

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 745 504**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

C07H 21/04 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.04.2012 PCT/US2012/032459**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.10.2012 WO12138955**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.04.2012 E 12767656 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2019 EP 2694683**

54 Título: **Ácidos nucleicos peptídicos gamma que contienen miniPEG preorganizados conformacionalmente**

30 Prioridad:

08.04.2011 US 201161516812 P
08.04.2011 US 201161516838 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.03.2020

73 Titular/es:

CARNEGIE MELLON UNIVERSITY (100.0%)
Center for Technology Transfer And Enterprise
Creation, 4615 Forbes Avenue, Suite 302
Pittsburgh, PA 15213, US

72 Inventor/es:

LY, DANITH, H.;
RAPIREDDY, SRINIVAS y
SAHU, BICHISMITA

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 745 504 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

Ácidos nucleicos peptídicos gamma que contienen miniPEG preorganizados conformacionalmente

5 Antecedentes de la invención

Los PNA son una clase de miméticos de ácidos nucleicos en los que la cadena principal de fosfodiéster y azúcar de origen natural se reemplaza con unidades de N-(2-aminoetil) glicina. Ver Nielsen, P. E.; y otros, Science 1991, 254, 1497-1500. Debido a la naturaleza homomorfa de la cadena principal y el enlazador, los PNA pueden hibridarse a ADN y ARN complementarios a través del apareamiento de bases de Watson-Crick normal al igual que los equivalentes naturales, pero con mayor afinidad y selectividad de secuencia. Ver Egholm, M., y otros, Nature 1993, 365, 566-568.

Los PNA también son capaces de invadir secuencias seleccionadas de ADN bicatenario (ADNbc) lo que se atribuye en gran parte a la falta de repulsión electrostática entre el PNA y las cadenas de ADN. Si bien el mecanismo subyacente para la alta selectividad de secuencia de un híbrido de PNA con ADN o ARN no se entiende completamente, los estudios estructurales sugirieron que la hidratación puede desempeñar un papel fundamental en la unión y la selectividad. Por ejemplo, los datos estructurales de rayos X de los dúplex de PNA-ADN y PNA-ARN indican que una molécula de agua une el protón de la amida en la cadena principal con la nucleobase adyacente lo que hace más rígida la cadena principal de los PNA y evita errores de apareamiento de secuencia lo que hace que el error de apareamiento de secuencia tenga menos cabida.

Además de la capacidad de los PNA de hibridarse a ADN o ARN con alta selectividad de secuencia, los estudios bioquímicos indican que los PNA poseen una mayor estabilidad nucleolítica y proteolítica, muy probablemente debido a su cadena principal poco natural que evita o hace más lenta la degradación fisiológica de los PNA por proteasas o nucleasas.

A pesar de las muchas características atractivas que hacen que los PNA sean atractivos como reactivos moleculares para biología, biotecnología y medicina, los PNA tienen algunos inconvenientes en comparación con otras clases de oligonucleótidos. Los PNA tienen una cadena principal de carga neutra como resultado de lo cual los PNA tienen poca solubilidad en agua, tendencia a agregarse y adherirse a las superficies y a adherirse a otras macromoléculas de una manera no específica. Esta propiedad inherente de agregación no específica y adherencia a las superficies presenta un desafío técnico para la manipulación y el procesamiento de los PNA.

Si bien se han realizado esfuerzos considerables para abordar estos problemas, varios de los esfuerzos del estado de la técnica se han centrado en la incorporación de residuos de aminoácidos cargados en los extremos o en el interior de un oligómero de PNA, la inclusión de grupos polares en la cadena principal, el reemplazo del esqueleto de la cadena principal original de amino etilglicilo con un andamio cargado negativamente, la conjugación de polietilenglicol (PEG) de alto peso molecular con uno de los extremos del oligómero, o la fusión de un PNA a un ADN para generar un oligómero quimérico para mejorar la solubilidad en agua. Sin embargo, estas modificaciones químicas a menudo se logran a expensas de la afinidad de unión y/o la especificidad de secuencia.

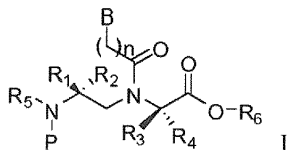
Además, los altos costos asociados con la síntesis de PNA han limitado su incorporación como reactivos de uso habitual en ensayos de diagnóstico, terapia génica y otros ensayos bioquímicos.

45 Resumen de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones anexas. La presente invención aborda los inconvenientes de la tecnología convencional al proporcionar un resto de PNA hidrófilo con propiedades de hibridación, solubilidad en agua y biocompatibilidad mejoradas. Más particularmente, la invención se refiere al diseño, síntesis, y usos de una unidad de PNA (R)-miniPEG hidrófila que tiene una cadena lateral de polietilenglicol (miniPEG o "MP") en el carbono γ de la cadena principal de los PNA.

De acuerdo con una modalidad, por lo tanto, la descripción proporciona un compuesto de acuerdo con la Fórmula I

55



60

En la Fórmula I, B es una base de ácido nucleico seleccionada de adenina, guanina, citosina, timina o uracilo. Cada uno de los grupos sustituyentes R_1 , R_2 y R_5 se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, (C_1-C_8) alquilo lineal o ramificado, (C_2-C_8) alquenilo, (C_2-C_8) alquinilo, (C_1-C_8) hidroxialquilo, (C_3-C_8) arilo, (C_3-C_8) cicloalquilo, (C_3-C_8) aril(C_1-

65

C₆)alquileo, (C₃-C₈)cicloalquil(C₁-C₆)alquileo, -CH₂-(OCH₂-CH₂)_qOP₁, -CH₂-(OCH₂-CH₂)_q-NHP₁, -CH₂-(OCH₂-CH₂-O)_q-SP₁ y -CH₂-(SCH₂-CH₂)_q-SP₁.

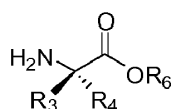
Los sustituyentes R₃ y R₄ son cada uno independientemente H mientras R₆ se selecciona del grupo que consiste en H, (C₁-C₈)alquilo lineal o ramificado, (C₃-C₈)arilo sustituido o no sustituido y (C₃-C₈)aril(C₁-C₆)alquileo.

De acuerdo con la Fórmula I, P se selecciona del grupo que consiste en H, 9-fluorenilmetiloxi carbonilo, Boc, benciloxycarbonilo, tosilato, bencilo, aloc, tritilo, dimetoxitritilo y monometoxitritilo y el sustituyente P₁ se selecciona del grupo que consiste en H, (C₁-C₈)alquilo, (C₂-C₈)alqueno, (C₂-C₈)alquino, (C₃-C₈)arilo, (C₃-C₈)cicloalquilo, (C₃-C₈)aril(C₁-C₆)alquileo y (C₃-C₈)cicloalquil(C₁-C₆)alquileo. Los subíndices n y q son cada uno independientemente números enteros entre 0 y 10 incluidos.

De acuerdo con una modalidad, cada uno de R₁ y R₂ en un compuesto de Fórmula I es independientemente -CH₂-O-(CH₂-CH₂-O)_qP₁. Para algunos compuestos de Fórmula I cada uno de R₁ es -CH₂-(O-CH₂-CH₂)_nOP₁ y R₂ se selecciona del grupo que consiste en H, (C₁-C₈)alquilo lineal o ramificado, (C₂-C₈)alqueno, (C₂-C₈)alquino, (C₁-C₈)hidroxialquilo, (C₃-C₈)arilo, (C₃-C₈)cicloalquilo, (C₃-C₈)aril(C₁-C₆)alquileo, (C₃-C₈)cicloalquil(C₁-C₆)alquileo, -CH₂-(OCH₂-CH₂)_q-NHP₁, -CH₂-(OCH₂-CH₂-O)_q-SP₁ y -CH₂-(SCH₂-CH₂)_q-SP₁. Para ciertos compuestos de Fórmula I R₁ es -CH₂-(O-CH₂-CH₂)_qOP₁, R₂ es H y el sustituyente P₁ es H o (C₁-C₈)alquilo.

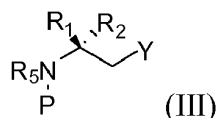
Los compuestos de Fórmula I son quirales. La pureza estereoquímica de un compuesto de Fórmula I está en el intervalo de aproximadamente 80 % a aproximadamente 99 % en la posición Cy. En una modalidad la pureza estereoquímica es al menos 90 % en la posición Cy. De acuerdo con aún otra modalidad la pureza estereoquímica de un compuesto de Fórmula I es al menos 99 % en la posición Cy.

La presente descripción proporciona además un método para preparar un compuesto de acuerdo con la Fórmula I. De acuerdo con el método de la invención, un compuesto de Fórmula II



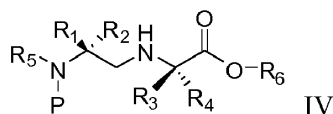
(II)

se pone en contacto con un compuesto de Fórmula III



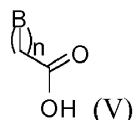
(III)

para obtener un compuesto de acuerdo con la Fórmula IV



IV

El compuesto de Fórmula IV se pone en contacto con un compuesto de acuerdo con la Fórmula V



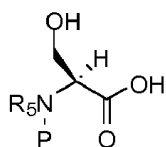
(V)

para proporcionar un compuesto de Fórmula I. Los grupos sustituyentes B, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, P y P₁ se definieron anteriormente. El sustituyente Y en la Fórmula III se selecciona del grupo que consiste en bromo, yodo, 4-toluenosulfonato y metanosulfonato.

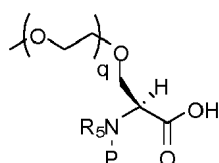
De acuerdo con la metodología de síntesis de la invención, la etapa de poner en contacto un compuesto de Fórmula IV con un compuesto de Fórmula V se efectúa en presencia de un agente de acoplamiento seleccionado del grupo que consiste en diciclohexilcarbodiimida, carbonildiimidazol, hexafluorofosfato de O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N'-

tetrametiluronio (HBTU), hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)tris(dimetilamino)fosfonio (BOP) y hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HATU) en un solvente aprótico polar.

En una modalidad, la presente descripción proporciona un método para sintetizar un compuesto de Fórmula III al ponerlo en contacto



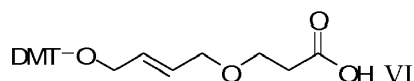
con un grupo $\text{CH}_3-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_q\text{OX}$ para obtener



El grupo de ácido carboxílico del producto polietilenoxi se reduce adicionalmente al alcohol correspondiente; y después se pone en contacto con un reactivo para obtener el compuesto de Fórmula III.

De acuerdo con una modalidad el alcohol se pone en contacto con un reactivo seleccionado del grupo que consiste en cloruro de metanosulfonilo, cloruro de 4-toluenosulfonilo y yoduro de sodio en un solvente aprótico. Cuando el alcohol se pone en contacto con yoduro de sodio la etapa de contacto se efectúa en presencia de un catalizador, tal como cloruro de circonio (IV).

La presente invención proporciona un método para sintetizar un oligómero de ácido nucleico peptídico (PNA) que tiene una secuencia predeterminada, al poner en contacto un soporte sólido con un enlazador alílico de acuerdo con la Fórmula VI



Desproteger el grupo DMT para obtener el alcohol correspondiente que después se pone en contacto con un primer monómero de PNA o un monómero de γ PNA en dependencia de la secuencia del oligómero de PNA. El grupo de ácido carboxílico del primer monómero se activa antes del contacto con la resina que contiene enlazador alílico. Después del acoplamiento del primer residuo de PNA a la resina, desproteger el grupo amino del primer residuo de PNA.

Activar el grupo de ácido carboxílico de un segundo monómero de PNA o monómero de γ PNA específico de secuencia y poner en contacto este PNA con ácido carboxílico activado con el grupo amino del residuo de PNA unido a la resina. Las etapas descritas anteriormente se repiten para sintetizar el oligómero de ácido nucleico peptídico (PNA) que comprende al menos un monómero de γ PNA.

Breve descripción de las figuras

Figura 1 (A) Espectros de CD de PNA5 y PNA2 (*Recuadro*) en función de la temperatura. Transición de fusión (T_m) de PNA2 a 5 como se determina por CD, supervisada a 260 nm. La concentración de oligómero fue 5 μM , preparado en tampón de fosfato de sodio 10 mM a pH 7,4.

La Figura 1 (B) es un gráfico que correlaciona la estabilidad de los oligómeros de PNA con el número de monómeros R -MP- γ PNA de la invención en el oligómero.

Figura 2 Perfiles de fusión UV de dúplex híbridos de (A) PNA-ADN y (B) PNA-ARN a una concentración de cadena de 5 μM cada uno en tampón de fosfato de sodio 10 mM a pH 7,4. Si bien se realizaron tanto los experimentos de calentamiento como de enfriamiento debido a que ambos tienen perfiles casi idénticos solo se muestra la fusión UV para los experimentos de calentamiento.

La Figura 3 ilustra la correlación entre la energía libre de unión de Gibbs (ΔG°) y el número de unidades de miniPEG en los dúplex de PNA-ADN y PNA-ARN.

La Figura 4 ilustra los sensogramas de resonancia de plasmones de superficie (SPR) (líneas negras continuas) y los ajustes (líneas discontinuas) para la hibridación de sondas de PNA a ADN complementario inmovilizado. Las soluciones contenían PNA 30 nM. Las barras de error a $t = 420$ segundos ilustran las desviaciones estándar para tres ensayos separados.

La Figura 5 muestra los espectros fluorescentes de los pares (A) PNA1X/PNA1Y y (B) PNA4X/PNA4Y a diferentes concentraciones. Las muestras se prepararon mediante la mezcla de relaciones equimolares de los oligómeros en tampón de fosfato de sodio 10 mM a pH 7,4. Las muestras se excitaron a 475 nm ($\lambda_{\text{máx}}$ de FITC) y las emisiones se registraron de 480 a 700 nm. Los espectros se normalizaron con respecto a la emisión de FITC.

La Figura 6 ilustra los resultados de un ensayo de cambio en gel no desnaturizante que tenía como objetivo evaluar el grado de unión no específica para un oligómero de PNA no modificado (PNA6) y un oligómero que contiene el monómero R-MP- γ PNA de la invención (PNA10). Se observó una reducción drástica en la intensidad de la banda de ADN con concentraciones crecientes de PNA6.

Descripción detallada de las modalidades preferidas

La presente invención se refiere a una nueva clase de monómeros de γ PNA que contienen MiniPEG preorganizados conformacionalmente, que poseen buena solubilidad en agua, exhiben propiedades de hibridación superiores, biocompatibilidad, pueden invadir fácilmente el ADN bicatenario y estructuras secundarias de ARN, y son capaces de experimentar diversificación química fácil, tal como mediante la introducción de grupos químicos funcionalmente diversos en uno o ambos extremos del monómero de PNA o dentro de la cadena principal de los PNA. Por lo tanto, la invención proporciona compuestos de acuerdo con la Fórmula I, así como la metodología para sintetizar un monómero de γ PNA de Fórmula I y también para sintetizar un monómero de PNA que tiene uno o más monómeros de γ PNA de Fórmula I.

Definiciones

Dentro del contexto de la presente descripción, los términos "miniPEG" o "MP" se usan indistintamente y se refieren a una unidad de polietilenglicol (PEG) individual o un polímero de PEG que comprende de 2-50 monómeros de PEG. De acuerdo con una modalidad, el término miniPEG incluye sin limitación un grupo $-\text{CH}_2-(\text{OCH}_2-\text{CH}_2)_q\text{OP}_1$ donde el subíndice q es un número entero entre 1-50 y P_1 se selecciona del grupo que consiste en H, (C_1-C_8) alquilo, (C_2-C_8) alquenilo, (C_2-C_8) alquinilo, (C_3-C_8) arilo, (C_3-C_8) cicloalquilo, (C_3-C_8) aril (C_1-C_6) alquileo y (C_3-C_8) cicloalquil (C_1-C_6) alquileo. Los ejemplos de unidades de miniPEG incluyen sin limitación los grupos $-\text{CH}_2-(\text{OCH}_2-\text{CH}_2)_{1-45}\text{OH}$, $-\text{CH}_2-(\text{OCH}_2-\text{CH}_2)_{1-40}\text{OH}$, $-\text{CH}_2-(\text{OCH}_2-\text{CH}_2)_{1-35}\text{OH}$, $-\text{CH}_2-(\text{OCH}_2-\text{CH}_2)_{1-30}\text{OH}$, $-\text{CH}_2-(\text{OCH}_2-\text{CH}_2)_{1-25}\text{OH}$, $-\text{CH}_2-(\text{OCH}_2-\text{CH}_2)_{1-20}\text{OH}$, $-\text{CH}_2-(\text{OCH}_2-\text{CH}_2)_{1-15}\text{OH}$, $-\text{CH}_2-(\text{OCH}_2-\text{CH}_2)_{1-10}\text{OH}$, y $-\text{CH}_2-(\text{OCH}_2-\text{CH}_2)_{1-5}\text{OH}$.

Otros ejemplos de la clase miniPEG son los grupos $-\text{CH}_2-(\text{OCH}_2-\text{CH}_2)_{1-45}\text{O}(\text{C}_1-\text{C}_8)$ alquilo, $-\text{CH}_2-(\text{OCH}_2-\text{CH}_2)_{1-40}(\text{C}_1-\text{C}_8)$ alquilo, $-\text{CH}_2-(\text{OCH}_2-\text{CH}_2)_{1-35}\text{O}(\text{C}_1-\text{C}_8)$ alquilo, $-\text{CH}_2-(\text{OCH}_2-\text{CH}_2)_{1-30}\text{O}(\text{C}_1-\text{C}_8)$ alquilo, $-\text{CH}_2-(\text{OCH}_2-\text{CH}_2)_{1-25}\text{O}(\text{C}_1-\text{C}_8)$ alquilo, $-\text{CH}_2-(\text{OCH}_2-\text{CH}_2)_{1-20}\text{O}(\text{C}_1-\text{C}_8)$ alquilo, $-\text{CH}_2-(\text{OCH}_2-\text{CH}_2)_{1-15}\text{O}(\text{C}_1-\text{C}_8)$ alquilo, $-\text{CH}_2-(\text{OCH}_2-\text{CH}_2)_{1-10}\text{O}(\text{C}_1-\text{C}_8)$ alquilo, y $-\text{CH}_2-(\text{OCH}_2-\text{CH}_2)_{1-5}\text{O}(\text{C}_1-\text{C}_8)$ alquilo.

"Alquilo" se refiere a grupos hidrocarbilo cíclicos de cadena lineal o ramificada que incluyen de 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono. Por ejemplo, un alquilo puede tener de 1 a 10 átomos de carbono, 1-8 átomos de carbono, o 1 a 5 átomos de carbono. El alquilo ilustrativo incluye grupos alquilo de cadena lineal como metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo y similares, e incluye además isómeros de cadena ramificada de grupos alquilo de cadena lineal, por ejemplo sin limitación, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_3)$, $-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$, $-\text{C}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_3)$, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$, $-\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_3)$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_3)$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, y similares. Por lo tanto, los grupos alquilo incluyen grupos alquilo primarios, grupos alquilo secundarios y grupos alquilo terciarios.

La frase "alquilo sustituido" se refiere a alquilo sustituido en 1 o más, *por ejemplo*, 1, 2, 3, 4, 5, o incluso 6 posiciones, cuyos sustituyentes están unidos en cualquier átomo disponible para producir un compuesto estable, con una sustitución como se describe en la presente. "Alquilo opcionalmente sustituido" se refiere a alquilo o alquilo sustituido.

Cada uno de los términos "halógeno", "haluro" y "halo" se refiere a -F, -Cl, -Br, o -I.

Los términos "alquileo" y "alquileo sustituido" se refieren a alquilo divalente y alquilo divalente sustituido, respectivamente. Ejemplos de alquileo incluyen sin limitación, etileno ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$). "Alquileo opcionalmente sustituido" se refiere a alquileo o alquileo sustituido.

"Alqueno o alquenilo" se refiere a grupos hidrocarbilo de cadena lineal, ramificada o cíclica que incluyen de 2 a aproximadamente 20 átomos de carbono que tienen uno o más enlaces dobles carbono a carbono, tal como 1 a 3, 1 a 2, o al menos un enlace doble carbono a carbono. "Alqueno sustituido" se refiere a alqueno sustituido en 1 o más, *por ejemplo*, 1, 2, 3, 4, 5, o incluso 6 posiciones, cuyos sustituyentes están unidos en cualquier átomo disponible para producir un compuesto estable, con una sustitución como se describe en la presente. "Alqueno opcionalmente sustituido" se refiere a alqueno o alqueno sustituido.

El término "alquenileno" se refiere a alqueno divalente. Ejemplos de alquenileno incluye sin limitación, etenileno ($-\text{CH}=\text{CH}-$) y todas las formas estereoisoméricas e isoméricas conformacionales del mismo. "Alquenileno sustituido" se refiere a alqueno divalente sustituido. "Alquenileno opcionalmente sustituido" se refiere a alquenileno o alquenileno sustituido.

- 5 "Alquino o "alquinilo" se refiere a un hidrocarburo insaturado de cadena lineal o ramificada que tiene el numero indicado de átomos de carbono y al menos un enlace triple. Ejemplos de un grupo (C₂-C₈)alquinilo incluyen, pero no se limitan a, acetileno, propino, 1-butino, 2-butino, 1-pentino, 2-pentino, 1-hexino, 2-hexino, 3-hexino, 1-heptino, 2-heptino, 3-heptino, 1-octino, 2-octino, 3-octino y 4-octino. Un grupo alquinilo puede ser no sustituido u opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes como se describe en la presente descripción más abajo.
- El término "alquinileno" se refiere a alquino divalente. Ejemplos de alquinileno incluye sin limitación, etinileno, propinileno. "Alquinileno sustituido" se refiere a alquino divalente sustituido.
- 10 El término "alcoxi" se refiere a un grupo -O-alquilo que tiene el numero indicado de átomos de carbono. Por ejemplo, un grupo (C₁-C₈)alcoxi incluye -O-metil (metoxi), -O-etilo (etoxi), -O-propilo (propoxi), -O-isopropilo (isopropoxi), -O-butil (butoxi), -O-sec-butil (sec-butoxi), -O-terc-butil (terc-butoxi), -O-pentilo (pentoxi), -O-isopentilo (isopentoxi), -O-neopentilo (neopentoxi), -O-hexilo (hexiloxi), -O-isohexilo (isohexiloxi) y -O-neohexilo (neohexiloxi).
- 15 El término "hidroxialquilo" se refiere a un grupo (C₁-C₁₀)alquilo en donde uno o más de los átomos de hidrógeno del grupo alquilo se reemplaza con un grupo -OH. Ejemplos de grupos hidroxialquilo incluyen, pero no se limitan a, -CH₂OH, -CH₂CH₂OH, -CH₂CH₂CH₂OH, -CH₂CH₂CH₂CH₂OH, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂OH, y versiones ramificadas de estos.
- 20 El término "éter" o "éter de oxígeno" se refiere a un grupo (C₁-C₁₀)alquilo en donde uno o más de los átomos de carbono del grupo alquilo se reemplaza con un grupo -O-. El término éter incluye compuestos -CH₂-(OCH₂-CH₂)_qOP₁ donde P₁ es un grupo protector, -H, o un (C₁-C₁₀)alquilo. Los éteres ilustrativos incluyen polietilenglicol, dietiléter, metilhexil éter y similares.
- 25 El término "tioéter" se refiere a un grupo (C₁-C₁₀)alquilo en donde uno o más de los átomos de carbono del grupo alquilo se reemplaza con un grupo -S-. El término tioéter incluye compuestos -CH₂-(SCH₂-CH₂)_q-SP₁ donde P₁ es un grupo protector, -H, o un (C₁-C₁₀)alquilo. Los éteres ilustrativos incluyen dimetiltioéter, etilmetiltioéter.
- 30 El término "arilo," solo o en combinación se refiere a un sistema de anillo aromático monocíclico o bicíclico tal como fenilo o naftilo. "Arilo" también incluye sistemas de anillos aromáticos que se fusionan opcionalmente con un anillo cicloalquilo como se define en la presente descripción.
- Un "arilo sustituido" es un arilo que es independientemente sustituido con uno o más sustituyentes unidos en cualquier átomo disponible para producir un compuesto estable, en donde los sustituyentes son como los descritos en la presente descripción. "Arilo opcionalmente sustituido" se refiere a arilo o arilo sustituido.
- 35 "Arileno" denota arilo divalente y "arileno sustituido" se refiere un arilo divalente sustituido. "Arileno opcionalmente sustituido" se refiere a arileno o arileno sustituido.
- 40 El término "heteroátomo" se refiere a N, O y S. Los compuestos inventivos que contienen átomos de N o S se pueden oxidar opcionalmente a los correspondientes compuestos de N-óxido, sulfóxido o sulfona.
- 45 El término "cicloalquilo" se refiere a sistemas de anillos monocíclicos, bicíclicos, tricíclicos o policíclicos, de 3 a 14 miembros, los cuales son saturados, insaturados o aromáticos. El grupo cicloalquilo se puede unir a través de cualquier átomo. Cicloalquilo también contempla anillos fusionados en los que el cicloalquilo se fusiona a un anillo arilo o hetroarilo como se definió anteriormente. Los ejemplos representativos de cicloalquilo incluyen, pero no se limitan a ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo y ciclohexilo. Un grupo de cicloalquilo puede ser no sustituido o opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes como se describe en la presente descripción más abajo.
- 50 El término "cicloalquileno" se refiere a cicloalquilo divalente. El término "opcionalmente sustituido cicloalquileno" se refiere a cicloalquileno que está sustituido con 1 a 3 sustituyentes, *por ejemplo*, 1, 2 o 3 sustituyentes, unidos en cualquier átomo disponible para producir un compuesto estable, en donde los sustituyentes son como los descritos en la presente descripción.
- 55 El término "nitrilo o ciano" se puede usar indistintamente y se refieren a un grupo -CN que está unido a un átomo de carbono de un anillo heteroarilo, anillo arilo y un anillo heterocicloalquilo.
- El término "oxo" se refiere a un átomo =O unido a un resto (C₃-C₈) cíclico saturado o insaturado o un resto (C₁-C₈) acíclico. El átomo =O puede estar unido a un átomo de carbono, azufre y nitrógeno que es parte del resto cíclico o acíclico.
- 60 El término "amina o amino" se refiere a un grupo -NR^dR^e e donde R^dy R^e cada uno independientemente se refiere a un grupo hidrógeno, (C₁-C₈)alquilo, arilo, heteroarilo, heterocicloalquilo, (C₁-C₈)haloalquilo y (C₁-C₆)hidroxialquilo.
- 65 El término "amida" se refiere a un grupo -NR'R"C(O)- en donde R' y R" cada uno independientemente se refiere a un hidrógeno, (C₁-C₈)alquilo, o (C₃-C₆)arilo.

Un "hidroxilo" o "hidroxi" se refiere a un grupo -OH.

El término "(C₃-C₈)aril-(C₁-C₆)alquileo" se refiere a un alquileo divalente en donde uno o más átomos de hidrógeno en el grupo C₁-C₆ alquileo se reemplaza por un grupo (C₃-C₈)arilo. Ejemplos de grupos (C₃-C₈)aril-(C₁-C₆)alquileo incluyen sin limitación 1-fenilbutileno, fenil-2-butileno, 1-fenil-2-metilpropileno, fenilmetileno, fenilpropileno, y naftiletileno.

El término "(C₃-C₈)cicloalquil-(C₁-C₆)alquileo" se refiere a un alquileo divalente en donde uno o más átomos de hidrógeno en el grupo C₁-C₆ alquileo se reemplaza por un grupo (C₃-C₈)cicloalquilo. Ejemplos de grupos (C₃-C₈)cicloalquil-(C₁-C₆)alquileo incluyen sin limitación 1-cicloproilbutileno, cicloproil-2-butileno, ciclopentil-1-fenil-2-metilpropileno, ciclobutilmetileno y ciclohexilpropileno.

Un "ácido nucleico peptídico" se refiere a un mimético de ADN o ARN en el que la cadena principal de fosfodiéster y azúcar del ADN o el ARN se reemplaza por una unidad de N-(2-aminoetil)glicina.

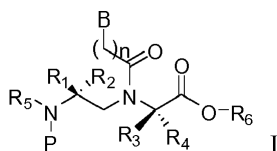
Algunos compuestos descritos aquí pueden tener centros asimétricos y, por lo tanto, existen en diferentes formas enantioméricas y diastereoméricas. Un compuesto de la descripción puede estar en forma de un isómero óptico o un diastereómero. En consecuencia, la invención abarca los compuestos de la invención y sus usos como se describe en la presente descripción en forma de sus isómeros ópticos, diastereoisómeros y mezclas de estos, que incluyen una mezcla racémica. Los isómeros ópticos de los compuestos de la descripción pueden obtenerse mediante técnicas conocidas tales como síntesis asimétrica, cromatografía quiral, tecnología de lecho móvil simulado o mediante separación química de estereoisómeros a través del empleo de agentes de resolución ópticamente activos.

A menos que se indique lo contrario, "estereoisómero" significa un estereoisómero de un compuesto que está sustancialmente libre de otros estereoisómeros de ese compuesto. Por lo tanto, un compuesto estereoméricamente puro que tenga un centro quiral estará sustancialmente libre del enantiómero opuesto del compuesto. Un compuesto estereoméricamente puro que tenga dos centros quirales estará sustancialmente libre de otros diastereómeros del compuesto. Un compuesto estereoméricamente puro típico comprende más de aproximadamente 80 % en peso de un estereoisómero del compuesto y menos de aproximadamente 20 % en peso de otros estereoisómeros del compuesto, por ejemplo mayor que aproximadamente 90 % en peso de un estereoisómero del compuesto y menos de aproximadamente 10 % en peso de los otros estereoisómeros del compuesto, o mayor que aproximadamente 95 % en peso de un estereoisómero del compuesto y menos de aproximadamente 5 % en peso de los otros estereoisómeros del compuesto, o mayor que aproximadamente 97 % en peso de un estereoisómero del compuesto y menos de aproximadamente 3 % en peso de los otros estereoisómeros del compuesto.

Si hay una discrepancia entre una estructura representada y un nombre dado a esa estructura, entonces la estructura representada controla. Además, si la estereoquímica de una estructura o una porción de una estructura no se indica, por ejemplo, en negrita o con líneas discontinuas, la estructura o porción de la estructura debe interpretarse como que abarca todos los estereoisómeros de esta. En algunos casos, sin embargo, donde existe más de un centro quiral, las estructuras y los nombres pueden representarse como enantiómeros individuales para ayudar a describir la estereoquímica relacionada. Los expertos en la técnica de la síntesis orgánica conocerán si los compuestos se preparan como enantiómeros individuales a partir de los métodos usados para prepararlos.

Compuestos

Los monómeros de γ-PNA de la presente descripción son compuestos que contienen etilenglicol preorganizados conformacionalmente de acuerdo con la Fórmula I.



Para los compuestos de Fórmula I, B es una base de ácido nucleico seleccionada de adenina, guanina, citosina, timina o uracilo. Cada uno de los grupos R₁, R₂ y R₅ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, (C₁-C₈)alquilo lineal o ramificado, (C₂-C₈)alqueno, (C₂-C₈)alquino, (C₃-C₈)arilo, (C₃-C₈)cicloalquilo, (C₃-C₈)aril(C₁-C₆)alquileo, (C₃-C₈)cicloalquil(C₁-C₆)alquileo, -CH₂-(OCH₂-CH₂)_qOP1, -CH₂-(OCH₂-CH₂)_qNHP1, -CH₂-(OCH₂-CH₂)_qSP1 y -CH₂-(SCH₂-CH₂)_qSP1. De acuerdo con una modalidad, R₁ y R₂ son cada uno independientemente -CH₂-(OCH₂-CH₂)_qOP1. Por ejemplo, R₁ puede ser un grupo -CH₂-(OCH₂-CH₂)_qOP1 y R₂ puede seleccionarse del grupo que consiste en H, (C₁-C₈)alquilo lineal o ramificado, (C₂-C₈)alqueno, (C₂-C₈)alquino, (C₃-C₈)arilo, (C₃-C₈)cicloalquilo, (C₃-C₈)aril(C₁-C₆)alquileo, (C₃-C₈)cicloalquil(C₁-C₆)alquileo, -CH₂-(OCH₂-CH₂)_qNHP1, -CH₂-(OCH₂-CH₂)_qSP1 y -CH₂-(SCH₂-CH₂)_qSP1. En una modalidad, R₁ es un grupo -CH₂-(OCH₂-CH₂)_qOH y el subíndice q es un número entero entre 1-25 ambos números enteros incluidos, entre 1-20 ambos números enteros incluidos, entre 1-15 ambos números enteros incluidos y entre 1-10 ambos números enteros incluidos.

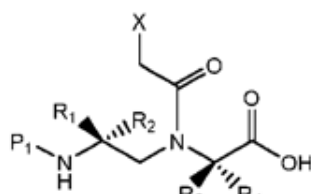
De acuerdo con una modalidad, la presente descripción proporciona compuestos de Fórmula I en los que cada uno de los grupos R_3 y R_4 es independientemente H. Para los compuestos de Fórmula I R_6 se selecciona del grupo que consiste en H, (C_1-C_8) alquilo lineal o ramificado, (C_3-C_8) arilo sustituido o no sustituido y (C_3-C_8) aril (C_1-C_6) alquileno.

El sustituyente P en el grupo amino terminal de un compuesto de Fórmula I puede ser hidrógeno o un grupo protector de amino. Ejemplos de tales grupos protectores incluyen sin limitación un grupo 9-fluorenilmetiloxi carbonilo (Fmoc), *t*-butiloxicarbonilo (Boc), benzhidroxycarbonilo (Bhoc), benziloxicarbonilo (Cbz), O-nitroveratrilo carbonilo (Nvoc), bencilo (Bn), aliloxicarbonilo (aloc), tritilo (Trt), 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxaciclohexilideno)etilo (Dde), diatiasuccinilo (Dts), benzotiazol-2-sulfonilo (Bts), dimetoxitritilo (DMT) y monometoxitritilo (MMT).

Para ciertos compuestos de Fórmula I el sustituyente P_1 se selecciona del grupo que consiste en H, (C_1-C_8) alquilo, (C_2-C_8) alqueno, (C_2-C_8) alquino, (C_3-C_8) arilo, (C_3-C_8) cicloalquilo, (C_3-C_8) aril (C_1-C_6) alquileno y (C_3-C_8) cicloalquil (C_1-C_6) alquileno. Los subíndices n y q en la Fórmula I son independientemente números enteros entre 0 y 50 ambos números enteros incluidos. De acuerdo con una modalidad, el subíndice n es 1 mientras que el subíndice p es un número entero entre 1-45, preferentemente entre 1-40, 1-35, 1-30, 1-25, 1-20, 1-15, o 1-10.

De acuerdo con una modalidad, el compuesto de Fórmula I es como se muestra en el Cuadro 1:

Cuadro 1. Composiciones químicas de las invenciones.



MONÓMEROS

P_1, P_2	P_3	X	R_1, R_2, R_3, R_4
H	CH ₃	Adenina	
Fmoc		Citosina	
Boc		Guanina	---H (R_3 y R_4 solamente)
Cbz		Timina	
Bn		Nucleobases modificadas	$\text{---CH}_2[\text{O}(\text{CH}_2)_2]_{1-10}\text{OP}_3$
Tos		Fluoróforos	
Aloc		Ligandos aromáticos	$\text{---CH}_2[\text{O}(\text{CH}_2)_2]_{1-10}\text{NP}_2$
Trt			
MMT			$\text{---CH}_2[\text{O}(\text{CH}_2)_2]_{1-10}\text{SP}_2$
DMT			

Los compuestos que se ajustan a la Fórmula I son quirales en virtud de la diversidad de grupos sustituyentes en C-y. Un compuesto de Fórmula I estereoméricamente puro típico comprende más de aproximadamente 80 % en peso de un estereoisómero del compuesto y menos de aproximadamente 20 % en peso de otros estereoisómeros del compuesto. De acuerdo con una modalidad, un compuesto de Fórmula I estereoméricamente puro comprende más de aproximadamente 90 % en peso de un estereoisómero del compuesto y menos de aproximadamente 10 % en peso de los otros estereoisómeros del compuesto, o más de aproximadamente 95 % en peso de un estereoisómero del compuesto y menos de aproximadamente 5 % en peso de los otros estereoisómeros del compuesto, o más de aproximadamente 97 % en peso de un estereoisómero del compuesto y menos de aproximadamente 3 % en peso de los otros estereoisómeros del compuesto o más de aproximadamente 99 % en peso de un estereoisómero del compuesto y menos de o igual a aproximadamente 1 % en peso de los otros estereoisómeros respectivamente.

Si bien el MP y las unidades de polietilenglicol (PEG) de peso molecular más grande se han incorporado en una serie de sistemas macromoleculares que incluyen, por ejemplo, péptidos y proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, polímeros sintéticos, dendrímeros, liposomas, y nanopartículas, los presentes inventores descubrieron inesperadamente que la introducción de un grupo dietilenglicol, comúnmente denominado 'miniPEG' o MP, en la cadena principal de PNA mejoró

la solubilidad acuosa, la biocompatibilidad y la especificidad de unión junto con la reducción de la agregación y la unión no específica del PNA.

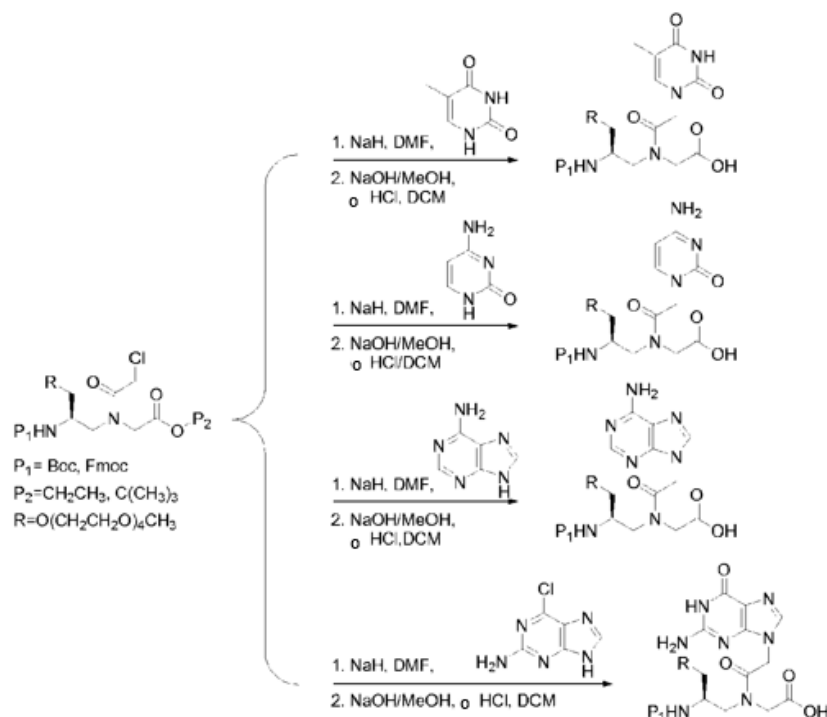
La cadena principal de PNA ofrece una opción de tres sitios (C- α , C- β y C- γ), para introducir un grupo miniPEG (MP). Estudios anteriores de los presentes inventores han indicado que la instalación de un centro quiral en la posición C- γ dentro de la cadena principal de PNA induce la organización helicoidal (helicidad) en el oligómero y proporciona un medio para el ajuste preciso de la estabilidad termodinámica de los PNA. La conformación helicoidal adoptada por un oligómero que contiene monómeros de PNA depende en parte de la estereoquímica de los monómeros de PNA usados. Son posibles dos conformaciones helicoidales, específicamente, una conformación a la derecha y una conformación a la izquierda. Los γ PNA preparados a partir de *L*-aminoácidos adoptan una hélice derecha, mientras que los preparados a partir de *D*-aminoácidos adoptan una hélice izquierda. Sin embargo, los estudios bioanalíticos indican que solo los γ PNA con hélice derecha se hibridan a ADN y ARN con alta afinidad y selectividad de secuencia.

Síntesis

A. Protocolos de síntesis generales

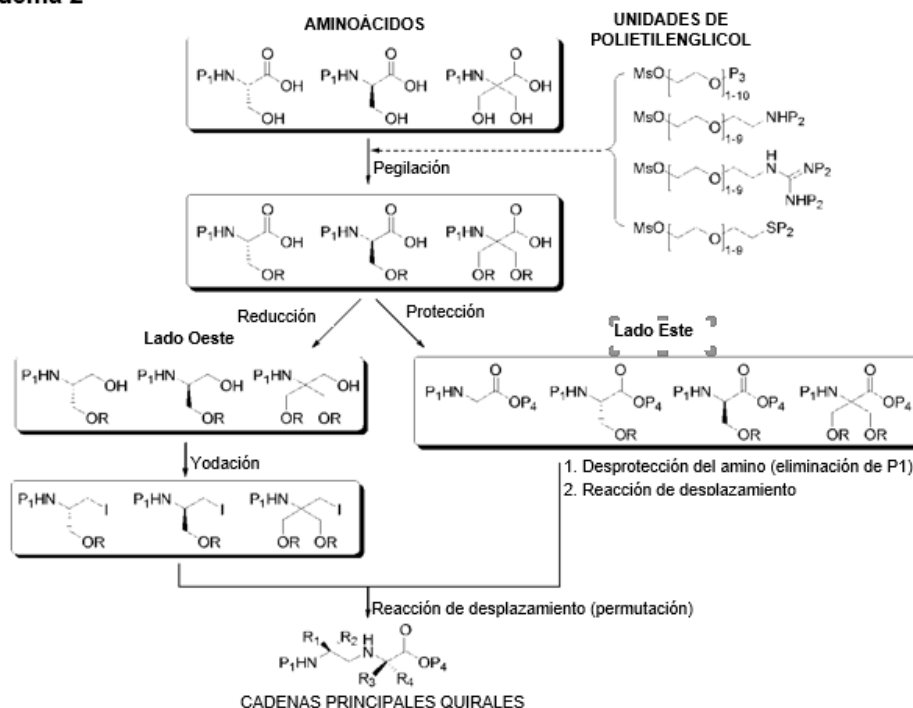
Las rutas tradicionales para sintetizar los PNA han sido tediosas, e involucran la preparación de nucleobases de A, C, y G protegidas, y el uso de productos químicos tóxicos y múltiples etapas para obtener un monómero de PNA protegido ortogonalmente que puede usarse para sintetizar oligómeros con el uso de una resina. Como se ilustra en el Esquema 1, los presentes inventores han desarrollado metodologías de síntesis que no requieren la protección de las nucleobases. En lugar de esto, los monómeros de PNA de acuerdo con la Fórmula I se preparan fácilmente con el uso de nucleobases desprotegidas baratas, disponibles comercialmente, que se acoplan directamente a una cadena principal de γ PNA protegida con Boc o Fmoc.

Esquema 1



Se proporciona además un método eficiente para sintetizar las cadenas principales de PNA protegidas con Boc y/o Fmoc. En comparación con la ruta de síntesis tradicional de Mitsunobu que se usa en la preparación de cadenas principales de PNA, la síntesis de cadenas principales de PNA de acuerdo con los métodos descritos en la presente descripción se realiza en unas pocas etapas simples a partir de aminoácidos protegidos con Boc y Fmoc relativamente baratos y disponibles comercialmente, por ejemplo, alanina, treonina, cisteína, o serina protegidas con Boc o Fmoc de acuerdo con el protocolo (Esquema 2). Como se muestra en este esquema, no es necesaria una purificación por cromatografía en columna complicada para obtener cadenas principales de PNA que tengan la pureza requerida para el acoplamiento a nucleobases desprotegidas.

Esquema 2

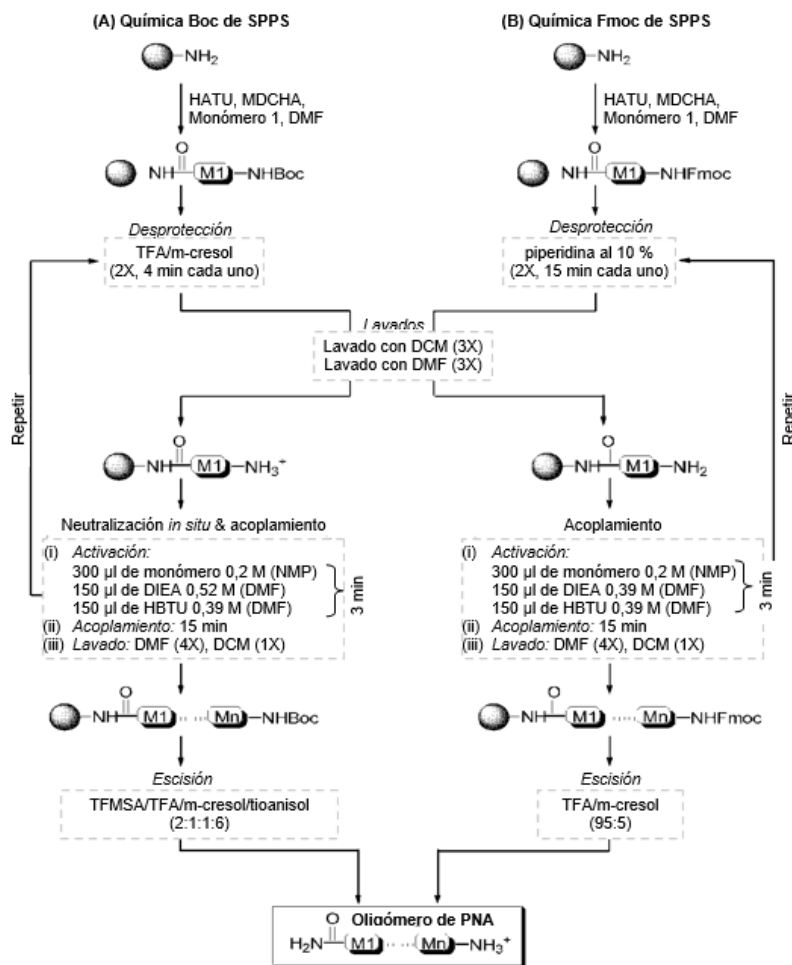


La presente descripción proporciona además una secuencia de reacciones en fase sólida optimizada para sintetizar oligómeros que contienen PNA que es más eficiente y reduce o elimina una serie de etapas peligrosas de transformación química que acompañan habitualmente a la síntesis en fase sólida tradicional (Esquema 3). Las metodologías de síntesis descritas en la presente descripción, han conducido a reducciones significativas de los costos en la producción de monómeros y oligómeros de γ PNA.

El protocolo de síntesis que se ilustra en el Esquema 3 está optimizado para acoplar eficazmente los monómeros de PNA de acuerdo con la Fórmula I a un soporte sólido de resina con reacciones secundarias mínimas (menos de 1 %) o reacciones de entrecruzamiento mínimas entre los grupos amino exocíclicos desprotegidos de la nucleobase de adenina, citosina, o guanina y el grupo carboxilo activado de un monómero de PNA. Debido a que la síntesis en fase sólida de acuerdo con el protocolo usa nucleobases desprotegidas no es necesaria la desprotección de las nucleobases en el producto oligomérico final antes de la escisión del oligómero del soporte sólido. Además, las etapas de neutralización y protección de piridinas necesarias para la síntesis en fase sólida de oligómeros de ADN o ARN con el uso de métodos convencionales se omiten en el presente método sin ningún efecto sobre el rendimiento general o la pureza de los oligómeros de MP- γ PNA finales.

La omisión de estas etapas no solo reduce significativamente el tiempo de síntesis, sino que también reduce los costos de la síntesis de oligómeros y los costos asociados con la eliminación de desechos peligrosos, tales como piridina y anhídrido acético, omitidos del protocolo que se muestra en el Esquema 3.

Esquema 3

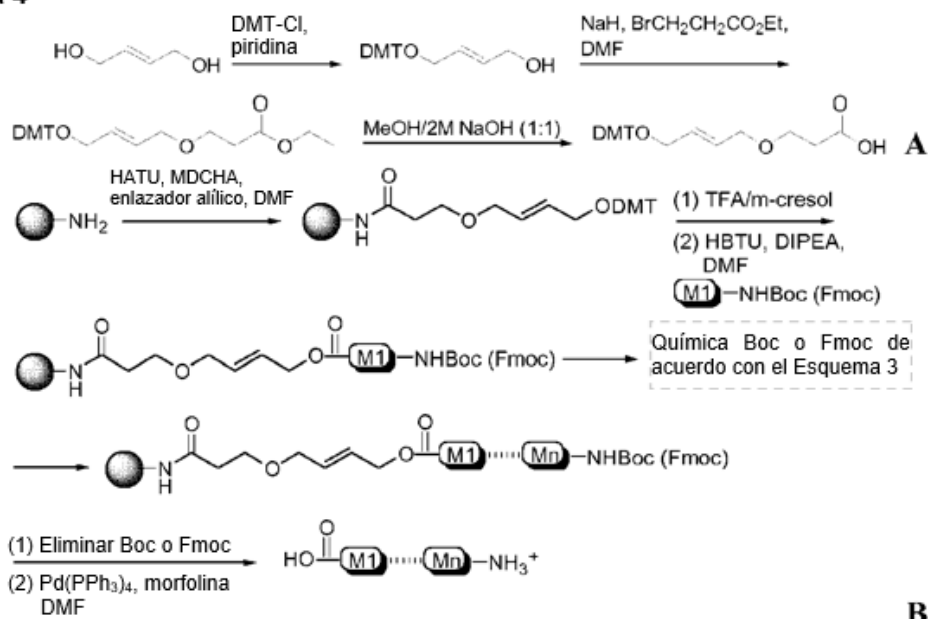


El esquema 3 ilustra una síntesis en fase sólida para monómeros de PNA de Fórmula I con el uso de monómeros de PNA protegidos con Boc (Esquema 3A) y protegidos con Fmoc (Esquema 3B). Como se indicó anteriormente, una ventaja de llevar a cabo la síntesis de oligómeros con el uso de un soporte sólido es que permite la neutralización *in situ* del ion amonio generado por la escisión con ácido trifluoroacético (TFA) del grupo protector Boc. De acuerdo con los presentes inventores la neutralización *in situ* es superior a la secuencia estándar de lavado/neutralización de piridinas usada convencionalmente debido a que mejora el rendimiento general y la pureza de los oligómeros de MP-γPNA.

Otra ventaja del método de síntesis de acuerdo con la presente descripción es el uso en las reacciones de acoplamiento de un monómero de PNA activado con tioéster en el C-terminal. Las rutas de síntesis tradicionales no emplean monómeros de tioéster en el C-terminal para la síntesis debido a la consiguiente esterificación intramolecular y truncamiento del N-terminal. Por el contrario, la síntesis de oligómeros con el uso de un método de acuerdo con la presente descripción no presenta estos inconvenientes. Esto es así debido a que la neutralización del ion amonio se lleva a cabo *in situ* y también debido a que la rigidez de los oligómeros de PNA modificados en γ es mayor que la de sus equivalentes acirales. El aumento de la rigidez del oligómero no favorece la esterificación intramolecular y los productos de truncamiento del N-terminal.

Como se indicó anteriormente, el uso de monómeros de PNA que tienen nucleobases desprotegidas durante la síntesis en fase sólida de un oligómero permite la escisión del producto oligomérico del soporte de resina en condiciones suaves. De acuerdo con una modalidad, los inventores han desarrollado un enlazador alílico novedoso para conectar el primer bloque de construcción de PNA al soporte sólido de resina. Ver el Esquema 4A. La principal ventaja del enlazador alílico es que permite la liberación del oligómero final del soporte sólido en condiciones casi neutras mediante el tratamiento de la resina con tetrakis trifenilfosfina de paladio ($\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$) y cantidad estequiométrica de morfina (Esquema 4B).

Esquema 4



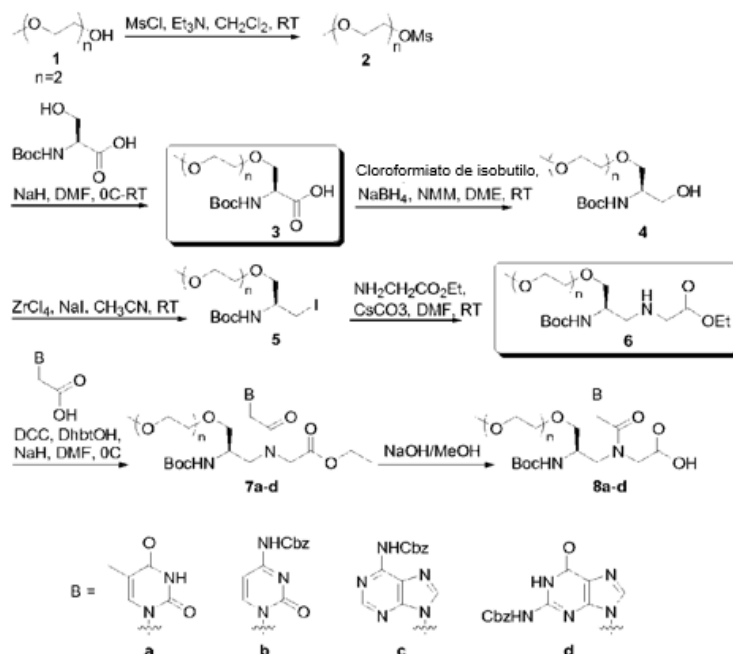
Los oligómeros de PNA son herramientas moleculares importantes en ensayos analíticos y como reactivos terapéuticos y de diagnóstico para el tratamiento y detección de enfermedades genéticas. Muchos ensayos de diagnóstico se basan en la hibridación específica del oligómero de PNA al ADN o ARN monocatenarios o en dúplex. Otros ensayos usan una sonda química unida covalentemente al oligómero de PNA para detectar una macromolécula biológica de interés. Ambos métodos de ensayo se basan en la liberación posterior del híbrido de PNA-ADN o PNA-ARN, o la liberación del complejo de macromolécula biológica y sonda de la superficie sólida para permitir su detección y cuantificación.

Sin embargo, los reactivos usados tradicionalmente para liberar los complejos de PNA del soporte sólido, son fuertes e inadecuados para su uso con muchas muestras biológicas. Los presentes inventores han abordado este problema mediante el desarrollo de un enlazador alílico novedoso para unir oligómeros de PNA a un soporte sólido para facilitar la liberación suave del biocomplejo de PNA formado durante el ensayo en condiciones casi neutras.

B. Síntesis de monómeros de γ PNA específicos

En una modalidad, los monómeros ^{R-MP} γ PNA protegidos con Boc que contienen las cuatro nucleobases naturales (A, C, G, T) se sintetizaron de acuerdo con los procedimientos que se exponen en el Esquema 5.

Esquema 5



Por lo tanto, la alquilación de la *L*-serina (**1**) protegida con Boc con 1-bromo-2-(2-metoxietoxi)etano o 2-(2-metoxietoxi)etano metanosulfonato (**2**) se llevó a cabo de la siguiente manera. A una solución fría vigorosamente agitada de DMF que contenía 2 equivalentes de hidruro de sodio, se le añadió lentamente compuesto (**1**), seguido de la adición de 1-bromo-2-(2-metoxietoxi)etano o 2-(2-metoxietoxi)etano metanosulfonato (**2**). Después de agitar a 0 °C durante 1 hora, la mezcla se inactivó mediante la adición de agua a 0 °C. Los solventes (DMF y agua) se eliminaron a presión reducida a temperatura ambiente. Se añadió agua a la mezcla cruda y el pH se ajustó a ~ 3 con el uso de HCl al 5 %. La solución acuosa se extrajo con acetato de etilo y se secó sobre Na₂SO₄. El producto resultante es serina pegilada protegida con Boc, el compuesto **3**, que se obtiene con alta pureza óptica.

Se determinó que tanto la estequiometría como el orden de adición de los reactivos son importantes para obtener un producto ópticamente puro. La adición lenta de Boc-serina es necesaria para garantizar la desprotonación completa del grupo carboxilo antes de la eliminación del protón hidroxilo. La formación del anión carboxilato reduce la acidez del protón en α lo que lo hace menos susceptible a la desprotonación por base.

La esterificación del producto alquilado (**3**) seguido de la reducción con borohidruro de sodio produce el alcohol correspondiente, serinol (**4**). La conversión del resto de ácido carboxílico en un alcohol hace que el protón del C α sea inerte a la desprotonación y la racemización en las etapas de reacción posteriores. El serinol (**4**) se dejó reaccionar con yoduro de sodio en presencia de cloruro de circonio (IV) (ZrCl₄) como catalizador para obtener el yoduro correspondiente (**5**). El desplazamiento posterior del yoduro por glicinato de etilo produjo la cadena principal de PNA (**6**).

El acoplamiento mediado por diciclohexilcarbodiimida (DCC) de **6** con las carboximetilnucleobases adecuadas (A, C, G, y T), seguido de la hidrólisis del grupo éster resultante proporcionó los monómeros de γ PNA de Fórmula I deseados (**8a-d**).

Las purzas ópticas de los intermediarios fundamentales y los monómeros de γ PNA finales de acuerdo con la Fórmula I se determinaron mediante ¹⁹F-NMR después de la derivatización química como se describe en la bibliografía. Ver Seco y otros, Chem. Rev. 2004, 104, 17-117. La cromatografía de gases acoplada a la detección por espectrometría de masas (GC/MS) se ha descrito en la bibliografía para determinar el exceso enantiomérico (ee) de monómeros de α -PNA quirales y sus oligómeros. Ver Corradini y otros, Tetrahedron: Asymmetry 1999, 10, 2063-2066.

Los presentes inventores descubrieron que la ¹⁹F-NMR es un método alternativo conveniente y exacto para determinar los valores de ee de monómeros de γ PNA de Fórmula I e intermediarios de la síntesis de monómeros de γ PNA. El análisis por ¹⁹F-RMN requirió la eliminación del grupo protector Boc y el acoplamiento posterior del grupo amino libre de un monómero de γ PNA de Fórmula I, un intermediario de la síntesis del monómero de γ PNA con cloruro de (+)-1-metoxi-1-(trifluorometil)fenilacetilo (MTPA-Cl, reactivo de Mosher).

Se usó Boc-*D*-serina como reactivo de partida para sintetizar el estereoisómero de PNA correspondiente (monómero ^S-MPγPNA), que se requiere como control para cuantificar el exceso enantiomérico del monómero ^R-MPγPNA deseado. La inspección del gráfico espectral de ¹⁹F-NMR del monómero ^R-MPγPNA y el monómero ^S-MPγPNA derivatizados con MTPA no reveló residuos del monómero ^S-MPγPNA lo que indica que el compuesto de Fórmula I deseado es ópticamente puro. En base a los datos espectrales se llegó a la conclusión de que el monómero de PNA de Fórmula I deseado tenía una pureza óptica de 99 % de ee dentro del límite de detección de ¹⁹F-NMR.

Si bien el monómero ^R-MPγPNA de timina mostró dos picos de rotámeros a -68,80 y -68,95 ppm en el espectro de NMR, el ^S-MPγPNA de timina correspondiente mostró solamente un rotámero. La existencia de los dos rotámeros para el monómero ^R-MPγPNA de timina no está clara.

Los monómeros de γPNA fabricados de acuerdo con los protocolos de síntesis descritos anteriormente tienen una pureza enantiomérica de al menos 90 % en peso de un estereoisómero del compuesto y menos de aproximadamente 10 % en peso del otro estereoisómero del compuesto, o más de aproximadamente 95 % en peso de un estereoisómero del compuesto y menos de aproximadamente 5 % en peso del otro estereoisómero del compuesto, o más de aproximadamente 97 % en peso de un estereoisómero del compuesto y menos de aproximadamente 3 % en peso del otro estereoisómero del compuesto o más de aproximadamente 99 % en peso del estereoisómero del compuesto y menos de o igual a aproximadamente 1 % en peso del otro estereoisómero respectivamente.

Los monómeros ^R-MPγPNA basados en el andamio de L-alanina se sintetizaron como se describe en Rapireddy y otros, J. Am. Chem. Soc. 2007, 129, 15596-15600 y He y otros, J. Am. Chem. Soc. 2009, 131, 12088-12090.

Si bien los oligómeros de γPNA derivados de L-alanina (^S-AlaγPNA) son capaces de invadir el ADN de forma B de doble hélice (ADN B) de secuencia mixta y son prometedores como reactivos antisentido y antígenos, los ^S-AlaγPNA son poco solubles en agua y tienen una tendencia a agregarse, presumiblemente debido a la cadena principal de carga neutra y al carácter hidrófobo del γ-Me. De acuerdo con una modalidad, por lo tanto, el reemplazo del grupo metilo de la cadena lateral con miniPEG, por ejemplo, una unidad de etilenglicol [(OCH₂CH₂)_n, donde n=1-10] en C-γ da como resultado un monómero de PNA (*R*)miniPEG de acuerdo con la Fórmula I. La introducción del monómero de PNA (*R*)miniPEG en una cadena oligomérica induce una hélice derecha en el oligómero de PNA resultante. Tales oligómeros tienen una solubilidad en agua mejorada y una agregación reducida al tiempo que retienen propiedades de hibridación superiores.

Análisis bioquímico

Para evaluar si un oligómero de PNA que contiene uno o más monómeros de γPNA de acuerdo con la Fórmula I influye en la conformación y las propiedades de hibridación del oligómero de PNA o influye en las propiedades de solubilidad en agua y agregación de un oligómero de PNA, los presentes inventores sintetizaron oligómeros de PNA cuyas secuencias se muestran en la Tabla 1 más abajo.

Tabla 1. Secuencia de oligómeros de PNA

Oligómero	Secuencia	# de Unidades de MP
PNA1	H-GCATGTTTGA-NH ₂	0
PNA2	H-GCATGTTTGA-NH ₂	1
PNA3	H-GCATGTTTGA-NH ₂	3
PNA4	H-GCATGTTTGA-NH ₂	5
PNA5	H-GCATGTTTGA-NH ₂	10
PNA6	H-ACGGGTAGAATAACAT-NH ₂	0
PNA7	H-ACGGGTAGAATAACAT-NH ₂	1
PNA8	H-ACGGGTAGAATAACAT-NH ₂	3
PNA9	H-ACGGGTAGAATAACAT-NH ₂	5
PNA10	H-ACGGGTAGAATAACAT-NH ₂	8
PNA1X	H-L ¹ Orn(X)-L ¹ Lys-GCATGTTTGA-NH ₂	0

PNA1Y	H- ^L Lys-GCATGTTTGA- ^L Orn(Y)-NH ₂	0
PNA4X	H- ^L Orn(X)- ^L Lys-GCATGTTTGA-NH ₂	5
PNA4Y	H- ^L Lys-GCATGTTTGA- ^L Orn(Y)-NH ₂	5
La letra subrayada indica una modificación R-MP-γ-cadena principal. X = fluoresceína (FITC), Y = tetrametilrodamina (TAMRA).		

El primer conjunto de oligómeros (PNA1 a 5), se diseñó para probar los efectos de miniPEG sobre la conformación y las propiedades de hibridación de los PNA. El segundo conjunto de oligómeros (PNA6 a 10), se diseñó para probar el efecto de miniPEG sobre la solubilidad en agua. Se elige una secuencia hexadecamérica para el estudio de la solubilidad acuosa debido a que una secuencia de este tipo representa una longitud estadística que se requeriría para reconocer un sitio único dentro del genoma o transcriptoma de mamíferos. El tercer conjunto incluía dos oligómeros (PNA1 y 4). Cada oligómero en este conjunto se diseñó para probar el efecto de miniPEG sobre la tendencia a la autoagregación de oligómeros que contienen PNA con el uso de la transferencia de energía de resonancia de Forster (FRET). Por lo tanto, los PAN 1 y 4 se unieron por separado a la fluoresceína (FITC) en el N-terminal (PNA1X y PNA4X) y al grupo tetrametilrodamina (TAMRA) en el C-terminal (PNA1Y y PNA4) de cada oligómero. Se introdujo un residuo de lisina en el C-terminal para mejorar la solubilidad en agua y ayudar a la purificación y caracterización de los oligómeros marcados.

Todos los oligómeros de PNA, con y sin cadenas laterales de MP, se sintetizan en soporte sólido de acuerdo con los protocolos descritos en la presente descripción o publicados en la bibliografía. A diferencia de los PNA con modificaciones realizadas en el α de la cadena principal que requieren una optimización adicional de las condiciones de reacción de acoplamiento a la fase sólida de resina para reducir al mínimo la racemización, no son necesarias precauciones ni modificaciones del protocolo de síntesis para el acoplamiento de los monómeros ^{R-MP}γPNA de Fórmula I de la invención en la resina.

Por otra parte, después de acoplar el último monómero el oligómero resultante puede escindirse fácilmente de la resina y precipitarse con etiléter. Los sedimentos secados al aire de los oligómeros crudos se disuelven en una mezcla de agua/acetonitrilo (80/20), y se purifican por HPLC de fase reversa y se caracterizan por espectrometría de masas MALDI-TOF.

1. Efecto de MiniPEG sobre la conformación & la hibridación del oligómero

Los oligómeros PNA1 a 5 se analizaron mediante espectroscopía de CD para determinar el efecto de miniPEG sobre la conformación de oligómeros de PNA. En consistencia con los hallazgos anteriores (Dragulescu-Andrasi, A. y otros; J. Am. Chem. Soc. 2006, 128, 10258-10267), no se observaron señales de CD dentro de las regiones de absorción de las nucleobases para el PNA1 que no contiene un grupo R-MP-γPNA de Fórmula I. Ver la Figura 1A. Esta observación indica que este oligómero de PNA o bien (i) no adopta una conformación helicoidal, o (ii) tiene una proporción equitativa de hélice derecha e izquierda en la muestra analítica.

Sin embargo, los PNA2 a 5 muestran patrones de acoplamiento de excitones característicos en el espectro de CD con dos mínimos característicos a 242 y 280 nm y dos máximos a 220 y 260 nm. El patrón de CD observado es característico de una hélice derecha. Ver la Figura 3B. La adición de unidades de miniPEG no alteró la amplitud de las señales de CD. Sin embargo, la adición de miniPEG altera las longitudes de onda de los máximos y mínimos, desplazándolas hacia las de las dobles hélices de PNA-ADN y PNA-ARN (Figura 3B).

Por otra parte, una caída gradual al mínimo de 242 nm generalmente indica un estrechamiento en el paso helicoidal del oligómero de uno que se asemeja al de un dúplex de PNA-PNA con 18 pares de bases por vuelta a uno que se asemeja al de un dúplex de PNA-ADN con 13 pares de bases por vuelta. En general, los perfiles de CD de PNA2 a 5 son similares a los de los dúplex híbridos de PNA-ADN y PNA-ARN correspondientes (Figura 3B), la diferencia principal en el gráfico de CD es la amplitud que casi se duplica para el dúplex en comparación con la cadena individual de PNA.

Sin atribuirse a una teoría particular, esta duplicación de la amplitud se debe probablemente a la mayor concentración de bases en el dúplex híbrido (aproximadamente el doble de la concentración), que la de la cadena individual de PNA. En conjunto, estos resultados muestran que una unidad de (R)-MP individual, instalada en y de la cadena principal es suficiente para preorganizar el PNA en una hélice derecha.

Si bien la incorporación de unidades de miniPEG adicionales no mejora aún más el apilamiento de bases, como se evidencia a partir de las similitudes en las amplitudes de CD, la presencia de miniPEG adicionales ayuda a estrechar el paso helicoidal de los oligómeros haciéndolos más rígidos y compactos. Esto se evidencia a partir de las mediciones de CD dependientes de la temperatura, que mostraron una reducción menos drástica en la amplitud de la señal en función del cambio de temperatura para el oligómero PNA5 que consiste en diez grupos R-MP-γPNA en comparación con el oligómero PNA2 que tiene un solo grupo R-MP-γPNA (Figura 4). Incluso a una temperatura tan alta como 80 °C, se obtiene

un perfil de CD característico para PNA5, lo que indica que el apilamiento de bases se produce para este oligómero a una temperatura de 80 °C. Por el contrario, PNA2 está completamente desnaturalizado a esta temperatura.

Por lo tanto, la estabilidad general de los oligómeros aumenta de manera lineal con el número de unidades de MP incorporadas (Figura 1B). El hecho de que PNA5 adopte una conformación helicoidal que se asemeja más a la de un dúplex de PNA-ADN o uno de PNA-ARN sugiere que puede hibridarse con ADN y ARN de manera más eficaz que los otros oligómeros en esta serie.

2. Efecto de MiniPEG sobre la estabilidad térmica de los oligómeros

Se realizaron experimentos de fusión UV para determinar el efecto de MP sobre la estabilidad térmica de los oligómeros de PNA después de la hibridación a un ADN o un ARN. La Figura 3A ilustra que la incorporación de una sola cadena lateral de miniPEG estabilizó un dúplex de PNA-ADN en 4 °C. El grado de estabilización térmica aumentó gradualmente con unidades de miniPEG adicionales. Sin embargo, el aumento en la estabilidad térmica se reduce a un valor de aproximadamente 2,3 °C por unidad para el oligómero completamente modificado, es decir un oligómero compuesto por grupos *R*-MP- γ PNA solamente (por ejemplo, PNA5).

Se observa un patrón similar para un dúplex de *R*-MP- γ PNA-ARN, pero el aumento observado en la estabilidad térmica es menor para un dúplex de *R*-MP- γ PNA-ARN en comparación con un dúplex de *R*-MP- γ PNA-ADN (Figura 3B). La mejora en la estabilidad térmica de un dúplex de *R*-MP- γ PNA-ARN es solo 3 °C para el primer monómero *R*-MP- γ PNA que se incorpora en el oligómero de PNA y esta ganancia en estabilidad térmica se reduce a aproximadamente 1,2 °C por monómero *R*-MP- γ PNA para un oligómero compuesto en su totalidad por *R*-MP- γ PNA (PNA5). Por el contrario la ganancia en estabilidad térmica es de aproximadamente 2,3 °C/unidad para los dúplex de *R*-MP- γ PNA-ADN.

Se observó además que si bien el PNA1 no modificado se une más estrechamente al ARN que al ADN (T_m diferencial (ΔT_m) de 10 °C), el PNA5 completamente modificado con miniPEG mostró una estabilidad térmica idéntica tanto con ARN como con ADN. La aparente falta de unión preferencial mostrada por PNA5 no se entiende claramente pero puede deberse a la rigidez de la cadena principal del oligómero PNA5.

Sin estar vinculados a una teoría particular, los presentes inventores creen que debido a que PNA5 es más rígido y estrechamente enrollado en comparación con PNA1 la cadena principal rígida limita la libertad conformacional necesaria para adaptarse a las cadenas plantilla de ADN y/o ARN. En tales circunstancias, las cadenas de ADN y ARN que participan en la hibridación se ven obligadas a experimentar un cambio conformacional necesario para adaptarse a la hélice de *R*-MP- γ PNA. La hipótesis anterior proporciona una explicación de por qué un *S*-Ala- γ PNA-ADN prefiere una hélice de forma P, una estructura helicoidal que es intermedia entre el ADN de forma A y B. También está claro que la hibridación de un *R*-MP- γ PNA a ADN y ARN requiere que los restos de ADN y ARN se alteren conformacionalmente para adaptarse a las exigencias de γ PNA en lugar de lo contrario.

Debido a que la cadena de ARN se adapta menos a los cambios conformacionales, su hibridación a un oligómero *R*-MP- γ PNA completamente modificado es menos fácil que la hibridación de un ADN al oligómero de *R*-MP- γ PNA completamente modificado.

A partir del análisis de van't Hoff se obtuvieron conocimientos adicionales relacionados con la contribución de miniPEG a la estabilidad del dúplex de PNA-ADN. Los datos en la Tabla 2 muestran los parámetros termodinámicos asociados con la hibridación de PNA1 a 5 a una cadena complementaria de ADN o ARN.

Tabla 2: Parámetros termodinámicos para dúplex de PNA-ADN y PNA-ARN

Oligo	PNA-ADN [†]				PNA-ARN [‡]			
	$-\Delta H^\circ$ (kJ/mol)	$-T\Delta S^\circ$ (kJ/mol)	$-AG^\circ$ (kJ/mol)	K_d	$-\Delta H^\circ$ (kJ/mol)	$-T\Delta S^\circ$ (kJ/mol)	$-\Delta G^\circ$ (kJ/mol)	K_d
PNA1	273±5	224±5	49±1*	$2,5 \times 10^{-9}$	289	229	60	$3,5 \times 10^{-11}$
PNA2	319±18	263±16	54±1	$3,2 \times 10^{-10}$	333	232	68	$1,2 \times 10^{-12}$
PNA3	316±11	256±11	59±1*	$5,1 \times 10^{-11}$	350	280	71	$4,3 \times 10^{-13}$
PNA4	329±14	265±12	65±1	$3,5 \times 10^{-12}$	356	283	73	$1,7 \times 10^{-13}$
PNA5	372±11	294±10	78±2	$4,6 \times 10^{-14}$	365	287	78	$2,1 \times 10^{-14}$

[†]Los promedios de tres ensayos (2 de mediciones de dependencia de la concentración + 1 de ajuste de la curva de fusión UV). [‡]Ajuste de la curva de fusión UV. *La desviación estándar es menor que 1 kJ/mol. Temperatura = 298 K.

Los resultados muestran que la energía libre de unión de Gibbs (ΔG°) aumenta de manera aproximadamente lineal con el aumento del número de unidades de miniPEG para los dúplex de PNA-ADN, mientras que el aumento en ΔG° es sigmoidal para los dúplex de PNA-ARN (Figuras 3A y 3B).

La incorporación de una sola unidad de miniPEG da como resultado una ganancia neta en la energía libre de unión de aproximadamente 5 kJ/mol para el dúplex de PNA-ADN y es menor que 5 KJ/mol para un dúplex de PNA-ARN. La ganancia en la energía libre de unión, por otra parte, no se correlaciona de manera lineal con el número de monómeros $R\text{-MP}\gamma\text{PNA}$ en el oligómero de PNA. En lugar de esto, la mayor parte de la ganancia neta en la energía libre de unión proviene de los dos primeros monómeros $R\text{-MP}\gamma\text{PNA}$ y disminuye a medida que más monómeros $R\text{-MP}\gamma\text{PNA}$ se introducen en el oligómero de PNA del dúplex de PNA-ARN. Además, se observó una reducción en la constante de equilibrio de disociación (K_d) en casi cinco órdenes de magnitud para un dúplex de PNA5-ADN mientras que se observó una disminución de aproximadamente tres órdenes de magnitud para PNA5-ARN en comparación con los dúplex de PNA1-ADN y PNA1-ARN.

Se cree que la ganancia de energía libre de unión se debe predominantemente a contribuciones entálpicas para los dúplex de PNA-ADN y PNA-ARN como se muestra por el aumento gradual en el término ΔH° con el número de unidades de miniPEG presentes en el PNA. La confirmación adicional de que la ganancia en la energía libre de unión se debe predominantemente a contribuciones entálpicas se deriva de la observación de que los PNA monocatenarios adoptan una forma globular compacta, presumiblemente para reducir al mínimo la exposición del núcleo hidrófobo de nucleobases y la cadena principal de carga neutra al solvente acuoso. Se deduce, por lo tanto, que se incurriría en una penalización entálpica para desplegar el PNA colapsado (globular) para que este adopte la estructura helicoidal necesaria para participar en la hibridación a un ADN o ARN complementario. La eliminación de esta penalización mediante la inducción de una estructura helicoidal a través del uso del $\gamma\text{-PNA}$ modificado con miniPEG de acuerdo con la Fórmula I se traduciría en un cambio entálpico más favorable durante la hibridación. Ver la Tabla 2.

De acuerdo con los presentes inventores, puede surgir un beneficio entálpico adicional de la cadena principal modificada debido a la formación de una red de moléculas de agua estructuradas que unen los protones de la amida de la cadena principal con las nucleobases adyacentes, lo que estabiliza las interacciones que son más pertinentes en un dúplex de γPNA -ADN que en un dúplex de PNA-ADN o PNA-PNA tradicional.

El análisis de resonancia de plasmones de superficie (SPR) se usa para estudiar la cinética de hibridación de los dúplex de $R\text{-MP}\gamma\text{PNA}$ -ADN y $R\text{-MP}\gamma\text{PNA}$ -ARN. Brevemente, la SPR se realizó de la siguiente manera. De acuerdo con una modalidad, la sonda de PNA se inmovilizó en el chip mientras que la diana de ADN se capturó de la solución. En otra modalidad, una versión biotinilada de la diana de ADN se inmoviliza en un chip de dextrana carboximetilada conjugada a estreptavidina, a una densidad superficial relativamente baja (aproximadamente 100 unidades de respuesta) de dianas de ADN para limitar los efectos de transporte de masa sobre la cinética de asociación. Las soluciones que contienen oligómeros de PNA 10-50 nM se dejan fluir sobre el chip durante aproximadamente 420 segundos, momento en el cual el flujo se cambia a un tampón libre de PNA para permitir la disociación neta del PNA hibridado.

Los sensogramas individuales para los oligómeros no modificados (PNA1) y modificados en γ con $R\text{-MP}$ (PNA2 a 5) a una concentración de 30 nM se muestran en la Figura 6. Si bien se observan pequeñas variaciones en la cinética de asociación, el PNA2 con una sola modificación parece unirse aproximadamente dos veces más rápido que el PNA no modificado. El ajuste de los datos a un modelo de unión 1:1 produce constantes de velocidad de asociación (k_a) que están en el intervalo de $4,7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a $9,7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Tabla 3).

Tabla 3. La constante de velocidad de asociación (k_a), la constante de velocidad de disociación (k_d) y la constante de equilibrio de disociación (K_d) para la hibridación de sondas de PNA con una diana de ADN complementario.

Oligómero	$k_a \text{ (M}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}$	$k_d \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$K_d \text{ (M)}$
PNA1	$4,7 \times 10^5$	$13,0 \times 10^{-4}$	$2,8 \times 10^{-9}$
PNA2	$9,7 \times 10^5$	$4,1 \times 10^{-4}$	$4,2 \times 10^{-10}$
PNA3	$6,2 \times 10^5$	$1,9 \times 10^{-4}$	$3,0 \times 10^{-10}$
PNA4	$6,6 \times 10^5$	$0,3 \times 10^{-4} \dagger$	$4,1 \times 10^{-11} \dagger$
PNA5	$8,0 \times 10^5$	$0,4 \times 10^{-4} \dagger$	$5,4 \times 10^{-11} \dagger$
$\dagger$ Indica incertidumbre debido a que el valor calculado se acerca a los límites de detección del instrumento.			

Por el contrario, se observó una variabilidad significativamente mayor en la fase de disociación del experimento, con variación de la constante de velocidad de disociación (k_d) en al menos un factor de 50. Las constantes de equilibrio de disociación (K_d) calculadas a partir de la relación de las constantes de velocidad de disociación y asociación también se proporcionan en la Tabla 3. El PNA1 no modificado y el PNA5 completamente modificado tienen una $K_d = 2,8$ nM y 54 pM, respectivamente. Los valores de K_d para PNA1-3 determinados por SPR (Tabla 3) son similares a los determinados por experimentos de fusión UV (Tabla 2). Sin embargo, se observan divergencias crecientes para PNA4 y PNA5, siendo los valores derivados de SPR 12 y 1.200 veces mayores, respectivamente que los valores de K_d determinados por experimentos de fusión UV (Tabla 2).

Estas diferencias se atribuyen a los grados de disociación muy pequeños observados dentro de la escala de tiempo del experimento de SPR. Sin embargo estas pequeñas diferencias en el grado de disociación introducen una gran incertidumbre durante la disociación del dúplex y dan lugar a diferencias en los valores de K_d .

En el ejemplo anterior, los resultados de SPR demuestran claramente que la mayor afinidad de los $R_{MP}\gamma$ PNA se debe a la cinética de disociación significativamente más lenta de los oligómeros de PNA que contienen uno o más de los monómeros $R_{MP}\gamma$ PNA. Por lo tanto, la preorganización helicoidal del PNA modificado puede tener una contribución menor a una cinética de hibridación más rápida que lo propuesto anteriormente. Es decir, es probable que la hibridación requiera cierta reorganización estructural de la cadena de ADN complementaria, lo que invalida en cierto grado el beneficio de preorganizar el oligómero de PNA a una forma helicoidal.

Los datos de CD, RMN, y rayos X han demostrado que los γ PNA derivados de L-aminoácidos adoptan una hélice derecha, y que la hélice se vuelve más rígida a medida que se añaden más unidades γ -quirales en la cadena principal. Por lo tanto podría esperarse que un PNA5 completamente modificado se hibride a dianas de ADN y ARN con una mayor selectividad de secuencia que PNA1. Para comprobar esta hipótesis, se determinaron las estabilidades térmicas de los dúplex de PNA5-ADN y PNA5-ARN que contenían dianas de apareamiento perfecto (PM) y con un solo error de apareamiento de bases (MM) y se compararon con las de un estudio anterior con dúplex de PNA1-ADN y PNA1-ARN. Los resultados muestran que a pesar de la fuerte afinidad de unión, PNA5 es capaz de discriminar entre secuencias estrechamente relacionadas. La ΔT_m está en el intervalo de -17 a -21 °C para PNA5-ADN y -16 a -20 °C para PNA5-ARN que contiene un solo error de apareamiento de bases (X=C, G, T), en comparación con -10 a -14 °C para el dúplex de PNA1-ADN y -11 a -18 °C para el de PNA1-ARN (Tabla 4). El nivel de discriminación de secuencia es mayor para PNA5-ADN que para PNA1-ADN, y similar, si no ligeramente mejor, para PNA5-ARN en comparación con PNA1-ARN. Este resultado es consistente con la adopción en PNA5 de un motivo helicoidal más rígido, que da menos cabida a los errores de apareamiento estructurales en comparación con PNA1.

Tabla 4. Discriminación de errores de apareamiento de secuencias

PNA1: H-GCATGTTTGA- ^L Lys-NH ₂				
PNA5: H- GCATGTTTGA - ^L Lys-NH ₂				
ADN: 3'-CGTACAXACT-5, X = A, C, G, T				
ARN: 3'-CGUACAXACU-5, X = A, C, G, U				
	T_m (°C)		T_m (°C)	
X-T	PNA1-ADN*	PNA5-ADN	PNA1-ARN*	PNA5-ARN
A-T	45	68	55	68
C<>T	31 (-14) [†]	47 (-21)	37 (-18)	48 (-20)
G<>T	31 (-14)	48 (-20)	44 (-11)	52 (-16)
T(U)<>T	35 (-10)	51 (-17)	40 (-15)	48 (-20)
*Los datos para la unión con error de apareamiento de PNA1-ADN y PNA1-ARN se tomaron de Dragulescu-Andrasi, A.; y otros, J. Am. Chem. Soc. 2006, 128, 10258-10267. [†] El valor entre paréntesis indica la ΔT_m entre el apareamiento perfecto y el error de apareamiento.				

Efecto de MiniPEG sobre la solubilidad acuosa y la agregación

Para determinar si la inclusión de miniPEG en la cadena principal de un PNA de Fórmula I tiene un efecto sobre la solubilidad en agua del oligómero resultante, se prepararon concentraciones saturantes de PNA6 a 10 (Tabla 1) en agua y las concentraciones de cada solución se midieron por espectroscopía UV. La incorporación de una sola unidad de MP mejora la solubilidad de PNA6 en casi 2 veces (Tabla 5). La solubilidad de los oligómeros se mejora aún más, aunque en menor grado, con unidades de MP adicionales.

Tabla 5. Concentraciones saturadas de oligómeros de PNA

Oligómero	# de Unidades de MP	Conc. sat. (mM)
PNA6	0	39
PNA7	1	76
PNA8	3	108
PNA9	5	350
PNA10	8	>500

Se usó FRET para estudiar si la incorporación de una unidad de miniPEG en la cadena principal de PNA puede ayudar a reducir la agregación. Se preparan diferentes concentraciones de PNA1X/PNA1Y no modificado y pares homólogos de PNA4X/PNA4Y modificados en γ (Tabla 1) mediante la mezcla de relaciones equimolares de los oligómeros individuales en tampón de fosfato de sodio. Las muestras se excitaron a 475 nm, la $\lambda_{\text{máx}}$ de FITC, y la emisión se registró de 480 a 700 nm. Tras la agregación, en la que los oligómeros que contienen FITC y TAMRA se ponen en contacto entre sí, la excitación a 475 nm conduce a la transferencia de energía de FITC a TAMRA debido a la proximidad de los dos cromóforos. La comparación de las eficiencias de FRET de los dos sistemas a diferentes concentraciones, por lo tanto, puede proporcionar una evaluación del efecto de miniPEG sobre la interacción intermolecular de los PNA.

Como se ilustra en la Figura 5A, cuando la concentración de cada oligómero de PNA no modificado es tan baja como 1 μM , aparece una emisión pequeña pero perceptible a 580 nm, lo que indica cierta agregación entre PNA1X y PNA1Y. El grado de agregación se intensifica aún más con concentraciones crecientes de oligómeros, lo que se evidencia a partir de la intensidad de la fluorescencia de TAMRA a ~ 580 nm tras la excitación del donante FITC a 475 nm.

Por el contrario, a una concentración de 20 μM , el punto en el que se observa casi 70 % de eficiencia de FRET para el par PNA1X/PNA1Y no modificado, se observa aproximadamente 5 % de eficiencia de FRET para el par PNA4X/PNA4Y modificado en γ (Figura 7B). Estos resultados indican que el par de PNA modificados en γ no interactúa entre sí tanto como los PNA no modificados. La distinción también es evidente a partir de fotografías de las muestras iluminadas con el uso de una lámpara UV de mano de longitud de onda corta (254 nm). La solución de PNA1X/PNA1Y mostró una emisión de naranja claro a temperatura ambiente y un tono amarillo verdoso a 90 °C, un indicio de que el agregado se disocia al calentarse. Por el contrario, la solución de PNA4X/PNA4Y mostró el mismo color, amarillo verdoso, a temperatura ambiente así como a 90 °C, lo que indica que los oligómeros se dispersan bien incluso a temperatura ambiente. Por lo tanto, la modificación *R*-MP- γ imparte no solo una mayor solubilidad al PNA, sino que también suprime la agregación.

Se ha documentado que a concentraciones moderadas, el PNA tiende a agregarse y adherirse a las superficies y a otras macromoléculas de una manera no específica. Tales interacciones pueden conducir a efectos de unión fuera de la diana y citotóxicos, cuando se emplean en el contexto celular. Entre las macromoléculas conocidas por su interacción no específica con PNA se encuentran los ácidos nucleicos y las proteínas.

Para evaluar el grado de unión fuera de la diana de PNA y $R\text{-MP}\gamma\text{PNA}$, se realiza un ensayo de cambio en gel. En este caso, un fragmento de ADN, de 171 pb de longitud, se incubó con diferentes concentraciones de PNA6 y PNA10 (Tabla 1) en tampón de fosfato de sodio 10 mM a 37 °C durante 16 h. Los dos oligómeros contienen una secuencia de nucleobases idéntica pero difieren entre sí en γ de la cadena principal. El PNA6 es no modificado, mientras que el PNA10 se encuentra modificado en posiciones alternas con cadena lateral *R*-MP- γ . Después de la incubación, las muestras se separan en gel de poliacrilamida no desnaturizante y se tiñen con SYBR-Gold.

Dado que la diana no contiene una secuencia complementaria a los oligómeros, no se espera que se produzca unión alguna, en cuyo caso la intensidad de la banda de ADN debe permanecer casi constante, independientemente de las concentraciones de PNA6 y PNA10. En cambio, se observa una reducción drástica en la intensidad de la banda de ADN con concentraciones crecientes de PNA6 (Figura 6). A 10 μM (correspondiente a una relación PNA/ADN de 25:1) o más, la banda de ADN desapareció completamente del gel.

Por el contrario, para el PNA10 modificado en γ la intensidad de las bandas de ADN permaneció casi constante incluso a una concentración tan alta como 20 μM (relación PNA/ADN de 50:1). Este resultado es consistente con los datos de solubilidad y de FRET, lo que indica que la incorporación de miniPEG en γ de la cadena principal no solo mejora las propiedades de hibridación y la solubilidad en agua de PNA sino que también ayuda a reducir la unión no específica con otras macromoléculas.

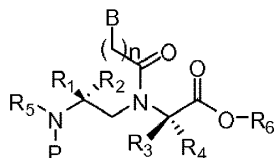
Los PNA de cadena principal modificada en gamma de acuerdo con la Fórmula I así como los oligómeros que contienen los PNA de Fórmula I se proporcionan, de acuerdo con la invención, para mejorar el diseño y la utilidad de la terapia y el diagnóstico basados en PNA. Por ejemplo, las mejoras en las propiedades de hibridación pueden permitir que los *R*-MP γ PNA invadan el ADN doble helicoidal y el ARN estructurado lo que puede no ser permisible con otros miméticos de

oligonucleótidos. Las mejoras en la solubilidad en agua facilitarán la manipulación y el procesamiento de PNA al tiempo que disminuyen las preocupaciones por la unión no específica y los efectos citotóxicos. Las mejoras en estas áreas, junto con la flexibilidad de la síntesis mediante la cual pueden instalarse con facilidad otras funcionalidades químicas en y de la cadena principal, expandirán la utilidad de los PNA en otras disciplinas científicas, que incluyen el descubrimiento de fármacos y la nanotecnología.

5

REIVINDICACIONES

1. Un monómero de ácido nucleico peptídico (PNA) que tiene la siguiente fórmula:



en donde

B es una base de ácido nucleico seleccionada de adenina, guanina, citosina, y timina;

R₁ es -CH₂(OCH₂CH₂)₁₋₁₀OCH₃;

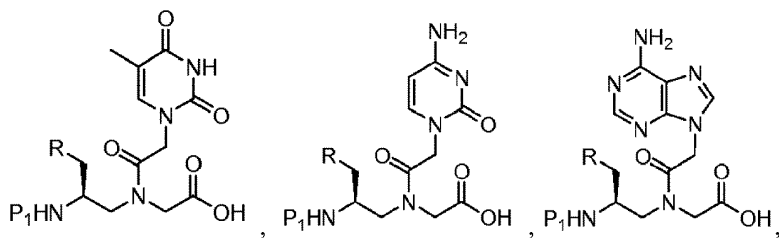
R₂ es H;

R₃, R₄, R₅, y R₆ son cada uno independientemente H;

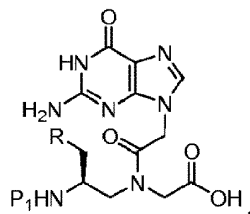
P se selecciona del grupo que consiste en H, 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc), terc-butiloxycarbonyl (Boc), benzyloxycarbonyl (Cbz), tosilato (Ts), bencilo (Bn), aliloxycarbonyl (alloc), tritilo (Trt), dimetoxitritilo (DMT), y monometoxitritilo (MMT); y

n es 1.

2. El monómero de PNA de conformidad con la reivindicación 1 seleccionado de los siguientes compuestos:

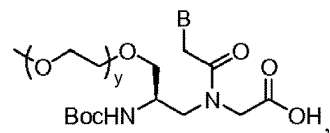


y

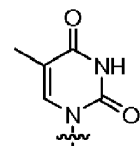


en donde P₁ es terc-butiloxycarbonyl (Boc) o 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc); y R es O(CH₂CH₂O)₄CH₃.

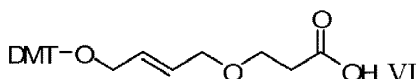
3. El monómero de PNA de conformidad con la reivindicación 1 que tiene la siguiente fórmula:



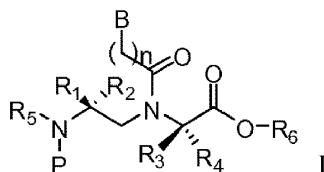
en donde y es 2; y B es



4. Uso de un monómero de PNA de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la síntesis de un oligómero de PNA.
5. Un oligómero de PNA que comprende el monómero de PNA de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
6. Un oligómero de PNA de conformidad con la reivindicación 5 para el uso en la terapia, en particular para el uso en el tratamiento de una enfermedad genética.
7. Un oligómero de PNA de conformidad con la reivindicación 5 para el uso en el diagnóstico, en particular para el uso en el diagnóstico de una enfermedad genética.
8. Un método para sintetizar un oligómero de PNA que tiene una secuencia predeterminada, que comprende:
 - (a) activar el grupo de ácido carboxílico de un enlazador alílico de acuerdo con la Fórmula VI



- (b) poner en contacto un soporte sólido con el enlazador alílico activado;
 - (c) activar el grupo de ácido carboxílico de un primer monómero de PNA con amino protegido o un monómero de γ PNA con amino protegido en dependencia de la secuencia del oligómero de PNA y después poner en contacto el monómero con ácido carboxílico activado con el producto de la etapa (b);
 - (d) desproteger el grupo amino del producto de la etapa (c),
 - (e) poner en contacto el producto de la etapa (d) con un segundo monómero de PNA específico de secuencia o un monómero de γ -PNA;
 - (f) repetir las etapas (c), (d) y (e) para sintetizar el oligómero de PNA que comprende al menos un monómero de γ -PNA;
- en donde
el monómero de γ -PNA es un compuesto de acuerdo con la Fórmula I



en donde

B es una base de ácido nucleico seleccionada de adenina, guanina, citosina, timina y uracilo;
Cada uno de R_1 , R_2 y R_5 se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, (C_1-C_8) alquilo lineal o ramificado, (C_2-C_8) alquenilo, (C_2-C_8) alquinilo, (C_1-C_8) hidroxialquilo, (C_3-C_8) arilo, (C_3-C_8) cicloalquilo, (C_3-C_8) aril (C_1-C_6) alquileo, (C_3-C_8) cicloalquil (C_1-C_6) alquileo, $-CH_2-(OCH_2-CH_2)_q-OP_1$, $-CH_2-(OCH_2-CH_2)_q-NHP_1$, $-CH_2-(OCH_2-CH_2)_q-SP_1$ y $-CH_2-(SCH_2-CH_2)_q-SP_1$; R_3 y R_4 son cada uno independientemente H;
 R_6 se selecciona del grupo que consiste en H, (C_1-C_8) alquilo lineal o ramificado, (C_3-C_8) arilo sustituido o no sustituido y (C_3-C_8) aril (C_1-C_6) alquileo;
P se selecciona del grupo que consiste en H, 9-fluorenilmetiloxi carbonilo (Fmoc), terc-butiloxycarbonilo (Boc), benciloxycarbonilo (Cbz), tosilato (Ts), bencilo (Bn), aliloxycarbonilo (aloc), tritilo (Trt), dimetoxitritilo (DMT), y monometoxitritilo (MMT); P_1 se selecciona del grupo que consiste en H, (C_1-C_8) alquilo, (C_2-C_8) alquenilo, (C_2-C_8) alquinilo, (C_3-C_8) arilo, (C_3-C_8) cicloalquilo, (C_3-C_8) aril (C_1-C_6) alquileo y (C_3-C_8) cicloalquil (C_1-C_6) alquileo; y
n y q son independientemente números enteros entre 0 y 10 incluidos.

9. El método de conformidad con la reivindicación 8, en donde R_1 es $-CH_2-(OCH_2-CH_2)_q-OP_1$; R_2 es H; y P_1 es H o (C_1-C_8) alquilo.
10. El método de conformidad con la reivindicación 9, en donde P_1 es un grupo alquilo terciario.
11. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en donde n es 1 y q es 1 a 10.

Figura 1

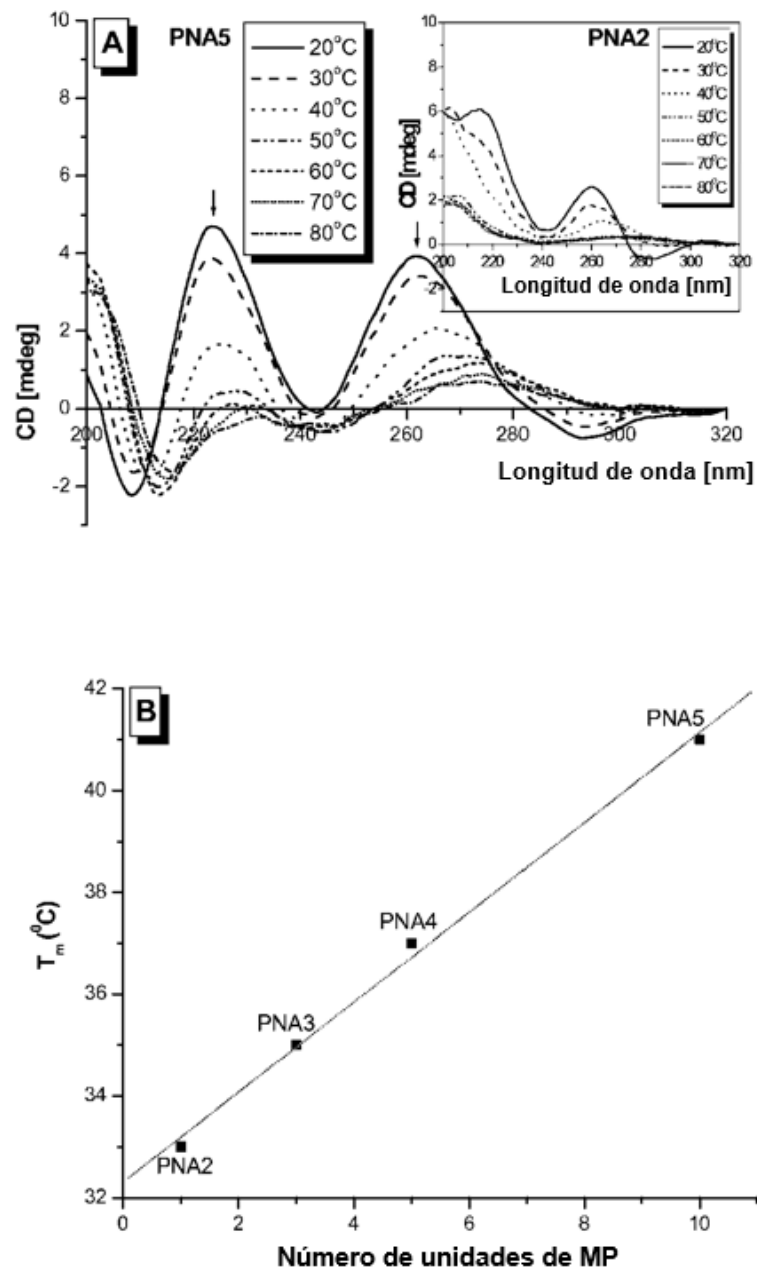


Figura 2

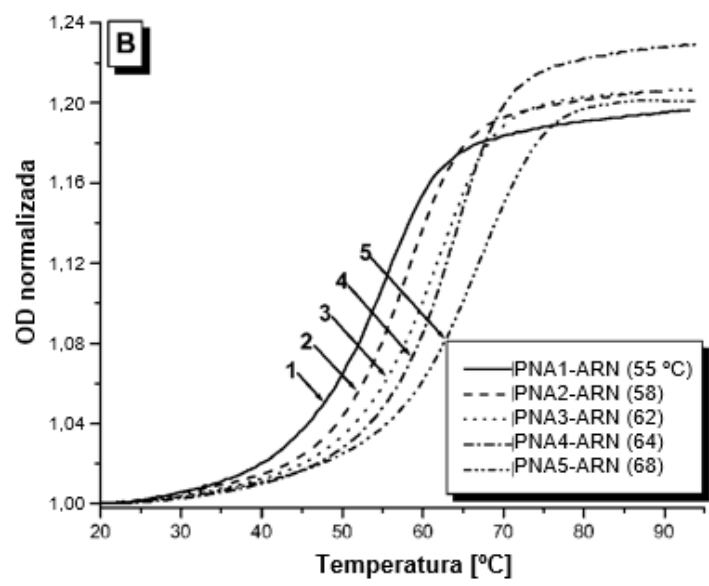
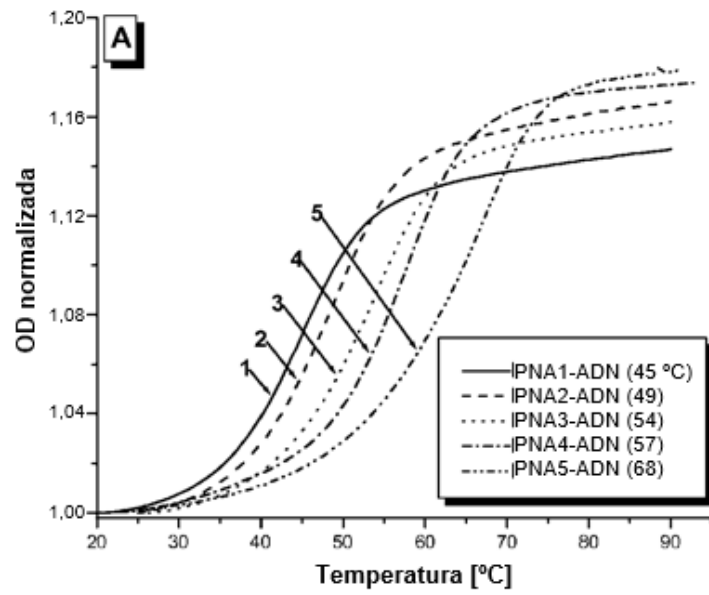


Figura 3

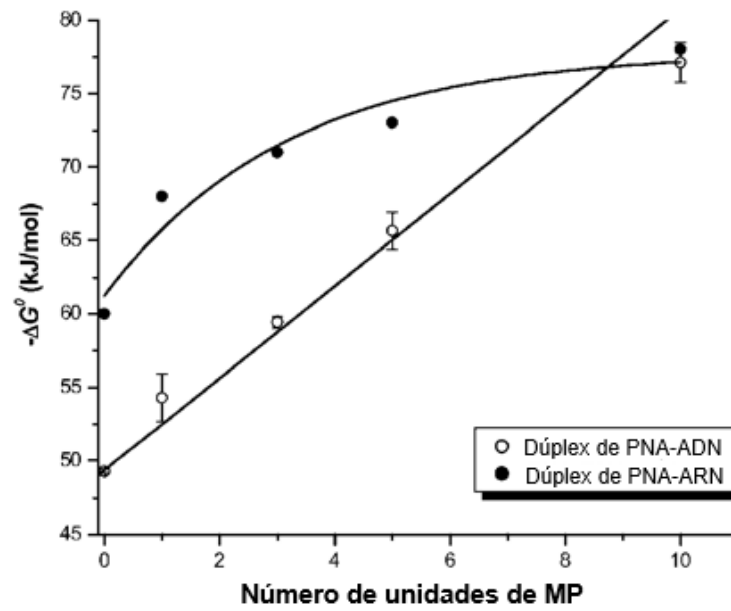


Figura 4

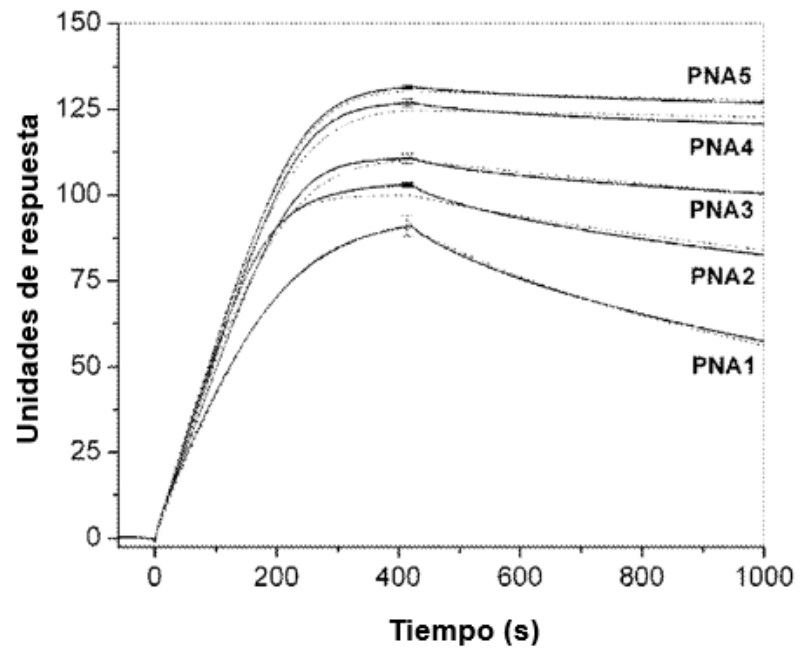


Figura 5

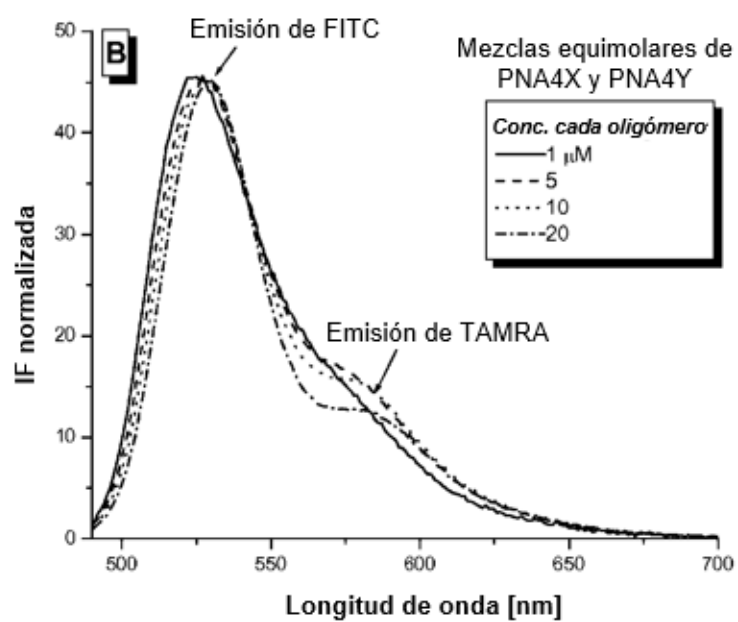
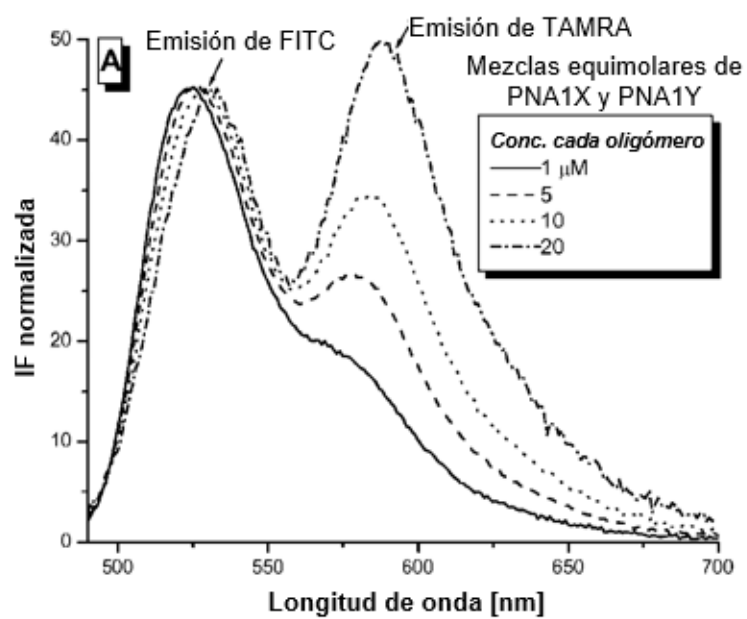


Figura 6

