura ambiente por 20h. El solvente se eliminó a presión reducida, y el residuo resultante se disolvió en MC y se lavó con 1M HCl ac. y después con agua. La capa orgánica se concentró al vacío y se purificó por cromatografía de columna (acetona) para obtener 1.4g del comp. **35** como una espuma blanca. ¹H NMR (400MHz; DMSO_{d6}) δ 10.16 (s, 1H), 8.35 (m, 1H), 8.26 (m, 1H), 7.81 (s, 0.6H), 7.77 (s, 0.4H), 7.72 (m, 2H), 7.45-7.31 (m, 5H), 6.78 (m, 2H), 5.18 (s, 2H), 5.12 (s, 1.2H), 5.01 (s, 0.8H), 4.55 (s, 0.8H), 4.29-4.27 (m, 2.4H), 4.09 (m, 2H), 3.88 (m, 0.8H), 3.26 (m, 2H), 2.95 (m, 2H), 1.61 (m, 2H), 1.36 (s, 9H); MS/ESI (m+1) = 779.2 (observado), PM = 778.9 (C₃₄H₃₈N₁₀O₈S₂).

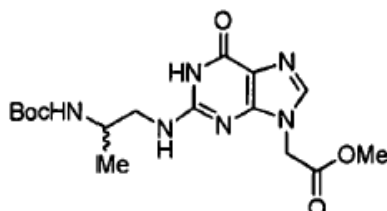
A partir de los derivados de 2,6-diaminopurina **26** ~ **30**, monómeros de PNA adenina modificados **36** ~ **40** se prepararon de manera similar a los procedimientos descritos en los **Ejemplos 32** ~ **35**. Datos espectrales y físicos para los comp. **36** ~ **40** se proporcionan en la tabla más abajo.

Ejemplos 36 ~ 40: Datos analíticos para los monómeros de PNA adenina 36 ~ 40.



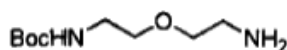
| Comp. | Material de partida | L ₂ | Datos espectrales & físicos |
|-------|---------------------|---|---|
| 36 | 26 | -(CH ₂) ₂ - | ¹ H NMR (400MHz; DMSO _{d6}) δ 10.17 (s, 1H), 8.36 (m, 1H), 8.26 (m, 1H), 7.82 (s, 0.6H), 7.78 (s, 0.4H), 7.72 (m, 2H), 7.45-7.31 (m, 5H), 6.79 (2H), 5.18 (s, 2H), 5.12 (s, 1.2H), 5.01 (s, 0.8H), 4.55 (s, 0.8H), 4.29-4.25 (m, 2.4H), 4.09 (m, 2H), 3.87 (m, 0.8H), 3.29 (m, 2H), 3.11 (m, 2H), 1.33 (d, 9H). MS/ESI (m+1) = 765.2 (observado), PM = 764.8 (C ₃₃ H ₃₆ N ₁₀ O ₈ S ₂). Espuma blanca. |
| 37 | 27 | -(CH ₂) ₄ - | ¹ H NMR (400MHz; DMSO _{d6}) δ 10.10 (s, 1H), 8.36 (m, 1H), 8.26 (m, 1H), 7.80 (s, 0.6H), 7.76-7.71 (m, 2.4H), 7.46-7.31 (m, 5H), 6.81-6.73 (m, 2H), 5.18 (s, 2H), 5.12 (s, 1.2H), 5.01 (s, 0.8H), 4.55 (s, 0.8H), 4.30-4.25 (m, 2.4H), 4.09 (m, 2H), 3.88 (m, 0.8H), 3.26 (m, 2H), 2.90 (m, 2H), 1.50-1.36 (m, 13H); MS/ESI (m+1) = 793.3 (observado), PM = 792.9 (C ₃₅ H ₄₀ N ₁₀ O ₈ S ₂). Sólido/espuma roja amarillenta. |
| 38 | 28 | -(CH ₂) ₅ - | ¹ H NMR (400MHz; DMSO _{d6}) δ 10.09 (s, 1H), 8.35 (m, 1H), 8.26 (m, 1H), 7.80 (s, 0.6H), 7.76 (s, 0.4H), 7.74-7.72 (m, 2.0H), 7.46-7.31 (m, 5H), 6.79-6.72 (m, 2H), 5.18 (s, 2H), 5.12 (s, 1.2H), 5.01 (s, 0.8H), 4.56 (s, 0.8H), 4.30-4.27 (m, 2.4H), 4.09 (m, 2H), 3.88 (m, 0.8H), 3.25 (m, 2H), 2.89 (m, 2H), 1.49 (m, 2H), 1.36 (m, 11H), 1.25 (m, 2H); MS/ESI (m+1) = 807.3 (observado), PM = 806.9 (C ₃₆ H ₄₂ N ₁₀ O ₈ S ₂)- Sólido/espuma amarilla. |
| 39 | 29 | -(CH ₂) ₇ - | ¹ H NMR (500MHz; DMSO _{d6}) δ 10.11 (d, J = 3.1 Hz, 1H), 8.37-8.34 (m, 1H), 8.28-8.24 (m, 1H), 7.80 (s, 0.6H), 7.76 (s, 0.4 Hz), 7.75-7.70 (m, 2H), 7.75-7.31 (m, 5H), 6.82-6.74 (m, 2H), 5.18 (s, 2H), 5.12 (s, 1.2H), 5.01 (s, 0.8H), 4.58 (s, 0.8H), 4.29 (m, 1.2H), 4.27 (q, J = 4.9 Hz, 1H), 4.06-4.03 (m, 2H), 3.88 (t, J = 5.2 Hz, 1H), 3.26-3.20 (m, 2H), 2.88-2.85 (m, 2H), 1.51-1.45 (m, 2H), 1.39-1.32 (m, 11H), 1.28-1.15 (m, 6H). MS/ESI (m+1) = 834.8 (observado), PM = 835.0 (C ₃₈ H ₄₆ N ₁₀ O ₈ S ₂). Sólido/espuma amarilla rojiza. |
| 40 | 30 |  | ¹ H NMR (400MHz; DMSO _{d6}) δ 10.14 (s, 1H), 8.35 (m, 1H), 8.26 (m, 1H), 7.82 (s, 0.6H), 7.78 (s, 0.4H), 7.73 (m, 2H), 7.46-7.31 (m, 5H), 6.81-6.74 (m, 2H), 5.18 (s, 2H), 5.13 (s, 1.2H), 5.02 (s, 0.8H), 4.55 (s, 0.8H), 4.30-4.26 (m, 2.4H), 4.09 (m, 2H), 3.88 (m, 0.8H), 3.50 (m, 2H), 3.43-3.38 (m, 4H), 3.07 (m, 2H), 1.36 (s, 9H); MS/ESI (m+1) = 809.3 (observado), PM = 808.9 (C ₃₅ H ₄₀ N ₁₀ O ₉ S ₂). Espuma amarilla pálida. |

Ejemplo 41: Preparación de etil 2-[2-[2-{2-(t-butoxicarbonilamino)-2-metil}etil]amino-6-oxo-6,9-dihidro-1H-purin-2-il]acetato (41).



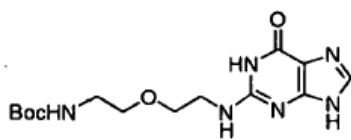
A una solución agitada de 4.69g del comp. **31** en 47ml de DMF, se añadieron 790mg de 55% NaH en aceite mineral y la solución de reacción se agitó por 2h. Después que 1.85ml de bromoacetato de etilo se añadieron lentamente, la solución de reacción se agitó por otras 2h. La mezcla de reacción se concentró al vacío y se purificó por cromatografía de columna (5:95 MeOH/MC) para obtener 5.04g del comp. **41** como un sólido amarillo pálido. ¹H NMR (500MHz; DMSO_{d6}) δ 10.55 (s, 1H), 7.67 (s, 1H), 6.74 (d, 1H), 6.40 (m, 1H), 4.87 (s, 2H), 4.17 (q, 2H), 3.65 (m, 1H), 3.28 (m, 1H), 3.16 (m, 1H), 1.36 (s, 9H), 1.21 (t, 3H), 1.01 (d, 3H).

Ejemplo 42: Preparación de 2-{2-(t-butoxicarbonilamino)etoxi}etilamina (42).



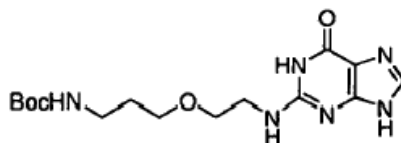
A 146g de [2-{2-(t-butoxicarbonilamino)etoxi}etil]metano sulfonato se disolvió en 500ml de DMF, se añadieron 134g de azida sódica. La mezcla de reacción se agitó a 70°C por 20h, y después se concentró a presión reducida. El residuo resultante se disolvió en 1,200ml de agua y se extrajo con EA. La capa orgánica se secó sobre sulfato sódico anhidro y se concentró al vacío. El residuo resultante se disolvió en 2,000ml de THF, a lo cual se añadieron 162g de trifetilfosfina. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente por 2h, después de lo cual se añadieron 200ml de agua. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente por 18h y se concentró hasta 500ml a presión reducida. Después, el precipitado resultante se filtró. El filtrado se concentró adicionalmente a presión reducida para eliminar el THF, y se lavó con MC. La capa ac. se concentró para obtener 86.2g del comp. **42** como un líquido. ¹H NMR (400MHz; CDCl₃) δ 4.96 (br s, 1H), 3.54-3.48 (m, 4H), 3.34 (q, 2H), 2.88 (t, 2H), 1.48-1.46 (m, 11H).

Ejemplo 43: Preparación de 2-[2-{2-(t-butoxicarbonilamino)-etoxi}etil]amino-1H-purin-6(9H)-ona (43).



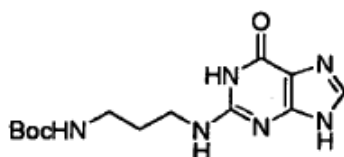
6.3g del comp. **42** y 2.0g de 2-bromohipoxantina se dispersaron en 55ml de monometoxietanol y 17.5ml de agua. La mezcla de reacción se agitó a reflujo por 16h, y el solvente se eliminó a presión reducida. Después, el concentrado se agitó en 20ml de MC y 10ml de agua por 30 min, y el precipitado resultante se recogió por filtración para obtener 2.1g del comp. **43** como un sólido amarillo pálido. ¹H NMR (500MHz; DMSO_{d6}) δ 12.43 (br s, 1H), 10.45 (br s, 1H), 7.89 (s, 0.2H), 7.61 (s, 0.8H), 6.77 (m, 1H), 6.34 (s, 0.8H), 6.12 (s, 0.2H), 3.52 (t, 2H), 3.41 (m, 4H), 3.09 (q, 2H), 1.36 (s, 9H).

Ejemplo 44: Preparación de 2-[2-[3-(t-butoxicarbonilamino)propiloxi]-etil]-amino-1H-purin-6(9H)-ona (44).



2-[3-(t-butoxicarbonilamino)propiloxi]etilamina y 2-bromohipoxantina reaccionaron siguiendo de manera similar el procedimiento descrito en el **Ejemplo 43** para producir el compuesto **44** como un sólido blanco. ¹H NMR (500MHz; DMSO_{d6}) δ 12.43 (br s, 1H), 10.45 (br s, 1H), 7.61 (m, 1H), 6.80 (t, 1H), 6.30 (s, 0.7H), 6.08 (s, 0.3H), 3.49 (t, 2H), 3.41 (t, 4H), 2.99 (q, 2H), 1.61 (m, 2H), 1.37 (s, 9H).

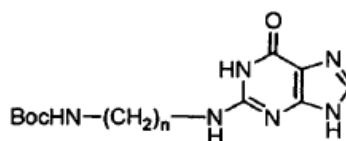
Ejemplo 45: Preparación de 2-[3-(t-butoxicarbonilamino)propil]amino-1H-purin-6(9H)-ona (45).



Una mezcla de 10g de clorohipoxantina y 19.6ml 1,3-diaminopropano dispersados en 40ml de monometoxietanol se agitó a 130°C por 10h. Después, el solvente se eliminó a presión reducida y el residuo resultante se disolvió en 150ml de THF y 150ml de agua, a lo cual se añadieron lentamente 19.2g de Boc₂O disueltos en 100ml de THF. La mezcla se agitó a temperatura ambiente por 6h. Después que EA se añadió, el precipitado resultante se recogió por filtración para obtener 6.31g del comp. **45** como un sólido verde oscuro. ¹H NMR (400MHz; DMSO_{d6}) δ 11.13 (br s, 1H), 7.64 (s, 1H), 6.87 (s, 1H), 6.31 (s, 1H), 3.23 (q, 2H), 2.98 (m, 2H), 1.62 (m, 2H), 1.38 (s, 9H).

Los derivados de guanina **46** ~ **47** se prepararon usando una diamina adecuada siguiendo de manera similar el procedimiento descrito en el Ejemplo 45. Datos espectrales y físicos para los comp. **46** ~ **47** se proporcionan en la tabla más abajo.

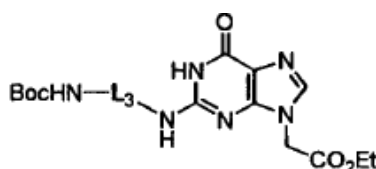
Ejemplos 46 ~ 47: Datos analíticos para los derivados de guanina 46 ~ 47.




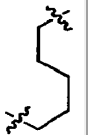
| Comp. | Diamina usada | n | Datos espectrales & físicos |
|-----------|-------------------|---|---|
| 46 | Etileno diamina | 2 | ¹ H NMR (500MHz; DMSO _{d6}) δ 12.43 (br s, 1H), 10.61 (br, 1H), 7.62 (s, 1H), 6.93 (t, 1H), 6.32 (s, 1H), 3.29 (q, 2H), 3.10 (q, 2H), 1.37 (s, 9H). Sólido gris. |
| 47 | Pentileno diamina | 5 | ¹ H NMR (500MHz; DMSO _{d6}) δ 12.44 (s, 1H), 10.35 (s, 1H), 7.60 (s, 1H), 6.80 (m, 1H), 6.29 (m, 1H), 3.21 (m, 2H), 2.90 (m, 2H), 1.49 (m, 2H), 1.39-1.35 (m, 11H), 1.27-1.23 (m, 2H). Sólido marrón pálido. |

Los comp. **43** ~ **46** se transformaron en los comp. **48** ~ **51** siguiendo de manera similar el procedimiento descrito en el Ejemplo 32. Datos espectrales y físicos para compuestos **48** ~ **51** se proporcionan en la tabla más abajo.

Ejemplos 48 ~ 51: Datos analíticos para los derivados de guanina 48 ~ 51.

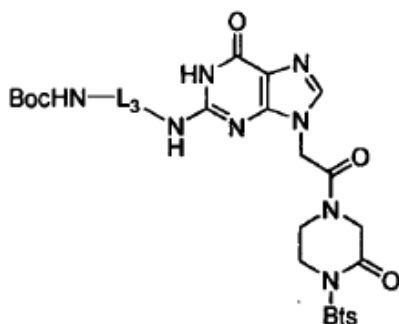


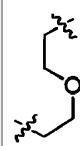
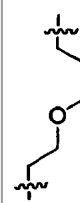
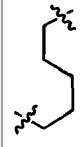
| Comp. | Material de partida | L ₃ | Datos espectrales & físicos |
|-----------|---------------------|----------------|---|
| 48 | 43 | | ¹ H NMR (500MHz; DMSO _{d6}) δ 10.67 (s, 1H), 7.69 (s, 1H), 6.78 (m, 1H), 6.15 (t, 1H), 4.87 (s, 2H), 4.15 (q, 2H), 3.51 (m, 2H), 3.41 (m, 4H), 3.10 (m, 2H), 1.37 (s, 9H), 1.20 (t, 3H). Sólido/espuma blanca. |
| 49 | 44 | | ¹ H NMR (500MHz; DMSO _{d6}) δ 10.57 (s, 1H), 7.69 (s, 1H), 6.79 (m, 1H), 6.44 (m, 1H), 4.87 (s, 2H), 4.16 (q, 2H), 3.48 (t, 2H), 3.40 (m, 4H), 2.99 (q, 2H), 1.61 (m, 2H), 1.37 (s, 9H), 1.21 (t, 3H). Sólido/espuma amarilla. |

| | | | | |
|----|----|----|---|--|
| 5 | 50 | 45 |  | $^1\text{H NMR}$ (500MHz; DMSO_{d6}) δ 10.64 (s, 1H), 7.68 (s, 1H), 6.91 (t, 1H), 6.47 (s, 1H), 4.88 (s, 2H), 4.16 (q, 2H), 3.28 (q, 2H), 3.08 (q, 2H), 1.36 (s, 9H), 1.21 (t, 3H). Sólido rojo oscuro. |
| 10 | 51 | 46 |  | $^1\text{H NMR}$ (400MHz; DMSO_{d6}) δ 10.44 (br s, 1H), 7.66 (s, 1H), 6.77 (m, 1H), 6.41 (m, 1H), 4.86 (s, 2H), 4.16 (q, 2H), 3.21 (q, 2H), 2.89 (q, 2H), 1.48 (m, 2H), 1.41-1.36 (m, 11H), 1.28-1.19 (m, 5H). Sólido gris oscuro. |

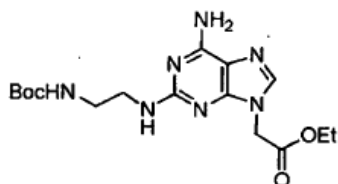
15 A partir de los derivados de guanina **48**, **49** y **51**, monómeros de PNA guanina modificados **52** ~ **54** se prepararon de manera similar a los procedimientos descritos en los Ejemplos 34 ~ 35. Datos espectrales y físicos para los comp. **52** **54** se proporcionan en la tablas más abajo.

20 Ejemplos 52 ~ 54: Datos analíticos para monómeros de PNA guanina 52 ~ 54.



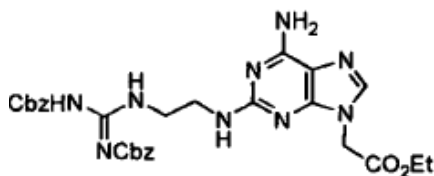
| 35 | Comp. | Material de partida | L ₃ | Datos espectrales & físicos |
|----|-------|---------------------|---|--|
| 40 | 52 | 48 |  | $^1\text{H NMR}$ (400MHz; DMSO_{d6}) δ 10.61 (m, 1H), 8.36 (m, 1H), 8.25 (m, 1H), 7.76-7.65 (m, 3H), 6.78 (t, 1H), 6.54 (m, 1H), 5.07 (s, 1.2H), 4.96 (s, 0.8H), 4.54 (s, 0.8H), 4.30 (s, 1.2H), 4.25 (m, 1.2H), 4.07 (m, 2H), 3.88 (m, 0.8H), 3.49 (m, 2.4H), 3.40 (m, 3.6H), 3.09 (m, 2H), 1.36 (s, 9H); MS/ESI (m+1) = 676.1 (observado), PM = 675.8 ($\text{C}_{27}\text{H}_{33}\text{N}_9\text{O}_8\text{S}_2$). Sólido/espuma marrón oscuro. |
| 45 | 53 | 49 |  | $^1\text{H NMR}$ (400MHz; DMSO_{d6}) δ 10.69 (s, 1H), 8.36 (m, 1H), 8.25 (m, 1H), 7.73 (m, 2H), 7.64-7.60 (m, 1H), 6.80 (t, 1H), 6.65 (br s, 1H), 5.05 (s, 1.2H), 4.94 (s, 0.8H), 4.54 (s, 0.8H), 4.29 (s, 1.2H), 4.24 (m, 1.2H), 4.07 (m, 2H), 3.87 (m, 0.8H), 3.46~3.39 (m, 6H), 2.97 (m, 2H), 1.60 (m, 2H), 1.36 (s, 9H); MS/ESI (m+1) = 689.8 (observado), PM = 689.8 ($\text{C}_{28}\text{H}_{35}\text{N}_9\text{O}_8\text{S}_2$). Sólido/espuma amarilla. |
| 50 | 54 | 51 |  | $^1\text{H NMR}$ (400MHz; DMSO_{d6}) δ 10.42-10.40 (m, 1H), 8.37-8.32 (m, 1H), 8.28-8.25 (m, 1H), 7.73-7.70 (m, 2H), 7.58-7.54 (m, 1H), 6.76 (t, 1H), 6.39-6.38 (m, 1H), 5.03 (s, 1.2H), 4.92 (s, 0.8H), 4.54 (s, 0.8H), 4.29 (s, 1.2H), 4.25 (m, 1.2H), 4.08-4.07 (m, 2H), 3.87 (m, 0.8H), 3.18 (m, 2H), 2.89 (m, 2H), 1.47 (m, 2H), 1.40-1.30 (m, 11H), 1.24 (m, 2H). MS/ESI (m+23/MNa ⁺) = 696.2 (observado), PM = 673.8 ($\text{C}_{28}\text{H}_{35}\text{N}_9\text{O}_7\text{S}_2$). Sólido/espuma roja. |

Ejemplo 55: Preparación de etil 2-[6-amino-2-{2-(t-butoxicarbonil-amino)etil}-amino-9H-purin-9-il]acetato (55).



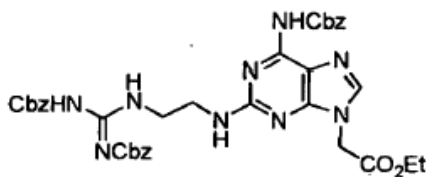
El comp. **55** se preparó a partir del comp. **26** siguiendo de manera similar el procedimiento para el **Ejemplo 32**. Sólido amarillo pálido. ^1H NMR (400MHz; DMSO_{d6}) δ 7.70 (s, 1H), 6.84 (t, 1H), 6.79 (s, 2H), 6.30 (t, 1H), 4.87 (s, 2H), 4.16 (q, 2H), 3.25 (q, 2H), 3.08 (q, 2H), 1.37 (s, 9H), 1.22 (t, 3H).

Ejemplo 56: Preparación de etil 2-[6-amino-2-[2-{2,3-bis(benciloxi-carbonil)guanidino}etil]amino-9H-purin-9-il]acetato (56).



A 4.42g del comp. **55** disueltos en 22ml MC, se añadieron lentamente 22ml TFA a 0°C, y la solución se agitó por 2.5h. La solución de reacción se concentró a presión reducida, a lo cual se añadieron 100ml de éter de dietilo. El precipitado resultante se recogió por filtración para obtener 5.79g de un producto intermedio sólido marrón pálido. 3.9g del intermedio se disolvieron en 39ml MC, a lo cual se añadieron lentamente 6.9ml de TEA a 0°C. La solución se agitó por 15min a temperatura ambiente, a lo cual se añadieron 2.48g de 1,3-bis(benciloxicarbonil)-2-(metiltio)pseudourea. Después, la mezcla de reacción se agitó por otras 24h, y se lavó con 0.5M HCl ac. La capa orgánica se secó sobre sulfato magnésico anhidro y se concentró a presión reducida para producir 4.58g del comp. **56** como un sólido amarillo pálido. ^1H NMR (500MHz; DMSO_{d6}) δ 11.59 (s, 1H), 8.56 (t, 1H), 7.69 (s, 1H), 7.39-7.29 (m, 10H), 6.75 (s, 2H), 6.53 (s, 1H), 5.15 (s, 2H), 5.02 (s, 2H), 4.86 (s, 2H), 4.13 (q, 2H), 3.50 (q, 2H), 3.37 (m, 2H), 1.19 (t, 3H).

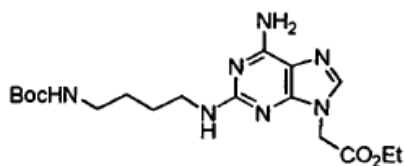
Ejemplo 57: Preparación de etil 2-[6-(benciloxicarbonilamino)-2-[2-{2,3-bis-(benciloxicarbonil)guanidino}etil]amino-9H-purin-9-il]acetato (57).



4.54g del comp. **56** y 8.22g de N-(benciloxicarbonil)-N'-metilimidazolio triflato se disolvieron en 90ml de DMF, y se agitó por 29h a temperatura ambiente. El solvente se eliminó a presión reducida, y el residuo resultante se purificó por cromatografía de columna (1:3 hexano/EA) para proporcionar 3.06g del comp. **57** como una espuma blanca/sólido. ^1H NMR (500MHz; DMSO_{d6}) δ 11.60 (s, 1H), 10.25 (s, 1H), 8.57 (t, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.45-7.29 (m, 15H), 7.14 (t, 1H), 5.18 (s, 2H), 5.14 (s, 2H), 5.02 (s, 2H), 4.95 (s, 2H), 4.15 (q, 2H), 3.54 (q, 2H), 3.42 (q, 2H), 1.19 (t, 3H).

Ejemplo 58: Preparación de etil 2-[6-amino-2-{4-(t-butoxicarbonil-amino)butil}-amino-9H-purin-9-il]acetato (58).

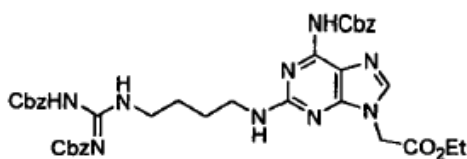
5



10 El comp. **58** se preparó a partir del comp.**27** como un sólido/espuma amarilla rojiza siguiendo de manera similar el procedimiento descrito en el Ejemplo 32. ^1H NMR (500MHz; DMSO_{d6}) δ 7.67 (s, 1H), 6.79 (t, 1H), 6.69 (s, 2H), 6.30 (m, 1H), 4.85 (s, 2H), 4.15 (q, 2H), 3.22-3.17 (m, 2H), 2.93-2.89 (m, 2H), 1.45 (m, 2H), 1.40-1.36 (m, 11H), 1.21 (t, 3H).

15 Ejemplo 59: Preparación de etil 2-[6-(benziloxicarbonilamino)-2-[4-(2,3-bis-(benziloxicarbonil)guanidino)butil]amino-9H-purin-9-yl]acetato (59).

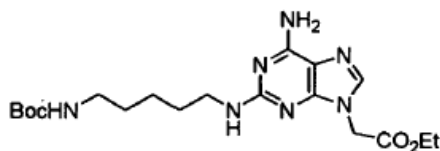
20



25 El comp. **59** se preparó a partir del comp.**58** como un sólido/espuma amarilla pálida siguiendo de manera similar los procedimientos descritos en los Ejemplos 56 ~ 57. ^1H NMR (500MHz; DMSO_{d6}) δ 11.49 (s, 1H), 10.12 (s, 1H), 8.28 (t, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.45-7.31 (m, 5H), 6.95 (t, 1H), 5.17 (s, 2H), 4.93 (s, 2H), 4.16 (q, 2H), 3.28 (m, 4H), 1.51 (m, 4H), 1.46 (s, 9H), 1.38 (s, 9H), 1.21 (t, 3H).

30 Ejemplo 60: Preparación de etil 2-[6-amino-2-[5-(t-butoxicarbonilamino)-pentil]amino-9H-purin-9-yl]acetato (60).

35

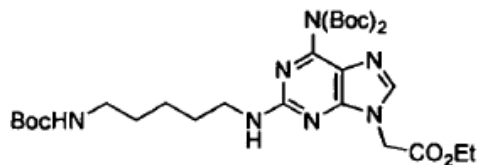


40 El comp. **60** se preparó a partir del comp.**28** como un sólido/espuma amarilla rojiza siguiendo de manera similar el procedimiento descrito en el Ejemplo 32. ^1H NMR (500MHz; DMSO_{d6}) δ 7.67 (s, 1H), 6.78 (t, 1H), 6.69 (s, 2H), 6.28 (m, 1H), 4.85 (s, 2H), 4.15 (q, 2H), 3.18 (q, 2H), 2.89 (q, 2H), 1.47 (m, 2H), 1.40-1.34 (m, 11H), 1.25 (m, 2H), 1.21 (t, 3H).

45 Ejemplo 61: Preparación de etil 2-[6-{di-(t-butoxicarbonil)amino}-2-[5-1(t-butoxicarbonil)amino]pentil]amino-9H-purin-9-yl]acetato (61).

45

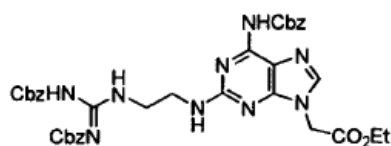
50



55 A 6.98g del comp. **60** disueltos en 100ml de THF, se añadieron 7.95g de Boc_2O y 186mg de 4-(N,N-dimetilamino)piridina, y la solución se agitó por 10min. Después, la solución se mezcló con 4.62ml de TEA, se agitó por 30min, lentamente se calentó hasta 50°C , y después, se agitó por otras 24h a la temperatura. La solución de reacción se concentró al vacío, y el residuo resultante se disolvió en 170ml de EA y se lavó en serie con 0.5M HCl ac. y agua. La capa orgánica se secó sobre sulfato sódico anhidro, se concentró, y se sometió a separación cromatográfica (1:1 hexano/MC \rightarrow MC) para obtener el comp. **61** como un sólido/espuma amarilla. ^1H NMR (500MHz; DMSO_{d6}) δ 8.05 (s, 1H), 7.23 (t, 1H), 6.77 (t, 1H), 5.00 (s, 2H), 4.19 (q, 2H), 3.25 (q, 2H), 2.91 (q, 2H), 1.53 (m, 2H), 1.40-1.39 (m, 29H), 1.28 (m, 2H), 1.22 (t, 3H).

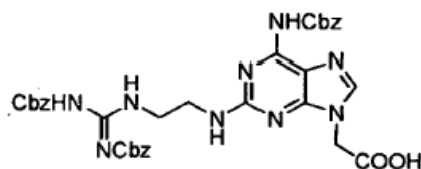
60

Ejemplo 62: Preparación de etil 2-[2-[2-(2,3-bis-(benciloxycarbonil)-guanidino)etil]amino-6-oxo-6,9-dihidro-1H-purin-2-il]acetato (62).



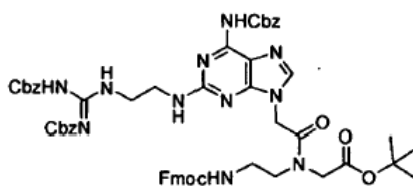
El comp. **50** se convirtió al comp. **62** como un sólido blanco siguiendo de manera similar el procedimiento descrito en el **Ejemplo 57**. $^1\text{H NMR}$ (500MHz; DMSO-d_6) δ 11.59 (s, 1H), 10.68 (s, 1H), 8.50 (t, 1H), 7.68 (s, 1H), 7.42-7.29 (m, 10H), 6.58 (m, 1H), 5.13 (s, 2H), 5.02 (s, 2H), 4.86 (s, 2H), 4.12 (q, 2H), 3.50 (m, 2H), 3.46 (m, 2H), 1.18 (t, 3H).

Ejemplo 63: Preparación de ácido 2-[6-(benciloxycarbonilamino)-2-[2-12,3-bis-(benciloxycarbonil)guanidino]etil]amino-9H-purin-9-il]acético (63).



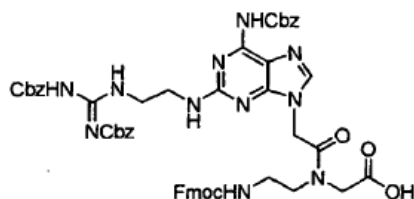
A 2.57g del comp. **57** disueltos en 7.1ml de THF y 7.1ml de agua, se añadieron 340mg de LiOH a 0°C , y la solución se agitó a temperatura ambiente por 40min. La solución de reacción se acidificó hasta pH 5~6 con 1N HCl ac. a 0°C , y el sólido resultante se recogió por filtración para producir 2.33g del comp. **63** como un sólido blanco. $^1\text{H NMR}$ (500MHz; DMSO-d_6) δ 11.59 (s, 1H), 10.21 (s, 1H), 8.57 (t, 1H), 7.93 (s, 1H), 7.45-7.28 (m, 15H), 7.12 (t, 1H), 5.17 (s, 2H), 5.13 (s, 2H), 5.02 (s, 2H), 4.83 (s, 2H), 3.53 (q, 2H), 3.42 (q, 2H).

Ejemplo 64: Preparación de t-butil N-[2-((9H-fluoren-9-il)metoxicarbonil-amino)etil]-N-[2-[6-(benciloxycarbonilamino)-2-[2-(2,3-bis-(benciloxi-carbonil)-guanidino)etil]amino-9H-purin-9-il]acetil]glicinato (64).



A 1.6g del comp. **63** disueltos en 30ml de DMF, se añadieron a 0°C 660mg de EDCI y 910mg de Fmoc-Aeg-OtBu. La solución de reacción se agitó por 2h a temperatura ambiente y después se concentró a presión reducida. El residuo resultante se disolvió en 50ml MC y se lavó con 0.5M HCl ac., y la capa orgánica se secó sobre sulfato sódico anhidro. Después, la capa orgánica se concentró y se sometió a separación cromatográfica (65:1 MC/MeOH) para obtener 500mg del comp. **64** como un sólido blanco. $^1\text{H NMR}$ (500MHz; DMSO-d_6) δ 11.59 (s, 0.4H), 11.58 (s, 0.6H), 10.21 (s, 1H), 8.55 (m, 1H), 7.47-7.28 (m, 20H), 7.06 (br, 1H), 5.17-4.89 (m, 8H), 4.34-4.28 (m, 2.8H), 4.20 (m, 1H), 3.95 (s, 1.2H), 3.52 (m, 3.4H), 3.43 (m, 2.2H), 3.34 (m, 1.7H), 3.12 (m, 0.7H), 1.43 (s, 3H), 1.34 (s, 6H).

Ejemplo 65: Preparación de N-[2-((9H-fluoren-9-il)metoxicarbonilamino)-etil]-N-[2-[6-(benciloxycarbonilamino)-2-[2-(2,3-bis(benciloxycarbonil)-guanidino)etil]amino-9H-purin-9-il]acetil]glicina (65).



5

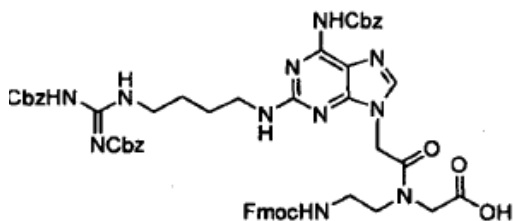
10

A 460mg del comp. **64** disueltos en 3.6ml MC, se añadieron lentamente 3.6ml TFA a 0°C. La solución de reacción se agitó a temperatura ambiente por 3.5h, y después, 50ml éter de dietilo se añadieron. El precipitado resultante se recogió por filtración para producir 430mg del comp. **65** como un sólido blanco. $^1\text{H NMR}$ (400MHz; DMSO_{d6}) δ 11.57 (s, 1H), 10.77 (br s, 1H), 8.66 (s, 1H), 8.54 (s, 1H), 7.87 (m, 2H), 7.63 (m, 2H), 7.50-7.28 (m, 21H), 5.26-4.96 (m, 8H), 4.34-4.18 (m, 4H), 4.03 (s, 1H), 3.52-3.36 (m, 7H), 3.13 (m, 1H). MS/ESI ($m+1$) = 1019.4 (observado), PM = 1018.0 ($\text{C}_{53}\text{H}_{51}\text{N}_{11}\text{O}_{11}$).

15

Ejemplo 66: Preparación de N-[2-((9H-fluoren-9-il)metoxicarbonilamino)-etil]-N-[2-[6-(benciloxicarbonilamino)-2-[4-[2,3-bis(benciloxicarbonil)-guanidino]-butil]amino-9H-purin-9-il)acetil]glicina (**66**).

20



25

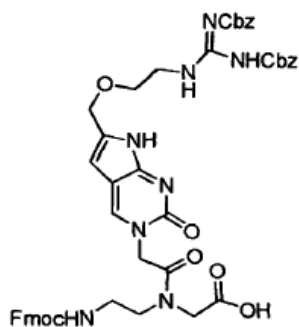
30

El comp. **59** se convirtió al comp. **66** como un sólido/espuma blanca siguiendo de manera similar los procedimientos descritos en los Ejemplos 63 ~ 65. $^1\text{H NMR}$ (500MHz; DMSO_{d6}) δ 12.84 (br s, 1H), 11.50 (s, 1H), 10.14-10.13 (m, 1H), 8.28 (m, 1H), 7.88 (m, 2H), 7.80-7.77 (m, 1H), 7.68-7.66 (m, 2H), 7.49 (t, 1H), 7.45-7.29 (m, 9H), 6.90 (m, 1H), 5.17 (s, 2H), 5.07 (s, 1.2H), 4.89 (s, 0.8H), 4.35-4.18 (m, 3H), 4.00 (s, 1H), 3.52 (m, 1H), 3.35-3.25 (m, 6H), 3.12 (m, 1H), 1.49 (m, 4H), 1.44 (d, 9H), 1.37 (d, 9H). MS/ESI ($m+1$) = 978.4 (observado), PM = 978.1 ($\text{C}_{49}\text{H}_{59}\text{N}_{11}\text{O}_{11}$).

35

Ejemplo 67: Preparación de N-[2-((9H-fluoren-9-il)metoxicarbonilamino)-etil]-N-[2-[6-[2-[2,3-bis(benciloxicarbonil)guanidino]etoxi]metil-2-oxo-2H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-3(7H)-il]acetil]glicina (**67**).

40



45

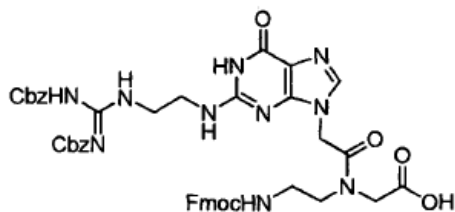
50

55

El comp. **18** se convirtió al comp. **67** como un sólido amarillo pálido siguiendo de manera similar los procedimientos descritos en los Ejemplos 63 ~ 65. $^1\text{H NMR}$ (500MHz; DMSO_{d6}) δ 11.99 (br s, 1H), 11.57 (br, 1H), 8.56 (m, 1H), 8.48-8.45 (m, 1H), 7.89-7.87 (m, 2H), 7.70-7.65 (m, 2H), 7.49-7.26 (m, 15H), 6.36-6.33 (m, 1H), 5.20 (s, 2H), 5.03-5.01 (m, 3.3H), 4.83 (s, 0.7H), 4.49-4.17 (m, 5.7H), 4.01 (m, 1.3H), 3.57-3.11 (m, 8H); MS/ESI ($m+1$) = 899.7 (observado), PM = 898.9 ($\text{C}_{47}\text{H}_{46}\text{N}_8\text{O}_{11}$).

60

Ejemplo 68: Preparación de N-[2-((9H-fluoren-9-il)metoxicarbonilamino)-etil]-N-[2-[2-[2,3-bis(benciloxicarbonil)guanidino]etil]amino-6-oxo-6,9-dihidro-1H-purin-2-il]acetil]glicina (**68**).



5

10

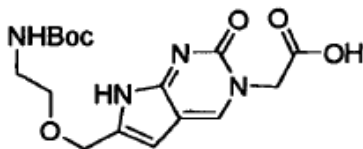
15

El comp. **62** se convirtió al comp. **68** como un sólido/espuma blanca siguiendo los procedimientos descritos en Ejemplos 63 ~ 65. $^1\text{H NMR}$ (500MHz; DMSO_{d6}) δ 11.58 (s, 1H), 10.88 (s, 1H), 8.51 (m, 1H), 7.93 (m, 1H), 7.87 (m, 2H), 7.64 (m, 2H), 7.47 (t, 1H), 7.41-7.26 (m, 14H), 6.66 (br, 1H), 5.16-4.89 (m, 8H), 4.34-4.18 (m, 3.8H), 4.00 (m, 1.2H), 3.50-3.35 (m, 7H), 3.13 (m, 1H); MS/ESI ($m+1$) = 885.3 (observado), PM = 884.9 ($\text{C}_{45}\text{H}_{44}\text{N}_{10}\text{O}_{10}$).

20

25

Ejemplo 69: Preparación de ácido 2-[6-[2-(t-butoxicarbonilamino)etoxi]metil-2-oxo-2H-pirrolo-[2,3-d]pirimidin-3(7H)-il]acético (69).



30

35

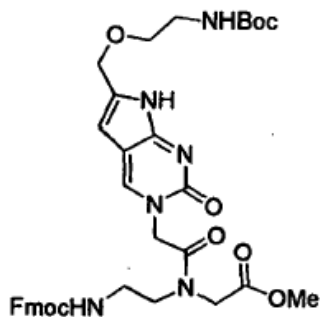
El compuesto **16** se hidrolizó al compuesto **69** como un sólido marrón pálido siguiendo de manera similar el procedimiento descrito en el Ejemplo 11. $^1\text{H NMR}$ (500MHz; DMSO_{d6}) δ 13.03 (br s, 1H), 11.31 (s, 1H), 8.37 (s, 1H), 6.85 (t, 1H), 6.19 (s, 1H), 4.63 (s, 2H), 4.40 (s, 2H), 3.42 (t, 2H), 3.11 (q, 2H), 1.37 (s, 9H).

40

45

50

Ejemplo 70: Preparación de metil N-[2-[(9H-fluoren-9-il)metoxicarbonil-amino]etil]-N-[2-[6-[2-(t-butoxicarbonilamino)etoxi]metil-2-oxo-2H-pirrolo-[2,3-d]pirimidin-3(7H)-il]acetil]glicinato (70).



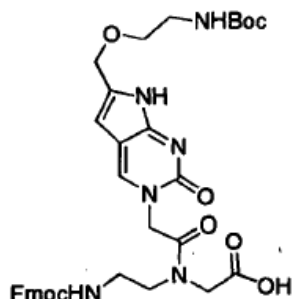
55

60

3.6g del comp. **69**, 3.6g de Fmoc-Aeg-OMe, 2.5g de EDCI 1.73g de HOBt, y 2.24ml DIEA se disolvieron en 70ml de DMF, y se agitó a temperatura ambiente por 1.5h. El solvente de reacción se eliminó a presión reducida, y el residuo resultante se disolvió en 100ml MC y se lavó en serie con 1M HCl ac., agua destilada, y salmuera. La capa orgánica se secó sobre sulfato sódico anhidro, se concentró al vacío, y se purificó por cromatografía de columna (100:2 MC/MeOH) para proporcionar 2.5g del comp. **70** como un sólido/espuma amarilla. $^1\text{H NMR}$ (500MHz; DMSO_{d6}) δ 11.30 (s, 1H), 8.24 (s, 0.65H), 8.21 (s, 0.35H), 7.89-7.87 (m, 2H), 7.71-7.67 (m, 2H), 7.48-7.25 (m, 5H), 6.87 (t, 1H), 6.17 (s, 0.7H), 6.15 (s, 0.3H), 4.93 (s, 1.3H), 4.74 (s, 0.7H), 4.40-4.39 (m, 2.7H), 4.35-4.21 (m, 3H), 4.08 (s, 1.3H), 3.73 (s, 0.8H), 3.62 (s, 2.2H), 3.51 (t, 1.4H), 3.43-3.30 (m, 3.6H), 3.13-3.10 (m, 3H), 1.37 (s, 9H).

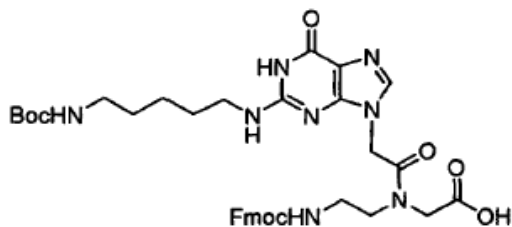
60

Ejemplo 71: Preparación de N-[2-((9H-fluoren-9-il)metoxicarbonilamino)-etil]-N-[2-[6-(t-butoxicarbonilamino)etoxi]metil-2-oxo-2H-pirrolo-[2,3-d]pirimidin-3(7H)-il]acetil]glicina (71).



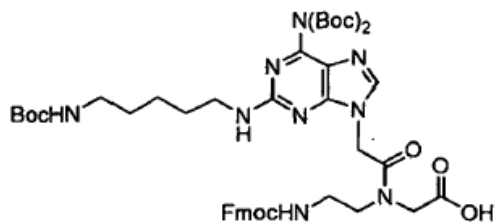
A 5.0g del comp. **70** disueltos en 75ml 1:1:1 acetonitrilo/acetona/agua, se añadieron lentamente a 0°C 28.5ml de 2.5N LiOH ac.. La solución de reacción se agitó por 10min y se neutralizó con 20% ácido cítrico ac.. Después que el pH de la solución se ajustó a 8 con bicarbonato sódico saturado ac., 516mg de Fmoc-OSu se añadieron a la solución y la solución se agitó por 2h a temperatura ambiente. Después, la solución se acidificó hasta pH 3 con 20% ácido cítrico ac. y se agitó por 90min a 0°C. El precipitado resultante se recogió por filtración para dar 4.0g del comp. **71** como un sólido verde amarillento. ¹H NMR (500MHz; DMSO_{d6}) δ 12.02 (br, 1H), 8.51-8.49 (m, 1H), 7.89-7.88 (d, 2H), 7.70-7.50 (m, 2H), 7.49 (t, 1H), 7.42-7.28 (m, 4H), 6.87 (t, 1H), 6.36 (s, 0.7H), 6.33 (s, 0.3H), 5.02 (s, 1.2H), 4.84 (0.8H), 4.43-4.42 (m, 2.4H), 4.34-4.19 (m, 3.2H), 4.01 (s, 1.4H), 3.48 (t, 1.2H), 3.44-3.41 (m, 2.1H), 3.37-3.29 (m, 2H), 3.12-3.10 (m, 2.7H), 1.37 (s, 9H); MS/ESI (m+1) = 689.3 (observado), PM = 688.7 (C₃₅H₄₀N₆O₉).

Ejemplo 72: Preparación de N-[2-((9H-fluoren-9-il)metoxicarbonilamino)-etil]-N-[2-[5-((t-butoxicarbonil)amino)pentil]amino-6-oxo-6,9-dihidro-1H-purin-2-il]acetil]glicina (72).



El comp. **51** se convirtió al comp. **72** como un sólido/espuma blanca siguiendo de manera similar los procedimientos descritos en los **Ejemplos 69 ~ 71**. ¹H NMR (500MHz; DMSO_{d6}) δ 13.01 (br, 1H), 10.52-10.46 (m, 1H), 7.88 (d, 2H), 7.65 (d, 2H), 7.54 (s, 0.5H), 7.50 (s, 0.5H), 7.48 (m, 1H), 7.40 (t, 2H), 7.31 (m, 2H), 6.81 (t, 0.5H), 6.72 (t, 0.5H), 6.52-6.48 (m, 1H), 4.98 (s, 1H), 4.77 (s, 1H), 4.33 (d, 1H), 4.23-4.21 (m, 2H), 4.05 (m, 1H), 3.96 (s, 1H), 3.50 (m, 1H), 3.35 (m, 2H), 3.21 (m, 2H), 3.14 (q, 1H), 2.88 (m, 2H), 1.46 (q, 2H), 1.39-1.35 (m, 11H), 1.23 (m, 2H); MS/ESI (m+1) = 717.4 (observado), PM = 716.8 (C₃₆H₄₄N₈O₈).

Ejemplo 73: Preparación de N-[2-((9H-fluoren-9-il)metoxicarbonilamino)-etil]-N-[2-[6-((bis(t-butoxicarbonil)amino)-2-(t-butoxicarbonilamino)-pentil)amino-9H-purin-9-il]acetil]glicina (73).



El comp. **61** se convirtió al comp. **73** como una sólido/espuma blanca siguiendo de manera similar los procedimientos descritos en los Ejemplos 69 ~ 71. ¹H NMR (500MHz; DMSO_{o6}) δ 12.71 (br s, 1H), 7.90-7.87 (m, 3H), 7.67 (m, 2H), 7.44-7.39 (m, 3H), 7.31 (m, 2H), 7.07 (m, 1H), 6.69 (m, 1H), 5.11 (s, 1.2H), 4.93 (s, 0.8H), 4.37-4.21 (m, 3.8H), 4.01 (s, 1.2H), 3.52 (m, 1H), 3.36 (m, 2H), 3.23 (m, 2H), 3.13 (m, 1H), 2.88 (m, 2H), 1.49 (m, 2H), 1.38-1.35 (m, 27H), 1.27-1.25 (m, 4H); MS/ESI (m+1) = 916.5 (observado), PM = 916.0 (C₄₆H₆₁N₉O₁₁).

Preparación de oligómeros de PNA: monómeros de PNA **o**, que se sintetizaron de acuerdo con el Esquema 4, se enviaron a Panagene, Inc (www.panagene.com, Daejeon, Corea del Sur) para preparar oligómeros de PNA de la **Fórmula I** en Panagene de acuerdo con el método descrito en la literatura o con modificación(s) menor(s) de este. (Org. Lett. vol 9, 3291-3293, 2006) Se recibieron de Panagene oligómeros de PNA caracterizados por MALDI-TOF y analizados por HPLC- C₁₈ de fase inversa. Los oligómeros de PNA recibidos de Panagene se usaron sin purificación adicional.

Los monómeros de PNA **q** del Esquema 5 se usaron para sintetizar los oligómeros de PNA de la **Fórmula I** de acuerdo con el método descrito en la técnica anterior o con modificación(s) menor(s) de este. (patente US 6,133,444) Esos oligómeros de PNA se purificaron por HPLC- C₁₈ de fase inversa (acetonitrilo ac con 0.1% TFA) y caracterizados por MALDI-TOF. La Figura 1 proporciona cromatogramas de HPLC antes y después de la purificación del **Oligo 17** por HPLC de fase inversa. La Figura 2 proporciona un espectro de masa de MALDI-TOF para un lote del **Oligo 17**. Las Figuras 1 y 2 se proporcionan sólo con propósitos ilustrativos y no se deben interpretar como una restricción a esta invención.

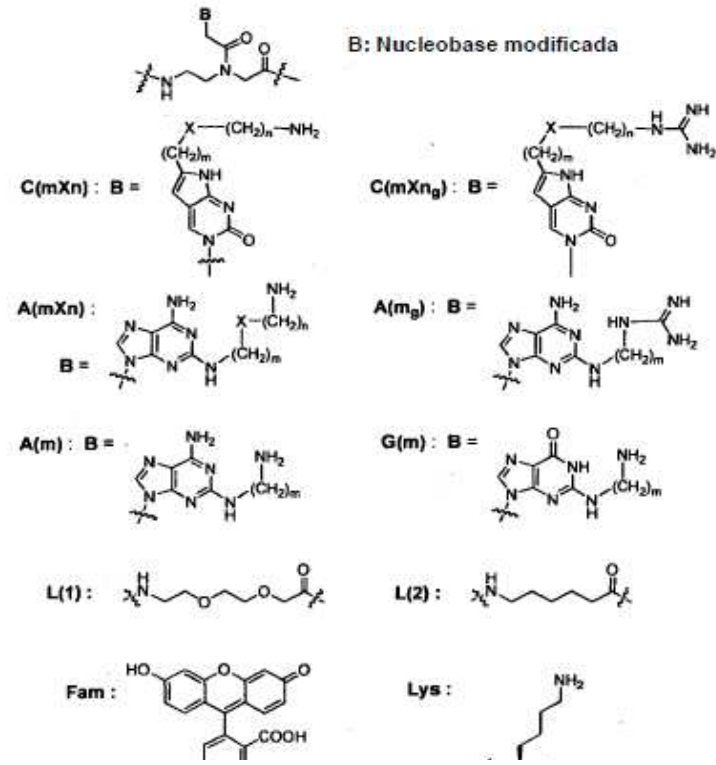
Los oligómeros de PNA sintetizados para esta invención se proporcionan en la Tabla 1 junto con sus datos de peso molecular por MALDI-TOF. De las abreviaturas usadas en la Tabla 1, A, T, G, y C se refieren a la nucleobase adenina, timina, guanina y citosina, sin modificar, respectivamente. Las nucleobases modificadas C(mXn), C(mXn_g), A(mXn), A(m), A(m_g), y G(m) son como se define más abajo la Tabla 1 junto con Lys, Fam, L(1), y L(2). Estos oligómeros de PNA sólo se presentan para propósitos ilustrativos y no se deben interpretar como una restricción a la presente invención.

Tabla 1. Oligómeros de PNA de esta invención y datos espectrales de masa de estos.^a

| Entrada | Secuencia (N → C) | PM | (m+1) ^b |
|----------|---|--------|--------------------|
| Oligo 1 | Fam-L(1)L(1)-TGC(1O3)-TAC(1O3)-TAC(1O3)-TG-Lys-NH ₂ | 4079.0 | 4078.3 |
| Oligo 2 | Fam-L(1)L(1)-TGC-TAC-TAC-TG-Lys-NH ₂ | 3745.6 | 3745.5 |
| Oligo 3 | TGC(1O3)-TAC-TAC(1O3)-TG-Lys-NH ₂ | 3319.4 | 3318.5 |
| Oligo 4 | TGC-TAC(1O3)-TAC-TG-Lys-NH ₂ | 3208.3 | 3208.3 |
| Oligo 5 | TGC-TAC-TAC-TG-Lys-NH ₂ | 3097.2 | 3097.8 |
| Oligo 6 | Fam-L(1)L(1)-TC(1O3)T-CC(1O3)C-AGC(1O3)-GTG-C(1O3)GC-C(1O3)AT-Lys-NH ₂ | 6140.1 | 6141.8 |
| Oligo 7 | Fam-L(1)L(1)-TCT-CCC-AGC-GTG-CGC-CAT-Lys-NH ₂ | 5584.4 | 5583.1 |
| Oligo 8 | TGC(2O2)-TAC-TAC(2O2)-TG-Lys-NH ₂ | 3319.4 | 3318.9 |
| Oligo 9 | GC(2O2)A-C(2O2)AT-TTG-C(2O2)CT-NH ₂ | 3553.7 | 3552.7 |
| Oligo 10 | GC(1O2)A-C(1O2)AT-TTG-C(1O2)CT-NH ₂ | 3511.6 | 3511.1 |
| Oligo 11 | GCA-CAT-TTG-CCT-Lys-NH ₂ | 3348.3 | 3345.8 |

| | | | | |
|----|---|--|--------|--------|
| 5 | Oligo 12 | CA(3)T-A(3)GT-A(3)TA-A(3)GT-NH ₂ | 3580.8 | 3580.9 |
| | Oligo 13 | CA(4)T-A(4)GT-A(4)TA-A(4)GT-NH ₂ | 3636.9 | 3634.9 |
| | Oligo 14 | CA(5)T-A(5)GT-A(5)TA-A(5)GT-NH ₂ | 3693.0 | 3691.5 |
| | Oligo 15 | CA(7)T-A(7)GT-A(7)TA-A(7)GT-NH ₂ | 3805.0 | 3803.4 |
| 10 | Oligo 16 | CAT-AGT-ATA-AGT-Lys-NH ₂ | 3420.3 | 3418.3 |
| | Oligo 17 | CA(5)T-A(5)GT-A(5)TA-A(5)GT-Lys-NH ₂ | 3820.9 | 3819.8 |
| | Oligo 18 | CA(2O2)T-A(2O2)GT-A(2O2)TA-A(2O2)GT-NH ₂ | 3700.7 | 3701.4 |
| | Oligo 19 | L(1)-TAG(2O3)-CTG(2O3)-CTG-ATT-Lys-NH ₂ | 3746.9 | 3748.9 |
| 15 | Oligo 20 | TG(5)G-C(1O2)AA-C(1O2)TG-A(5)T-Lys-NH ₂ | 3525.6 | 3523.8 |
| | Oligo 21 | Fam-L(2)-TG(5)G-C(102)AA-C(102)TG-A(5)T-Lys-NH ₂ | 3997.0 | 3996.1 |
| | Oligo 22 | Fam-L(2)-TT-C(1O2)AT-A(5)GT-A(5)TA-AG(5)T-Lys-NH ₂ | 4806.9 | 4806.7 |
| 20 | Oligo 23 | Fam-L(2)L(2)-TC(1O2)A-GA(5)A-C(1O2)TT-A(5)T-Lys-NH ₂ | 4084.2 | 4083.8 |
| | Oligo 24 | Fam-L(2)-CA(5)T-A(4 _g)GT-A(4 _g)TA(5)-AGT-Lys-NH ₂ | 4348.5 | 4347.4 |
| | Oligo 25 | TT-C(1O2 _g)AT-A(5)GT-A(5)TA-AG(5)T-Lys-NH ₂ | 4377.4 | 4375.6 |
| 25 | Oligo 26 | GC(1N3)A-C(1N3)AT-TTG-C(1N3)CT-NH ₂ | 3550.8 | 3550.9 |
| | Oligo 27 | CAT-AGT-ATA-AGT-NH ₂ | 3292.3 | 3292.5 |
| | Oligo 28 | Fam-L(2)-TGG-CAA-CTG-AT-Lys-NH ₂ | 3617.5 | 3616.3 |
| 30 | a. Las abreviaturas empleadas para los monómeros se definen más abajo. b. Máximo ión observado para MH ⁺ a menos que se indique lo contrario. | | | |

35
40
45
50
55
60



Afinidad de unión para ADN: Los oligómeros de esta invención se evaluaron por su afinidad de unión para ADN por medición de los valores de T_m de la siguiente manera.

Se mezclaron 4 μ M del oligómero de PNA y 4 μ M de ADN en amortiguador ac. (pH 7.16, 10mM fosfato sódico, 100mM NaCl), y se incubaron a 90°C durante varios minutos y lentamente se enfriaron a temperatura ambiente. Después, la solución se transfirió a una cubeta de cuarzo de 4ml y la cubeta se selló fuertemente. La cubeta se montó en un espectrofotómetro UV/Visible Agilent 8453 y los cambios de absorbancia a 260nm se registraron con aumento de la temperatura de la cubeta ya sea a 0.5 o 1.0°C por minuto. A partir de la curva de absorbancia vs temperatura, la temperatura que mostró la mayor velocidad de aumento en absorbancia se leyó como la temperatura de fusión T_m entre PNA y ADN. Los ADN para las mediciones de T_m se adquirieron ya sea de Bioneer, Inc. (www.bioneer.com, Daejon, Corea del Sur) o de Ahram Biosystems (www.ahrambio.com, Seúl, Corea del Sur), y se usaron sin purificación adicional.

La Figura 3 proporciona gráficos de cambios de absorbancia con temperatura para el Oligo 17 contra ADN complementario o no coincidente. Para las secuencias de ADNs no coincidentes contra el Oligo 17, referirse a la Tabla 2. En la Figura 3, hay una temperatura de transición en cada curva, que se leyó como el valor de T_m para la curva.

Los valores de T_m se proporcionan en la Tabla 2 para los oligómeros de PNA de esta invención. Estos valores de T_m se proporcionan sólo con propósitos ilustrativos y no se deben interpretar como una restricción a esta invención.

Tabla 2. Valores de T_m entre PNA y ADN complementario o no coincidente.

| Entrada | Secuencia de ADN (5' → 3') | T_m , °C | Observación |
|----------|----------------------------|------------|-------------------------------------|
| Oligo 5 | CAG-TAG-TAG-CA | 55 | oligómero de PNA sin modificar |
| Oligo 3 | | 65 | C(103) x 2 |
| Oligo 4 | | 61 | C(103) x 1 |
| Oligo 8 | | 68 | C(202) x 2 |
| Oligo 10 | AGG-CAA-TTG-TGC | > 85 | C(102) x 3 |
| Oligo 11 | | 59 | oligómero de PNA sin modificar |
| Oligo 12 | ACT-TAT-ACT-ATG | 60 | A(3) x 4 |
| Oligo 13 | | 64 | A(4) x 4 |
| Oligo 14 | | 69 | A(5) x 4 |
| Oligo 15 | | 71 | A(7) x 4 |
| Oligo 18 | | 66 | A(202) x 4 |
| Oligo 27 | | 55 | oligómero de PNA sin modificar |
| Oligo 16 | ACT-TAT-ACT-ATG | 56 | oligómero de PNA sin modificar |
| Oligo 17 | ACT-TAT-ACT-ATG | 72 | complementario |
| | ACT-TA <u>C</u> -ACT-ATG | 61 | no coincidente (T → C) |
| | ACT-TA <u>A</u> -ACT-ATG | 59 | no coincidente (T → A) |
| | ACT-TA <u>G</u> -ACT-ATG | 58 | no coincidente (T → G) |
| Oligo 24 | ACT-TAT-ACT-ATG | 70 | A(5) x 2 más A(4 _g) x 2 |
| Oligo 20 | ATC-AGT-TGC-CA | 84 | complementario |
| | ATC-A <u>T</u> T-TGC-CA | 62 | no coincidente (G → T) |
| | ATC-A <u>A</u> T-TGC-CA | 65 | no coincidente (G → A) |

La sustitución de citosina con un derivado de la nucleobase pirrolocitosina no natural de esta invención aumentó notablemente la afinidad del oligómero de PNA para el ADN complementario. Por ejemplo, Oligo 10 que tiene tres monómeros 'C(1O2) de citosina 'modificados' mostró una T_m que sobrepasaba 85°C, mientras que el correspondiente Oligo 11 'sin modificar' mostró una T_m de 58°C. Otros monómeros de citosina modificada tales como 'C(1O3) o 'C(2O2)' además aumentaron significativamente la afinidad del oligómero de PNA para el ADN complementario, como se ejemplificó con Oligo 3 y Oligo 8.

Nucleobases de adenina 'modificada' de esta invención además aumentaron significativamente la afinidad del oligómero de PNA para el ADN complementario. Por ejemplo, Oligo 15 que tiene cuatro monómeros A(7) de adenina 'modificada' mostraron una T_m de 71°C, la cual es significativamente más alta que la T_m de 55°C observada con Oligo 27 'sin modificar'. Otros monómeros de adenina 'modificada' tales como A(4), y A(5) además aumentaron notablemente la afinidad para el ADN complementario.

Se encontró que los monómeros de PNA 'modificados' de esta invención eran muy sensibles a la no coincidencia de bases. Por ejemplo, disminuciones de 11 ~ 14°C en la T_m se observaron con una sola base no coincidente para un monómero A(5) en Oligo 17. Una sola base no coincidente para un monómero C(102) en Oligo 20 resultó en disminuciones de 19 ~ 22°C en la T_m .

Penetración celular : Con el fin de evaluar la capacidad de penetración celular de los oligómeros de PNA de esta invención, células de cáncer de origen humano se trataron con oligómeros de PNA etiquetados covalentemente con fluoresceína. El método aplicado se proporciona en resumen de la siguiente manera.

En cada cubreobjeto (en autoclave) colocado en cada pocillo de una placa de 24-pocillos, se sembraron 20,000 ~ 100,000 células en dependencia de la velocidad de crecimiento de la línea celular usada, y las células se cultivaron a 37°C y 5% CO₂ durante 16 a 24h. Después, el medio se sustituyó con 500µl de medio Opti-MEM fresco (con o sin 1% FBS), al cual se añadió una alícuota de solución madre ac. de un oligómero de PNA etiquetado covalentemente con fluoresceína. Después de que las células se cultivaron durante un intervalo designado, las células se lavaron con PBS, y se fijaron mediante la incubación a 3.7% o 4% paraformaldehído. Las células se lavaron totalmente varias veces con PBS o PBS que contenía 0.1% Tween-20. Después, el cubreobjeto se montó sobre un portaobjeto por medio del uso de una gota de solución de montaje y se selló con esmalte de uñas para microscopía de fluorescencia confocal. Se tomaron imágenes de fluorescencia ya sea en un microscopio confocal Zeiss LSM 510 (Alemania) a objetivo 63X o en un microscopio confocal Nikon C1Si a objetivo 40X.

Las imágenes de penetración celular en las Figuras 4~8 se proporcionan sólo para propósitos ilustrativos y no se deben interpretar como una restricción a la presente invención.

En la Figura 4(a) y 4(b), se proporcionan imágenes de microscopía confocal (a objetivo 63x) 1, 2, 3 y 24h después de que las células HeLa se trataron con Oligo 1 y Oligo 2 a 5µM, respectivamente (sin FBS). Mientras la intensidad de fluorescencia es clara y llega a ser intensa sobre las 24h en la Figura 4(a), la intensidad de fluorescencia es débil en la Figura 4(b), lo que indica que Oligo 1 penetra las células HeLa significativamente más rápido que Oligo 2 'sin modificar'.

En la Figura 5(a) y 5(b), se proporcionan imágenes de microscopía confocal (a objetivo 63x) 0.5 y 1h después de que las células MCF-7 se trataron con Oligo 6 y Oligo 7 a 2.5µM, respectivamente (sin FBS). Mientras la intensidad de fluorescencia es clara y llega a ser intensa sobre 1h en la Figura 5(a), la intensidad de fluorescencia es débil en la Figura 5(b), lo que indica que Oligo 6 penetra las células MCF-7 significativamente más rápido que Oligo 7 'sin modificar'.

En la Figura 6(a) y 6(b), se proporcionan fotografías de microscopía confocal (a objetivo 40x) 6 o 24h después de que las células HeLa se trataron con Oligo 1 y Oligo 6 a 1µM, respectivamente (con 1% FBS). Mientras la intensidad de fluorescencia es débil aun a 24h en la Figura 6(a), la intensidad de fluorescencia es clara y llega a ser intensa sobre 24h en la Figura 6(b), lo que sugiere que Oligo 6 penetra las células HeLa significativamente más rápido que Oligo 1.

En la Figura 7(a) y 7(b), se proporcionan fotografías de microscopía confocal (objetivo 40x) 24h después de que las células JAR se trataron con Oligo 21 y Oligo 28 a 2µM, respectivamente (sin FBS). Mientras la intensidad de fluorescencia es fuerte en la Figura 7(a), no hay intensidad de fluorescencia significativa en la Figura 7(b), lo que sugiere que Oligo 21 penetra las células JAR significativamente más rápido que Oligo 28 'sin modificar'.

En la Figura 7(c) y 7(d), se proporcionan fotografías de microscopía confocal (a objetivo 40x) 24h después de que las células A549 se trataron con Oligo 21 y Oligo 28 a 2µM, respectivamente (sin FBS). Mientras la intensidad de fluorescencia es fuerte en la Figura 7(c), no hay intensidad de fluorescencia significativa en la Figura 7(d), lo que sugiere que Oligo 21 penetra las células A549 significativamente más rápido que Oligo 28 'sin modificar'.

En la Figura 7(e) y 7(f), se proporcionan fotografías de microscopía confocal (a objetivo 40x) 12h después de que las células HeLa se trataron con Oligo 21 y Oligo 28 a 2µM, respectivamente (sin FBS). Mientras la intensidad de

fluorescencia es evidente en la Figura 7(e), no hay intensidad de fluorescencia significativa en la Figura 7(f), lo que sugiere que Oligo 21 penetra las células HeLa significativamente más rápido que Oligo 28 'sin modificar'.

5 En la Figura 7(g), se proporcionan fotografías de microscopía confocal (a objetivo 40x) 24h después de que las células HeLa se trataron con el Oligo 21 a 2µM (sin FBS). Dado que la fluorescencia celular en la Figura 7(g) es significativamente más fuerte que en la Figura 7(e), Oligo 21 parece penetrar sobre 24h en vez de 12h.

10 La Figura 8(a), 8(b) y 8(c) proporcionan imágenes de microscopía confocal (objetivo 40x) 24h después de que las células HeLa, A549, y JAR se trataron con 2µM Oligo 22, respectivamente (sin FBS). Todas las imágenes están asociadas con fluorescencia dentro de la célula, lo que indica que Oligo 22 posee buena penetración celular en las células probadas.

15 **Antisentido Ejemplo:** Oligo 9 y Oligo 12 poseen la misma secuencia de bases que T1-12 y T5-12, respectivamente, las cuales se informó en la literatura que inhiben la síntesis ribosomal de mdm2. (Nucleic Acids Res. vol 32, 4893-4902, 2004) Oligo 9 y Oligo 12 se evaluaron por su capacidad de inhibir la síntesis ribosomal de mdm2 en las células JAR de la siguiente manera. El siguiente ejemplo antisentido se presenta sólo para propósitos ilustrativos y no se debe interpretar como una restricción a la presente invención.

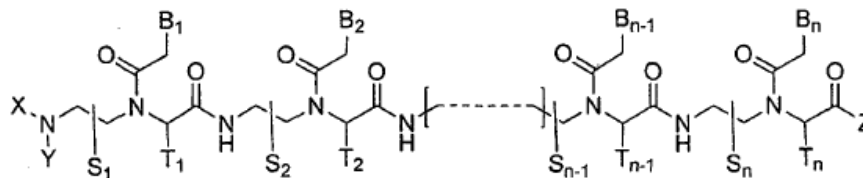
20 Las células JAR (ATCC # de catálogo HTB-144) se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con 10% FBS y 1% penicilina-estreptomina a 37°C y 5% CO₂. Las células después se sembraron en cada pocillo de una placa de 12-pocillos que contenía 1ml del mismo medio, y se trataron con una alícuota de una solución madre acuosa de Oligo 9 u Oligo 12 de una concentración designada. Después, las células se incubaron a 37°C y 5% CO₂ por 15h.

25 Las células en cada pocillo se lavaron con PBS frío y se trataron con 80µl de amortiguador RIPA que contenía 1% de cóctel de inhibidores de proteasa, y la placa se incubó a 4°C y se agitó lentamente por 15min. El contenido de cada pocillo se raspó en un micro tubo. El micro tubo se incubó en hielo por 10min y se centrifugó a 10,000g. El sobrenadante resultante se recogió y se sometió a cuantificación de proteína por el ensayo de Bradford y análisis de transferencia de tipo Western. Para electroforesis, 20µg de proteína se cargaron en cada línea del gel en un aparato de minigel, se separó y se transfirió sobre una membrana de PVDF (0.45µ, Millipore). El anticuerpo primario mdm2 usado para la transferencia de tipo Western fue SC-965 (Santa Cruz Biotechnology).

35 La Figura 9 proporciona los resultados de la transferencia de tipo Western para las células JAR tratadas con 5µM o 10µM Oligo 9, 5µM o 10µM Oligo 10, co-tratamiento con los oligómeros a 5µM o 10µM cada uno, y blanco (sin tratamiento con oligómero). En la Figura 9, el tratamiento con Oligo 9 u Oligo 10, o co-tratamiento con Oligo 9 y Oligo 10 inhibió significativamente la síntesis ribosomal de mdm2 en las células JAR tanto a 5µM y 10µM.

Reivindicaciones

1. Un derivado de ácido nucleico peptídico de la Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de este:



Fórmula I

en donde

n es un entero igual a o mayor que 5;

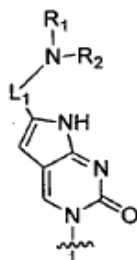
S₁, S₂, ..., S_{n-1}, S_n, T₁, T₂, ..., T_{n-1}, y T_n independientemente representan radicales hidrógeno, deuterio, alquilo sustituido o no sustituido, o arilo sustituido o no sustituido;

X y Y independientemente representan radicales hidrógeno, deuterio, alquilo sustituido o no sustituido, acilo sustituido o no sustituido, sulfonilo sustituido o no sustituido, o arilo sustituido o no sustituido;

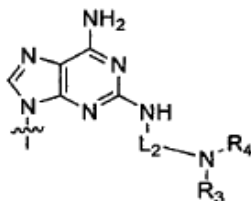
Z representa radicales hidroxilo, alquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, o amino sustituido o no sustituido;

B₁, B₂, ..., B_{n-1}, y B_n son independientemente seleccionadas de nucleobases naturales que incluyen adenina, timina, guanina, citosina y uracilo, y nucleobases no naturales; y,

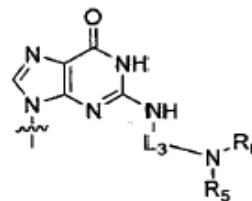
al menos una de B₁, B₂, ..., B_{n-1}, y B_n es independientemente seleccionada de nucleobases no naturales representadas por la **Fórmula II**, **Fórmula III**, o **Fórmula IV**:



Fórmula II



Fórmula III

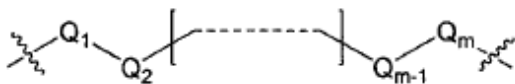


Fórmula IV

en donde

R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ y R₆ son independientemente seleccionados de radicales alquilo sustituido o no sustituido, e hidrógeno; y,

L₁, L₂ y L₃ son un enlazador covalente representado por la **Fórmula V** que conecta un grupo amino básico a la porción responsable de las propiedades de apareamiento de las nucleobases:



Fórmula V

en donde

Q₁ y Q_m son radicales metileno sustituido o no sustituido (-CH₂-), y Q_m está directamente enlazado al grupo amino básico;

Q₂, Q₃, ..., y Q_{m-1} son independientemente seleccionados de radicales metileno sustituido o no sustituido, oxígeno (-O-), azufre (-S-), y amino sustituido o no sustituido [-N(H)-, o -N(sustituyente)-]; y,

m es un número entero de 2 a 15.

2. El derivado de ácido nucleico peptídico de acuerdo con la Reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de este:

en donde

n es un número entero del 5 al 30;

$S_1, S_2, \dots, S_{n-1}, S_n, T_1, T_2, \dots, T_{n-1},$ y T_n son radicales hidrógeno;

X y Y son independientemente seleccionados de radicales hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido, acilo sustituido o no sustituido, sulfonilo sustituido o no sustituido;

Z representa radicales hidroxilo, alquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, o amino sustituido o no sustituido;

$B_1, B_2, \dots, B_{n-1},$ y B_n son independientemente seleccionadas de nucleobases naturales que incluyen adenina, timina, guanina, citosina y uracilo, y nucleobases no naturales; y,

al menos una de $B_1, B_2, \dots, B_{n-1},$ y B_n es independientemente seleccionada de nucleobases no naturales representadas por la **Fórmula II, Fórmula III, o Fórmula IV.**

5

10

15

3. El derivado de ácido nucleico peptídico de acuerdo con la Reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de este:

en donde

n es un número entero del 8 al 25;

$S_1, S_2, \dots, S_{n-1}, S_n, T_1, T_2, \dots, T_{n-1},$ y T_n son radicales hidrógeno;

X y Y son independientemente seleccionados de radicales hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido, acilo sustituido o no sustituido;

Z representa radicales hidroxilo, o amino sustituido o no sustituido;

$B_1, B_2, \dots, B_{n-1},$ y B_n son independientemente seleccionadas de nucleobases naturales que incluyen adenina, timina, guanina, citosina y uracilo, y nucleobases no naturales;

al menos dos de $B_1, B_2, \dots, B_{n-1},$ y B_n son independientemente seleccionadas de nucleobases no naturales representadas por la **Fórmula II, Fórmula III, o Fórmula IV;**

R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 y R_6 son independientemente seleccionados de radicales alquilo sustituido o no sustituido, e hidrógeno;

Q_1 y Q_m son radicales metileno sustituido o no sustituido, y Q_m está directamente enlazado al grupo amino básico;

$Q_2, Q_3, \dots,$ y Q_{m-1} son independientemente seleccionados de radicales metileno sustituido o no sustituido, oxígeno, y amino; y,

m es un número entero de 2 a 12.

20

25

30

35

4. El derivado de ácido nucleico peptídico de acuerdo con la Reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de este:

en donde

n es un número entero del 10 al 25;

$S_1, S_2, \dots, S_{n-1}, S_n, T_1, T_2, \dots, T_{n-1},$ y T_n son radicales hidrógeno;

X y Y son independientemente seleccionados de radicales hidrógeno, y acilo sustituido o no sustituido;

Z representa radicales hidroxilo, o amino sustituido o no sustituido;

$B_1, B_2, \dots, B_{n-1},$ y B_n son independientemente seleccionadas de nucleobases naturales que incluyen adenina, timina, guanina, citosina y uracilo, y nucleobases no naturales;

al menos tres de $B_1, B_2, \dots, B_{n-1},$ y B_n son independientemente seleccionadas de nucleobases no naturales representadas por la **Fórmula II, Fórmula III, o Fórmula IV;**

R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 y R_6 son independientemente seleccionados de radicales alquilo sustituido o no sustituido, e hidrógeno;

Q_1 y Q_m son radicales metileno, y Q_m está directamente enlazado al grupo amino básico;

$Q_2, Q_3, \dots,$ y Q_{m-1} son independientemente seleccionados de radicales metileno, oxígeno, y amino; y,

m es un número entero de 2 a 10.

40

45

50

55

5. El derivado de ácido nucleico peptídico de acuerdo con la Reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de este:

en donde

n es un número entero del 10 al 20;

$S_1, S_2, \dots, S_{n-1}, S_n, T_1, T_2, \dots, T_{n-1},$ y T_n son radicales hidrógeno;

X y Y son independientemente seleccionados de radicales hidrógeno, y acilo sustituido o no sustituido;

Z representa radicales hidroxilo, o amino sustituido o no sustituido;

$B_1, B_2, \dots, B_{n-1},$ y B_n son independientemente seleccionadas de nucleobases naturales que incluyen adenina, timina, guanina, citosina y uracilo, y nucleobases no naturales;

60

al menos tres de $B_1, B_2, \dots, B_{n-1},$ y B_n son independientemente seleccionadas de nucleobases no naturales representadas por la **Fórmula II, Fórmula III, o Fórmula IV;**

$R_1, R_3,$ y R_5 son radicales hidrógeno, y R_2, R_4 y R_6 are independientemente representan radicales hidrógeno, o amidinilo sustituido o no sustituido;

Q_1 y Q_m son radicales metileno, y Q_m está directamente enlazado al grupo amino básico;

$Q_2, Q_3, \dots,$ y Q_{m-1} son independientemente seleccionados de radicales metileno, oxígeno, y amino; y, m es un número entero de 2 a 10.

5

6. El derivado de ácido nucleico peptídico de acuerdo con la Reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de este:

10

en donde

n es un número entero del 10 al 20;

$S_1, S_2, \dots, S_{n-1}, S_n, T_1, T_2, \dots, T_{n-1},$ y T_n son radicales hidrógeno;

15

X y Y son independientemente seleccionados de radicales hidrógeno, y acilo sustituido o no sustituido;

Z representa radicales hidroxilo, o amino sustituido o no sustituido;

$B_1, B_2, \dots, B_{n-1},$ y B_n son independientemente seleccionadas de adenina, timina, guanina, citosina y uracilo, y nucleobases no naturales;

20

al menos tres de $B_1, B_2, \dots, B_{n-1},$ y B_n son independientemente seleccionadas de nucleobases no naturales representadas por la **Fórmula II, Fórmula III, o Fórmula IV;**

$R_1, R_3,$ y R_5 son radicales hidrógeno, y $R_2, R_4,$ y R_6 independientemente representan radicales hidrógeno o amidinilo;

Q_1 y Q_m son radicales metileno, y Q_m está directamente enlazado al grupo amino básico;

25

$Q_2, Q_3, \dots,$ y Q_{m-1} son independientemente seleccionados de radicales metileno, y oxígeno; y,

m es un número entero de 2 a 8.

7. El derivado de ácido nucleico peptídico de acuerdo con la Reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de este:

30

en donde

n es un número entero del 8 al 20;

$S_1, S_2, \dots, S_{n-1}, S_n, T_1, T_2, T_{n-1},$ y T_n son radicales hidrógeno;

X es un radical hidrógeno;

Y representa radicales hidrógeno, o acilo sustituido o no sustituido;

35

Z representa radicales hidroxilo, o amino sustituido o no sustituido;

$B_1, B_2, \dots, B_{n-1},$ y B_n son independientemente seleccionadas de adenina, timina, guanina, citosina, y nucleobases no naturales;

al menos tres de $B_1, B_2, \dots, B_{n-1},$ y B_n son independientemente seleccionadas de nucleobases no naturales representadas por la **Fórmula II, Fórmula III, o Fórmula IV;**

40

$R_1, R_3,$ y R_5 son radicales hidrógeno, y $R_2, R_4,$ y R_6 independientemente representa radicales hidrógeno o amidinilo;

L_1 representa $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-$, $-CH_2-O-(CH_2)_2-$, o $-CH_2-O-(CH_2)_3-$ con el extremo derecho está directamente enlazado al grupo amino básico; y,

45

L_2 y L_3 son independientemente seleccionados de $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-$, $-(CH_2)_3-O-(CH_2)_2-$, $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_3-$, $-(CH_2)_2-$, $-(CH_2)_3-$, $-(CH_2)_4-$, $-(CH_2)_5-$, $-(CH_2)_6-$, $-(CH_2)_7-$, y $-(CH_2)_8-$ con el extremo derecho está directamente enlazado al grupo amino básico.

8. Una composición farmacéutica que contiene una cantidad terapéuticamente eficaz del derivado de ácido nucleico peptídico de cualquiera de las reivindicaciones 1 ~ 7 o una sal farmacéuticamente aceptable de este para un propósito terapéutico.

50

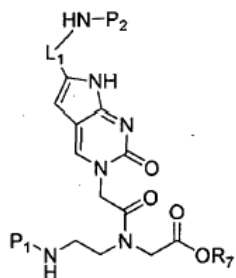
9. Un método para usar el derivado de ácido nucleico peptídico de cualquiera de las reivindicaciones 1 ~ 7 o una sal de este para un propósito de diagnóstico.

10. Un método para usar el derivado de ácido nucleico peptídico de cualquiera de las reivindicaciones 1 ~ 7 o una sal de este para la modulación in vitro de la expresión de la proteína celular.

55

11. Un compuesto de la **Fórmula VI:**

60



Fórmula VI

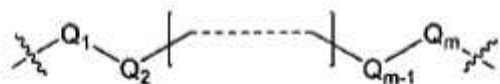
en donde

R₇ es un radical hidrógeno, N-succinilo, o alquilo sustituido o no sustituido;

P₁ se selecciona de radicales hidrógeno, t-butoxicarbonilo, (9H-fluoren-9-il)metoxi-carbonilo, benciloxycarbonilo sustituido o no sustituido, y arilsulfonilo sustituido o no sustituido;

P₂ se selecciona de radicales hidrógeno, t-butoxicarbonilo, (9H-fluoren-9-il)metoxi-carbonilo, benciloxycarbonilo sustituido o no sustituido, alquilocarbonilo sustituido, alquilo sustituido o no sustituido, amidinilo, 1,3-bis(t-butoxicarbonil)amidinilo, 1,3-bis-(benciloxycarbonil)amidinilo; y,

L₁ es un enlazador representado por la **Fórmula V**:



Fórmula V

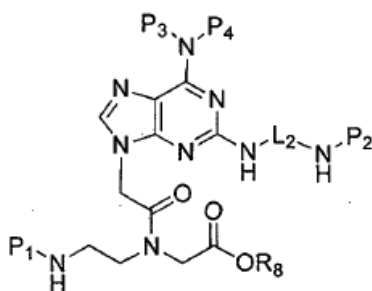
en donde

Q₁ y Q_m son radicales metileno sustituido o no sustituido, y Q_m está directamente enlazado al radical amino;

Q₂, Q₃, ..., y Q_{m-1} son independientemente seleccionados de radicales metileno sustituido o no sustituido, oxígeno, azufre, y amino sustituido o no sustituido; y,

m es un número entero de 2 a 15.

12. Un compuesto de la **Fórmula VII**:



Fórmula VII

en donde

R₈ es un radical hidrógeno, N-succinilo, o alquilo sustituido o no sustituido;

P₁ se selecciona de radicales hidrógeno, t-butoxicarbonilo, (9H-fluoren-9-il)metoxi-carbonilo, benciloxycarbonilo sustituido o no sustituido, y arilsulfonilo sustituido o no sustituido;

P₂ se selecciona de radicales hidrógeno, t-butoxicarbonilo, (9H-fluoren-9-il)metoxi-carbonilo, benciloxycarbonilo sustituido o no sustituido, alquilocarbonilo sustituido, alquilo sustituido o no sustituido, amidinilo, 1,3-bis(t-butoxicarbonil)amidinilo, 1,3-bis-(bencil-oxycarbonil)amidinilo; y

P₃ se selecciona de radicales hidrógeno, t-butoxicarbonilo, (9H-fluoren-9-il)metoxi-carbonilo, benciloxycarbonilo sustituido o no sustituido;

P₄ se selecciona de radicales hidrógeno, y t-butoxicarbonilo; y,

L₂ es un enlazador representado por la **Fórmula V**:



Fórmula V

5

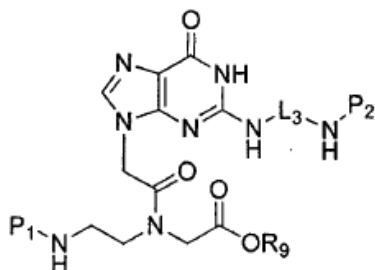
en donde

Q₁ y Q_m son radicales metileno sustituido o no sustituido, y Q_m está directamente enlazado al radical amino;
 Q₂, Q₃, ..., y Q_{m-1} son independientemente seleccionados de radicales metileno sustituido o no sustituido, oxígeno, azufre, y amino sustituido o no sustituido; y,
 m es un número entero de 2 a 15.

10

13. Un compuesto de la **Fórmula VIII**:

15



Fórmula VIII

20

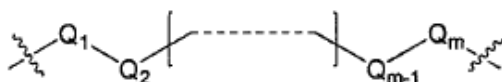
25

en donde

R₉ es un radical hidrógeno, N-succinilo, o alquilo sustituido o no sustituido;
 P₁ se selecciona de radicales hidrógeno, t-butoxicarbonilo, (9H-fluoren-9-il)metoxi-carbonilo, benciloxicarbonilo sustituido o no sustituido, y arilsulfonilo sustituido o no sustituido;
 P₂ se selecciona de radicales hidrógeno, t-butoxicarbonilo, (9H-fluoren-9-il)metoxi-carbonilo, benciloxicarbonilo sustituido o no sustituido, alquiloxicarbonilo sustituido, alquilo sustituido o no sustituido, amidinilo, 1,3-bis(t-butoxicarbonil)amidinilo, 1,3-bis-(bencil-oxicarbonil)amidinilo; y
 L₃ es un enlazador representado por la **Fórmula V**:

30

35



Fórmula V

40

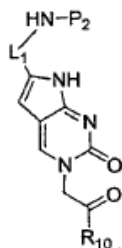
en donde

Q₁ y Q_m son radicales metileno sustituido o no sustituido, y Q_m está directamente enlazado al radical amino;
 Q₂, Q₃, ..., y Q_{m-1} son independientemente seleccionados de radicales metileno sustituido o no sustituido, oxígeno, azufre, y amino sustituido o no sustituido; y,
 m es un número entero de 2 a 15.

45

14. Un compuesto de la **Fórmula IX**:

50



Fórmula IX

55

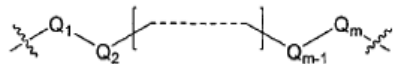
60

en donde

R₁₀ es un radical hidroxilo, alquiloxi sustituido o no sustituido, o amino sustituido o no sustituido;

P₂ se selecciona de radicales hidrógeno, t-butoxicarbonilo, (9H-fluoren-9-il)metoxi-carbonilo, benciloxicarbonilo sustituido o no sustituido, alquiloxicarbonilo sustituido, alquilo sustituido o no sustituido, amidinilo, 1,3-bis(t-butoxi-carbonil)amidinilo, 1,3-bis-(benciloxicarbonil)amidinilo; y,

L₁ es un enlazador representado por la **Fórmula V**:



Fórmula V

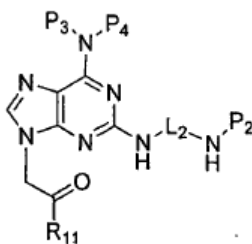
en donde

Q₁ y Q_m son radicales metileno sustituido o no sustituido, y Q_m está directamente enlazado al radical amino;

Q₂, Q₃, ..., y Q_{m-1} son independientemente seleccionados de radicales metileno sustituido o no sustituido, oxígeno, azufre, y amino sustituido o no sustituido; y,

m es un número entero de 2 a 15.

15. Un compuesto de la **Fórmula X**:



Fórmula X

en donde

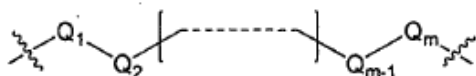
R₁₁ es un radical hidroxilo, alquiloxi sustituido o no sustituido, o amino sustituido o no sustituido ;

P₂ se selecciona de radicales hidrógeno, t-butoxicarbonilo, (9H-fluoren-9-il)metoxi-carbonilo, benciloxicarbonilo sustituido o no sustituido, alquiloxicarbonilo sustituido, alquilo sustituido o no sustituido, amidinilo, 1,3-bis(t-butoxi-carbonil)amidinilo, 1,3-bis-(bencil-oxicarbonil)amidinilo; y

P₃ se selecciona de radicales hidrógeno, t-butoxicarbonilo, (9H-fluoren-9-il)metoxi-carbonilo, benciloxicarbonilo sustituido o no sustituido;

P₄ se selecciona de radicales hidrógeno, y t-butoxicarbonilo; y,

L₂ es un enlazador representado por la **Fórmula V**:



Fórmula V

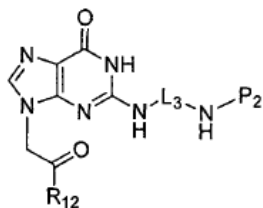
en donde

Q₁ y Q_m son radicales metileno sustituido o no sustituido, y Q_m está directamente enlazado al radical amino;

Q₂, Q₃ ..., y Q_{m-1} son independientemente seleccionados de radicales metileno sustituido o no sustituido, oxígeno, azufre, y amino sustituido o no sustituido; y,

m es un número entero de 2 a 15.

16. Un compuesto de la **Fórmula XI**:



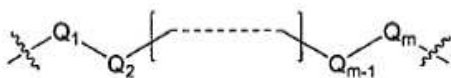
Fórmula XI

en donde

R_{12} es un radical hidroxilo, alquiloxi sustituido o no sustituido, o amino sustituido o no sustituido;

P_2 se selecciona de radicales hidrógeno, t-butoxicarbonilo, (9H-fluoren-9-il)metoxi-carbonilo, benciloxycarbonilo sustituido o no sustituido, alquiloxicarbonilo sustituido, alquilo sustituido o no sustituido, amidinilo, 1,3-bis(t-butoxi-carbonil)amidinilo, 1,3-bis-(bencil-oxycarbonil)amidinilo; y

L_3 es un enlazador representado por la **Fórmula V**:



Fórmula V

en donde

Q_1 y Q_m son radicales metileno sustituido o no sustituido, y Q_m está directamente enlazado al radical amino;

Q_2, Q_3, \dots , y Q_{m-1} son independientemente seleccionados de radicales metileno sustituido o no sustituido, oxígeno, azufre, y amino sustituido o no sustituido; y,

m es un número entero de 2 a 15.

Figura 1

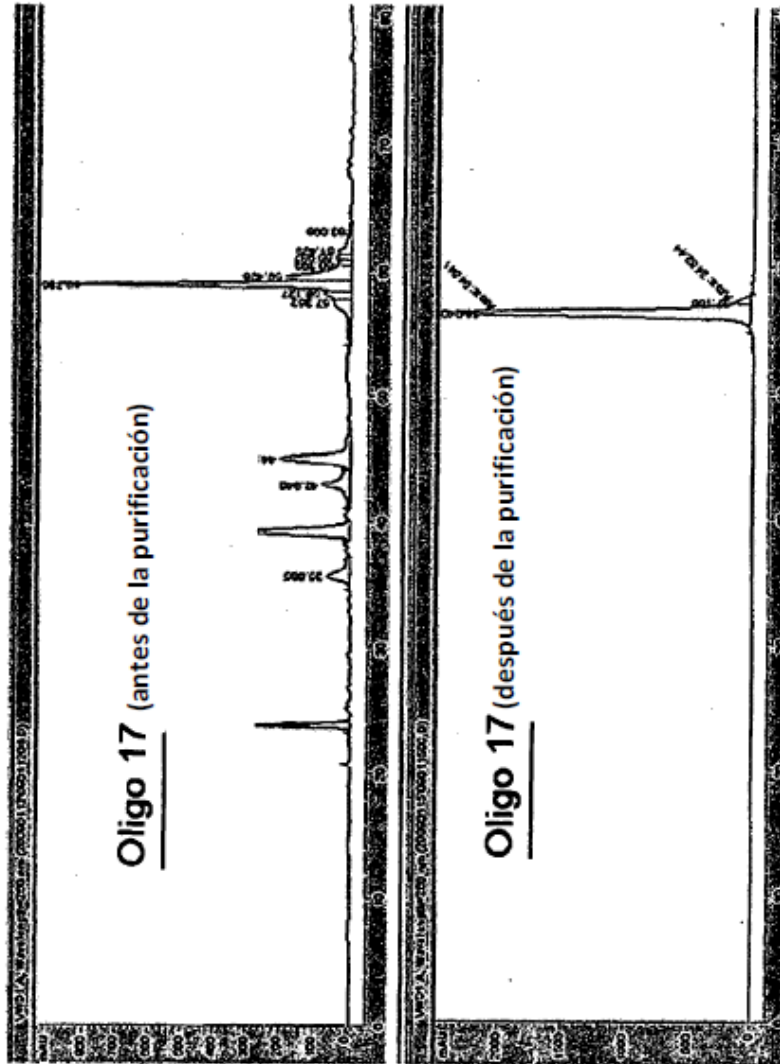


Figura 2

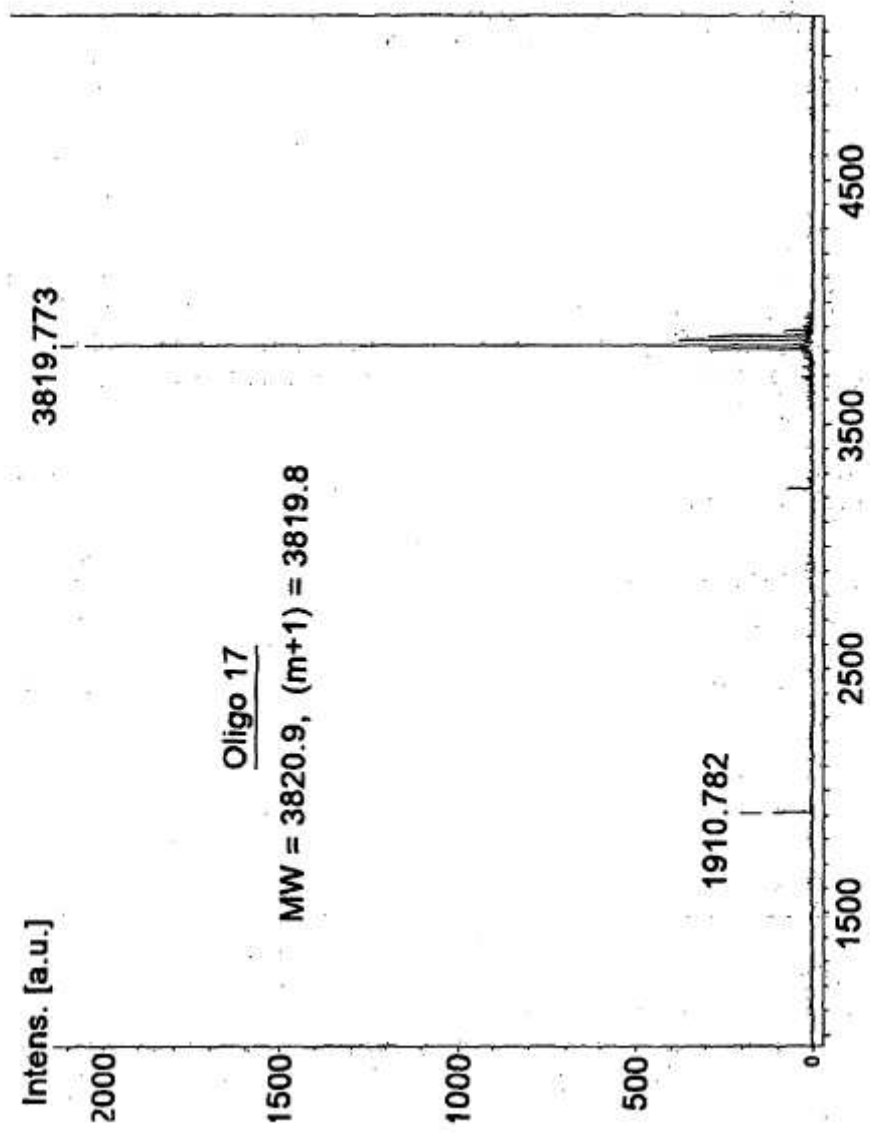


Figura 3

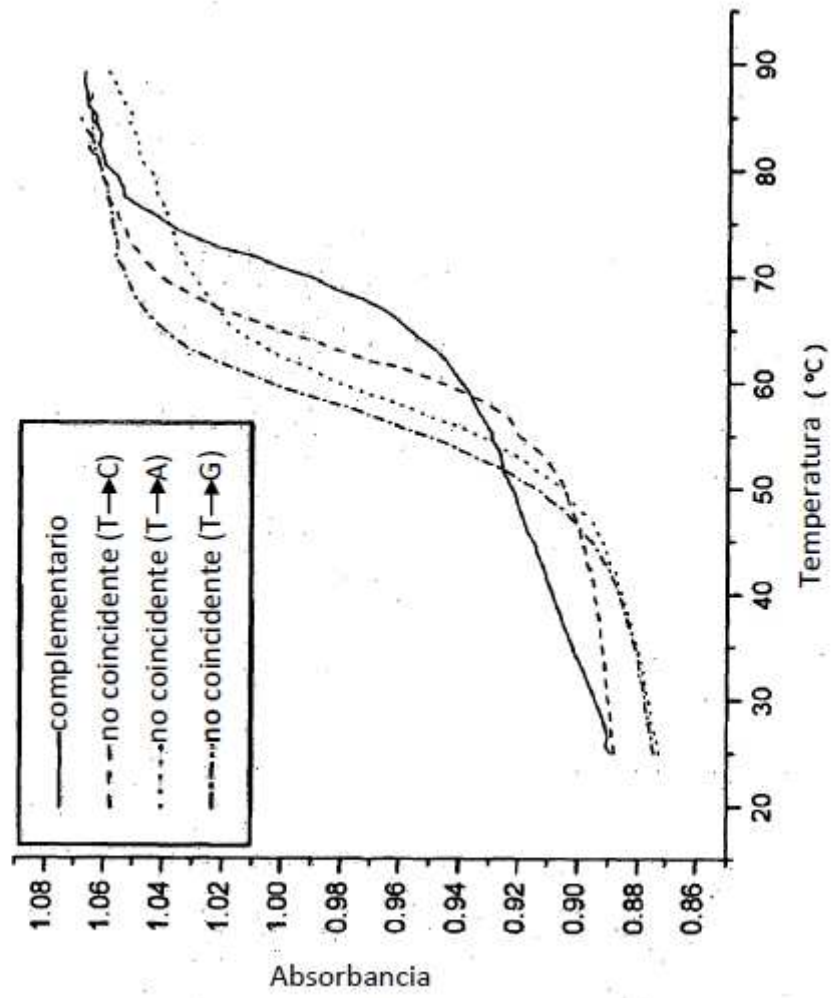


Figura 4

| (a) | (b) |
|-----|-----|
| 1h | 1h |
| 2h | 2h |
| 3h | 3h |
| 24h | 24h |

Figura 5

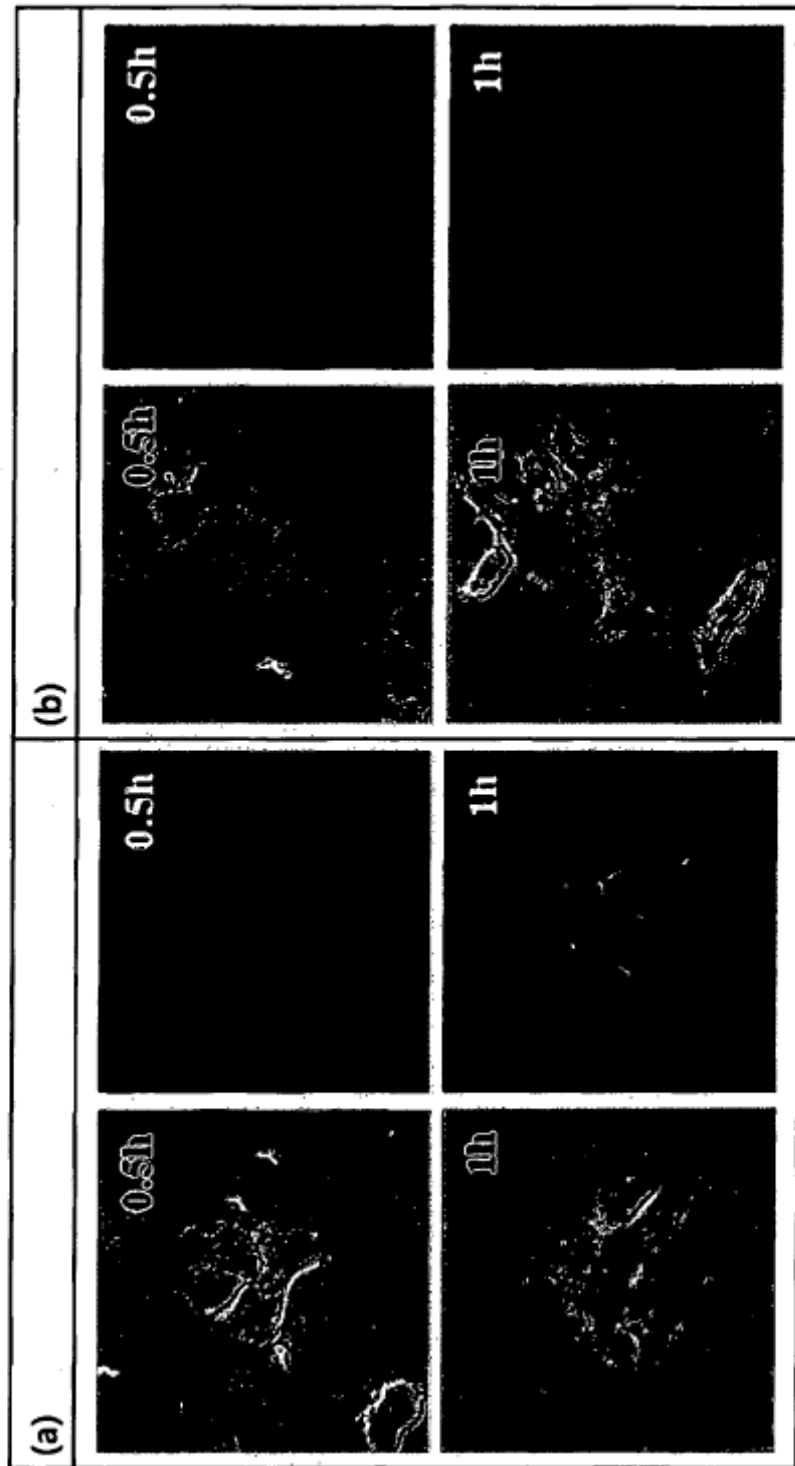


Figura 6

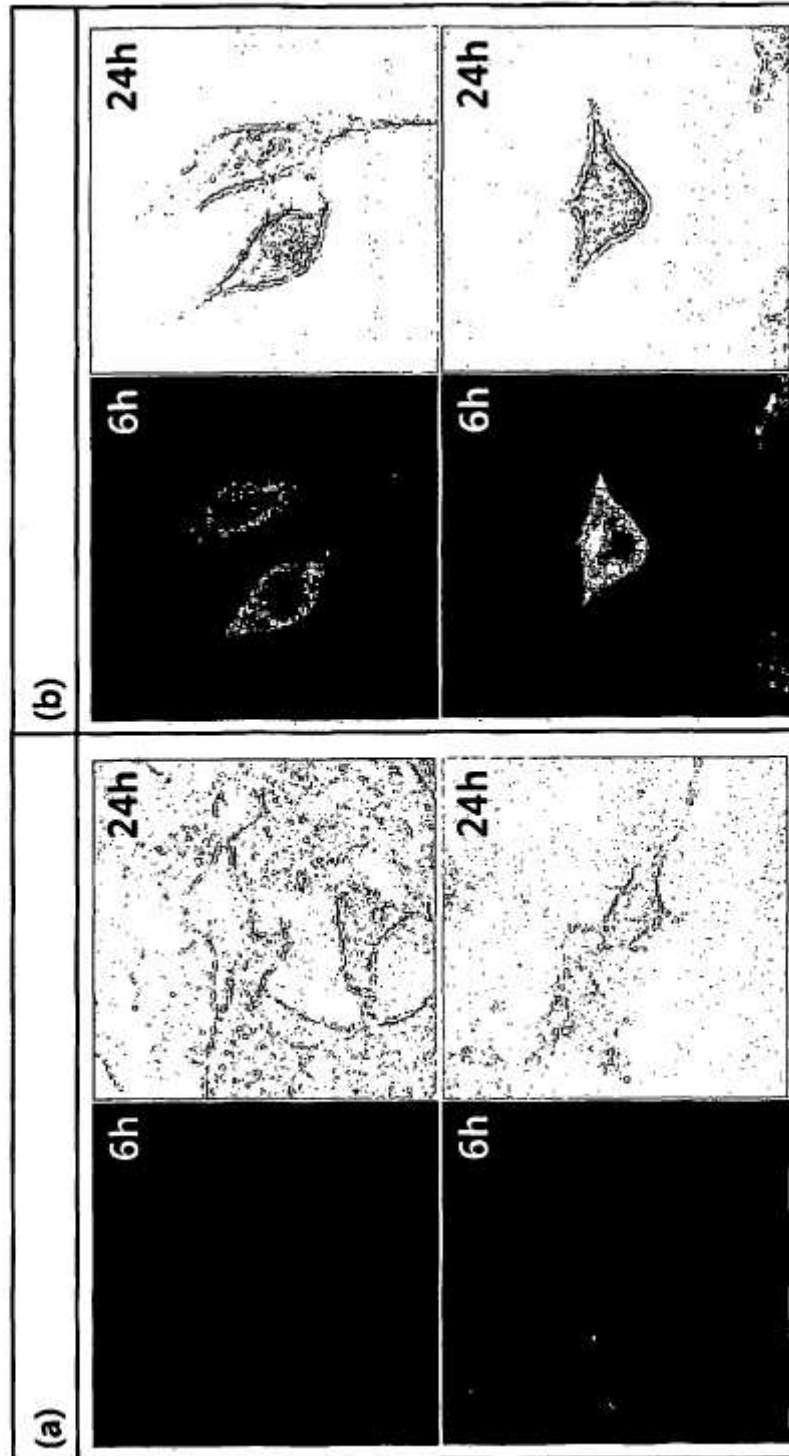


Figura 7

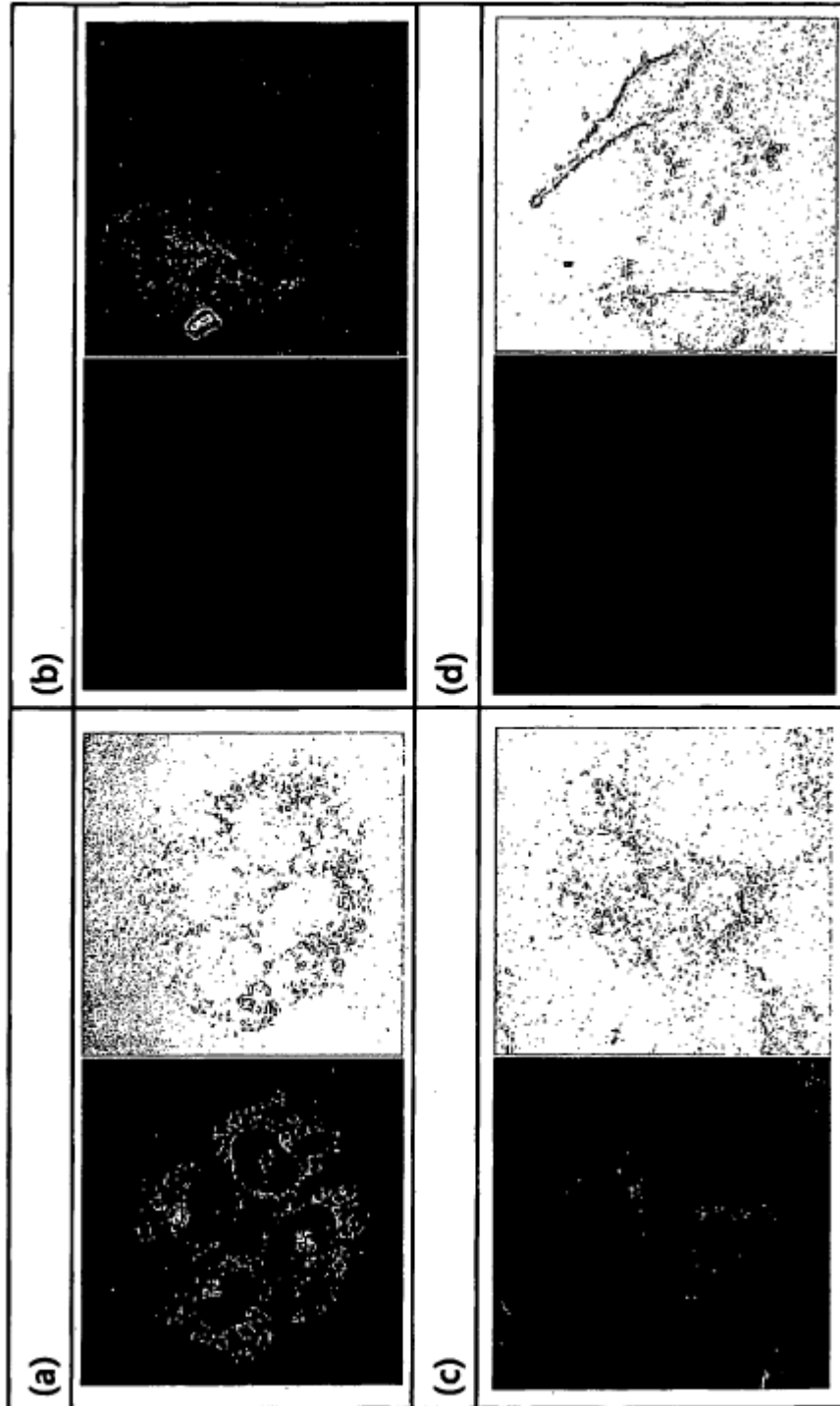


Figura 7 (continua a la página anterior)

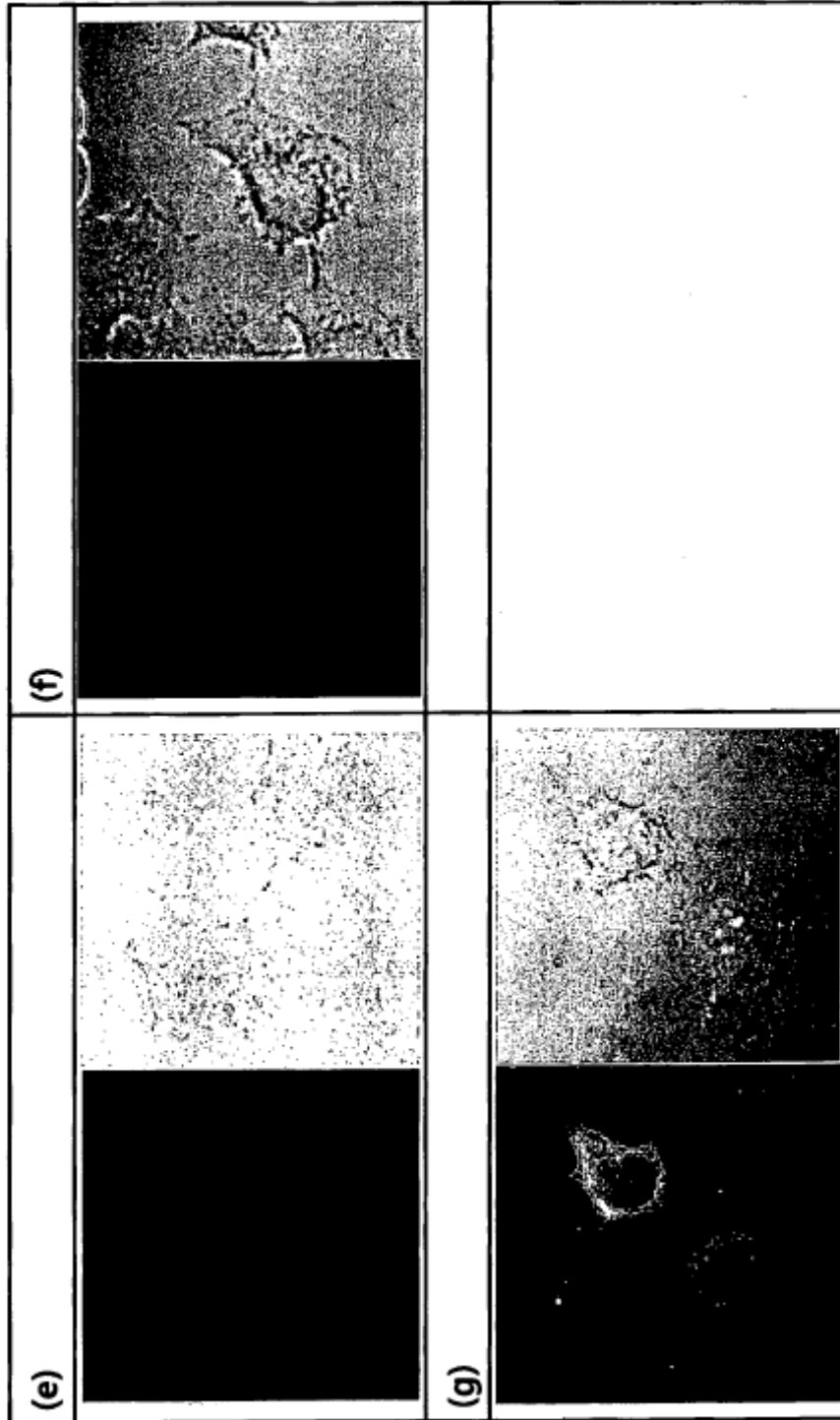


Figura 8

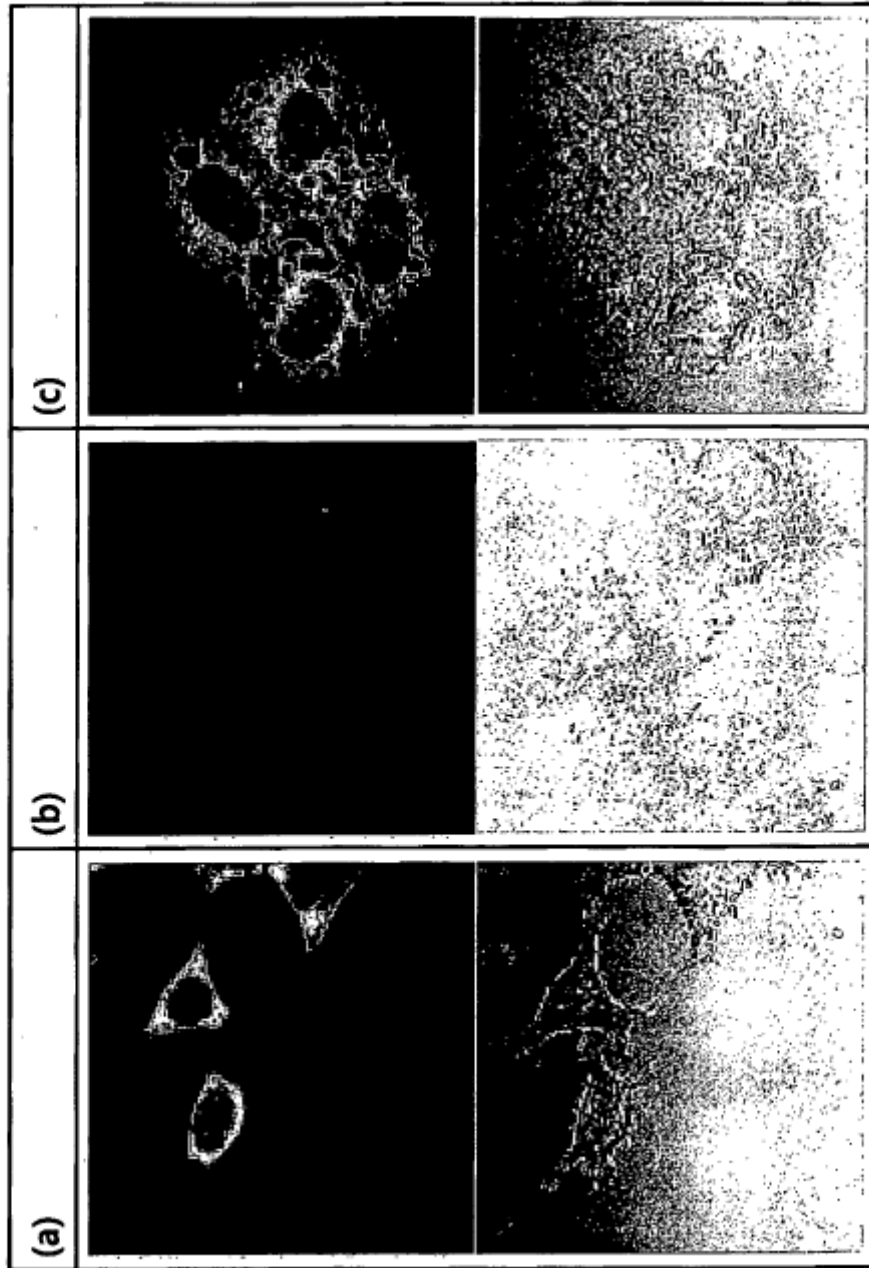


Figura 9

| | ① | ② | ③ | ④ | ⑤ | ⑥ | ⑦ | ⑧ | ⑨ |
|-------------|----------------------|---|---|---|--------------------|---|---|---|-------------|
| mdm2 | | | | | | | | | |
| Línea | Oligo 12, μM | | | | Oligo 9, μM | | | | Observación |
| 1 | 0 | | | | 0 | | | | Control |
| 2 | 5 | | | | 0 | | | | |
| 3 | 0 | | | | 5 | | | | |
| 4 | 5 | | | | 5 | | | | |
| 5 | Proteínas marcadoras | | | | | | | | |
| 6 | 0 | | | | 0 | | | | Control |
| 7 | 10 | | | | 0 | | | | |
| 8 | 0 | | | | 10 | | | | |
| 9 | 10 | | | | 10 | | | | |

Figura 10

