

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 712 090**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/00** (2006.01)

**A61K 31/496** (2006.01)

**C07D 233/22** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.08.2014 PCT/US2014/053520**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.03.2015 WO15031819**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.08.2014 E 14841286 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.01.2019 EP 3038637**

54 Título: **Moléculas pequeñas ensambladas modularmente para el tratamiento de la distrofia miotónica tipo 1**

30 Prioridad:

**29.08.2013 US 201361871483 P**

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

**09.05.2019**

73 Titular/es:

**THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE (100.0%)  
10550 North Torrey Pines Road  
La Jolla, CA 92037, US**

72 Inventor/es:

**DISNEY, MATTHEW D. y  
RZUCZEK, SUZANNE**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 712 090 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

Moléculas pequeñas ensambladas modularmente para el tratamiento de la distrofia miotónica tipo 1

## Antecedentes

5 El ARN es una diana importante para sondas moleculares pequeñas funcionales o con fines terapéuticos. Sin embargo, muy pocos ARNs se han valorado como tal. Dianas validadas, incluyen el ARN ribosomal, <sup>1,2</sup> que constituyen el 80-90% del ARN celular total,<sup>3-5</sup> y riboconmutadores, que se conocen como aglutinantes de metabolitos que se pueden imitar como diseño inhibidor auxiliar. <sup>6,7</sup> Los compuestos que se dirigen al ribosoma y a riboconmutadores han sido sondas extremadamente útiles para ayudar a entender la función del ARN. Un cambio principal en la biología química del ARN es cómo aprovechar otros ARNs en el transcriptoma de una manera similar. Este es un cambio considerable dado la poca abundancia celular de estos ARNs<sup>8</sup> y a la falta de moléculas pequeñas guía.<sup>9</sup>

15 En un esfuerzo por valorar otras dianas de ARN en el transcriptoma con moléculas pequeñas, hemos desarrollado una estrategia "ascendente" para diseñar moléculas que se unan a un ARN de interés. Esto es, definimos elementos estructurales secundarios del ARN discreto, pequeño que son privilegiados para unirse a moléculas pequeñas;<sup>10-14</sup> las interacciones se depositan después en una base de datos. Los elementos estructurales secundarios en nuestros estudios de selección se mantuvieron intencionadamente pequeños para que fueran componentes similares a los ARNs celulares más grandes. La estructura secundaria de un ARN diana se compara con nuestra base de datos de interacciones, proporcionando compuestos guía. Las guías se pueden optimizar empleando varias estrategias que incluyen la búsqueda de semejanza química <sup>15,16</sup> y/o el ensamblado modular. <sup>13,17-22</sup> Una aplicación de esta estrategia ha sido el diseño racional de moléculas pequeñas bioactivas que se dirigen al ARN que causa distrofia miotónica de tipo 1 (DM1, de sus siglas en inglés).<sup>15,17,18</sup>

25 La DM1 es una enfermedad neuromuscular incurable actualmente causada por una expansión de r(CUG), r(CUG)<sup>exp</sup>, en la región 3' no traducida (UTR) del ARNm de la proteína quinasa miotónica (*DMPK*).<sup>23,24</sup> El ARNm se pliega en una estructura en horquilla que muestra una repetición regular de bucles internos de 1 x 1 nucleótido (motivos 5'CUG/3'GUC; Figura 1)<sup>25,26</sup> que son flexibles conformacionalmente.<sup>2,27</sup> Los bucles son sitios de unión de alta afinidad por la proteína muscleblind-1 (MBNL1), y el secuestro de MBNL1 causa su inactivación y posterior desregulación del splicing del pre-ARNm alternativo.<sup>28-31</sup> La formación del complejo r(CUG)<sup>exp</sup>-MBNL1 causa varios defectos asociados a la enfermedad que incluyen (Figura 1): (i) defectos de splicing al pre-ARNm;<sup>28,32-34</sup> (ii) formación de un foco nuclear que consiste en los complejos r(CUG)<sup>exp</sup>-proteína; <sup>35-37</sup>; y, (iii) defectos de traducción del ARNm *DMPK* debido a un pobre transporte núcleo-citoplasmático.<sup>38-40</sup>

35 Ya que la causa fundamental de la DM1 es r(CUG)<sup>exp</sup>, se han empleado una variedad de estrategias para alterar los complejos r(CUG)<sup>exp</sup>-MBNL1, liberando por tanto el MBNL1 y restaurando la regulación del splicing alternativo. Los oligonucleótidos que se dirigen al r(CUG)<sup>exp</sup>, mejoran los defectos asociados a la DM1 tras la inyección en modelos de ratón de DM1. <sup>33,41,42</sup> Se han desarrollado pequeñas moléculas que se dirigen a la diana r(CUG)<sup>exp</sup> incluyendo pentamidina, bis-benzimidazoles, naftil piridinas, y triazinas.<sup>13,15,17-19,43-46</sup> Los más potentes son los compuestos ensamblados modularmente que se dirigen a la repetición natural de r(CUG)<sup>exp</sup>, uniendo los motivos múltiples 5'CUG/3'GUC simultáneamente.<sup>13,17-19</sup> Estos compuestos se componen de una estructura de ensamblado modular que indica múltiples copias de un módulo de unión a ARN en una cadena simple.<sup>13,17-19</sup>

## Compendio

40 Los transcriptomas proporcionan una infinidad de ARNs potenciales que podrían ser dianas terapéuticas o sondas de función genética química. Sin embargo, las moléculas pequeñas permeables celulares, generalmente no aprovechan estas dianas, debido a la dificultad en el diseño de alta afinidad, ARN dirigido a pequeñas moléculas específicas. Como parte de un programa general para estudiar la función del ARN empleando moléculas pequeñas, se diseñaron moléculas pequeñas ensambladas modularmente bioactivas que se dirigen a la repetición de ARN expandido no codificante que causa la distrofia miotónica tipo 1 (DM1), r(CUG)<sup>exp</sup>. En la presente memoria, se presenta un estudio riguroso para aclarar las características de los compuestos ensamblados modularmente que proporcionan bioactividad.

50 Se investigaron diferentes estructuras de ensamblado modular incluyendo poliamidas, α-péptidos, β-péptidos, y amidas terciarias peptídicas (PTAs, de sus siglas en inglés). En base a la actividad según lo evaluado por la mejora de los defectos asociados a la DM1, la estabilidad frente a las proteasas, permeabilidad celular, y toxicidad, descubrimos que son óptimas estructuras limitadas, principalmente las PTAs. En particular, determinamos que r(CUG)<sup>exp</sup> es la diana del PTA óptimo en modelos celulares y que la PTA óptima mejora los defectos asociadas a DM1 en un modelo de ratón. Se emplearon análisis biofísicos para investigar fuentes potenciales de bioactividad. Estas investigaciones muestran que compuestos ensamblados modularmente tienen mayores tiempos de permanencia sobre sus dianas y tasas más rápidas que los módulos de unión a ARN de los que se derivan; y tasas más rápidas que la proteína a la que se une r(CUG)<sup>exp</sup>, la inactivación que da lugar a los defectos asociados a la DM1. Estos estudios proporcionan información acerca de las características de las moléculas pequeñas que son

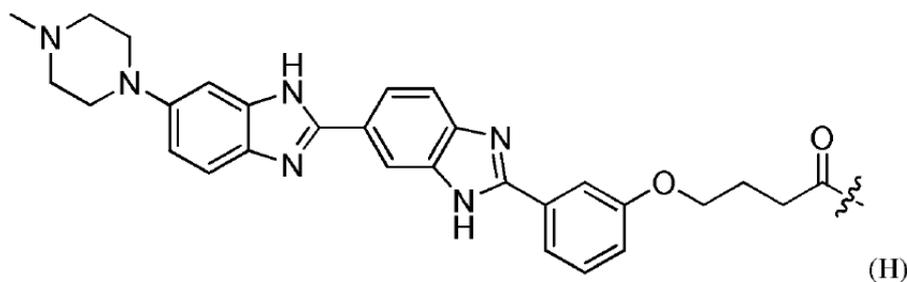
programables para el ARN diana, permitiendo la fácil optimización de terapias o sondas químicas frente a otras dianas de ARN celular. Véase, por ejemplo, la Patente US2008/0227213 A1.

En la presente memoria, se describen estudios detallados que ayudan al entendimiento de las características en las estructuras de ensamblado modular que proporcionan bioactividad. Esto demuestra que la naturaleza de la estructura afecta significativamente a la potencia y a la bioactividad. Mediante el estudio de diferentes estructuras incluyendo poliaminas,  $\alpha$ -péptidos,  $\beta$ -péptidos, y amidas terciarias peptídicas (PTAs), determinamos que la PTA es la estructura óptima en base a la bioactividad en dos ensayos celulares diferentes, de la estabilidad frente a las proteasas, permeabilidad celular, y toxicidad. Estos estudios definen las características que se pueden programar en moléculas pequeñas para proporcionar bioactividad y que se pueden aplicar para otras dianas potenciales ARN en el transcriptoma.

En varias realizaciones, la invención proporciona un compuesto de unión r(CUG)<sup>exp</sup> dimérico de fórmula (I)

H-Y-H (I)

en donde H es un grupo de fórmula



en donde la línea ondulada indica una posición de unión, y en donde Y es un 1, $\omega$ -diaminoalcano que tienen grupos amino primarios o secundarios en ambos extremos de un segmento de alcano lineal o ramificado, estos grupos amino primarios o secundarios tienen enlaces de amida formados con los respectivos grupos carbonilo de los dos grupos H de fórmula (I), y que comprenden de manera opcional otros grupos amino, carboxamida, o peptidilo adicional; o una sal aceptable farmacéuticamente de la misma. Más específicamente, un enlazador Y puede ser un 1, $\omega$ -diaminoalcano, que comprende opcionalmente otros grupos amino, carboxiamido, o peptidilo adicional; por ejemplo, Y puede comprender además uno o más segmentos  $\alpha$ -peptidilo, segmentos  $\beta$ -peptidilo, segmentos poliamina, segmentos amida terciaria peptidilo, o cualquier combinación de los mismos.

La invención puede proporcionar también un método de alteración del complejo r(CUG)<sub>12</sub>-MBNL1, que comprende administrar una cantidad eficaz de un compuesto de la invención a una célula mamífera viva. La célula mamífera viva está en el tejido corporal de un paciente humano.

La invención puede proporcionar también un método de tratamiento de la distrofia miotónica de tipo 1 en un paciente humano, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un compuesto de la invención.

### Breve descripción de las figuras

Figura 1. Esquema de la patología de la enfermedad de DM1. Una expansión de repeticiones de r(CUG) (r(CUG)<sup>exp</sup>; SEQ ID NO:9) localizada en la región 3' no traducida (UTR) del ARNm de la *DMPK* se pliega en una estructura en horquilla que se une y secuestra una proteína muscleblind-1 (MBNL1), un regulador de splicing al pre-ARNm. Esta reducción en la MBNL1 funcional da como resultado la desregulación del splicing alternativo de los pre-ARNm controlados mediante MBNL1. Otros defectos asociados con la DM1 incluyen el descenso en la traducción del pre-ARNm *DMPK* y la formación del foco nuclear. Las moléculas pequeñas ensambladas modularmente que se dirigen al r(CUG)<sup>exp</sup> tienen el potencial de mejorar los defectos mediante el splicing al MBNL1.

Figura 2. Estructuras de primera y segunda generación de compuestos ensamblados modularmente que se unen al r(CUG)<sup>exp</sup>. El compuesto de primera generación 2H-4 contienen una estructura de ensamblado peptoide. Las clases de compuestos de segunda generación consisten en poliaminas,  $\alpha$ -péptidos,  $\beta$ -péptidos, y amidas terciarias peptídicas (PTAs).

Figura 3. IC<sub>50</sub> de los compuestos ensamblados modularmente de segunda generación para alterar el complejo r(CUG)<sub>12</sub>-MBNL1. Las potencias se determinaron empleando un ensayo TR-FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia de tiempo resuelto, de sus siglas en inglés).<sup>15,47</sup> Los compuestos más potentes para cada tipo de clase son: 2H-SPM, 2H-3G  $\approx$  2H-4G, y 2H-3NPr, 2H-3NMe, y 2H-K4NPr ( $\approx$ 2H-K1NPr).

Figura 4. Efecto de la estructura de ensamblaje modular para mejorar el splicing al pre-ARNm asociado con DM1 y a defectos de traducción. (A) Representación del patrón de splicing al pre-ARNm observado para el mini-gen *cTNT* en presencia y ausencia del mini-gen DM1. Después de la infección las células se trataron con 10  $\mu$ M del compuesto en

el medio de cultivo. El splicing alternativo se ensayó mediante RT-PCR. (B) Cuantificación del análisis RT-PCR. Los compuestos de segunda generación se compararon con el compuesto original, 2H-4. El compuesto más activo en este ensayo es el 2H-K4NPr, que tiene una estructura de ensamblado PTA ( $p=0,03$ ; indicado mediante “\*”). (C) Esquema del modelo celular empleado para estudiar los defectos de traducción. Una línea celular C2C12 transflectada establemente expresa ARNm de luciferasa de luciérnaga con  $r(\text{CUG})_{800}$  en el 3' UTR. El  $r(\text{CUG})_{800}$  causa el transcrito que se retiene principalmente en el núcleo y, por tanto, no se traduce de manera eficaz. Si una molécula pequeña se une a El  $r(\text{CUG})_{800}$  y desplaza o inhibe la unión de MBNL1, entonces el transcrito se exporta de manera más eficaz desde el núcleo y se traduce en el citoplasma. (D) Cuantificación del efecto de compuestos de segunda generación sobre el defecto de traducción en DM1 como medida de la actividad de la luciferasa. Los compuestos se ensayaron a  $10 \mu\text{M}$  y se compararon con el compuesto de origen, 2H-4. La mejora en la actividad luciferasa está relacionada con las células sin tratar. (Sin cambio en la actividad luciferasa es igual al 0%). Los compuestos de segunda generación eran menos eficaces que el 2H-4 en la mejora de los defectos de traducción. Todos los compuestos de segunda generación tienen actividades similares.

Figura 5. Bioactividad de los compuestos de tercera generación ensamblados modularmente. La mayoría de los derivados del compuesto de segunda generación, 2H-K4NPr, se diseñaron para investigar el efecto de los sustituyentes sobre la amida terciaria. (A) Estructuras de los compuestos de tercera generación. Los derivados de 2H-K4NPr que se prepararon consistían en estructuras peptídicas, PTA y peptoides. (B)  $\text{IC}_{50}$  de los compuestos ensamblados modularmente de tercera generación para alterar el complejo  $r(\text{CUG})_{12}$ -MBNL1. 2H-K4NMe, que tiene una estructura PTA *N*-metilo es el más potente. “\*” indica  $p<0,05$  como se determina mediante un ensayo de t-Student de dos colas. (C) Cuantificación de la mejora de los defectos de splicing del pre-ARNm alternativo asociado a DM1 de los compuestos de tercera generación. 2H-K4NPr mejora la desregulación del defecto de splicing del pre-ARNm *cTNT* en la mayor medida posible. (D) Cuantificación de la mejora de los defectos de traducción asociado a DM1 de los compuestos de tercera generación. Los compuestos demostraron una actividad comparable a la del compuesto de origen, 2H-4. (E) Permeabilidad celular y toxicidad de los compuestos ensamblados modularmente de tercera generación. “+” indica Hoechst 33258, que se empleó como control positivo para la compuerta.

Figura 6: Experimentos desplegados para identificar las dianas de ARN celular de la molécula pequeña diseñada 2H-K4NMe-Biotina. Arriba, la estructura del compuesto que se sujetó a perlas de agarosa de estreptavidina funcionalizada para proporcionar una matriz de afinidad. Abajo, izquierda, gel de agarosa desnaturizado teñido con SYBR oro. Abajo a la derecha, Northern blot gel teñido con SYBR oro con una sonda para  $r(\text{CUG})^{\text{exp}}$ . Calle 1, 1 Kb de escala; arriba cuatro bandas (de arriba abajo) son: 3 Kb, 2 Kb, 1,5 Kb y 1 Kb; Calle 2, ARN total recolectado de las células; Calle 3, vacía; Calle 4, llevado a cabo empleando 5'-Biotina d(CAG)<sub>10</sub>; Calle 5, fracción unida a K4NMe-Biotina (molécula pequeña control que no debería unirse a  $r(\text{CUG})^{\text{exp}}$ ); Calle 6, fracción unida a 2H-K4NMe-Biotina; Calle 7, lavado final de la resina antes de la elución de la unión de ARN de la Calle 6.

Figura 7. 2H-K4NMe mejora los defectos de splicing del pre-ARNm alternativo asociado a DM1 en un modelo de ratón de DM1. El modelo DM1 de ratón expresa la actina del esqueleto humano (HSA, de sus siglas en inglés) transgen que contiene 250 repeticiones CTG (HSA<sup>LR</sup>; donde LR indica la longitud de las repeticiones). El tipo salvaje (WT) se refiere a ratones FVB. (A) Arriba, esquema de splicing alternativo *Clcn1* en ratones WT y con DM1. Abajo, análisis del splicing alternativo *Clcn1* mediante RT-PCR donde los ratones se trataron durante cada día durante 7 días con  $100 \text{ mg/kg}$  de 2H-K4NMe. (B) Arriba, esquema del splicing alternativo *Serca1* (*Atp2a1*) en ratones WT y con DM1. Abajo, análisis del splicing alternativo *Serca1* mediante RT-PCR cuando los ratones se trataron con  $100 \text{ mg/kg/d}$  de 2H-K4NMe. “\*\*\*” indica  $p<0,01$  como se determina mediante un ensayo t de Student de dos colas.

Figura 8. Auto-radiografía en gel representativa que muestra el efecto de moléculas pequeñas ensambladas modularmente sobre los defectos de splicing en un modelo de cultivo celular de DM1. Las células HeLa se co-transfectaron con un mini-gen que codifica 960 repeticiones CTG interrumpidas y un mini-gen de splicing alternativo *cTNT*.<sup>4</sup>

Figura 9. Efecto de la composición con estructura de ensamblado sobre la permeabilidad celular y la toxicidad. Las células HeLa se trataron con  $10 \mu\text{M}$  y  $1 \mu\text{M}$  del compuesto durante 24 horas. La toxicidad se ensayó mediante la tinción con yoduro de propidio (PI, de sus siglas en inglés). Todos los compuestos de segunda generación han mejorado la permeabilidad en comparación con el compuesto original 2H-4. Los compuestos con estructuras peptídicas y PTA tuvieron la absorción celular más grande con baja toxicidad. Las entradas para la tinción positiva se crearon en relación con las células sin tratar, no teñidas; células sin tratar, células teñidas con PI; y células tratadas con Hoechst 33258 (indicadas mediante “+” en el gráfico).

Figura 10. Estudio de las cinéticas de la molécula pequeña de unión al ARN diana. Arriba, las estructuras secundarias de los ARN que se emplearon en los experimentos SPR para estudiar la unión de las moléculas pequeñas al ARN diana (SEQ ID Nos:10-14). Abajo, un modelo para la  $k_{\text{on}}$  aumentada y la  $k_{\text{off}}$  más lenta observada para las moléculas pequeñas ensambladas modularmente debido al efecto bisagra.

Figura 11. Auto-radiografía en gel representativa que muestra el efecto de 2H-K4NMe sobre los defectos de splicing en un modelo de ratón con DM1. Arriba: Resultados del análisis *Clcn1*, Abajo: Resultados del análisis *Serca1*.

Las Figuras 12-13 muestran las gráficas empleadas para determinar las poblaciones de (A) células viables, (B) células teñidas con yoduro de propidio, (C) células con fluorescencia Hoechst, y (D) células con fluorescencia Hoechst y compuesto con tinción de yoduro de propidio y controles como se ha señalado antes. El primer grupo (A) – (D) para cada una de las Figuras se refiere al subgrupo A-Hoechst Rojo, y el segundo grupo (A) – (D) para cada una de las Figuras se refiere al subgrupo A-Hoechst Violeta.

Las Figuras 14-24 muestran los gráficos para determinar la población de (A) células viables, (B) células teñidas con yoduro de propidio, (C) células con fluorescencia Hoechst, y (D) células con fluorescencia a la tinción Hoechst y yoduro de propidio, para células control Hoechst 33258, y los compuestos indicados 2H-4, 2H-SPM, 2H-3G, 2H-3NPr, 2H-3NMe, 2H-K4NPr, 2H-K4NMe, 2H-K4NH, 2H-K4NiBu, y 2H-K4, a concentraciones de 10  $\mu\text{M}$  y 1  $\mu\text{M}$ .

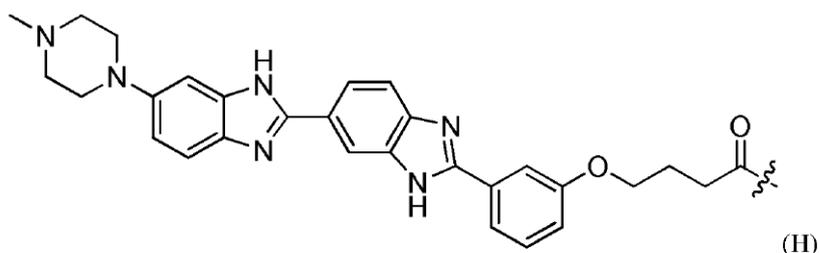
Las Figuras 25 (A) – (D) muestran las isotermas de unión a partir de los experimentos de resonancia plasmónica de superficie para 2H-K4NMe con las secuencias de ARN  $r(\text{CUG})_{12}$ ,  $r(\text{CAG})_{12}$ ,  $r(\text{AU})_{12}$ , y  $r(\text{CG})_8$ , respectivamente.

### Descripción detallada

La invención proporciona, en varias realizaciones, un compuesto de unión a  $r(\text{CUG})^{\text{exp}}$  dimérico de fórmula (I)

H-Y-H (I)

en donde H es un grupo de fórmula

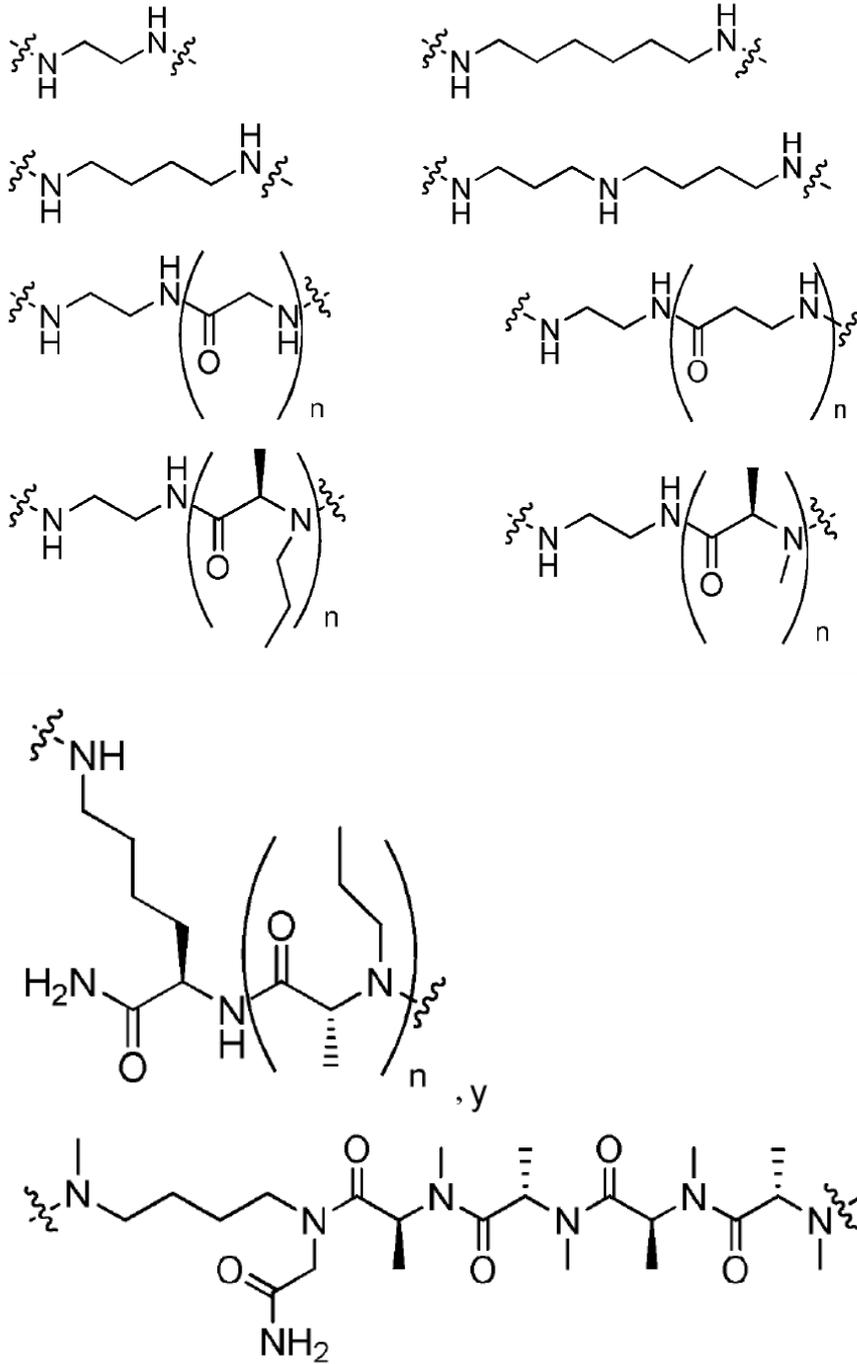


en donde la línea ondulada indica una posición de unión, y en donde Y es un 1, $\omega$ -diaminoalcano que tiene grupos amino primarios o secundarios en ambos extremos de un segmento de alcano lineal o ramificado, estos grupos amino primarios o secundarios tienen enlaces de amida formados con los respectivos grupos carbonilo de los dos grupos H de fórmula (I), y que comprenden de manera opcional otros grupos amino, carboxamida, o peptidilo adicional; o una sal aceptable farmacéuticamente de la misma. El enlazador bifuncional que comprende los dos grupos amino reactivos forman enlaces amida con los grupos carbonilo respectivos de las 2 unidades H de la fórmula 1.

Más específicamente, un enlazador Y puede ser un 1, $\omega$ -diaminoalcano, que comprende opcionalmente otro amino, carboxamido, o peptidilo adicional; por ejemplo, Y puede comprender además uno o más segmentos  $\alpha$ -peptidilo, segmentos  $\beta$ -peptidilo, segmentos poliamina, segmentos amida terciaria peptidilo, o cualquier combinación de los mismos.

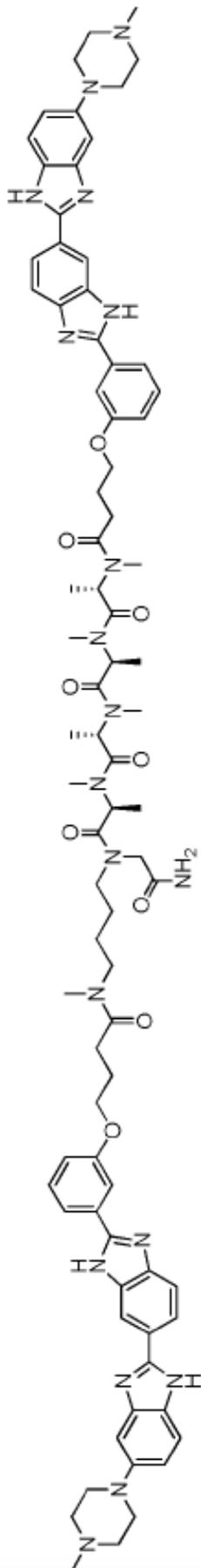
Por un 1, $\omega$ -diaminoalcano se entiende un alcano que tiene grupos amino primarios o secundarios en ambos extremos de un segmento de alcano lineal o ramificado. Cuando uno o más grupos amino adicionales se presentan en el alcano, el enlazador Y es una poliamina. En el segmento del alcano se pueden presentar uno o más grupos carboxamido, es decir, un grupo de fórmula  $\text{C}(=\text{O})\text{NR}$ , en donde R es H o alquilo, por ejemplo (C1-C6)alquilo. El término segmento  $\alpha$ -peptidilo como se emplea en la presente memoria se refiere a un resto o a un oligómero de restos de  $\alpha$ -aminoácido, y el término segmento  $\beta$ -peptidilo como se emplea en la presente memoria se refiere a un resto o a un oligómero de restos de  $\beta$ -aminoácido. Un segmento de amida terciaria de peptidilo se refiere a un resto o a un oligómero de péptidos que tienen sustituyentes que no son hidrógeno sobre sus grupos amino peptidilo.

Más específicamente, Y se selecciona del grupo que consiste en



en donde las líneas onduladas indican un punto de unión a un respectivo grupo H, y n es un número entero que oscila de 1 a aproximadamente 20.

5 Por ejemplo, el compuesto puede tener la fórmula



En varias realizaciones, la invención proporciona un método para alterar el complejo r(CUG)<sub>12</sub>-MBNL1, que comprende administrar una cantidad eficaz de un compuesto de la invención a una célula mamífera viva. Por ejemplo, la célula mamífera puede estar en el tejido corporal de un paciente humano.

5 En varias realizaciones, la invención proporciona un método de tratamiento de la distrofia miotónica tipo 1 en un paciente humano, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un compuesto de la invención.

Diseño de compuestos ensamblados modularmente.

Previamente se presentó el diseño de compuestos de ensamblado modularmente que inhiben el complejo r(CUG)<sup>exp</sup>-MBNL1 *in vitro*<sup>13</sup> e *in vivo*<sup>18</sup>. Los compuestos se comprenden de una estructura peptídica que muestra múltiples copias de bis-benzimidazol Ht separado por cuatro módulos de espaciado, o compuestos nH-4 (Figura 2). El compuesto 2H-4 es el más eficaz en los modelos de cultivo de células con DM1, mejorando varios defectos asociados con la DM1 (Figura 1).<sup>18</sup> En un esfuerzo por comprender las características de los compuestos ensamblados modularmente que proporcionan una alta afinidad de unión y bioactividad por r(CUG)<sup>exp</sup>, se diseñaron y sintetizaron una serie de compuestos de segunda generación en los que se varió la estructura de ensamblado. En particular, se estudiaron estructuras de ensamblado de poliaminas, α-péptidos, β-péptidos, péptidos, y amidas terciarias peptídicas (PTA) (Figura 2). Estas estructuras nos permitieron estudiar el efecto de: (i) formación de interacciones favorables con una estructura fosfodiéster cargada negativamente (poliaminas); (ii) unión de espaciado amida (α- y β-péptidos); (iii) N-alquilación (α- y β-péptidos, péptidos y PTAs); y (iv) quiralidad de un átomo de carbono C-α (PTAs y péptidos).

Las PTAs están restringidas de manera conformacional, las cuales se pueden pre-organizar para el reconocimiento de un ARN diana (Figura 2). Ya que el compuesto más potente de primera generación era un dímero (2H-4),<sup>18</sup> nos centramos en los dímeros de cada estructura de ensamblado. Los compuestos se sintetizaron sobre una resina de fase sólida y se acopló a un derivado Ht que contiene un carboxilato. (Ht se une a 5' CUG/3' GUC, y, por tanto, es el módulo de unión al ARN<sup>13</sup>). Cabe señalar que todos los compuestos de segunda generación son solubles en agua a una concentración ≥10 mM y una concentración ≥100 μM en un medio de cultivo celular.

Los compuestos de segunda generación se denominan 2H-X donde 2H indica dos módulos de unión de ARN H y X es específico para cada estructura. La nomenclatura para cada estructura es: (i) poliaminas: 2H-P donde P indica la poliamina en particular (ED es etilendiamina; BD es butanodiamina; HD es hexanodiamina; SPD es espermidina; SPM es espermina); (ii) α-péptidos: 2H-nG donde nG indica el número de restos de glicina; (iii) β-péptidos: 2H-nβA donde nβA indica el número de restos de β-alanina; y (iv) PTAs: 2H-nNX donde NX indica el módulo de espaciado N-alquilado en particular y n indica el número de módulos.

Efecto de la estructura de ensamblado sobre la potencia *in vitro*.

Como se mencionó anteriormente, la DM1 está causada por el secuestro de MBNL1 por r(CUG)<sup>exp</sup>.<sup>28, 32-37</sup> Por lo tanto, la potencia *in vitro* se determinó mediante la medición del desplazamiento de MBNL1 a partir del complejo r(CUG)<sub>12</sub>-MBNL1 empleando un ensayo FRET de resolución de tiempo (TR-FRET).<sup>15,47</sup> Cada compuesto dimérico altera el complejo r(CUG)<sub>12</sub>-MBNL1 con un IC<sub>50</sub> entre ~3 y ~300 μM (Figura 3). Los compuestos más potentes son: 2H-SPM, 2H-3G, y 2H-4G. Las poliaminas y α-péptidos (poliglicinas) tienen una media más potente que las PTAs y los péptidos. Esto puede ser debido a la presencia de protones imino que pueden interactuar favorablemente con la estructura fosfodiéster del ARN (Figura 2).

El espaciado entre los módulos de unión de ARN a H afecta a la potencia *in vitro* por más de un orden de magnitud en casi todas las clases de estructuras (Figura 3), como se observó anteriormente.<sup>13,19,21</sup> Por ejemplo, 2H-SPM tienen un IC<sub>50</sub> de ~3 μM mientras que 2H-ED tienen un IC<sub>50</sub> de ~30 μM. Los α-péptidos más potentes son 2H-3G y 2H-4G (IC<sub>50</sub> ≈ 3 μM) mientras que 2H-6G es el menos potente (IC<sub>50</sub> ≈ 30 μM). Se observaron diferencias similares para 2H-nβA, 2H-nNMe, y 2H-KnNPr. En resumen, el compuesto más potente en cada clase de estructura de ensamblado es: poliaminas, 2H-SPM; péptidos, 2H-3G ≈ 2H-4G (sólo se investigó 2H-3G), PTAs, 2H-3NPr, 2H-3NMe, y 2H-K4NPr.

Efecto de la estructura del ensamblado sobre la estabilidad proteolítica.

Investigamos la estabilidad proteolítica del compuesto más potente en cada clase mediante la medición de su susceptibilidad a la digestión de la pronasa a pH 7,8 y pH 9,0 durante 18 horas.<sup>48</sup> El compuesto más estable proteolíticamente es 2H-SPM (no se observó degradación) mientras que 2H-3NMe es el menos estable (degradado completamente). La estabilidad intermedia frente a la digestión de pronasa se observó para los compuestos restantes, véase la Tabla 1, de abajo.

La estabilidad proteolítica de los compuestos de segunda y tercera generación se ensayó empleando la pronasa como se describió anteriormente.<sup>2</sup> Pronasa es un grupo de ≥ 10 proteasas aisladas de *Streptomyces griseus* K-1. Como tal, la degradación proteolítica se midió en dos pHs, 7,8 y 9,0. En resumen, la pronasa (1 unidad) se añadió al compuesto de interés (400 μM en 40 μL) en un tampón de digestión 1X (Tris-HCl 50 mM, pH 7,8 ó 9,0, y CaCl<sub>2</sub> 10 mM), y la reacción se incubó a 37°C durante 18 horas. Las reacciones se pararon mediante la adición de 4 μL de ácido acético al 25%, y los productos de la digestión por pronasa se analizaron mediante HPLC. Se empleó un

gradiente lineal de 0-100% de metanol en H<sub>2</sub>O con TFA al 0,1% (v/v) y una velocidad de flujo de 1 mL/min. Los resultados se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1: Actividad proteolítica de compuestos seleccionados con respecto a la pronasa

Compuesto	Degradación por pronasa (pH 7,8)	Degradación por pronasa (pH 9,0)
2H-4	++	++
2H-SPM	+	+
2H-3G	++	++
2H-3NPr	++	++
2H-3NMe	+++	+++
2H-K4NPr	++	++
2H-K4NMe	++	++
2H-K4H	+++	+++
2H-K4iBu	+++	+++
2H-K4	++	++

5 +Pronasa estable, ++ Pronasa con estabilidad intermedia, +++ Pronasa inestable

Efecto de la estructura de ensamblado sobre la bioactividad.

El mejor compuesto de cada estructura se estudió para mejorar los defectos asociados a la DM1 en dos modelos celulares de DM1 (Figura 4A y C y 8). Como se menciona anteriormente, el secuestro de MBNL1 por r(CUG)<sup>exp</sup> causa defectos de splicing al pre-ARNm.<sup>28,32-34</sup> Por lo tanto, se estudió el splicing alternativo regulado por MBNL del pre-ARNm del exón 5 de la troponina T cardiaca (*cTNT*).<sup>49,50</sup> Las células HeLa se transfectaron transitoriamente con un mini-gen de DM1 que codifica r(CUG)<sup>exp</sup> y un mini-gen *cTNT*<sup>45,51</sup> seguido por el tratamiento con 10 μM del compuesto. En ausencia de r(CUG)<sup>exp</sup>, la tasa de inclusión del exón 5 es ~45% mientras que en presencia de r(CUG)<sup>exp</sup>, la tasa de inclusión del exón 5 es ~85% (Figura 4A y B). Curiosamente, no todos los compuestos ensayados mejoran el defecto de splicing al pre-ARNm *cTNT* (Figura 4B). Existe alguna relación entre la potencia y la mejora de los defectos de splicing *in vitro* (Figuras 3 y 4B). En base a la potencia *in vitro*, se predecirían las siguientes potencias *in vitro*: 2H-3G ≈ 2H-SPM > 2H-3NPr > 2H-3NMe ≈ 2H-K4NPr. Aunque generalmente se observaron estas tendencias, 2H-K4NPr es atípico y es actualmente el más potente *in vivo* para mejorar el defecto de splicing a *cTNT*.

A continuación, se estudiaron los compuestos para mejorar los defectos de traducción asociados con DM1 (debido al pobre transporte nucleocitoplasmático de los transcritos que contienen r(CUG)<sup>exp</sup>).<sup>38-40</sup> En particular, se empleó un sistema modelo celular en la que la línea celular C2C12 expresa de forma estable r(CUG)<sub>800</sub> embebida en el 3' UTR de la luciferasa de luciérnaga.<sup>12</sup> De manera afín al ARNm *DMPK* en células afectadas con DM1, la repetición expandida afecta al transporte nucleocitoplasmático del ARNm de luciferasa y, por tanto, reduce la expresión de luciferasa. Los compuestos que se unen a r(CUG)<sup>exp</sup> y alteran el complejo r(CUG)<sup>exp</sup>-MBNL1 pueden estimular el transporte citoplasmático del ARNm luciferasa y, por tanto, estimular la traducción de la luciferasa (Figura 4C). Se observa un incremento significativo de la actividad luciferasa (y por lo tanto, mejora del defecto de traducción asociado a DM1) para todos los compuestos (Figura 4D). Existe poca diferencia entre las potencias de los compuestos, con 2H-SPM teniendo menor mejora que los otros. Mayormente, los compuestos no afectan a la actividad luciferasa de células que expresan de manera estable el ARNm sin r(CUG)<sub>800</sub> de la luciferasa de luciérnaga (10μM del compuesto).

Efecto de la estructura de ensamblado sobre la permeabilidad celular y la toxicidad.

A continuación, se estudió el efecto de la estructura de ensamblado sobre la permeabilidad celular y la toxicidad mediante citometría de flujo (Figura 9). La permeabilidad se monitoreó empleando la fluorescencia intrínseca del módulo H mientras que la toxicidad se midió mediante tinción con yoduro de propidio (PI). Las células se trataron con 1 ó 10 μM del compuesto durante 24 horas y después se analizó. Existe una pequeña diferencia en la permeabilidad celular o la toxicidad de los compuestos de segunda generación cuando se dosifican con 10 μM del compuesto (Figura 9), con la excepción del 2H-SPM, que muestra una toxicidad significativa. La permeabilidad celular no cambia a dosis 1 μM, excepto para 2H-SPM, la cual se reduce al 50%. Tomados en conjunto, los datos de la permeabilidad y a toxicidad sugieren que las poliaminas pueden ser estructuras de ensamblado modular sub-

óptimas. Con la excepción del 2H-SPM, todos los compuestos son más permeables y menos tóxicos que el compuesto original, 2H-4, cuando las células se tratan con 1  $\mu\text{M}$  del compuesto (Figura 9). Se ha demostrado que las glicinas *N*-alquiladas, tales como los péptidos y las PTAs entran en las células en mayores cantidades que en los péptidos<sup>52,53</sup> y que los péptidos limitados estructuralmente son más permeables que sus equivalentes sin estructurar.<sup>54-57</sup>

Efecto de las cadenas laterales *N*-alquilo en PTAs.

Considerando todos los datos *in vivo*, el compuesto óptimo es 2H-K4NPr (Figuras 3, 4, y 9). Los defectos de splicing mejoran de manera más eficaz (Figura 4B), tienen una actividad comparable para mejorar los defectos de traducción (Figura 4D), es altamente permeable y tienen baja toxicidad (Figura 9), y es estable proteolíticamente (y similar metabólicamente<sup>48</sup>). Por lo tanto, investigamos el impacto del módulo de espaciado en la bioactividad del 2H-K4NPr. Específicamente, se estudiaron las influencias de *N*-alquilación y la sustitución del carbono- $\alpha$  (Figura 5A). Estudios anteriores han demostrado que el módulo de espaciado afecta a la afinidad, potencia, permeabilidad celular, y localización.<sup>20</sup>

Las potencias *in vitro* se determinaron empleando el ensayo de TR-FRET descrito anteriormente. Los valores  $\text{IC}_{50}$  oscilan de 20 a 55  $\mu\text{M}$ . El *N*-metil PTA, 2H-K4NMe, es el más potente, mientras que el 2H-K4NiBu es el menos potente (Figura 5B). Esto sugiere que sustituyentes voluminosos pueden obstaculizar la asociación estrecha entre  $\text{r}(\text{CUG})_{12}$  y la molécula pequeña. Resulta interesante, que 2H-K4NH y 2H-K4NiBu sean inestables proteolíticamente (Tabla 1).

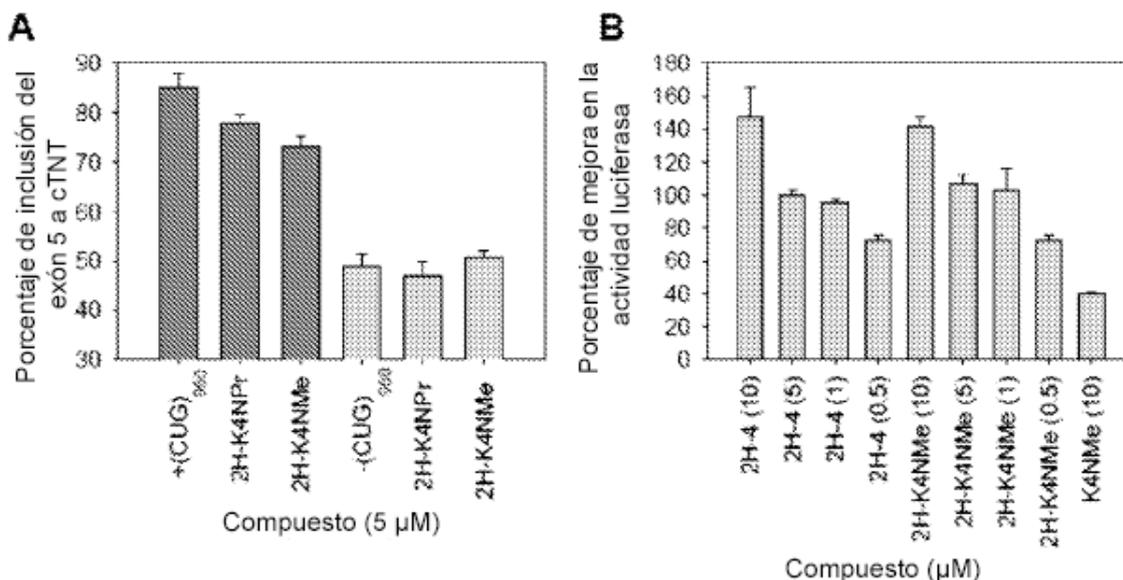
Los compuestos se ensayaron para mejorar los defectos de splicing del pre-ARNm asociado al DM1 cuando las células se dosificaron a 10  $\mu\text{M}$ . Los compuestos más eficaces son el original 2H-K4NPr y 2H-K4NH (amida no terciaria) seguido por el 2H-K4NMe y el 2H-K4 (sin sustituyente sobre el C- $\alpha$ ); 2H-K4iBu es inactivo. Los derivados de 2H-K4NPr se evaluaron también para la mejora de los defectos de traducción empleando el sistema indicador de luciferasa. Todos los derivados incrementan significativamente la expresión de la luciferasa de una forma similar cuando las células se tratan con 10  $\mu\text{M}$  del compuesto. A continuación, se determinaron la permeabilidad celular y la toxicidad de cada uno de los derivados de 2H-K4NPr a través de citometría de flujo (Figura 5E). Como se observa para los compuestos de segunda generación, existe una pequeña diferencia en la permeabilidad cuando las células se dosifican con 10  $\mu\text{M}$  del compuesto con la excepción del 2H-K4, un péptido. Se observa una marcada diferencia para 2H-K4 y los compuestos de tercera generación a la dosis de 1  $\mu\text{M}$ , son ~4 veces más permeables que los otros derivados (péptidos y PTAs). En general, se observa una pequeña toxicidad para los derivados de 2H-K4NPr con la excepción del 2H-K4NiBu, que tienen una toxicidad significativa en ambos a 1 y 10  $\mu\text{M}$ . Y el 2H-K4, que muestra algo de toxicidad cuando las células se tratan con 10  $\mu\text{M}$  del compuesto (Figura 5E).

En resumen, la sustitución iBu es desfavorable para la bioactividad, produciendo el compuesto inactivo en ambos ensayos celulares (Figura 5C y D) y aumentando la toxicidad celular (Figura 5E). La sustitución de Pr por H o Me es mejor tolerada, aunque la sustitución Me desciende la mejora de los defectos de splicing (Figura 5C). Por el contrario, 2H-K4NH tiene una actividad comparable a 2H-K4NPr como se ensayó mediante el restablecimiento de los patrones de splicing al pre-ARNm. La permeabilidad celular y la toxicidad son similares para 2H-K4NPr, 2H-K4NMe, y, 2H-K4NH. La eliminación del grupo metilo en el carbono- $\alpha$ , proporcionando el 2H-K4, afecta negativamente en la permeabilidad celular (Figura 5E).

Otros análisis de 2H-K4NPr y 2H-K4NMe.

Investigamos además el 2H-K4NPr y 2H-K4NMe en base a sus capacidades para mejorar los defectos asociados a DM1 y debido a sus mayores permeabilidades celulares (Figura 5E) y a las mayores estabilidades proteolíticas/metabólicas (Tabla 1) que la de 2H-K4NH y 2H-K4. Primero, se midió la respuesta a la dosis para mejorar los defectos de splicing del pre-ARNm. Ambos compuestos mejoran el defecto de splicing a *cTNT* a 5  $\mu\text{M}$  pero no a 1  $\mu\text{M}$ . Curiosamente, 2H-K4NMe es ligeramente mejor que 2H-K4NPr a esta concentración (Tabla 2). Ningún compuesto afecta al splicing de *cTNT* en las células que no expresan  $\text{r}(\text{CUG})^{\text{exp}}$ .

Tabla 2: Comparación de la bioactividad de 2H-K4NMe con la bioactividad de 2H-K4NPr.



(A) Cuantificación del análisis RT-PCR comparando los compuestos de segunda y tercera generación para mejorar los defectos de splicing del pre-ARNm asociado a DM1. Hay una pequeña diferencia entre el compuesto 2H-K4NPr de segunda generación y el compuesto 2H-K4NMe de tercera generación a 5  $\mu$ M. (B) Gráfica que compara la actividad luciferasa relacionada a la mejora de los defectos de traducción asociados a DM1 entre 2H-4 y 2H-K4NMe. K4NMe es la estructura sin conjugar (sin módulos de unión a ARN).

Se completó también la respuesta a la dosis para mejorar los defectos de traducción para 2H-K4NMe. Se observó una actividad significativa cuando las células se trataron con un poco del compuesto 1  $\mu$ M (Tabla 2). Tanto 2H-K4NPr como 2H-K4NMe parecen mejorar los defectos de splicing y traducción del pre-ARNm alternativo a concentraciones algo menores que sus  $IC_{50}$  *in vitro*. Estas observaciones podrían deberse a: (i) los ensayos *in vivo* e *in vitro* miden fenómenos muy diferentes: inhibición de la interacción  $r(CUG)^{exp}$ -MBNL1 (*in vitro*) como se comparó a la actividad del MBNL1 libre (*in vivo*); (ii) se observa también un efecto pequeño en el efecto de traducción para la estructura del PTA (K4NMe; Tabla 2); y (iii) un reciente estudio por Jog et al. indica que una vez que se alcanza el umbral crítico de la concentración de MBNL1, cambios relativamente pequeños en la cantidad del MBNL1 activo afecta significativamente al número y la intensidad de los defectos de splicing.<sup>52</sup> Por ejemplo, cuando no se afectan los niveles de MBNL1, el porcentaje de inclusión del exón 5 al cTNT es del 49,5%. Cuando los niveles de MBNL1 se aumentan al 79%, 87%, 97%, y 98% a través del bloqueo de siARN, los porcentajes de inclusión del exón son del 48,2% (no cambia en comparación con las células tratadas con siARN ensambladas), 54,3%, 81,5%, y 88,4%.<sup>52</sup> Cabe señalar que estos efectos son únicos para cada sustrato de pre-ARNm.<sup>52</sup> Teniendo en cuenta la actividad, estabilidad, toxicidad y facilidad de síntesis, el 2H-K4NMe es más óptimo que el 2H-K4NPr.

Se completaron experimentos control adicionales con 2H-K4NMe. Para asegurar que el splicing alternativo de los pre-ARNm no regulados por MBNL1 no se afectan, se estudió el splicing alternativo del dominio con homología a pleckstrina que contiene, familia H miembro 2 (*PLEKHH2*) empleando un constructo de mini-gen.<sup>45</sup> El splicing del *PLEKHH2* no se afectó a 10  $\mu$ M, demostrando la selectividad del 2H-K4NMe por  $r(CUG)^{exp}$  y a eventos de splicing a pre-ARN alternativos regulados por MBNL1. Por otra parte, la estructura PTA sin conjugar, K4NMe, muestra una pequeña actividad en el ensayo de traducción (Tabla 2).

La unión de 2H-K4NMe a varios ARNs que incluyen  $r(CUG)_{12}$ ,  $r(CAG)_{12}$ ,  $r(AU)_{12}$  y  $r(GC)_8$  se estudió mediante espectrometría de resonancia plasmónica de superficie (SPR). Se examinó el efecto de la composición de estructura de ensamblado sobre la permeabilidad celular y la toxicidad. Las células HeLa se trataron con 10  $\mu$ M y 1  $\mu$ M del compuesto durante 24 horas. Se ensayó la toxicidad mediante tinción con yoduro de propidio (PI). Todos los compuestos de segunda generación mejoraron la permeabilidad en comparación con el compuesto de origen 2H-4. Los compuestos con estructuras peptídicas y PTA tenían la absorción celular mayor con escasa toxicidad. Las puertas para la tinción positiva se crearon en relación con las células sin tratar, sin teñir; sin tratar, células, teñidas con PI; y células tratadas con Hoechst 33258. En resumen, 2H-K4NMe es ~30-100 veces selectivo por  $r(CUG)_{12}$  que los otros ARNs estudiados (Tabla 2). En general, tiene una tasa de asociación ( $K_{on}$ ) más rápida y una tasa de disociación ( $K_{off}$ ) más lenta cuando se une a  $r(CUG)_{12}$  comparado con otros ARNs.

Los parámetros cinéticos para 2H-K4NMe en su unión a r(CUG)<sub>12</sub> muestran que este compuesto tiene ventajas sobre el módulo de unión de ARN monomérico y MBNL1 (Tabla 3).

Tabla 3. Caracterización de la unión de ligandos para varios ARNs ensayados por SPR. <sup>a</sup>						
2H-K4NMe						
ARN	k <sub>off</sub> (1) (s <sup>-1</sup> )	k <sub>off</sub> (2) (s <sup>-1</sup> )	k <sub>on</sub> (1) (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	k <sub>on</sub> (2) (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	k <sub>obs</sub> (1) (M)	Selectividad para r(CUG) <sub>12</sub>
r(CUG) <sub>12</sub> <sup>b</sup>	3,43x10 <sup>-3</sup>	5,00x10 <sup>-2</sup>	2,61x10 <sup>5</sup>	1,87x10 <sup>3</sup>	1,31x10 <sup>-8</sup>	-
r(CAG) <sub>12</sub> <sup>b</sup>	6,95x10 <sup>-2</sup>	8,47x10 <sup>-2</sup>	8,38x10 <sup>4</sup>	1,63x10 <sup>3</sup>	8,29x10 <sup>-7</sup>	63
r(AU) <sub>12</sub> <sup>b</sup>	1,65x10 <sup>-2</sup>	3,59x10 <sup>-1</sup>	4,13x10 <sup>4</sup>	1,98x10 <sup>4</sup>	4,00x10 <sup>-7</sup>	30
r(GC) <sub>8</sub> <sup>b</sup>	8,22x10 <sup>-2</sup>	1,05x10 <sup>-1</sup>	5,86x10 <sup>4</sup>	2,48x10 <sup>4</sup>	1,40x10 <sup>-6</sup>	107
2H-K4NMeS						
r(CUG) <sub>12</sub> <sup>b</sup>	6,00x10 <sup>-2</sup>	4,20x10 <sup>-2</sup>	2,73x10 <sup>4</sup>	1,44x10 <sup>5</sup>	2,2x10 <sup>-6</sup>	-
H monómero						
r(CUG) <sub>12</sub> <sup>c</sup>	3,69x10 <sup>-2</sup>	-	1,76x10 <sup>4</sup>	-	2,10x10 <sup>-6</sup>	-
MBNL1						
r(CUG) <sub>12</sub> <sup>c</sup>	2,03x10 <sup>-3</sup>	-	3,28x10 <sup>3</sup>	-	6,19x10 <sup>-7</sup>	-

<sup>a</sup> Las desviaciones estándar para cada una de las mediciones es  $\pm 10\%$  y las estructuras secundarias de los ARNs se proporcionan en la Figura S-5. <sup>b</sup> Los datos se adaptaron mejor a dos componentes de la isoterma de unión. <sup>c</sup> Los datos se adaptaron mejor a un componente de la isoterma de unión.

Por ejemplo, H se une a r(CUG)<sub>12</sub> con una K<sub>d</sub> de 2000 nM, o 15 veces más débil que 2H-K4NMe. Estudios previos muestran que 2H-4 sólo tiene afinidad extra de 1,5 veces en comparación con el monómero.<sup>13</sup> La afinidad incrementada de 2H-K4NMe podría deberse a las interacciones mejoradas de la estructura del PTA con el ARN o a la naturaleza más organizada de la estructura de PTA. Los PTAs tienen una flexibilidad limitada debido a la cadena 1,3-alílica introducida mediante los sustituyentes en ambos carbonos  $\alpha$  y el nitrógeno imino  $\gamma$ , por tanto, la muestra tiene menos espacio conformacional cuando se encuentra con el modo de unión óptimo para r(CUG)<sub>12</sub>.

Las estructuras secundarias de los ARNs empleados en estos estudios se proporcionan en la Figura 10. Adicionalmente, las tasas k<sub>on</sub> y k<sub>off</sub> son 10 veces más rápidas y 10 veces más lentas para 2H-K4NMe que para H, lo que sugiere que un efecto bisagra (Figura 10) proporciona beneficios para ambas tasas de la formación del complejo y para la disociación del complejo para compuestos ensamblados modularmente. 2H-K4NMe se une 5 veces más fuerte a r(CUG)<sub>12</sub> que a MBNL1. La alta afinidad de unión es ventajosa para los compuestos que se dirigen a r(CUG)<sup>exp</sup> a menores concentraciones del compuesto de manera similar a la que se requiere para la bioactividad minimizando, por tanto, los efectos potenciales no específicos a dosis eficaces. 2H-K4NMe también tiene ventajas cinéticas para unirse a r(CUG)<sub>12</sub> que a MBNL1, su tasa de activación es 79 veces más rápida que para MBNL1 (Tabla 3).

Estas observaciones cinéticas de unión pueden deberse a la naturaleza en la que la molécula pequeña y MBNL1 se unen a los ARNs diana. Como un regulador de unión alternativo, MBNL1 debe interactuar específicamente con el ARN y hacerlo a través de cuatro dominios de dedos de zinc (ZnF). Recientemente se ha presentado una estructura cristalina del dominio ZnF3/4 acomplejado con dos copias de la cadena única de r(CGUGU).<sup>59</sup> Ambos dedos de zinc interactúan con una molécula de ARN formando contactos con ZnF3 con la etapa 5'GC y ZnF4 formando contactos para 5'GCU. Las moléculas de ARN se orientan anti-paralelas las unas a las otras. Estos resultados sugieren que la unión a MBNL1 induce una trayectoria de la cadena transversal y descomprimen la unión al ARN. Es probable que el MBNL1 abra el sistema de horquilla de r(CUG) para proporcionar dos regiones de cadena sencilla, que se ve apoyado por el hecho de que el MBNL1 se une de forma débil a todos los pares de bases de los ARNs.<sup>60</sup> El incremento en la tasa para el diseño de la molécula pequeña en el r(CUG)<sup>exp</sup> puede ser una consecuencia de tal reconocimiento molecular. Esto es, la molécula pequeña se une a la estructura en horquilla original del r(CUG)<sup>exp</sup> y la estabiliza mientras que el MBNL1 interactúa inicialmente con r(CUG)<sup>exp</sup>, después altera o remodela la estructura en horquilla para proporcionar la conformación de unión final.

Identificación de las dianas celulares de 2H-K4NMe.

Se identificaron las dianas celulares del compuesto que se dirige al r(CUG)<sup>exp</sup> óptimo empleando una versión modificada de un experimento seleccionado (Figura 6). En resumen, se sintetizó un derivado biotinilado de 2H-K4NMe (2H-K4NMe-Biotina) y se presentó en una resina de estreptavidina para proporcionar una matriz de purificación por afinidad. Se extrajo el ARN total a partir del modelo celular de DM1 y se incubó con la matriz de afinidad. Después de un lavado profundo, el northern blotting reveló que r(CUG)<sup>exp</sup> está altamente enriquecido en el ARN eluido unido mediante 2H-K4NMe-Biotina (Figura 6). Curiosamente, r(CUG)<sup>exp</sup> no se destruyó por las perlas de estreptavidina que muestran un oligonucleótido complementario para r(CUG)<sup>exp</sup>, 5'-biotina-d(CAG)<sub>12</sub>. Esto se debe probablemente a la elevada naturaleza estructurada del r(CUG)<sup>exp</sup> diana.<sup>8,25,27,60-62</sup> Puesto que los oligonucleótidos reconocen la secuencia, la formación del dúplex entre el r(CUG)<sup>exp</sup> y un oligonucleótido complementario, sólo puede ocurrir después de que la estructura intramolecular se haya desdoblado, una barrera significativa para la formación del complejo. Las moléculas pequeñas que reconocen la estructura no tendrían esta barrera para unirse a las dianas de ARN altamente estructuradas.

2H-K4NMe mejora los defectos de splicing en un modelo de ratón de DM1.

Se seleccionó el 2H-K4NMe para estudios animales en base al rendimiento general en ensayos basados en células, la actividad proteolítica aumentada en comparación con el 2H-KNH, y la menor complejidad estructural en comparación con 2H-K4NPr. Se ha presentado un modelo de ratón de DM1 en el que se expresan 250 repeticiones de rCUG empleando un promotor de actina (repetición larga de la actina esquelética humana, HSA<sup>LR</sup>).<sup>24</sup> La presencia de estas repeticiones da como resultado una desregulación del splicing alternativo en el canal iónico de cloruro específico del músculo (*Clcn1*) y de los pre-ARNm ATPasa 1 cálcica del retículo sarcoplasmático/endoplásmico (*Serca1/Atp2a1*). El exón 7a de *Clcn1* es excluido ~100% en el ARNm de los ratones adultos normales; los ratones con DM1 tienen una tasa de exclusión de ~50%. Después de que los ratones con DM1 se trataran durante 7 días con 100 mg/kg/d de 2H-K4NMe, la tasa de exclusión del exón 7A se restauró al 71% (*p*-valor = 0,007) (Figura 7 y 11). Se recuperó también la unión del exón 21 *Serca1*. La tasa de inclusión del exón 22 es ~100% en ratones adultos normales y ~11,8% en ratones con DM1. Después del tratamiento con 2H-K4NMe, la tasa de inclusión incrementa hasta el 21,5% (*p*-valor = 0,008). Notablemente, 2H-K4NMe no afectó al splicing alternativo de los ARNm *Itgb1* y *CapZB*, que no se regularon por MBNL1.

### Compendio y planteamiento

En este estudio investigamos el papel de la estructura de ensamblado modularmente sobre las actividades *in vitro* e *in vivo* de compuestos diseñados para dirigirse al ARN que causa la distrofia miotónica de tipo 1. En base a una variedad de criterios, que incluyen la potencia *in vitro* e *in vivo*, la estabilidad proteolítica, la permeabilidad celular, y la toxicidad, la estructura óptima es una PTA. Mayormente, unas cinéticas de investigación mostraron que las moléculas pequeñas de ensamblado modularmente tienen tasas de activación más rápidas y tasas de desactivación más lentas que las moléculas pequeñas monoméricas o la proteína MBNL1, quizás debido al efecto bisagra para diferenciar la naturaleza de la molécula pequeña de unión y la proteína para r(CUG)<sup>exp</sup>. Estas ventajas cinéticas explican probablemente los potentes efectos biológicos de nuestros compuestos divalentes, los módulos de unión al ARN a partir de los que se componen por sí solos son inactivos. Tales efectos se pueden programar en el diseño de otras moléculas pequeñas que se dirigen a otros ARNs celulares.

Además, aprovechamos la química permitida por el planteamiento del ensamblado modular para incorporar un marcador de biotina. Esta modificación permite seleccionar dianas celulares de una molécula pequeña empleando perlas de estreptavidina y demuestra que r(CUG)<sup>exp</sup> es en efecto una diana de nuestros compuestos diseñados. Este es el primer estudio que identifica r(CUG)<sup>exp</sup> como una diana celular de moléculas pequeñas que mejora los defectos asociados a DM1 y además respalda nuestra estrategia de diseño. Otros marcadores que se pueden incorporar en los compuestos de ensamblado modularmente incluyen cabeza para la separación dirigida o la unión entrecruzada covalente.<sup>63,64</sup> Notablemente, nuestro compuesto óptimo mejora los defectos de splicing alternativo asociados a DM1 en un modelo de ratón y, por tanto, tienen potencial terapéutico.

### Documentos citados

1. Pohlsgaard, J., y Douthwaite, S. (2005) The bacterial ribosome as a target for antibiotics. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 870-881.
2. Projan, S. J. (2002) New (and not so new) antibacterial targets – from where and when will the novel drugs come? *Curr. Opin. Pharmacol.* 2, 513-522.
3. Berg, J. M., Tymoczko, J. L., y Stryer, L. (2007) *Biochemistry, Sexta Edición*, W.H. Freeman and Company, Nueva York.
4. Johnson, L. F., Abelson, H. T., Penman, S., y Green, H. (1977) The relative amounts of the cytoplasmic RNA species in normal, transformed and senescent cultured cell lines. *J. Cell. Physiol.* 90, 465-470.
5. Johnson, L. F., Williams, J. G., Abelson, H. T., Green, H., y Penman, S., (1975) Changes in RNA in relation to growth of the fibroblast. III. Posttranscriptional regulation of mRNA formation in resting and growing cells. *Cell* 4, 69-75.

6. Blount, K. F., y Breaker, R. R. (2006) Riboswitches as antibacterial drug targets. *Nat. Biotechnol.* **24**, 1558-1564.
7. Blount, K. F., Wang, J. X., Lim, J., Sudarsan, N., y Breaker, R. R. (2007) Antibacterial lysine analogs that target lysine riboswitches. *Nat. Chem. Biol.* **3**, 44-49.
- 5 8. Kumar, A., Park, H., Fang, P., Parkesh, R., Guo, M., Nettles, K. W., y Disney, M. D. (2011) Myotonic dystrophy type 1 RNA crystal structures reveal heterogeneous 1 x 1 nucleotide UU internal loop conformations. *Biochemistry* **50**, 9928-9935.
9. Guan, L., y Disney, M. D. (2012) Recent advances in developing small molecules targeting RNA. *ACS Chem. Biol.* **7**, 73-86.
- 10 10. Childs-Disney, J. L., Wu, M., Pushechnikov, A., Aminova, O., y Disney, M. D. (2007) A small molecule microarray platform to select RNA internal loop-ligand interactions. *ACS Chem. Biol.* **2**, 745-754.
11. Velagapudi, S. P., Seedhouse, S. J., y Disney, M. D. (2010) Structure-activity relationships through sequencing (StARTS) defines optimal and sub-optimal RNA motif targets for small molecules. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **49**, 3816-3818.
- 15 12. Disney, M. D., Labuda, L. P., Paul, D. J., Poplawski, S. G., Pushechnikov, A., Tran, T., Velagapudi, S. P., Wu, M., y Child-Disney, J. L. (2008) Two-dimensional combinatorial screening identifies specific aminoglycoside-RNA internal loop partners. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 11185-11194.
13. Pushechnikov, A., Lee, M. M., Childs-Disney, J. L., Sobczak, K., French, J. M., Thornton, C. A., y Disney, M. D. (2009) Rational design of ligands targeting triplet repeating transcripts that cause RNA dominant disease: application to myotonic muscular dystrophy type 1 and spinocerebellar ataxia type 3. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 9767-9779.
- 20 14. Velagapudi, S. P., Seedhouse, S. J., French, J., y Disney, M. D. (2011) Defining the RNA internal loops preferred by benzimidazole derivatives via 2D combinatorial screening and computational analysis. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 10111-10118.
- 25 15. Parkesh, R., Childs-Disney, J. L., Nakamori, M., Kumar, A., Wang, E., Wang, T., Hoskins, J., Tran, T., Housman, D. E., Thornton, C. A., y Disney, M. D. (2012) Design of a bioactive small molecule that targets the myotonic dystrophy type 1 RNA via an RNA motif-ligand database and chemical similarity searching. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 4731-4742.
- 30 16. Kumar, A., Parkesh, R., Sznajder, L. J., Childs-Disney, J. L., Sobczak, K., y Disney, M. D. (2012) Chemical correction of pre-mRNA splicing defects associated with sequestration of muscleblind-like 1 protein by expanded r(CAG)-containing transcripts. *ACS Chem. Biol.* **7**, 496-505.
17. Childs-Disney, J. L., Parkesh, R., Nakamori, M., Thornton, C. A., y Disney, M. D. (2012) Rational design of bioactive, modularly assembled aminoglycosides targeting the RNA that causes myotonic dystrophy type 1. *ACS Chem. Biol.* **7**, 1984-1993.
- 35 18. Childs-Disney, J. L., Hoskins, J., Rzuczek, S. G., Thornton, C. A., y Disney, M. D. (2012) Rationally designed small molecules targeting the RNA that causes myotonic dystrophy type 1 are potentially bioactive. *ACS Chem. Biol.* **7**, 856-862.
19. Lee, M. M., Childs-Disney, J. L., Pushechnikov, A., French, J. M., Sobczak, K., Thornton, C. A., y Disney, M. D. (2009) Controlling the specificity of modularly assembled small molecules for RNA via ligand module spacing: targeting the RNAs that cause myotonic muscular dystrophy. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 17464-17472.
- 40 20. Lee, M. M., French, J. M., y Disney, M. D. (2011) Influencing uptake and localization of aminoglycoside-functionalized peptoids. *Mol. Biosyst.* **7**, 2441-2451.
21. Lee, M. M., Pushechnikov, A., y Disney, M. D. (2009) Rational and modular design of potent ligands targeting the RNA that causes myotonic dystrophy 2. *ACS Chem. Biol.* **4**, 345-355.
- 45 22. Disney, M. D., Lee, M. M., Pushechnikov, A., y Childs-Disney, J. L. (2010) The role of flexibility in the rational design of modularly assembled ligands targeting the RNAs that cause the myotonic dystrophies. *Chembiochem* **11**, 375-382.
- 50 23. Brook, J. D., McCurrach, M. E., Harley, H. G., Buckler, A. J., Church, D., Aburatani, H., Hunter, K., Stanton, V. P., Thirion, J. P., Hudson, T., Sohn, R., Zemelmann, B., Snell, R. G., Rundle, S. A., Crow, S., Davies, J., Shelbourne, P., Buxton, J., Jones, C., Juvonen, V., Johnson, K., Harper, P. S., Shaw, D. J., y Housman, D. E. (1992) Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding protein kinase family member. *Cell* **68**, 799-808.

24. Mankodi, A., Logigian, E., Callahan, L., McClain, C., White, R., Henderson, D., Krym, M., y Thornton, C. A. (2000) Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat. *Science* 289, 1769-1773.
- 5 25. Tian, B., White, R. J., Xia, T., Welle, S., Turner, D. H., Mathews, M. B., y Thornton, C. A. (2000) Expanded CUG repeat RNAs form hairpins that activate the double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR. *RNA* 6, 79-87.
26. Sobczak, K., Michlewski, G., de Mezer, M., Kierzek, E., Krol, J., Olejniczak, M., Kierzek, R., y Krzyzosiak, W. J. (2010) Structural diversity of triplet repeat RNAs. *J. Biol. Chem.* 285, 12755-12764.
27. Parkesh, R., Fountain, M., y Disney, M. D. (2011) NMR spectroscopy and molecular dynamics simulation of r(CCGCUGCGG)<sub>2</sub> reveal a dynamic UU internal loop found in myotonic dystrophy type 1. *Biochemistry* 50, 599-601.
- 10 28. Miller, J. W., Urbinati, C. R., Teng-Umnuay, P., Stenberg, M. G., Byrne, B. J., Thornton, C. A., y Swanson, M. S. (2000) Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)<sub>n</sub> expansions associated with myotonic dystrophy. *EMBO J.* 19, 4439-4448.
29. Paul, S., Dansithong, W., Kim, D., Rossi, J., Webster, N. J., Comai, L., y Reddy, S. (2006) Interaction of muscleblind, CUG-BP1 y hnRNP H proteins in DM1-associated aberrant IR splicing. *EMBO J.* 25, 4271-4283.
- 15 30. Cardani, R., Mancinelli, E., Rotondo, G., Sansone, V., y Meola, G. (2006) Muscleblind-like protein 1 nuclear sequestration is a molecular pathology marker of DM1 y DM2. *Eur. J. Histochem.* 50, 177-182.
31. Jiang, H., Mankodi, A., Swanson, M. S., Moxley, R. T., y Thornton, C. A. (2004) Myotonic dystrophy type 1 is associated with nuclear foci of mutant RNA, sequestration of muscleblind proteins and deregulated alternative splicing in neurons. *Hum. Mol. Genet.* 13, 3079-3088.
- 20 32. Kanadia, R. N., Johnstone, K. A., Mankodi, A., Lungu, C., Thornton, C. A., Esson, D., Timmers, A. M., Hauswirth, W. W., y Swanson, M. S. (2003) A muscleblind knockout model for myotonic dystrophy. *Science* 302, 1978-1980.
33. Wheeler, T. M., Sobczak, K., Lueck, J. D., Osborne, R. J., Lin, X., Dirksen, R. T., y Thornton, C. A. (2009) Reversal of RNA dominance by displacement of protein sequestered on triplet RNA. *Science* 325, 336-339.
- 25 34. Orengo, J. P., Ward, A. J., y Cooper, T. A. (2011) Alternative splicing dysregulation secondary to skeletal muscle regeneration. *Ann. Neurol.* 69, 681-690.
- 35 35. Taneja, K. L., McCurrach, M., Schalling, M., Housman, D., y Singer, R. H. (1995) Foci of trinucleotide repeat transcripts in nuclei of myotonic dystrophy cells and tissues. *J. Cell. Biol.* 128, 995-1002.
- 30 36. Mankodi, A., Urbinati, C. R., Yuan, Q. P., Moxley, R. T., Sansone, V., Krym, M., Henderson, D., Schalling, M., Swanson, M.S., y Thornton, C. A. (2001) Muscleblind localizes to nuclear foci of aberrant RNA in myotonic dystrophy types 1 and 2. *Hum. Mol. Genet.* 10, 2165-2170.
37. Wojciechowska, M., y Krzyzosiak, W. J. (2011) Cellular toxicity of expanded RNA repeats: focus on RNA foci. *Hum Mol. Genet.* 39, 8938-8951.
- 35 38. Mastroiannopoulos, N. P., Feldman, M. L., Uney, J. B., Mahadevan, M. S., y Phylactou, L. A. (2005) Woodchuck post-transcriptional element induces nuclear export of myotonic dystrophy 3' untranslated region transcripts. *EMBO Rep.* 6, 458-463.
39. Amack, J. D., y Mahadevan, M. S. (2001) The myotonic dystrophy expanded CUG repeat tract is necessary but not sufficient to disrupt C2C12 myoblast differentiation. *Hum. Mol. Genet.* 10, 1879-1887.
- 40 40. Amack, J. D., Paguio, A. P., y Mahadevan, M. S. (1999) Cis and trans effects of myotonic dystrophy (DM) mutation in a cell culture model. *Hum. Mol. Genet.* 8, 1975-1984.
41. Lee, J. E., Bennett, C. F., y Cooper, T. A. (2012) RNase H-mediated degradation of toxic RNA in myotonic dystrophy type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 109, 4221-4226.
42. Kanadia, R. N., Shin, J., Yuan, Y., Beattie, S. G., Wheeler, T. M., Thornton, C. A., y Swanson, M. S. (2006) Reversal of RNA missplicing and myotonia after muscleblind overexpression in a mouse poly(CUG) model for myotonic dystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 103, 11748-11753.
- 45 43. Gareiss, P. C., Sobczak, K., Mc Naughton, B. R., Palde, P. B., Thornton, C. A., y Miller, B. L. (2008) Dynamic combinatorial selection of molecules capable of inhibiting the (CUG) repeat RNA-MBNL1 interaction in vitro: Discovery of lead compounds targeting myotonic dystrophy (DM1). *J. Am. Chem. Soc.* 130, 16254-16261.

44. Arambula, J. F., Ramisetty, S. R., Baranger, A. M., y Zimmerman, S. C. (2009) A simple ligand that selectively targets CUG trinucleotide repeats and inhibits MBNL protein binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 106, 16068-16073.
- 5 45. Warf, M. B., Nakamori, M., Matthys, C. M., Thornton, C. A., y Berglund, J. A. (2009) Pentamidine reverses the splicing defects associated with myotonic dystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 106, 18551-18556.
46. García-López, A., Llamusi, B., Orzaez, M., Pérez-Paya, E., y Artero, R. D. (2011) In vivo discovery of a peptide that prevents CUG-RNA hairpin formation and reverses RNA toxicity in myotonic dystrophy models. *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 108, 11866-11871.
- 10 47. Chen, C. Z., Sobczak, K., Hoskins, J., Southall, N., Marugan, J. J., Zheng, W., Thornton, C. A., y Austin, C. P. (2012) Two high-throughput screening assays for aberrant RNA-protein interactions in myotonic dystrophy type 1. *Anal. Bioanal. Chem.* 402, 1889-1898.
48. Hook, D. F., Gessier, F., Noti, C., Kast, P., y Seebach, D. (2004) Probing the proteolytic stability of beta-peptides containing alpha-fluoro- and alpha-hydroxi-beta-amino acids. *ChemBiochem* 5, 691-706.
- 15 49. Orengo, J. P., Bundman, D., y Cooper, T. A. (2006) A bichromatic fluorescent reporter for cell-based screens of alternative splicing. *Nucleic Acids Res.* 34, e148.
50. Faustino, N. A., y Cooper, T. A. (2003) Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev.* 17, 419-437.
51. Philips, A. V., Timchenko, L. T., y Cooper, T. A. (1998) Disruption of splicing regulated by a CUG-binding protein in myotonic dystrophy. *Science* 280, 737-741.
- 20 52. Yu, P., Liu, B., y Kodadek, T. (2005) A high-throughput assay for assessing the cell permeability of combinatorial libraries. *Nat. Biotechnol.* 23, 746-751.
53. Kwon, Y. U., y Kodadek, T. (2007) Quantitative evaluation of the relative cell permeability of peptoids and peptides. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 1508-1509.
54. Verdine, G. L., y Hilinski, G. J. (2012) Stapled peptides for intracellular drug targets. *Methods Enzymol.* 503, 3-33.
- 25 55. Moellering, R. E., Cornejo, M., Davis, T. N., Del Bianco, C., Aster, J. C., Blacklow, S. C., Kung, A. L., Gilliland, D. G., Verdine, G. L., y Bradner, J. E. (2009) Direct inhibition of the NOTCH transcription factor complex. *Nature* 462, 182-188.
56. Bautista, A. D., Appelbaum, J. S., Craig, C. J., Michel, J., y Schepartz, A. (2010) Bridged beta(3)-peptide inhibitors of p53-hDM2 complexation: correlation between affinity and cell permeability. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 2904-2906.
- 30 57. Daniels, D. S., y Schepartz, A. (2007) Intrinsically cell-permeable miniature proteins based on a minimal cationic PPII motif. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 14578-14579.
58. Jog, S. P., Paul, S., Dansithong, W., Tring, S., Comai, L., y Reddy, S. (2012) RNA splicing is responsive to MBNL1 dose. *PLoS One* 7, e48825.
- 35 59. Teplova, M., y Patel, D. J. (2008) Structural insights into RNA recognition by the alternative-splicing regulator muscleblind-like MBNL1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15, 1343-1351.
60. Warf, M. B., y Berglund, J. A. (2007) MBNL binds similar RNA structures in the CUG repeats of myotonic dystrophy and its pre-mRNA substrate cardiac troponin T. *RNA* 13, 2238-2251.
- 40 61. Mooers, B. H., Logue, J. S., y Berglund, J. A. (2005) The structural basis of myotonic dystrophy from the crystal structure of CUG repeats. *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 102, 16626-16631.
62. Sobczak, K., de Mezer, M., Michlewski, G., Krol, J., y Krzyzosiak, W. J. (2003) RNA structure of trinucleotide repeats associated with human neurological diseases. *Nucleic Acids Res.* 31, 5469-5482.
63. Guan, L., y Disney, M. D. (2013) Small molecule-mediated cleavage of RNA in living cells. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 52, 1462-1465.
- 45 64. Guan, L., y Disney, M. D. (2013) Covalent small molecule-RNA complex formation in living cells enables cellular profiling of small molecule-RNA interactions. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, in press.
65. Lin, X., Miller, J. W., Mankodi, A., Kanadia, R. N., Yuan, Y., Moxley, R. T., Swanson, M. S., y Thornton, C. A. (2006) Failure of MBNL1-dependent post-natal splicing transitions in myotonic dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 15, 2087-2097.

**Ejemplos**

Contenidos:

1. Métodos generales
2. Esquemas sintéticos para estructuras ensambladas modularmente
- 5 3. Síntesis de moléculas pequeñas ensambladas modularmente
4. Caracterización de moléculas pequeñas ensambladas modularmente
5. Ensayo de la estabilidad proteolítica
6. Amplificación RT-PCR para ensayar la mejora de los defectos de splicing en un modelo celular
7. Auto-radiografías representativas para la mejora de los defectos de splicing en un modelo celular
- 10 8. Comparación de la bioactividad de 2H-K4NMe y 2H-K4NPr
9. Descripción de los estudios de permeabilidad celular y toxicidad
10. Gráficas de citometría de flujo representativas para moléculas pequeñas ensambladas modularmente
11. Descripción de los experimentos de resonancia plasmónica de superficie
12. Isotermas de unión a partir de los experimentos de resonancia plasmónica de superficie
- 15 13. Diana seleccionada y Northern Blotting
14. Amplificación RT-PCR para ensayar la mejora de los defectos de splicing en un modelo de ratón con DM1
15. Auto-radiografías representativas para la mejora de los defectos de splicing en un modelo de ratón con DM1
16. Referencias

- 20 1. Métodos generales

A continuación se pueden encontrar descripciones experimentales detalladas para la síntesis y caracterización del compuesto, análisis RT-PCR, citometría de flujo, experimentos SPR, diana seleccionada y Northern blotting.

Ensayo de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia de tiempo resuelto (TR-FRET).

- 25 Se ensayó la actividad *in vitro* inicial de los compuestos de ensamblado modularmente mediante la alteración del complejo r(CUG)<sup>exp</sup>-MBNL1 empleando un ensayo TR-FRET anteriormente presentado.<sup>15,47</sup> Para calcular el porcentaje de inhibición se empleó la proporción de la intensidad de fluorescencia de 545 y 665 nm en presencia y ausencia del compuesto. Las curvas resultantes se ajustaron a la siguiente ecuación para determinar los valores IC<sub>50</sub>:

$$y = B + \frac{A-B}{1 + \left(\frac{IC_{50}}{x}\right)^{ladera}}$$

- 30 donde y es la proporción de las intensidades de fluorescencia a 545 nm y 665 nm (F545/F665), x es la concentración de la molécula pequeña, B es la proporción F545/F665 reflejo de la cantidad máxima del FRET observado (ausencia de molécula pequeña); A es la proporción F545/F665 reflejo de la cantidad mínima de FRET observado (ausencia de ARN, proteína, y molécula pequeña; sólo están presentes los anticuerpos); y el IC<sub>50</sub> es la concentración de la molécula pequeña cuando la mitad de la proteína es desplazada por la molécula pequeña.

- 35 Mejora de los defectos de splicing asociados a DM1 en un modelo de cultivo celular DM1 empleando RT-PCR.

- 40 Se ensayaron los defectos de splicing al pre-ARNm alternativo asociado a DM1 empleando un sistema modelo anteriormente presentado.<sup>45</sup> En resumen, las células HeLa crecieron como monocapas en placas de 96 pocillos en un medio de cultivo (1X DMEM, FBS 10%, y 1X Glutamax (Invitrogen)). Las células se transfectaron con un 90-95% de confluencia con 200 ng del plásmido total empleando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) según el protocolo estándar del fabricante. Se emplearon cantidades iguales del plásmido que expresan un mini-gen de DM1 con 960 repeticiones CTG interrumpidas<sup>21</sup> y un mini-gen de interés (cTNT<sup>21</sup> o PLEKHH2<sup>45</sup>). Después de 5 horas, el cóctel de transfección se eliminó y se reemplazó por medio de cultivo que contiene el compuesto de interés. Después de 20-

24 horas, las células se lisaron, y el ARN total se recogió empleando un kit miniprep de ARN de mamífero de Sigma-Aldrich GeneElute. Se realizó la digestión de ADN en una columna según el protocolo recomendado del fabricante. Una muestra de ADN se sometió a RT-PCR como se describió anteriormente.<sup>15</sup>

Mejora de los defectos de traducción asociados a DM1 empleando un sistema modelo de luciferasa.

- 5 Se cultivaron líneas celulares de C2C12 que expresan 800 ó 0 repeticiones en el 3' UTR de la luciferasa como monocapas en placas de 96 pocillos en medio de cultivo (1X DMEM, FBS 10%, 1X Glutamax, (Invitrogen) y 1X de penicilina/estreptomicina (MP Biomedicals LLC)). Después de 24 horas, se añadió el compuesto de interés en 50 µL de medio de cultivo. Las células se trataron con el compuesto durante 24 horas. Se determinó la actividad luciferasa como se describió anteriormente.<sup>18</sup>

- 10 Tratamiento en ratones.

15 Todos los procedimientos experimentales, manipulación, y la cría del ratón se realizaron según la Asociación de Evaluación y Acreditación del Cuidado de los animales de laboratorio. Se empleó un modelo de ratón para DM1, HSA<sup>LR</sup> en línea 20b.<sup>24</sup> Los ratones con HSA<sup>LR</sup> expresan ARN de actina esquelética humana con 250 repeticiones CUG en el 3' UTR. Los ratones emparejados por edad y sexo se inyectaron intraperitonealmente con 100 mg/kg de 2H-K4NMe en agua para el tratamiento o con NaCl al 0,9% para el control una vez al día durante 7 días. Los ratones se sacrificaron un día después de la última inyección, y se obtuvo el músculo vasto. Se extrajo el ARN del tejido vasto, y se sintetizó el ADNc como se describió anteriormente.<sup>65</sup>

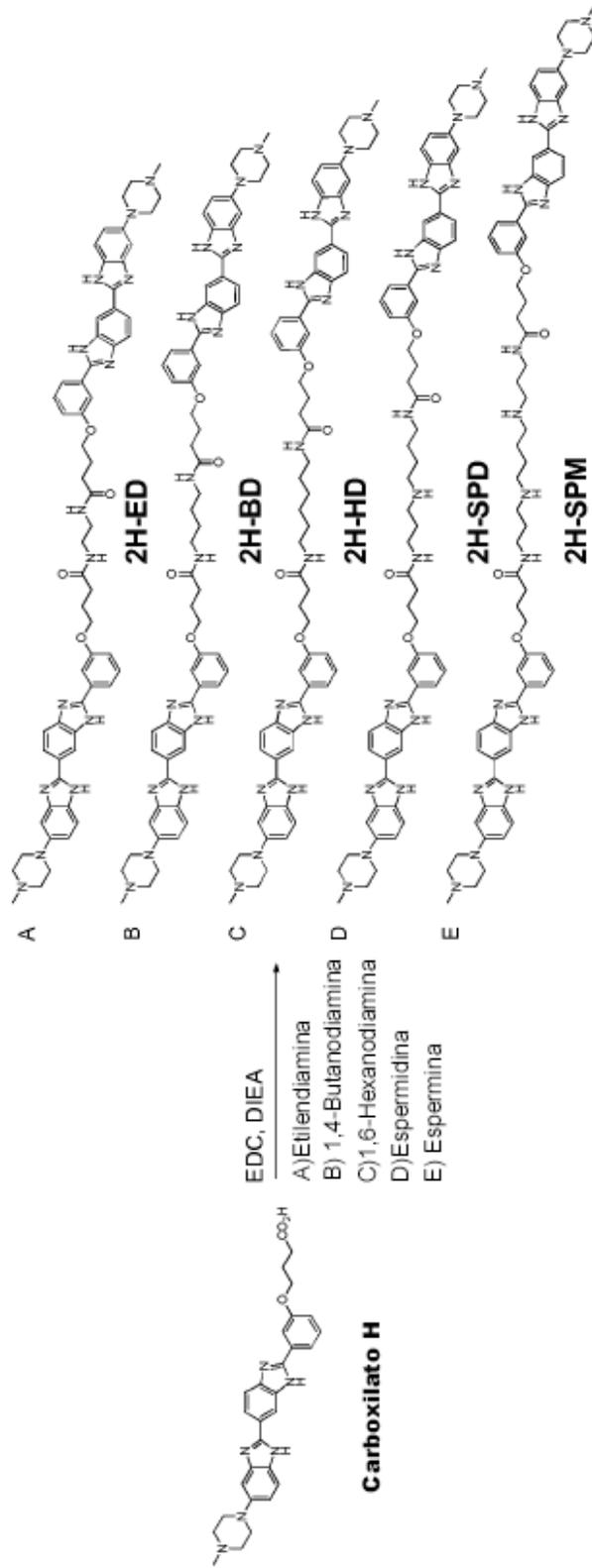
Síntesis.

20 Se adquirió una resina de Fmoc-Rink amida (0,59 mmol/g) de Advanced ChemTech. Se adquirieron una resina de Wang (0,93 mmol/g), una resina 2-clorotritil cloruro (1,2 mmol/g), y Fmoc-L-glicina de Novabiochem. Se adquirió *N,N*-dimetilformamida (DMF, anhidra) de EMD y se empleó sin purificación adicional. Las poliaminas, 1-propilamina, piperidina, ácido trifluoroacético (TFA), *N,N*-diisopropiletilamina (DIEA), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y ácido 2-bromoacético se adquirieron de Sigma Aldrich. Se adquirieron *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (DIC), 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (HOAt), Fmoc-L-alanina, y Fmoc-β-Alanina de Advanced ChemTech. *O*-(Benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio hexafluorofosfato (HBTU) y trifosgeno, se adquirieron de Oakwood Chemicals. El ácido (*S*) 2-cloropropiónico y 2,4,6-colidina se adquirieron de Alfa Aesar. *N*-Fmoc etilendiamina, *N*<sup>6</sup>-Boc-*N*<sup>2</sup>-Fmoc-L-Lisina y Fmoc-*N*-metil-L-alanina se adquirieron de Combi-Blocks. El carboxilato Hoechst se sintetizó como se presenta anteriormente.<sup>1</sup> Los *N*-metilpéptidos se sintetizaron empleando un microondas Biotage Initiator+ SP Wave.

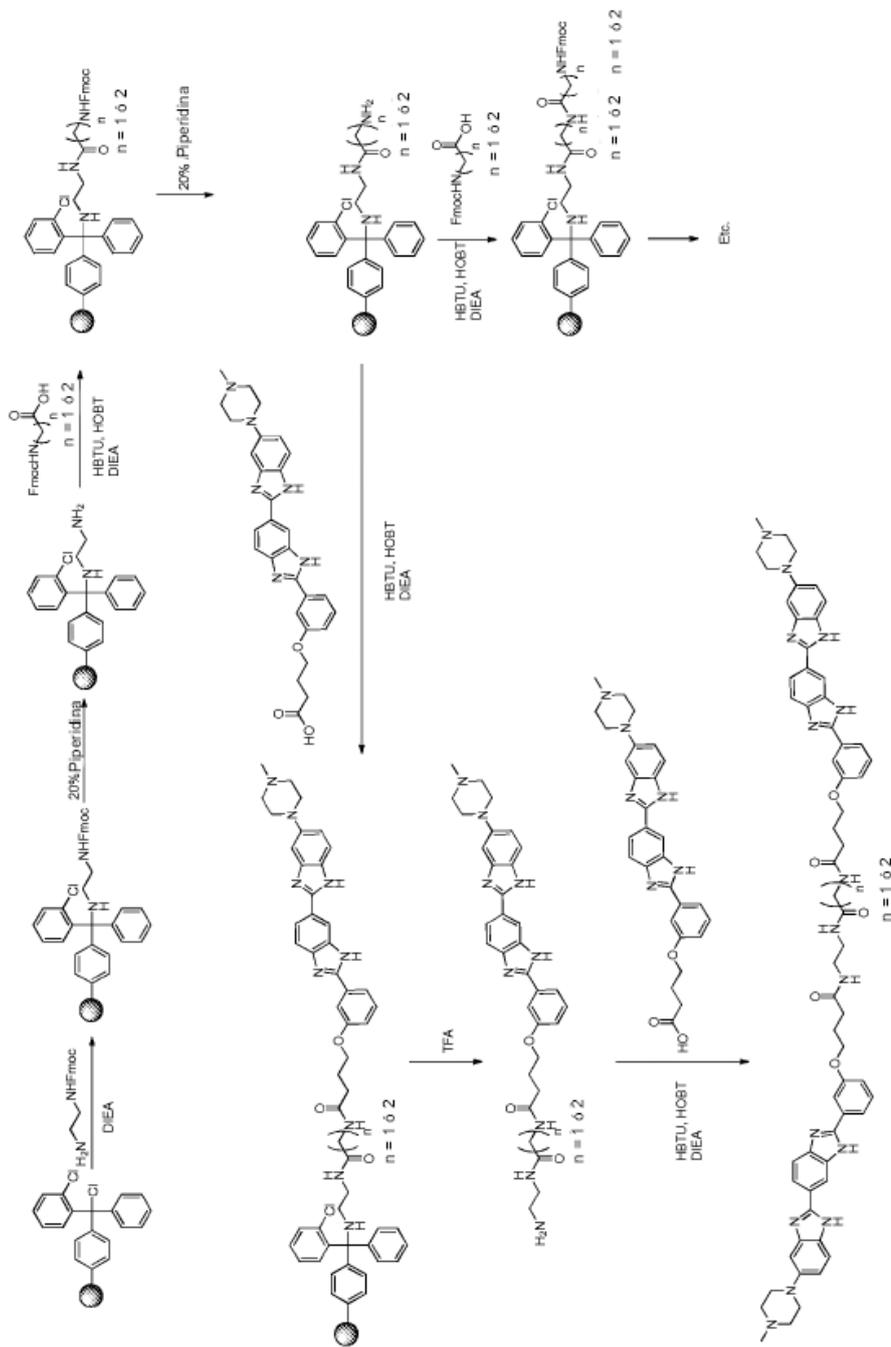
- 30 Purificación y análisis del compuesto.

35 La HPLC preparatoria se realizó empleando una bomba de HPLC Waters 1525 Binary equipada con un sistema detector de la absorbancia Waters 2487 dual y una columna Waters Sunfire C18 OBD 5 µm 19 x 150 mm. La absorbancia se controló a 345 y 220 nm. Para la purificación del compuesto se empleó un gradiente de metanol al 20-100% (MeOH) en H<sub>2</sub>O con TFA al 0,1% (v/v) durante 60 minutos. La HPLC analítica se realizó empleando una columna Waters Symmetry C18 5 µm 4,6 x 150 mm. Las poliaminas, PTAs y peptoides se analizaron empleando un gradiente de MeOH en H<sub>2</sub>O de 0-100% con TFA 0,1% (v/v) durante 60 minutos. Los péptidos se analizaron empleando acetonitrilo al 0-100% en H<sub>2</sub>O con TFA al 0,1% (v/v) durante 60 minutos. Todos los compuestos evaluados tenían una pureza ≥95% mediante HPLC analítica. La espectrometría de masas se realizó con una Analizador Applied Biosystems MALDI ToF/ToF 4800 Plus utilizando una matriz de ácido α-hidroxicinámico.

Esquemas sintéticos para estructuras ensambladas modularmente  
 Esquema 1. Síntesis de Poliaminas

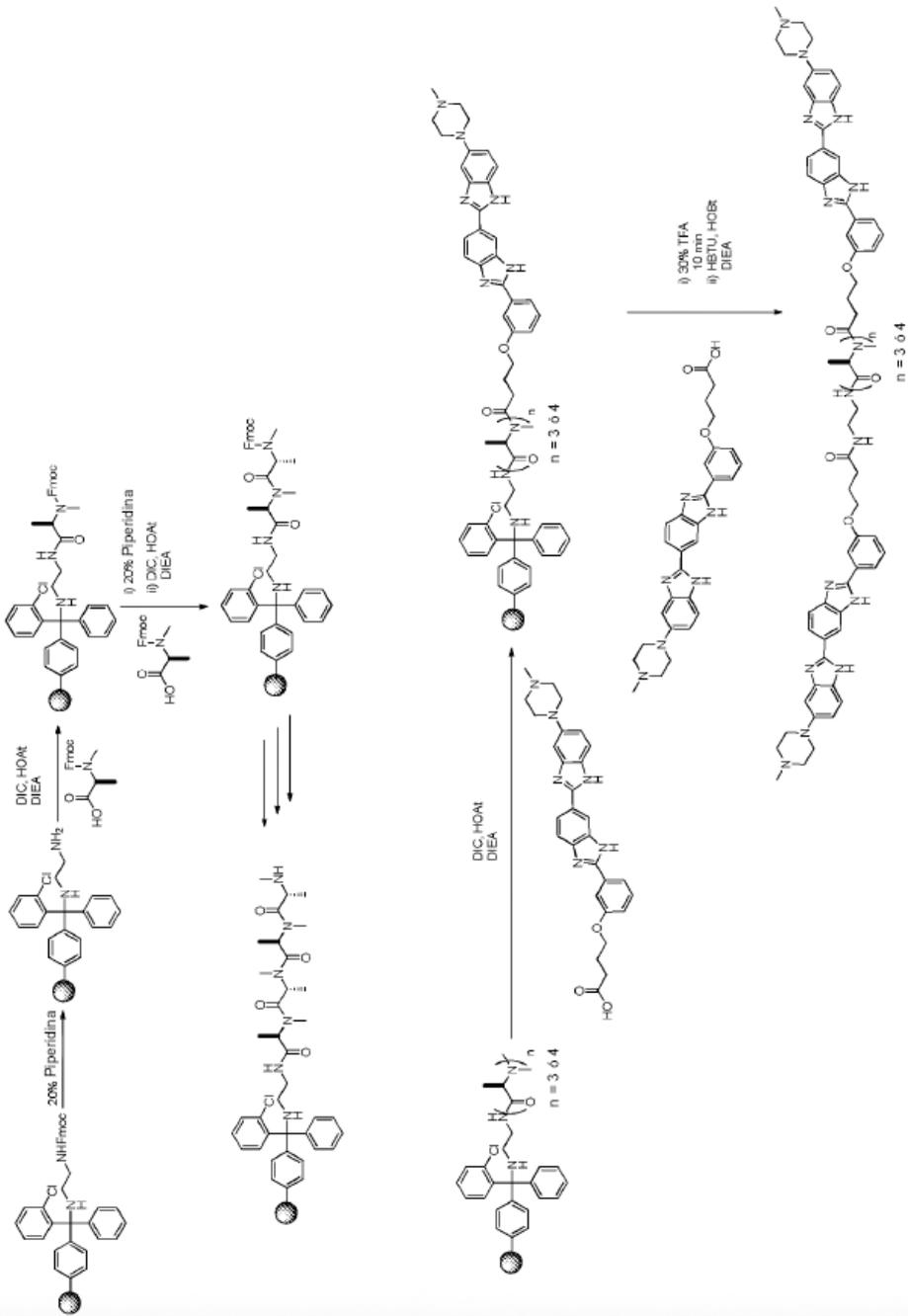


Esquema 2. Síntesis de péptidos  $\alpha$  y  $\beta$

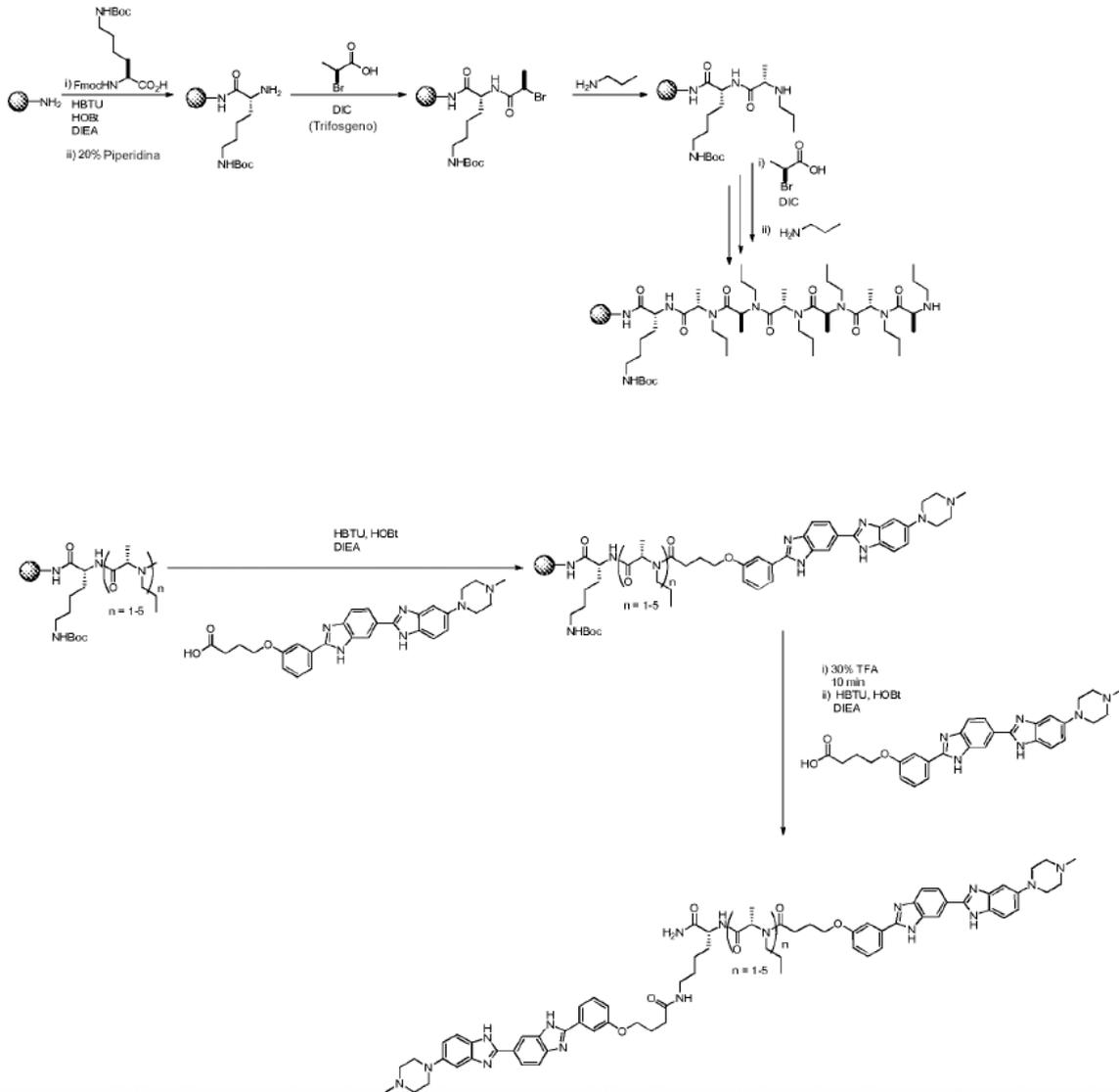




Esquema 4. Síntesis de Amidas terciarias de N-metilo.



Esquema 5. Síntesis de amidas terciarias peptídicas de lisina.





La resina de 2-clorotritil cloruro (3 g, 3,66 mmol, 1,22 mmol/g) se trató con una disolución de *N*-Fmoc etilendiamina (1,5 g, 5,32 mmol) y DIEA (3,2 mL, 18,3 mmol, 5 eq) en DMF (10 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche, y después la resina se lavó con DMF. La resina se trató con MeOH durante 10 minutos, y después se desprotegió con piperidina 20%/DMF (2 x 20 min).

#### 5 Síntesis de péptidos $\alpha$ y $\beta$ .

La resina de etilendiamina (1,25 g, 1,5 mmol) se trató con una disolución de HBTU (2,28 g, 6 mmol), HOBT (811 mg, 6 mmol), DIEA (2,1 mL, 12 mmol), y bien Fmoc-glicina o bien Fmoc  $\beta$ -alanina (6 mmol) en DMF (15 mL) y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Después, la resina se lavó con DMF y se desprotegió con piperidina 20%/DMF (5 mL, 2 x 20 min). Este ciclo se repitió cinco veces, y después de cada ciclo se eliminó una porción de la resina (100 mg). 2H-1G (C<sub>62</sub>H<sub>67</sub>N<sub>15</sub>O<sub>5</sub>): MS calculado: 1102,5; MS encontrado: 1102,5; t<sub>R</sub> = 42 min; 2H-2G (C<sub>64</sub>H<sub>70</sub>N<sub>16</sub>O<sub>6</sub>): MS calculado: 1159,6; MS encontrado: 1159,5; t<sub>R</sub> = 42 min; 2H-3G (C<sub>66</sub>H<sub>73</sub>N<sub>17</sub>O<sub>7</sub>): MS calculado: 1216,6; MS encontrado: 1216,2; t<sub>R</sub> = 42 min; 2H-4G (C<sub>68</sub>H<sub>76</sub>N<sub>18</sub>O<sub>8</sub>): MS calculado: 1273,6; MS encontrado: 1273,7; t<sub>R</sub> = 41 min; 2H-5G (C<sub>70</sub>H<sub>79</sub>N<sub>19</sub>O<sub>9</sub>): MS calculado: 1330,6; MS encontrado: 1330,4; t<sub>R</sub> = 41 min; 2H-6G (C<sub>72</sub>H<sub>82</sub>N<sub>20</sub>O<sub>10</sub>): MS calculado: 1387,7; MS encontrado: 1387,7; t<sub>R</sub> = 45 min; 2H-1 $\beta$ A (C<sub>63</sub>H<sub>69</sub>N<sub>15</sub>O<sub>5</sub>): MS calculado: 1116,6; MS encontrado: 1116,2; t<sub>R</sub> = 43 min; 2H-2 $\beta$ A (C<sub>66</sub>H<sub>74</sub>N<sub>16</sub>O<sub>6</sub>): MS calculado: 1187,6; MS encontrado: 1187,7; t<sub>R</sub> = 43 min; 2H-3 $\beta$ A (C<sub>69</sub>H<sub>79</sub>N<sub>17</sub>O<sub>7</sub>): MS calculado: 1258,6; MS encontrado: 1258,7; t<sub>R</sub> = 43 min; 2H-4 $\beta$ A (C<sub>72</sub>H<sub>84</sub>N<sub>18</sub>O<sub>8</sub>): MS calculado: 1329,7; MS encontrado: 1329,5; t<sub>R</sub> = 44 min; 2H-5 $\beta$ A (C<sub>75</sub>H<sub>89</sub>N<sub>19</sub>O<sub>9</sub>): MS calculado: 1400,7; MS encontrado: 1400,4; t<sub>R</sub> = 43 min; 2H-6 $\beta$ A (C<sub>78</sub>H<sub>94</sub>N<sub>20</sub>O<sub>10</sub>): MS calculado: 1471,8; MS encontrado: 1471,3; t<sub>R</sub> = 43 min.

Síntesis de amidas terciarias peptídicas.

20 La resina de Wang (1 g, 0,93 mmol) se agitó con ácido (S)-2-cloropropiónico (500  $\mu$ L, 5,4 mmol) y DIC (845  $\mu$ L, 5,4 mmol) en DMF a temperatura ambiente durante 3 horas. La resina se lavó después con DMF, se trató con una disolución de 1-propilamina (500  $\mu$ L, 6 mmol) en DMF (5 mL), y se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. La resina se lavó con DMF, y una porción de la resina (200 mg) se eliminó después de cada ciclo. La resina restante se sometió a cuatro ciclos adicionales de emparejamiento y desplazamiento. 2H-1NPr (C<sub>66</sub>H<sub>75</sub>N<sub>15</sub>O<sub>5</sub>): MS calculado: 1158,6; MS encontrado: 1158,6; t<sub>R</sub> = 33 min; 2H-2NPr (C<sub>72</sub>H<sub>86</sub>N<sub>16</sub>O<sub>6</sub>): MS calculado: 1270,7; MS encontrado: 1270,9; t<sub>R</sub> = 35 min; 2H-3NPr (C<sub>78</sub>H<sub>97</sub>N<sub>17</sub>O<sub>7</sub>): MS calculado: 1385,7; MS encontrado: 1385,8; t<sub>R</sub> = 31 min; 2H-4NPr (C<sub>84</sub>H<sub>108</sub>N<sub>18</sub>O<sub>8</sub>): MS calculado: 1496,9; MS encontrado: 1496,8; t<sub>R</sub> = 35 min.

Síntesis de amidas terciarias *N*-metil peptídicas.

30 La resina de etilendiamina (250 mg, 0,31 mmol) se trató con una disolución de DIC (143  $\mu$ L, 0,92 mmol), HOAt (125 mg, 0,92 mmol), DIEA (313  $\mu$ L, 1,8 mmol), y Fmoc-*N*-metil-L-alanina (300 mg, 0,92 mmol) en DMF anhidro (2 mL). La mezcla de reacción se calentó a 75°C mediante un microondas durante 20 minutos. La resina se lavó después con DMF y se desprotegió con piperidina 20%/DMF (2,5 mL, 2 x 10 min). Este ciclo se repitió tres veces, y después se eliminó la mitad de la resina. La resina restante se sometió a un ciclo adicional. 2H-3NMe (C<sub>72</sub>H<sub>85</sub>N<sub>17</sub>O<sub>7</sub>): MS calculado: 1300,7; MS encontrado: 1300,8; t<sub>R</sub> = 32 min; 2H-4NMe (C<sub>76</sub>H<sub>92</sub>N<sub>18</sub>O<sub>8</sub>): MS calculado: 1386,7; MS encontrado: 1386,0; t<sub>R</sub> = 31 min.

Síntesis de amidas terciarias peptídicas de lisina: método DIC.

40 Una resina de Rink amida desprotegida (1 g, 0,59 mmol) se trató con una disolución de *N*<sup>6</sup>-Boc-*N*<sup>2</sup>-Fmoc-L-lisina (829 mg, 1,8 mmol, 3 eq), HBTU (880 mg, 2,4 mmol, 4 eq), HOBT (320 mg, 2,4 mmol, 4 eq), y DIEA (820  $\mu$ L, 4,7 mmol, 8 eq) en DMF (10 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. Después la resina se lavó con DMF y se trató con piperidina 20%/DMF (5 mL, 2 x 20 min). La resina se trató con DIC (1 mL, 6,4 mmol), y ácido (S) 2-cloropropiónico (500  $\mu$ L, 0,6 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. La resina se lavó después con DMF y se resuspendió en 5 mL de DMF. A continuación, se añadió 1-propilamina (500  $\mu$ L, 12 mmol), y la resina se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas seguido del lavado con DMF. Se eliminó una porción de la resina (200 mg), y este ciclo se repitió cuatro veces más. 2H-K1NPr (C<sub>70</sub>H<sub>82</sub>N<sub>16</sub>O<sub>6</sub>): MS calculado: 1243,7; MS encontrado: 1243,5; t<sub>R</sub> = 33 min; 2H-K2NPr (C<sub>76</sub>H<sub>93</sub>N<sub>17</sub>O<sub>7</sub>): MS calculado: 1356,7; MS encontrado: 1356,1; t<sub>R</sub> = 34 min; 2H-K3NPr (C<sub>82</sub>H<sub>104</sub>N<sub>18</sub>O<sub>8</sub>): MS calculado: 1469,8; MS encontrado: 1469,6; t<sub>R</sub> = 35 min; 2H-K4NPr (C<sub>88</sub>H<sub>115</sub>N<sub>19</sub>O<sub>9</sub>): MS calculado: 1582,9; MS encontrado: 1582,7; t<sub>R</sub> = 35 min; 2H-K5NPr (C<sub>94</sub>H<sub>126</sub>N<sub>20</sub>O<sub>10</sub>): MS calculado: 1696,0; MS encontrado: 1696,4; t<sub>R</sub> = 35 min.

Síntesis de amidas terciarias peptídicas de lisina: método trifosgeno.

50 Una resina de Rink amida desprotegida (250 mg, 0,05 mmol, 0,2 mmol/g) se trató con una disolución de *N*<sup>6</sup>-Boc-*N*<sup>2</sup>-Fmoc-L-lisina (65 mg, 0,14 mmol), HBTU (69 mg, 0,19 mmol), HOBT (25 mg, 0,19 mmol), y DIEA (65  $\mu$ L, 0,37 mmol) en DMF (1 mL) y se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. Después la resina se lavó con DMF, seguido de la eliminación del Fmoc mediante tratamiento con piperidina 20%/DMF (2 mL, 2 x 20 min) y se lavó con DCM y THF. (La etapa de lavado con THF se completó con agitación durante 5 min). La mayoría del disolvente se drenó de la resina, y se añadió DIEA (87  $\mu$ L, 0,5 mmol). Se disolvió trifosgeno (75 mg, 0,25 mmol) en THF anhidro (3,65 mL) y ácido (S) 2-cloropropiónico (23  $\mu$ L, 0,25 mmol). Esta disolución se incubó a -80°C durante 15 minutos. Después, se añadió 2,4,6-colidina (66  $\mu$ L, 0,5 mmol), proporcionando la precipitación de un sólido blanco. Se añadió esta disolución fría a la resina y se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. Después, la resina se lavó con DCM y

DMF, y luego se añadió una disolución de 1-propilamina (250  $\mu$ L, 6 mmol) en DMF (3 mL). La resina se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas y se lavó después con DMF y DCM. Este ciclo se repitió un total de cuatro veces. 2H-K4NiBu ( $C_{92}H_{123}N_{19}O_9$ ): MS calculado: 1639,0; MS encontrado: 1639,2;  $t_R$  = 31 min.

Síntesis de amida terciaria peptídica de *N*-metil lisina.

- 5 Una resina de Rink amida desprotegida (200 mg, 0,12 mmol) se agitó con una disolución de *N*<sup>6</sup>-Boc-*N*<sup>2</sup>-Fmoc-L-lisina (262 mg, 0,56 mmol), HBTU (203 mg, 0,56 mmol), HOBt (75 mg, 0,56 mmol), y DIEA (98  $\mu$ L, 0,56 mmol) en DMF (2 mL) durante 4 horas, y después el Fmoc se eliminó con piperidina 20%/DMF (3 mL, 2 x 20 min). Se añadió una disolución de Fmoc-*N*-metil-L-alanina (100 mg, 0,3 mmol), DIC (48  $\mu$ L, 0,9 mmol), HOAt (41 mg, 0,9 mmol), y DIEA (104  $\mu$ L, 0,9 mmol), en DMF (2 mL), y la reacción se calentó a 75°C mediante un microondas durante 10 minutos. La resina se lavó con DMF, y el Fmoc se eliminó con piperidina 20%/DMF (2 x 10 min). Este ciclo se repitió un total de cuatro veces. K4NMe ( $C_{22}H_{43}N_7O_5$ ): MS calculado: 486,3; MS encontrado: 486,4;  $t_R$  = 10 min; 2H-K4NMe ( $C_{80}H_{99}N_{19}O_9$ ): MS calculado: 1470,8; MS encontrado: 1470,6;  $t_R$  = 32 min.

Síntesis peptídicas de lisina alanina.

- 15 Una resina de Rink amida desprotegida (250 mg, 0,15 mmol) se agitó con una disolución de *N*<sup>6</sup>-Boc-*N*<sup>2</sup>-Fmoc-L-lisina (275 mg, 0,6 mmol), HBTU (247 mg, 0,6 mmol), HOBt (88 mg, 0,6 mmol), y DIEA (226  $\mu$ L, 0,6 mmol) en DMF (2 mL) durante 4 horas, y después el Fmoc se eliminó con piperidina 20%/DMF (3 mL, 2 x 20 min). A continuación la resina se trató con una disolución de Fmoc-L-alanina (200 mg, 0,6 mmol), HBTU (247 mg, 0,6 mmol), HOBt (88 mg, 0,6 mmol), y DIEA (226  $\mu$ L, 0,6 mmol), en DMF (2 mL) durante 4 horas seguido por la desprotección del Fmoc con piperidina 20%/DMF (3 mL, 2 x 20 min). Este ciclo se repitió tres veces más. 2H-K4NH ( $C_{76}H_{91}N_{19}O_9$ ): MS calculado: 1414,7; MS encontrado: 1414,6;  $t_R$  = 31 min.

Síntesis del peptoide lisina.

- 25 Una resina de Rink amida desprotegida (250 mg, 0,15 mmol) se agitó con una disolución de *N*<sup>6</sup>-Boc-*N*<sup>2</sup>-Fmoc-L-lisina (275 mg, 0,6 mmol), HBTU (247 mg, 0,6 mmol), HOBt (88 mg, 0,6 mmol), y DIEA (226  $\mu$ L, 0,6 mmol) en DMF (2 mL) durante 4 horas, y después el Fmoc se eliminó con piperidina 20%/DMF (3 mL, 2 x 20 min). La resina se lavó con DMF (3 x 5 mL) y se hizo reaccionar dos veces con una disolución de ácido bromoacético 1 M (2 mL) y DIC (250  $\mu$ L, 1,5 mmol) en DMF (2 mL) mediante irradiación por microondas (3 x 15s) empleando una microonda 700 W ajustada al 10% de potencia. La resina se lavó con DMF (3 x 5 mL) y se hizo reaccionar dos veces con una disolución de 1-propilamina (250  $\mu$ L, 0,6 mmol) en DMF (2 mL) mediante una irradiación microonda (3 x 15s) 700 W ajustada al 10% de potencia. La resina se lavó con DMF (3 x 5 mL), y las etapas de emparejamiento y desplazamiento se repitieron durante tres ciclos más. 2H-K4 ( $C_{84}H_{107}N_{19}O_9$ ): MS calculado: 1526,9; MS encontrado: 1526,7;  $t_R$  = 35 min.

Síntesis de 2H-K4NMe biotinilado.

- 35 Una resina de Rink amida desprotegida (200 mg, 0,12 mmol) se hizo reaccionar con una disolución de ácido 2-bromoacético (2 mL) 1 M y DIC (60  $\mu$ L, 0,4 mmol) por calentamiento a través de un microondas a 75°C durante 5 min. La resina se lavó con DMF, se trató con una disolución de 3-azidopropilamina (40 mg, 0,4 mmol) en DMF, y se calentó en el reactor de microondas a 75°C durante 5 minutos. La resina se lavó con DMF y después se añadió una disolución de *N*<sup>6</sup>-Boc-*N*<sup>2</sup>-Fmoc-L-lisina (164 mg, 0,35 mmol), DIC (60  $\mu$ L, 0,4 mmol), HOAt (50 mg, 0,4 mmol), y DIEA (60  $\mu$ L, 0,4 mmol) en DMF (2 mL). La reacción se calentó mediante un microondas a 75°C durante 10 min, seguido del lavado de la resina con DMF. A continuación, se eliminó el Fmoc con 20% piperidina/DMF (2 x 10 min), una disolución de Fmoc-*N*-metil-L-alanina (100 mg, 0,3 mmol), DIC (60  $\mu$ L, 0,4 mmol), HOAt (50 mg, 0,4 mmol), y DIEA (60  $\mu$ L, 0,4 mmol) en DMF (2 mL), y la reacción se calentó mediante un microondas a 75°C durante 10 min. La resina se lavó con DMF y el Fmoc se eliminó con 20% piperidina/DMF (2 x 10 min). Este ciclo se repitió un total de cuatro veces. Después se unió la biotina al péptido a través de una reacción de click empleando un método descrito anteriormente. En resumen, las perlas se calentaron en el microondas con una disolución de biotina alcalina (166 mg, 0,6 mmol), catalizador cobre (I) (20 mg, 0,08 mmol), y trietilamina (200  $\mu$ L) en una mezcla 1:1 de DMF y agua (2 mL) a 110°C durante 2 horas. K4NMe Biotina ( $C_{40}H_{70}N_{14}O_8S$ ): MS calculado: 907,52; MS encontrado: 907,44;  $t_R$  = 17 min. El compuesto 2H-K4NMe Biotina ( $C_{98}H_{126}N_{26}O_{12}S$ ) se obtuvo después del acoplamiento del H-carboxilato como se describe para 2H-K4NMe. 2H-K4NMe Biotina ( $C_{98}H_{126}N_{26}O_{12}S$ ): MS calculado: 1891,98; MS encontrado: 1891,85;  $t_R$  = 33 min.

- 50 Síntesis de 2H-K4NMeS (Amida terciaria del péptido estable de lisina).

- 55 Una resina de Rink amida desprotegida (1 g, 0,59 mmol) se hizo reaccionar con una disolución de ácido 2-bromoacético (500 mg, 3,6 mmol) y DIC (554  $\mu$ L, 3,6 mmol) en DMF seco (5 mL). Esto se hizo reaccionar en un microondas convencional 3 x 15 s al 10% de potencia. Esto se repitió una vez. Después, la resina se lavó con DMF seco y luego se trató con una disolución de éster terc-butílico del ácido N-(4-aminobutil)-*N*-metil carbámico (200 mg, 1 mmol) en DMF seco (5 mL). Esto se hizo reaccionar en un microondas convencional 3 x 15 s al 10% de potencia y después se agitó a temperatura ambiente durante 15 min. Después se trató con una disolución de Fmoc-*N*-metilalanina (290 mg, 0,89 mmol), DIC (277  $\mu$ L, 1,77 mmol), HOAt (241 mg, 1,77 mmol) y DIEA (308  $\mu$ L, 1,77 mmol) en DMF seco (5 mL) y se hizo reaccionar a 75°C durante 10 min empleando el sintetizador de microondas Biotage

5 SP-Wave. La resina se transfirió después a un vaso de síntesis peptídico y se lavó con DMF. Después el Fmoc se desprotegió mediante agitación a temperatura ambiente con 20% de piperidina/DMF (5 mL) durante 2 x 10 min. El ciclo se repitió 3 veces más. Después de un total de 4 acoplamientos y desprotecciones la resina se hizo reaccionar con una disolución de carboxilato de Hoechst (300 mg, 0,59 mmol), DIC (277  $\mu$ L, 1,77 mmol), HOAt (241 mg, 1,77 mmol) y DIEA (308  $\mu$ L, 1,77 mmol) en DMF seco (5 mL) mediante calentamiento al microondas a 75°C durante 10 min empleando un sintetizador de microondas Biotage SP-Wave. Después la resina se lavó con DMF y DCM y se separó con 30% TFA/DCM a temperatura ambiente durante 10 min. Inmediatamente se concentró y se formó el azeótropo con tolueno 3x. La radiación UV indicó aproximadamente 20  $\mu$ moles del producto. El aceite amarillento se disolvió en DMF seco (1,5 mL) y se añadió carboxilato de Hoechst (10 mg, 20,3  $\mu$ moles), HOAt (3 mg, 22,3  $\mu$ moles), DIC (6  $\mu$ L, 44,6  $\mu$ moles) y DIEA (250  $\mu$ L). Esto se calentó al microondas a 75°C durante 10 minutos empleando un sintetizador de microondas Biotage SP-Wave, y la disolución se concentró después a vacío. Después se purificó mediante HPLC en fase inversa como se describe anteriormente. Se aislaron 2,52  $\mu$ moles del producto, 3,7 mg. 2H-K4NMeS (C<sub>81</sub>H<sub>102</sub>N<sub>19</sub>O<sub>9</sub>): MS calculado: 1484,80; MS encontrado: 1484,55; t<sub>R</sub> = 31min.

Procedimiento general para la conjugación de carboxilato de Hidrógeno a péptidos y amidas terciarias peptídicas.

15 Una resina libre en amina (100 mg, 0,12 mmol) se trató con una disolución de carboxilato de Hoechst (81 mg, 0,16 mmol, 1,3 eq), HBTU (185 mg, 0,5 mmol, 4 eq), HBOt (68 mg, 0,5 mmol, 4 eq) y DIEA (0,2 mL, 1,2 mmol, 10 eq) en DMF (5 mL) a temperatura ambiente durante la noche. La disolución se eliminó. La resina se lavó con DMF y DCM, se trató después con 30% TFA/DCM (2 mL) durante 10 min. La disolución se concentró a vacío y se formó el azeótropo con tolueno tres veces. La cantidad del producto se calculó aproximadamente mediante absorbancia UV.

20 La resina se trató con una disolución Hoechst de carboxilato (5,5 mg, 0,01 mmol, 2 eq), HBTU (8 mg, 0,01 mmol, 2 eq), HBOt (2mg, 0,01 mmol, 2 eq) y DIEA (70  $\mu$ L, 0,4 mmol, 80 eq) en DMF (1 mL) durante la noche a temperatura ambiente. El disolvente se eliminó a vacío, y el producto se purificó empleando HPLC en fase inversa como se describe anteriormente.

Datos analíticos.

25 Se obtuvieron para todos los compuestos datos de pureza de HPLC y de espectroscopía de masa 2H-ED, 2H-BD, 2H-HD, 2H-SPD, 2H-SPM, 2H-1G, 2H-2G, 2H-3G, 2H-4G, 2H-5G, 2H-6G, 2H-1 $\beta$ A, 2H-2 $\beta$ A, 2H-3 $\beta$ A, 2H-4 $\beta$ A, 2H-5 $\beta$ A, 2H-6 $\beta$ A, 2H-1NPr, 2H-2NPr, 2H-3NPr, 2H-4NPr, 2H-3NMe, 2H-4NMe, 2H-K1NPr, 2H-K2NPr, 2H-K3NPr, 2H-K4NPr, 2H-K5NPr, K4NMe, 2H-K4NMe, 2H-K4NH, 2H-K4NIBu, 2H-K4, K4NMe Biotina, y 2H-K4NMe Biotina.

Amplificación PCR para ensayar la mejora de los defectos splicing en un modelo celular

30 Se transcribieron inversamente 300 ng del ARN total a 42°C empleando 5 unidades de transcriptasa inversa AMV (Life Sciences). La mitad de la reacción RT se sometió a PCR empleando un cebador directo marcado radiactivamente. Los productos de PCR-RT se observaron después de 30-35 ciclos a 95°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto, 72°C durante 2 minutos y una extensión final a 72°C durante 10 minutos. Los productos se separaron en un gel de poliacrilamida desnaturalizada al 5% y se visualizó empleando un generador de imágenes Molecular Dynamics Typhoon 9410 en modo variable. Los cebadores RT-PCR para el mini-gen *cTNT* fueron 5'GTTACAACCATCTAAAGCAAGATG (directo; SEQ ID NO:1) y 5'GTTGCATGGCTGGTGCAGG (opuesto; SEQ ID NO:2). Los cebadores RT-PCR para el mini-gen *PLEKKH2* fueron 5'CGGGGTACCAAATGCTGCAGTTGACTCTCC (directo; SEQ ID NO:3) y 5'CCGCTCGAGCCATTCATGAAGTGCACAGG (opuesto; SEQ ID NO:4).

40 Descripción de los estudios de permeabilidad celular y toxicidad

Se cultivaron células HeLa en placas de 12 pocillos en medio de cultivo (1X DMEM, 10% FBS, y 1X Glutamax (Invitrogen)) durante 24 horas hasta que alcanzaron el 90-95% de confluencia. El medio de cultivo se eliminó y se reemplazó con 750  $\mu$ L de medio fresco que contiene el compuesto de interés. Las células se trataron durante 24 horas y se lavaron después con 1X DPBS. Las células se sometieron a tripsinización, se granularon, y lavaron dos veces con hielo 1X DPBS. Las células se resuspendieron en 1X DPBS que contiene 1  $\mu$ g/mL de yoduro de propidio (Sigma Aldrich) y se incubaron sobre hielo durante 30 min. El análisis de 10.000 acontecimientos se completó empleando un citómetro de flujo BD LSRII empleando estándares directos y mediciones de dispersión lateral. Las células se compararon con los controles tratados con el medio en solitario. La tinción con yoduro de propidio se empleó para detectar células que estaban totalmente intactas pero que eran permeables. El PI se detectó empleando un láser de 561 nm. El colorante Hoechst 33258 se empleó como un control positivo para conmutar compuestos 2H-X. El H se detectó empleando un láser UV (355 nM). Las entradas para el tinte positivo se crearon en relación a las células sin tratar, sin teñir; células teñidas con PI, sin tratar; y células tratadas con Hoechst 33258.

Estudios cinéticos empleado Resonancia plasmónica de superficie

55 Se midieron las tasas de activación, las tasas de desactivación y K<sub>obs</sub> empleando un espectrofotómetro ForteBio OctetRed y biosensores para sumergir y leer Estreptavidina SA (ForteBio). Los sensores se pre-equilibraron en un Tampón Kinetics 1X (ForteBio) antes de comenzar las mediciones. El 5' r(CUG)<sub>12</sub> Biotinilado se plegó mediante calentamiento en un Tampón Kinetics 1X a 60°C durante 5 min seguido por enfriamiento lento a temperatura ambiente en la superficie del banco de trabajo. Las mediciones se completaron mediante la incubación de los

sensores de manera secuencial en 200  $\mu$ L de: Tampón Kinetics 1X, ARN 5'-biotinilado 540 nM, Tampón Kinetics 1X, compuesto de interés de MBNL1 (a concentraciones variables; siete diluciones 1:2 en Tampón Kinetics 1X), y finalmente Tampón Kinetics 1X. Los datos se ajustaron empleando un programa informático 7.0 de Análisis de Datos de ForteBio. Los datos de MBNL1 y de H (monómero) se ajustaron empleando un modelo 1:1. Este modelo ajusta un analito en disolución de unión a un sitio de unión en la superficie. Los datos de 2H-K4NMe y 2H-4 se ajustaron empleando un modelo de ligando heterogéneo 2:1. Este modelo ajusta la unión de un analito en disolución a dos sitios de unión en la superficie diferentes. Se calcularon los parámetros cinéticos para ambas interacciones. Las estructuras secundarias de los ARNs empleadas en estos estudios se proporcionan en la Figura 10. En la Figura 25 (A)-(D) se muestran las gráficas de las isoterms de unión a partir de los experimentos de resonancia plasmónica de superficie.

## 2. Diana seleccionada y Northern Blotting.

Se cultivaron células HeLa como monocapas en un matraz de 75 cm<sup>2</sup> en medio de cultivo para una confluencia aproximada del 95%. Las células se transfectaron con un plásmido que expresa un mini-gen de DM1 con 960 repeticiones CTG<sup>2</sup> empleando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) según el protocolo del fabricante. Aproximadamente 24 horas después de la transfección, se aisló el ARN total empleando el reactivo Trizol (Ambion) según el protocolo del fabricante.

2H-K4NMe-Biotina y 5'-biotina-d(CAG)<sub>12</sub> (adquirida en Integrated DNA Technologies (IDT) y utilizada sin purificación adicional) se conjugaron a perlas de agarosa-estreptavidina (Sigma, 15  $\mu$ g/mL de carga de biotina) mediante el tratamiento de 2 nmoles de perlas con 50 nmoles del compuesto u oligonucleótido en agua durante 1 hora a temperatura ambiente. Se determinó la saturación de la perla con el compuesto mediante absorbancia a 345 nm en el sobrenadante indicando que contienen 2H-K4NMe-Biotina. Las perlas se lavaron con agua hasta que no se eluyó más compuesto de la resina mediante el control de la absorbancia a 345 nm. Las perlas tratadas con 5'-biotina-d(CAG)<sub>12</sub> se lavaron con agua hasta que no se detectó más la presencia de ADN mediante absorbancia a 260 y 280 nm (empleando un espectrofotómetro nanodrop).

Aproximadamente 30  $\mu$ g del ARN total se dobló en 1 X PBS durante 5 min a 95°C durante 5 minutos y después se enfrió a temperatura ambiente sobre el banco de trabajo. El ARN doblado se incubó con las perlas durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación a 500 rpm. La disolución se eliminó y las perlas se lavaron con alícuotas de 300  $\mu$ L de 1X PBST hasta que no se detectó más la presencia de ARN mediante absorbancia a 260 y 280 nm (empleando un espectrofotómetro nanodrop). Las perlas se lavaron después con agua para eliminar toda la sal y los detergentes. El ARN unido se liberó de las perlas calentando las perlas a 95°C durante 5 minutos en 100  $\mu$ L de formamida al 95%, EDTA 10 mM, pH 8,2.

Se separaron aproximadamente 2  $\mu$ g de ARN por muestra en un gel de agarosa 1,25% (p/v) que contiene 6,66% (v/v) de formaldehído y de tampón 1X MESA (MOPS 20 mM, acetato de sodio 8 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). El gel se sometió a electroforesis a 50 V durante 2 horas. Después de la electroforesis, el gel se sumergió en NaOH 50 mM durante 20 minutos y después de la tinción empleando SYBR oro 10  $\mu$ g/mL, se sumergió en tampón TBE 0,5X durante 30 minutos. Después de la tinción, el gel se destiñó en tampón TBE 0,5X durante 30 minutos y después se visualizaron con un detector de imágenes molecular Bio-Rad gel doc XR + sistema de captura de imágenes.

El ARN se transfirió a una membrana de nylon (Hybond N+, Amersham) según el protocolo de blotting capilar del fabricante empleando SSC 20X(NaCl 3M, citrato de sodio 300 mM, pH 7,0). El ARN transferido se entrecruzó después a la membrana mediante desplazamiento de la membrana en un Strategene UV Stratalinker 2400 (120.000  $\mu$ julios a 0  $\mu$ julios en 30 segundos). La membrana se lavó con SDS 0,1% en ebullición durante 10 minutos a 37°C. El blot se hibridó después con una sonda d(CAG)<sub>10</sub> marcada con <sup>32</sup>P (10 millones de recuentos) en un Tampón de Hibridación 1X (Disolución Denhart 7,5X, SSPE 5X, y SDS 0,1%) durante 18 horas a 37°C. El exceso de sonda se eliminó mediante lavado con una Disolución de Lavado 1 (SSPE 5X, SDS 0,1%) seguido del lavado a 37°C con una Disolución de Lavado 2 (SSPE 0,5X, SDS 0,1%) 2 x 10 min. Se continuó el lavado adicional con la Disolución de Lavado 1 hasta que la radiactividad de la disolución de lavado alcanzó los niveles de fondo. La membrana se secó al aire y se visualizó empleando un detector de imágenes de Dinámica Molecular Typhoon 9410 de modo variable.

## Amplificación RT-PCR para ensayar el defecto de splicing en un modelo de ratón con DM-1

La amplificación PCR se llevó a cabo durante 26-30 ciclos con los siguientes pares de cebadores: *Cln1* directo 5'-TGAAGGAATACCTCACACTCAAGG (SEQ IN NO:5) y opuesto 5'-(6FAM)CACGGAACACAAAGGCACTG (SEQ ID NO:6); *Secr1* directo 5'-(6FAM)CTCATGGTCCTCAAGATCTCAC (SEQ ID NO:7) y opuesto 5'-GGGTCAGTGCCTCAGCTTTG (SEQ ID NO:8). Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis de gel de agarosa. El gel se escaneó con un láser fluorimager (Typhoon, GE Healthcare), y los productos se cuantificaron empleando ImageQuant.

## Ejemplos de Documentos citados

1. Pushechnikov, A., Lee, M. M., Childs-Disney, J. L., Sobczak, K., French, J. M., Thornton, C. A., y Disney, M. D. (2009) Rational design of ligands targeting triplet repeating transcripts that cause RNA dominant disease:

application to myotonic muscular dystrophy type 1 and spinocerebellar ataxia type 3. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 9767-9779.

2. Childs-Disney, J. L., Hoskins, J., Rzuczek, S. G., Thornton, C. A., y Disney, M. D. (2012) Rationally designed small molecules targeting the RNA that causes myotonic dystrophy type 1 are potently bioactive, *ACS Chem. Biol.* 7, 856-862.
3. Hook, D. F., Bindschadler, P., Mahajan, Y. R., Sebesta, R., Kast, P., y Seebach, D. (2005) The proteolytic stability of 'designed' beta-peptides containing alpha-peptide-bond mimics and of mixed alpha, beta-peptides: application to the construction of MHC-binding peptides. *Chem. Biodivers.* 2, 591-632.
4. Philips, A. V., Timchenko, L. T., y Cooper, T. A. (1998) Disruption of splicing regulated by a CUG-binding protein in myotonic dystrophy. *Science* 280, 737-741.
5. Warf, M. B., Nakamori, M., Matthys, C. M., Thornton, C. A., y Berglund, J. A. (2009) Pentamidine reverses the splicing defects associated with myotonic dystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 106, 18551-18556.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

- <110> The Scripps Research Institute Disney, Matthew D. Rzuczek, Suzanne
- 5 <120> Moléculas pequeñas ensambladas modularmente para el tratamiento de la distrofia miotónica tipo 1
- <130> 1361.209W01
- 10 <140> PCT/US2014/053520  
<141> 2014-08-29
- <150> US 61/871,483  
<151> 2013-08-29
- 15 <160> 14
- <170> FastSEQ para Versión Windows 4.0
- 20 <210> 1  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial
- 25 <220>  
<223> Un cebador sintético
- <400> 1  
gttcacaacc atctaaagca agatg 25
- 30 <210> 2  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial
- 35 <220>  
<223> Un cebador sintético
- 40 <400> 2  
gttgcacatggc tggcgcagg 19
- 45 <210> 3  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial
- 50 <220>  
<223> Un cebador sintético
- <400> 3  
cggggtacca aatgctgcag ttgactctcc 30
- 55 <210> 4  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial
- <220>  
<223> Un cebador sintético
- 60 <400> 4  
ccgctcgagc cattcatgaa gtgcacagg 29
- 65 <210> 5  
<211> 24  
<212> ADN

	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Un cebador sintético	
5	<400> 5	
	tgaaggaata cctcacactc aagg	24
	<210> 6	
10	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> Un cebador sintético	
	<400> 6	
	cacggaacac aaaggcactg	20
20	<210> 7	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
25	<220>	
	<223> Un cebador sintético	
	<400> 7	
30	ctcatggtcc tcaagatctc ac	22
	<210> 8	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
35	<220>	
	<223> Un cebador sintético	
	<400> 8	
40	gggtcagtgc ctcagcttg	20
	<210> 9	
	<211> 36	
	<212> ARN	
45	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Una secuencia de ARN artificial	
50	<400> 9	
	cugcugcugc ugcugcugcu gcugcugcug cugcug	36
	<210> 10	
	<211> 36	
55	<212> ARN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Una secuencia de ARN artificial	
60	<400> 10	
	gcgugcugc ugcugcugcu gcugcugcug cugcgc	36
	<210> 11	
65	<211> 36	
	<212> ARN	

# ES 2 712 090 T3

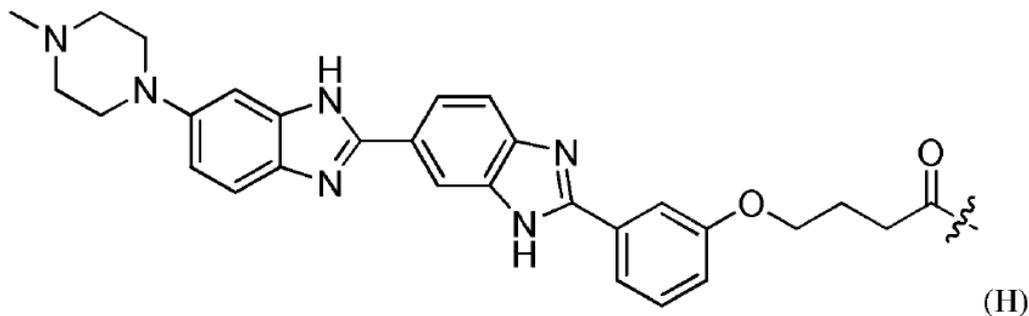
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Una secuencia de ARN artificial	
5	<400> 11	
	gcgcagcagc agcagcagca gcagcagcag cagcgc	36
10	<210> 12	
	<211> 28	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> Una secuencia de ARN artificial	
	<400> 12	
	auauauauau augaaaauau auauauau	28
20	<210> 13	
	<211> 20	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia Artificial	
25	<220>	
	<223> Una secuencia de ARN artificial	
	<400> 13	
30	gcgcgcgca aagcgcgcg	20
	<210> 14	
	<211> 36	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia Artificial	
35	<220>	
	<223> Una secuencia de ARN artificial	
	<400> 14	
40	cugcugcugc ugcugcugcu gcugcugcug cugcug	36

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de unión r(CUG)<sup>exp</sup> dimérico de fórmula (I)

H-Y-H (I),

en donde H es un grupo de fórmula



5

en donde la línea ondulada indica una posición de unión, y

en donde Y es un 1,ω-diaminoalcano que tiene grupos amino primarios o secundarios en ambos extremos de un segmento de alcano lineal o ramificado, estos grupos amino primarios o secundarios tienen enlaces de amida formados con los respectivos grupos carbonilo de los dos grupos H de fórmula (I), y que comprenden de manera

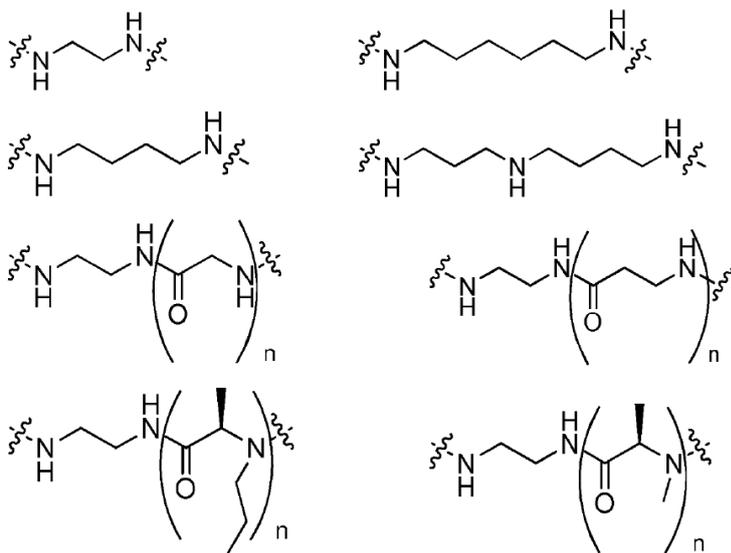
10

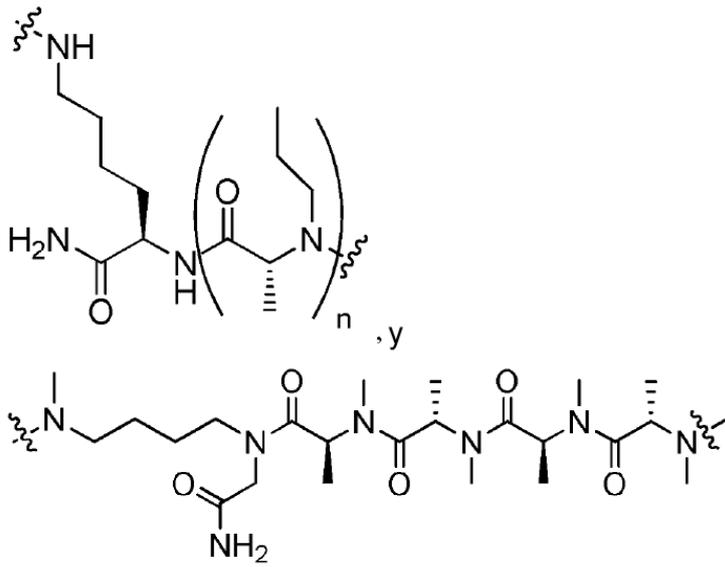
opcional otros grupos amino, carboxamido, o peptidilo adicionales; o una sal adecuada farmacéuticamente de la misma.

2. El compuesto de la reivindicación 1, en donde Y comprende además uno o más segmentos α-peptidilo, segmentos β-peptidilo, segmentos poliamina, segmentos amida terciaria peptidilo, o cualquier combinación de los mismos.

15

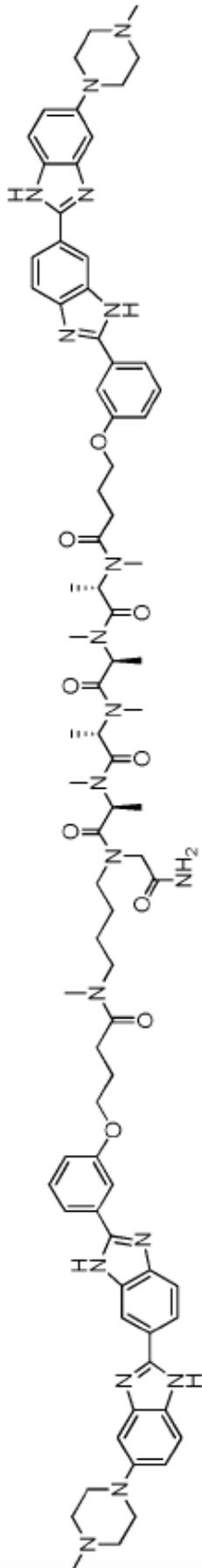
3. El compuesto de la reivindicación 1, en donde Y se selecciona del grupo que consiste en





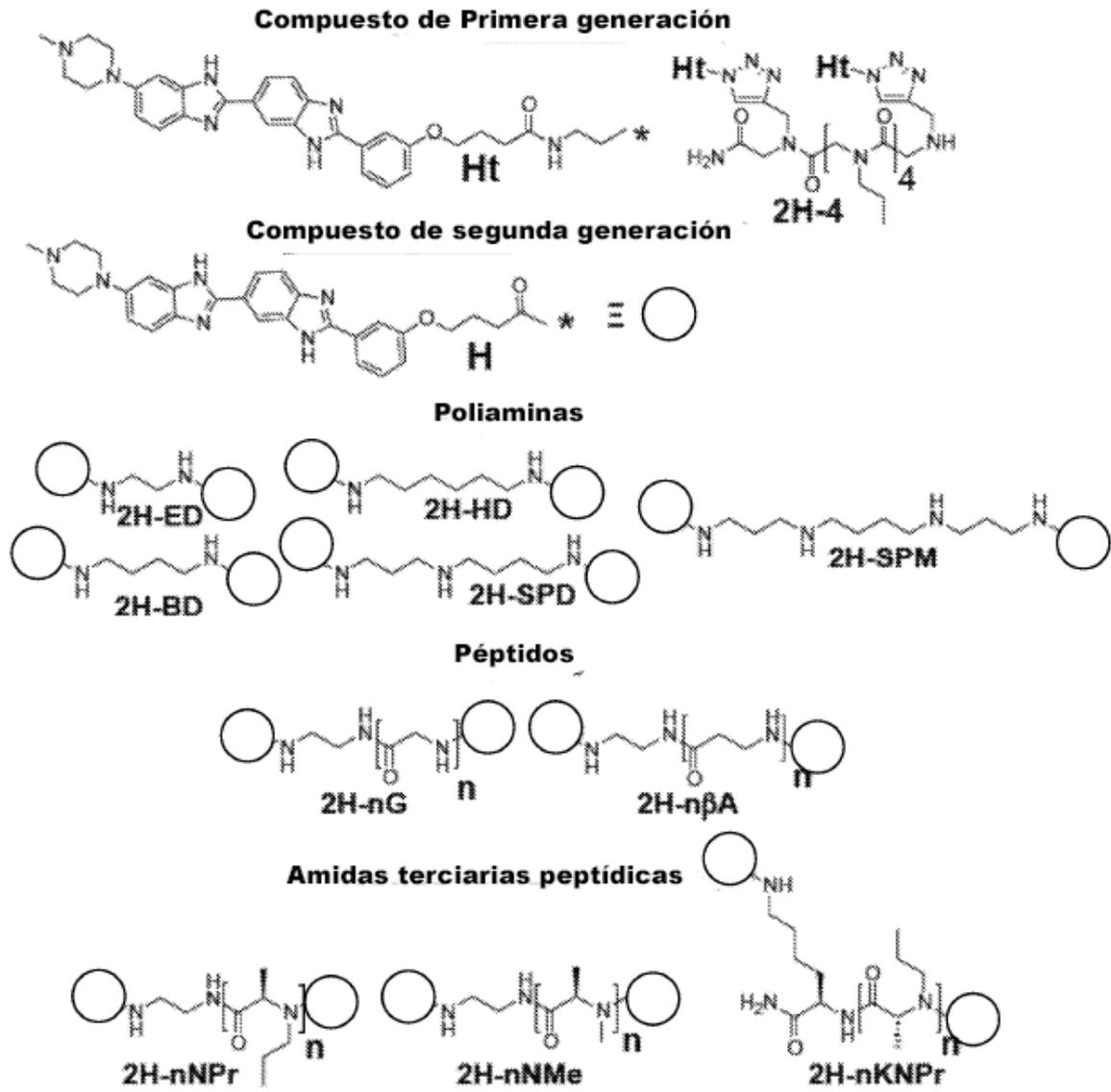
en donde las líneas onduladas indican cada una un punto de unión a un respectivo grupo H, y n es un número entero que oscila de 1 a 20.

4. El compuesto de la reivindicación 1 de fórmula:



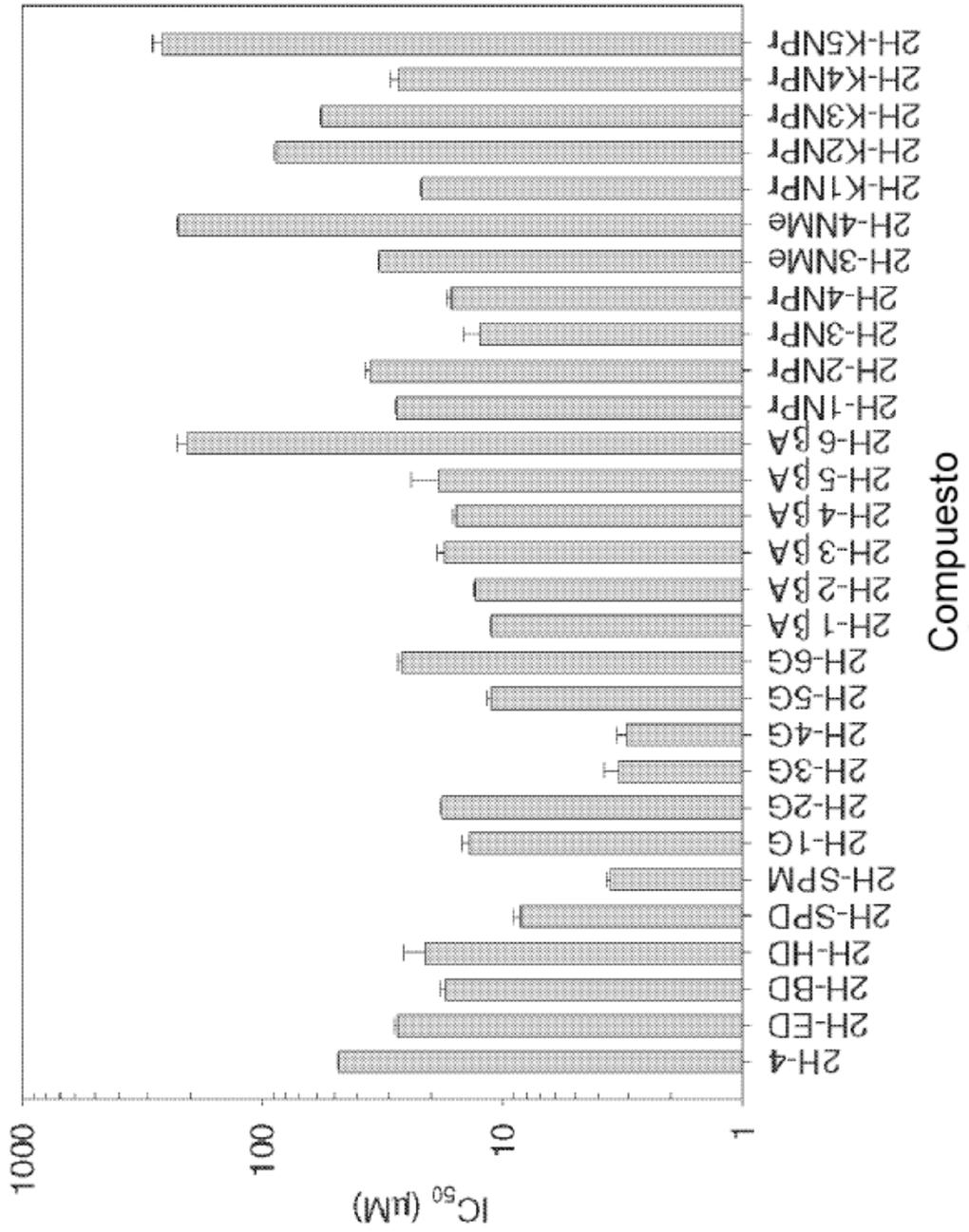
5. Un método in vitro para alterar el complejo r(CUG)<sub>12</sub>-MBNL1 que comprende administrar una cantidad eficaz de un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 a una célula mamífera viva.
6. El método de la reivindicación 5, en donde la célula mamífera viva está en el tejido corporal de un paciente humano.
- 5 7. Un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para usar en el tratamiento de la distrofia miotónica tipo 1 en un paciente humano.

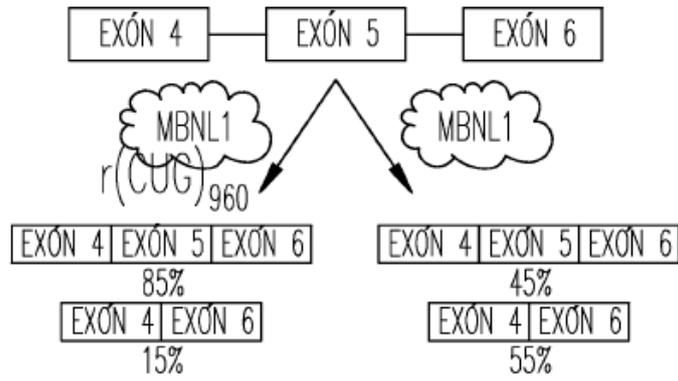




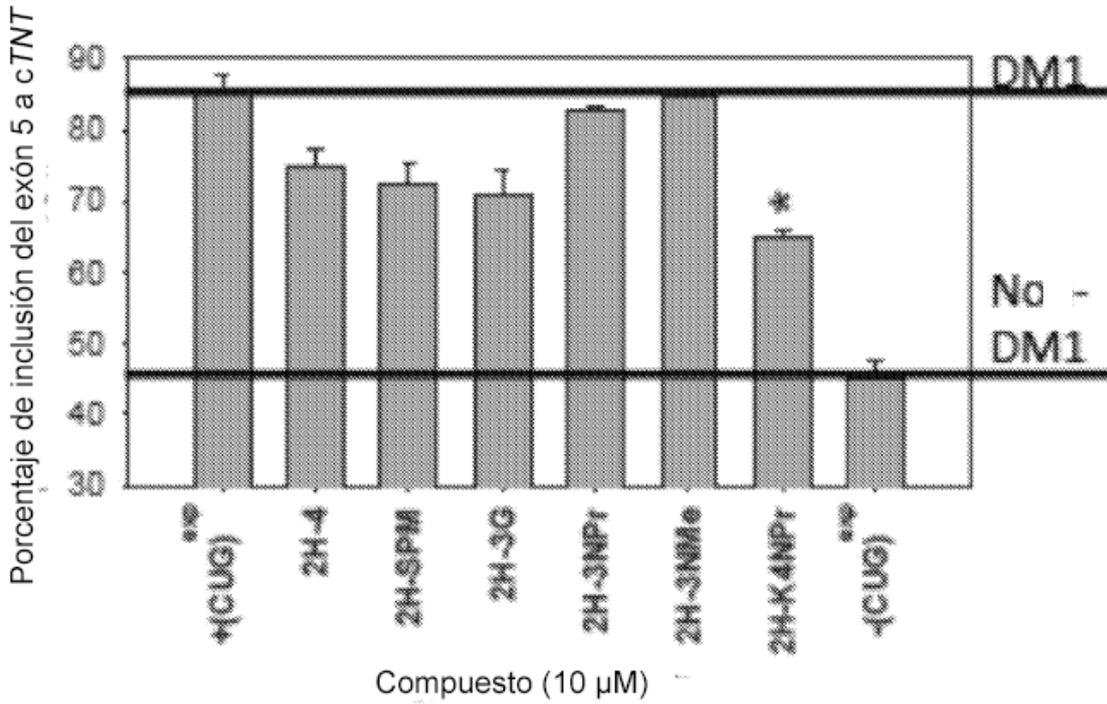
*Fig.2*

Fig. 3

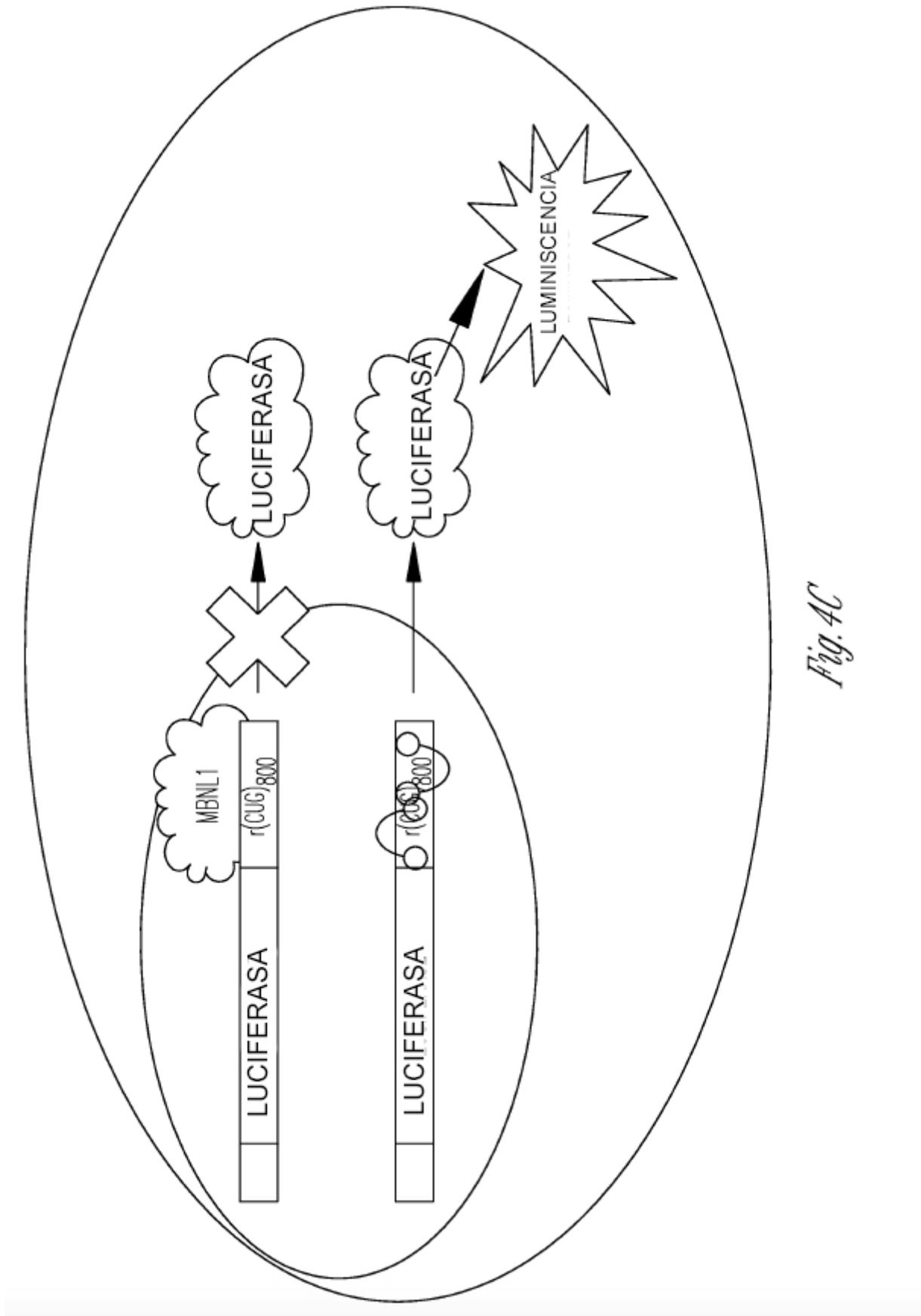




*Fig. 4A*



*Fig. 4B*



*Fig. 4C*

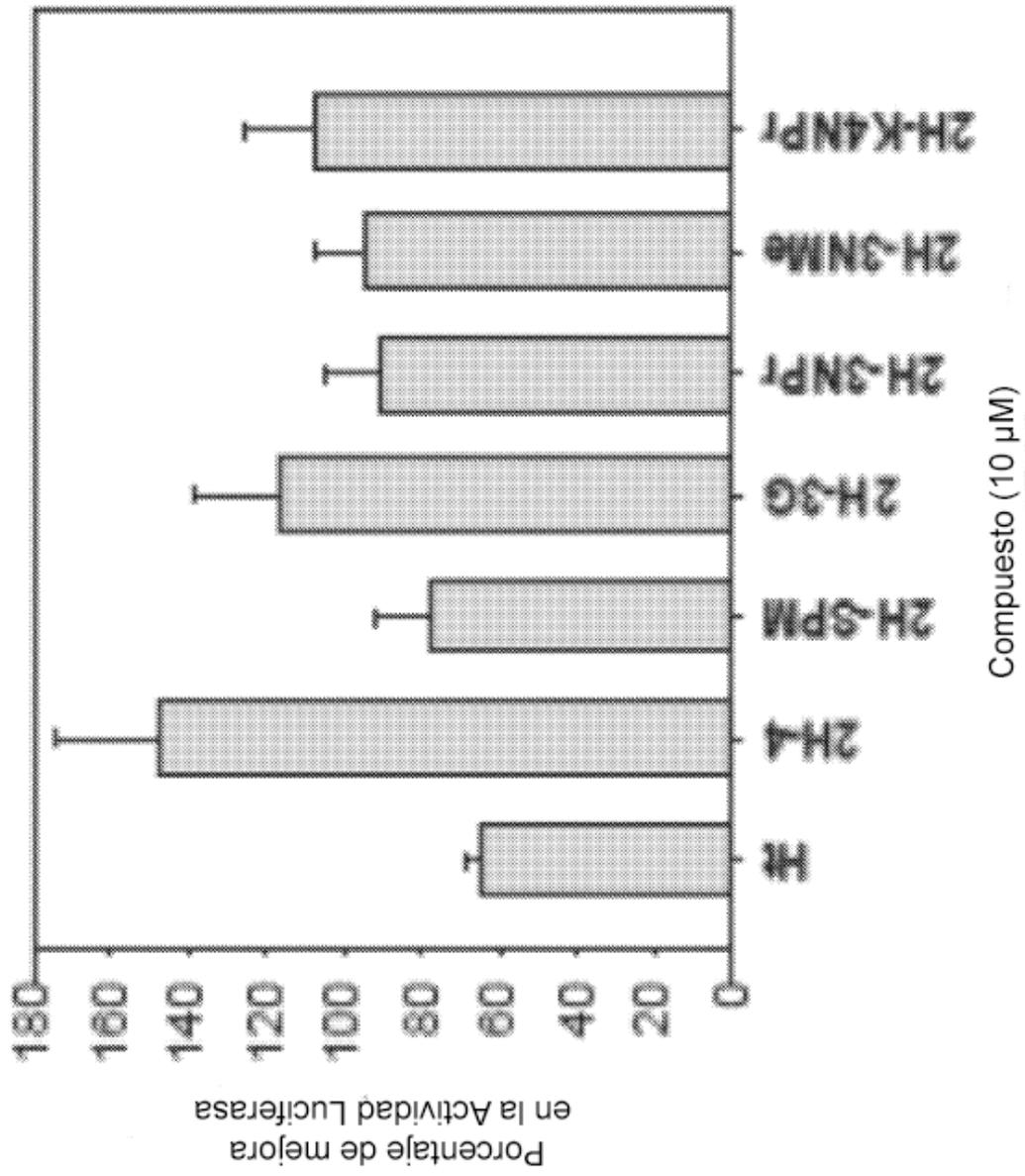
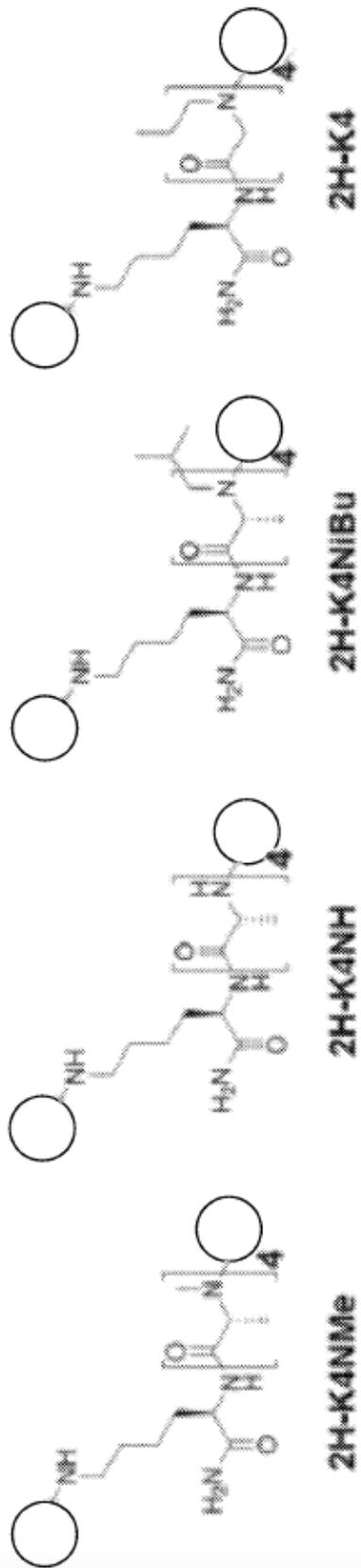
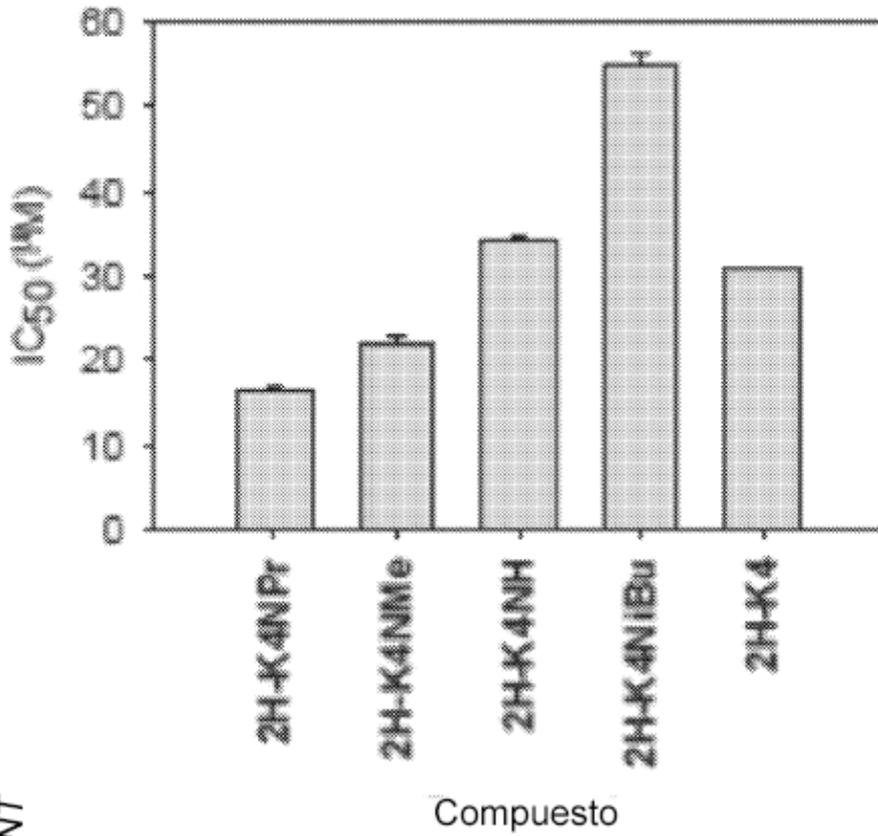


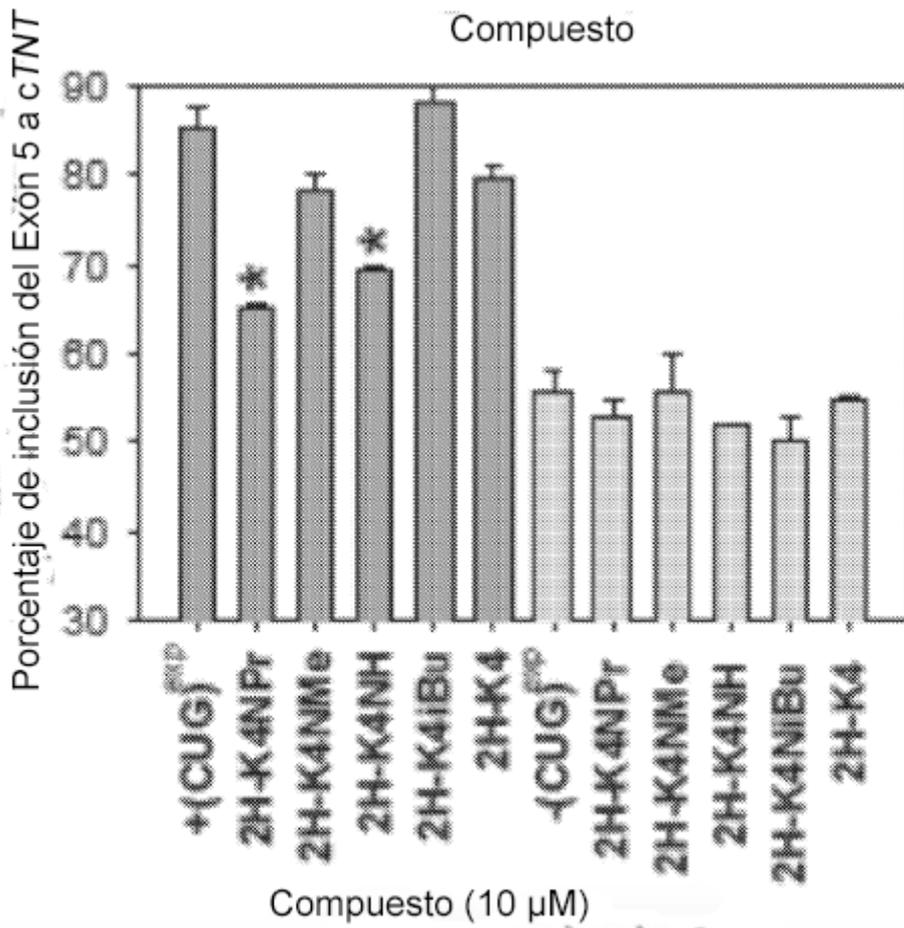
Fig. 4D



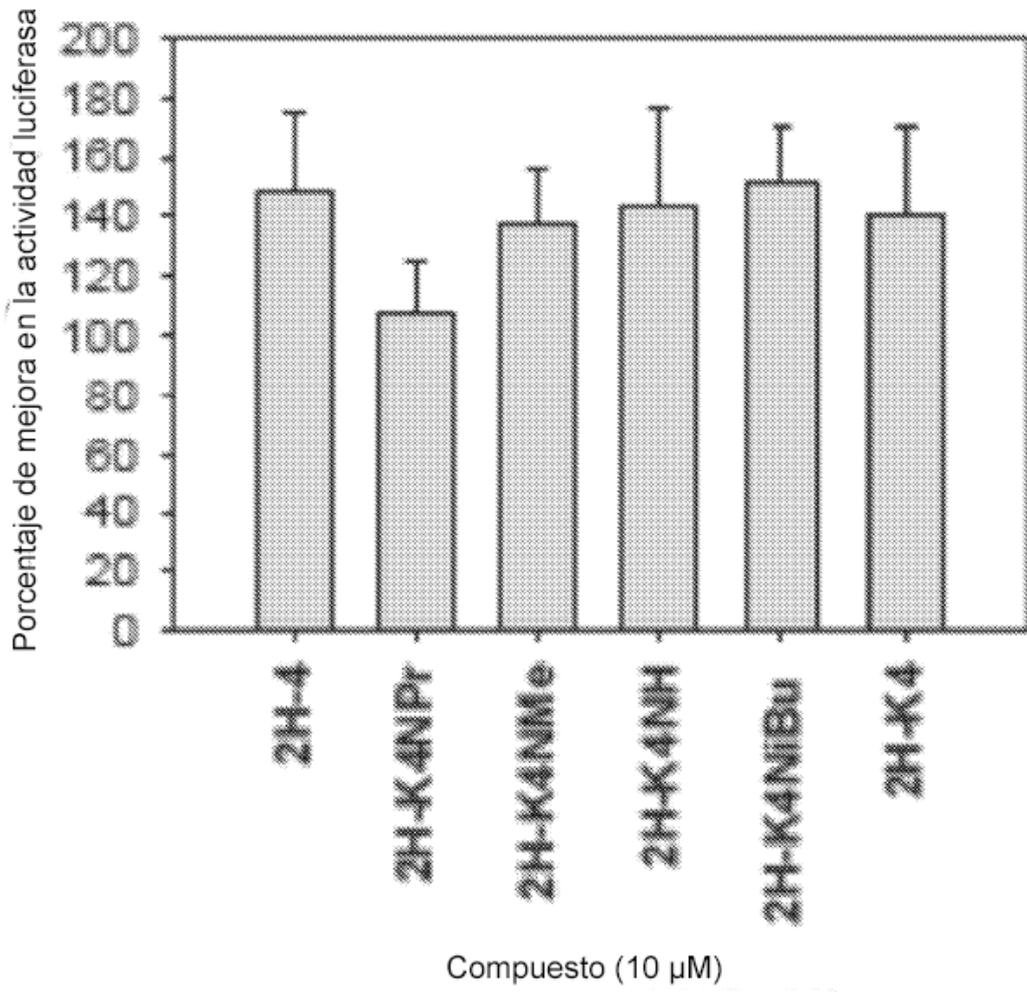
*Fig. 5A*



*Fig. 5B*



*Fig. 5C*

*Fig. 5D*

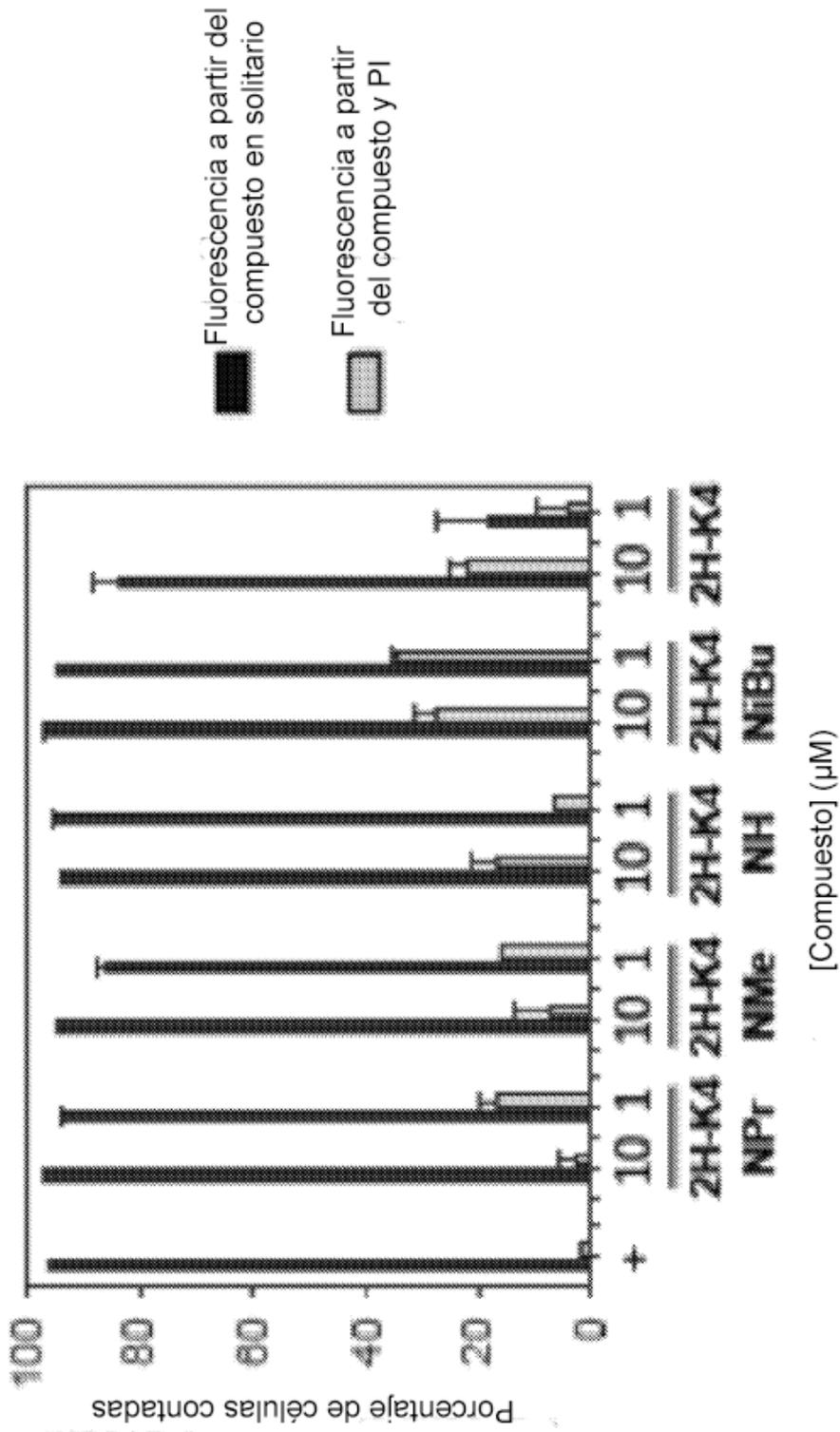
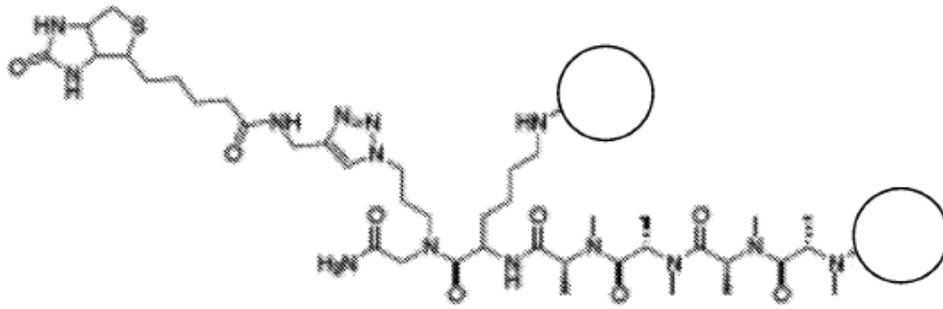
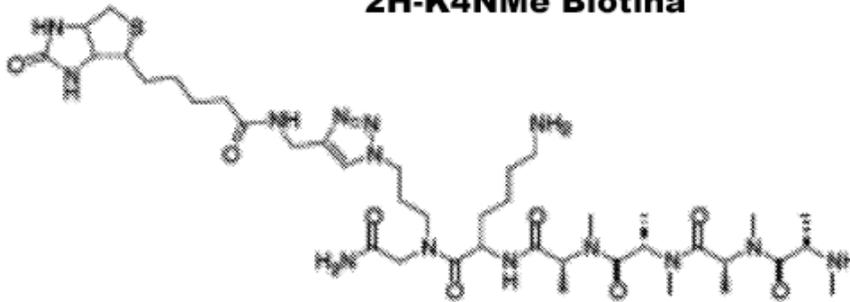


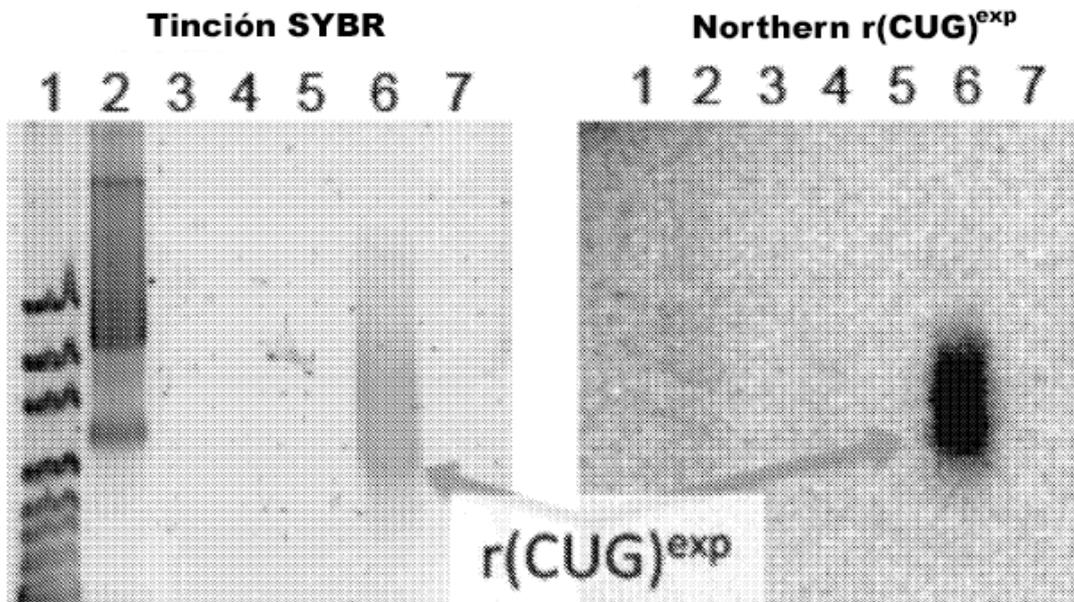
Fig. 5E



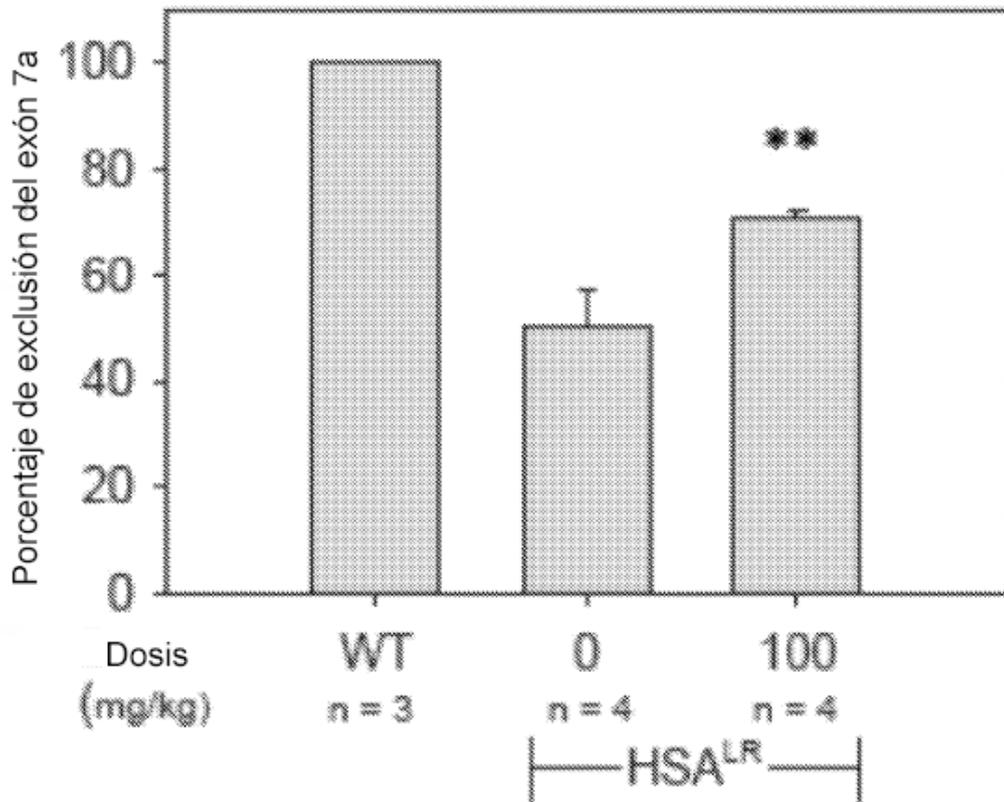
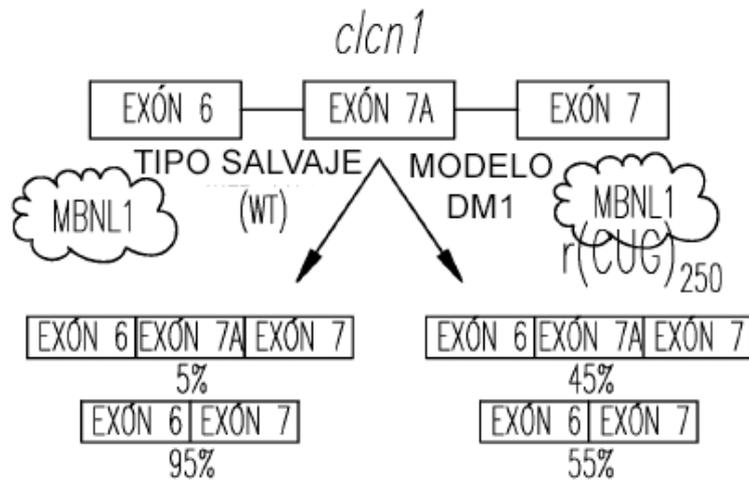
**2H-K4NMe Biotina**



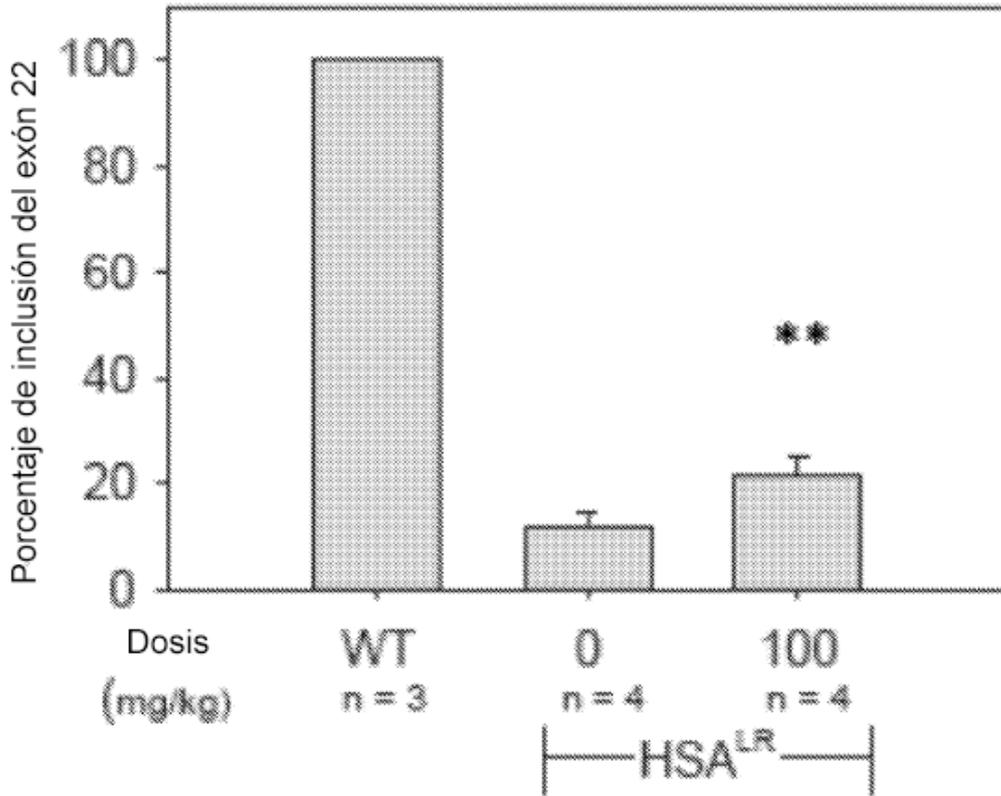
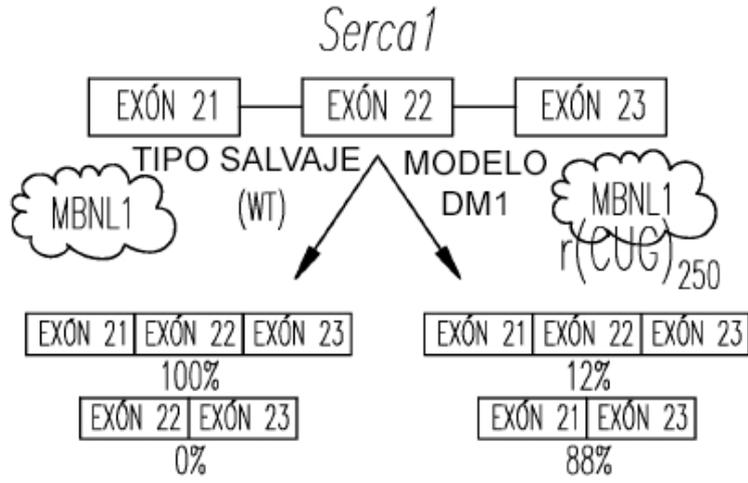
**K4NMe Biotina**



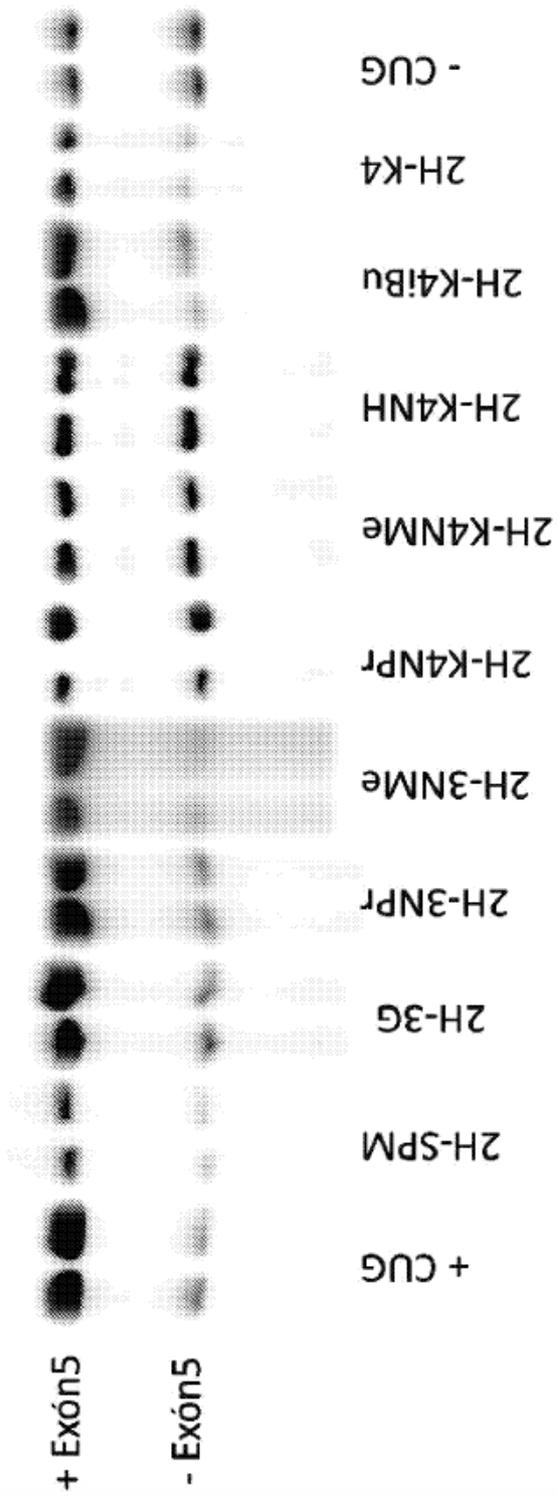
*Fig. 6*



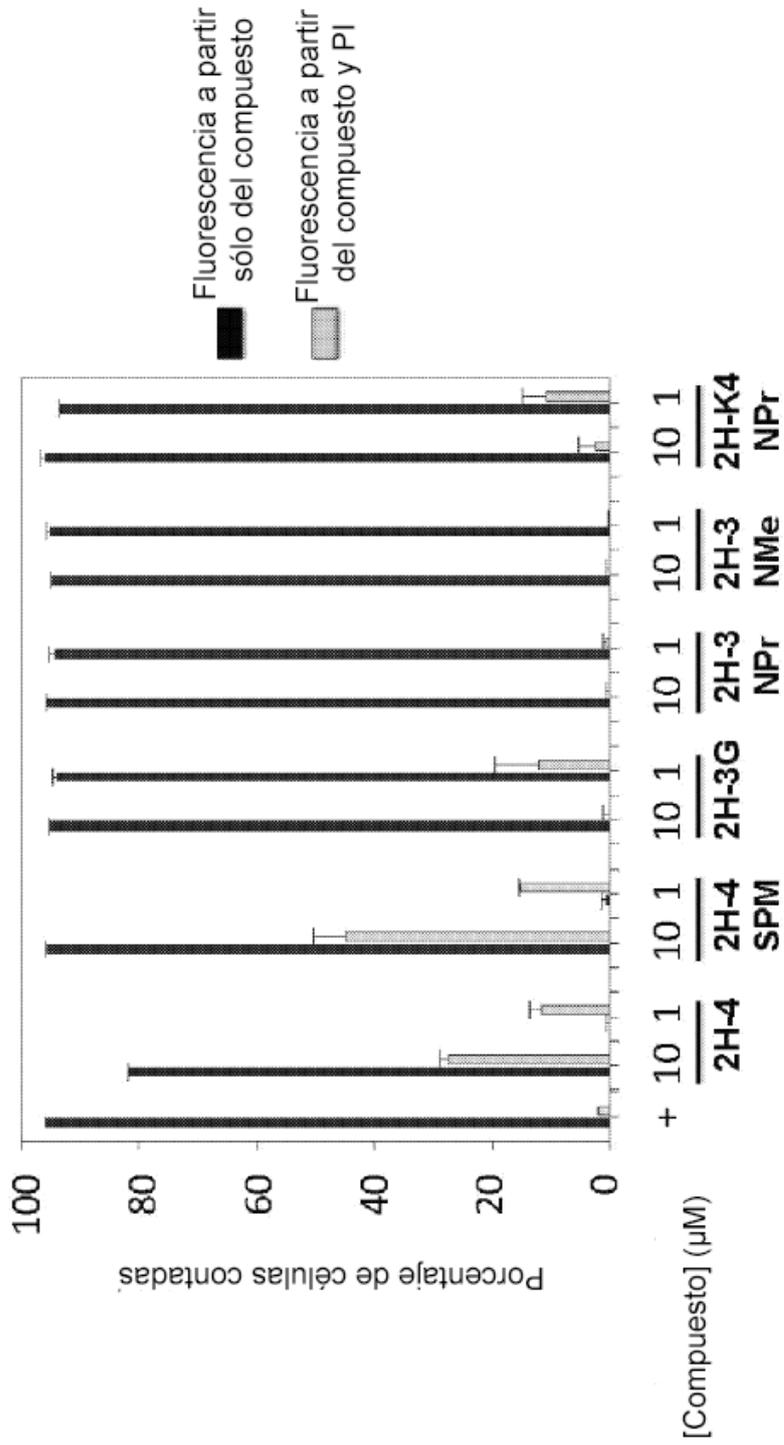
*Fig. 7A*



*Fig. 7B*

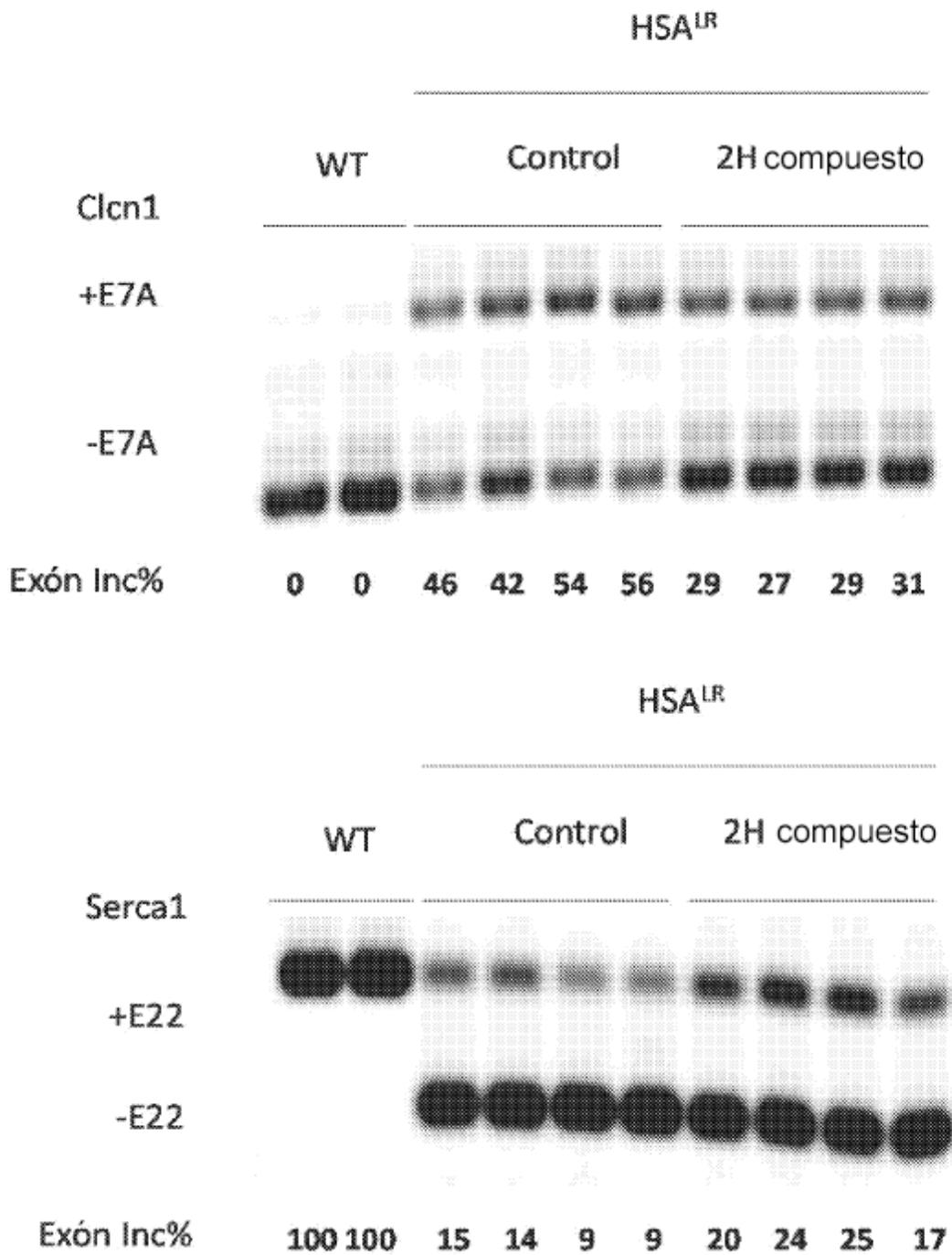


*Fig. 8*



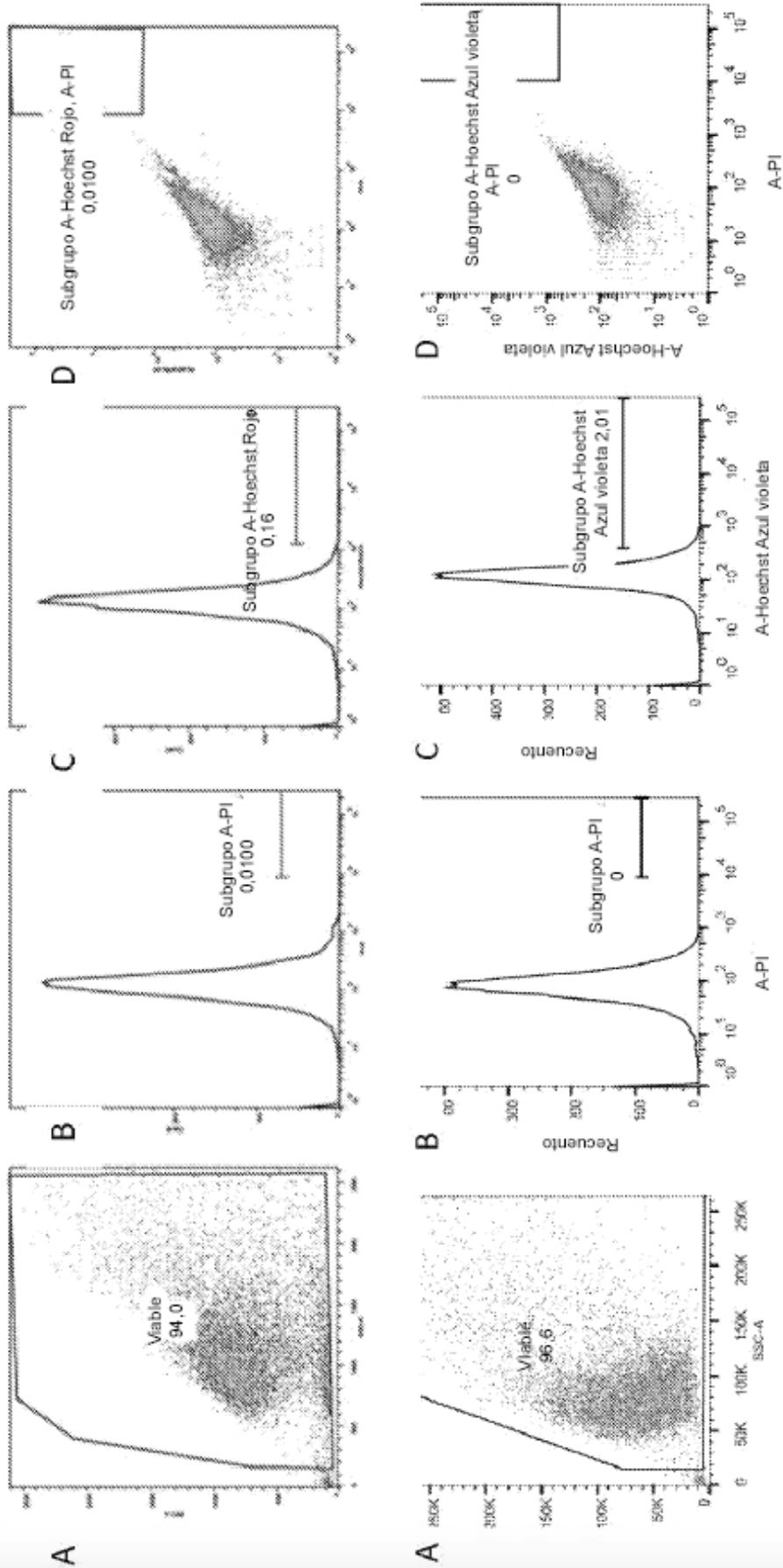
*Fig. 9*





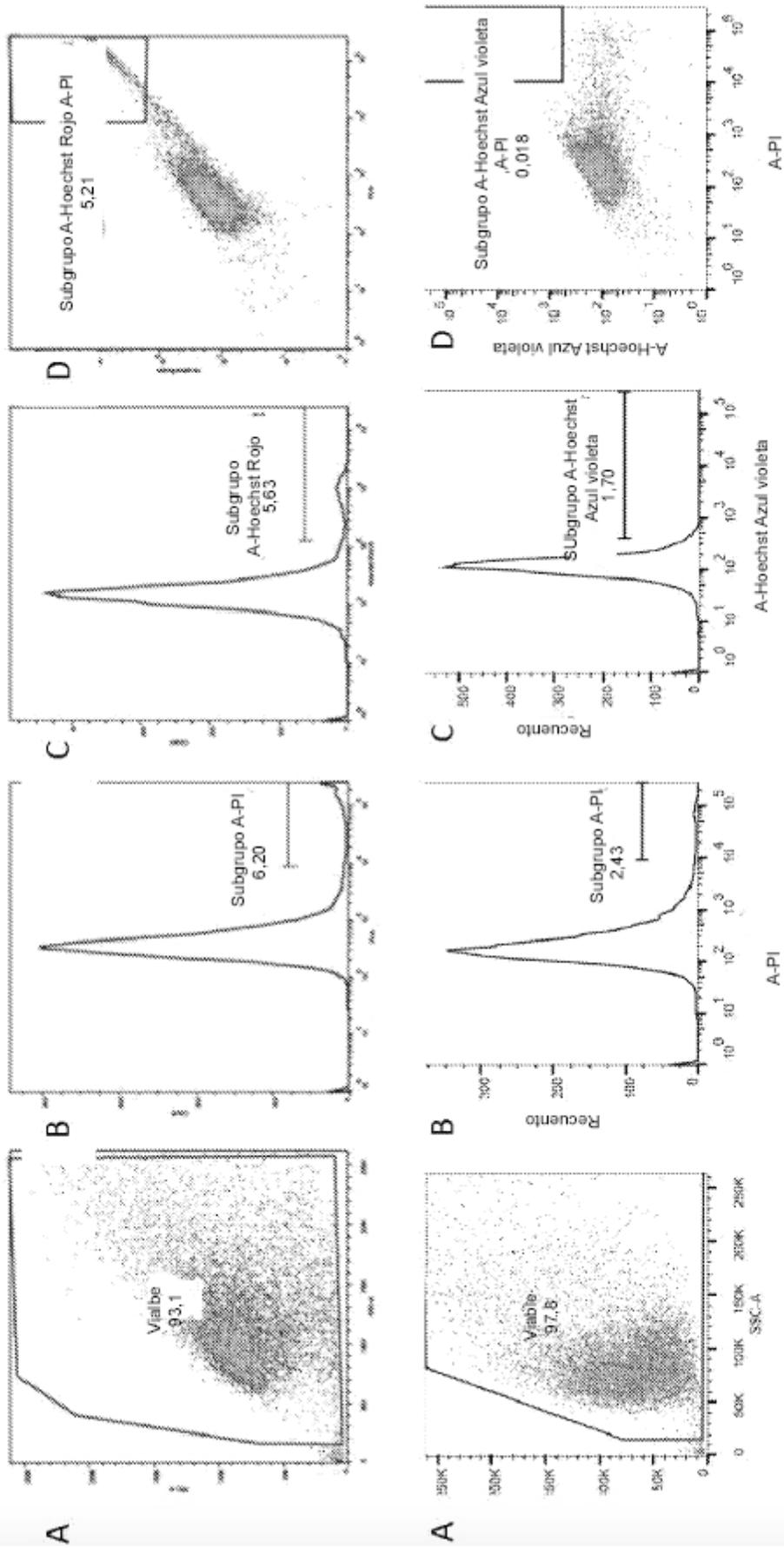
*Fig. 11*

**Células sin teñir y sin tratar**



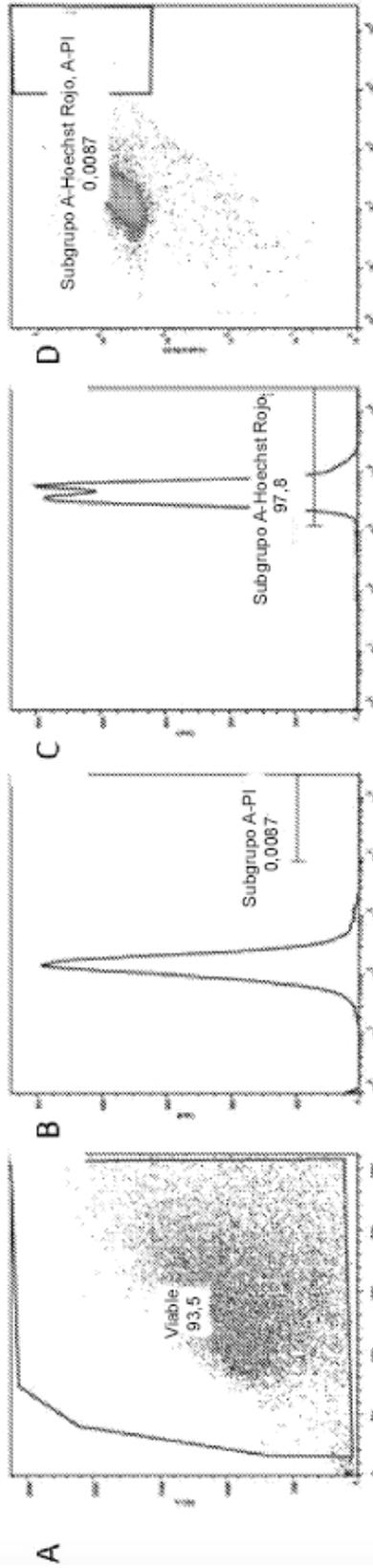
*Fig. 12*

**Células sin tratar teñidas con yoduro de propidio**

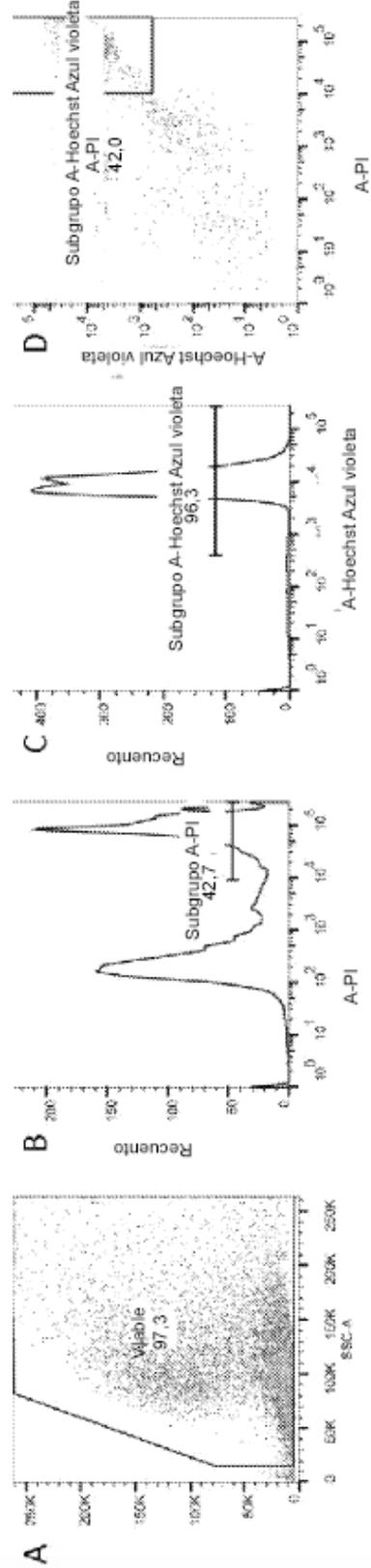


*Fig. 13*

**Células control Hoechst 33258**  
**10  $\mu$ M**

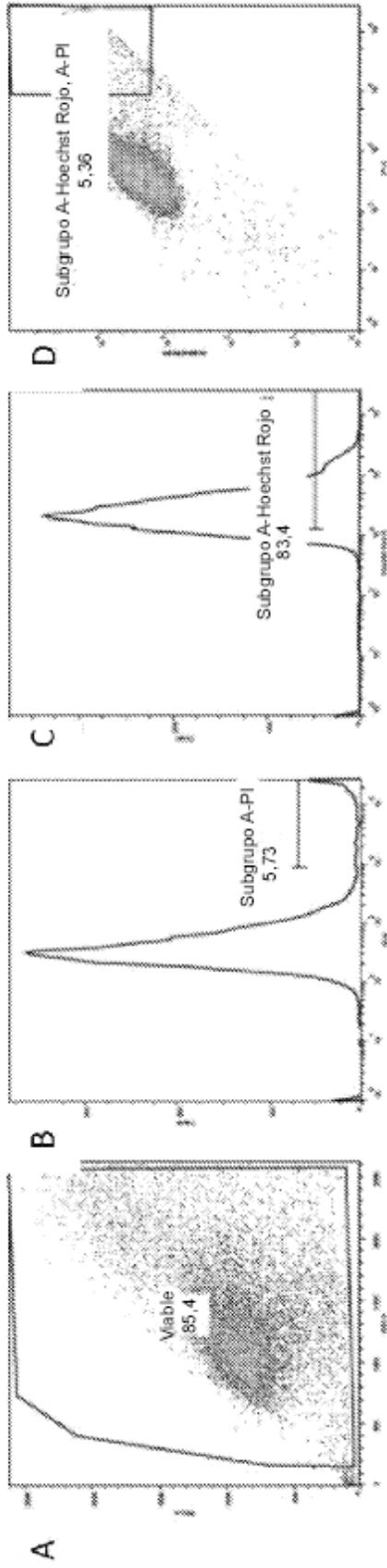


**1  $\mu$ M**

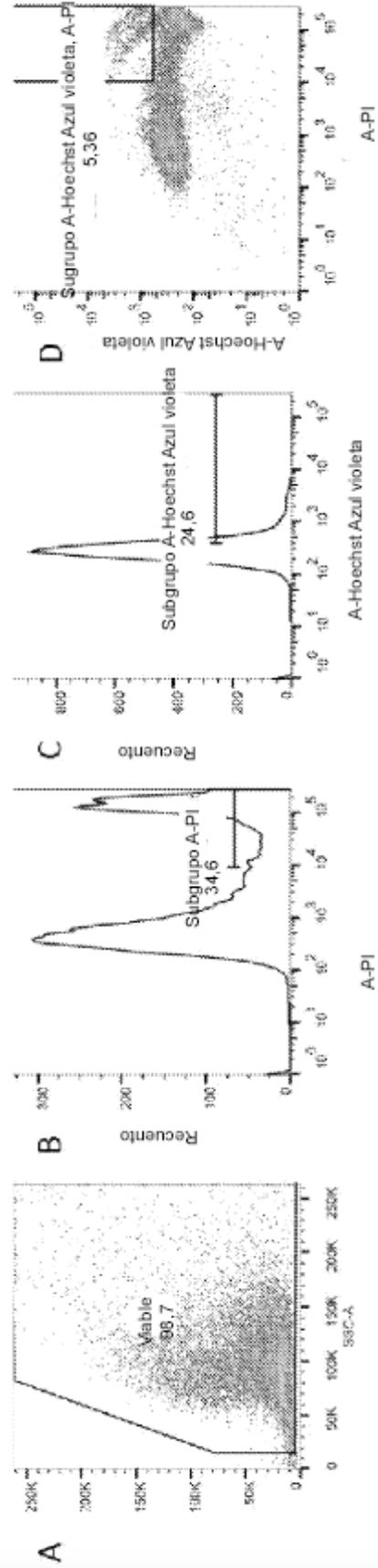


*Fig. 14*

**10  $\mu$ M**



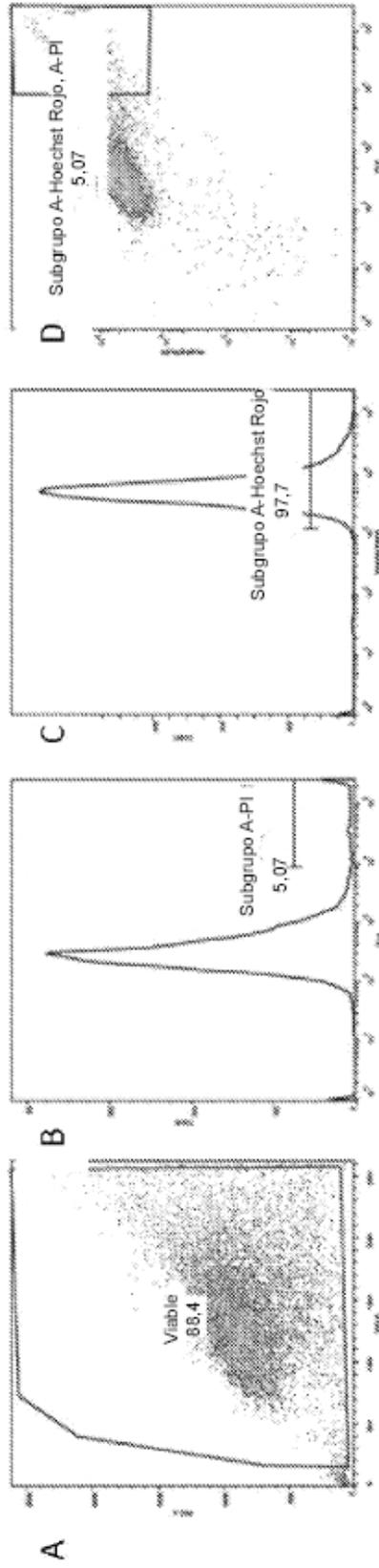
**1  $\mu$ M**



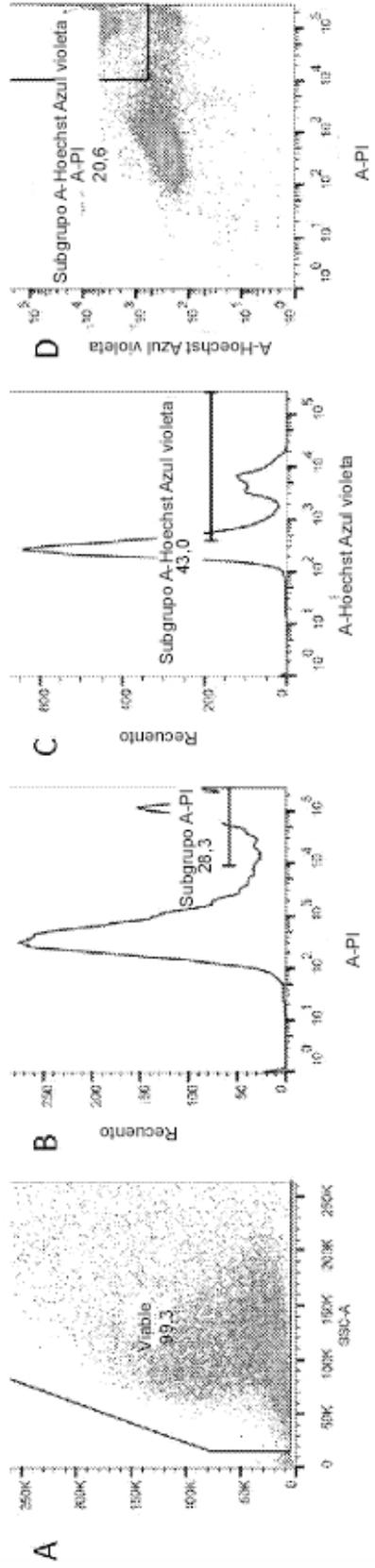
*Fig. 15*

**2H-SPM**

**10  $\mu\text{M}$**



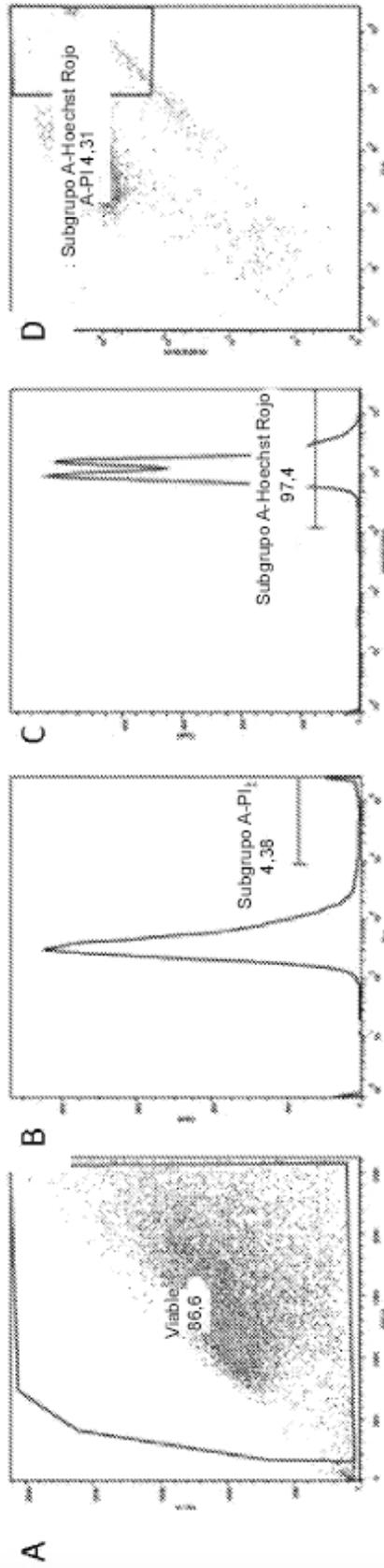
**1  $\mu\text{M}$**



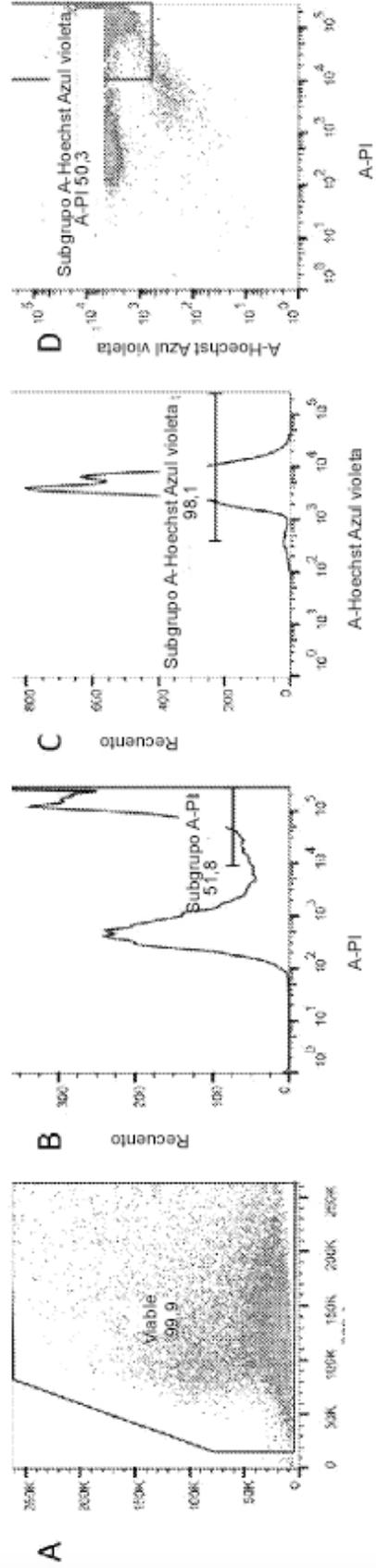
*Fig. 16*

**2H-3G**

**10  $\mu$ M**

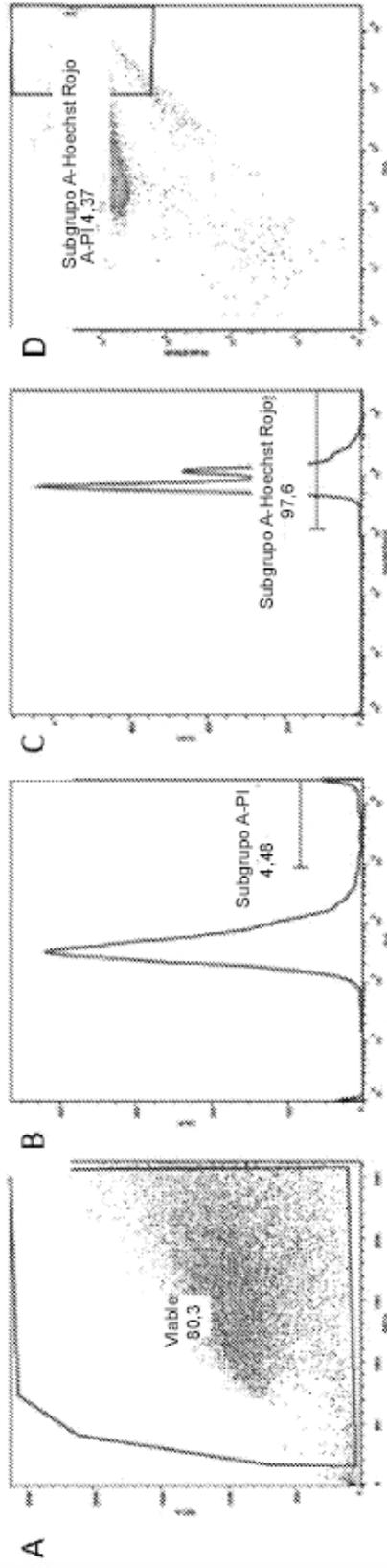


**1  $\mu$ M**

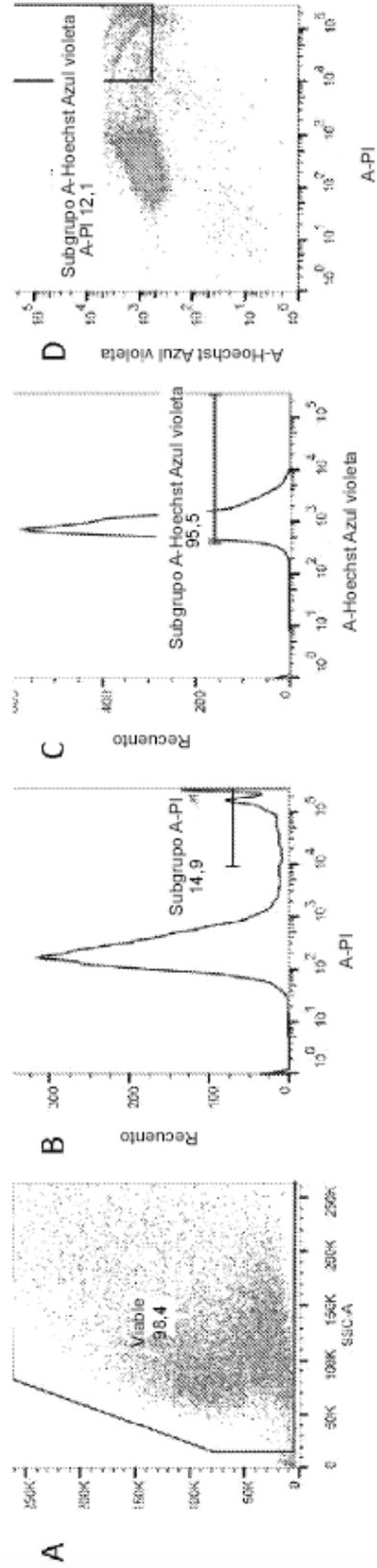


*Fig. 17*

10  $\mu$ M



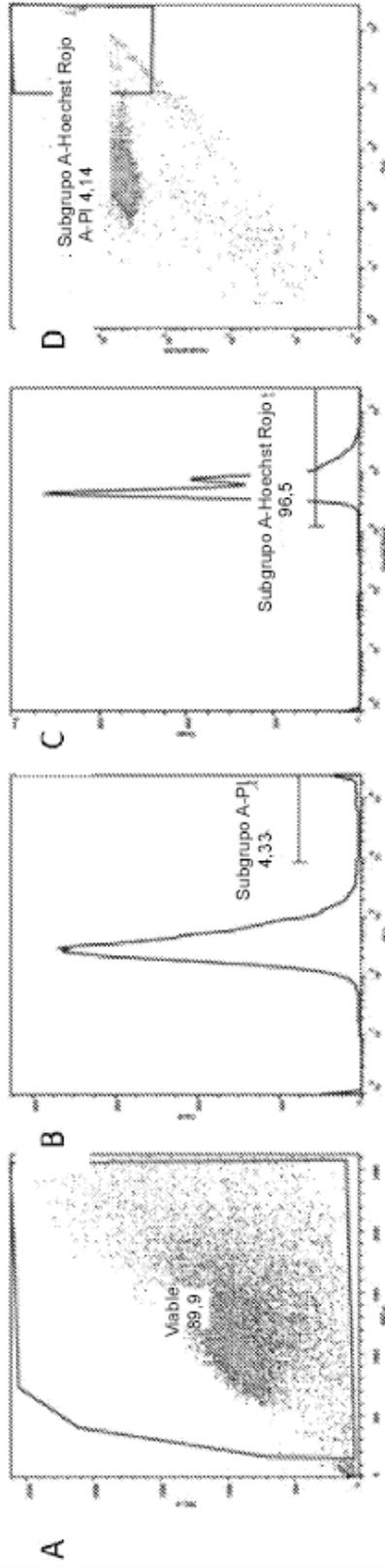
1  $\mu$ M



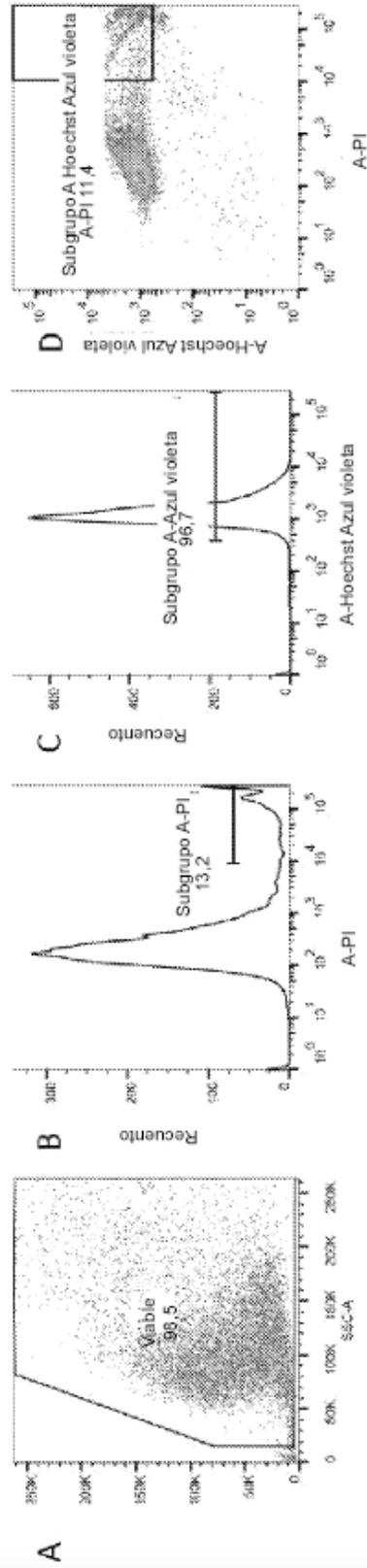
*Fig. 18*

**2H-3NMe**

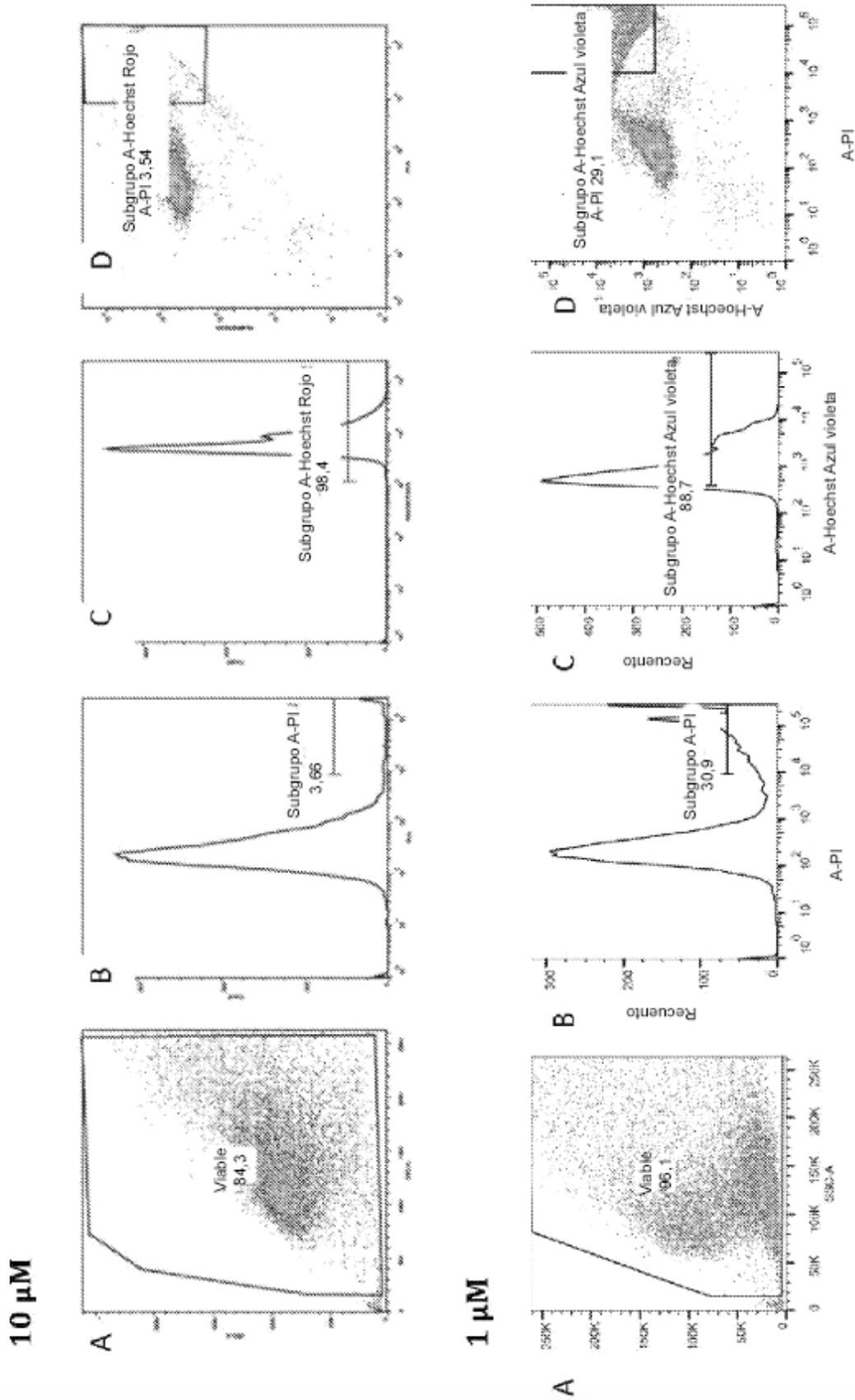
**10  $\mu$ M**



**1  $\mu$ M**



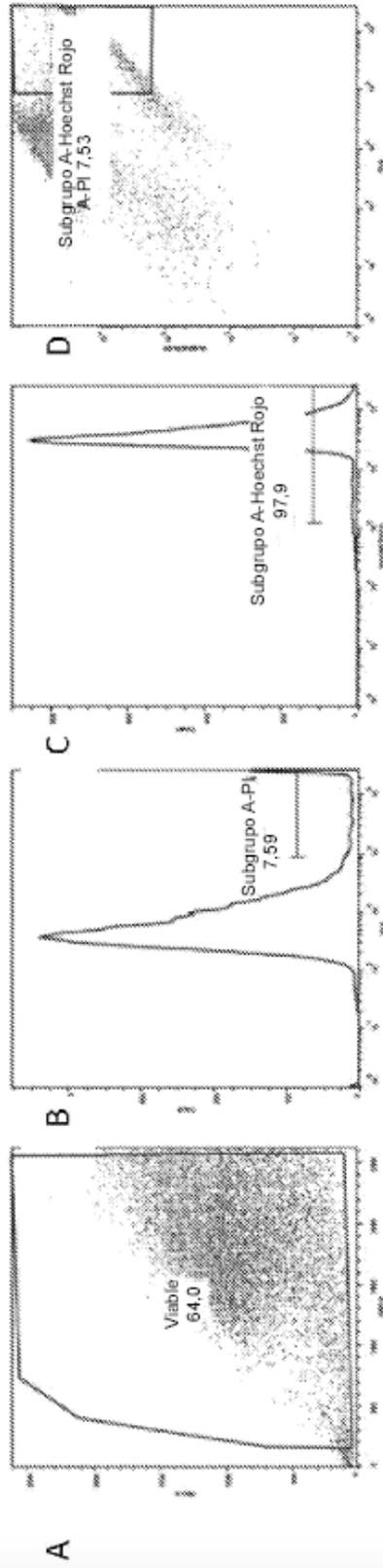
*Fig. 19*



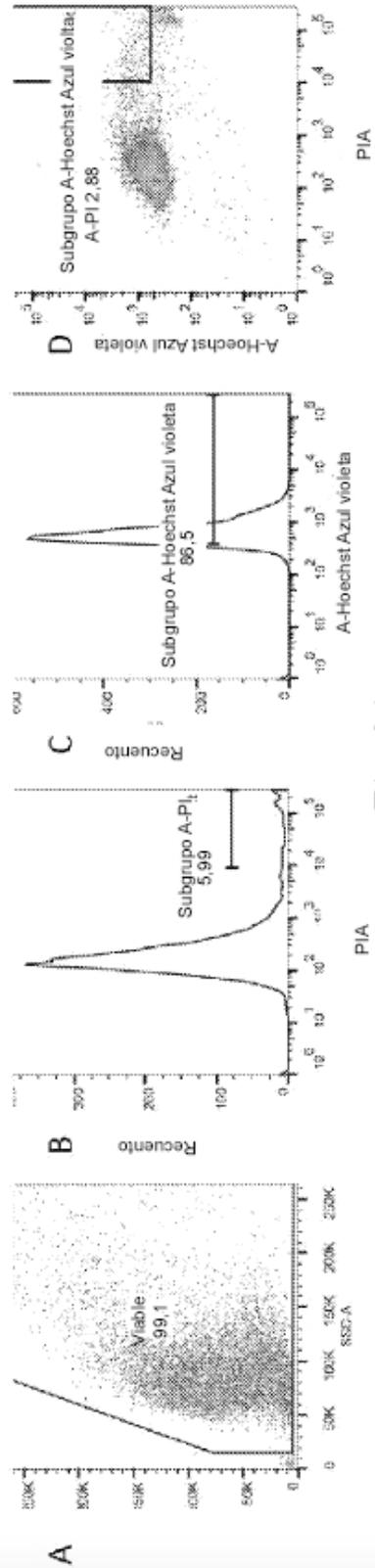
*Fig. 20*

**2H-K4NMe**

**10  $\mu$ M**



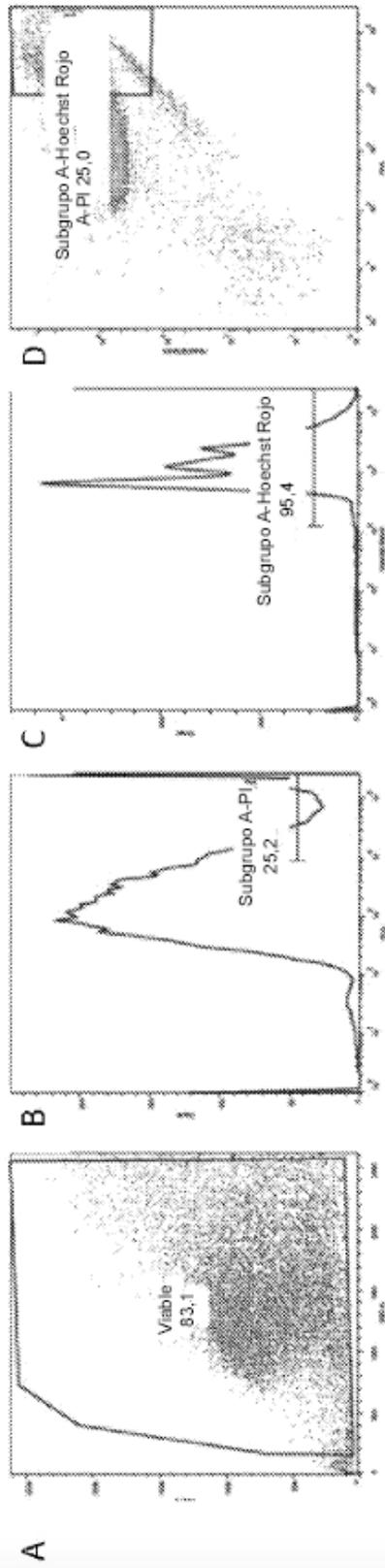
**1  $\mu$ M**



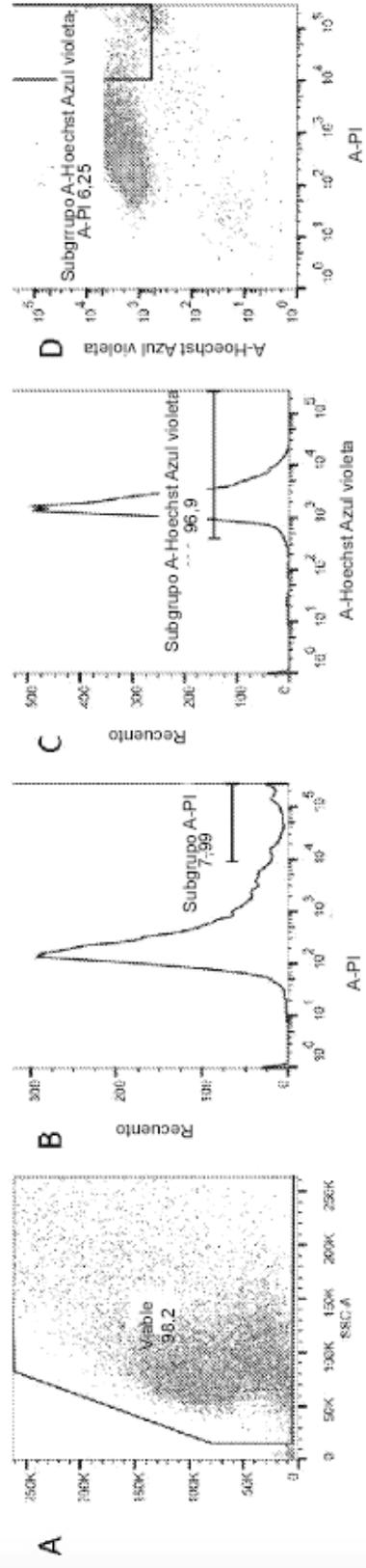
*Fig. 21*

**2H-K4NH**

**10  $\mu$ M**



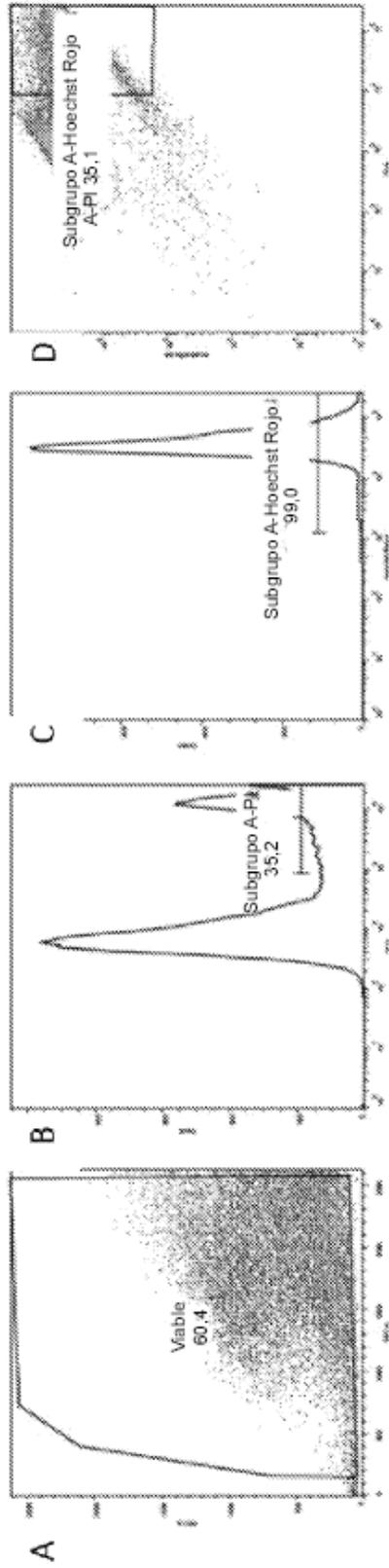
**1  $\mu$ M**



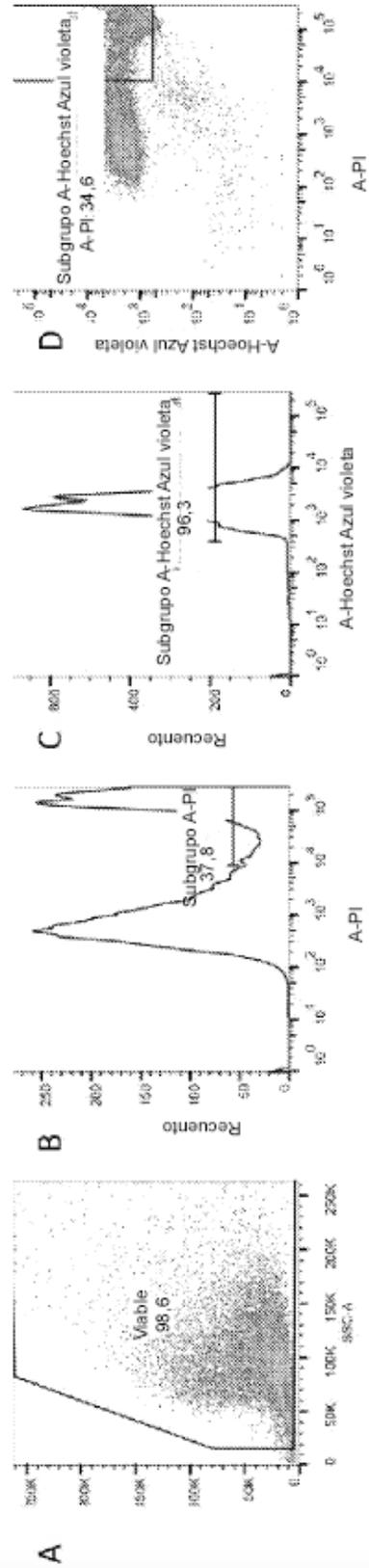
*Fig. 22*

**2H-K4NiBu**

**10  $\mu$ M**



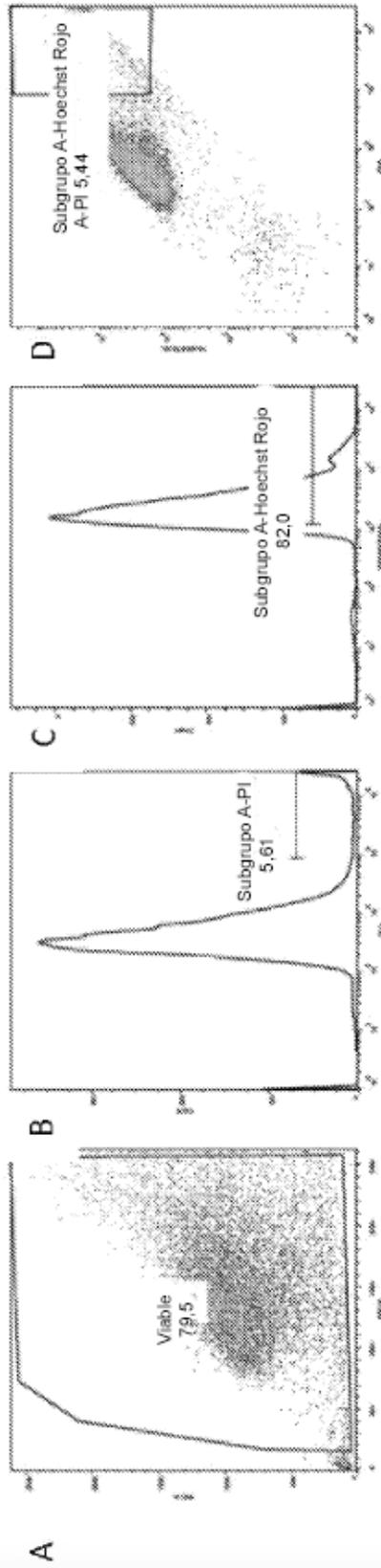
**1  $\mu$ M**



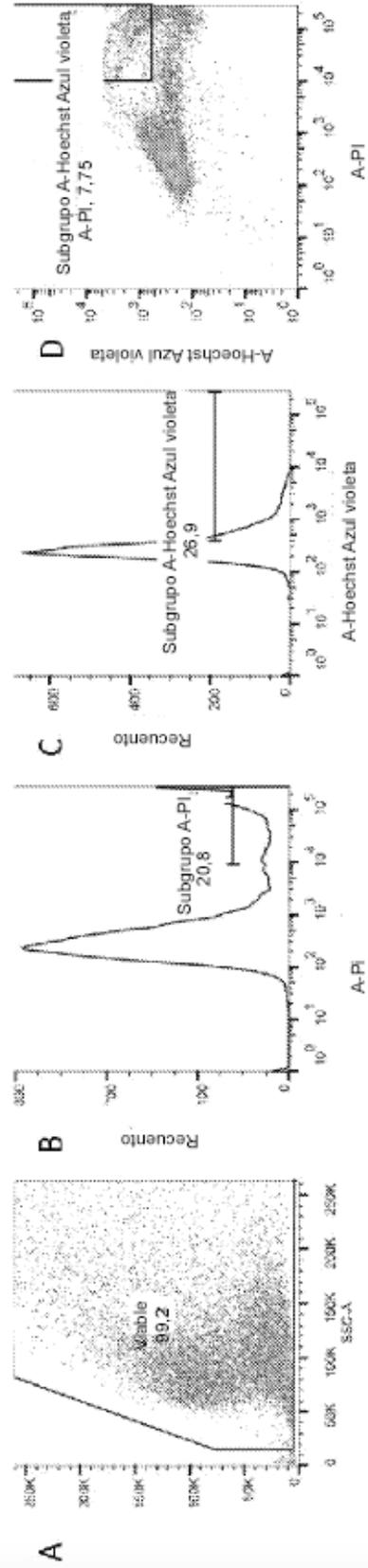
*Fig. 23*

**2H-K4**

**10  $\mu$ M**



**1  $\mu$ M**



*Fig. 24*

