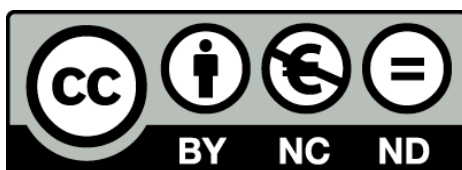


## Síntesis y evaluación de ligandos con bases Janus para el reconocimiento de los pares U·U y C·U característicos de los RNAs tóxicos asociados a las distrofias miotónicas

Elisabet Fernández Martínez



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0. Spain License.**

**Síntesis y evaluación de ligandos con bases Janus  
para el reconocimiento de los pares U·U y C·U  
característicos de los RNAs tóxicos asociados a las  
distrofias miotónicas**

Memoria presentada por

**Elisabet Fernández Martínez**

Dirigida y revisada por:

**Dr. Enrique Pedroso Müller**

Facultad de Química de la Universidad de Barcelona  
Departamento de Química Orgánica

Departamento de Química Orgánica  
Programa de Doctorado en Química Orgánica  
Universidad de Barcelona, Diciembre 2014



*De vegades, a la vida passa el mateix;  
la dificultat dels pendents fa que t'oblidis que  
no deixes de progressar i de continuar pujant.*

*Albert Espinosa*





## **Agradecimientos**

Para empezar, quiero agradecer al Ministerio de Educación, Cultura y Deporte la concesión de la beca FPU para la realización de esta tesis doctoral. También quiero agradecer a la Dra. María Macias la oportunidad de realizar los experimentos de EM en el IRB y al Dr. Carlos González la colaboración en los estudios de RMN. Faig extensiu l'agraïment a la Laura i a la Irene del Servei de Masses d'aquesta Facultat per la seva bona disponibilitat i amabilitat.

***The End.** Pot semblar innusual començar quelcom d'aquesta manera, però en definitiva, aquest ja és l'acte final. Durant aquest temps han passat moltíssimes coses, i el camí que m'ha dut fins aquí ha estat, indubtablement, una gran aventura. Vosaltres, que heu compartit més que instants amb mi, que m'heu ajudat a forjar aquesta història i que m'heu empès per avançar en aquest trajecte, us mereixeu ara ser els protagonistes. Sigueu lluny o sigueu a prop, gràcies per formar part d'aquesta etapa de la meva vida.*

*A tu Enrique, perquè només conèixer-te vas aconseguir tocar-me amb aquesta passió que desprens, una passió que he intentat fer meva durant tots aquests anys. Hem patit cada moment amarg i hem gaudit cada instant dolç, i encara que s'ha fet de pregar, ha estat un plaer compartir tot això amb tu. Anna, gràcies per fer-me sentir com a casa i per tantes vegades que he rebut la teva ajuda i consell. Núria, Jordi i Vicente, sempre heu tingut la porta oberta per mi, us ho agraeixo de tot cor.*

*Sou molts els que heu passat pel departament i heu deixat en mi una petjada important: Paula, Albert S, Carlos R, Marta M, Giovanna, Jorge, Tomeu, Ivanna, Marta F, Anna S, Aleix, Albert G, Roger, Clément, Natàlia, Omar,... heu fet els dies més alegres, les "cervetes" més amenes i algunes nits més bojes! En especial, vull agrair a l'Àlex T totes les estones que hem compartit, que no han estat poques. No oblidis que el més important en aquest món és ser feliç! A l'Ana C, la millor companya de laboratori, ets un sol! I ara vens tu...Xavi, és impossible agrair-te tantes i tantes coses que hem compartit i que mai oblidaré. Simplement, gràcies, tot hauria estat molt diferent sense tu.*

*No em puc oblidar de tots els amics que heu anat seguint aquesta història d'una miqueta més lluny: Moltíssimes gràcies Lluís, Iris, Raúl, Jon...! També a la Belén i a la Sílvia, que aquest últim any m'han donat molts ànims. I, amb molt d'afecte, gràcies Joana, que m'has escoltat i m'escoltes; encara ens queda molt per fer i gaudir juntes!*

*Finalment, als de casa: al Lucas, que malgrat no adonar-se'n, fa que els mals de cap s'esvaeixin; a l'Àlex...gràcies per la paciència incondicional, pels ànims, pel recolzament i...simplement, per ser al meu costat i fer-me sentir especial; als meus pares, Carme i Xavi, a vosaltres us ho dec tot, gràcies als dos he arribat on sóc, m'heu fet créixer i m'heu fet molt gran, avui sóc jo la que està orgullosa de vosaltres. Gràcies de tot cor!*



# ÍNDICE

## ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y SÍMBOLOS

### INTRODUCCIÓN

La diversidad estructural y funcional del RNA	3
Enfermedades asociadas al RNA: Las TRED	6
Las distrofias miotónicas 1 y 2	9
<i>Las enfermedades</i>	9
<i>Origen patológico</i>	10
<i>Mecanismo Molecular de las DMs</i>	10
La estructura de rCUG <sup>exp</sup> y rCCUG <sup>exp</sup>	13
Estrategias terapéuticas contra las DMs	16
• <i>Estrategias dirigidas a degradar el transcrito de RNA expandido</i>	17
• <i>Estrategia dirigida a la inhibición de la unión RNA<sup>exp</sup>-proteína</i>	18
Ligandos capaces de unirse a CUG <sup>exp</sup> y CCUG <sup>exp</sup>	19
• <i>Diseño racional de ligandos</i>	19
• <i>Screening de biblioteca de compuestos</i>	22
• <i>Química combinatoria dinámica</i>	23
Las Bases Janus	24
Objetivos	27
Bibliografía	28

## CAPÍTULO 1: Diseño y síntesis de ligandos tipo PNA con bases Janus

<b>1. Introducción</b>	37
Diseño de las bases Janus: Las bases J <sub>T</sub> , J <sub>D</sub> y J <sub>W</sub>	37
Los PNAs (Ácidos Nucleicos Peptídicos)	40
<i>Características</i>	40
<i>Su interacción con el DNA y el RNA</i>	41
<i>Modificaciones descritas</i>	42
<b>2. Síntesis de los monómero de PNA de J<sub>T</sub>, J<sub>D</sub> y J<sub>W</sub></b>	44
2.1. El monómero de PNA con J <sub>T</sub>	45
2.1.1. Intentos de obtención del monómero no modificado con J <sub>T</sub>	45
2.1.1.1. Primera Ruta Sintética	45
2.1.1.1.1. <i>Bis-protección de J<sub>T</sub> con grupos Boc</i>	45
2.1.1.1.2. <i>Protección parcial de J<sub>T</sub> con grupos Boc</i>	47
<i>Mono-protección de las aminas.</i>	47
<i>Desprotección parcial de las aminas del intermedio 5</i>	48

2.1.1.2.	Segunda Ruta Sintética	49
2.1.2.	Obtención de monómeros modificados con $J_T$	51
2.1.2.1.	Obtención del monómero $J_T$ -O-PNA	51
2.1.2.2.	Obtención del monómero $J_T$ -PNA	53
2.2.	El monómero de PNA con $J_D$	56
	<i>Vía ester metílico</i>	56
	<i>Vía ester bencílico</i>	60
2.3.	El monómero de PNA con $J_W$	60
2.3.1.	Primera ruta sintética	61
2.3.2.	Segunda ruta sintética	63
<b>3.</b>	<b>Caracterización de las Bases Janus <math>J_T</math>, <math>J_D</math> y <math>J_W</math></b>	<b>65</b>
3.1.	Comportamiento ácido-base de las bases Janus $J_T$ , $J_D$ y $J_W$	65
3.1.1.	Determinación del $pK_a$ de la base $J_T$	66
3.2.	Determinación del coeficiente de extinción molar de las bases $J_T$ , $J_D$ y $J_W$	68
<b>4.</b>	<b>Diseño y síntesis de los ligandos tipo PNA</b>	<b>69</b>
4.1.	Diseño de los ligandos	69
4.1.1.	Ligandos con $J_T$ de la diana $CUG_n$	70
4.1.2.	Ligandos con $J_D$ de la diana $CCUG_n$	71
4.1.3.	Ligandos que contienen $J_W$ de las dianas $CUG_n$ y $CCUG_n$	72
4.2.	Síntesis en fase sólida, purificación y caracterización	74
<b>5.</b>	<b>Bibliografía</b>	<b>77</b>
<b>CAPÍTULO 2: Estudio de los complejos RNA-ligando</b>		
<b>1.</b>	<b>Introducción</b>	<b>83</b>
1.1.	Elección de la diana	84
1.2.	Las técnicas biofísicas	84
1.2.1.	Espectrometría UV-Vis. Desnaturalización térmica	84
1.2.2.	Dicroísmo circular	87
1.2.3.	Calorimetría de valoración isotérmica (ITC)	88
1.2.4.	Resonancia magnética nuclear	91
1.2.5.	Espectrometría de masas	93
<b>2.</b>	<b>Esquema del capítulo</b>	<b>94</b>
<b>3.</b>	<b>Evaluación de ligandos que contienen la base Janus <math>J_T</math> dirigidos al par no canónico U·U asociado a la DM1</b>	<b>94</b>
3.1.	Diana $G(CUG)_4C$	94
3.1.1.	Desnaturalización térmica controlada por UV	95
3.1.2.	Dicroísmo circular	97
3.2.	Diana hCUG	98
3.2.1.	Ensayos en condiciones de fuerza iónica alta	98

3.2.1.1.	Desnaturalización térmica controlada por UV	99
3.2.1.2.	Dicroísmo circular	101
3.2.1.3.	Calorimetría de valoración isotérmica	102
3.2.2.	Ensayos en condiciones de fuerza iónica baja	105
3.2.2.1.	Desnaturalización térmica controlada por UV	105
3.2.2.2.	Dicroísmo circular	107
3.2.2.3.	Calorimetría de valoración isotérmica	108
3.2.2.3.1.	Compuesto <b>12</b>	108
3.2.2.3.2.	Ligandos <b>J<sub>T</sub>K</b> y <b>J<sub>T</sub>G<sub>n</sub>J<sub>T</sub>K</b>	109
3.2.2.4.	RMN	114
3.2.2.4.1.	RMN de <sup>19</sup> F	115
3.2.2.4.2.	RMN de <sup>1</sup> H	117
3.2.2.5.	Espectrometría de masas	122
<b>4.</b>	<b>Evaluación de ligandos que contienen J<sub>D</sub> o J<sub>T</sub> dirigidos al par no canónico C·U asociado a la DM2. Diana hCCUG.</b>	<b>125</b>
4.1.	Ligandos que contienen J <sub>D</sub>	125
4.1.1.	Desnaturalización térmica controlada por UV	125
4.1.2.	Dicroísmo circular	126
4.1.3.	Calorimetría de valoración isotérmica	127
4.1.4.	Espectrometría de masas	129
4.2.	Ligandos con J <sub>T</sub> para la diana hCCUG	130
4.2.1.	Desnaturalización térmica controlada por UV	130
4.2.2.	Dicroísmo circular	131
4.2.3.	Calorimetría de valoración isotérmica	132
<b>5.</b>	<b>Evaluación de los ligandos que contienen la base Janus J<sub>W</sub></b>	<b>135</b>
5.1.	Ligandos con las bases Janus J <sub>W</sub> y J <sub>T</sub> dirigidos a la diana hCCUG	135
5.1.1.	Condiciones de fuerza iónica alta	136
5.1.2.	Condiciones de fuerza iónica baja	136
5.1.2.1.	Desnaturalización térmica controlada por UV	136
5.1.2.2.	Dicroísmo Circular	137
5.1.2.3.	Calorimetría de valoración isotérmica	138
5.1.2.4.	RMN de <sup>19</sup> F	140
5.1.2.5.	Espectrometría de masas	141
5.2.	Ligandos con las bases Janus J <sub>W</sub> y J <sub>D</sub> dirigidos a la diana hCCUG	141
5.2.1.	Dicroísmo circular	141
5.2.2.	Calorimetría de valoración isotérmica	142
5.2.3.	Espectrometría de masas	144
<b>6.</b>	<b>Selectividad</b>	<b>144</b>
<b>7.</b>	<b>Bibliografía</b>	<b>147</b>

## DISCUSIÓN

Discusión	153
Bibliografía	159

## CONCLUSIONES

163

## APÉNDICE

<b>1. Intentos de obtención del monómero de PNA no modificado de J<sub>T</sub></b>	169
1.1. Primera Ruta Sintética	169
1.1.1. <i>Bis</i> -protección de J <sub>T</sub> con grupos Boc	169
1.1.2. Protección parcial de J <sub>T</sub> con grupos Boc	174
<i>Mono</i> -protección de las aminas.	174
<i>Desprotección parcial de las aminas del intermedio 5</i>	179
1.2. Segunda Ruta Sintética	182
<i>Subruta 1</i>	183
<i>Subruta 2</i>	184
<i>Subruta 3</i>	185
<b>2. Bibliografía</b>	186

## EXPERIMENTAL SECTION

### MATERIALS AND METHODS

<b>1. Reagents, solvents and buffer solutions.</b>	189
1.1. Reagents and solvents	189
1.2. Buffer solutions	190
<b>2. General techniques.</b>	190
2.1. Chromatographic techniques	190
2.2. Nuclear magnetic resonance	191
2.3. Mass spectrometry	192
2.4. UV-Vis Spectroscopy and circular dichroism	193
2.5. Other instrumentation	193
<b>3. Solid-phase Synthesis</b>	193
3.1. Peptide nucleic acids (PNA) synthesis	193
3.1.1. Instrumentation and general reagents	193
3.1.2. Synthesis cycle and elongation of the chain	193
3.1.3. Cleavage, deprotection and purification	194
3.1.4. Assay and determination of resin functionalization	195
3.1.5. PNA quantification by UV-Vis absorption	196
3.1.5.1. PNAs molar extinction coefficient	196
3.2. Oligonucleotide synthesis	196

3.2.1. Instrumentation and general reagents	196
3.2.2. Synthesis cycle and elongation of the chain	196
3.2.3. Manual cleavage, deprotection and purification	197
3.2.4. RNA quantification by UV-Vis absorption	198
3.2.5. Ion exchange chromatography	199
<b>4. RNA-ligand interaction studies</b>	<b>199</b>
4.1. Thermal denaturation assays monitored by UV-Vis and circular dichroism	199
4.2. Circular dichroism assays	200
4.3. Isothermal titration calorimetry (ITC) assays	200
4.4. Nuclear magnetic resonance	201
4.4.1. Sample preparation	201
4.4.2. Acquisition parameters	202
4.4.3. Titration experiments	202
4.4.4. Data processing	202
4.5. Stoichiometry determination by mass spectrometry	202

## EXPERIMENTAL SECTION: Chapter 1

<b>1. Synthesis and characterization of organic compounds</b>	<b>204</b>
1.1. PNA monomers containing J <sub>T</sub>	204
1.1.1. Janus J <sub>T</sub> with one methylene group: First synthetic route	204
1.1.2. Janus J <sub>T</sub> with one methylene group: Second Synthetic Route	206
1.1.3. Synthesis of AEG PNA backbone	207
1.1.4. Janus J <sub>T</sub> PNA monomer J <sub>T</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -O-CH <sub>2</sub> -CO-PNA (J <sub>T</sub> -O-PNA)	208
1.1.5. Janus J <sub>T</sub> PNA monomer with two methylene groups: Synthesis of J <sub>T</sub> -PNA	211
1.2. Janus J <sub>D</sub> PNA monomer	213
1.3. Janus J <sub>W</sub> PNA monomer	218
<b>2. Spectrophotometric determination of the pK<sub>a</sub> of 12</b>	<b>222</b>
<b>3. Determination of the ε Janus bases</b>	<b>223</b>
<b>4. PNA synthesis and characterization</b>	<b>228</b>

## EXPERIMENTAL SECTION: Chapter 2

<b>1. Synthesis and characterization of oligonucleotide models</b>	<b>239</b>
<b>2. Biophysical Assays</b>	<b>242</b>
2.1. Thermal denaturation experiments monitored by UV spectroscopy	242
2.1.1. 14-mer G(CUG) <sub>4</sub> C target	242
2.1.2. hCUG in high ionic strength buffer	242
2.1.3. hCUG in low ionic strength buffer	247
2.1.4. Fluorinated hCUG	247
2.1.5. hCCUG	247
2.2. Circular dichroism experiments	248



2.2.1. 14-mer G(CUG) <sub>4</sub> C	248
2.2.2. hCUG in high ionic strength buffer	248
2.2.3. hCUG in low ionic strength	251
2.2.4. hCCUG	252
2.3. Isothermal titration calorimetry (ITC)	253
2.3.1. hCUG in high ionic strength buffer	253
2.3.2. hCUG in low ionic strength	255
2.3.3. hCCUG	259
2.3.4. Selectivity experiments	260
2.4. NMR Experiments	263
2.4.1. <sup>19</sup> F-NMR	263
2.4.2. <sup>1</sup> H-NMR	264
2.5. Stoichiometry determination by MS	268
<b>REFERENCES EXPERIMENTAL SECTION</b>	<b>272</b>

# ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y SÍMBOLOS

A	adenina
Å	angstrom
Abs	absorbancia
ac ( <i>aq</i> )	acuoso ( <i>aqueous</i> )
Ac	acetilo
ACN	acetonitrilo
AEG	<i>N</i> -(2-aminoetil)glicina
anh.	anhidro
Ar	Argón
ASO	oligonucleótido antisentido
Boc	<i>tert</i> -butoxicarbonilo
Boc <sub>2</sub> O	anhídrido de Boc
br	<i>broad</i>
BTT	5-benciltio-1- <i>H</i> -tetrazol
C	citosa
CA (AC)	citrato de amonio ( <i>ammonium citrate</i> )
<i>calcd</i>	<i>calculated</i>
cat	cantidad catalítica
CCF (TLC)	cromatografía en capa fina ( <i>thin layer chromatography</i> )
CDI	carbonildiimidazol
CI	ionización química
CNE	2-cianoetilo
CPG	soporte de bolas de vidrio de tamaño controlado ( <i>Controlled Pore Glass</i> )
conc.	concentrado/-a
COSY	<i>Correlated Spectroscopy</i>
CUG-BP1	proteína de unión al RNA con repeticiones CUG 1
d	doblete
DC (CD)	dicroísmo circular ( <i>circular dichroism</i> )
DCM	diclorometano
ΔG	variación de la energía libre de Gibbs
ΔH	variación de entalpía
DHP	3,4-dihidro-2 <i>H</i> -pirano
DIEA	<i>N,N</i> -diisopropiletilamina
DMAP	4-dimetilaminopirimidina

DME	éter dimetiletilenglicólico
DMP	periodinato de Dess-Martin
DM (1 o 2)	distrofia miotónica (tipo 1 o 2)
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMPK	proteína quinasa de la distrofia miotónica
DMT	4,4'-dimetoxitritilo
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
$\Delta S$	variación de entropía
DSS	2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfonato de sodio perdeuterado
EDC	<i>N</i> -(3-dimetilaminopropil)- <i>N'</i> -etilcarbodiimida
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EM	espectrometría de masas
eq	equivalentes
ESI	ionización por electrospray
exp	expandido
Fmoc	9-fluorenilmetoxycarbonilo
G	guanina/ glicina
h	horas
HATU	hexafluorofosfato de (2-(7-aza-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio
HOBT	1-hidroxibenzotriazol
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
iPrPac	isopropilfenoxiacetilo
ITC	<i>Isothermal Titration Calorimetry</i>
J	Janus
K	lisina
$K_a$	constante de asociación
$K_d$	constante de disociación
Lys	lisina
m	multiplete
MALDI-TOF	espectrometría de masas por desorción iónica provocada por láser, asistida por matriz con analizador de tiempo de vuelo
MBNL1	Proteína <i>Muscleblind-like 1</i>
min	minutos
MPLC	cromatografía líquida de media presión

mRNA	ácido ribonucleico mensajero
Mst	mesitilensulfonilo
MW	Peso molecular ( <i>molecular weight</i> )
<i>m/z</i>	relación masa/carga
n	estequiometría (número de ligandos por biomolécula)
NMI	<i>N</i> -metilimidazol
NMP	<i>N</i> -metilpirrolidona
NOE	<i>Nuclear Overhauser Effect</i>
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
OD <sub>260</sub>	densidad óptica a 260 nm
Pac	fenoxiacetilo
PCC	clorocromato de piridinio
PKC	proteína quinasa C
PNA	ácido nucleico peptídico
ppm	partes por millón
pTsOH	ácido <i>para</i> -toluensulfónico
PS	poliestireno-1%-divinilbenceno
pyr	piridina
R	constante universal de los gases ideales
R <sub>f</sub>	factor de retención (cromatografía en capa fina)
RMN	resonancia magnética nuclear
RNA	ácido ribonucleico
RNasa	ribonucleasa
rRNA	ácido ribonucleico ribosomal
rt	temperatura ambiente ( <i>room temperature</i> )
s	singulete
SCN	sistema central nervioso
t	triplete
T	timina
T <sub>e</sub>	temperatura de ebullición
TEMPO	2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oxilo
TFA	ácido trifluoroacético
T <sub>m</sub>	temperatura de fusión
t <sub>R</sub>	tiempo de retención
TBDMS	éter <i>tert</i> -butilodimetilsililo
TOCSY	<i>Total correlation Spectroscopy</i>

$t$ Bu	<i>tert</i> -butilo
TEA	trietilamina
TEAA	acetato de trietilamonio
THAP	2,4,6-trihidroxiacetofenona
THF	tetrahidrofurà
TRED	Enfermedades por expansión de trinucleótidos, <i>Trinucleotide repeat expansion disorders</i>
$t$ RNA	ácido ribonucleico de transferencia
$t$ RNA <sup>Phe</sup>	ácido ribonucleico de transferencia de la fenilalanina
U	uridina
UTR	región no traducida, <i>untranslated region</i>
UV	ultravioleta
Vis	visible
$\delta$	desplazamiento químico
$\epsilon$	coeficiente de extinción molar
$\lambda$	longitud de onda
$\theta$	elipticidad
$\theta_M$	elipticidad molar

# ***Introducción***





### La diversidad estructural y funcional del RNA

Después de que Watson y Crick propusieran en 1953 la estructura de doble hélice del DNA, el estudio funcional y estructural del RNA ha ido adquiriendo un protagonismo creciente en la biología contemporánea con el objetivo de poder comprender las bases moleculares de la vida.<sup>[1,2]</sup> En los últimos años, los grandes avances en la biología molecular han mejorado sustancialmente el conocimiento de cómo fluye la información genética, desde el DNA al RNA y, finalmente, a las proteínas. El dogma central establece que hay tres tipos de RNA encargados de llevar a cabo este proceso, el RNA mensajero (mRNA o RNA codificante), que contiene el patrón que codifica la secuencia de la proteína que debe ser sintetizada en el ribosoma; el RNA de transferencia (<sup>t</sup>RNA), que lleva el aminoácido apropiado al ribosoma en el proceso de *traducción*; y el propio RNA ribosomal (rRNA) (Figura I.1).

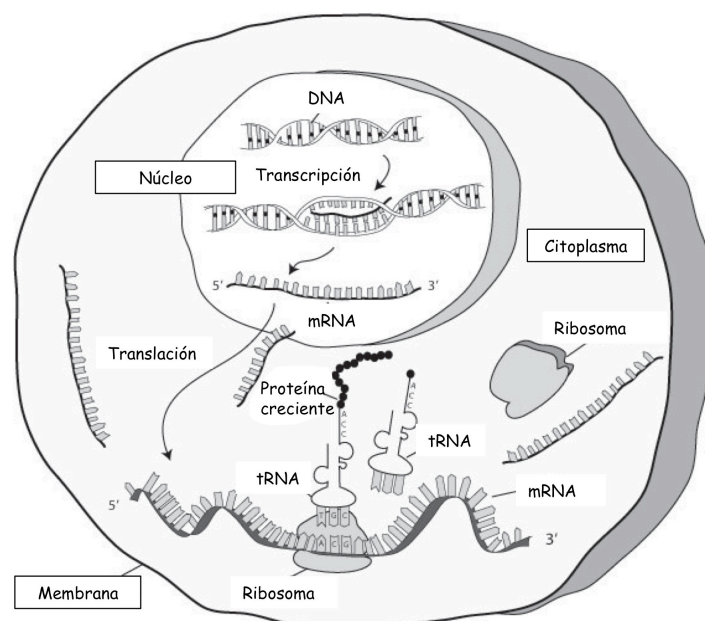


Fig. I.1. Esquema del proceso de traducción y transcripción celular.



Los ácidos nucleicos, el DNA y el RNA, son polianiones poliméricos constituidos por una secuencia lineal de nucleótidos. Las principales diferencias entre ambos es el anillo de furanosa que conforma el esqueleto del polímero, que en el DNA es la D-2'-O-desoxiribosa mientras que en el RNA es la D-ribose, y la presencia de la base pirimidínica timina del DNA que se transcribe a uracilo en el RNA (Figura I.2).<sup>[3]</sup>

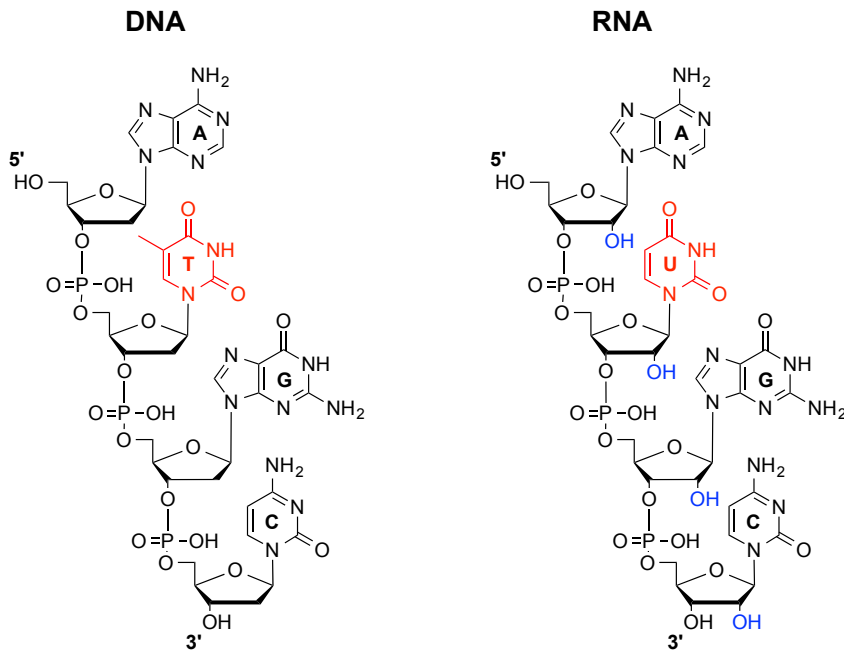


Fig. I.2. Estructura del DNA (ácido 2-desoxiribonucleico) y del RNA (ácido ribonucleico).

A pesar de tener una composición química muy semejante, los dos ácidos nucleicos presentan estructuras y funciones biológicas muy distintas. El DNA, que contiene la información genética, se encuentra normalmente como doble hélice dextrógira (dsDNA) estabilizada por pares canónicos Watson-Crick. La doble hélice de DNA puede adoptar diferentes conformaciones (A-DNA, B-DNA, Z-DNA),<sup>[4]</sup> y el DNA puede también estructurarse para dar lugar a motivos no canónicos menos comunes como los cuádruplex de G o los motivos-*i*.<sup>[5]</sup> El RNA es estructuralmente mucho más versátil,<sup>[6]</sup> y suele presentarse como una simple cadena ssRNA (*single-stranded* RNA) capaz de adoptar variadas estructuras secundarias mediante interacciones intramoleculares entre sus bases ribonucleicas. La más común de todas ellas es la doble hélice<sup>[7]</sup> que puede contener motivos como horquillas, bucles, protuberancias, apareamientos no canónicos (*mismatches*), etc. (Figura I.3). La flexibilidad del dsRNA es muy parecida a la del dsDNA aunque las pequeñas diferencias entre ambos estudiadas por algunos grupos de investigación ayudan a entender sus diferenciadas funciones biológicas.<sup>[8]</sup> El RNA puede adoptar estructuras aún más complejas, las llamadas estructuras terciarias, que se originan cuando diferentes regiones de una estructura secundaria entran en contacto, interaccionan, y dan lugar a una estructura aún más compleja y compacta. Algunos ejemplos son los tRNA, en los que dos subestructuras de tipo tallo-lazo (*stem-loop*) interaccionan intramolecularmente, dando lugar a los conocidos como pseudonudos y a los *kissing loops*.

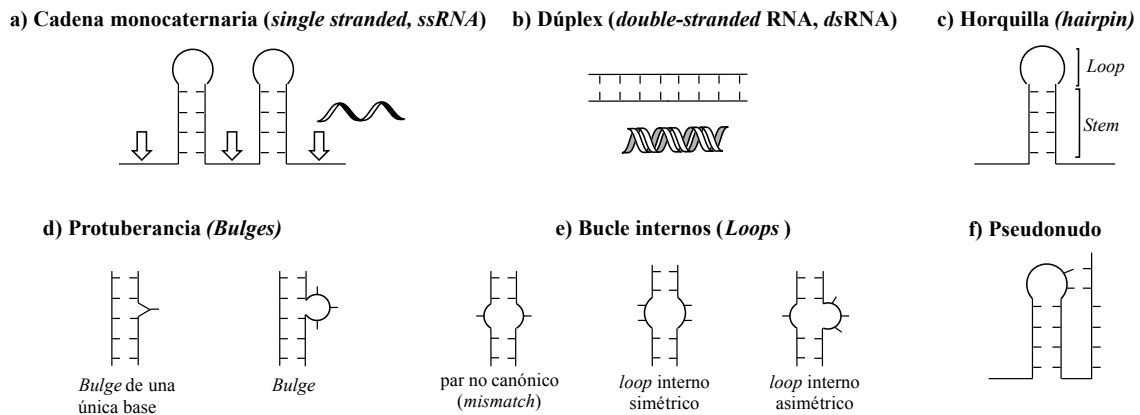


Fig. 1.3. Representación de motivos estructurales presentes en el RNA.

Las células contienen variados tipos y estructuras de RNA que confieren, a cada uno de ellos, una función y actividad celular determinada. Ello es debido a que en las estructuras tridimensionales que adoptan se generan cavidades o sitios de unión que permiten la interacción específica con diversos tipos de moléculas, ya sean proteínas<sup>[9]</sup>, pequeñas moléculas<sup>[10]</sup> u otros RNAs. Así pues, en los más de cincuenta años posteriores al descubrimiento de la estructura del DNA, los científicos han aprendido que el RNA no puede concebirse como un elemento pasivo que ejerce un papel de simple transmisor entre la información genética del DNA y la secuencia primaria de las proteínas, sino que existen otros tipos de RNA no codificantes que tienen un papel esencial en muchos de los procesos celulares.<sup>[11]</sup> Algunos ejemplos son:<sup>[12]</sup>

*Pequeños RNAs Nucleares (snRNA)*: situados en el núcleo celular, se encargan del procesado del mRNA, regulan factores de transcripción (7SK RNA) o polimerasas y mantienen las telomerasas. Normalmente, suelen encontrarse asociados a proteínas formando los llamados snRNPs (*small nuclear ribonucleoproteins*).

*Micro RNAs (miRNAs)*: implicados en la inhibición de la expresión génica utilizando la ruta de la ribointerferencia. Estudios recientes los relacionan con el cáncer, diabetes, desórdenes inmunes y otras enfermedades.

*Pequeños RNAs de interferencia (siRNA)*: implicados en la inhibición de la expresión génica vía la inhibición específica de la transcripción a mRNA. Forma también parte del mecanismo de defensa de los organismos contra RNAs virales o en la organización de la estructura de la cromatina.

*Ribointerruptores (Riboswitch)*: segmentos de mRNA capaces de unirse a pequeñas moléculas para modificar la producción de la proteína codificada como respuesta metabólica a un cambio o ataque en el organismo.

*RNAs catalíticos (Ribozima)*: Se trata de RNAs con actividades enzimáticas. Tienen funciones en los procesos de replicación y procesado del mRNA. Pueden iniciar sus actividades sin asistencia de una proteína adicional.<sup>[13]</sup>

La riqueza estructural y funcional que caracteriza los RNAs, su capacidad de almacenar la información genética y de catalizar reacciones químicas ha llevado a algunos científicos a proponer la llamada hipótesis del "RNA world", en la que se sugiere que existió con

anterioridad al DNA y a las proteínas.<sup>[14-16]</sup> Al respecto hay que decir que, mientras que indiscutiblemente el RNA es capaz de albergar la información genética de un organismo primitivo, solo se han detectado dos clases de reacciones capaces de ser catalizadas por el RNA en la naturaleza, la transferencia del grupo fosforilo y la formación del enlace peptídico. Sin embargo, las ribozimas presentan un gran abanico de estrategias catalíticas que podrían aplicarse a otras reacciones, y se podría llegar a la conclusión que, en principio, el RNA podría catalizar innumerables reacciones de las necesarias para sustentar la vida.<sup>[17]</sup>

Por otro lado, la incidencia del RNA en tantos procesos celulares, lo han convertido en una diana terapéutica relevante, abriéndose así una importante vía para combatir enfermedades humanas a través de la búsqueda de moléculas que lo reconozcan y que permitan regular sus funciones. Es por ello que, en los últimos años, el RNA se ha convertido en uno de los principales centros de atención de la investigación biomédica.

### **Enfermedades asociadas al RNA: Las TRED**

Dada la relevancia de los RNAs en muchos procesos celulares, se puede afirmar que el correcto funcionamiento de las células depende de la precisa expresión de un gran número y variedad de ácidos nucleicos. Normalmente, los RNAs se encuentran en el interior celular unidos a proteínas (*RNA binding proteins*) formando los conocidos complejos ribonucleoproteicos (RNPs), que son las formas funcionales de los RNAs.<sup>[18]</sup> Una mutación que afecte alguno de los componentes de los RNPs, ya sea el RNA, la proteína o los factores requeridos para su acoplamiento, puede ser la causa del desarrollo de una enfermedad.<sup>[19]</sup>

En este contexto se enmarcan las llamadas TRED (*Trinucleotide Repeat Expansion Disorders*) que son un conjunto de enfermedades caracterizadas por la repetición de microsátélites por encima de un número normal de reiteraciones.<sup>[20,21]</sup>

Los microsátélites, también llamados repeticiones de secuencias simples (*simple sequence repeats, SSRs*), son secuencias cortas, polimórficas y repetitivas de uno a seis nucleótidos, siendo las más comunes las de trinucleótidos. Se tiene poco conocimiento de la función genética de estas repeticiones. Aún así, se sabe que los microsátélites se encuentran abundantemente distribuidos, aunque no uniformemente, por todo el genoma humano llegando a constituir el 3% de éste.<sup>[22]</sup> Debido a su alta mutabilidad, se cree que los SSRs juegan un papel importante en la evolución del genoma creando y manteniendo la gran diversidad genómica de los seres vivos.<sup>[23-25]</sup> Estas secuencias repetitivas pueden expandirse o contraerse por defectos en la replicación, reparación o recombinación del DNA. La alteración de la longitud natural de los tramos con repeticiones puede desencadenar una patología como las de las TRED (Tabla I.1).<sup>[26]</sup>

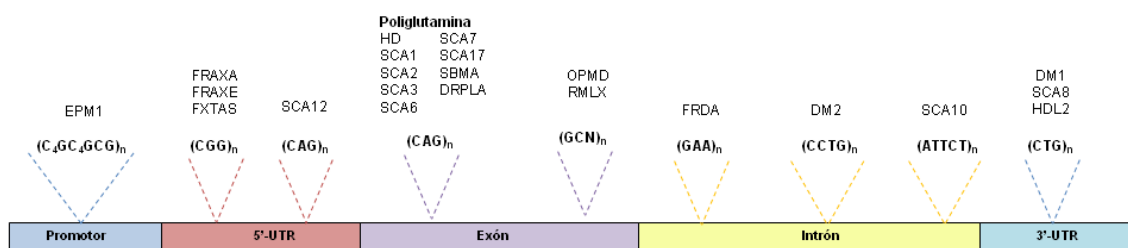
Enfermedad	Unidad Repetitiva (Gen)	Localización Repetición	Síntomas Característicos
<b>Enfermedades poliglutámicas</b>			
HD	CAG ( <i>HTT</i> )	Reg. codificante	Corea, distonía, def.cognitivas, problemas psiquiátricos.
SCA1	CAG ( <i>ATXN1</i> )	Reg. codificante	Ataxia, disartria, espasticidad, oftalmoplegia.
SCA2	CAG ( <i>ATXN2</i> )	Reg. codificante	Ataxia, hiporeflexia, afecciones motoras, parkinson.
SCA3	CAG ( <i>ATXN3</i> )	Reg. codificante	Ataxia, distonía, espasticidad.
SCA6	CAG ( <i>CACNA1A</i> )	Reg. codificante	Ataxia, disartria, pérdida sensorial, temblores, nistagmo.
SCA7	CAG ( <i>ATXN7</i> )	Reg. codificante	Ataxia, disartria, ceguera, enfermedad de la distrofia de conos y bastones.
SCA17	CAG ( <i>TBP</i> )	Reg. codificante	Ataxia, demencia, corea, convulsiones, distonía.
SBMA	CAG ( <i>AR</i> )	Reg. codificante	Debilidad muscular, espasticidad, fertilidad reducida, ginecomastia.
DRPLA	CAG ( <i>ATN1</i> )	Reg. codificante	Convulsiones, corea, ataxia, demencia.
<b>Enfermedades con mutaciones en regiones no codificantes: mecanismo de pérdida de función</b>			
FRAXA	CGG ( <i>FMR1</i> )	5'UTR	Retraso mental, dismorfia facial, autismo.
FRAXE	CCG ( <i>FMR2</i> )	5'UTR	Retraso mental, hiperactividad.
FRDA	GAA ( <i>FXN</i> )	Intrón	Ataxia, pérdida sensorial, diabetes <i>mellitus</i> , cardiopatías.
<b>Enfermedades con mutaciones en regiones no codificantes: mecanismo de ganancia de función a través del RNA mutante</b>			
DM1	CTG ( <i>DMPK</i> )	3'UTR	Debilidad muscular, miotonía, defectos conductos cardíacos, alteraciones SNC, distrofia muscular, atrofia testicular.
DM2	CCTG ( <i>ZNF9</i> )	Intrón	Como DM1, con posible retraso mental.
FXTAS	CGG ( <i>FMR1</i> )	5'UTR	Ataxia, temblores, parkinson, demencia.
<b>Otras enfermedades</b>			
SCA8	CTG/CAG ( <i>ATXN8</i> )	UTR, reg. codificante	Ataxia, disartria, nistagmo, espasticidad.
SCA10	ATTCT ( <i>ATXN10</i> )	Intrón	Ataxia, disartria, convulsiones, disfagia.
SCA12	CAG ( <i>PPP2R2B</i> )	Promotor, 5'UTR	Temblores, ataxia, espasticidad, demencia.
HDL2	CTG ( <i>JPH3</i> )	3'UTR, Región Codificante	Corea, distonía, deterioro cognitivo.
OPMD	GCG ( <i>PABPN1</i> )	Reg. codificante	Miastenia ocular, disfagia, debilidad muscular.
EPM1	C <sub>4</sub> GC <sub>4</sub> GCG ( <i>CSTB</i> )	Promotor	Mioclono fotosensible, convulsiones, degeneración cerebral.
RMLX	GCG ( <i>ARX</i> )	Reg.Codificante	Retraso mental con convulsiones o con distartria y distonía.

**Tabla I.1.** Características clínicas y moleculares principales de las enfermedades de expansión de repeticiones de tripletes. Abrev: AR, receptor de andrógenos; ARX, aristaless-related homeobox; ATN1, atrofina; ATXN, ataxina; CACNA1A, canal de calcio dependiente del voltage P/Q subunidad  $\alpha$ -1A; SNC, sistema nervioso central; CSTB, cistatina B; DM, distrofia miotónica; DMPK, proteína quinasa de la distrofia miotónica; DRPLA, atrofia dentatorrubal-palidoluisiana; EPM1, epilepsia amioclónica de Unvervicht y Lundborg; FMR1, gen del retraso mental frágil X 1; FMR2, gen del retraso mental frágil X 2; FRAXA, síndrome de la X frágil; FRAXE, síndrome de la X frágil asociada a la zona FRAXE; FRDA, ataxia de Friedreich; FXN, frataxina; FXTAS, ataxia y temblor asociados al X frágil; HD, enfermedad de Huntington; HDL2, enfermedad de Huntington tipo 2; HTT, huntingtina; JPH3, junctofilina 3; OPMD, distrofia muscular oculofaringeal; PABPN1, proteína de unión a poli(A) nuclear 1; PPP2R2B, proteína fosfatasa 2 reguladora de la subunidad B isoforma  $\beta$ ; RMLX, retraso mental ligado al cromosoma X; SBMA, atrofia muscular progresiva espinobulbar; SCA, ataxia espinocerebral; TBP, proteína de unión a la caja TATA; UTR, región no traducida; ZNF9, gen dedo de zinc 9.

Desde 1991, cuando se describieron por primera vez las mutaciones patológicas caracterizadas por la repetición aberrante de microsatélites,<sup>[27,28]</sup> ya se han descubierto unas 22 enfermedades genéticas asociadas a la expansión de trinucleótidos (Tabla I.1).<sup>[29,30]</sup> Estas patologías suelen presentar síntomas neurológicos o neuromusculares. Generalmente, las enfermedades son causadas por la expansión del triplete CNG, donde N es cualquier nucleótido, aunque también se describen trastornos producidos por otros tripletes o bien, mutaciones en las que el microsatélite expandido está formado por más de tres nucleótidos (tetra-, penta-, ..., nucleótidos). En una persona sana, el número habitual de repeticiones de estas secuencias suele oscilar entre las 5 y 40. A partir de unas 50-60 repeticiones, el individuo suele presentar síntomas de la patología. Se pueden resumir las características básicas de la mayoría de las TRED en:<sup>[31]</sup>

- Inestabilidad del gen mutado, el cual es más propenso a sufrir expansiones tanto a nivel somático como germinal.<sup>[32]</sup>
- Anticipación: en sucesivas generaciones, se observa la aparición de los síntomas de la enfermedad a edades inferiores y con mayor severidad. Esto es debido a que la severidad del fenotipo es proporcional a la longitud de la expansión.<sup>[33]</sup>
- Aumento del riesgo de herencia de la mutación cuantas más generaciones haya sido transmitida.

Las TRED pueden clasificarse según el mecanismo molecular por el que se desarrolla la enfermedad, el cual viene determinado por la secuencia y la zona del gen en la que se encuentre la mutación.<sup>[34]</sup> Así pues, se pueden dividir en dos subclases: aquellas caracterizadas por la expansión del triplete CAG en regiones exónicas o codificantes, también conocidas como enfermedades poliglutamínicas<sup>[35]</sup>, y aquellas en las que la mutación se presenta en una región del genoma no codificante (Figura I.4).



**Fig. I.4.** Secuencia y localización de las expansiones de repeticiones asociadas a enfermedades neurodegenerativas. Abrev: DM, distrofia miotónica; DRPLA, atrofia dentatorrubal-palidoluisiana; EPM1, epilepsia amioclónica de Unverricht y Lundborg; FRAXA, síndrome de la X frágil; FRAXE, síndrome de la X frágil asociada a la zona FRAXE; FRDA, ataxia de Friedreich; FXTAS, ataxia y temblor asociados al X frágil; HD, enfermedad de Huntington; HDL2, enfermedad de Huntington tipo 2; OPMD, distrofia muscular oculofaríngea; RMLX, retraso mental ligado al cromosoma X; SBMA, atrofia muscular progresiva espinobulbar; SCA, ataxia espinocerebral; UTR, región no traducida. Figura basada en la de Mirkin y cols.<sup>[29]</sup>

En las enfermedades poliglutamínicas, entre las que se incluyen la enfermedad de Huntington y la mayoría de ataxias espinocerebrales, la expansión del triplete CAG en el mRNA codifica para secuencias poliglutamínicas en la proteína generada. Aunque las proteínas mutantes de

las diferentes enfermedades no compartan similitudes secuenciales ni estructurales excepto la región poliglutámica en sí, todas ellas presentan semejantes fenotipos, lo que sugiere que poseen mecanismos patológicos comunes. Parece ser que las proteínas mutantes pueden padecer una lisis y liberar fragmentos tóxicos de poliglutamina. Estos fragmentos podrían agregarse en el medio celular generando inclusiones intracelulares que provoquen toxicidad a través de alteraciones en la transcripción, metabolismo o por el *stress* celular causado.<sup>[36,37]</sup> Por otro lado, no se descarta que estas colas poliglutámicas provoquen cambios estructurales en la proteína mutante que desencadenen interacciones anómalas con el resto de biomoléculas celulares.<sup>[38]</sup>

Las TRED causadas por expansiones de tripletes en regiones no codificantes del genoma, se caracterizan por una larga y variada expansión que causa una múltiple disfunción o degeneración de los tejidos del individuo afectado. Entre ellas, se encuentran la ataxia de Friedreich<sup>[39]</sup>, los síndromes de la X<sup>[40]</sup> y XE frágiles<sup>[41]</sup>, las ataxias espinocerebrales 8, 10 y 12 y las distrofias miotónicas 1 y 2, entre otras. Los fenotipos de cada enfermedad, así como el mecanismo molecular de ésta, varían en función de la secuencia, localización y número de microsatélites (ver Tabla I.1).

### **Las distrofias miotónicas 1 y 2**

#### *Las enfermedades*

La distrofia miotónica de tipo 1 (DM1), o enfermedad de Steinert, fue descrita por primera vez en 1909 como una enfermedad distinta a la miotonía congénita.<sup>[42,43]</sup> No fue hasta después de casi un siglo, en 1992, cuando se clasificó como la primera enfermedad de tipo TRED autosómica dominante causada por la expansión de un microsatélite en una región génica no codificante.<sup>[44]</sup>

La DM1 es la forma de distrofia muscular más común entre la población adulta con una incidencia de 1 cada 8000 individuos, aunque esta incidencia puede variar mucho según la población de estudio.<sup>[45]</sup> Su notable prevalencia y el hecho de que fue de las primeras TRED descubiertas, la convierte en una de las enfermedades causadas por la expansión de trinucleótidos más estudiada. La sintomatología de la enfermedad puede variar bastante según el grado que presente el individuo. Se diferencian cuatro grados según el momento en el que se inicia el desarrollo de la patología: si se inicia en un estadio infantil, adulto o tardío oligosintomático, o bien si se trata de la forma congénita de DM.<sup>[46]</sup>

Los síntomas más característicos de la DM1 son la relajación lenta de los músculos después de una contracción voluntaria (miotonía), una progresiva distrofia muscular, debilidad muscular sobre todo en cara y mandíbula (ptosis), pero también en los músculos pulmonares, en los músculos distales de las extremidades y en el músculo esternocleidomastoideo, disfgia, cataratas, hiperinsulinemia y resistencia a la insulina, hiperglucemia, hipogammaglobulinemia, dolor abdominal, atrofia testicular y calvicie frontal en hombres, defectos en los conductos cardíacos pudiendo causar arritmias o hasta fallos cardíacos, alteraciones variadas en el sistema nervioso central como somnolencia, trastornos de la personalidad, déficit de memoria, desorden del comportamiento, así como dificultades en el aprendizaje o retraso mental. Así pues, se trata de individuos incapacitados para poder llevar una vida normal y con una esperanza de vida muy reducida.<sup>[45-47]</sup>

A diferencia de la DM1, descrita a principios del s. XX, la distrofia muscular de tipo 2 (DM2) fue clasificada hace solo unos 20 años.<sup>[48]</sup> Inicialmente, se asociaban diferentes fenotipos de ésta a la Miopatía Proximal Miotónica (PROMM) y a la Distrofia Miotónica Proximal (PMD).<sup>[49,50]</sup> Fue en 2001 cuando se adoptó la nomenclatura DM1 y DM2 al realizar un mapa genético y determinar que todos los fenotipos asociados a PROMM y PMD radicaban en la misma mutación de un mismo gen. La DM2 también es una enfermedad clasificada dentro de las TRED, autosómica, dominante y multisistémica. La prevalencia en la población es menor que en la DM1, se estima entre 1 y 7 individuos afectados por cada 10000 personas.<sup>[51,52]</sup>

En cuanto a su sintomatología, la DM2 se diferencia de la DM1 en que no existe su forma congénita, el grupo de músculos afectados mayoritariamente son los proximales (en la DM1 se ven principalmente afectados los distales), presenta menor severidad en la distrofia muscular, miotonía, cardiopatías y en las afecciones al SNC; no suelen presentarse cataratas, ni diabetes, ni retrasos mentales, a la vez que los síntomas suelen manifestarse a mayor edad, con lo que la esperanza de vida es alrededor de la media.<sup>[47,53]</sup>

### *Origen patológico*

A principios de los 90 se determinó que la DM1 es causada por la expansión mutante del triplete CTG en el extremo 3' de la región no traducida (3'UTR) del gen de la proteína quinasa de la distrofia miotónica (*DMPK*) localizado en el cromosoma 19q13.3.<sup>[44,54,55]</sup> El número de repeticiones en individuos no afectados se sitúa entre 5 y 38 y es a partir de las 50 repeticiones cuando se pueden manifestar algunos de los síntomas de la enfermedad. Como ya se ha comentado, la severidad de los fenotipos y la edad en la que ésta empieza a desarrollarse es directamente proporcional a la longitud de las repeticiones (anticipación) y se ha observado que más de 1500 repeticiones resultan en un severa forma congénita de DM1.

Los individuos afectados por la segunda forma de DM presentan una expansión del tetranucleótido CCTG en el intrón 1 del gen *ZNF9* (dedo de zinc 9) situado en el cromosoma 3q21 tal y como se describió en 2001.<sup>[56]</sup> El número normal de repeticiones del cuadruplete CCTG es entre 10 y 26, y a partir de 75 repeticiones se desarrolla la enfermedad pudiendo llegar, en algunos individuos, hasta las 11000 repeticiones.<sup>[57]</sup>

Así pues, las dos patologías presentan mutaciones distintas situadas en diferentes genes. No obstante, como se ha comentado en el apartado anterior, sus sintomatologías son muy parecidas. Esta evidencia, parece indicar que el mecanismo molecular por el que se desarrollan los fenotipos de ambas afecciones podría ser el mismo.

### *Mecanismo Molecular de las DMs*

A lo largo de los años han surgido distintas teorías para explicar el mecanismo molecular o patogénesis de las DMs.<sup>[58,59]</sup>

*Teoría de la haploinsuficiencia de la DMPK.*<sup>[60]</sup> Se postuló que las expansiones del triplete CTG podían ser capaces de alterar la síntesis y el procesado del mRNA que codifica el gen *DMPK* y, consecuentemente, la proteína producida en la traducción de dicho mRNA perdiese su función. Esta teoría surgía a partir de la observación que en los tejidos musculares de

pacientes con DM existe un déficit de la expresión del *DMPK* mRNA y de la correspondiente proteína traducida.<sup>[61]</sup> No obstante, estudios con ratones mutados en el gen *DMPK* solo presentaron una ligera miopatía y ningún otro fenotipo de la DM1. La ausencia de sintomatología relacionada con la DM1 hizo descartar la teoría de la haploinsuficiencia de la *DMPK* (o de la *ZNF9* en el caso de la DM2)<sup>[62]</sup> al menos como causa principal de la patología.<sup>[63,64]</sup>

*Efectos del alelo expandido hacia genes vecinos.* Se propuso la hipótesis que las repeticiones CTG y CCTG alteraban la estructura de la cromatina impidiendo la correcta expresión de sus genes vecinos. Esta teoría se basaba en el hecho de que los pacientes con DM presentan niveles reducidos del factor de transcripción que codifica el gen *SIX5*.<sup>[65,66]</sup> Sin embargo, ensayos llevados a cabo con ratones sin el gen *SIX5*, no manifestaron síntomas de la afección y únicamente desarrollaron cataratas.<sup>[67,68]</sup> Esta evidencia parecía indicar que esta reducción en la expresión podría contribuir a la sintomatología de la DM, pero no explicarla globalmente.<sup>[69]</sup>

*Efectos patógenos del RNA expandido.* Las características clínicas de ambas enfermedades son muy parecidas aunque las mutaciones que las causan son completamente distintas. Este hecho podía ser explicado si ambas fueran causadas por un mismo mecanismo patogénico. Una de las principales características observables tanto en la DM1 como en la DM2, es la correcta transcripción y procesado del RNA proveniente del alelo mutante en *DMPK*, aunque éste es esencialmente retenido en el núcleo celular.<sup>[20,70]</sup> Este dato parecía indicar un papel importante del RNA expandido en la patogénesis. Con el objetivo de verificarlo, se realizaron unos ensayos con ratones mutados con 250 repeticiones de CTG en el 3'UTR del gen de la actina humana esquelética (*human skeletal actin*). Los ratones mutados reprodujeron las características típicas de miotonía y histología muscular anormal de la DM1, mientras que una población con simplemente 20 repeticiones del triplete CTG no mostró sintomatología alguna.<sup>[71,72]</sup> Estos resultados indicaban que la expresión de CTG es capaz de reproducir las principales características de la DM1 independientemente del gen en el que se encuentre localizado, a la vez que la longitud de la mutación es responsable de la severidad del fenotipo. Poco después, en 2001, se estudió una población de ratones transgénicos que habían sido mutados con la expansión (CTG)<sub>300</sub> en el gen *DMPK*. Estos ratones, no solo manifestaban síntomas de miotonía sino que también presentaban una expresión anormal de las isoformas TAU cerebrales e histologías anormales de los tejidos musculares.<sup>[73]</sup>

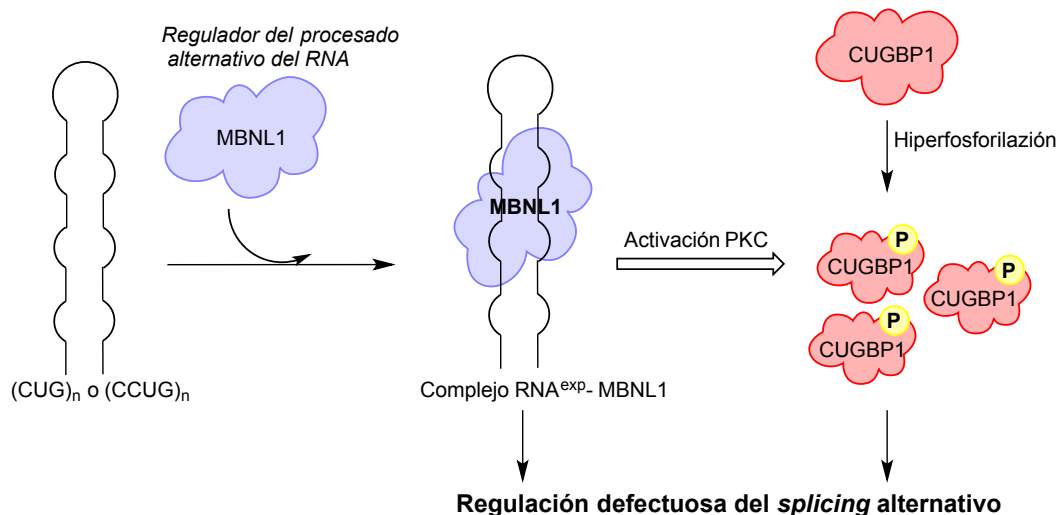
Así pues, todo parecía indicar que el RNA expandido tenía un efecto tóxico en la célula. En vista de estas observaciones, se planteó la hipótesis de que el RNA mutante (CUG<sub>n</sub> y CCUG<sub>n</sub>), producto de la transcripción de los alelos expandidos y acumulado en el núcleo celular, podía ser capaz de interactuar y secuestrar ciertas proteínas que se unen al RNA (*RNA-binding proteínas*) con la consecuente desregulación de su función.<sup>[74,75]</sup>

En los años posteriores, el trabajo de muchos grupos de investigación ha demostrado que el principal defecto producido por la acumulación de los transcritos CUG<sub>n</sub> y CCUG<sub>n</sub> en el medio celular es una regulación deficiente de más de una docena de procesados alternativos (*alternative splicing*) del mRNA.<sup>[20,76]</sup> En este contexto, se han identificado dos proteínas capaces de unirse o verse afectadas por los RNA tóxicos: la CUG-BP1 (*CUG binding protein1*) y la MBNL1 (*muscleblind-like 1*),<sup>[77]</sup> ambas relacionadas con la regulación del procesado alternativo del mRNA.<sup>[78]</sup> El procesado o *splicing* es el proceso celular asociado a la maduración



del *pre*-mRNA. La mayoría de genes codificantes para proteínas contienen algunos segmentos (intrones) que formarán parte del transcrito inicial (*pre*-mRNA) pero que no serán incluidos en el mRNA que será traducido. La eliminación de los intrones y la unión de los segmentos que componen el mRNA maduro (exones) recibe el nombre de *splicing*. El procesado alternativo se produce cuando un mismo *pre*-mRNA puede generar diferentes mRNAs codificantes de distintas proteínas por combinación de diferentes exones.<sup>[79]</sup>

En cuanto a la proteína CUGBP1, se ha observado que es capaz de unirse *in vitro* a pequeños oligonucleótidos (CUG)<sub>n</sub><sup>[80]</sup> pero no interacciona con RNA de doble cadena ni es secuestrada por el transcrito (CUG)<sub>n</sub> quedando retenida en el núcleo celular.<sup>[81,82]</sup> Los estudios llevados a cabo indican que solo MBNL1 se une específicamente al RNA expandido en los individuos con DM. La proteína presenta una gran afinidad por las repeticiones CUG<sup>[74]</sup> y CCUG<sup>[75]</sup> debido a la gran similitud estructural con su diana natural. Por otro lado, se ha observado que el número de proteínas unidas al RNA expandido es proporcional al número de repeticiones,<sup>[80,83]</sup> uniéndose una proteína MBNL1 por cada dos motivos 5' CUG/3' GUC.<sup>[84]</sup> Así pues, la proteína MBNL1 queda retenida en las inclusiones del RNA tóxico<sup>[85]</sup> reduciendo, consecuentemente, su concentración efectiva en el núcleo celular y provocando deficiencias en el procesado de algunos *pre*-mRNAs.<sup>[86]</sup>



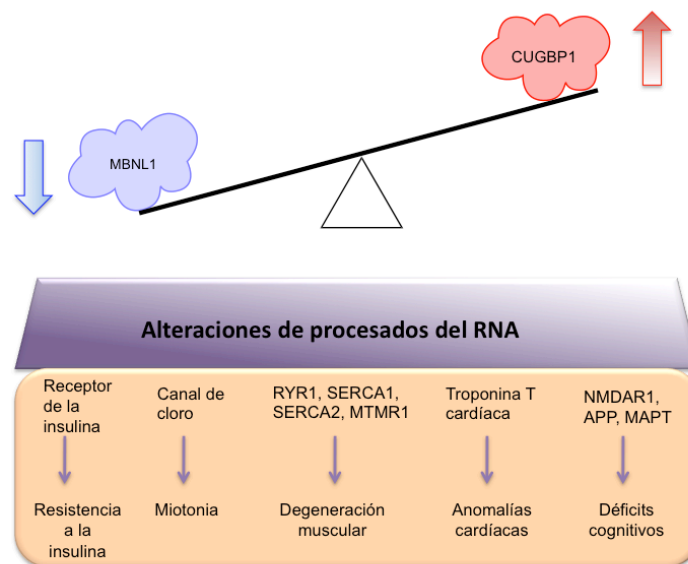
**Fig.I.5.** Mecanismo bioquímico patológico de las DMs. MBNL1 es secuestrada por las estructuras que adopta el transcrito mutante de RNA quedando retenida en el núcleo celular. Por otro lado, se activa la fosforilación de la proteína CUGBP1, a través de la PKC, provocando una regulación errónea del *splicing* alternativo celular.

Como consecuencia de la baja concentración de MBNL1 libre, en una primera instancia, se activa la proteína quinasa C (PKC) que hiperfosforila la CUGBP1, estabilizándola y provocando un aumento de su concentración efectiva (Figura I.5).<sup>[87,88]</sup> La función reguladora de MBNL1 y CUGBP1 es antagónica, esto significa que mientras MBNL1 promueve la transcripción del patrón de *splicing* adulto, CUGBP1 participa en la retención del patrón fetal.<sup>[89]</sup> Así pues, la reducción de MBNL1 en el núcleo celular conjuntamente con el aumento de CUGBP1 provoca que en el organismo del individuo afectado predominen los patrones de *splicing* fetal generando isoformas de proteínas embrionarias en adultos.<sup>[59,90,91]</sup> Por ejemplo, se han detectado procesados alternativos defectuosos en el receptor de insulina, lo cual provoca

resistencia a esta hormona a los individuos con DM1.<sup>[92,93]</sup> Por otro lado, un exceso en la inclusión del exón 5 de la cTNT (*cardiac troponin T*) produce defectos de los conductos cardíacos.<sup>[84,94]</sup> Se ha determinado que la pérdida de MBNL1 activa en el medio celular puede explicar más del 80% de los defectos del procesado asociadas a las DMs (Figura I.6).<sup>[76]</sup>

En resumen, todas las evidencias científicas parecen indicar que el principal mecanismo patológico de las DMs es una pérdida de función de la proteína MBNL1 debido a su secuestro por parte de los CUG<sup>exp</sup> y CCUG<sup>exp</sup>, mientras que la proteína CUG-BP1 sufre una ganancia de función que provoca un patrón de *splicing* fetal en individuos adultos.

Hay otros fenómenos no relacionados con el *splicing* alternativo que también son relevantes en la sintomatología de las DMs. Por ejemplo, la baja concentración de MBNL1 provoca que los procesos celulares que esta proteína regula se vean afectados. Es el caso de la regulación defectuosa de algunos miRNAs del tejido cardíaco, controlados por MBNL1, que explicaría algunas de las disfunciones cardíacas de los individuos con DMs.<sup>[95]</sup> El RNA tóxico también parece producir otros efectos independientes de la deficiencia de la proteína MBNL1.<sup>[76,96,97]</sup>



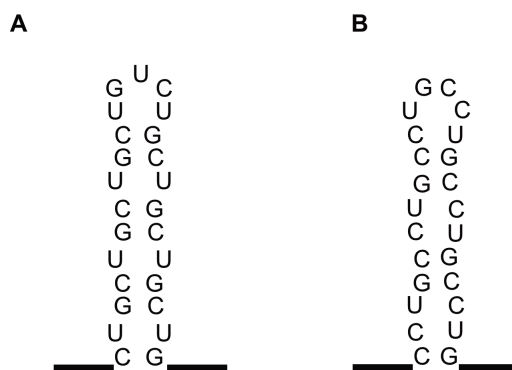
**Fig. I.6.** Procesados alternativos defectuosos que median la patogénesis de la DM1 y DM2. El aumento de la concentración de CUGBP1 y la disminución de MBNL1 afecta al procesado alternativo de algunos transcritos causando diferentes fenotipos clínicos en ambas enfermedades.

### La estructura de rCUG<sup>exp</sup> y rCCUG<sup>exp</sup>

Existe poca información estructural sobre los RNA con expansiones de tripletes. No obstante, la estructura CUG<sup>exp</sup> es una de las más estudiadas por su relevancia como diana terapéutica. En 1997, Napierala y cols. hicieron una primera aproximación a la estructura de CUG<sup>exp</sup> mediante ensayos enzimáticos.<sup>[98]</sup> Los datos obtenidos fueron posteriormente corroborados por otras investigaciones mediante microscopía electrónica de (CUG)<sub>130</sub>, fusiones térmicas y digestiones enzimáticas.<sup>[87,99]</sup> En estos primeros estudios se concluyó que el RNA asociado a la DM1 forma estructuras tallo-lazo u horquilla (*hairpins*) en los que el tallo de la estructura se compone de dos pares G-C consecutivos entre apareamientos no canónicos (*mismatches*) U-U (Figura I.7A).

En 2003, un estudio más exhaustivo mediante ensayos químicos y enzimáticos de seis de las repeticiones asociadas a enfermedades neurodegenerativas, confirmó que oligonucleótidos CUG<sub>n</sub> con n > 10 se estructuran en solución como Napierala había descrito.<sup>[100]</sup> Mientras que, con n inferiores, el oligonucleótido se encuentra predominantemente como monocadena.

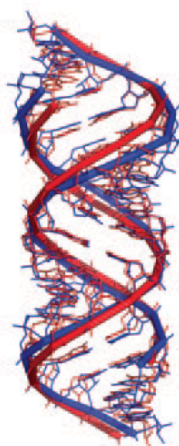
La observación de que largas repeticiones de CCUG presentaban un comportamiento semejante a CUG<sub>n</sub> frente a las nucleasas, permitió concluir que CCUG<sub>n</sub> adopta también una estructura secundaria de tipo *hairpin* con un tallo compuesto por repeticiones de dos *mismatches* C·U entre dos pares C-G (Figura I.7B).



**Fig.I.7.** Estructura de los RNAs asociados a la DM1 (A) y a la DM2 (B) con las repeticiones CUG y CCUG, respectivamente.

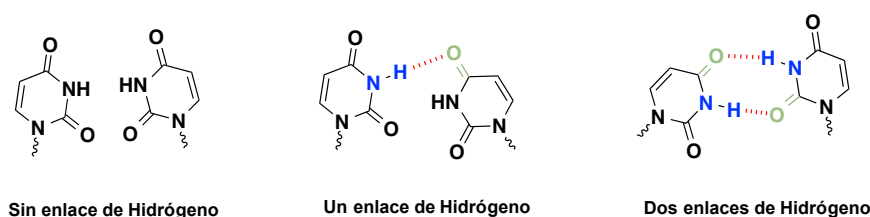
Vale la pena destacar que las conformaciones tipo horquilla de los RNAs expandidos presentan una inestabilidad intrínseca, debido a la abundante presencia de pares no canónicos, que hace que una hebra del tallo se deslice sobre la otra. Estudios estructurales han determinado que cuanto mayor es el número de repeticiones, más estable es la estructura. No obstante, a partir de unas 15 repeticiones, se alcanza un valor máximo.<sup>[101]</sup>

Unos años más tarde, en 2005, Berglund y cols. consiguieron cristalizar el oligonucleótido r(CUG)<sub>6</sub> y describieron su estructura mediante difracción de rayos X de alta resolución (1.58 Å).<sup>[102]</sup> Las repeticiones de CUG forman hélices de doble cadena parecidas a la forma A del RNA. Esta estructura presenta alguna distorsión debido a la presencia de los *mismatches* U·U, situados entre dos pares C-G, que provocan un surco menor más ancho y menos profundo y, a la vez, un surco mayor más estrecho y profundo (Figura I.8). En cuanto a los pares no canónicos U·U, no se encontraron evidencias de una distorsión importante en el esqueleto de la cadena para acomodar estos pares de bases formando algún enlace de hidrógeno. No obstante, dos de cada 12 pares U·U observables parecían estar separadas por una distancia que les permitiría la formación de un enlace de hidrógeno.



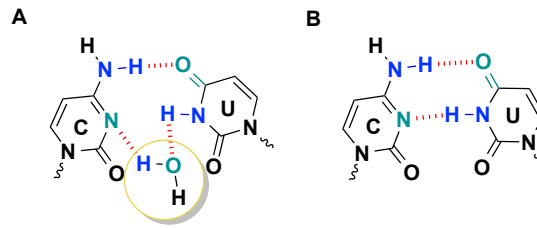
**Fig. I.8.** Comparación entre la estructura de r(CUG)<sub>6</sub> determinada por difracción de rayos X por Berglund y *cols.* y la forma A del RNA. Superposición de r(CUG)<sub>6</sub> (azul) y la forma canónica A de RNA (roja). Figura tomada de la referencia 102.

Más recientemente, se han realizado algunos estudios para determinar si existe o no interacción entre las Us de este par no canónico. En uno de ellos se han analizado de nuevo los datos de rayos X de Berglund y se ha estudiado el dúplex G(CUG)<sub>2</sub>C (1.23 Å).<sup>[103]</sup> En esta publicación, se llega a la conclusión que existe un enlace de hidrógeno entre el O4 de una U y el N3-H de la segunda U. Posteriores estudios estructurales mediante RMN combinada con simulaciones de dinámica molecular<sup>[104]</sup> y difracción de rayos X,<sup>[105]</sup> parecen indicar que, aunque la conformación de menor energía se alcanza cuando se establece un enlace de hidrógeno entre las Us, existe un equilibrio dinámico entre las conformaciones con cero (15.9%), uno (76.5%) y dos enlaces de hidrógeno (7.6%) (Figura I.9).



**Fig. I.9.** Interacciones observadas del par no canónico U-U presente en la estructura CUG<sup>exp</sup>.

A principios de 2014, Disney y *cols.* han descrito la estructura de CCUG<sub>n</sub> determinada mediante estudios de difracción de rayos X (resolución de 2.35 Å) de un RNA estructurado como una horquilla, estabilizada por el tetra/*loop* GAAA, que contiene tres repeticiones de 5' CCUG/GUCC 3'.<sup>[106]</sup> Los datos estructurales confirman los estudios publicados por Sobczak en 2003.<sup>[100]</sup> Las repeticiones CCUG<sub>n</sub> forman *loops* internos periódicos debido a los dos apareamientos no canónicos C-U entre dos pares C-G consecutivos. La estructura se asemeja a la forma A del RNA aunque presenta importantes distorsiones sobre todo en el *loop* central. Se ha observado que en el bucle terminal del tallo los pares C-U presentan un comportamiento distinto a los otros dos. En este caso, los pares no canónicos C-U están estabilizados por un enlace de hidrógeno entre el NH<sub>2</sub> (C) y el O4 (U) y una interacción adicional vía una molécula de agua entre el N3 (C) y el N3-H (U). Esta unión a través de moléculas de agua de solvatación ya había sido descrita anteriormente en estudios del par C-U por RMN y dinámica molecular.<sup>[107-109]</sup> Por otro lado, en los *loops* centrales de la cadena, cada par C-U parece establecer dos enlaces de hidrógeno, el primero entre NH<sub>2</sub> (C) y el O4 (U) y el segundo entre el N3 (C) y el N3-H (U) (Figura I.10.).



**Fig. I.10.** Interacciones observadas por difracción de rayos X entre las bases de los pares no-canónicos C-U. **A)** Interacción mediante un enlace de hidrógeno y a través de una molécula de agua. **B)** Interacción mediante dos enlaces de hidrógeno.

### **Estrategias terapéuticas contra las DMs**

Actualmente no existe un tratamiento efectivo para la DM1 ni la DM2 capaz de prevenir o revertir la progresión de la enfermedad. Los individuos que sufren estas patologías solo pueden ser tratados para atenuar la sintomatología de la afección. Sin embargo, a partir de todos los progresos en el conocimiento de las DMs, en los últimos años han surgido diferentes estrategias terapéuticas con el objetivo de revertir los síntomas de estas patologías.

En un primer nivel, estas estrategias se pueden clasificar en tres tipos según la diana a la que se dirijan: al DNA, al RNA o a las proteínas.<sup>[110]</sup>

A nivel de DNA se trata de terapias dirigidas a detener la principal causa de la enfermedad, es decir, el proceso de expansión propiamente. Se trata pues, de estrategias que pretenden evitar o prevenir la expansión somática de las repeticiones C(C)TG en sus respectivos genes. Se han descrito algunas tecnologías innovadoras que podrían llegar a ser esperanzadoras<sup>[111,112]</sup> y algunas pequeñas moléculas que parecen ser capaces de reducir la expansión somática de repeticiones.<sup>[113]</sup> No obstante, todo indica que se trata de una estrategia con poco futuro terapéutico.

Las terapias a nivel proteico son aquellas dirigidas a normalizar la actividad celular de CUGBP1 y MBNL1. Por ejemplo, el reemplazamiento de MBNL1, es decir, proporcionar niveles de proteína capaces de saturar los transcritos tóxicos y, que el exceso libre, pueda desarrollar sus funciones.<sup>[114]</sup> Otra opción puede ser la restauración del nivel de expresión normal de la proteína CUGBP1 mediante el bloqueo de la actividad de la PKC.<sup>[88,115,116]</sup> Las dos estrategias han dado resultados *in vivo* y, aunque aún parecen estar lejos de poder ser aplicadas en individuos enfermos, demuestran que los efectos del RNA tóxico sobre el organismo son reversibles.

Sin embargo, las estrategias más prometedoras son las dirigidas al RNA tóxico. En este grupo se engloba la eliminación de las repeticiones C(C)UG<sub>n</sub> del transcrito y la inhibición de la unión RNA tóxico-MBNL1 (Figura I.11).

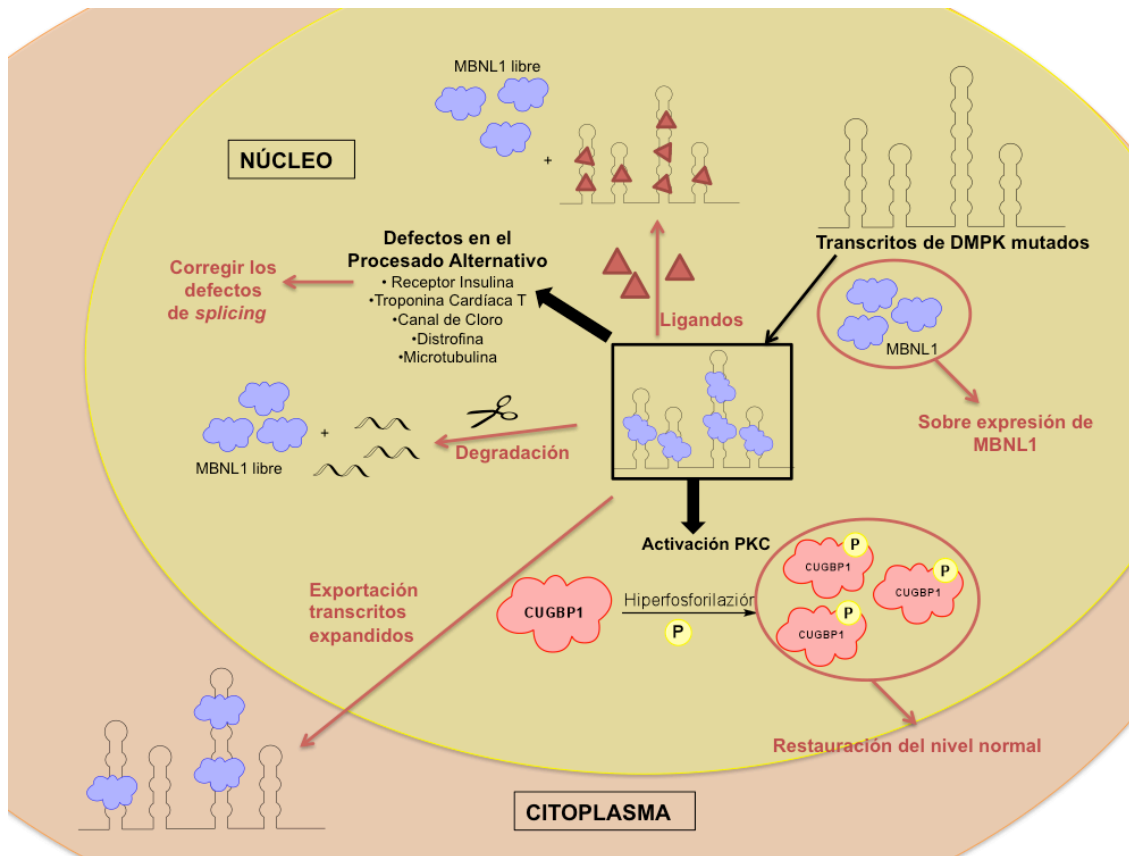


Fig. I.11. Estrategias desarrolladas para combatir la patogénesis de las DMs (en rojo). Figura adaptada de la ref. 126.

- **Estrategias dirigidas a degradar el transcrito de RNA expandido.**

Con esta estrategia se pretende eliminar los transcritos mutantes C(C)UG<sup>exp</sup> y revertir todo el mecanismo patológico de las DMs. Se ha demostrado que la degradación de los RNAs tóxicos provoca una importante mejoría de la sintomatología de las DMs. La mayoría de estas aproximaciones se basan en cadenas de ácidos nucleicos (DNA o RNA) capaces de hibridarse con el RNA tóxico.

Un ejemplo son las ribozimas, ampliamente empleadas como herramienta de reparación de mRNAs mutantes para producir un transcrito normal.<sup>[117]</sup> En este contexto, se ha diseñado una ribozima tipo *cabeza de martillo* que degrada los transcritos mutantes de *DMPK* con buenos resultados.<sup>[118]</sup> Otra aproximación consiste en utilizar oligonucleótidos antisentido (ASO).<sup>[119]</sup> En la literatura se encuentran ASO modificados químicamente así como un (CAG)<sub>7</sub> modificado como 2'-O-metilo fosforotioato (PS58) descrito por Mulders<sup>[120]</sup> capaz de silenciar el transcrito expandido y reducir sus agregados ribonucleares selectivamente sin activar el mecanismo de la RNasa-H. Por otro lado, los LNA (*locked nucleic acids*) *gapmers* de Lee y cols. degradan el transcrito mutante mediante la activación de la RNasa-H.<sup>[121]</sup>

Los siRNAs también se han usado con éxito para inducir la degradación específica del RNA tóxico<sup>[122,123]</sup> en células mamíferas<sup>[124]</sup> y en tejidos de individuos con DM1.<sup>[125]</sup>

- **Estrategias dirigidas a la inhibición de la unión RNA<sup>exp</sup>-proteína.**

La otra prometedora estrategia para abordar la toxicidad de los RNA retenidos en el núcleo celular, es bloquear su interacción patógena con la *RNA-binding protein* MBNL1.

*Oligonucleótidos antisentido.* Wheeler y cols. han descrito el único oligonucleótido antisentido capaz de unirse a las repeticiones de CUG sin inducir su degradación.<sup>[126]</sup> CAG25, un oligonucleótido morfolino antisentido, es capaz de invadir las horquillas CUG<sub>n</sub> liberando la proteína MBNL1 y restaurando el correcto procesado alternativo al prevenir su unión al transcrito aberrante. El estudio detallado de su mecanismo de acción demostró que la administración de CAG25 producía una eliminación del 50% de los agregados nucleares debido a su exportación al citoplasma. Anteriormente a este trabajo, Mastroiannopoulos trabajó en la exportación de transcritos de CUG expandidos al citoplasma como un posible tratamiento de la DM. Fue capaz de exportar el transcrito mutante retenido en el núcleo celular con la ayuda de un elemento regulatorio viral post-transcripcional (WPRE).<sup>[127,128]</sup> Sin embargo, más allá de estos estudios, no se han diseñado moléculas con el objetivo de exportar los transcritos mutantes de las DMs al citoplasma, y serían necesarios más estudios que demostrasen que la presencia de CUG<sup>exp</sup> en el citoplasma no causa efectos tóxicos inesperados y solo revierte algunos de los síntomas de las DMs.

Vale la pena destacar que se deberían solucionar ciertos aspectos relacionados con el uso de ASO. Por un lado, es necesaria una optimización de la administración de la molécula activa y, por otro lado, existe la necesidad de producir ASOs selectivos de cada RNA mutado.

*Pequeñas moléculas o ligandos.* Otra aproximación consiste en utilizar pequeñas moléculas con gran afinidad hacia los transcritos mutantes CUG<sup>exp</sup> y CCUG<sup>exp</sup> que sean capaces de desplazar MBNL1 y bloquear su unión. Trabajar con pequeñas moléculas presenta ventajas respecto a la utilización de oligonucleótidos, los cuales tienen poca capacidad de atravesar la membrana celular y una importante inestabilidad en fluidos biológicos.<sup>[129]</sup>

El diseño o la identificación de ligandos de RNA tampoco es un trabajo sencillo. Un ligando de RNA debe:

- i) unirse con gran afinidad a su diana.
- ii) ser muy selectivo, ya que tiene que reconocer su diana preferentemente sobre otros RNA celulares expresados a niveles iguales o superiores, sobre el DNA y sobre las proteínas.
- iii) alcanzar la región correcta de la célula, es decir, donde se encuentra el RNA diana (citoplasma, núcleo...). Esto será posible si el ligando presenta unas propiedades lipo y hidrofílicas determinadas y no es degradado previamente.
- iv) tener una baja toxicidad.

Un desafío a destacar en el diseño de ligandos de RNA es que no existe tanta información estructural como del DNA o de las proteínas. No obstante, la gran biodiversidad estructural de los RNAs, puede ser ventajosa en el diseño racional de pequeñas moléculas selectivas. Sin embargo, a pesar de los grandes progresos de los últimos años,<sup>[11,130]</sup> todavía está muy lejos de alcanzarse el objetivo de diseñar ligandos selectivos de una determinada diana de RNA que esté basado simplemente en el conocimiento de su estructura.

### Ligandos capaces de unirse a $CUG^{exp}$ y $CCUG^{exp}$

Se han publicado muchos trabajos en los que se ha demostrado que el uso de pequeños ligandos selectivos remite gran parte de los fenotipos de la enfermedad, tanto en cultivos celulares<sup>[131]</sup>, modelos de *Drosophila*<sup>[132]</sup> como ratones<sup>[126]</sup> (Figura I.12).

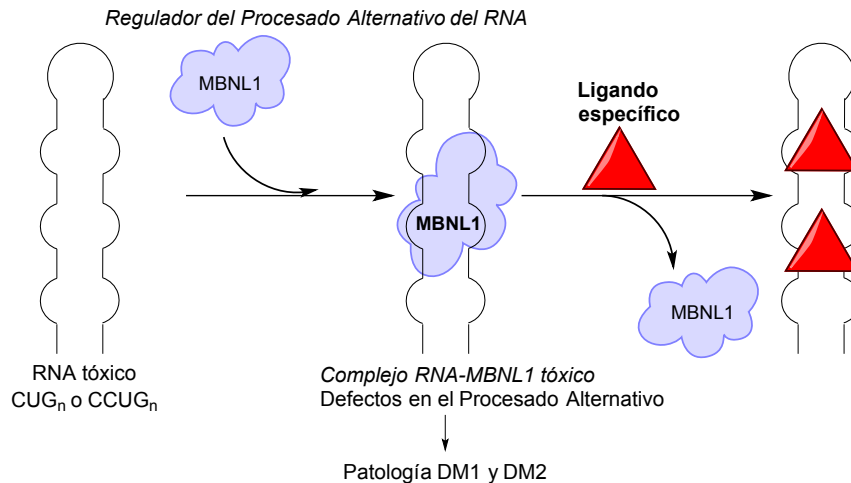


Fig. I.12. Inhibición de la formación del complejo RNA<sub>tóxico</sub>-MBNL1 mediante la unión selectiva de un ligando.

- **Diseño racional de ligandos.**

*Peptoides ensamblados modularmente.* Disney y cols. han trabajado en el diseño y optimización de ligandos modulares de tipo peptoide. Cada módulo contiene un compuesto, conjugado vía química Click, que presenta gran afinidad hacia el RNA. A partir de estas unidades se han sintetizado ligandos modularmente ensamblados con el objetivo de reconocer varios *loops* internos del RNA<sup>exp</sup> a la vez.

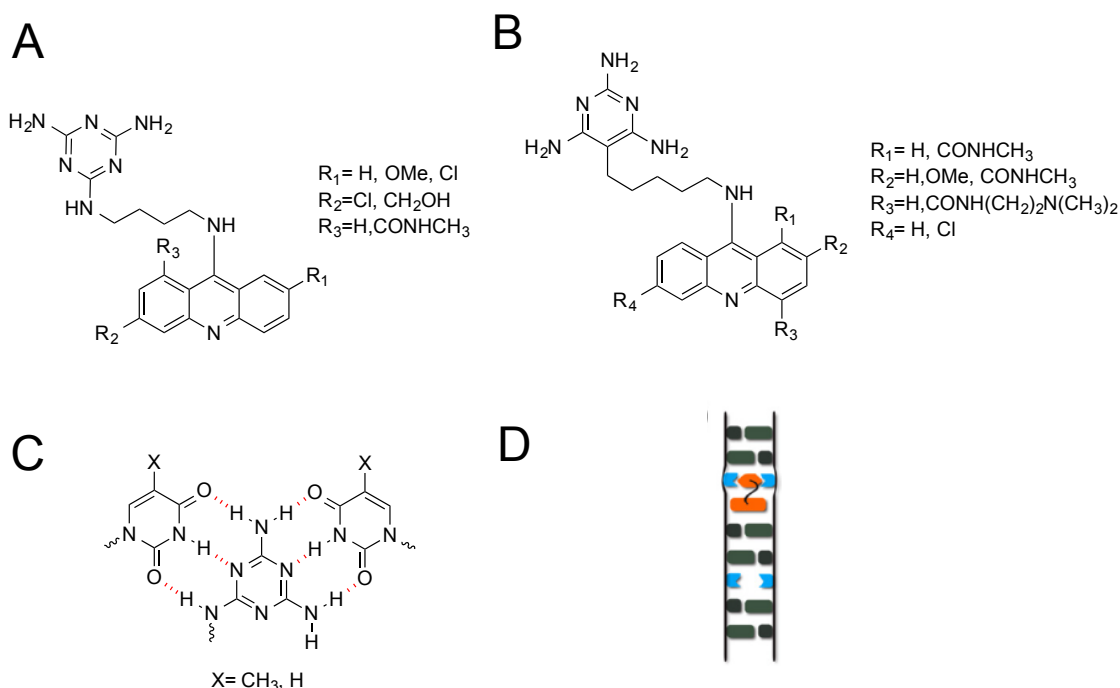
En una primera aproximación,<sup>[133]</sup> el motivo de reconocimiento escogido para interactuar con  $CUG^{exp}$  fue el compuesto Hoechst 33258, que ya había sido descrito por su capacidad de unirse a  $5' \underline{CUG}/3' \underline{GUC}$  y  $5' \underline{CAG}/3' \underline{GAC}$ .<sup>[134]</sup> El número de módulos, así como la distancia entre ellos, se optimizó para obtener una buena afinidad frente a un modelo de  $r(CUG)^{exp}$  (Figura I.13). El mejor ligando identificado, compuesto por 5 módulos, presenta una  $IC_{50}$  inferior a  $0.1 \mu M$  y unos buenos valores de selectividad frente varios RNAs. Por otro lado, también se ensayó con buenos resultados la permeabilidad celular en mioblastos de ratón. En 2012, estos compuestos se ensayaron *in vitro* para determinar su efecto sobre las anomalías celulares asociadas a la DM1 y se verificó su actividad.<sup>[138]</sup>





A partir de aquí, varios trabajos posteriores del mismo grupo se han enfocado a optimizar los ligandos con kanamicina A y neamina tanto para la diana de DM1 como para la de DM2, obteniendo  $K_d$  del orden nmolar y selectividades aceptables.<sup>[138-140]</sup>

*Ligandos selectivos de los pares U·U y C·U.* Cuando ya se había iniciado esta tesis doctoral, Zimmerman y cols. describieron un ligando diseñado para unirse al CUG<sup>exp</sup> que es producto de la conjugación de una triaminotriazina y una acridina (Figura I.15A).<sup>[141]</sup> La 2,4,6-triaminotriazina o melamina, tiene la finalidad de actuar como base Janus con el par no canónico T·T en DNA y U·U en RNA, mientras que la acridina pretende interactuar por intercalación y apilamiento con el par contiguo C-G (Figura I.15C y D).



**Fig. I.15.** Ligando descrito por Zimmerman y cols. en 2009. **A)** Ligando formado por el heterociclo melamina conjugado a una acridina. **B)** Ligando formado por la 2,4,6-triaminopirimidina conjugada a distintos derivados de acridina. **C)** Interacción de la base de Janus melamina y el par T·T o U·U. **D)** Posible disposición espacial del ligando al interactuar con la diana (CTG)<sub>n</sub> o (CUG)<sub>n</sub>.

Este compuesto presenta una afinidad por  $r(\text{CUG})^{\text{exp}}$  en el rango nanomolar alto (430 nM) y una afinidad moderada por otros *mismatches* de RNA (entre 6 y 140 veces inferior). Unos años más tarde, el mismo grupo se planteó unir dos de sus ligandos Janus mediante una cadena lo suficientemente larga para que las dos bases Janus pudiesen interactuar con dos pares U·U a la vez, obteniendo un ligando dimérico. Los resultados obtenidos fueron mucho mejores que los anteriores llegando a obtener una afinidad 50 veces mayor.<sup>[142]</sup> El ligando más potente *in vitro* era capaz de penetrar tanto la membrana celular como la nuclear provocando una dispersión ribonuclear casi completa de MBNL1.<sup>[143]</sup>

En 2011, el mismo grupo diseñó una serie de nuevos ligandos para la diana de DM2 manteniendo la misma estrategia, es decir, la unión de una base Janus a un compuesto con alto potencial intercalante.<sup>[144]</sup> Se trata de la conjugación de la 2,4,6-triaminopirimidina a una acridina (Figura I.15B). El mejor de los ligandos presenta una afinidad del orden  $\mu\text{M}$  bajo y una

selectividad moderada hacia otros pares no canónicos de RNA y buena frente otros RNAs. Como es conocido, las acridinas son compuestos con gran afinidad tanto por el DNA como por el RNA debido a su gran potencial intercalante. No obstante, aunque puedan presentar una afinidad muy elevada, suelen ser muy poco selectivas, lo que supone una limitación importante para proponer estas moléculas como posibles cabezas de serie.

- **Screening de biblioteca de compuestos.**

*Pentamidina.* En 2009, se identificó la pentamidina (Figura I.16A), partiendo de una biblioteca de ligandos de ácidos nucleicos, por su capacidad de inhibir *in vitro* la formación del complejo r(CUG)<sup>exp</sup>-MBNL1. La molécula parecía unirse al surco menor del *hairpin* tóxico logrando mejorar el procesado de dos *pre*-mRNAs y revertir algunos fenotipos de la DM1 *in vivo*.<sup>[145]</sup> A pesar de tener una afinidad media por CUG<sup>exp</sup> (IC<sub>50</sub> = 58 μM), su uso terapéutico está totalmente limitado debido a su alta toxicidad.

*Ro-38-8220 y Cromomicina A3.* Muy recientemente, se han identificado otros dos compuestos por su capacidad de reducir o eliminar algunos fenotipos de la DM1, el Ro 38-8220 (Figura I.16B) y la cromomicina A3<sup>[146,147]</sup>. No obstante, su mecanismo de acción no se ha determinado.<sup>[116]</sup>

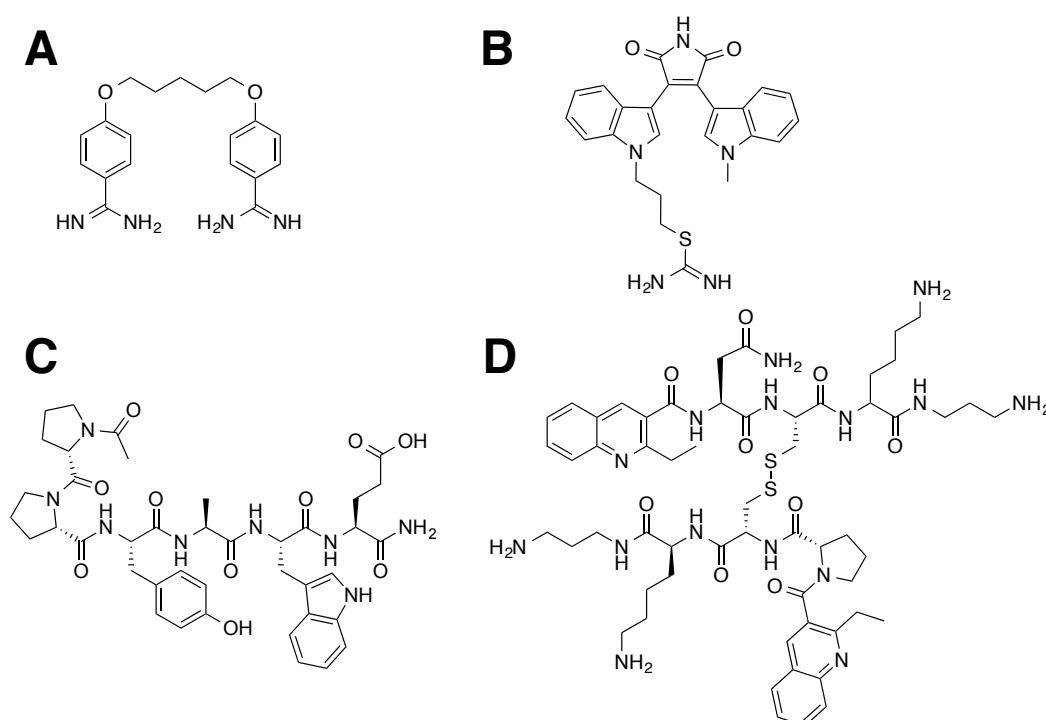
*ABP1.* El cribado de una biblioteca combinatoria compuesta por hexapéptidos sintetizados con D-aminoácidos en un modelo de *Drosophila*, identificó el péptido ABP1 como supresor de la toxicidad de CUG<sup>exp</sup> (Figura I.16C).<sup>[132]</sup> Su administración logra suprimir los defectos en los tejidos cerebrales, musculares y en el ojo en este modelo. Se demostró también que ABP1 es capaz de reducir la formación de los agregados de CUG<sup>exp</sup> y la degeneración muscular cuando se administra oralmente. En modelos de ratones con DM1, se consiguió revertir la desregulación del procesado del mRNA y la histopatología muscular. Parece que su mecanismo de acción es desestructurar el *hairpin* CUG<sub>n</sub> dando lugar a la cadena simple (ssRNA). No obstante, los ensayos de selectividad parecen demostrar que ABP1 puede unirse a otros tipos de ácidos nucleicos.

*Cribado de compuestos con analogía estructural a Hoechst y Pentamidina.* Disney también ha publicado recientemente un estudio de diecisiete moléculas seleccionadas a partir de una aproximación sinérgica, donde combina el análisis de ligandos de RNA ya conocidos y una búsqueda de análogos estructurales. En esta investigación escogen moléculas con similitudes estructurales a Hoechst 33258 y a la pentamidina las cuales, como ya se ha comentado, presentan una elevada afinidad por los RNAs expandidos con apareamientos no canónicos. En el estudio se identifican algunos compuestos con IC<sub>50</sub>'s del orden μM bajo y una de ellas mejora los defectos del procesado del *pre*-mRNA en células y ratones. No obstante, la selectividad que presentan no es demasiado buena, lo que hace pensar que las moléculas identificadas tienen poco futuro como agentes terapéuticos.<sup>[148]</sup>

*Naftiridina y moléculas con tiofeno.* Mediante un cribado de treinta mil pequeñas moléculas se identificó una naftiridina sustituida y otras moléculas que contenían tiofeno por su capacidad de inhibir la formación del complejo MBNL1-CUG<sup>exp</sup>. La naftiridina parece actuar interaccionando con los *loops* U·U de la estructura del RNA tóxico causando una mejora en los

defectos de *splicing* de modelos celulares con DM1. En cambio, los derivados del tiofeno identificados se unen a la proteína MBNL1 provocando una importante desregulación de los procesados alternativos celulares que agrava los fenotipos de la enfermedad.<sup>[149]</sup>

*Lomofungina* y *dilomofungina*. Hoskins y cols. identificaron el agente antimicrobiano lomofungina no solo como inhibidor del complejo MBNL1-CUG<sup>exp</sup>, sino por su capacidad de dispersar la proteína MBNL1 localizada en el núcleo celular incrementando su actividad. Su dímero, la dilomofungina, a pesar de ser 17 veces más potente que el monómero para inhibir la formación del complejo indeseado *in vitro*, causa un aumento del RNA CUG<sup>exp</sup> en el núcleo celular debido a un mecanismo desconocido.<sup>[150]</sup>



**Fig. I.16.** Ligandos de la estructura CUG<sub>n</sub> asociada a la DM1 identificados mediante técnicas de cribado: **A)** Pentamidina; **B)** Ro 33-3220; **C)** Péptido ABP1. **D)** Mejor compuesto dimérico de tipo peptídico identificado mediante química combinatoria dinámica.

- **Química combinatoria dinámica.**

Usando la química combinatoria dinámica sobre resina, Miller y cols. identificaron algunos compuestos capaces de unirse a r(CUG) *in vitro*.<sup>[151]</sup> Los compuestos descritos son de tipo peptídico, contienen un anillo de quinolina y un enlace disulfuro que une dos monómeros (Figura I.16D). La afinidad de los mejores compuestos es del orden micromolar bajo y la selectividad observada es mejorable. Unos años más tarde, usando como cabeza de serie uno de los compuestos identificados en el estudio anterior, diseñaron una segunda generación de ligandos optimizados. Las modificaciones principales son la sustitución del anillo de quinolina por un anillo de benzo[q]quinolina, más afín por el RNA, y del enlace disulfuro por un doble enlace (Z y E). Los nuevos compuestos presentan constantes del orden nanomolar y mejor selectividad que los anteriores. A su vez, son capaces de penetrar en la célula y dos de ellos, ensayados en ratones, revierten los defectos en el *splicing* observados en la DM1.<sup>[152]</sup>

Como puede comprobarse después de enumerar y analizar la mayoría de ligandos actualmente descritos para C(C)UG<sup>exp</sup>, todos presentan afinidades relativamente buenas hacia las dianas aunque, sorprendentemente, no mantienen ninguna relación estructural entre ellos. En los diseños racionales, tanto Zimmerman como Disney, han escogido el motivo característico y repetitivo de los RNAs tóxicos de las DMs como base de su diseño, sin embargo, han empleado moléculas muy distintas para ello. Por otro lado, si se analizan los ligandos identificados mediante los cribados de bibliotecas de compuestos, identificar un farmacóforo para el diseño de nuevas cabezas de serie parece una tarea excesivamente compleja.

En esta tesis doctoral, se planteó un diseño racional de ligandos aprovechando los característicos motivos estructurales que presentan los RNAs C(C)UG<sup>exp</sup>, es decir, los pares no canónicos U·U y C·U. Para ello, al igual que Zimmerman planteó una vez ya iniciada esta tesis, una buena opción parecen ser las bases Janus capaces de reconocer por ambas caras un par de nucleobases encaradas.

### Las Bases Janus

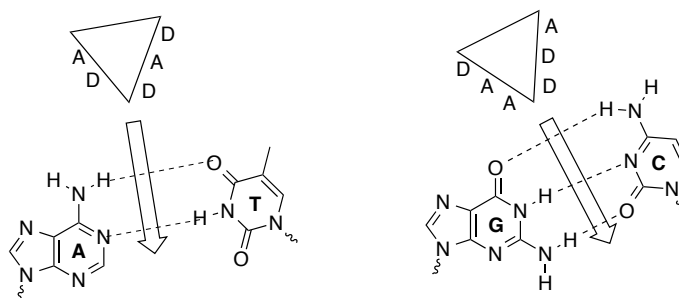
Janus, en la mitología romana, era el dios de las puertas, los comienzos y los finales y se representaba como un hombre con dos caras que miran en direcciones opuestas para indicar su doble funcionalidad (Figura I.17).



**Fig. I.17.** Dios Janus de la mitología romana. Suele representarse como un hombre con dos caras opuestas, una mirando hacia adelante, al futuro, la otra mirando hacia atrás, al pasado.

Por analogía, en 1996 Lehn introdujo el término bases Janus (o *Janus Wedges*) para hacer referencia a una nueva aproximación dirigida al reconocimiento de un par de nucleobases enfrentadas.<sup>[153]</sup> Las bases Janus son heterociclos con dos caras diseñadas para reconocer un par canónico o no canónico introduciéndose entre ellas como una cuña (*wedge*) y estableciendo el máximo número posible de interacciones por enlaces de hidrógeno (Figura I.18).

En la misma publicación, Lehn reflexiona sobre las posibles aplicaciones de las *Janus Wedges*. Para que una base Janus interaccione con un par canónico presente en DNA o RNA, es necesario que se introduzca entre las nucleobases rompiendo sus interacciones Watson-Crick y estableciendo nuevos enlaces de hidrógeno, lo cual puede no estar termodinámicamente favorecido. Es por estos motivos que zonas no apareadas del DNA o del RNA, así como pares no canónicos, bucles, protuberancias, etc, parecen las mejores dianas para las bases Janus. Hay que decir que debido a su naturaleza autocomplementaria, este tipo de compuestos tienen tendencia a la agregación.

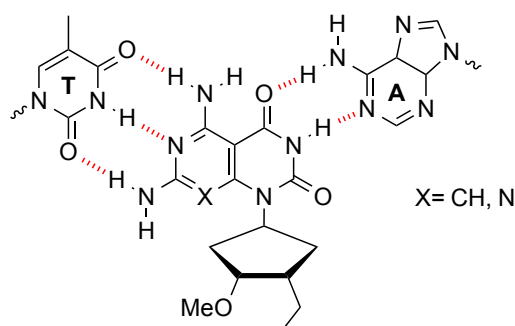


**Fig. I.18.** Concepto de Base Janus o *Janus Wedge* aplicado al reconocimiento de los pares canónicos A-T y C-G. A: aceptor de enlaces de hidrógeno; D: dador de enlaces de hidrógeno. Imagen tomada de la ref. 152.

Desde esta publicación, otros investigadores han empleado bases Janus en distintos contextos.<sup>[154]</sup> Algunos han estudiado su comportamiento para formar macroestructuras tipo *rosetta* debido a la complementariedad que existe entre sus dos caras.<sup>[155,156]</sup>

Otros investigadores han diseñado *Janus Wedges* capaces de interactuar con dos nucleobases. Así, McLaughlin y cols. han descrito monómeros de PNA modificados con bases Janus capaces de reconocer el par C-T (2,6-diamino-4-pirimidona) y C-G (2-amino-1,3,5-triazina-4,6-diona) que dan lugar a la formación de estructuras tipo triplete.<sup>[157,158]</sup> Un trabajo parecido y mucho más reciente es el de Bong, que derivatiza péptidos con el heterociclo melamina para forman tríplexes con dos cadenas de dT<sub>10</sub>.<sup>[159-161]</sup>

También se han introducido las bases de Janus en nucleósidos, es el caso de Tor<sup>[162]</sup>, de He<sup>[163]</sup> y de Perrin<sup>[164,165]</sup> que han diseñado Janus capaces de interactuar con A y T (Figura I.19).



**Fig. I.19.** Base Janus descrita por Perrin capaz de reconocer el par canónico T-A.

En cuanto a moléculas con posibles aplicaciones terapéuticas, se ha descrito una *Janus Wedge* capaz de interactuar con los *mismatches* G-U presentes en el RNA de Tau<sup>[166]</sup>, así como los ligandos de C(C)UG<sup>exp</sup>, anteriormente comentados, que son capaces de reconocer mediante enlaces de hidrógeno los pares no canónicos U-U y C-U.<sup>[131,144]</sup>

En cuanto a la capacidad de reconocer dos uracilos enfrentados, se ha descrito la 2,4,6-triaminopirimidina como posible ligando del ribointerruptor de la purina.<sup>[167]</sup>

Vale la pena destacar que muchos de los trabajos publicados sobre Bases Janus son posteriores al inicio de esta tesis doctoral.



**Objetivos**

En esta tesis doctoral se ha planteado el diseño racional de ligandos capaces de unirse con alta afinidad y selectividad a los RNAs tóxicos asociados a las distrofias miotónicas de tipo 1 y 2, con el objetivo de inhibir la unión de la proteína MBNL1 a los *hairpins* que forman los transcritos expandidos C(C)UG<sup>exp</sup> y así corregir los defectos celulares de estas afecciones.

Se propone alcanzar la deseada selectividad de los ligandos mediante un motivo químico capaz de reconocer los pares no canónicos U·U y C·U que aparecen repetidamente en las estructuras de los transcritos mutantes. La aproximación elegida ha sido la de las bases Janus que son capaces de interactuar mediante enlaces de hidrógeno por ambas caras con las dos nucleobases de los *mismatches*. Para aumentar la afinidad de los ligandos hacia el RNA y evitar posibles repulsiones electrostáticas, se plantea introducir las bases Janus en esqueletos neutros como los de los ácidos nucleicos peptídicos (PNA).

Así pues, los dos objetivos fundamentales de esta tesis doctoral que se corresponden con los dos capítulos de la memoria son:

1. Diseño y síntesis de bases Janus capaces de reconocer los apareamientos no canónicos U·U y C·U y su incorporación en monómeros de PNA. Diseño y síntesis de oligómeros de tipo PNA que contengan las bases Janus diseñadas para interactuar con las estructuras *hairpin* de los CUG<sup>exp</sup> y CCUG<sup>exp</sup> asociados a la DM1 y DM2, respectivamente.
2. Evaluación mediante técnicas biofísicas de la afinidad y selectividad de los ligandos sintetizados por una estructura modelo de los CUG<sup>exp</sup> y CCUG<sup>exp</sup>.



## Bibliografía

- [1] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, 171, 737–738.
- [2] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, 171, 964–967.
- [3] G. M. Blackburn, M. J. Gait, D. Loakes, D. M. Williams, *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*, UK, **2006**.
- [4] S. Arnott, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1970**, 21, 365–319.
- [5] M. Guéron, J.-L. Leroy, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2000**, 10, 326–331.
- [6] J. A. Cruz, E. Westhof, *Cell* **2009**, 136, 604–609.
- [7] A. Rich, D. R. Davies, *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, 78, 3548–3549.
- [8] I. Faustino, A. Pérez, M. Orozco, *Biophys. J.* **2010**, 99, 1876–1885.
- [9] K. B. Hall, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, 12, 283–288.
- [10] J. Gallego, G. Varani, *Acc. Chem. Res.* **2001**, 34, 836–843.
- [11] J. R. Thomas, P. J. Hergenrother, *Chem. Rev.* **2008**, 108, 1171–1224.
- [12] S. Clancy, *Nat. Educ.* **2008**, 1, 102.
- [13] A. Serganov, D. J. Patel, *Nat. Rev. Genet.* **2007**, 8, 776–790.
- [14] W. Gilbert, *Nature* **1986**, 319, 618–618.
- [15] D. M. J. Lilley, J. Sutherland, *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2011**, 366, 2853–2856.
- [16] J. Darnell, *RNA: Life's Indispensable Molecule*, Lab.Press, New York, **2011**.
- [17] D. A. Hiller, S. A. Strobel, *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2011**, 366, 2929–2935.
- [18] T. A. Cooper, L. Wan, G. Dreyfuss, *Cell* **2009**, 136, 777–793.
- [19] G.-S. Wang, T. A. Cooper, *Nat. Rev. Genet.* **2007**, 8, 749–761.
- [20] L. P. W. Ranum, T. A. Cooper, *Annu. Rev. Neurosci.* **2006**, 29, 259–277.
- [21] H. T. Orr, H. Y. Zoghbi, *Annu. Rev. Neurosci.* **2007**, 30, 575–621.
- [22] H. Ellegren, *Nat. Rev. Genet.* **2004**, 5, 435–445.
- [23] G. Tóth, Z. Gáspári, J. Jurka, *Genome Res.* **2000**, 10, 967–981.
- [24] D. Tautz, M. Trick, G. Dover, *Nature* **1986**, 322, 652–656.
- [25] Y. Kashi, D. King, M. Soller, *Trends Genet.* **1997**, 13, 74–78.
- [26] J. R. O'Rourke, M. S. Swanson, *J. Biol. Chem.* **2009**, 284, 7419–7423.
- [27] A. R. La Spada, E. M. Wilson, D. B. Lubahn, *Nature* **1991**, 352, 77.
- [28] A. J. M. . Vervek, M. Pieretti, J. S. Sutcliffe, Y.-H. Fu, D. P. A. Kuhl, A. Pizzuti, O. Reiner, S. Richards, M. F. Victoria, F. Zhang, et al., *Cell* **1991**, 65, 905–914.
- [29] S. M. Mirkin, *Nature* **2007**, 447, 932–940.
- [30] A. R. La Spada, J. P. Taylor, *Nat. Rev. Genet.* **2010**, 11, 247–258.
- [31] C. J. Cummings, H. Y. Zoghbi, *Hum. Mol. Genet.* **2000**, 9, 909–916.
- [32] C. E. Pearson, K. N. Edamura, J. D. Cleary, *Nat. Rev. Genet.* **2005**, 6, 729–742.
- [33] M. G. Hamshere, H. Harley, P. Harper, J. D. Brook, J. F. Y. Brookfield, *J. Med. Genet.* **1999**, 36, 59–61.
- [34] D. L. Nelson, H. T. Orr, S. T. Warren, *Neuron* **2013**, 77, 825–843.
- [35] H. Y. Zoghbi, H. T. Orr, *Annu. Rev. Neurosci.* **2000**, 23, 217–247.
- [36] M. F. Perutz, T. Johnson, M. Suzuki, J. T. Finch, *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* **1994**, 91, 5355–5358.
- [37] J. Shao, M. I. Diamond, *Hum. Mol. Genet.* **2007**, 16, R115–R123.
- [38] C. A. Ross, S. J. Tabrizi, *Lancet Neurol.* **2011**, 10, 83–98.
- [39] P. I. Patel, G. Isaya, *Am. J. Hum. Genet.* **2001**, 69, 15–24.

- [40] B. Coffee, F. Zhang, S. T. Warren, D. Reines, *Nat. Genet.* **1999**, *22*, 98–101.
- [41] J. C. Mulley, S. Yu, D. Z. Loesch, D. A. Hay, A. Donnelly, A. K. Gedeon, P. Carbonell, I. López, G. Glover, I. Gabarrón, *J. Med. Genet.* **1995**, *32*, 162–169.
- [42] H. Steinert, *Dtsch Z Nervenheilkd* **1909**, *37*, 58–104.
- [43] E. F. Batien, H. P. Gibb, *Brain* **1909**, *32*, 187–205.
- [44] J. D. Brook, M. E. McCurrach, H. G. Harley, A. J. Buckler, D. Church, H. Aburatani, K. Hunter, V. P. Stanton, J.-P. Thirion, T. Hudson, et al., *Cell* **1992**, *68*, 799–808.
- [45] P. S. Harper, *Myotonic Dystrophy*, W.B.Saunders, London, **2001**.
- [46] B. Udd, R. Krahe, *Lancet Neurol.* **2012**, *11*, 891–905.
- [47] L. Machuca-Tzili, D. Brook, D. Hilton-Jones, *Muscle Nerve* **2005**, *32*, 1–18.
- [48] L. P. W. Ranum, P. F. Rasmussen, K. A. Benzow, M. D. Koob, J. W. Day, *Nat. Genet.* **1998**, *19*, 196–198.
- [49] K. Ricker, C. Koch, F. Lehmann-Horn, D. Pongratz, M. Otto, R. Heine, R. T. Moxley, *Neurology* **1994**, *44*, 1448.
- [50] B. Udd, R. Krahe, C. Wallgreen-Pettersson, B. Falck, H. Kalimo, *Neuromuscul. Disord.* **1997**, *7*, 217–228.
- [51] K. Ricker, *J. Neurol.* **1999**, *246*, 334–338.
- [52] G. Meola, *Muscle Nerve* **2000**, *23*, 1789–1799.
- [53] B. Schoser, L. Timchenko, *Curr. Genomics* **2010**, *11*, 77–90.
- [54] J. Buxton, P. Shelbourne, J. Davies, C. Jones, T. V. Tongeren, C. Aslanidis, P. de Jong, G. Jansen, M. Anvret, B. Riley, et al., *Nature* **1992**, *355*, 547–548.
- [55] M. Mahadevan, C. Tsilfidis, L. Sabourin, G. Shutler, C. Amemiya, G. Jansen, C. Neville, M. Narang, J. Barcelo, K. O’Hoy, et al., *Science* **1992**, *255*, 1253–1255.
- [56] C. L. Liquori, K. Ricker, M. L. Moseley, J. F. Jacobsen, W. Kress, S. L. Naylor, J. W. Day, L. P. W. Ranum, *Science* **2001**, *293*, 864–867.
- [57] J. R. Gatchel, H. Y. Zoghbi, *Nat. Rev. Genet.* **2005**, *6*, 743–755.
- [58] M. Bermúdez de León, B. Cisneros, *J. Neurosci. Res.* **2008**, *86*, 18–26.
- [59] J. E. Lee, T. A. Cooper, *Biochem. Soc. Trans.* **2009**, *37*, 1281–1286.
- [60] P. Carango, J. E. Noble, H. G. Marks, V. L. Funanage, *Genomics* **1993**, *18*, 340–348.
- [61] Y. H. Fu, D. L. Friedman, S. Richards, J. A. Pearlman, R. A. Gibbs, A. Pizzuti, T. Ashizawa, M. B. Perryman, G. Scarlato, R. G. Fenwick, et al., *Science* **1993**, *260*, 235–238.
- [62] W. Chen, Y. Wang, Y. Abe, L. Cheney, B. Udd, Y.-P. Li, *J. Mol. Biol.* **2007**, *368*, 8–17.
- [63] G. Jansen, P. J. T. A. Groenen, D. Bächner, P. H. K. Jap, M. Coerwinkel, F. Oerlemans, W. van den Broek, B. Gohlsch, D. Pette, J. J. Plomp, et al., *Nat. Genet.* **1996**, *13*, 316–324.
- [64] S. Reddy, D. B. J. Smith, M. M. Rich, J. M. Leferovich, P. Reilly, B. M. Davis, K. Tran, H. Rayburn, R. Bronson, D. Cros, et al., *Nat. Genet.* **1996**, *13*, 325–335.
- [65] T. R. Klesert, A. D. Otten, T. D. Bird, S. J. Tapscott, *Nat. Genet.* **1997**, *16*, 402–406.
- [66] C. A. Thornton, J. P. Wymer, Z. Simmons, C. McClain, R. T. Moxley, *Nat. Genet.* **1997**, *16*, 407–409.
- [67] T. R. Klesert, D. H. Cho, J. I. Clark, J. Maylie, J. Adelman, L. Snider, E. C. Yuen, P. Soriano, S. J. Tapscott, *Nat. Genet.* **2000**, *25*, 105–109.
- [68] P. S. Sarkar, B. Appukuttan, J. Han, Y. Ito, C. Ai, W. Tsai, Y. Chai, J. T. Stout, S. Reddy, *Nat. Genet.* **2000**, *25*, 110–114.
- [69] M. G. Hamshire, E. E. Newman, M. Alwazzan, B. S. Athwal, J. D. Brook, *Proc. Natl.*

- Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 7394–7399.
- [70] B. M. Davis, M. E. McCurrach, K. L. Taneja, R. H. Singer, D. E. Housman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 7388–7393.
- [71] A. Mankodi, E. Logigian, L. Callahan, C. McClain, R. White, D. Henderson, M. Krym, C. A. Thornton, *Science* **2000**, *289*, 1769–1772.
- [72] A. Mankodi, M. P. Takahashi, H. Jiang, C. L. Beck, W. J. Bowers, R. T. Moxley, S. C. Cannon, C. A. Thornton, *Mol. Cell* **2002**, *10*, 35–44.
- [73] H. Seznec, O. Agbulut, N. Sergeant, C. Savouret, A. Ghestem, N. Tabti, J.-C. Willer, L. Ourth, C. Duros, E. Brisson, et al., *Hum. Mol. Genet.* **2001**, *10*, 2717–2726.
- [74] J. W. Miller, C. R. Urbinati, P. Teng-umnuay, M. G. Stenberg, B. J. Bryne, C. A. Thornton, M. S. Swanson, *EMBO J.* **2000**, *19*, 4439–4448.
- [75] Y. Kino, D. Mori, Y. Oma, Y. Takeshita, N. Sasagawa, S. Ishiura, *Hum. Mol. Genet.* **2004**, *13*, 495–507.
- [76] H. Du, M. S. Cline, R. J. Osborne, D. L. Tuttle, T. A. Clark, J. P. Donohue, M. P. Hall, L. Shiue, M. S. Swanson, C. A. Thornton, et al., *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2010**, *17*, 187–193.
- [77] M. B. Warf, J. V. Diegel, P. H. von Hippel, J. A. Berglund, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 9203–9208.
- [78] D. L. Black, *Annu. Rev. Biochem.* **2003**, *72*, 291–336.
- [79] M. Pistoni, C. Ghigna, D. Gabellini, *RNA Biol.* **2010**, *7*, 441–452.
- [80] L. T. Timchenko, J. W. Miller, N. A. Timchenko, D. R. DeVore, K. V. Datar, L. Lin, R. Roberts, C. T. Caskey, M. S. Swanson, *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 4407–4414.
- [81] M. Fardaei, K. Larkin, J. D. Brook, M. G. Hamshere, *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 2766–2771.
- [82] A. Mankodi, P. Teng-Umnuay, M. Krym, D. Henderson, M. Swanson, C. A. Thornton, *Ann. Neurol.* **2003**, *54*, 760–768.
- [83] Y. Yuan, S. A. Compton, K. Sobczak, M. G. Stenberg, C. A. Thornton, J. D. Griffith, M. S. Swanson, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 5474–5486.
- [84] M. B. Warf, J. A. Berglund, *RNA* **2007**, *13*, 2238–2251.
- [85] M. Fardaei, M. T. Rogers, H. M. Thorpe, K. Larkin, M. G. Hamshere, P. S. Harper, J. D. Brook, *Hum. Mol. Genet.* **2002**, *11*, 805–814.
- [86] A. V. Philips, L. Timchenko, T. A. Cooper, *Science* **1998**, *280*, 737–741.
- [87] R. Tian, R. J. White, T. Xia, S. Welle, D. H. Turner, M. B. Mathews, C. A. Thornton, *RNA* **2000**, *6*, 79–87.
- [88] N. M. Kuyumcu-Martinez, G.-S. Wang, T. A. Cooper, *Mol. Cell* **2007**, *28*, 68–78.
- [89] X. Lin, J. W. Miller, A. Mankodi, R. N. Kanadia, Y. Yuan, R. T. Moxley, M. S. Swanson, C. A. Thornton, *Hum. Mol. Genet.* **2006**, *15*, 2087–2097.
- [90] T. H. Ho, D. Bundman, D. L. Armstrong, T. A. Cooper, *Hum. Mol. Genet.* **2005**, *14*, 1539–1547.
- [91] R. N. Kanadia, K. A. Johnstone, A. Mankodi, C. Lungu, C. A. Thornton, D. Esson, A. M. Timmers, W. W. Hauswirth, M. S. Swanson, *Science* **2003**, *302*, 1978–1980.
- [92] M. Kellerer, R. Lammers, B. Ermel, S. Tippmer, B. Vogt, B. Obermaier-Kusser, A. Ullrich, H. U. Haering, *Biochemistry* **1992**, *31*, 4588–4596.
- [93] R. S. Savkur, A. V. Philips, T. A. Cooper, *Nat. Genet.* **2001**, *29*, 40–47.
- [94] M. S. Mahadevan, R. S. Yadava, Q. Yu, S. Balijepalli, C. D. Frenzel-McCardell, T. D. Bourne, L. H. Phillips, *Nat. Genet.* **2006**, *38*, 1066–1070.

- [95] F. Rau, F. Freyermuth, C. Fugier, J.-P. Villemin, M.-C. Fischer, B. Jost, D. Dembele, G. Gourdon, A. Nicole, D. Duboc, et al., *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2011**, *18*, 840–845.
- [96] R. S. Savkur, G. Singh, A. V. Philips, E. A. Grice, T. A. Cooper, *Mol. Cell* **2002**, *10*, 45–53.
- [97] A. Ebralidze, Y. Wang, V. Petkova, K. Ebralidse, R. P. Junghans, *Science* **2004**, *303*, 383–387.
- [98] M. Napierala, W. J. Krzyzosiak, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 31079–31085.
- [99] S. Michalowski, J. W. Miller, C. R. Urbinati, M. Paliouras, M. S. Swanson, J. Griffith, *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 3534–3542.
- [100] K. Sobczak, M. de Mezer, G. Michlewski, J. Krol, W. J. Krzyzosiak, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 5469–5482.
- [101] A. M. Paiva, R. D. Sheardy, *Biochemistry* **2004**, *43*, 14218–14227.
- [102] B. H. M. Mooers, J. S. Logue, J. A. Berglund, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 16626–16631.
- [103] A. Kiliszek, R. Kierzek, W. J. Krzyzosiak, W. Rypniewski, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 4149–4156.
- [104] R. Parkesh, M. Fountain, M. D. Disney, *Biochemistry* **2011**, *50*, 599–601.
- [105] A. Kumar, H. Park, P. Fang, R. Parkesh, M. Guo, K. W. Nettles, M. D. Disney, *Biochemistry* **2011**, *50*, 9928–9935.
- [106] J. L. Childs-Disney, I. Yildirim, H. Park, J. R. Lohman, L. Guan, T. Tran, P. Sarkar, G. C. Schatz, M. D. Disney, *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 538–550.
- [107] J. Golebiowski, S. Antonczak, J. Fernandez-Carmona, R. Condom, D. Cabrol-Bass, *J. Mol. Model.* **2004**, *10*, 408–417.
- [108] Y. Tanaka, C. Kojima, T. Yamazaki, T. S. Kodama, K. Yasuno, S. Miyashita, A. Ono, A. (Sho) Ono, M. Kainosho, Y. Kyogoku, *Biochemistry* **2000**, *39*, 7074–7080.
- [109] C. Schneider, M. Brandl, J. Sühnel, *J. Mol. Biol.* **2001**, *305*, 659–667.
- [110] S. A. M. Mulders, B. G. M. van Engelen, B. Wieringa, D. G. Wansink, *Hum. Mol. Genet.* **2010**, *19*, R90–R97.
- [111] P. A. Olsen, A. Solhaug, J. A. Booth, M. Gelazauskaite, S. Krauss, *DNA Repair* **2009**, *8*, 298–308.
- [112] D. Mittelman, C. Moye, J. Morton, K. Sykoudis, Y. Lin, D. Carroll, J. H. Wilson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 9607–9612.
- [113] M. Gomes-Pereira, D. G. Monckton, *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* **2006**, *598*, 15–34.
- [114] R. N. Kanadia, J. Shin, Y. Yuan, S. G. Beattie, T. M. Wheeler, C. A. Thornton, M. S. Swanson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 11748–11753.
- [115] G.-S. Wang, M. N. Kuyumcu-Martinez, S. Sarma, N. Mathur, X. H. T. Wehrens, T. A. Cooper, *J. Clin. Invest.* **2009**, *119*, 3797–3806.
- [116] A. Ketley, C. Z. Chen, X. Li, S. Arya, T. E. Robinson, J. Granados-Riveron, I. Udosen, G. E. Morris, I. Holt, D. Furling, et al., *Hum. Mol. Genet.* **2014**, *23*, 1551–1562.
- [117] L. A. Phylactou, C. Darrach, M. J. A. Wood, *Nat. Genet.* **1998**, *18*, 378–381.
- [118] M.-A. Langlois, N. S. Lee, J. J. Rossi, J. Puymirat, *Mol. Ther.* **2003**, *7*, 670–680.
- [119] R. Kole, A. R. Krainer, S. Altman, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2012**, *11*, 125–140.
- [120] S. A. M. Mulders, W. J. A. A. van den Broek, T. M. Wheeler, H. J. E. Croes, P. van Kuik-Romeijn, S. J. de Kimpe, D. Furling, G. J. Platenburg, G. Gourdon, C. A. Thornton, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 13915–13920.

- [121] J. E. Lee, C. F. Bennett, T. A. Cooper, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 4221–4226.
- [122] L. Malinina, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2005**, *23*, 233–235.
- [123] K. Sobczak, T. M. Wheeler, W. Wang, C. A. Thornton, *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **2013**, *21*, 380–387.
- [124] M.-A. Langlois, C. Boniface, G. Wang, J. Alluin, P. M. Salvaterra, J. Puymirat, J. J. Rossi, N. S. Lee, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 16949–16954.
- [125] J. Krol, A. Fiszer, A. Mykowska, K. Sobczak, M. de Mezer, W. J. Krzyzosiak, *Mol. Cell* **2007**, *25*, 575–586.
- [126] T. M. Wheeler, K. Sobczak, J. D. Lueck, R. J. Osborne, X. Lin, R. T. Dirksen, C. A. Thornton, *Science* **2009**, *325*, 336–339.
- [127] N. P. Mastroiannopoulos, M. L. Feldman, J. B. Uney, M. S. Mahadevan, L. A. Phylactou, *EMBO Rep.* **2005**, *6*, 458–463.
- [128] N. P. Mastroiannopoulos, E. Chrysanthou, T. C. Kyriakides, J. B. Uney, M. S. Mahadevan, L. A. Phylactou, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *377*, 526–531.
- [129] M. D. Disney, *Drug Discov. Today* **2013**, *18*, 1228–1236.
- [130] L. Guan, M. D. Disney, *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 73–86.
- [131] J. F. Arambula, S. R. Ramisetty, A. M. Baranger, S. C. Zimmerman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**.
- [132] A. García-López, B. Llamusi, M. Orzáez, E. Pérez-Payá, R. D. Artero, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 11866–11871.
- [133] A. Pushechnikov, M. M. Lee, J. L. Childs-Disney, K. Sobczak, J. M. French, C. A. Thornton, M. D. Disney, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 9767–9779.
- [134] J. Cho, R. R. Rando, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 2158–2163.
- [135] J. L. Childs-Disney, J. Hoskins, S. G. Rzuczek, C. A. Thornton, M. D. Disney, *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 856–862.
- [136] M. D. Disney, J. L. Childs-Disney, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 649–656.
- [137] M. M. Lee, A. Pushechnikov, M. D. Disney, *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4*, 345–355.
- [138] M. M. Lee, J. L. Childs-Disney, A. Pushechnikov, J. M. French, K. Sobczak, C. A. Thornton, M. D. Disney, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 17464–17472.
- [139] M. D. Disney, M. M. Lee, A. Pushechnikov, J. L. Childs-Disney, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 375–382.
- [140] J. L. Childs-Disney, I. Yildirim, H. Park, J. R. Lohman, L. Guan, T. Tran, P. Sarkar, G. C. Schatz, M. D. Disney, *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 538–550.
- [141] J. F. Arambula, S. R. Ramisetty, A. M. Baranger, S. C. Zimmerman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 16068–16073.
- [142] A. Haghghat Jahromi, M. Honda, S. C. Zimmerman, M. Spies, *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 6687–6697.
- [143] A. H. Jahromi, Y. Fu, K. A. Miller, L. Nguyen, L. M. Luu, A. M. Baranger, S. C. Zimmerman, *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 9471–9481.
- [144] C. H. Wong, Y. Fu, S. R. Ramisetty, A. M. Baranger, S. C. Zimmerman, *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 8881–8890.
- [145] M. B. Warf, M. Nakamori, C. M. Matthys, C. A. Thornton, J. A. Berglund, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 18551–18556.
- [146] E. Berman, S. C. Brown, T. L. James, R. H. Shafer, *Biochemistry* **1985**, *24*, 6887–6893.
- [147] S. Chakrabarti, D. Bhattacharyya, D. Dasgupta, *Biopolymers* **2000**, *56*, 85–95.

- [148] R. Parkesh, J. L. Childs-Disney, M. Nakamori, A. Kumar, E. Wang, T. Wang, J. Hoskins, T. Tran, D. Housman, C. A. Thornton, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 4731–4742.
- [149] J. L. Childs-Disney, E. Stepniak-Konieczna, T. Tran, I. Yildirim, H. Park, C. Z. Chen, J. Hoskins, N. Southall, J. J. Marugan, S. Patnaik, et al., *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 2044.
- [150] J. W. Hoskins, L. O. Ofori, C. Z. Chen, A. Kumar, K. Sobczak, M. Nakamori, N. Southall, S. Patnaik, J. J. Marugan, W. Zheng, et al., *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 6591–6602.
- [151] P. C. Gareiss, K. Sobczak, B. R. McNaughton, P. B. Palde, C. A. Thornton, B. L. Miller, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 16254–16261.
- [152] L. O. Ofori, J. Hoskins, M. Nakamori, C. A. Thornton, B. L. Miller, *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 6380–6390.
- [153] N. Branda, G. Kurz, J.-M. Lehn, *Chem. Commun.* **1996**, 2443–2444.
- [154] X. Pang, C. Wan, M. Wang, Z. Lin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 2–17.
- [155] R. L. Beingessner, J. A. Diaz, U. D. Hemraz, H. Fenniri, *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 661–664.
- [156] A. Marsh, M. Silvestri, J.-M. Lehn, *Chem. Commun.* **1996**, 1527–1528.
- [157] D. Chen, Meena, S. K. Sharma, L. W. McLaughlin, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 70–71.
- [158] H. Chen, Meena, L. W. McLaughlin, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13190–13191.
- [159] Y. Zeng, Y. Pratumyot, X. Piao, D. Bong, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 832–835.
- [160] X. Xia, X. Piao, K. Fredrick, D. Bong, *ChemBioChem* **2014**, *15*, 31–36.
- [161] X. Xia, X. Piao, D. Bong, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 7265–7268.
- [162] D. Shin, Y. Tor, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 6926–6929.
- [163] M.-Y. Pan, W. Hang, X.-J. Zhao, H. Zhao, P.-C. Deng, Z.-H. Xing, Y. Qing, Y. He, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 5692–5702.
- [164] A. Asadi, B. O. Patrick, D. M. Perrin, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 466–475.
- [165] E. Largy, W. Liu, A. Hasan, D. M. Perrin, *Chem. - Eur. J.* **2014**, *20*, 1462–1466.
- [166] G. Artigas, V. Marchán, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 10666–10677.
- [167] S. D. Gilbert, S. J. Mediatore, R. T. Batey, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14214–14215.



# **Capítulo 1**

***Diseño y síntesis de ligandos tipo PNA con bases Janus***

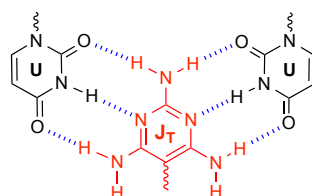




## 1. Introducción

### *Diseño de las bases Janus: Las bases $J_T$ , $J_D$ y $J_W$*

El primer objetivo fue elegir dos heterociclos capaces de actuar como *Janus Wedge* con los pares no canónicos U·U y C·U. Se decidió trabajar con bases heterocíclicas de tipo pirimidínico y no de mayor tamaño para que su introducción entre los pares no canónicos no estuviera demasiado dificultada por problemas estéricos. Además, de este modo se podía aprovechar la capacidad de los nitrógenos pirimidínicos de formar enlaces de hidrógeno para favorecer la interacción. Para reconocer el par no canónico U·U presente en las estructuras tipo horquilla de los CUG<sup>exp</sup> asociados a la DM1, se escogió la base **2,4,6-triaminopirimidina ( $J_T$ )** (Fig. 1.1).



**Fig. 1.1.** La base Janus 2,4,6-triaminopirimidina ( $J_T$ ) interaccionando con el par no canónico U·U.

La 2,4,6-triaminopirimidina es un heterociclo pirimidínico simétrico que existe mayoritariamente en su forma amino y no como imino derivado. Debido a la gran cantidad de heteroátomos que presenta tiene un gran potencial como dador (D) y aceptor (A) de enlaces de hidrógeno. Si se derivatiza en la posición 5, ambas caras del heterociclo presentan un perfil DAD, por lo que podría reconocer el par U·U estableciendo un total de seis enlaces de

hidrógeno (Fig. 1.1). Estas propiedades también le conceden la capacidad de poder agregarse mediante interacciones intermoleculares con ella misma o con otros compuestos. De hecho, Fenniri ya estudió su posible autoagregación para formar nanoestructuras aunque no fue capaz de conseguirlo.<sup>[1]</sup> Posteriormente, Whitehead investigó mediante RMN-<sup>1</sup>H la formación de rosetas hexaméricas y estructuras lineales formadas por un nucleósido no natural con la base J<sub>T</sub> y ácido cianúrico o ácido barbitúrico.<sup>[2]</sup> En el mismo estudio, se resaltó la capacidad que parecía presentar la base J<sub>T</sub> de establecer interacciones por ambas caras con dos cadenas poli-T para dar lugar a una estructura tipo tríplex.<sup>[3]</sup> Su síntesis, y la de sus derivados, suele llevarse a cabo haciendo reaccionar malononitrilo, o derivados de éste, con guanidina o bien, vía una cicloadición [4+2] de amidinas con 1,3,5-triazinas.<sup>[4,5]</sup> Aunque la 2,4,6-triaminopirimidina es comercial, la derivatización del heterociclo en su C5 no parece ser viable debido a la baja reactividad de esta posición y, por ese motivo, suele sintetizarse vía condensación de dos fragmentos según las necesidades y objetivos de cada investigación. A lo largo de los años, esta base ha sido empleada con diferentes fines, tanto enmarcados en un contexto biológico, como puramente químico o tecnológico. Como ejemplos se pueden mencionar los estudios en que se emplea como ligando del ribointerruptor de la purina,<sup>[6]</sup> de la GalR2 relacionada con la epilepsia,<sup>[7]</sup> o de estructuras de RNA con las repeticiones CCUG,<sup>[8]</sup> entre otras.

Para interactuar con el *mismatch* C·U, presente en las estructuras de RNA tóxico compuestas por el tetranucleótido CCUG asociadas a la DM2, se eligió el heterociclo **2,6-diamino-4(3H)-pirimidona (J<sub>D</sub>)** (Fig. 1.2).

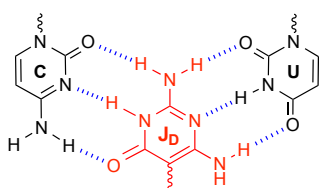


Fig. 1.2. La base Janus 2,6-diamino-4-pirimidona (J<sub>D</sub>) interactuando con el par no canónico C·U.

La base 2,6-diamino-4(3H)-pirimidona ya había sido empleada por McLaughlin y *cols.* como base Janus para interactuar con los pares no canónicos C·T.<sup>[9]</sup> El heterociclo derivatizado en la posición 5 presenta una cara con el perfil DDA, que interactúa con C, y la otra DAD, que reconoce la U. Así pues, es capaz de establecer un total de seis enlaces de hidrógeno con el par no-canónico C·U.

Parece muy establecido que la forma tautomérica que predomina para esta pirimidina es la oxo y no la hidroxilo.<sup>[10,11]</sup> En el año 2000, un estudio por RMN de la tautomería de diferentes 4-pirimidonas confirmó que en ningún momento se detectaba la presencia del tautómero hidroxilo.<sup>[12]</sup> Por otro lado, existen dos posibles tautómeros de la forma oxo, el 1H y el 3H. Mediante estudios estructurales por RMN se determinó que en estado sólido solo existe la forma 3H y que, en solución, la misma especie es la mayoritaria aunque puede llegar a detectarse minoritariamente el isómero 1H en disolventes muy polares.<sup>[13]</sup> Posteriormente, un estudio cristalográfico confirmó que la especie mayoritaria es el tautómero 2,6-diamino-4(3H)-pirimidona (Figura 1.3).<sup>[14]</sup>

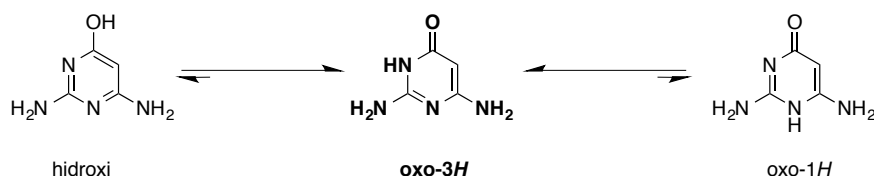


Fig. 1.3. Tautómeros de la 2,6-diamino-4-pirimidona.

El heterociclo  $J_D$  es fácil de derivatizar en la posición 5 puesto que se trata de un carbono con densidad de carga negativa, como puede comprobarse por resonancia. Se pueden encontrar multitud de referencias donde se lleva a cabo la sustitución en el C5 del heterociclo tanto en medio ácido como básico, aunque siempre en disolventes polares debido a la limitada solubilidad de esta pirimidona.<sup>[15-17]</sup> La obtención del heterociclo ya derivatizado también puede llevarse a cabo por condensación de guanidina y un éster cianoacetato o derivados.<sup>[18,19]</sup> En la literatura se describen distintos derivados de esta base con fines terapéuticos, por ejemplo un derivado con propiedades antiinflamatorias.<sup>[20]</sup> Por otro lado, también se emplea como base Janus para el par no canónico C-T en el trabajo ya comentado de McLaughlin<sup>[9]</sup> y, debido a sus buenas propiedades como dador y aceptor de enlaces de H es un motivo estructural que aparece en muchas moléculas activas.

Una publicación de McLaughlin *y cols.* en la que se describía una base Janus capaz de interactuar con el par Watson-Crick C-G<sup>[21]</sup> nos impulsó a realizar su síntesis debido a la repetida presencia de este par canónico entre los *mismatches* de las estructuras de C(C)UG<sup>exp</sup>. El heterociclo es la **6-amino-1,3,5-triazina-2,4-(1H,3H)-diona** ( $J_W$ ) también conocida como amelida. Como puede verse en la figura 1.4., derivatizada en la posición 1 posee una cara con el perfil de reconocimiento AAD, por la que puede reconocer G, y la otra ADA, con la que interactuaría con C. Así pues, es capaz de formar un total de cinco puentes de hidrógeno al introducirse entre el par C-G.

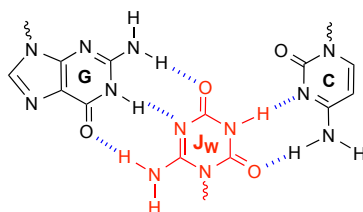


Fig. 1.4. La base Janus amelida ( $J_W$ ) interactuando con el par canónico C-G.

El heterociclo *6-amino-1,3,5-triazina-2,4-(1H,3H)-diona* ( $J_W$ ) es el producto de la doble hidrólisis de la melamina. Amelida descompone en agua a 170°C para dar CO<sub>2</sub> y amoníaco y puede convertirse en ácido cianúrico por oxidación con permanganato potásico o hirviéndolo con ácidos o bases. Su solubilidad, al igual que su absorción UV-Vis, es muy limitada y, por esto último, se deduce que el tautómero mayoritario es la forma cetónica.<sup>[22]</sup> La mayor parte de publicaciones que pueden encontrarse sobre amelida tratan de la detección de melamina y sus derivados (amelina, amelida y ácido cianúrico) en alimentos o bebidas. Ello es debido a que la contaminación voluntaria de leche con melamina causó daños e incluso muertes de niños en 2008. Esta adulteración de la leche se realizó para aparentar mayor contenido en compuestos proteicos, y posteriormente se repitió en comida para animales.<sup>[23,24]</sup>

## Los PNAs (Ácidos Nucleicos Peptídicos)

Los Ácidos Nucleicos Peptídicos (PNAs) son estructuras miméticas de los ácidos nucleicos formadas por un esqueleto pseudopeptídico compuesto por unidades de *N*-(2-aminoetil)glicina con nucleobases (o bases modificadas) unidas al esqueleto a través del nitrógeno de la glicina vía una cadena formada por un metileno y un grupo carbonilo (Figura 1.5).<sup>[25]</sup> Así pues, se trata de estructuras híbridas entre los oligonucleótidos y las proteínas que presentan una combinación de propiedades de ambos “mundos”.<sup>[26]</sup>

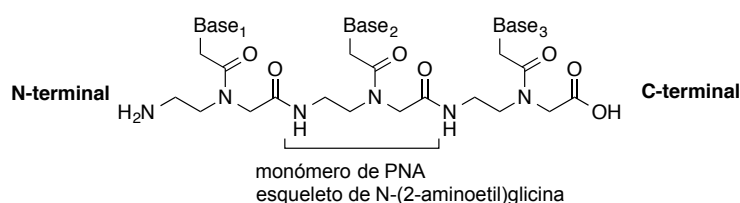


Fig. 1.5. Estructura de los Ácidos Nucleicos Peptídicos (PNAs).

En un intento de diseñar estructuras capaces de reconocer específicamente *dsDNA* para formar tríplexes vía la cara *Hoogsteen* de un par de bases apareadas, Nielsen y cols. diseñaron, por modulado molecular, unas estructuras poliméricas basadas en el DNA. En estos polímeros, el esqueleto de desoxiribosa-fosfato se sustituyó por un esqueleto de tipo poliamida aquiral, creando así los PNAs. No obstante, en este estudio se observó que un PNA poli-T no formaba el tríplex esperado sino que presentaba una extraordinaria capacidad de reconocimiento y hibridación con su cadena complementaria de DNA (poli-A). Este hecho evidenció que la estabilización de un dúplex híbrido DNA-PNA es mayor a la de un *dsDNA*.<sup>[27]</sup>

Desde entonces, los PNAs han atraído la atención de muchos científicos en distintos campos de investigación: química médica, bioorgánica y prebiótica<sup>[28–30]</sup>, química física<sup>[31]</sup>, biología molecular y nanotecnología<sup>[32]</sup>. Esto es debido a las propiedades químicas y físicas que poseen, entre las que destaca, básicamente, su eficiencia y especificidad para unirse a monocadenas de DNA y RNA así como a dúplexes de DNA. Por otro lado, también se han realizado y estudiado una gran variedad de modificaciones químicas en los PNAs, tanto en el esqueleto,<sup>[25,33]</sup> como en las bases<sup>[34]</sup>, todas ellas con el fin de potenciar algunas de sus propiedades u optimizarlas para variadas aplicaciones.

### Características

Los PNAs originales, es decir, con el esqueleto *N*-(2-aminoetil)glicina (aegPNA), son pseudopéptidos aquirales, miméticos de los ácidos nucleicos que presentan una estructura menos flexible que éstos debido a los enlaces de tipo amida presentes en todo su esqueleto.<sup>[35]</sup> Su representación es análoga a la de los péptidos, el  $N_{\text{terminal}}$  se coloca a la izquierda mientras que el  $C_{\text{terminal}}$  a la derecha (Figura 1.5).

El carácter neutro de los PNAs es una de sus características más importantes puesto que permite explicar porqué los dúplexes híbridos entre una cadena de PNA y una de DNA (o RNA) son más estables que los homodúplexes DNA-DNA o RNA-RNA. El hecho de presentar un esqueleto neutro elimina las repulsiones electrostáticas que se producen cuando dos cadenas de ácidos nucleicos se aproximan e interaccionan. Sin embargo, este carácter neutro hace a los

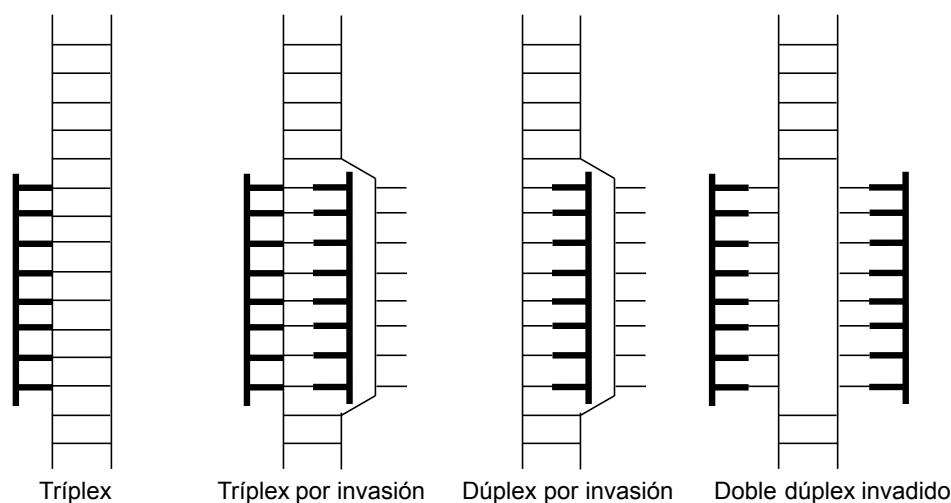
PNAs menos hidrofílicos, lo que implica que su solvatación y sus propiedades en disolventes no acuosos se ven afectadas.<sup>[36]</sup>

En un contexto terapéutico, es importante destacar que los PNAs son resistentes a la degradación enzimática ya que no son reconocidos por nucleasas ni por proteasas puesto que su estructura es distinta a la de los péptidos y oligonucleótidos.<sup>[37]</sup> Aunque son muchas las aplicaciones de los PNAs,<sup>[38-43]</sup> el mayor obstáculo aún por superar en cuanto a su utilización como fármacos es su administración y biodisponibilidad *in vivo*. Los oligómeros de PNA, aunque están formados por un esqueleto neutro y son solubles en agua, tienen una baja permeabilidad celular tanto en organismos eucariotas como bacterianos, por lo que presentan una limitada actividad en experimentos con modelos animales.<sup>[44]</sup> Se han realizado algunos estudios al respecto, observando que, por ellos mismos, los PNAs cruzan las membranas celulares con mucha dificultad.<sup>[45,46]</sup> No obstante, para intentar mejorar la penetración celular se plantean distintas posibilidades, como introducir lisinas en su esqueleto para conseguir cargas positivas<sup>[47,48]</sup>, conjugarlos a péptidos transportadores<sup>[47,49]</sup> o a estructuras lipofílicas<sup>[50]</sup> o bien, por métodos mecánicos.<sup>[51]</sup>

#### *Su interacción con el DNA y el RNA*

En cuanto a su interacción con cadenas simples de DNA y RNA, estos polímeros presentan mayor afinidad por oligonucleótidos con secuencias complementarias que los propios ácidos nucleicos naturales (DNA o RNA). Son capaces de hibridarse a una cadena de DNA o RNA paralelamente (3'oligonucleótido- C<sub>terminal</sub> PNA) y antiparalelamente (3'oligonucleótido- N<sub>terminal</sub> PNA), aunque la unión antiparalela está más favorecida.<sup>[52]</sup> La hibridación entre dos cadenas se rige, como era de esperar, por las reglas de apareamiento entre nucleobases de Watson-Crick<sup>[52]</sup> y se ha observado que la interacción es tan estable que resulta prácticamente independiente de la concentración de sales.<sup>[53]</sup>

En cuanto a su interacción con estructuras de doble cadena, se han estudiado extensamente los diferentes modos de unión que los PNAs presentan hacia un dúplex de DNA (Figura 1.6). Esta interacción puede dar lugar a un tríplex por la cara Hoogsteen del surco mayor,<sup>[54]</sup> un dúplex<sup>[55]</sup> o tríplex por invasión<sup>[56]</sup> o a una doble invasión sobre el dúplex.<sup>[57] [58-60]</sup>



**Fig. 1.6.** Esquema de los distintos modos de unión de los PNAs a una estructura de *dsDNA*. Los PNAs están representados en negrita.

En comparación con el DNA, la interacción de los PNAs con estructuras secundarias de RNA no ha sido tan estudiada puesto que los complejos no son tan estables. Sin embargo, Rozners y *cols.* han realizado un amplio estudio de la capacidad de los PNAs para hibridarse con dobles cadenas de RNA, estudios que, teniendo en cuenta los objetivos de esta tesis, son de gran trascendencia para su desarrollo.

En los trabajos de Rozners se estudia la capacidad de una cadena de PNA, con y sin modificaciones, para establecer interacciones por la cara Hoogsteen de un *hairpin* de RNA y formar una triple hélice (Figura 1.7).

En su primer estudio se emplearon distintos PNAs pirimidínicos no modificados de corta longitud (6-mer y 12-mer) y se trabajó a pH 5.5 para asegurar la protonación de la citosina, que es necesaria para su interacción con la cara Hoogsteen de G. Los experimentos de ITC y dicroísmo circular corroboraron la formación de la triple hélice con una alta selectividad del PNA y una fuerte unión a la estructura tallo-lazo de RNA.<sup>[61]</sup> Posteriormente, diseñaron PNAs con bases modificadas<sup>[62]</sup> y con modificaciones en la distancia entre la base y el esqueleto de *N*-(2-aminoetil)glicina. La formación del tríplex y sus parámetros termodinámicos se estudiaron por ITC a pH 5.5 y 6.25 con muy buenos resultados, tanto de afinidad como de selectividad. Los PNAs con un átomo de carbono más en la cadena que separa la base y el esqueleto de AEG presentaron una mayor afinidad hacia la diana.<sup>[63]</sup> Más adelante, con el objetivo de conseguir mejorar las interacciones a pH fisiológico (pH= 7.4), sintetizaron PNAs modificados con la base 2-aminopirimidina que fueron capaces de formar triplexes con *hairpins* de RNA en condiciones fisiológicas. La unión era muy selectiva en cuanto a la secuencia y también respecto a la naturaleza del ácido nucleico, ya que se observa mayor afinidad hacia estructuras de RNA que de DNA.<sup>[64]</sup> En su estudio más reciente este grupo ha trabajado con argPNAs, donde se ha sustituido la glicina del esqueleto por una arginina, para potenciar la afinidad del PNA hacia el RNA y mejorar su permeabilidad celular. Los ensayos realizados parecen indicar la formación de un tríplex por invasión.<sup>[65]</sup> Así pues, con su extenso trabajo, Rozners ha demostrado que los PNAs, modificados o no, son capaces de interactuar selectivamente y con gran afinidad con RNAs estructurados dando lugar a triples hélices.

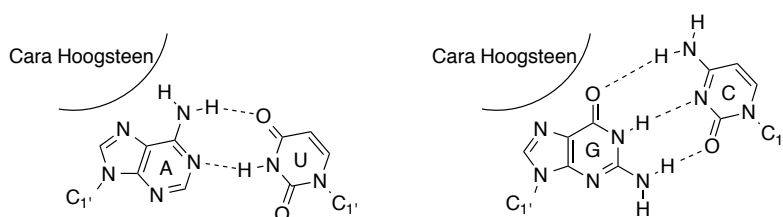


Fig. 1.7. Pares de bases Watson-Crick y zona por la que tienen lugar las interacciones Hoogsteen.

### Modificaciones descritas

A partir del trabajo de Nielsen y *cols.* en 1991, se han realizado y estudiado muchas modificaciones en los PNAs, tanto en el esqueleto como en las bases, con el fin de poder mejorar y optimizar sus propiedades (Fig.1.8). En cuanto al esqueleto de *N*-(2-aminoetil)glicina, la gran variedad de modificaciones y sustituciones estudiadas han dado lugar a PNAs con propiedades de reconocimiento inferiores a los *aeg*PNAs.<sup>[66-71]</sup> En otras aproximaciones, se ha modificado la longitud y la naturaleza de la cadena que separa el esqueleto de PNA y la base, probando con una cadena etílica<sup>[72]</sup> o propílica.<sup>[73]</sup> En cuanto a sustituciones en el esqueleto,

los más destacados son los lysPNAs<sup>[74]</sup> y los argPNAs<sup>[75]</sup>, en los que la glicina ha sido sustituida por lisina o arginina, respectivamente. Estas modificaciones son muy interesantes con fines terapéuticos y confieren al polímero una mayor solubilidad y una mejorada permeabilidad celular como consecuencia de la protonación de la cadena lateral del aminoácido. Finalmente, las modificaciones realizadas en las bases es tan extensa como lo son las aplicaciones, el tipo de interacciones y los objetivos que puedan imaginarse.<sup>[76-84]</sup>

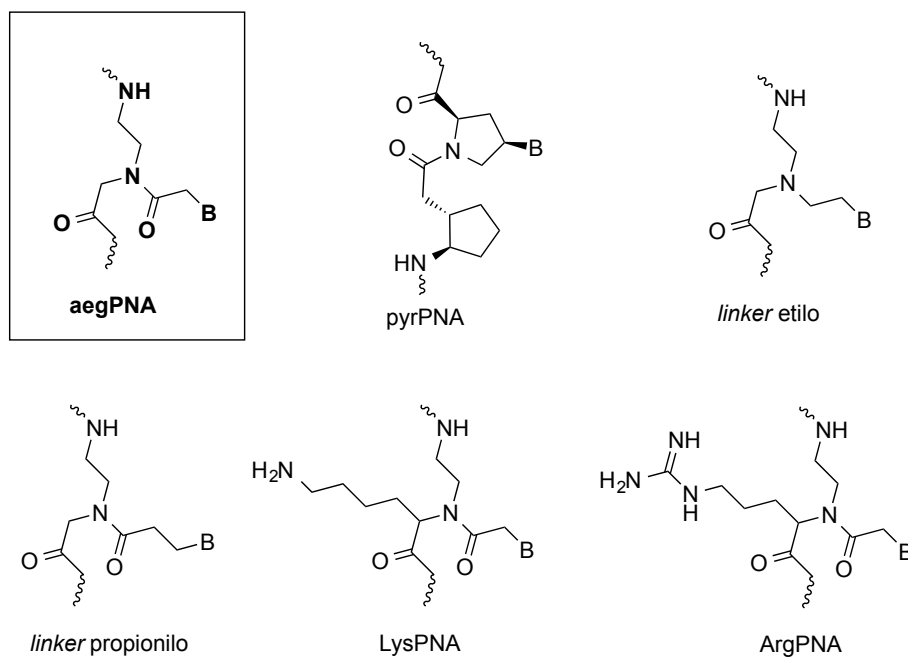


Fig. 1.8. Esquema de algunas de las modificaciones en el esqueleto de PNA descritas en los últimos veinte años.

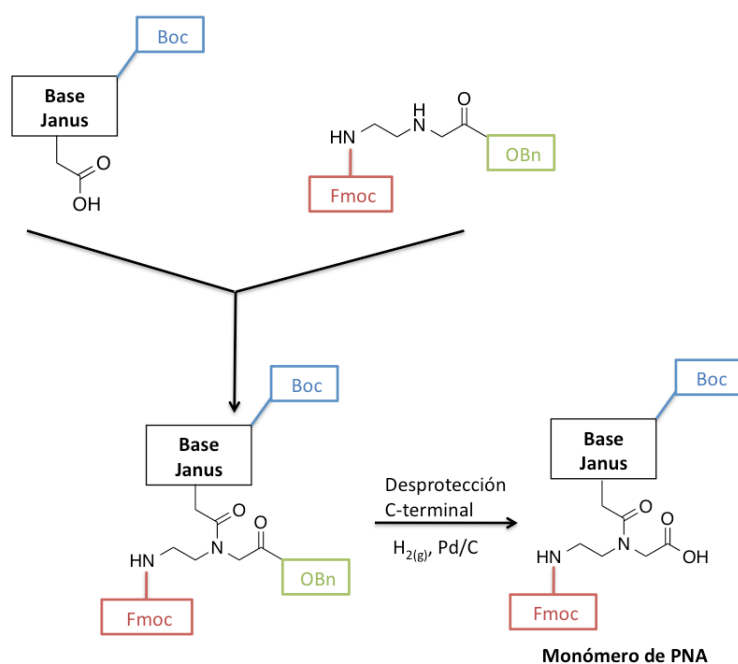


El objetivo del trabajo descrito en este capítulo es derivatizar como monómeros de PNA las bases Janus  $J_T$ ,  $J_D$  y  $J_W$  seleccionadas para interactuar con los pares no canónicos U·U y C·U, así como con el par C-G. Esta estrategia permite obtener ligandos con un esqueleto neutro y aquiral que debería favorecer su aproximación al RNA evitando repulsiones electrostáticas y, a su vez, abre las puertas a la obtención de ligandos que agrupen distintos módulos (*modularly-assembled ligands*) capaces de interactuar con *mismatches* contiguos.

En primer lugar se describe el diseño y el desarrollo de unas rutas sintéticas válidas para la obtención de los monómeros de PNA de las bases Janus 2,4,6-triaminopirimidina ( $J_T$ ), 2,6-diamino-4-pirimidona ( $J_D$ ) y 6-amino-1,3,5-triazina-2,4(1*H*,3*H*)-diona ( $J_W$ ) debidamente protegidas y derivatizadas en las posiciones 5, 5 y 1, respectivamente. Posteriormente se procede con el estudio de sus propiedades ácido-base y la determinación de sus coeficientes de extinción molar. Finalmente, se detalla el diseño y síntesis de los ligandos tipo PNA que contienen las bases  $J_T$ ,  $J_D$  y  $J_W$ .

## 2. Síntesis de los monómeros de PNA de $J_T$ , $J_D$ y $J_W$

En cuanto a la síntesis de los tres monómeros, lo primero que debía tenerse en cuenta era la estrategia de protección que se emplearía. Puesto que la síntesis de los ligandos PNA se realizaría mediante síntesis estándar en fase sólida, los monómeros debían tener grupos protectores ortogonales que permitiesen la eliminación selectiva del protector del grupo amino terminal del esqueleto de AEG, sin que se viera comprometida la integridad de los grupos protectores de las bases. Los monómeros de PNA comerciales más empleados suelen estar protegidos con el grupo 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) en el grupo amino terminal, mientras que se emplea el grupo benzhidroxiloxycarbonilo (Bhoc) para las bases A, C y G. Los dos grupos protectores son ortogonales ya que Fmoc es lábil en condiciones básicas mientras que los Bhoc se eliminan en condiciones ácidas. La utilización del grupo Bhoc como protector de las bases Janus seleccionadas no se consideró adecuada puesto que se trata de un grupo estéricamente muy voluminoso y podía llegar a complicar la síntesis total de los monómeros. Así pues, se eligió, en base a las síntesis de monómeros de PNAs descritas por Hudson y cols.,<sup>[77,85]</sup> la siguiente estrategia de protección: los grupos amino de las bases Janus se protegerían con el protector *tert*-butiloxycarbonilo (Boc), el grupo amino del esqueleto de *N*-(2-aminoetil)glicina con Fmoc y el grupo carboxilo C-terminal del precursor del monómero de PNA mediante la formación de un éster bencílico, consiguiendo así la ortogonalidad necesaria. La síntesis de los monómeros de PNA suele ser una síntesis convergente en la que, por un lado, se sintetiza la base convenientemente protegida y derivatizada como ácido metilencarboxílico y, por otro lado, se obtiene el esqueleto de *N*-(2-aminoetil)glicina convenientemente protegido. Una vez obtenidos los dos fragmentos se procede a una reacción de acoplamiento entre ambos para formar el enlace amida que da lugar al monómero de PNA. Finalmente, se desprotege el grupo C-terminal dando lugar al monómero de PNA listo para ser introducido en la cadena polimérica (Figura 1.9).



**Fig. 1.9.** Estrategia de síntesis convergente para la obtención de los monómeros de PNA. Se detalla la estrategia de protección escogida en esta tesis doctoral.

## 2.1. El monómero de PNA con $J_T$

### 2.1.1. Intentos de obtención del monómero no modificado con $J_T$

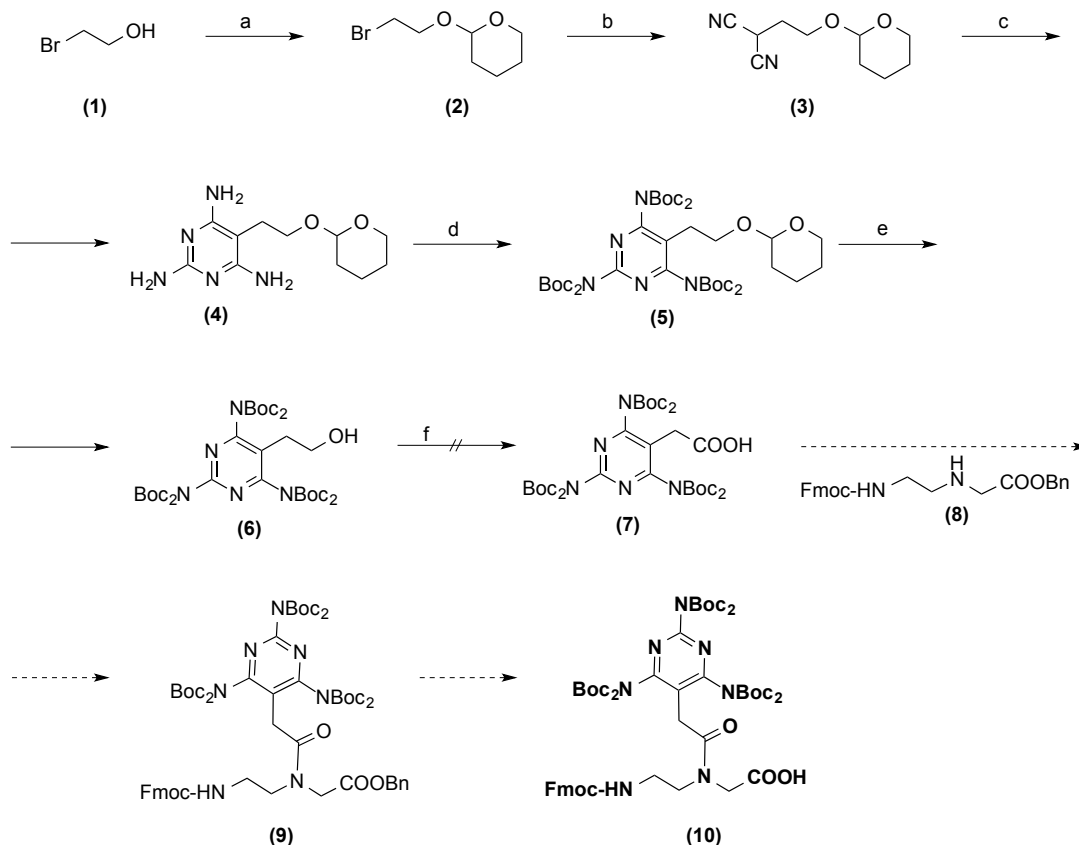
Para facilitar la lectura del manuscrito, en este apartado se resumirán los diferentes intentos realizados sin éxito para la obtención del monómero de PNA no modificado de la base  $J_T$ . Se ha trasladado al Apéndice la descripción y el análisis detallado de los problemas experimentados.

#### 2.1.1.1. Primera Ruta Sintética

##### 2.1.1.1.1. Bis-protección de $J_T$ con grupos Boc

Inicialmente, se diseñó una primera ruta sintética adaptando a nuestros objetivos un esquema sintético descrito en una patente de Fenniri y *cols.* (Figura 1.10).<sup>[86]</sup>

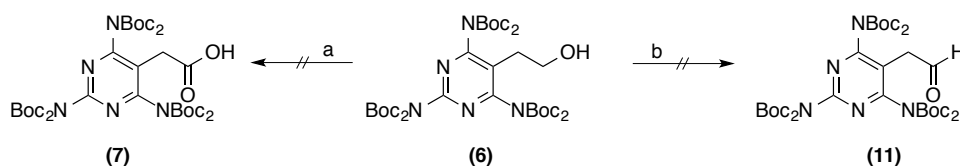
La ruta sintética de la patente de Fenniri, a diferencia del esquema sintético aquí planteado, se inicia con el compuesto comercial 3-bromopropanol en vez del 2-bromoetanol, y describe todas las etapas sintéticas para obtener el compuesto análogo a **6** con un carbono adicional en su cadena lateral. Fenniri oxida este alcohol a aldehído mientras que, para la síntesis del monómero de PNA deseado, debe ser oxidado a ácido carboxílico. Se planteó entonces, hacer reaccionar el ácido obtenido **7** con el esqueleto de AEG convenientemente protegido para obtener el monómero de PNA **9** que, vía una hidrogenólisis del ester bencílico, se convertiría en el monómero de PNA anhelado **10**.



**Fig. 1.10.** Ruta sintética inicial diseñada para la obtención del monómero de PNA con  $J_T$ . Los reactivos empleados y los rendimientos obtenidos son los siguientes: a. DHP (1.1 eq),  $\text{HCl}_{\text{cat}}$ , rt, 2.5 h, **100%**; b. Malononitrilo (2.1 eq), NaH 60% (1.2 eq),  $\text{DME}_{\text{anh}}$ , rt, *overnight*, **87%**; c. 1.  $\text{Na}_{(\text{s})}$  (2 eq) y  $\text{EtOH}_{(\text{abs})}$ , 2. Hidrocloruro de guanidinio (1.3 eq), reflujo, 6h, **73%**; d.  $\text{Boc}_2\text{O}$  (20 eq), DMAP (0.7 eq), TEA (8 eq),  $\text{THF}_{\text{anh}}$ , rt, 24-30 h, **58%**; e.  $\text{pTsOH}_{\text{cat}}$ , MeOH, rt, 6 h, **85%**; f. Oxidación, diferentes reactivos, ver Tabla A.1.

Los procedimientos experimentales descritos en la patente de Fenniri hasta el compuesto **6** fueron esencialmente reproducibles, aunque alguno de ellos tuvo que ser optimizado para mejorar los rendimientos.

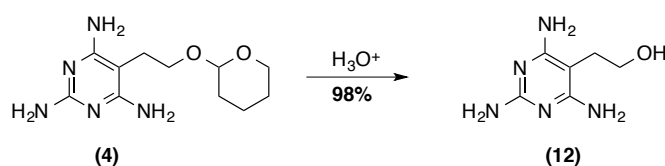
Se utilizó todo un abanico de condiciones para oxidar el alcohol **6** tanto al ácido carboxílico **7** como al aldehído **11** (Figura 1.11). Se llevaron a cabo distintos intentos (Tabla A.1) con  $\text{KMnO}_4$  en condiciones básicas,<sup>[87]</sup> con el radical TEMPO (2,2,6,6-tetrametilpiperidil-*N*-oxil) en combinación con clorito e hipoclorito sódico,<sup>[88,89]</sup> se empleó también el periodinato de Dess-Martin (DMP), ya utilizado por Fenniri para la oxidación a aldehído, el clorocromato de piridinio (PCC)<sup>[90]</sup> y la oxidación de Swern.<sup>[91]</sup> No obstante, todos los intentos fueron infructuosos. En todos los ensayos se recuperó intacto el alcohol de partida **6**, lo que parecía indicar que, el grupo hidroxilo no era capaz de interactuar con los agentes oxidantes.



**Fig. 1.11.** Oxidación del alcohol **6** a ácido carboxílico (a) y a aldehído (b). Los agentes oxidantes empleados han sido: a.  $\text{KMnO}_4$  y TEMPO/ $\text{NaClO}_2$ ; b. DMP, oxidación de Swern y PCC. (Ver tabla A.1)

En la caracterización por RMN- $^1\text{H}$  del alcohol **6** se pudo observar que la señal del H del grupo hidroxilo presentaba un desplazamiento a campos muy bajos ( $\delta = 8.12$  ppm) y que la molécula no tenía la simetría esperada. Las evidencias espectroscópicas eran compatibles con la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular que provocase que el grupo hidroximetilo de **6** fuese poco accesible y mucho menos reactivo. Además, el gran impedimento estérico que provocaban los grupos protectores Boc también dificultaban su interacción con los agentes oxidantes.

Se planteó la síntesis del compuesto **12**, que es análogo al alcohol **6** pero sin la protección de las aminas (Figura 1.12), para obtener un derivado simple de la base  $J_T$  con el que llevar a cabo algunos ensayos preliminares de interacción y, desde el punto de vista sintético, intentar su oxidación evitando el impedimento estérico que los grupo Boc causaban en el compuesto protegido, aún sabiendo que las aminas podrían interferir en la reacción.

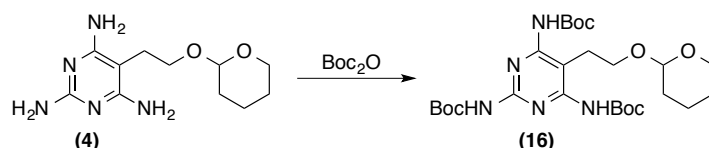


**Fig. 1.12.** Desprotección en condiciones ácidas del alcohol de **4**. Condiciones optimizadas: AcOH/H<sub>2</sub>O (1:1) *overnight* a 70°C.

Se intentó la oxidación del hidroxilo de **12** (Figura A.6) tanto a ácido carboxílico (KMnO<sub>4</sub>)<sup>[87]</sup> como a aldehído (DMP, PCC)<sup>[86,90]</sup> (Tabla A.2). Todos los ensayos fueron fallidos y en ninguno de los casos se detectó la formación de los productos de oxidación de **12** pero sí la de numerosos productos no identificados, muy probablemente, fruto de la alta reactividad de las aminas.

#### 2.1.1.1.2. Protección parcial de $J_T$ con grupos Boc

*Mono-protección de las aminas.* Se planteó la opción de obtener un alcohol primario menos impedido estéricamente para facilitar su interacción con los agentes oxidantes (Figura 1.13).



**Fig.1.13.** Síntesis planteada para la obtención del producto *mono*-protegido en cada amina **16**. Las diferentes condiciones ensayadas para la introducción del grupo protector Boc se encuentran resumidas en la tabla A.3 y A.4.

Empleando el reactivo Boc<sub>2</sub>O, se llevaron a cabo muchos ensayos variando las condiciones de la reacción: número de equivalentes de Boc<sub>2</sub>O, temperatura, cambio de disolvente, de base, de catalizador,... (Tabla A.3). Se llegó a la conclusión que, a causa de la baja nucleofilia de las aminas exocíclicas, la reacción no evolucionaba en ausencia de un agente activante y, en contrapartida, este activante favorecía la *bis*-protección de las aminas. Consecuentemente, se generaban un gran número de productos, desde el que tenía un grupo Boc hasta el que tenía seis, y el rendimiento que podía obtenerse de cada uno de ellos era muy bajo.

Un reactivo comúnmente empleado para la introducción de grupos Boc es el *tert*-butoxicarbonilimidazol (Boc-Im) que es comercial y sencillo de sintetizar. Su síntesis está descrita a partir de *tert*-butanol y carbonildiimidazol (CDI) con un buen rendimiento.<sup>[92]</sup> A partir de su síntesis y de su reactividad surgió la idea de introducir el grupo protector Boc en dos etapas utilizando CDI y *tert*-butanol (Figura 1.14).

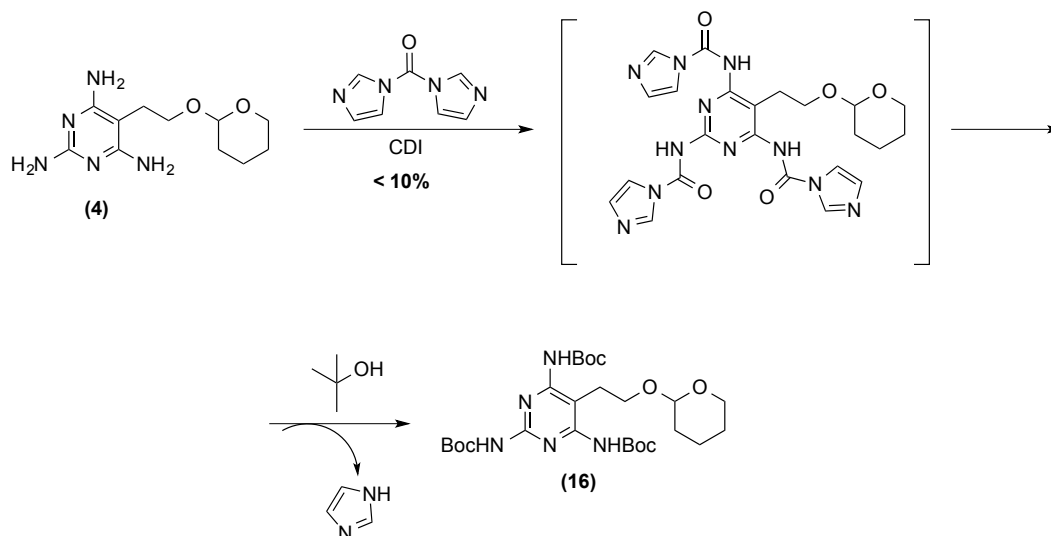


Fig. 1.14. Introducción del grupo protector Boc en  $J_7$  a partir de CDI y *tert*-butanol para la obtención de **16**.

Se realizaron algunos ensayos con distintas condiciones experimentales y, en una de ellas, realizando la reacción *one pot* (ensayo *c*, Tabla A.4), es decir, añadiendo desde el principio todos los reactivos, se pudo aislar el producto deseado **16** con un rendimiento del 10% después de dos purificaciones por columna. Sin embargo, el rendimiento disminuyó al aumentar la escala de trabajo. Las reducidas cantidades obtenidas de **16** no permitían seguir adelante con la ruta sintética planteada ya que aún restaban cuatro etapas sintéticas para obtener el monómero de PNA deseado.

*Desprotección parcial de las aminas del intermedio 5.* Los grupos protectores Boc son lábiles a condiciones ácidas, sin embargo, en presencia de iones hidróxido y en determinadas condiciones de tiempo y/o temperatura, su estabilidad también se ve comprometida. Así pues, se intentaron optimizar unas condiciones para desproteger parcialmente el compuesto **5** utilizando hidróxido de litio (LiOH). Después de ensayar distintas condiciones experimentales, se logró obtener el producto con 4 grupos protectores Boc **17** con un rendimiento del 37% (Figura 1.15).

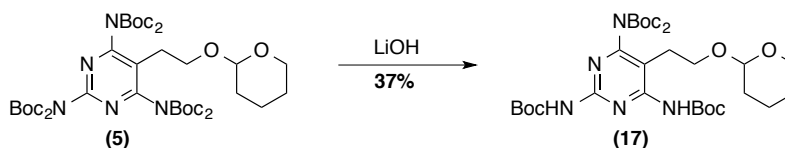


Fig. 1.15. Desprotección parcial de los grupo amino del compuesto **5** en presencia de hidróxido de Litio. Condiciones: LiOH (4 eq), THF/agua, 40°C, 19 h.

Se procedió con la hidrólisis del acetal de **17** poniendo en práctica las mismas condiciones (pTsOH, MeOH) anteriormente utilizadas con el compuesto **5** que contiene seis grupos Boc (Figura 1.10). Sorprendentemente, se tuvo que alargar el tiempo de reacción, se necesitó el

doble de concentración de ácido pTsOH y fue necesaria una purificación en columna. Finalmente, se obtuvo con un rendimiento del 30% el producto con tres grupos Boc **18** (Figura 1.16).

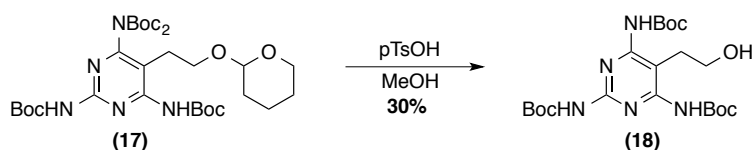


Fig. 1.16. Reacción de desprotección del alcohol de **17** para la obtención de **18**.

Así pues, la obtención de **18** a partir del intermedio **5** se consiguió en dos etapas con un bajo rendimiento global del 11%. Sin embargo, ensayos de estabilidad de **18** en distintos disolventes demostraron que los grupos protectores Boc eran más lábiles en **18** que en los compuestos *hexa*-protegidos (como el compuesto **5**). Posteriormente se comprobó que sucedía lo mismo con los productos con cuatro y tres grupos Boc **16** y **17**.

En este punto, se decidió abandonar esta ruta sintética y plantear una nueva.

### 2.1.1.2. Segunda Ruta Sintética

La nueva ruta sintética se diseñó con el fin de que la funcionalización de ácido en la cadena lateral de  $J_T$  ya estuviera implícita antes de la protección de las aminas (Figura 1.17).

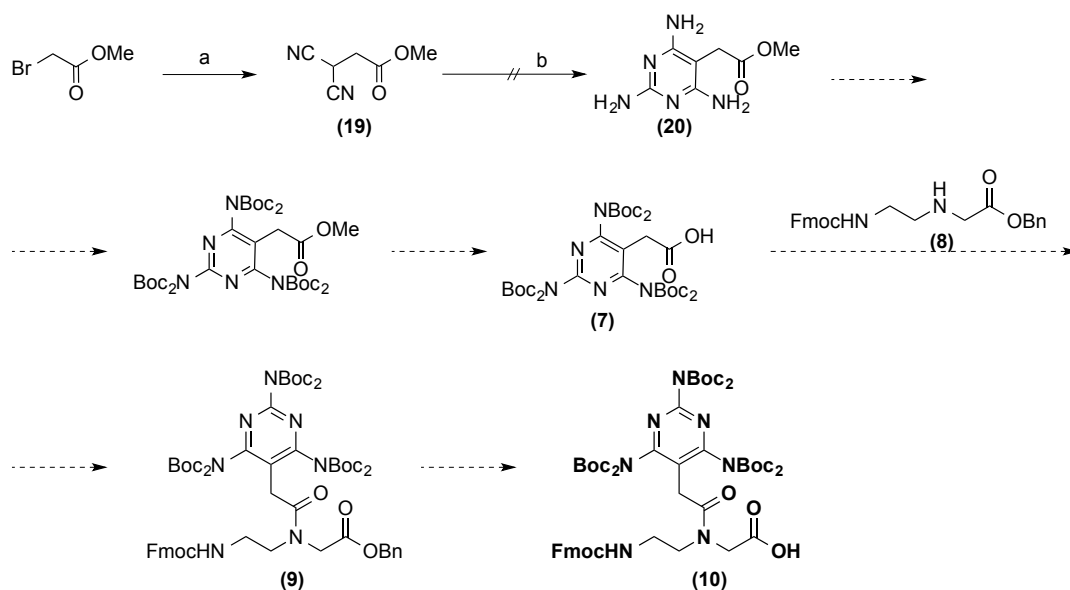


Fig.1.17. Segunda ruta sintética planteada para la síntesis del monómero de PNA con la base  $J_T$ . Condiciones de las reacciones llevadas a cabo: a. Malononitrilo (1.5 eq), 60% NaH (1.6 eq),  $DME_{anh}$ , rt, *overnight*, 60%; b. 1.  $Na_{(s)}$  (2 eq),  $MeOH_{anh}$  2. hidrocloreuro de guanidinio (1.3 eq), reflujo, 3.5 h.

Obtenido el compuesto **19**, se hizo reaccionar con hidrocloreuro de guanidinio en metóxido sódico para formar el anillo 2,4,6-triaminopirimidina. Lamentablemente, no se obtuvo el compuesto **20** sino su producto de ciclación **21**, resultante del ataque nucleófilo de la amina exocíclica de la posición 2 sobre el ester metílico de la cadena lateral (Figura 1.18).

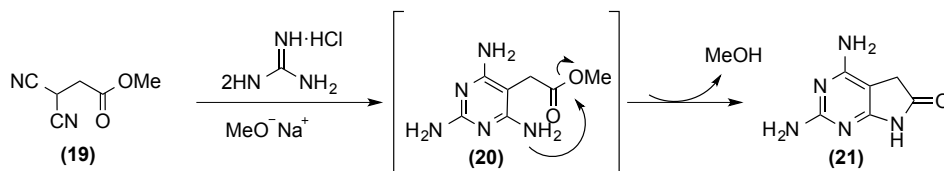


Fig.1.18. Obtención del producto bicíclico **21** a partir de **19**.

Para intentar superar este inconveniente se plantearon algunas alternativas sintéticas (Figura 1.19).

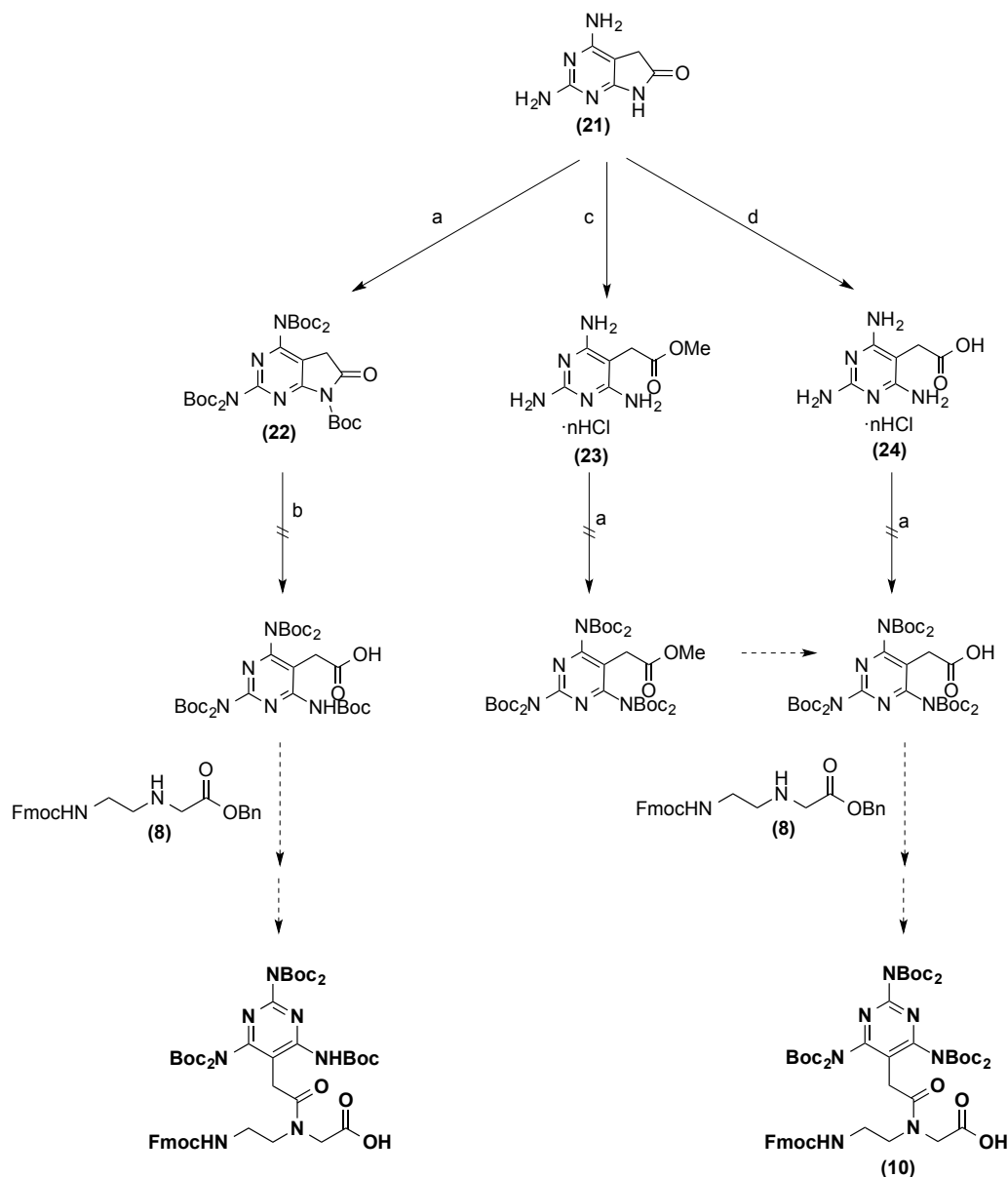


Fig. 1.19. Diferentes opciones sintéticas a partir del compuesto bicíclico **21** para la obtención del monómero de PNA con la base  $J_T$ . Condiciones de reacción: a.  $\text{Boc}_2\text{O}$  (3-20 eq), DMAP (0.5 – 3 eq), TEA (5 eq.), ACN entre 10 h y 8 días a  $70^\circ\text{C}$  o rt; b.  $\text{H}_2\text{O}_2$  (6 eq), LiOH (2 eq), THF/ $\text{H}_2\text{O}$ , rt, 3 días; c.  $\text{HCl}_{(\text{g})}$ ,  $\text{MeOH}_{\text{anh}}$ , rt, 1.5 h, **100%**; d.  $\text{HCl}_{(\text{ac})}$  7%, reflujo, 5 h, **100%**.

En primera instancia se planteó proteger las aminas de **21** con grupos Boc y forzar también la protección de la lactama utilizando un exceso de  $\text{Boc}_2\text{O}$ . Dado que el enlace amida estaría activado, se podía intentar una rotura oxidativa con  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{LiOH}^{[93]}$  para obtener el ácido

correspondiente. Sin embargo, aunque el producto **22** se detectó en el crudo de la reacción por EM-ESI, fue imposible aislarlo puro en los diferentes ensayos realizados. La rotura oxidativa sobre el mismo crudo de reacción se llevó a cabo sin éxito.

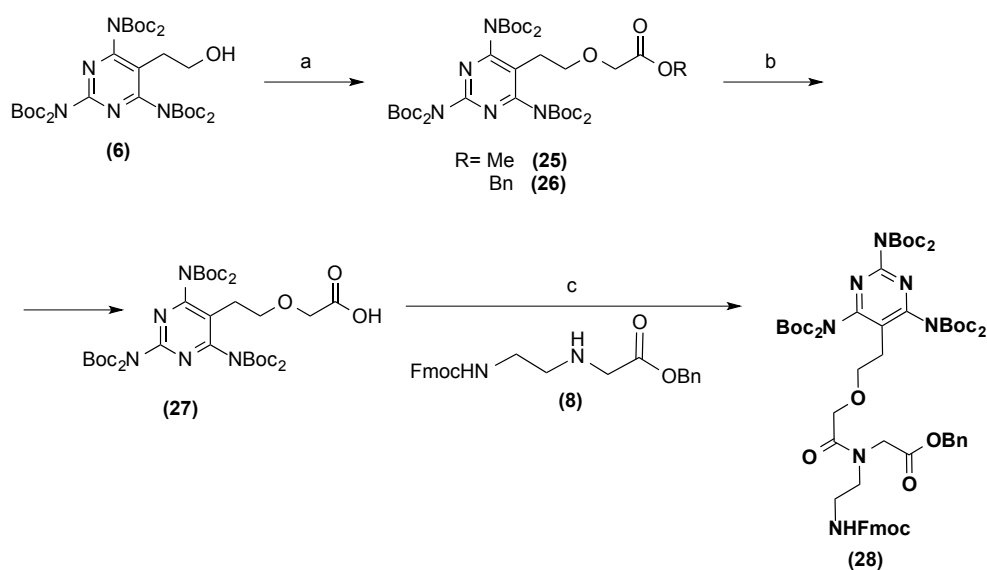
En las otras aproximaciones planteadas se pensó en la apertura de la lactama, vía metanólisis o hidrólisis, para obtener **23** y **24**, respectivamente. Ambas reacciones permitieron la obtención de los productos deseados. Sin embargo, al intentar la protección de sus aminas con  $\text{Boc}_2\text{O}$ , volvieron a ciclar para formar de nuevo el producto **21** y los productos derivados de la introducción de algunos grupos Boc.

### 2.1.2. Obtención de monómeros modificados con $J_T$

Después de intentar sin éxito dos rutas sintéticas con sus variantes para obtener el monómero de PNA deseado, se decidió abandonar este objetivo inicial e intentar la síntesis de otros monómeros con la base  $J_T$  en los que la distancia entre ésta y el esqueleto de *N*-(2-aminoetil)glicina fuera superior. De esta manera, se pretendía evitar toda la problemática experimentada con el monómero ideal.

#### 2.1.2.1. Obtención del monómero $J_T$ -O-PNA

En una primera aproximación, se decidió partir del compuesto **6** de la primera ruta sintética (Figura 1.10) y derivatizarlo a través del grupo hidroxilo de su cadena lateral mediante un enlace de tipo éter (Figura 1.20).



**Fig.1.20.** Ruta sintética planteada para la obtención del monómero de  $J_T$  modificado a partir del alcohol **6**. Condiciones de reacción: a. Para la obtención de **25**: NaH al 60% (1.5 eq), 2-bromoacetato de metilo (1.4 eq) en  $\text{DME}_{\text{anh}}$ , de  $0^\circ\text{C}$  a rt, *overnight*, **40%**. Para la obtención de **26**: NaH al 60%(1.5 eq), 2-bromoacetato de bencilo (1.4 eq) en  $\text{DME}_{\text{anh}}$ , de  $0^\circ\text{C}$  a rt, *overnight*, **80%**; b. A partir de **25**:  $\text{LiOH}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (1.1 eq),  $\text{H}_2\text{O}:\text{THF}$  (2:8), rt, 1 día, **78%**. A partir de **26**:  $\text{H}_2(\text{g})$ , Pd/C, MeOH, rt, 30 min, **100%**; c. EDC (1.1 eq), HOBT (0.5 eq), **8** (1.1 eq), DIEA (2eq), DCM, rt, 15 h, **68%**.

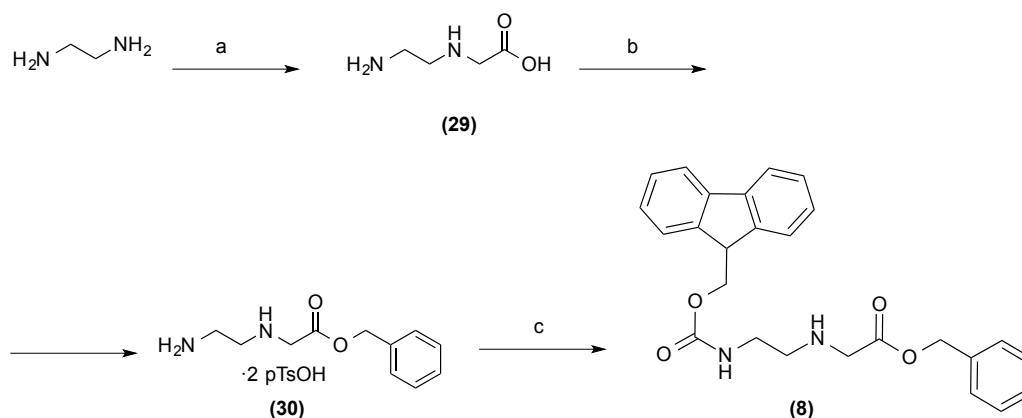
Las dos rutas sintéticas llevadas a cabo se iniciaron con la formación del alcóxido del producto **6** con NaH. En la primera, se añadió una solución de 2-bromoacetato de metilo y, aunque con un rendimiento relativamente bajo (40%), se obtuvo el producto **25** después de una purificación cromatográfica. A continuación era necesaria la saponificación del ester **25** sin



comprometer la permanencia de los grupos Boc, por eso se eligió emplear hidróxido de litio en una solución de agua y THF que permitió obtener **27** con un rendimiento del 78%.<sup>[94,95]</sup>

Teniendo en cuenta la escasa complejidad de las dos reacciones químicas llevadas a cabo para la obtención de **27**, el rendimiento obtenido era relativamente bajo (31%). Con el objetivo de mejorarlo, se llevó a cabo la misma síntesis vía ester bencílico. Se procedió a la obtención de **26** mediante el mismo procedimiento experimental, siendo muy cuidadosos con las condiciones anhidras y en las diferentes adiciones de reactivos. El rendimiento obtenido, después de una purificación por columna de gel de sílice, fue el doble que el logrado con el ester metílico. La eliminación del grupo bencilo se llevó a cabo rápida y fácilmente mediante hidrogenólisis empleando como catalizador Pd<sub>(s)</sub> sobre C con un rendimiento cuantitativo. Cambiando la estrategia de protección del ácido de ester metílico a bencílico se logró mejorar el rendimiento de estas dos etapas del 31% al 80%. El siguiente paso en la ruta sintética fue el acoplamiento del ácido **27** con el esqueleto de *N*-(2-aminoetil)glicina protegido **8**.

El compuesto **8**, como ya se ha comentado anteriormente, no es comercial y se tuvo que sintetizar a partir de etilendiamina y ácido 2-cloroacético (Figura 1.21).<sup>[85,96]</sup>



**Fig. 1.21.** Síntesis del esqueleto de *N*-(2-aminoetil)glicina protegido con el grupo protector Fmoc en el *N*-terminal y como ester bencílico en el extremo C-terminal. Condiciones experimentales: a. ácido 2-cloroacético (0.1 eq), de 0°C a rt, 24 h, **49%**; b. Alcohol bencílico (18 eq), pTsOH (2.4 eq), Tolueno, reflujo, 6.5 h, **90%**; c. Fmoc-OSu (1.1 eq), DIEA (3.2 eq), THF, 2.5 h a 0°C y 30 min a rt, **70%**.

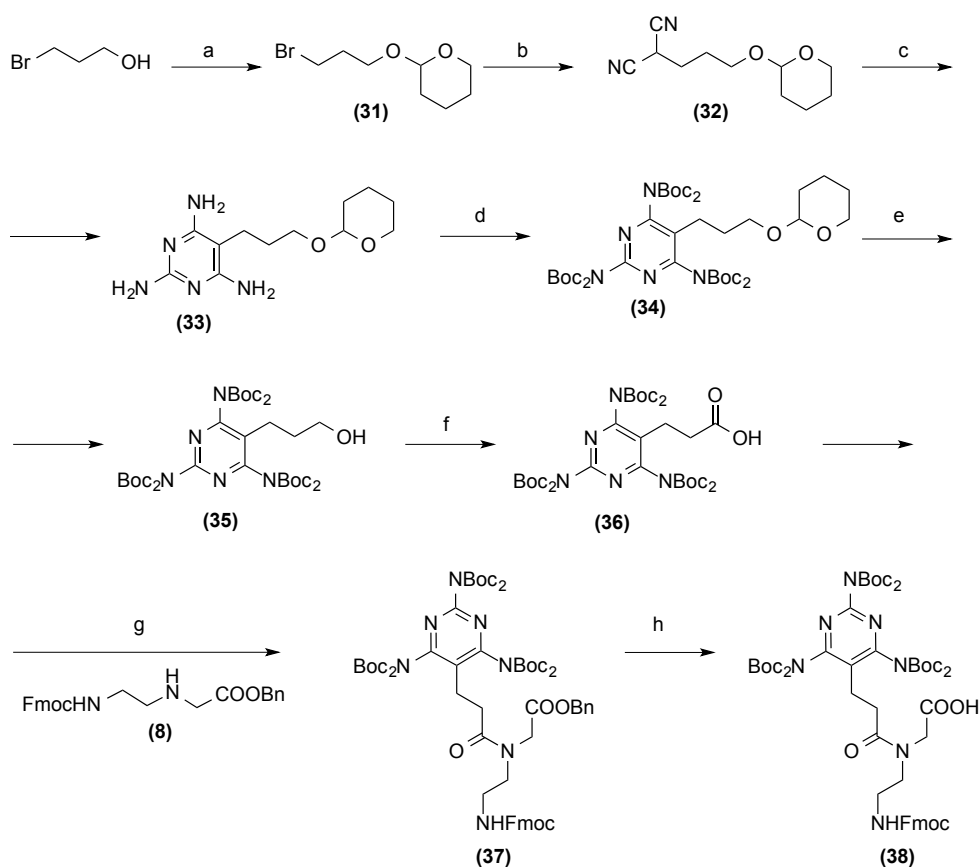
La ruta llevada a cabo, descrita anteriormente por Husdon y cols., se reprodujo sin dificultades. La primera etapa, es decir, la formación de la *N*-(2-aminoetil)glicina **29**, no presenta muy buen rendimiento, siendo la mayor dificultad el aislamiento del producto que debe precipitar en DMSO. No obstante, los buenos resultados de la esterificación de Fisher para obtener **30** y la protección de la amina primaria con Fmoc-Osu permitieron obtener **8** con un rendimiento global del 31% en tres etapas sintéticas.

Volviendo a la síntesis del monómero **28**, se procedió al acoplamiento entre el esqueleto de *N*-(2-aminoetil)glicina protegido **8** y el ácido **27** (Fig.1.20). La formación del enlace amida se llevó a cabo empleando la carbodiimida EDC, HOBt y DIEA en condiciones anhidras para optimizar al máximo el acoplamiento.

Finalmente, el monómero de PNA **28** con el C-terminal protegido como ester bencílico se obtuvo en un total de 8 etapas sintéticas con un rendimiento global del 17%. Para la mejor conservación del producto, se guardó el monómero en forma de ester bencílico hasta su uso, momento en el que se eliminaría vía hidrogenólisis.

2.1.2.2. Obtención del monómero J<sub>T</sub>-PNA

Aunque el monómero **27** se obtuvo con buen rendimiento, la distancia entre la base J<sub>T</sub> y el esqueleto de PNA parecía ser, sobre el papel, demasiado grande respecto a los PNAs clásicos. Por este motivo, se planteó la opción de obtener otro monómero de PNA modificado pero, con una distancia entre el esqueleto y la base inferior a la de **27**. Se decidió reproducir la síntesis llevada a cabo en la patente de Fenniri<sup>[86]</sup> en la que se había basado la primera ruta sintética (*Apartado 2.1.1.1.*, Figura 1.10) donde se parte de 3-bromopropanol (Figura 1.22). Fenniri describe los pasos sintéticos para obtener el compuesto **35** el cual es oxidado empleando DMP a aldeído. Teniendo en cuenta que en la publicación no se comenta ningún problema asociado a esta etapa, se creyó que la oxidación a ácido carboxílico podría llevarse a cabo sin las dificultades encontradas con el alcohol **6**.



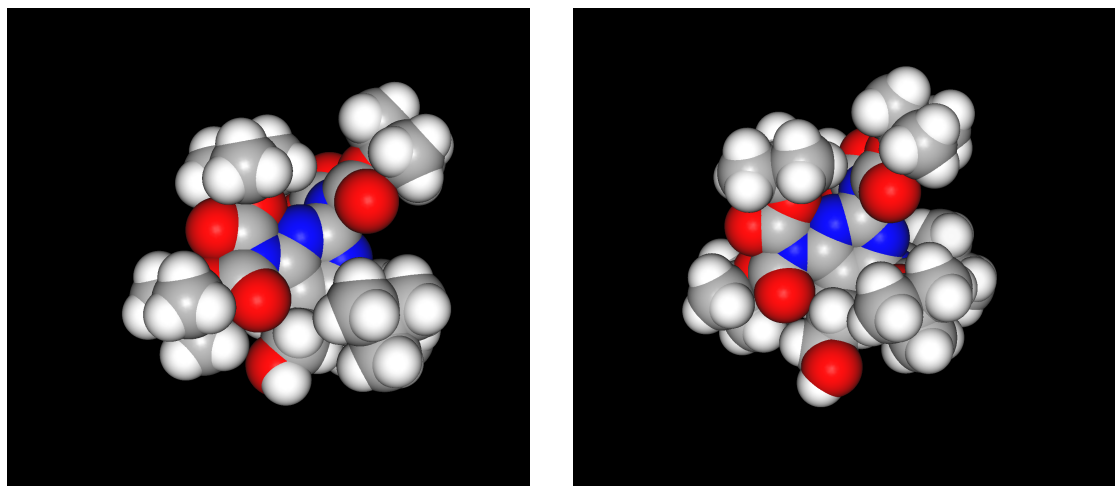
**Fig. 1.22.** Ruta sintética para la obtención del monómero de PNA con la base J<sub>T</sub> y con un metileno de más en su cadena lateral (J<sub>T</sub>-PNA). Los reactivos empleados y los rendimientos obtenidos son los siguientes: a. DHP (1.1 eq), HCl<sub>cat</sub>, rt, 4 h, **75%**; b. Malonitrilo (1.5 eq), NaH 60% (1.5 eq), DME<sub>anh</sub>, rt, *overnight*, **66%**; c. 1. Na<sub>(s)</sub> (2 eq) y EtOH<sub>(abs)</sub>, 2. Hidrocloruro de guanidinio (1.2 eq), reflujo, 5h, **69%**; d. Boc<sub>2</sub>O (12 eq), DMAP (0.7 eq), TEA, THF<sub>anh</sub>, rt, 20-25 h, **60%**; e. pTsOH<sub>cat</sub>, MeOH, rt, 6 h, **98%**; f. TEMPO (0.07 eq), NaClO<sub>2</sub> (2 eq), NaClO, ACN y tampón fosfato, 35°C, 70 h, **88%**; g. **8** (1.1 eq), EDC (1.5 eq), HOBT (0.5 eq), DIEA (2eq), DCM, rt, *overnight*, **55%**; h. H<sub>2(g)</sub>, Pd/C, MeOH, rt, 45 min, **100%**.

La síntesis se inició con la protección como acetal del grupo hidroxilo del 3-bromopropanol empleando dihidropirano (DHP). Respecto a la experimental descrita en la patente, donde la reacción duraba dos horas, se observó que el rendimiento mejoraba si el tiempo se alargaba a 4 h. Se obtuvo el producto **31** suficientemente puro como para continuar con la síntesis sin

ulterior purificación. En la siguiente etapa se realizó una sustitución nucleófila con malononitrilo sobre el átomo de bromo de **31** que permitió obtener **32** después de una purificación mediante columna cromatográfica con unos rendimientos entre el 40 y 66%. La formación del heterociclo 2,4,6-triaminopirimidina se logró vía la condensación de **32** con hidrocloreuro de guanidinio en condiciones estrictamente anhidras. En la purificación por columna de **33** se añadió un 2% de TEA a los eluyentes empleados para mejorar su elución y evitar así la protonación de J<sub>T</sub> en contacto con el gel de sílice. Para la protección de las aminas exocíclicas con los grupos protectores Boc se emplearon inicialmente las condiciones descritas por Fenniri aunque, posteriormente, se optimizaron para mejorar el rendimiento. Para ello, se aumentó la relación molar entre el Boc<sub>2</sub>O y **33** de 7 a 12. Además, doblando el tiempo de reacción se consiguió aumentar la cantidad de **34** formada y, a la vez, tener menos subproductos, facilitando así la purificación. Una vez obtenido el producto **34**, el siguiente paso fue la desprotección del alcohol que, aunque se tuvo que alargar el tiempo de reacción una hora más de lo descrito, se realizó con un rendimiento casi cuantitativo. Es interesante destacar que por RMN-<sup>1</sup>H en CDCl<sub>3</sub> se observó que, a diferencia del compuesto **6**, el producto **35** presentaba la simetría esperada. En el espectro se evidenciaban dos señales para los metilos de los grupos <sup>t</sup>Bu de los protectores Boc, una de los que se encontraban en las posiciones 4 y 6 del heterociclo, y la otra de los protectores Boc en la posición 2 de la pirimidina. Además, en estas condiciones, no se detectó la señal del H del grupo hidroxilo. Así pues, todo parecía indicar que el alcohol no estaba formando ningún enlace de hidrógeno intramolecular con lo que, posiblemente, la oxidación no debía ser problemática.

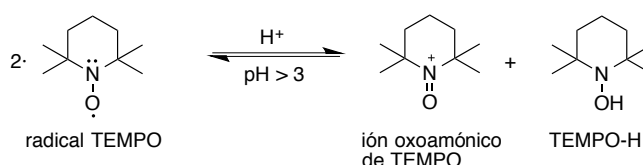
Llegados a este punto, se plantearon diferentes opciones para oxidar el alcohol **35** a ácido carboxílico. Entre todas ellas, la posibilidad de utilizar el radical TEMPO<sup>[97]</sup> con NaClO<sub>2</sub>, ya empleado en los intentos de oxidación del compuesto **6**, pareció una de las mejores opciones, puesto que se trabajaba en condiciones tamponadas, a una temperatura próxima a la ambiente y se describían buenos rendimientos en tiempos cortos y con una gran variedad de compuestos.<sup>[98,99]</sup> Existe un gran abanico de posibilidades experimentales para emplear TEMPO como oxidante en síntesis orgánica, en buena parte por la necesidad de combatir los problemas de solubilidad de TEMPO en relación a los productos orgánicos que se quiere oxidar. Por este motivo, se encuentran descritas en la bibliografía reacciones en condiciones de transferencia de fase<sup>[100,101]</sup> o TEMPO unido a un soporte sólido<sup>[102]</sup>. No obstante, se procedió con la experimental descrita por Tschäen y *cols.* en la que se emplea una cantidad catalítica de TEMPO (0.07 eq), NaClO<sub>2</sub> y lejía comercial (NaClO). La reacción se llevó a cabo en una mezcla de ACN y tampón fosfato (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) a una temperatura de 35°C.<sup>[88,89]</sup>

La reacción se realizó a pH 6.8 exitosamente y se obtuvo, sin necesidad de purificación, el ácido **36** con un rendimiento casi cuantitativo. Vale la pena destacar, sin embargo, que el tiempo de reacción fue mucho más largo que los descritos en la literatura. Para conseguir una completa conversión se tuvo que dejar evolucionar la reacción durante seis días. Este hecho ponía en evidencia que efectivamente, los grupos protectores Boc provocaban un impedimento estérico importante en la cadena lateral del heterociclo que dificultaba la interacción del grupo hidroxilo con los agentes oxidantes (Figura 1.23). Con el compuesto **6** no fue posible la oxidación mientras que, aumentando la distancia entre el alcohol y el heterociclo protegido, se pudo lograr la oxidación aunque la reacción fuera relativamente lenta.



**Fig. 1.23.** Representaciones con un modelo espacial (CPK) de los compuestos **6** (izquierda) y **35** (derecha) en los que se puede apreciar el importante impedimento estérico causado por los grupos Boc sobre el grupo  $-\text{CH}_2\text{OH}$  de la cadena lateral de  $J_T$ . En el caso de **35**, el metileno adicional en su cadena lateral hace más accesible el grupo  $-\text{CH}_2\text{OH}$  para interactuar con los agentes oxidantes.

Teniendo en cuenta que la forma activa de TEMPO es el ión oxoamónico, se planteó que una manera de acelerar la reacción sería intentar favorecer su formación. Teniendo en cuenta el equilibrio pH-dependiente entre las diferentes especies de TEMPO (Figura 1.24), reduciendo el pH se podía favorecer la desproporción del radical al ión oxoamónico y TEMPO-H.<sup>[98]</sup> Así pues, se llevó a cabo la reacción en el mismo tampón fosfato pero a un pH de 5.8 aproximadamente y se observó la completa conversión del alcohol **35** después de 70 h (casi 3 días). Aunque el tiempo de reacción continuaba siendo alto, se logró reducirlo a la mitad respecto al primer experimento. El escalado de la reacción, sin embargo, hizo disminuir los rendimientos obtenidos debido a que se producía la desprotección de algunas de las aminas exocíclicas y, por este motivo, no se trabajó a escala mayor de 500 mg en esta reacción.



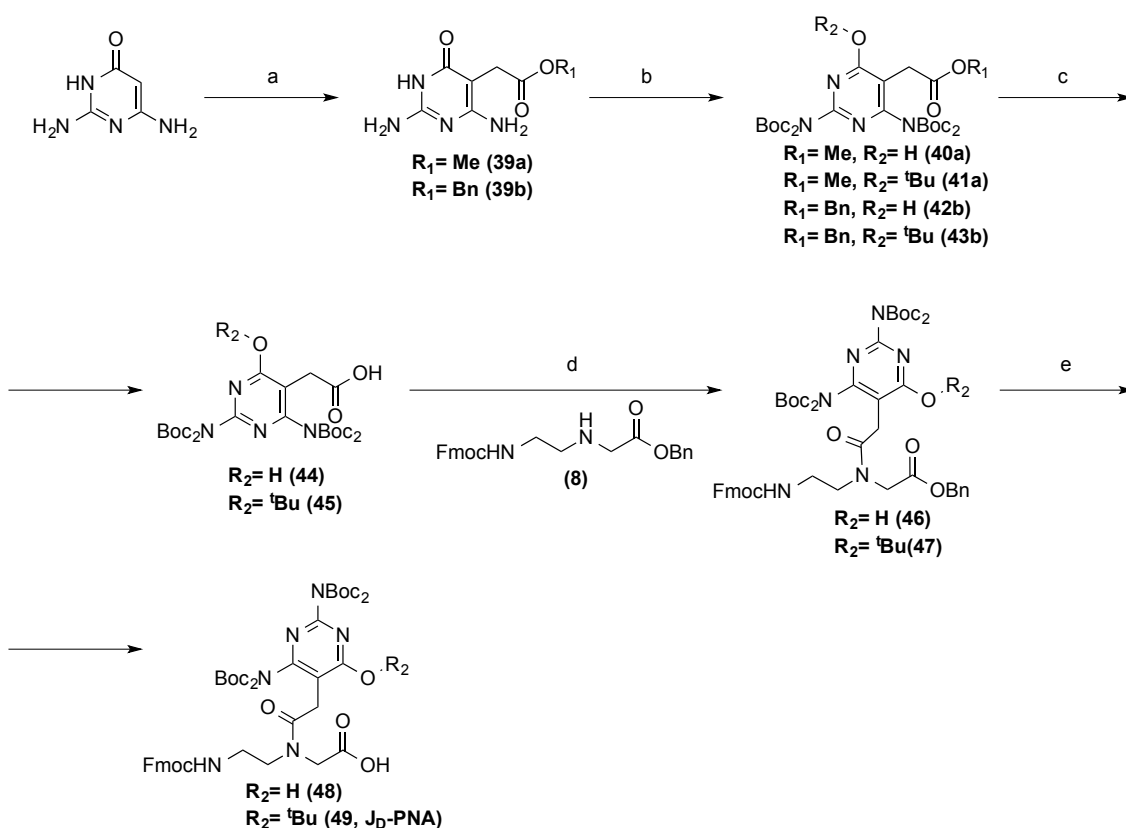
**Fig. 1.24.** Desproporción pH-dependiente de TEMPO.

Una vez obtenido el ácido carboxílico **36**, se procedió a su acoplamiento con el esqueleto de *N*-(2-aminoetil)glicina **8**. La reacción se llevó a cabo en las mismas condiciones que con el ácido **27** (Figura 1.20). El rendimiento, no obstante, se vió disminuido del 68% al 55%, muy posiblemente debido, nuevamente, al impedimento estérico causado por los grupos protectores Boc. El monómero de PNA se conservó en su forma protegida **37** hasta su uso, momento en el que se procedió con la hidrogenólisis cuantitativa del ester bencílico empleando  $\text{Pd}_{(s)}$  sobre carbono.

Finalmente, en un total de 8 etapas sintéticas, se obtuvo el monómero  $J_T$ -PNA modificado con un metileno adicional en la cadena que separa la base del esqueleto de PNA con un rendimiento global del 10%.

## 2.2. El monómero de PNA con J<sub>D</sub>

El siguiente monómero a sintetizar fue el del heterociclo 2,6-diamino-4(3*H*)-pirimidona. Como ya se ha comentado, fue en 2004 cuando McLaughlin y *cols.* describieron la síntesis de un *homo*PNA con este heterociclo como base Janus con el objetivo de formar una estructura de tipo tríplex por interacción simultánea con N<sub>11</sub>dC<sub>8</sub>N<sub>11</sub> y N<sub>11</sub>dT<sub>8</sub>N<sub>11</sub>.<sup>[9]</sup> El monómero que sintetizaron, sin embargo, presenta una estrategia de protección distinta a la que se ha escogido en esta tesis doctoral. Por este motivo, aunque basándonos en su experiencia, se diseñó una nueva ruta sintética con la misma estrategia de protección utilizada para el monómero con J<sub>T</sub>: empleando el esqueleto de *N*-(2-aminoetil)glicina **8** ya sintetizado y el grupo protector Boc en la base Janus (Figura 1.25).



**Fig. 1.25.** Ruta sintética para la obtención del monómero de PNA con la base Janus J<sub>D</sub> (J<sub>D</sub>-PNA). Los reactivos empleados y los rendimientos obtenidos son los siguientes: a. Para la obtención de **39a**, 2-Bromoacetato de metilo (1.3 eq), NaHCO<sub>3</sub> (1.3 eq), DMF, rt, 5 días, **81%**; para la obtención de **39b**, 2-Bromoacetato de bencilo (1.5 eq), NaHCO<sub>3</sub> (1.3 eq), DMF, rt, 4 días, **78%**; b. Para la obtención de **41a**: Boc<sub>2</sub>O (10 eq), DMAP (0.3 eq), piridina, DMF<sub>anh</sub>, 24h, rt, **44%**; para la obtención de **43b**: Boc<sub>2</sub>O (8 eq), DMAP (0.3 eq), piridina, DMF<sub>anh</sub>, 15 h, rt, **54%**; c. Para la obtención de **45**: H<sub>2(g)</sub>, Pd/C, MeOH; 8h, **100%**; d. Para la obtención de **47**, **8**(1.1 eq), EDC (1.5 eq), HOBt (0.5 eq), DIEA (2 eq), DCM, rt, 24 h, **45%**; e. Para la obtención de **49**, H<sub>2(g)</sub>, Pd/C, MeOH, rt, 40 min, **90%**.

*Vía ester metílico (R<sub>1</sub> = Me).* La primera reacción de la ruta fue la derivatización de la 2,6-diamino-4(3*H*)-pirimidona en la posición 5 como acetato de metilo. Se barajó la posibilidad de que el producto **39a** ciclase debido al ataque nucleófilo de la amina de la posición 6 al ester metílico, pero en ningún momento se detectó el producto de la ciclación. Para mejorar el rendimiento se alargó el tiempo de reacción de 3 a 5 días. Inicialmente, la purificación se llevó

a cabo mediante MPLC en condiciones acuosas pero la recuperación del producto fue muy limitada debido a su baja solubilidad. Así pues, se optó por hacerlo precipitar en medio acuoso, lo que permitió obtener el producto **39a** puro, después de su filtración, con un rendimiento del 81%. El siguiente paso sintético fue la protección de las aminas exocíclicas con el grupo protector Boc. Analizando las dificultades encontradas en la *mono*-protección de las aminas de la 2,4,6-triaminopirimidina, se optó por la *bis*-protección para obtener el producto **40a**. En un primer ensayo se empleó un exceso de  $\text{Boc}_2\text{O}$  (5.5 eq), TEA como base, DMAP (0.5 eq) como activante y ACN como disolvente, todo en condiciones anhidras. Después de 3 días a temperatura ambiente, la conversión era completa, por lo que se decidió proceder con el *work-up* y purificación. El producto que se aisló mayoritariamente después de la columna cromatográfica de gel de sílice era un compuesto con una masa superior a la esperada (+56) y que presentaba un espectro de  $\text{RMN}^{-1}\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  muy similar al previsible para **40a**. Analizando los datos, se llegó a la conclusión que el producto obtenido era **41a**, producto en el que se había formado el éter *tert*-butílico en la posición 4 del heterociclo. Este fenómeno ya había sido descrito en 2009 por Wang y Gold cuando quisieron proteger con grupos Boc compuestos derivados de las 2-amino-3H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4(7H)-onas para obtener derivados de 7-desazaguaninas.<sup>[103]</sup> Los autores intentaron estudiar la formación del  $\text{O}^4\text{-}^t\text{Bu}$  éter mediante el seguimiento de las reacciones de protección por CCF y LC/MS tanto de sus 7-desazaguaninas como de la misma guanina. Según se explica en su publicación, debido a la presencia del activante DMAP y de un exceso de  $\text{Boc}_2\text{O}$ , se genera un intermedio en el que se ha introducido un grupo Boc en el N3 heterocíclico. Vía una transformación intramolecular debido a la nucleofilia del átomo de oxígeno, se produce la formación del  $\text{O}^4\text{-}^t\text{Bu}$  éter con la consiguiente pérdida de  $\text{CO}_2(\text{g})$ . Esta hipótesis puede ser aplicada por analogía a la protección de los compuestos **39** (Figura 1.26).

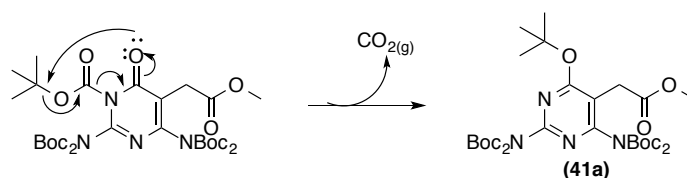


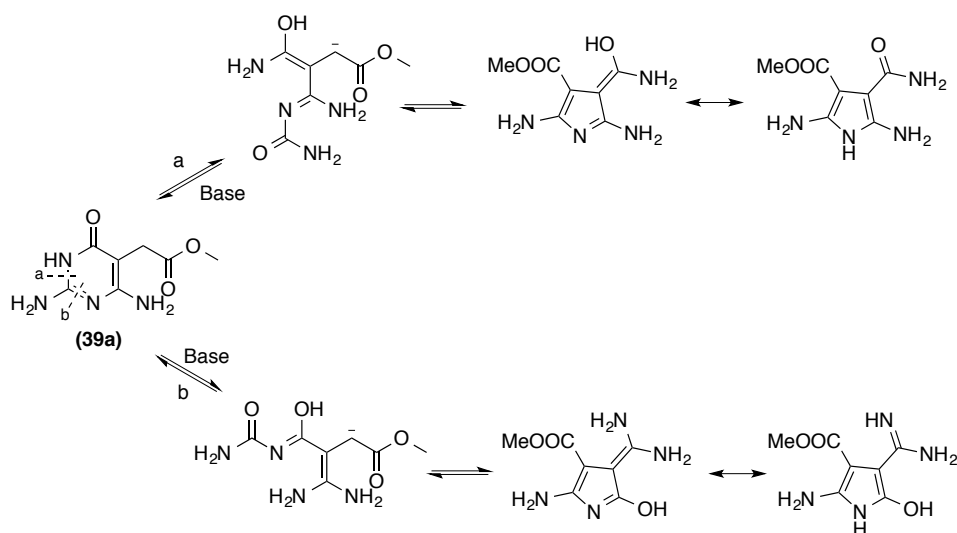
Fig. 1.26. Mecanismo propuesto para la formación del producto **41a**.

En principio, la formación del  $\text{O}^4\text{-}^t\text{Bu}$  éter no era un inconveniente para seguir adelante con la síntesis ya que se comprobó su estabilidad en TFA (condiciones de desprotección y desanclaje de los PNAs) y se observó que podía eliminarse cuantitativamente.

Se escaló la reacción para obtener más cantidad de producto y los resultados obtenidos en el primer ensayo no fueron del todo reproducibles. Además de obtenerse **41a**, se aisló también gran cantidad de un subproducto y se detectó la formación del producto sin el  $\text{O}^4\text{-}^t\text{Bu}$  éter **40a**. Debido al alto porcentaje del subproducto formado, se intentó caracterizarlo mediante  $\text{RMN}^{-1}\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , EM-ESI de alta resolución y HPLC.

En los espectros de RMN se podía observar la presencia de dos señales correspondientes a grupos Boc así como una de  $^t\text{Butilo}$ , la desaparición del metileno en  $\alpha$  al ester metílico y la presencia de un nuevo heterociclo. Las señales del ester metílico, sin embargo, se encontraban intactas. La masa del compuesto era doscientas unidades superior a la del producto **41a** y la fórmula molecular obtenida del EM-ESI de alta resolución correspondía al compuestos **41a** con

dos grupos Boc adicionales ( $C_{41}H_{66}N_4O_{15}$ ). Todo ello no parecía ser posible sobre la base del mismo sistema heterocíclico de 2,6-diamino-4(3*H*)-pirimidona. Con estas evidencias, la única explicación plausible que se encontró era que se produjera una apertura del heterociclo, tal como muestra la figura 1.27, seguida de una ciclación causada por el ataque del metileno en  $\alpha$  al ester metílico sobre el carbonilo para dar lugar a un nuevo heterociclo de tipo pirrólico. Los datos de RMN- $^1H$  y  $^{13}C$  concordaban con la formación del nuevo heterociclo aunque no se profundizó tanto como para poder determinar una estructura concreta. Lo que realmente importaba era aclarar porqué tenía lugar esta reacción secundaria y así, intentar evitarla.

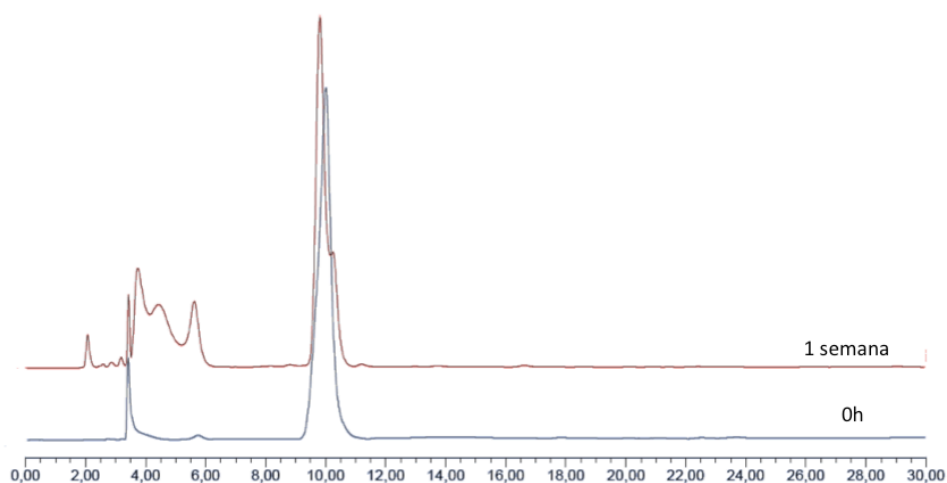


**Fig. 1.27.** Mecanismo propuesto para la formación del subproducto mayoritario obtenido en la protección de las aminas de **39a**.

Se pensó en la posible inestabilidad del heterociclo  $J_D$  en medio básico. Posiblemente la TEA y los tiempos largos de reacción favorecían la formación del subproducto no deseado. Para verificar si la hipótesis era cierta, se decidió estudiar la estabilidad del producto **39a** y el protegido **41a** en TEA y ACN en las mismas condiciones en las que se había llevado a cabo la reacción de protección. Los ensayos de estabilidad se controlaron por HPLC y CCF durante 7 días y se pudo comprobar que **39a** era inestable en la mezcla empleada de TEA y ACN (Figura 1.28) mientras que **41a** era completamente estable. Por otro lado, también se realizó un nuevo ensayo de protección donde se emplearon 18 eq de  $Boc_2O$  y 1 eq de DMAP. Con este exceso se pretendía valorar si el producto indeseado también se formaba cuando se disminuía el tiempo de reacción. En este ensayo, que se paró a las 3 h, se obtuvo una mezcla de los productos **40a** y **41a** con bajo rendimiento debido a una limitada conversión. Así pues, parecía ser que el producto **39a** presentaba una cierta inestabilidad en medio básico y que los largos tiempos de reacción requeridos para la protección de las aminas exocíclicas, favorecían la formación de subproductos indeseados. Así pues, era necesario optimizar las condiciones de reacción para obtener el producto protegido deseado con un rendimiento razonable y con tiempos cortos de reacción.

En la descripción experimental de McLaughlin, que trabajaba con un compuesto análogo a **39a** como ester  $t$ butílico, se introduce un grupo Z en la amina exocíclica de la posición 2 empleando DMAP en cantidad catalítica y piridina como base en una mezcla de DMF y DMSO. Viendo sus condiciones experimentales, se decidió optimizar la reacción de protección de **39a** con  $Boc_2O$  empleando DMF como disolvente, para asegurar la completa disolución de todos los reactivos,

y piridina como base, ya que su  $pK_a$  es inferior al de la TEA. Además, se añadió un gran exceso de anhídrido de Boc (10 eq) para intentar que la reacción se completara en el menor tiempo posible.



**Fig.1.28.** Análisis por HPLC de la estabilidad de **39a** en una solución de ACN con TEA. Cromatogramas a tiempo cero y después de una semana. Elución de 0 a 30% de B en A en 30 min. A= 0.01M TEAAc<sub>(ac)</sub> y B =ACN.

Después de algunos ensayos, se determinaron unas condiciones para obtener el compuesto **41a** como producto mayoritario de la reacción en 24 h aunque, el subproducto pirrólico, siempre se ha detectado. El rendimiento de la reacción, después de la purificación, era entre el 40 y el 50%.

La siguiente etapa sintética, la hidrólisis del ester metílico, se ensayó con diferentes reactivos y condiciones controlando su evolución por CCF y EM-ESI (Tabla 1.1).

Ensayo	Condiciones	Observaciones
a <sup>[95]</sup>	LiOH (1.6 eq), H <sub>2</sub> O/THF, rt, 63 h	Mezcla de <b>41a</b> y derivados sin grupos Boc y <b>45</b> y derivados sin grupos Boc.
b	LiOH (1 eq), H <sub>2</sub> O/THF, rt, 24 h	
c	LiOH (2 eq), H <sub>2</sub> O/THF, rt, 24 h	
d	NaOH (1.5 eq), MeOH/ H <sub>2</sub> O, rt, 24 h	
e	KOH (1.5 eq), MeOH/ H <sub>2</sub> O, rt, 24 h	
f <sup>[104–106]</sup>	TMSOK (1.2 eq), THF, 40°C, 40 h	Desprotección de las aminas. No se detecta la hidrólisis del ester metílico.
g <sup>[107]</sup>	CH <sub>3</sub> SNa (1 eq), AlCl <sub>3</sub> (3 eq), DMF, 100°C, 17 h	

**Tabla 1.1.** Intentos de saponificación del compuesto **41a**.

Como puede comprobarse en las entradas [a-e] de la Tabla 1.1., el uso de un hidróxido provocó tanto la hidrólisis del ester metílico como la desprotección de las aminas exocíclicas.



Como el tiempo de reacción debía ser alto para obtener una conversión completa, la estabilidad de los grupos Boc se veía comprometida. Se empleó también el trimetilsilanoato de potasio (TMSOK)<sup>[104-106]</sup>, pero después de 40 h solo se observaba la pérdida de los grupos protectores Boc mientras que el ester seguía intacto. Los mismos resultados se obtuvieron empleando CH<sub>3</sub>SNa con el ácido de Lewis AlCl<sub>3</sub>.<sup>[107]</sup> En vista de la dificultad de saponificar el ester de **41a**, se decidió rehacer la ruta sintética planteada (Fig.1.25) pero derivatizando la base J<sub>D</sub> como ester bencílico. Mediante esta estrategia se podría eliminar el grupo bencilo con una simple hidrogenación sin que se vieran afectados los protectores Boc de las aminas exocíclicas.

*Vía ester bencílico (R<sub>1</sub> = Bn).* Se procedió pues con la nueva síntesis empleando el 2-bromoacetato de bencilo y reproduciendo las mismas condiciones optimizadas para la obtención del compuesto **39a**. El rendimiento obtenido para el producto **39b** fue ligeramente inferior al de su análogo metílico. Seguidamente se protegieron las aminas exocíclicas y, en este caso, el rendimiento de obtención de **43b** fue del 54%, un poco superior al obtenido para **41a**. El siguiente paso, la hidrogenólisis del ester bencílico, se llevó a cabo en MeOH empleando Pd/C. La reacción, a pesar de ser bastante lenta, permitió obtener el ácido **45** cuantitativamente. Así pues, sin dificultades añadidas, se obtuvo el ácido que se hizo reaccionar con el esqueleto de *N*-(2-aminoetil)glicina **8** empleando EDC y HOBt para obtener el monómero protegido **47** con un rendimiento del 45%. El monómero de PNA de J<sub>D</sub> se conservó como ester bencílico hasta su introducción en la cadena de PNA, momento en el que se realizó una nueva hidrogenólisis con el fin de obtener el grupo C-terminal como ácido carboxílico.

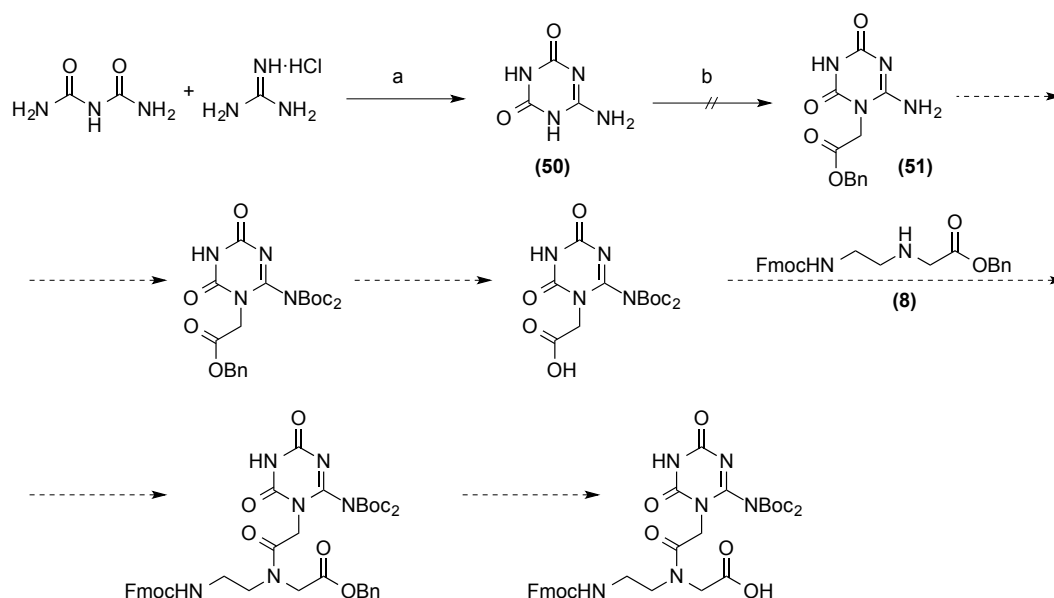
Vale la pena destacar, que en el primer intento de hidrogenación catalítica del ester bencílico de **47** se dejó evolucionar la reacción durante 2 h y se observó, analizando el crudo de reacción por HPLC, que se habían obtenido dos productos. En una proporción del 70% aproximadamente, se obtuvo el monómero de PNA deseado **49** mientras que, el porcentaje restante, surgía de la eliminación del protector Fmoc del grupo N-terminal de **49**. La estabilidad del grupo Fmoc frente a la hidrogenación fue descrita en 1978 cuando se llegó a la conclusión que, en ciertas condiciones, el grupo protector Fmoc puede ser eliminado vía hidrogenación catalítica sobre Pd. Las variables a tener en cuenta para que esta desprotección tenga lugar son la cantidad de catalizador de Pd y el tiempo de reacción.<sup>[108]</sup> Así pues, en un segundo intento se redujo la cantidad de Pd<sub>(s)</sub>/C a un tercio y se controló la reacción cada 15 min por CCF. A los 30 minutos de reacción la conversión era completa y solo se detectaba la formación de un producto, el monómero de PNA de J<sub>D</sub> **49**. Finalmente, se obtuvo J<sub>D</sub>-PNA en un total de 5 etapas sintéticas y un rendimiento global del 17%.

### 2.3. El monómero de PNA con J<sub>w</sub>

En la literatura se puede encontrar una síntesis descrita para la obtención del monómero de PNA con la base J<sub>w</sub> en la que se emplea una estrategia de protección distinta de la llevada a cabo en esta tesis doctoral. La base presenta un grupo protector mesitilensulfonilo, el extremo N-terminal un grupo protector Fmoc y el ácido del C-terminal se encuentra como ester *tert*-butílico.<sup>[21]</sup> No obstante, con el objetivo de obtener el monómero deseado de J<sub>w</sub> con los mismos grupos protectores que los monómeros de J<sub>T</sub> y J<sub>D</sub>, se diseñó una nueva ruta sintética.

### 2.3.1. Primera ruta sintética

La ruta sintética que se diseñó para la obtención del monómero de PNA con la triazina  $J_W$  se muestra en la Figura 1.29. Como puede comprobarse, se sigue la misma estrategia de protección (Fmoc/Boc) que con los otros monómeros ya obtenidos.



**Fig. 1.29.** Ruta sintética diseñada para la obtención del monómero de PNA con la base  $J_W$  con la estrategia Boc/Fmoc. Los reactivos empleados y los rendimientos obtenidos son los siguientes: a.  $K_2CO_3$  (0.15 eq), DMF, reflujo, 8 h, 40%. Los procedimientos siguientes no han sido optimizados y/o ensayados.

La ruta se inició con la síntesis de la propia triazina (amelida) reproduciendo las condiciones descritas en una patente de Diebner.<sup>[109]</sup> Se pueden encontrar otras alternativas para la obtención de amelida en la literatura, como por ejemplo, mediante la oxidación con ácido sulfúrico de la 2,4,6-triamino-1,3,5-triazina<sup>[110]</sup> o a partir de urea<sup>[111]</sup>, entre otros.<sup>[112,113]</sup> En la patente mencionada no se describe un procedimiento experimental estándar sino que se presentan diferentes variables a optimizar según las necesidades y el producto que se desee sintetizar.

Teniendo en cuenta la información de la patente, se realizaron dos ensayos en los que se hizo reaccionar biuret con hidrocloreuro de guanidinio. En un primer intento se empleó una mezcla equimolar de ambos reactivos,  $K_2CO_3$  como catalizador básico (0.15 eq) y etilenglicol como disolvente, ya que presenta un elevado punto de ebullición (198°C) y permitía alcanzar altas temperaturas. Después de 12 h a reflujo, la mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente y, a pesar de estar descrita la precipitación de la triazina, no precipitó. Se analizó el crudo por EM-ESI y, en el espectro de masas, no se detectó la formación del producto **50**. El segundo intento se realizó en las mismas condiciones pero se empleó DMF ( $T_e = 154^\circ C$ ) como disolvente. La reacción se dejó evolucionar durante 8 h, momento en el que se observaba gran cantidad de precipitado, y se filtró. Debido a la baja solubilidad de la triazina **51** se tuvo que realizar su caracterización por EM-ESI en condiciones ácidas (ácido fórmico), por EM-Cl y por RMN- $^{13}C$  en DMSO- $d_6$  con una gota de  $HCl_{cc}$ . Mediante estas técnicas se confirmó la obtención de **50**.

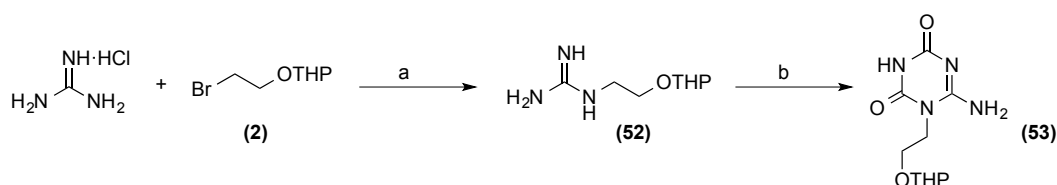
Obtenido pues el heterociclo, se procedió a intentar su derivatización con bromoacetato de bencilo. Inicialmente, el problema que se esperaba tener era la obtención de los dos isómeros posibles, el compuesto **51** y el producto sustituido en el N3. No obstante, primero debían encontrarse unas condiciones en las que realizar esta sustitución. En la bibliografía no se encontró nada descrito sobre la derivatización de amelida, por ese motivo se intentó introducir el acetato de bencilo en el heterociclo por analogía con derivatizaciones llevadas a cabo sobre el ácido isocianúrico (Tabla 1.2).<sup>[114–116]</sup>

Ensayo	Condiciones	Observaciones
a	2-bromoacetato de bencilo (1.5 eq), NaHCO <sub>3</sub> (1.7 eq) DMF, rt, 1 mes.	La reacción no evoluciona. El heterociclo <b>50</b> no se consigue solubilizar del todo.
b	2-bromoacetato de bencilo (1.5 eq), NaHCO <sub>3</sub> (1.7 eq) DMF, MW 60°C, 6 h.	Apertura y degradación de amelida <b>50</b> .
c	2-bromoacetato de bencilo (1.5 eq), NaHCO <sub>3</sub> (1.7 eq) H <sub>2</sub> O/THF, MW 60°C, 40 min	Se detecta amelida. No se observa la formación de <b>51</b> . El heterociclo <b>50</b> no se consigue solubilizar del todo.
d	2-bromoacetato de bencilo (1.5 eq), solución acuosa K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 0.5M, DMF, rt, 3 días	Apertura y degradación de amelida <b>50</b> .
e	NaH (1.1 eq), 2-Bromoacetato de bencilo (1.1 eq), DMF <sub>anh</sub> , rt, 3 h.	Crudo de reacción analizado por HPLC, cromatograma muy complejo, no se detecta ni <b>50</b> ni <b>51</b> .
f	1- LiOH (1.1eq) en H <sub>2</sub> O, 100°C, 3 h 2- 2-bromoacetato de bencilo (1.1 eq) en DMF.	Se aísla el producto deseado <b>51</b> . Analizado por HPLC representa solo un 3.5% del crudo.

**Tabla 1.2.** Intentos de derivatización del heterocilo amelida **50**.

A pesar de que se intentaron diferentes procedimientos experimentales y condiciones de reacción, en ninguno de los ensayos realizados se consiguió derivatizar el heterociclo amelida **50**. La mayor problemática, que no se logró solventar, es la limitada solubilidad de amelida tanto en disolventes orgánicos como acuosos, o en soluciones básicas, lo que limita mucho su reactividad. En el ensayo [f] se consiguió aislar una pequeña cantidad de producto, que representaba el 3.5% del crudo de reacción, que tenía la masa esperada de **51**. Debido a la baja cantidad obtenida, pudo analizarse por EM-ESI pero no se pudo determinar su estructura mediante técnicas espectroscópicas.

Según la patente de Diebner, el heterociclo amelida también puede formarse empleando derivados de guanidinio, como por ejemplo difenilguanidina, butilguanidina y hexilguanidina, entre otras.<sup>[109]</sup> Por este motivo, se planteó la posibilidad de derivatizar la guanidina haciéndola reaccionar con el compuesto **2** previamente sintetizado y, posteriormente, condensar **52** con biuret para formar la triazina **53** (Figura 1.30). Vale la pena destacar que Diebner en ningún caso se refiere a guanidinas derivatizadas con grupos funcionales o heteroátomos, simplemente considera derivados alquílicos.



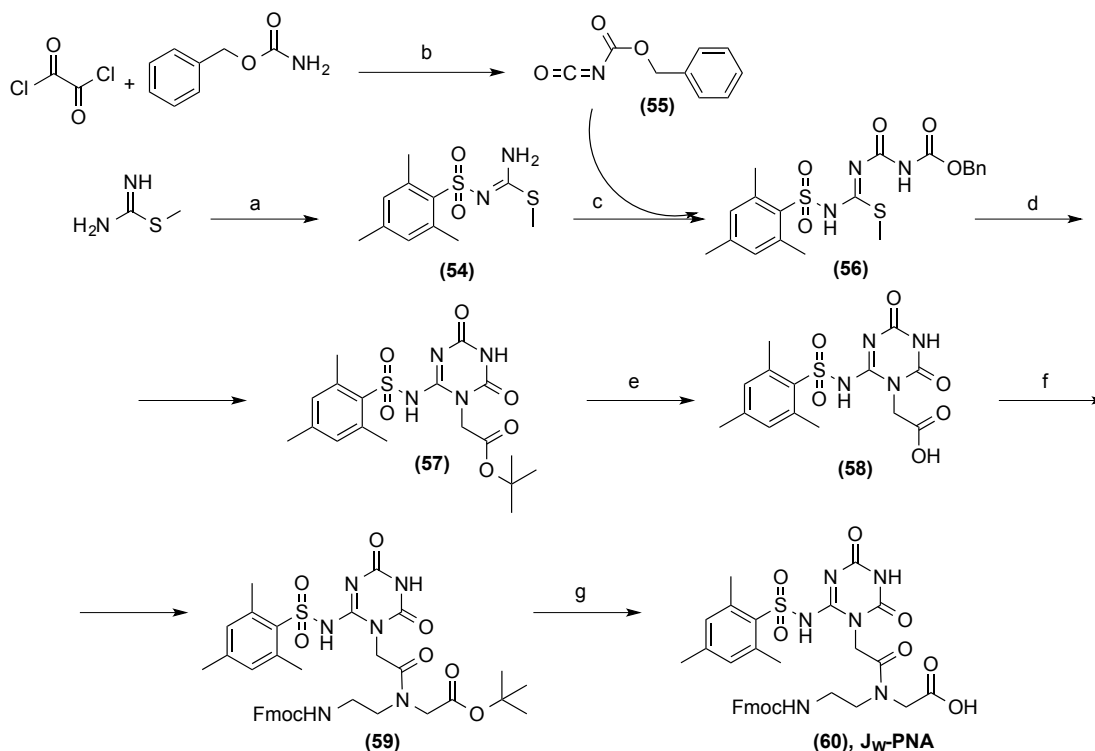
**Fig. 1.30.** Ruta sintética alternativa para la síntesis de amelida derivatizada. Los reactivos empleados y los rendimientos obtenidos son los siguientes: a. <sup>t</sup>BuOK (2 eq), DIEA (2 eq), DMF, 50°C, *overnight*, **100%**.

La primera reacción se llevó a cabo sin dificultades siguiendo un procedimiento experimental descrito por Bugaut.<sup>[117]</sup> El compuesto **52** se obtuvo con un rendimiento cuantitativo y se hizo reaccionar con biuret empleando las mismas condiciones que para la obtención de **50**. En un primer intento, se recuperaron ambos reactivos de partida, biuret y **52**. Posteriormente, dejando evolucionar la reacción durante 17 h se observó la degradación de ambos y, aumentando al doble los equivalentes de biuret, a las 8h de reacción aún no se apreciaba ninguna evolución. Así pues, no se consiguió condensar ambos compuestos para obtener **53**. Se decidió entonces reproducir la síntesis descrita por McLaughlin aunque los grupos protectores fueran distintos a los empleados en la estrategia de protección de este trabajo.

### 2.3.2. Segunda ruta sintética

Como previamente se ha comentado, en 2008 McLaughlin describió la síntesis del monómero de PNA con la base amelida protegida con el grupo mesitilensulfonilo. La síntesis que desarrollaron tiene un total de siete etapas sintéticas y un rendimiento global del 20% (Figura 1.31).<sup>[21]</sup>

La ruta sintética se iniciaba con la protección de la S-metilisotiourea empleando el cloruro de 2-mesitilensulfonilo en presencia de hidróxido de sodio para neutralizar el cloruro de hidrógeno generado en la reacción. Aunque se alargó el tiempo de reacción respecto al descrito por McLaughlin, el rendimiento asociado a la obtención de **54** fue inferior al esperado. La obtención del isocianato **55** a partir de carbamato de bencilo y cloruro de oxalilo se llevó a cabo en condiciones estrictamente anhidras y bajo atmósfera de Ar<sub>(g)</sub>, ya que se trata de un compuesto muy reactivo y fácilmente hidrolizable.<sup>[118,119]</sup> Finalmente, después de una destilación a presión reducida<sup>[119]</sup> se obtuvo **55** con un rendimiento semejante al descrito y se caracterizó por RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C bajo atmósfera de Ar<sub>(g)</sub>. Vale la pena destacar que el isocianato debe conservarse bajo atmósfera inerte y a temperaturas muy bajas (-30°C) para asegurar su conservación.



**Fig. 1.31.** Ruta sintética para la obtención del monómero de PNA J<sub>w</sub>-PNA diseñada por McLaughlin. Los reactivos que se han empleado y los rendimientos obtenidos son los siguientes: a. Cloruro de 2-mesitilensulfonilo (1.1 eq), NaOH<sub>(ac)</sub>, DCM, rt, 2 h, **40%**; b. DCM<sub>anh</sub>, 1 h a 0°C, 4h a rt, *overnight* a reflujo, **50%**; c. THF<sub>anh</sub>, rt, 24 h, **90%**; d. Hidrocloruro de glicinato de *tert*-butílico (1.1 eq), THF<sub>anh</sub>, TEA, 45°C, 24 h, **98%**; e. TFA, DCM, rt, 6 h, **93%**; f. Fmoc-AEG-O<sup>t</sup>Bu (1 eq), EDC (1.2 eq), DIEA (2.1 eq), DMF, rt, *overnight*, **84%**; g. TFA, DCM, rt, 3 h, **82%**.

Una vez obtenidos los productos **54** y **55** se hicieron reaccionar en condiciones anhidras para obtener **56**, el cual precipitó en el medio de la reacción y se aisló puro mediante simple filtración. En la siguiente etapa se formó el anillo triazínico haciendo reaccionar **56** con el hidrocloruro del ester *tert*-butílico de la glicina en condiciones anhidras. La amina primaria del aminoácido produce un ataque nucleófilo sobre el fragmento de tiourea con la consecuente eliminación de metanotiol y, posteriormente, sobre el carbamato eliminando alcohol bencílico (Figura 1.32).<sup>[120,121]</sup> Aunque el crudo de la reacción era muy limpio, se realizó una rápida purificación por columna cromatográfica de gel de sílice obteniendo **57** con un excelente rendimiento (98%). Seguidamente, se realizó la acidólisis del ester *tert*-butílico con TFA en DCM para obtener el ácido **58**, que se hizo reaccionar con el derivado comercial de *N*-(2-aminoetil)glicina protegido con el grupo Fmoc en el extremo N-terminal y como ester *tert*-butílico en el C-terminal. Para la formación del enlace amida entre ambos fragmentos se empleó EDC como agente activante, DIEA como base y, debido a la baja solubilidad de **58**, el disolvente escogido fue DMF. El rendimiento asociado a la formación del monómero de PNA protegido fue del 84%, un rendimiento comparativamente bueno. El monómero se conservó en su forma protegida como ester *tert*-butílico hasta su introducción en la cadena de PNA, momento en el que desprotegió el ester *tert*-butílico con TFA.

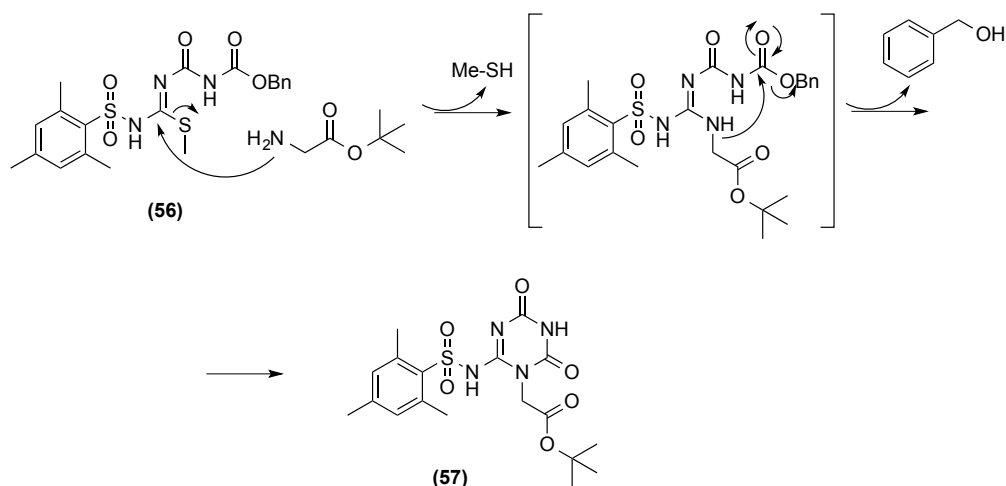


Fig. 1.32. Mecanismo de formación del heterociclo  $J_W$  derivatizado.

En este punto, es interesante destacar que el grupo protector mesitilensulfonilo, utilizado como protector de la base  $J_W$ , no es lábil en las condiciones ácidas que genera el TFA. Para eliminarlo es necesario emplear un ácido aún más fuerte como el trifluorometansulfónico (TFMSA). Este dato se deberá tener en cuenta para la desprotección y desanclaje de los PNAs que lo contengan.

Finalmente, reproduciendo la síntesis previamente descrita por McLaughlin, se obtuvo el monómero de PNA con la base de Janus  $J_W$  en un total de siete etapas sintéticas con un rendimiento global del 12%.

### 3. Caracterización de las Bases Janus $J_T$ , $J_D$ y $J_W$

Es conveniente determinar algunos parámetros característicos de las bases Janus escogidas tanto para la síntesis de los PNAs, como para los posteriores ensayos biofísicos. Por un lado, hay que conocer sus propiedades ácido-base, puesto que la interacción planteada con los pares no canónicos correspondientes se da en la forma neutra de las bases Janus. Por otro lado, para poder llevar a cabo unas cuantificaciones precisas de los PNAs mediante absorción UV-Vis, es necesario conocer sus coeficientes de extinción molar. Así pues, en este apartado se estudiará el comportamiento ácido-base de las bases de Janus  $J_T$ ,  $J_D$  y  $J_W$  y se determinarán sus coeficientes de extinción molar.

#### 3.1. Comportamiento ácido-base de las bases Janus $J_T$ , $J_D$ y $J_W$

Las propiedades ácido base de la 2,4,6-triaminopirimidina, así como de otras pirimidinas, fueron extensamente estudiadas por UV-Vis en los años 70 por Roth.<sup>[122,123]</sup> En el caso de  $J_T$ , determinó que su  $pK_{a,1}$  asociado a la protonación de uno de los N pirimidínicos, estaba cerca de la neutralidad ( $pK_{a,1}$  de  $6.72 \pm 0.01$ ) a  $20^\circ\text{C}$ . Y, a la segunda protonación de  $J_T$ , que tiene lugar en el otro nitrógeno heterocíclico, se le asignó un  $pK_{a,2}$  de  $1.31 \pm 0.01$  a  $20^\circ\text{C}$  (Figura 1.33). En otras fuentes bibliográficas se pueden encontrar valores relativamente distintos para la misma base.<sup>[124]</sup> Así, mediante técnicas potenciométricas se llegó a un valor de  $pK_{a,1}$  de 6.81 a  $20^\circ\text{C}$ ,<sup>[125]</sup> mientras que en otro estudio se determinó un  $pK_{a,1}$  de 7.18 y un  $pK_{a,2}$  de 1.07. Incluso, recientemente, se están realizando algunos estudios con derivados de  $J_T$  sustituidos en los grupos amino ya que ciertas evidencias indican que el C5 podría ser básico e incluso podría protonarse antes que el N pirimidínico.<sup>[126,127]</sup> Como puede comprobarse, todos los valores de

$pK_{a,1}$  se encuentran alrededor de la neutralidad, pero hay ligeras discrepancias entre ellos. Por otro lado, el hecho de tener el heterociclo derivatizado en la posición 5 podría afectar a su basicidad y, dado el efecto que puede llegar a tener en la interacción con la diana, se consideró necesaria la determinación del  $pK_{a,1}$  de la base  $J_T$  con una molécula modelo derivatizada en dicha posición.

Roth también estudió el comportamiento ácido-base de  $J_D$  mediante espectrometría UV-Vis a 20°C. Determinó un  $pK_{a,1}$  de 3.33 asociado a la protonación del N1 pirimidínico y un  $pK_{a,2}$  de 10.78 asociado a la protonación del N3 (Figura 1.33).<sup>[122]</sup> Anteriormente a Roth, Brown determinó empleando la misma técnica unos  $pK_a$ s muy semejantes<sup>[11]</sup> y, posteriormente, se pueden encontrar algunas referencias en la literatura con valores muy parecidos.<sup>[124,128]</sup> En vista que los  $pK_a$  de la base  $J_D$  se encuentran muy alejados de los pHs fisiológicos, no se consideró necesario determinar experimentalmente sus  $pK_a$ . Así pues, a pH neutro  $J_D$  estará en su forma neutra y debería establecer las interacciones planteadas con el *mismatch* C-U.

Se encuentra menos información del comportamiento ácido-base de amelida ( $J_W$ ). No obstante, se han realizado algunas determinaciones experimentales obteniendo unos valores de  $pK_{a,1}$ , relacionado con la protonación de N5 heterocíclico, de 1.8; un  $pK_{a,2}$  asociado al N3 de 6.9; y un  $pK_{a,3}$ , relacionado con el N1 de la triazina, de 13.5 (Figura 1.33).<sup>[129-132]</sup> Teniendo en cuenta estos valores, se decidió no determinar el  $pK_a$  de la triazina  $J_W$  puesto que tampoco era uno de los objetivos principales de esta tesis doctoral.

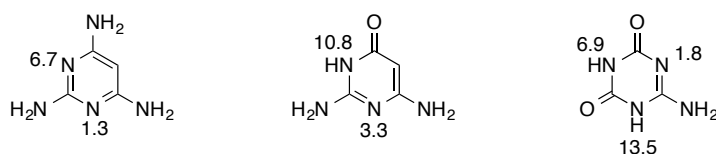


Fig. 1.33. Valores de  $pK_a$  descritos en la literatura de las bases Janus  $J_T$ ,  $J_D$  y  $J_W$ .

### 3.1.1. Determinación del $pK_a$ de la base $J_T$

Se procedió a la determinación experimental del  $pK_a$  de un derivado de  $J_T$  sustituido en la posición 5, y como modelo se eligió el compuesto **12** (Figura 1.34).

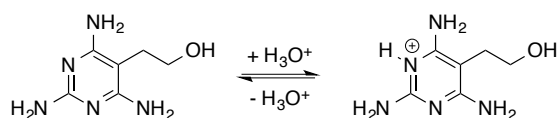


Fig. 1.34. Equilibrio ácido-base del compuesto **12** empleado para determinar el  $pK_a$  de la Janus  $J_T$ .

Existen diferentes técnicas para determinar el  $pK_a$  de un compuesto<sup>[133]</sup>, como por ejemplo mediante medidas de conductividad, potenciometría, voltamperometría, aunque también puede determinarse por RMN<sup>[134]</sup> y, una de las técnicas más comunes, analizando la variación de absorbancia UV-Vis del compuesto a diferentes pHs.<sup>[135,136]</sup> Entre todas ellas, se eligió determinar el  $pK_a$  de **12** empleando la espectrofotometría UV-Vis y siguiendo el procedimiento experimental descrito en un manual de laboratorio de 1962.<sup>[137]</sup>

Para realizar este tipo de experimentos se deben analizar soluciones tamponadas con una concentración constante del compuesto a diferentes pHs. Teniendo en cuenta que los valores

de  $pK_{a,1}$  descritos de  $J_T$  se aproximan a la neutralidad, se decidió usar como tampón una solución de  $KH_2PO_4$  de concentración 10 mM. Con el fin de obtener una intensidad de absorción del producto adecuada, se trabajó con soluciones 100  $\mu$ M de **12**.

Si se tiene en cuenta la definición de la constante de equilibrio de un ácido ( $K_a$ ) y se aplica  $-\log$  a ambos lados de la ecuación se obtiene que,

$$A-H \rightleftharpoons A^- + H^+$$

$$pK_a = pH - \log \frac{[A^-]}{[AH]} \quad (1.1)$$

si se sustituye en la ecuación (1.1) la relación que existe entre las concentraciones de ambas especies en solución se llega a la ecuación (1.2), donde  $x$  es la fracción molar de la especie AH en la solución.

$$pK_a = pH + \log \frac{x}{1-x} \quad (1.2)$$

Por otro lado, la absorción ( $A$ ) de una solución a un pH determinado depende de la fracción que existe de cada una de las especies,

$$A = A_{AH} \cdot x + A_{A^-} \cdot (1-x) \quad (1.3)$$

Sustituyendo la ecuación (1.3) en la (1.2) y teniendo en cuenta que la molécula de estudio es una base, se obtiene la ecuación (1.4) que relaciona el  $pK_a$  de un compuesto básico con su absorbancia a una longitud de onda concreta ( $\lambda_{analítica}$ ), en una solución de pH definido y a una determinada temperatura.

$$pK_a = pH + \log \frac{A - A_M}{A_I - A} \quad (1.4)$$

donde  $A_M$  es la absorbancia que el compuesto analizado presenta cuando se encuentra completamente en su forma no iónica y  $A_I$  es la absorbancia que el compuesto analizado presenta cuando se encuentra exclusivamente en su forma iónica.

Teniendo en cuenta la ecuación (1.4), lo primero que hay que hacer es determinar  $A_M$  y  $A_I$ . Para definir sus valores, se registraron los espectros de absorción de una solución 100  $\mu$ M de **12** en  $NH_{3(ac)}$  (0.1 M) y otra en  $HCOOH_{(ac)}$  (0.1 M), respectivamente. Con estas medidas también se determinó que la longitud de onda en la que se observaba mayor cambio de  $A$  debido a la variación de pH, es decir, la  $\lambda_{analítica}$  que era de 285 nm.

Se registraron los espectros de absorbancia en un intervalo de pHs entre 6 y 7.5 (Figura 1.35) y se representó el  $\log (A-A_M)/(A_I-A)$  frente al pH (ver *P.Exp. Capítulo 1*). Los puntos obtenidos se ajustaron a una recta con un coeficiente de correlación excelente. La intersección de la recta con el eje de ordenadas correspondía con el  $pK_a$  del compuesto **12**: **7.07 ± 0.02**.



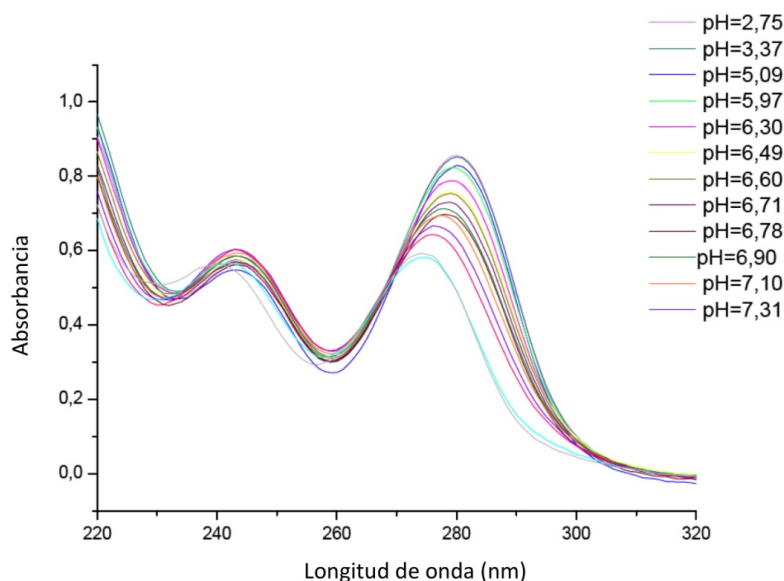


Fig. 1.35. Determinación del pKa de **12**. Representación de los espectros de absorción a distintos pHs.

Como era de esperar, el valor de pK<sub>a</sub> obtenido era muy similar a los valores descritos en la bibliografía. Éste era un dato importante que debía tenerse en cuenta en los ensayos biofísicos, pues a pH neutro coexistirían en solución la forma básica y la ácida de la base J<sub>T</sub>.

### 3.2. Determinación del coeficiente de extinción molar de las bases J<sub>T</sub>, J<sub>D</sub> y J<sub>W</sub>.

El coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) es un parámetro característico de cada compuesto relacionado con su absorción a una determinada longitud de onda en unas condiciones de disolvente, pH y temperatura. Para los objetivos de este trabajo,  $\epsilon$  es un valor imprescindible puesto que los PNAs deben ser cuantificados por UV-Vis debido a que su síntesis se realiza a escala  $\mu$ molar.

En la literatura pueden encontrarse algunos valores de las  $\epsilon$  de las bases Janus J<sub>T</sub>,<sup>[122,123,138,139]</sup> J<sub>D</sub><sup>[139,140]</sup> y J<sub>W</sub><sup>[141]</sup> aunque las condiciones y longitudes de onda a los que se definen no se correspondían con los que se necesitaban en este trabajo. Por este motivo, se decidió determinar experimentalmente las  $\epsilon$  de las tres bases Janus a la longitud de onda de 230 nm, ya que la base J<sub>W</sub> solo presenta absorción entre 200 y 240 nm, y a 280 nm, que corresponde al máximo de absorción de J<sub>T</sub> y está muy próximo al de J<sub>D</sub>. Además, teniendo en cuenta que los ensayos biofísicos se podrían realizar a pH neutro o ácido, se decidió también determinarlos a pH 5.5 y 7.0.

En primer lugar, se escogieron los compuestos modelo con los que realizar los experimentos. Se eligió el compuesto **12** como modelo de J<sub>T</sub>, el derivado de J<sub>D</sub> como ester metílico **39**, puesto que el propio heterociclo 2,6-diamino-4(3H)-pirimidona dio problemas de solubilidad, y la base amelida **50**. El estudio se realizó disolviendo los compuestos mencionados en una solución tampón de NH<sub>4</sub>AcO 10 mM. Se prepararon dos disoluciones de cada compuesto y se ajustó el pH a 5.5 en uno de ellos y a 7.0 en el otro. Se determinó la absorbancia UV-Vis de cada base en un rango de concentraciones entre 10 y 100  $\mu$ M, soluciones obtenidas a partir de la dilución de

la solución madre. La representación de los valores de absorbancia a cada longitud de onda escogida (230 y 280 nm) frente a la concentración del compuesto, dio una recta, la pendiente de la cual, correspondía al coeficiente de extinción molar según la Ley de Lambert-Beer. En el rango de concentraciones trabajadas se obtuvo una muy buena linealidad y los ajustes de los datos experimentales a la ley de Lambert-Beer presentaron coeficientes de correlación siempre superiores a 0.995 (ver *P.Exp. Capítulo 1*). Los experimentos se realizaron por duplicado y se tomó el valor medio como  $\epsilon$  (Tabla 1.3).

Base Janus	pH= 5.5		pH= 7.0	
	$\epsilon_{230}$	$\epsilon_{280}$	$\epsilon_{230}$	$\epsilon_{280}$
$J_T$	6852 $\pm$ 178	13098 $\pm$ 202	6546 $\pm$ 132	11028 $\pm$ 204
$J_D$	4731 $\pm$ 60	10011 $\pm$ 86	5040 $\pm$ 85	10723 $\pm$ 106
$J_W$	2201 $\pm$ 89	-	2529 $\pm$ 60	-

**Tabla 1.3.** Valores de  $\epsilon$  determinados experimentalmente de las bases Janus  $J_T$ ,  $J_D$  y  $J_W$  a pH 5.5 y 7.0 y a las longitudes de onda 230 y 280 nm.

Como puede comprobarse en la Tabla 1.3, los valores de  $\epsilon$  de  $J_T$  a 280 nm (máximo de absorción) muestran una gran dependencia del pH. Teniendo en cuenta el valor de  $pK_a$  obtenido, a pH 5.5 la forma ácida de  $J_T$  será la mayoritaria en disolución, por lo que la  $\epsilon$  determinada a este pH corresponderá a la especie  $J_T\text{-H}^+$ . Sin embargo, a pH neutro existe una mezcla de las formas ácida y básica de  $J_T$  y, en consecuencia, la  $\epsilon$  determinada hará referencia a esta mezcla. Por otro lado, como ya se ha comentado,  $J_W$  no presenta absorción a  $\lambda$  superiores a 240 nm y, por ese motivo, solo podía ser cuantificada a 230 nm.

#### 4. Diseño y síntesis de los ligandos tipo PNA

##### 4.1. Diseño de los ligandos

Una vez obtenidos los monómeros de PNA de las bases Janus, se procedió al diseño de los ligandos. Inicialmente, se decidió que en todos los PNAs sintetizados, independientemente de la diana a la que se dirigieran, se introduciría el aminoácido lisina (K) en el extremo C-terminal puesto que confiere solubilidad en agua a los ligandos y, por otro lado, su grupo amino, protonado a pH neutro, puede facilitar la interacción con la diana polianiónica. Además, teniendo en cuenta la problemática penetración celular de los PNAs, el incorporar una lisina también podría mejorar su permeabilidad. Finalmente, también se decidió que se usaría una resina que permitiese obtener el residuo C-terminal como carboxamida, evitando así la presencia de un ácido carboxílico en los ligandos.

Este apartado se ha dividido en función de la diana a las que están dirigidos los PNAs. Para facilitar la lectura, se han empleado nombres abreviados de los ligandos en los que se especifica la secuencia de residuos de PNA y aminoácidos que componen el ligando, desde el extremo N-terminal hasta el C-terminal. Para hacer referencia a los aminoácidos, se ha escogido la nomenclatura de una sola letra donde G es glicina y K lisina.

#### 4.1.1. Ligandos con $J_T$ de la diana $CUG_n$

El RNA mutante relacionado con la DM1, como se ha descrito en la introducción, se encuentra estructurado como *hairpin* y presenta una secuencia donde el triplete CUG se repite aberrantemente. La estructura del *hairpin* mutante relacionado con la DM1 está estabilizada por dos pares C-G consecutivos entre dos apareamientos no canónicos U·U.

Se habían sintetizado dos monómeros de PNA con la base Janus  $J_T$  en los que la distancia entre la base y el esqueleto de AEG era superior a la original. Se obtuvo el monómero **38**, que solo presentaba un metileno adicional y el **28**, con una cadena lateral con tres átomos de más. Para la síntesis de una primera generación de ligandos, se decidió emplear el monómero con la modificación más pequeña, es decir, el monómero de  $J_T$  **38**. Teniendo en cuenta estos parámetros y la estructura de la diana, se diseñaron dos tipos de ligandos, uno monomérico y otros diméricos (Figura 1.36).

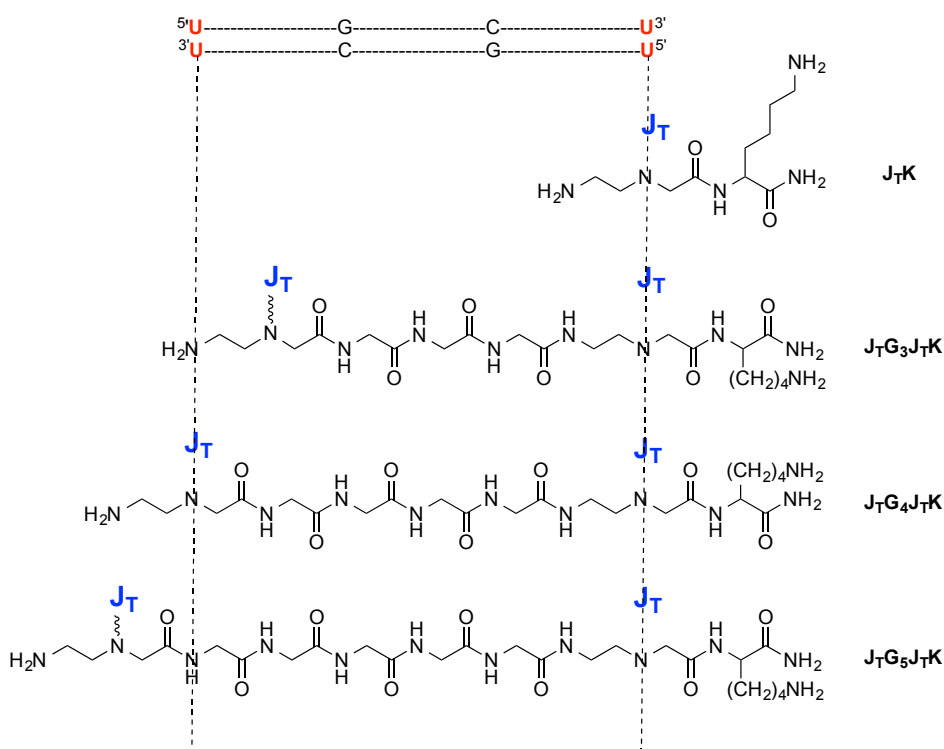
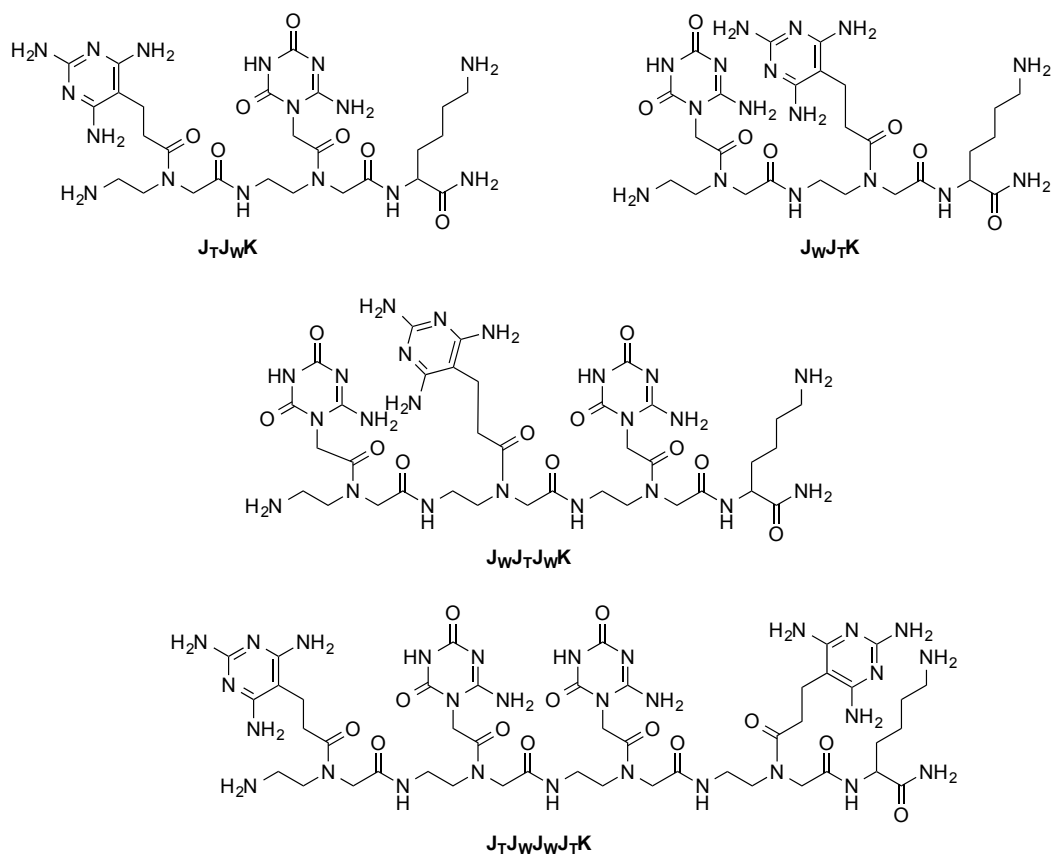


Fig. 1.36. Diseño de los ligandos con  $J_T$  para la estructura  $CUG_n$ .

El ligando monomérico está simplemente compuesto del monómero **38** y del aminoácido lisina en el extremo C-terminal. Los ligandos diméricos están formados por dos bases Janus  $J_T$  separadas por un esqueleto que contiene un número diferente de residuos de glicina. Sobre el papel, el número de glicinas óptimo para cubrir la distancia entre los dos pares no canónicos U·U es de cuatro. No obstante, pareció interesante sintetizar también el compuesto con tres y cinco glicinas para evaluar la trascendencia de este espaciador en la interacción, teniendo en cuenta además, el metileno adicional del monómero de PNA con  $J_T$  respecto al estándar. Así pues, en principio, en el caso del ligando monomérico, se esperaría la unión de una sola molécula por par no-canónico U·U mientras que, en el caso de los ligandos diméricos, podría unirse uno por cada dos *mismatches*. (Figura 1.37).

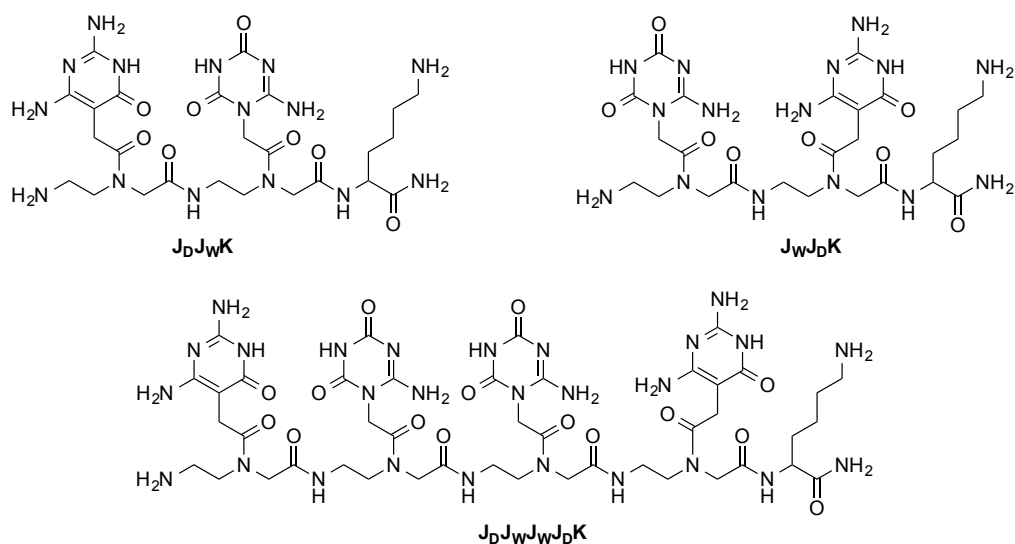






**Fig. 1.41.** Ligandos que contienen J<sub>W</sub> en combinación con J<sub>T</sub> diseñados para interactuar con la diana CUG<sub>n</sub>.

En combinación con J<sub>D</sub>, se diseñaron unos ligandos análogos a los mencionados para J<sub>T</sub>: los ligandos diméricos con J<sub>D</sub> y J<sub>W</sub> en ambos sentidos (J<sub>D</sub>J<sub>W</sub>K y J<sub>W</sub>J<sub>D</sub>K) y el tetrámero (J<sub>D</sub>J<sub>W</sub>J<sub>W</sub>J<sub>D</sub>K) (Figura 1.42).



**Fig. 1.42.** Ligandos que contienen J<sub>W</sub> en combinación con J<sub>D</sub> diseñados para interactuar con la diana CCUG<sub>n</sub>.

#### 4.2. Síntesis en fase sólida, purificación y caracterización

Dado que los PNAs tienen un esqueleto de poliamida, en su síntesis se emplea una metodología prácticamente idéntica a la usada en la síntesis de péptidos en fase sólida. Los monómeros de PNA empleados y los aminoácidos se encuentran resumidos en la Tabla 1.4.

Monómeros de PNA	
Con la Janus J <sub>T</sub>	38
Con la Janus J <sub>D</sub>	49
Con la Janus J <sub>W</sub>	60
Aminoácidos	
K	Fmoc-Lys(Boc)-OH
G	Fmoc-Gly-OH

**Tabla 1.4.** Monómeros de PNA y aminoácidos empleados para la síntesis de los ligandos.

La síntesis de cada PNA se llevó a cabo a una escala de 10  $\mu$ moles sobre una resina *NovaSyn TG Sieber* formada por un soporte de polietilenglicol-poliestireno (PEG-PS) funcionalizado con el espaciador bifuncional XAL (ácido 5-(9-aminoxanten-2-oxi)-valérico). Este espaciador bifuncional proporciona una unión del PNA al soporte sólido estable en las condiciones de síntesis y escindible en condiciones compatibles con la estabilidad del PNA una vez finalizada. Un tratamiento ácido para el desanclaje (*cleavage*) permite la obtención de los PNAs en forma de carboxamida en el extremo C-terminal.

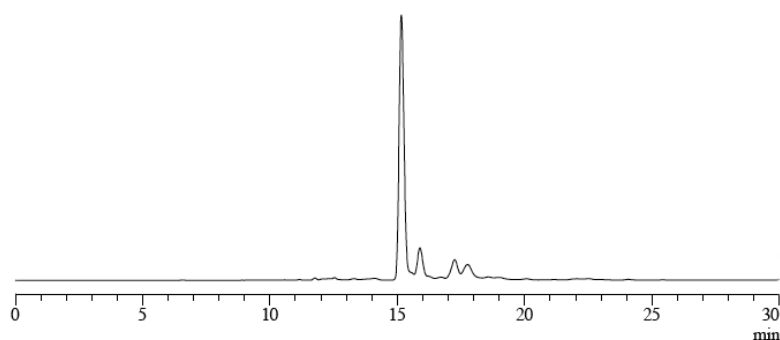
La elongación de la cadena es un proceso cíclico que consta de tres etapas: la eliminación del grupo Fmoc, el acoplamiento y la acetilación de los grupos amino que no han reaccionado (*capping*).

- La desprotección del extremo N-terminal se llevó a cabo con dos tratamientos de 10 minutos con una solución de piperidina al 20% en DMF.
- Para la formación del enlace peptídico o de tipo amida entre los monómeros de PNA (o los correspondientes aminoácidos), se empleó el agente activante HATU (hexafluorofosfato 1-[*bis*(dimetilamino)metileno]-1*H*-1,2,3-triazol[4,5-*b*]piridinio-3-óxido), las bases DIEA y 2,6-lutidina y un disolvente orgánico capaz de disolver todos los reactivos, en este caso la NMP. Se empleó un exceso de 3 eq de monómero de PNA o aminoácido. Los acoplamientos se realizaron en condiciones anhidras para evitar reacciones secundarias con el agua. En el caso de los monómeros de PNA, la etapa de acoplamiento se prolongó durante 90 minutos con el objetivo de obtener el mejor rendimiento posible, mientras que solo se dejaron evolucionar durante 45 minutos los acoplamientos de los aminoácidos (K y G). Para evaluar cualitativamente el grado de acoplamiento se realizaron tests de ninhidrina que indican la presencia de aminas primarias en la resina (ver *Materiales y Métodos*).
- El *capping*, realizado con Ac<sub>2</sub>O después de verificar la eficacia del acoplamiento, es una etapa importante para evitar la formación de cadenas poliméricas con deleciones de residuos de PNA o aminoácido.

Estas etapas se repitieron cíclicamente hasta obtener el producto deseado. Llegados a este punto se desprotegió el extremo N-terminal con el mismo tratamiento de piperidina empleado para la eliminación del grupo Fmoc anterior a cada acoplamiento y, a continuación, se procedió al desanclaje del PNA de la resina y a la desprotección de las bases.

El *cleavage* se realizó con una mezcla de TFA/*m*-cresol (19:1) en los PNAs que solo contenían J<sub>T</sub> o J<sub>D</sub>, puesto que en estas condiciones tiene lugar el desanclaje a la vez que la desprotección de las bases. Para los PNAs que contenían J<sub>W</sub> se empleó una mezcla de TFA/TFMSA<sup>[21]</sup> con TIS y anisol, ya que se necesitaba un ácido más fuerte para conseguir eliminar el protector mesitilensulfonilo. En el primer caso, fueron necesarios 30 minutos para conseguir el completo desanclaje y desprotección de las bases mientras que en el segundo, las reacciones se dejaron evolucionar durante 2 h.

Los 15 PNAs ya sintetizados, desanclados y desprotegidos, se purificaron por HPLC en fase reversa C<sub>18</sub> empleando condiciones ácidas. Posteriormente, se caracterizaron por EM-ESI (+) o bien, por EM-MALDI-TOF (+). Los crudos obtenidos del *cleavage* contenían mayoritariamente, en general, el producto deseado, por lo que las purificaciones fueron muy sencillas de llevar a cabo (véase como ejemplo la Figura 1.43). Finalmente, se obtuvieron los PNAs deseados con unos rendimientos de entre el 20 y el 79% (Tabla 1.5).



**Fig. 1.42.** Cromatograma del crudo obtenido después del desanclaje del PNA J<sub>T</sub>G<sub>4</sub>J<sub>T</sub>K. Elución: de 0 a 30% de B en A durante 30 min. A= 0.1% de TFA en H<sub>2</sub>O y B= 0.1% de TFA en ACN.



PNA	Rendimiento	Masa calculada	<i>m/z</i> determinada
J <sub>T</sub> K	60%	424.2659	ESI (+): 424.84 [M+H] <sup>+</sup> , 212.93 [(M+2H)/2] <sup>2+</sup> HR ESI (+): 425.2730 [M+H] <sup>+</sup>
J <sub>T</sub> G <sub>3</sub> J <sub>T</sub> K	20%	874.4746	ESI (+): 875.23 [M+H] <sup>+</sup> , 438.23 [(M+2H)/2] <sup>2+</sup> HR ESI (+): 875.4913 [M+H] <sup>+</sup> , 438.2442 [(M+2H)/2] <sup>2+</sup>
J <sub>T</sub> G <sub>4</sub> J <sub>T</sub> K	30%	931.4961	ESI (+): 932.26 [M+H] <sup>+</sup> , 466.45 [(M+2H)/2] <sup>2+</sup> , 311.25 [(M+3H)/3] <sup>3+</sup> HR ESI (+): 932.5049 [M+H] <sup>+</sup> , 466.7557 [(M+2H)/2] <sup>2+</sup> , 311.5062 [(M+3H)/3] <sup>3+</sup>
J <sub>T</sub> G <sub>5</sub> J <sub>T</sub> K	20%	988.5176	ESI (+): 495.22 [(M+2H)/2] <sup>2+</sup> MALDI-TOF (+): 989.8 [M+H] <sup>+</sup> HR ESI (+): 989.5222 [M+H] <sup>+</sup> , 495.2660 [(M+2H)/2] <sup>2+</sup> , 330.5143 [(M+3H)/3] <sup>3+</sup>
J <sub>D</sub> K	59%	411.2343	ESI (+): 411.93 [M+H] <sup>+</sup> HR ESI (+): 411.2411 [M+H] <sup>+</sup>
J <sub>D</sub> J <sub>D</sub> K	42%	677.3470	ESI (+): 678.08 [M+H] <sup>+</sup> , 339.54 [(M+2H)/2] <sup>2+</sup> HR ESI (+): 678.3536 [M+H] <sup>+</sup> , 339.6813 [(M+2H)/2] <sup>2+</sup>
J <sub>W</sub> K	61%	413.21	ESI (+): 413.83 [M+H] <sup>+</sup>
J <sub>W</sub> J <sub>W</sub> K	79%	681.31	ESI (+): 682.06 [M+H] <sup>+</sup>
J <sub>T</sub> J <sub>W</sub> K	59%	692.36	ESI (+): 693.12 [M+H] <sup>+</sup> , 347.14 [(M+2H)/2] <sup>2+</sup>
J <sub>W</sub> J <sub>T</sub> K	43%	692.36	ESI(+): 693.02 [M+H] <sup>+</sup> , 346.97 [(M+2H)/2] <sup>2+</sup>
J <sub>W</sub> J <sub>T</sub> J <sub>W</sub> K	63%	960.45	ESI (+): 961.30 [M+H] <sup>+</sup> , 481.22 [(M+2H)/2] <sup>2+</sup> MALDI-TOF (+): 961.7 [M+H] <sup>+</sup> , 983.7[M+Na] <sup>+</sup> , 999.7[M+K] <sup>+</sup>
J <sub>T</sub> J <sub>W</sub> J <sub>W</sub> J <sub>T</sub> K	60%	1238.6	ESI (+): 1240.41 [M+H] <sup>+</sup> , 620.49 [(M+2H)/2] <sup>2+</sup> MALDI-TOF (+): 1241.0 [M+H] <sup>+</sup>
J <sub>D</sub> J <sub>W</sub> K	42%	679.33	ESI (+): 680.08 [M+H] <sup>+</sup> , 340.62 [(M+2H)/2] <sup>2+</sup>
J <sub>W</sub> J <sub>D</sub> K	58%	679.33	ESI (+): 680.03 [M+H] <sup>+</sup> , 340.59 [(M+2H)/2] <sup>2+</sup>
J <sub>D</sub> J <sub>W</sub> J <sub>W</sub> J <sub>D</sub> K	42%	1213.53	ESI (+): 1214.20 [M+H] <sup>+</sup> , 607.82 [(M+2H)/2] <sup>2+</sup> MALDI-TOF(+): 1214.4 [M+H] <sup>+</sup>

Tabla 1.5. Resumen de los PNAs sintetizados, rendimientos y caracterización por EM.

## 5. Bibliografía

- [1] H. Fenniri, P. Mathivanan, K. L. Vidale, D. M. Sherman, K. Hallenga, K. V. Wood, J. G. Stowell, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3854–3855.
- [2] B. J. Cafferty, I. Gállego, M. C. Chen, K. I. Farley, R. Eritja, N. V. Hud, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 2447–2450.
- [3] F. Rakotondradany, H. Sleiman, M. A. Whitehead, *Can. J. Chem.* **2009**, *87*, 627–639.
- [4] D. L. Boger, M. J. Kochanny, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 4950–4955.
- [5] D. L. Boger, M. J. Kochanny, H. Cai, D. Wyatt, P. A. Kitos, M. S. Warren, J. Ramcharan, L. T. Gooljarsingh, S. J. Benkovic, *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 643–659.
- [6] S. D. Gilbert, S. J. Mediatore, R. T. Batey, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14214–14215.
- [7] V. N. Sagi, T. Liu, X. Lu, T. Bartfai, E. Roberts, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 7210–7215.
- [8] C. H. Wong, Y. Fu, S. R. Ramisetty, A. M. Baranger, S. C. Zimmerman, *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 8881–8890.
- [9] D. Chen, Meena, S. K. Sharma, L. W. McLaughlin, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 70–71.
- [10] K. Schofield, in *Heterocycl. Compd.*, Butterworths, Baltimore, University Park Press, London, **1921**, pp. 127–129.
- [11] D. Brown, T. Teitei, *Aust. J. Chem.* **1965**, *18*, 559–568.
- [12] C. López, R. M. Claramunt, I. Alkorta, J. Elguero, *J. Spectrosc.* **2000**, *14*, 121–126.
- [13] F. H. Allen, *Acta Crystallogr. Sect. B* **2002**, *58*, 380–388.
- [14] V. Gerhardt, M. Tutughambarso, M. Bolte, *Acta Crystallogr. C* **2011**, *67*, o179–o187.
- [15] K. Jadidi, R. Ghahremanzadeh, A. Bazgir, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 2005–2009.
- [16] S. Tu, J. Zhang, R. Jia, B. Jiang, Y. Zhang, H. Jiang, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 1450–1453.
- [17] S. J. Tangeda, A. Garlapati, *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 1453–1458.
- [18] J. K. DeMartino, I. Hwang, S. Connelly, I. A. Wilson, D. L. Boger, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 5441–5448.
- [19] A. Gangjee, Y. Wang, S. F. Queener, R. L. Kisliuk, *J. Heterocycl. Chem.* **2006**, *43*, 1523–1531.
- [20] D. P. Kawade, P. B. Khedekar, K. P. Bhusari, *Int J Pharm* **2011**, *2*, 13–16.
- [21] H. Chen, Meena, L. W. McLaughlin, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13190–13191.
- [22] B. Bann, S. A. Miller, *Chem. Rev.* **1958**, *58*, 131–172.
- [23] K. Ai, Y. Liu, L. Lu, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 9496–9497.
- [24] C. A. Brown, K.-S. Jeong, R. H. Poppenga, B. Puschner, D. M. Miller, A. E. Ellis, K.-I. Kang, S. Sum, A. M. Cistola, S. A. Brown, *J. Vet. Diagn. Invest.* **2007**, *19*, 525–531.
- [25] P. E. Nielsen, G. Haaima, *Chem. Soc. Rev.* **1997**, *26*, 73–78.
- [26] P. E. Nielsen, *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 624–630.
- [27] P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, *Science* **1991**, *254*, 1497–1500.
- [28] P. E. Nielsen, *Orig. Life Evol. Biosph.* **1993**, *23*, 323–327.
- [29] C. Böhrer, P. E. Nielsen, L. E. Orgel, *Nature* **1995**, *376*, 578–581.
- [30] P. E. Nielsen, *Chem. Biodivers.* **2007**, *4*, 1996–2002.
- [31] P. E. Nielsen, M. Eriksson, *Q. Rev. Biophys.* **1996**, *29*, 369–394.
- [32] R. P. Singh, B.-K. Oh, J.-W. Choi, *Bioelectrochemistry* **2010**, *79*, 153–161.
- [33] P. E. Nielsen, *Chem. Iodiversity* **2010**, *7*, 786–804.
- [34] F. Wojciechowski, R. E. Hudson, *Curr. Top. Med. Chem.* **2007**, *7*, 667–679.
- [35] P. E. Nielsen, M. Egholm, *Curr. Issues Mol. Biol.* **1999**, *1*, 89–104.
- [36] A. Sen, P. E. Nielsen, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 3367–3374.
- [37] V. V. Demidov, V. N. Potaman, M. D. Frank-Kamenetskii, M. Egholm, O. Buchardt, S. H. Sönnichsen, P. E. Nielsen, *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *48*, 1310–1313.
- [38] S. Shakeel, S. Karim, A. Ali, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2006**, *81*, 892–899.

- [39] D. Pouchain, J. J. Díaz-Mochón, L. Bialy, M. Bradley, *ACS Chem. Biol.* **2007**, *2*, 810–818.
- [40] H. Knudsen, P. E. Nielsen, *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 494–500.
- [41] J. G. Karras, M. A. Maier, T. Lu, A. Watt, M. Manoharan, *Biochemistry* **2001**, *40*, 7853–7859.
- [42] H. Yin, Q. Lu, M. Wood, *Mol. Ther.* **2007**, *16*, 38–45.
- [43] B. A. Janowski, K. Kaihatsu, K. E. Huffman, J. C. Schwartz, R. Ram, D. Hardy, C. R. Mendelson, D. R. Corey, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 210–215.
- [44] P. Sazani, F. Gemignani, S.-H. Kang, M. A. Maier, M. Manoharan, M. Persmark, D. Bortner, R. Kole, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 1228–1233.
- [45] P. Wittung, J. Kajanus, K. Edwards, P. E. Nielsen, B. Nordén, B. G. Malmström, *FEBS Lett.* **1995**, *365*, 27–29.
- [46] L. Good, R. Sandberg, O. Larsson, P. E. Nielsen, C. Wahlestedt, *Microbiology* **2000**, *146*, 2665–2670.
- [47] U. Koppelhus, S. K. Awasthi, V. Zachar, H. U. Holst, P. Ebbesen, P. E. Nielsen, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **2002**, *12*, 51–63.
- [48] P. Sazani, K. Shin-Hong, M. A. Maier, C. Wei, J. Dillman, J. Summerton, M. Manoharan, R. Kole, *Nucleic Acid Res.* **2001**, *29*, 3965–3974.
- [49] C. G. Simmons, A. E. Pitts, L. D. Mayfield, J. W. Shay, D. R. Corey, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 3001–3006.
- [50] T. Ljungstrøm, H. Knudsen, P. E. Nielsen, *Bioconjug. Chem.* **1999**, *10*, 965–972.
- [51] U. Koppelhus, P. E. Nielsen, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2003**, *55*, 267–280.
- [52] M. Egholm, O. Buchardt, L. Christensen, C. Behrens, S. M. Freier, D. A. Driver, R. H. Berg, S. K. Kim, B. Norden, P. E. Nielsen, *Nature* **1993**, *365*, 566–568.
- [53] S. Tomac, M. Sarkar, T. Ratilainen, P. Wittung, P. E. Nielsen, B. Nordén, A. Gräslund, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 5544–5552.
- [54] P. Wittung, P. Nielsen, B. Nordén, *Biochemistry* **1997**, *36*, 7973–7979.
- [55] P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, in *Antisense Res. Appl.*, CRC Press, Boca Raton, **1993**, pp. 363–373.
- [56] P. E. Nielsen, M. Egholm, O. Buchardt, *J. Mol. Recognit.* **1994**, *7*, 165–170.
- [57] J. Lohse, O. Dahl, P. E. Nielsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 11804–11808.
- [58] R. W. Roberts, D. M. Crothers, *Science* **1992**, *258*, 1463–1466.
- [59] H. Han, P. B. Dervan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 3806–3810.
- [60] C. Escudeé, J.-C. François, J.-S. Sun, G. Ott, M. Sprinzl, T. Garestier, J.-C. Heélène, *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 5547–5553.
- [61] M. Li, T. Zenggeya, E. Rozners, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8676–8681.
- [62] T. Zenggeya, M. Li, E. Rozners, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 2121–2124.
- [63] P. Gupta, T. Zenggeya, E. Rozners, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 11125.
- [64] T. Zenggeya, P. Gupta, E. Rozners, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 12593–12596.
- [65] P. Gupta, O. Muse, E. Rozners, *Biochemistry* **2012**, *51*, 63–73.
- [66] P. Lagriffoule, M. Eriksson, K. K. Jensen, P. E. Nielsen, P. Wittung, B. Nordén, O. Buchardt, *Chem. – Eur. J.* **1997**, *3*, 912–919.
- [67] K. N. Ganesh, P. E. Nielsen, *Curr. Org. Chem.* **2000**, *4*, 931–943.
- [68] J. K. Pokorski, M. A. Witschi, B. L. Purnell, D. H. Appella, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15067–15073.
- [69] T. Vilaivan, C. Srisuwannaket, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 1897–1900.
- [70] E. A. Englund, Q. Xu, M. A. Witschi, D. H. Appella, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 16456–16457.
- [71] A. Gourishankar, K. N. Ganesh, *Artif. DNA PNA XNA* **2012**, *3*, 5–13.
- [72] B. Hyrup, M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 1083–1088.
- [73] B. Hyrup, M. Egholm, P. E. Nielsen, P. Wittung, B. Nordén, O. Buchardt, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7964–7970.

- [74] P. E. Nielsen, G. Haaima, A. Lohse, O. Buchardt, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1939–1942.
- [75] A. Püschl, S. Sforza, G. Haaima, O. Dahl, P. E. Nielsen, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 4707–4710.
- [76] R. H. E. Hudson, R. D. Viirre, Y. H. Liu, F. Wojciechowski, A. K. Dambeniaks, *Pure Appl. Chem.* **2004**, *76*, 1591–1598.
- [77] F. Wojciechowski, R. H. E. Hudson, *Can. J. Chem.* **2008**, *86*, 1026–1029.
- [78] E. Ferrer, A. Shevchenko, R. Eritja, *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 291–297.
- [79] A. B. Eldrup, B. B. Nielsen, G. Haaima, H. Rasmussen, J. S. Kastrup, C. Christensen, P. E. Nielsen, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, *2001*, 1781–1790.
- [80] A. B. Eldrup, C. Christensen, G. Haaima, P. E. Nielsen, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3254–3262.
- [81] L. M. Wilhelmsson, A. Holmén, P. Lincoln, P. E. Nielsen, B. Nordén, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2434–2435.
- [82] A. B. Eldrup, O. Dahl, P. E. Nielsen, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11116–11117.
- [83] M. C. Griffith, L. M. Risen, M. J. Greig, E. A. Lesnik, K. G. Sprankle, R. H. Griffey, J. S. Kiely, S. M. Freier, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 831–832.
- [84] H. Kuhn, V. V. Demidov, M. D. Frank-Kamenetskii, P. E. Nielsen, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 582–587.
- [85] F. Wojciechowski, R. H. E. Hudson, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 3807–3816.
- [86] H. Fenniri, *Method and Associated Compounds for Forming Nanotubes*, WO 02/066482 A1.
- [87] J. Kenyon, B. C. Platt, *J. Chem. Soc.* **1939**, 633–637.
- [88] M. Zhao, J. Li, E. Mano, Z. Song, D. M. Tschaen, E. J. J. Grabowski, P. J. Reider, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2564–2566.
- [89] M. M. Zhao, J. Li, E. Mano, Z. J. Song, D. M. Tschaen, in *Org. Synth.*, John Wiley & Sons, Inc., **2003**.
- [90] R. Warrenner, T. Lee, R. Russell, M. Paddon-Row, *Aust. J. Chem.* **1978**, *31*, 1113–1127.
- [91] A. Vázquez-Romero, L. Cárdenas, E. Blasi, X. Verdaguer, A. Riera, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 3104–3107.
- [92] S. P. Rannard, N. J. Davis, *Org. Lett.* **1999**, *1*, 933–936.
- [93] Y. Feng, G. Chen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 958–961.
- [94] N. Panday, J. Benz, D. Blum-Kaelin, V. Bourgeois, H. Dehmlow, P. Hartman, B. Kuhn, H. Ratni, X. Warot, M. B. Wright, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5231–5237.
- [95] B. Martine, L. Christiane, D. Pierre, B. Benaissa, B. Jean, *New Indole Derivatives Are Peroxisome Proliferator Activated Receptor Activators Useful to Treat E.g. Hypertriglyceridemia, Hyperlipidemia, Hypercholesterolemia and Diabetes*, 2890071-a1.
- [96] G. Byk, C. Gilon, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 5687–5692.
- [97] T. Vogler, A. Studer, *Synthesis* **2008**, *13*, 1979–1993.
- [98] R. A. Sheldon, I. W. C. E. Arends, *Adv. Synth. Catal.* **2004**, *346*, 1051–1071.
- [99] R. A. Sheldon, I. W. C. E. Arends, *J. Mol. Catal. Chem.* **2006**, *251*, 200–214.
- [100] P. Lucio Anelli, C. Biffi, F. Montanari, S. Quici, *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 2559–2562.
- [101] L. Huang, N. Teumelsan, X. Huang, *Chem. Weinh. Bergstr.* **2006**, *12*, 5246–5252.
- [102] Y. Shang, T. But, H. Togo, P. Toy, *Synlett* **2007**, *2007*, 0067–0070.
- [103] R.-W. Wang, B. Gold, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 2465–2468.
- [104] J. F. Hyde, O. K. Johansson, W. H. Dautt, R. F. Fleming, H. B. Laudenslager, M. P. Roche, *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 5615–5618.
- [105] E. Minta, C. Boutonnet, N. Boutard, J. Martinez, V. Rolland, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 1795–1797.
- [106] M. Lovrić, I. Cepanec, M. Litvić, A. Bartolinčić, V. Vinković, *Croat. Chem. Acta* **2007**, *80*, 109–115.
- [107] M. Node, K. Nishide, M. Sai, K. Fuji, E. Fujita, *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 1991–1993.

- [108] J. Martinez, J. C. Tolle, M. Bodanszky, *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 3596–3598.
- [109] R. L. Diebner, L. Jackson, *Preparation of Ammelides*, **1975**, 260/249.5.
- [110] J. H. Jäger, *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* **1876**, *9*, 1554–1557.
- [111] in *Gmelins Handb. Anorg. Chem.*, Elsevier MDL, p. 364.
- [112] D. W. Kaiser, J. T. Thurston, *J. Org. Chem.* **1952**, *17*, 185–192.
- [113] M. Matsui, H. Nakazumi, K. Shibata, H. Muramatsu, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 4987–4990.
- [114] M. Chiron-Charrier, P. Caubère, *Synth. Commun.* **1993**, *23*, 2659–2672.
- [115] J.-L. Havet, C. Porte, A. Delacroix, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 4399–4402.
- [116] D. Ri Zhang, S. Wha Oh, Y. Pyo Hong, Y. S. Kang, *Int. J. Adhes. Adhes.* **2005**, *25*, 371–378.
- [117] A. Bugaut, K. Jantos, J.-L. Wietor, R. Rodriguez, J. K. M. Sanders, S. Balasubramanian, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2677–2680.
- [118] A. J. Speziale, L. R. Smith, *J. Org. Chem.* **1963**, *28*, 1805–1811.
- [119] L. Grehn, M. Lurdes, S. Almeida, U. Ragnarsson, *Synthesis* **1988**, 1988, 992–994.
- [120] C. Yuan, R. M. Williams, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 1945–1948.
- [121] C. Yuan, R. M. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11777–11784.
- [122] B. Roth, J. Z. Strelitz, *J. Org. Chem.* **1969**, *34*, 821–836.
- [123] B. Roth, J. Z. Strelitz, *J. Org. Chem.* **1970**, *35*, 2696–2702.
- [124] D. D. Perrin, *Dissociation Constants of Organic Bases in Aqueous Solution*, Butterworth Press, London, **1965**.
- [125] A. Albert, R. Goldacre, J. Phillips, *J. Chem. Soc. Resumed* **1948**, 2240–2249.
- [126] B. Németh, C. Wéber, T. Veszprémi, T. Gáti, Á. Demeter, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 4910–4918.
- [127] M. Dračinský, A. Holý, P. Jansa, S. Kovačková, M. Buděšínský, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, *2009*, 4117–4122.
- [128] T. Okano, S. Kojima, *Yakugaku Zasshi* **1966**, *86*, 547–554.
- [129] V. Pacáková, K. Štulík, M. Příhoda, *J. Chromatogr. A* **1988**, *442*, 147–156.
- [130] V. Pichon, L. Chen, S. Guenu, M.-C. Hennion, *J. Chromatogr. A* **1995**, *711*, 257–267.
- [131] R. Muñiz-Valencia, S. G. Ceballos-Magaña, D. Rosales-Martinez, R. Gonzalo-Lumbreras, A. Santos-Montes, A. Cubedo-Fernandez-Trapiella, R. C. Izquierdo-Hornillos, *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *392*, 523–531.
- [132] Y. H. Jang, S. Hwang, S. B. Chang, J. Ku, D. S. Chung, *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113*, 13036–13040.
- [133] J. Reijenga, A. van Hoof, A. van Loon, B. Teunissen, *Anal. Chem. Insights* **2013**, *8*, 53–71.
- [134] D. V. Griffiths, S. P. Swetnam, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1981**, 1224–1225.
- [135] E. Bosch, J. Guiteras, A. Izquierdo, M. D. Prat, *Anal. Lett.* **1988**, *21*, 1273–1284.
- [136] D. Hutter, S. A. Benner, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 9839–9842.
- [137] A. Albert, E. P. Serjeant, *Ionization Constants of Acids and Bases: A Laboratory Manual*, Methuen, **1962**.
- [138] T. J. Thamann, *Spectrochim. Acta Part Mol. Spectrosc.* **1988**, *44*, 379–384.
- [139] L. F. Cavalieri, A. Bendich, *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72*, 2587–2594.
- [140] M. M. Stimson, *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, *71*, 1470–1474.
- [141] Gmelin-Institut für Anorganische Chemie und Grenzgebiete, *Gmelin Handbook of Inorganic and Organometallic Chemistry*, Springer, Berlin, **1990**.

# ***Capítulo 2*** ||

## ***Estudio de los complejos RNA-ligando*** ||



## 1. Introducción

Las interacciones no covalentes son muy relevantes en la naturaleza, no sólo porque son responsables de la estructura tridimensional de las proteínas y de los ácidos nucleicos, sino porque también juegan un papel fundamental en el reconocimiento molecular de la mayoría de procesos biológicos. El estudio de las interacciones entre ligandos y biomoléculas es esencial para entender los procesos que desencadenan, así como para el diseño y optimización de nuevas moléculas con fines terapéuticos. Es por estos motivos que, hoy en día, se han desarrollado un gran número de técnicas biofísicas que permiten determinar y caracterizar todo tipo de interacciones no covalentes. Todas estas técnicas han ido evolucionado significativamente en las últimas décadas, se están desarrollando día a día instrumentos más sensibles y sofisticados que proporcionan mayor información y permiten análisis más detallados. Para interacciones intermoleculares, como son las de los complejos ligando-biomolécula, se pueden llegar a determinar constantes de afinidad, parámetros termodinámicos, estequiometrías de unión, modos de interacción e, incluso, se pueden llevar a cabo estudios estructurales a nivel atómico.

Este segundo capítulo se centrará en el estudio, mediante el uso de diferentes técnicas biofísicas, de la interacción entre los ligandos sintetizados y pequeños RNA modelo que contengan las repeticiones CUG y CCUG características de los RNAs mutantes relacionados con la DM1 y la DM2.



### 1.1. Elección de la diana

Con el fin de evaluar la interacción entre ligandos y RNA mediante ensayos biofísicos, la situación óptima sería trabajar con la propia biomolécula para la que se ha diseñado el ligando. De esta manera, los estudios que se realizarían y los datos determinados serían mucho más próximos a los que se obtendrían *in vivo*. No obstante, suele ser muy complejo trabajar con la diana “real” debido a las dificultades que supone obtener una biomolécula a gran escala, sin tener en cuenta, la problemática que puede encontrarse en cuanto a sus características de solubilidad, agregación, estabilidad, etc. Por otro lado, ciertos ensayos biofísicos requieren un marcaje de la diana como sucede, por ejemplo, en algunos ensayos de fluorescencia. Debido a estas limitaciones, en muchos estudios de interacción se emplean modelos de RNA que contienen la secuencia o los motivos estructurales que presenta la biomolécula. Los modelos que suelen diseñarse son RNAs de secuencias cortas y solubles en las condiciones experimentales. A su vez, para poder llevar a cabo un correcto tratamiento de los datos es muy importante que el RNA se encuentre adecuadamente estructurado en las condiciones de los ensayos, por ejemplo, que no se produzcan agregaciones o coexistan distintas conformaciones. Con esta finalidad, se estabilizan estructuras haciendo uso de pares Watson-Crick adicionales o introduciendo *loops* ultra-estables en la formación de una estructura tallo-lazo. En otros casos, se introduce el principal motivo estructural del RNA diana dentro de una estructura ya de por sí estable, como podría ser un dúplex.

### 1.2. Las técnicas biofísicas

Cada técnica biofísica permite obtener una información concreta de una determinada interacción y, por este motivo, es importante conocer las características de todas ellas y planificar una estrategia para abordar los interrogantes que se plantean. Se han desarrollado muchísimas técnicas con el fin de estudiar y entender cómo funcionan las interacciones no covalentes entre biomoléculas o entre éstas y pequeños ligandos. Algunas de ellas son la cristalografía, la fluorescencia, la calorimetría, la resonancia magnética nuclear (RMN), la espectrometría de masas (EM), el dicroísmo circular (DC) o la resonancia de plasmones superficiales. Estos estudios experimentales se complementan con los análisis computacionales de modelado molecular que permiten predecir virtualmente interacciones entre ligandos y biomoléculas.<sup>[1]</sup> Con todas las técnicas disponibles hoy en día,<sup>[2]</sup> se pueden encontrar respuestas a la mayoría, si no todos, de los interrogantes planteados para una interacción, es decir, las llamadas tres W: “*Who? Where? and Why?*”.<sup>[3]</sup>

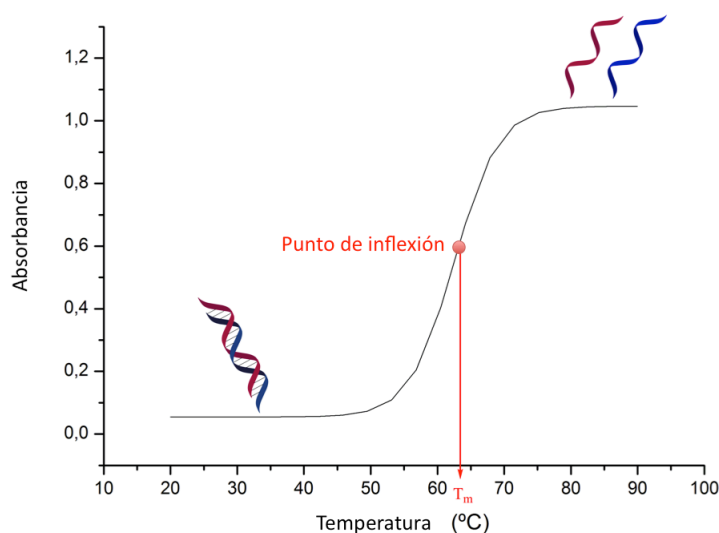
A continuación se hace una breve descripción de las técnicas empleadas en esta tesis doctoral.

#### 1.2.1. Espectrometría UV-Vis. Desnaturalización térmica.

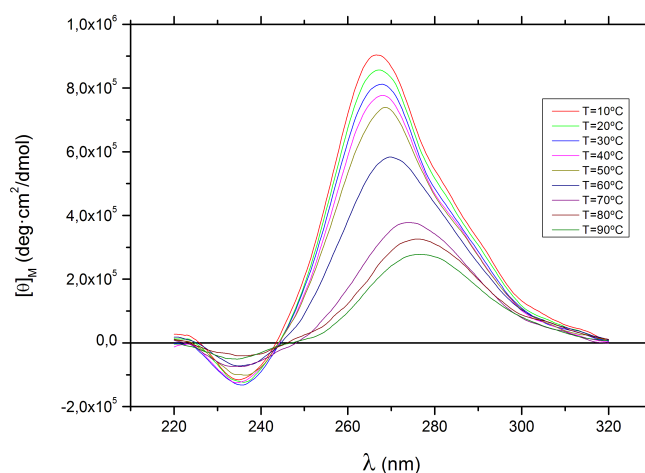
La estabilidad térmica de un oligonucleótido estructurado suele determinarse a través de su curva de desnaturalización térmica de la que puede deducirse su temperatura de fusión ( $T_m$ ). Para realizar una curva de fusión o de desnaturalización, se registra la variación de una propiedad física característica de la estructura del oligonucleótido en función de la temperatura. Las curvas obtenidas suelen ser de tipo sigmoïdal con una pendiente más pronunciada cuanto mayor es el fragmento de oligonucleótido estructurado. Las propiedades

más empleadas son la absorción UV-Vis<sup>[4]</sup> o la elipticidad,<sup>[5]</sup> aunque también pueden emplearse otras propiedades como la fluorescencia<sup>[6]</sup> o la RMN.<sup>[7]</sup> En esta tesis doctoral se han realizado curvas de fusión tanto mediante medidas de absorbancia de UV-Vis como de DC (Apartado 1.2.2) que son técnicas espectroscópicas electrónicas.

A



B



**Fig. 2.1.** **A.** Curva de fusión registrada a partir de medidas de UV a 260 nm. En el eje de ordenadas se representa la absorbancia y en el de abscisas la temperatura. Al calentar la muestra el oligonucleótido se desestructura con el consecuente aumento de absorbancia. El punto de inflexión de la curva corresponde a la temperatura de fusión. **B.** Superposición de espectros de DC obtenidos a diferentes temperaturas. La variación de elipticidad a una longitud de onda determinada permite obtener la  $T_m$  del oligonucleótido.

En una curva de fusión por UV se aumenta gradualmente la temperatura de una solución del oligonucleótido mientras que éste va sufriendo una desestructuración (desnaturalización) cooperativa que provoca un desapilamiento de las nucleobases y una rotura de los enlaces de hidrógeno. Este pérdida de estructura se traduce, en general, en un aumento de la

absorbancia. Esto es debido a que, mientras el oligonucleótido está estructurado, las nucleobases están apiladas interaccionando a través de sus sistemas  $\pi$  provocando una disminución de la intensidad de absorción en el espectro de UV (efecto de hipocromicidad).<sup>[8,9]</sup> Al aumentar la temperatura y, en consecuencia, provocar la desestructuración del oligonucleótido, las interacciones se debilitan hasta desaparecer quedando reflejado en un aumento de la absorbancia global. Las medidas se realizan a una longitud de onda determinada que, en el caso de los oligonucleótidos, suele ser la de su máximo de absorción (260 nm) (Figura 2.1.A).

El punto de inflexión de la curva obtenida al representar la variación de absorbancia o elipticidad frente a la temperatura, se conoce como temperatura de fusión ( $T_m$ ) y se define como la temperatura en la que el 50% de la muestra se encuentra estructurada, y el otro 50% desestructurada (Figura 2.1.A). La  $T_m$  depende, grosso modo, de la secuencia del oligonucleótido, de su concentración (siempre que no se trate de un sistema unimolecular), de las condiciones salinas del medio y hasta de los contraiones presentes.

Los experimentos en presencia de un ligando se realizan para valorar si éste produce una estabilización de la estructura del oligonucleótido o, de lo contrario, la desestabiliza. Para cuantificarlo se puede calcular  $\Delta T_m$  que se define como:

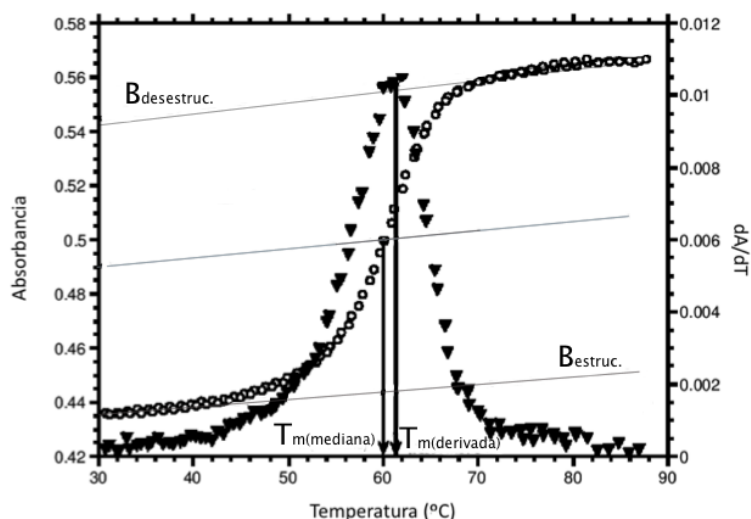
$$\Delta T_m = T_{m(\text{oligo+ligando})} - T_{m(\text{oligo})} \quad (2.1)$$

Una valor de  $\Delta T_m$  positivo indica que el ligando es capaz de estabilizar térmicamente la estructura del oligonucleótido mientras que, si es negativo, significa que el ligando la desestabiliza. Por otro lado, también puede suceder que el incremento calculado sea nulo, lo cual indica que el ligando no afecta ni perturba la estructura del oligonucleótido.<sup>[10-12]</sup>

Finalmente, pueden también determinarse los parámetros termodinámicos de la interacción si se registran las curvas de fusión a diferentes concentraciones de oligonucleótido.<sup>[13,14]</sup>

*Determinación de la  $T_m$ .* Para determinar la  $T_m$  es necesario representar gráficamente los valores obtenidos de la propiedad física medida, en esta tesis doctoral absorbancia (A) o elipticidad ( $\theta$ ), en función de la temperatura. En primer lugar, deben dibujarse las líneas de base que definen la A o la  $\theta$  de la especie completamente estructurada y desestructurada, es decir, las rectas que definen los plafones a alta y baja temperatura. Después debe calcularse y representarse la recta mediana de las dos anteriores. El punto de cruce entre la recta mediana y la curva obtenida experimentalmente, corresponde a la  $T_m$ .

El gran inconveniente del método de la mediana es la subjetividad para escoger las líneas de base de la especie estructurada y desestructurada. Por este motivo muchos prefieren determinar el punto de inflexión de la curva calculando su primera derivada. No obstante, es importante tener en cuenta que esta aproximación solo es plenamente válida para sistemas unimoleculares, y que para el caso de equilibrios de molecularidad superior, como sucede cuando se estudia la interacción con un ligando, el método puede conllevar un error asociado entre 1 y 2°C (Figura 2.2).<sup>[15]</sup> Así pues, aunque el método de la mediana sea más subjetivo, el resultado es el más preciso y, por este motivo, se ha decidido emplearlo en esta tesis doctoral.



**Fig. 2.2.** El máximo de la primera derivada difiere del valor de  $T_m$  obtenido mediante el método de la mediana.  $B_{estr}$  hace referencia a la línea de base que define la absorbancia del compuesto estructurado mientras que  $B_{destr}$  la del compuesto desestructurado. La línea central corresponde a la mediana, recta promedio de las anteriores. La  $T_m$  corresponde a la intersección entre la curva experimental y la mediana. Figura adaptada de la ref.15.

### 1.2.2. Dicroísmo Circular

La espectroscopía de dicroísmo circular (DC) consiste en hacer interaccionar una molécula ópticamente activa con luz polarizada linealmente y medir la diferencia de absorción de los componentes polarizados circularmente a la derecha ( $A_D$ ) y a la izquierda ( $A_I$ ) a diferentes longitudes de onda. Si la muestra es ópticamente activa, presentará coeficientes de extinción molar diferentes para la luz polarizada a la derecha y a la izquierda (2.2) y convertirá la luz polarizada linealmente en luz polarizada elípticamente.<sup>[16]</sup>

$$\Delta A = A_I - A_D \quad (2.2)$$

Esta diferencia de absorbancias ( $\Delta A$ ) se emplea para calcular tanto el coeficiente de extinción del DC ( $\Delta \epsilon$ ), como la elipticidad ( $\theta = \Delta A \cdot 32.98^\circ$ ).<sup>[17-19]</sup>

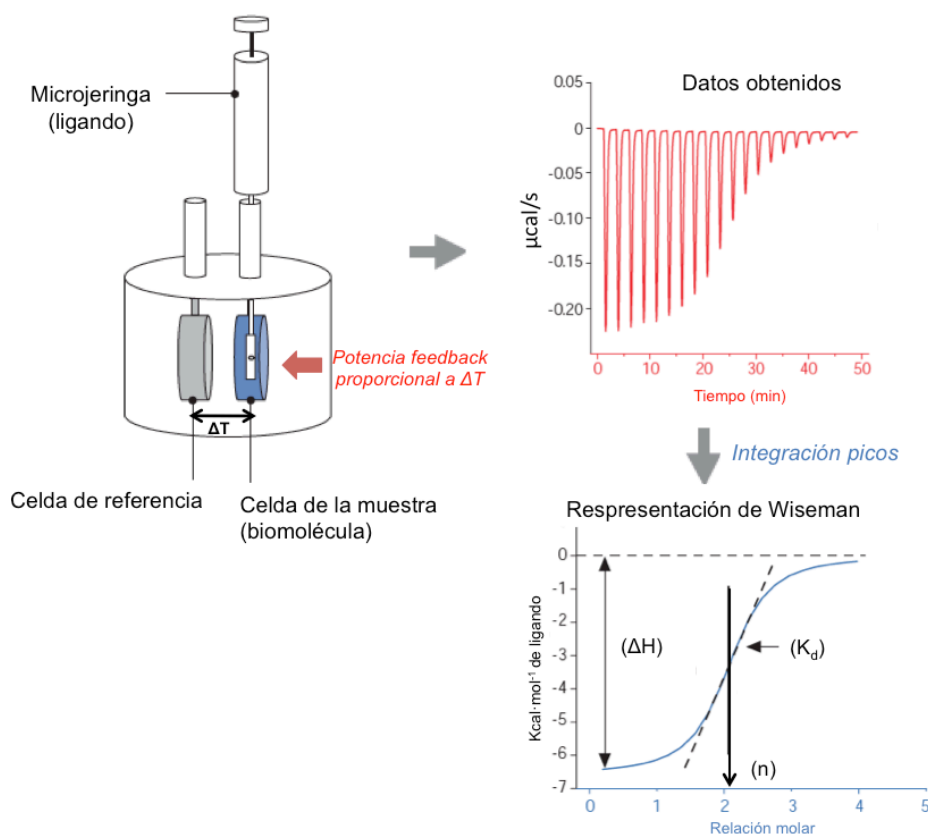
En los ácidos nucleicos, las nucleobases son el componente cromóforo de la molécula, no obstante, debido a su plano de simetría no son ópticamente activas por ellas mismas. Lo que da lugar a espectros de DC de gran intensidad en oligonucleótidos es la quiralidad de la (desoxi)ribosa y, sobre todo, su estructura secundaria tan bien definida, por ejemplo helicoidal, que se encuentra estabilizada por el apilamiento de las nucleobases y por sus apareamientos mediante enlaces de hidrógeno.<sup>[20]</sup> Como el espectro de DC depende de las interacciones entre las bases del oligonucleótido, se trata de una técnica muy sensible a los cambios estructurales y, por esto, ha sido empleada desde hace más de cuarenta años para caracterizar las conformaciones de los ácidos nucleicos en solución.<sup>[21,22]</sup> Además, esta técnica puede ser extremadamente útil para evaluar la interacción entre pequeñas moléculas y estructuras de ácidos nucleicos, pues cualquier cambio estructural producido en el oligonucleótido debido a su interacción con un ligando puede producir un cambio en su elipticidad.<sup>[17,23]</sup> Se trata de una técnica muy útil debido a su alta sensibilidad, sencillez y reproducibilidad, y porque se requiere poca cantidad de muestra y no es destructiva.

También se puede hacer un seguimiento de la variación de elipticidad de un oligonucleótido estructurado con la temperatura y, por lo tanto, determinar la  $T_m$  en ausencia y presencia de un ligando. Al aumentar la temperatura del sistema, el oligonucleótido pasa de una estructura secundaria definida con una elipticidad considerable, a un estado desestructurado. Esto conlleva una reducción casi total de la elipticidad del sistema (Figura 2.1.B). Todas las consideraciones hechas en el apartado anterior sobre el análisis de datos y determinación de la  $T_m$  son extensivas al DC.

### 1.2.3. Calorimetría de valoración isotérmica (ITC)

Comparada con la mayoría de técnicas experimentales empleadas en los estudios biofísicos, la calorimetría es una de las más antiguas. De hecho, Lavoisier y Laplace crearon el primer calorímetro a finales del siglo XVIII para medir el calor producido por una cobaya.<sup>[24]</sup> Desde entonces se han desarrollado muchos tipos de calorímetro, aunque los calorímetros que hoy en día se conocen no surgieron hasta los 90, cuando salieron al mercado calorímetros de alta sensibilidad preparados para realizar estudios a nivel molecular. Actualmente, la sensibilidad de los calorímetros comerciales es muy superior a la de los iniciales, pudiéndose llegar a detectar calores del orden de 0.05  $\mu\text{J}$  o inferiores y, además, se ha reducido drásticamente la cantidad de muestra necesaria para llevar a cabo los ensayos. En nuestros días, esta técnica se usa en muchos sectores de investigación<sup>[25]</sup> tales como estudios biofísicos de biomoléculas,<sup>[26,27]</sup> en el desarrollo de productos biotecnológicos y, obviamente, para el estudio de interacciones de pequeñas moléculas de interés terapéutico con proteínas o ácidos nucleicos.<sup>[27,28]</sup>

Dentro de las diferentes técnicas calorimétricas, la ITC es la aproximación más utilizada para estudiar interacciones intermoleculares entre ligandos y biomoléculas. Es una técnica muy completa ya que permite obtener la constante de asociación de la interacción, sus parámetros termodinámicos ( $\Delta H$ ,  $\Delta S$ ,  $\Delta G$ ) y la estequiometría de la unión. A diferencia de otras técnicas, en las que se mide la variación de una propiedad característica de una de las moléculas implicadas, la ITC tiene la gran ventaja que permite cuantificar el calor asociado a la interacción, es decir, la entalpía de la unión. Es la única técnica que, sin necesidad de introducir marcas o modificaciones químicas, en un solo experimento proporciona una completa caracterización de la interacción intermolecular a nivel termodinámico y estequiométrico.



**Fig 2.3.** Esquema general de un calorímetro y datos obtenidos. A partir de la potencia *feedback* que debe proporcionar el instrumento a la celda de la muestra después de cada inyección para eliminar el incremento de T generado por la interacción se construye el gráfico de datos. La integración de cada pico y su representación vs la relación molar entre ligando y biomolécula da lugar al gráfico de Wiseman del que se deducen los parámetros de la entalpía ( $\Delta H$ ), la constante de disociación ( $K_d$ ) y la estequiometría del complejo ( $n$ ).

Típicamente, en los calorímetros actuales, la celda de referencia así como la de la muestra se encuentran dentro de un recinto adiabático, ambas con volúmenes cuidadosamente conocidos (Figura 2.3). A lo largo de todo el experimento, la temperatura de las dos celdas está controlada y se mantiene constante mediante un *feedback* electrónico que controla un sistema termoelectrónico (*thermoelectric heater*). El experimento se realiza inyectando a intervalos de tiempo predeterminados con una microjeringa controlada informáticamente, un pequeño, pero bien medido volumen de la solución del ligando (o diana, según el diseño del experimento) a la celda de la muestra que contiene la solución de la diana (o ligando). La interacción entre los dos compuestos genera un incremento de temperatura entre la celda de la muestra y la de la referencia. En el caso que sea una interacción exotérmica, aumentará la temperatura de la celda de la muestra mientras que si es endotérmica, disminuirá. Al producirse este cambio, el instrumento responde recuperando la temperatura inicial en la celda de la muestra, ya sea aportando una mayor potencia, o bien, disminuyéndola. La potencia aplicada o dejada de aplicar en cada una de las inyecciones se relaciona con el calor ( $q$ ) de la interacción (aunque también refleja el calor de dilución) y la representación de  $q$  en función del tiempo ( $t$ ) aporta el termograma del experimento (Figura 2.3). La integración de cada pico se corresponde con el valor absoluto de  $q$ , que representado en función de la relación molar entre ambas especies proporciona una curva de tipo sigmoidea de la cual, mediante modelos matemáticos preestablecidos, se determinan los parámetros

termodinámicos de la interacción: variación de entalpía ( $\Delta H$ ), constante de afinidad ( $K_a$ ) y estequiometría de unión ( $n$ ) (Figura 2.3). Los parámetros restantes, como la energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ), la entropía ( $\Delta S$ ) y la constante de disociación  $K_d$ , se calculan a partir de los primeros empleando las siguientes relaciones:<sup>[29,30]</sup>

$$\Delta G = -RT \ln K_a = \Delta H - T\Delta S \quad (2.3)$$

$$\Delta S = \frac{\Delta H - \Delta G}{T} \quad (2.4)$$

$$K_d = \frac{1}{K_a} \quad (2.5)$$

Los modelos matemáticos que incorpora el *software* del instrumento, se han diseñado en función de los diferentes tipos de unión que pueden darse (independiente, cooperativo,...), así pues, es conveniente un conocimiento previo del sistema con el que se trabaja.

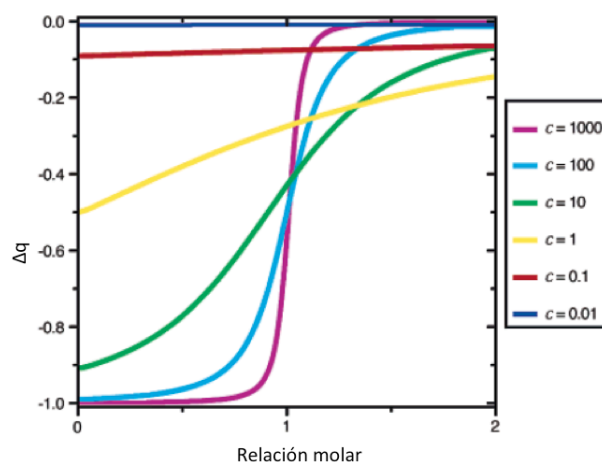
*Diseño de los experimentos de ITC.* Es importante elegir bien las condiciones en las que realizar los experimentos, procurando que el calor de cada inyección sea lo suficientemente grande como para ser cuantificado y, a su vez, que corresponda únicamente al fenómeno de la unión biomolécula-ligando. Para el primer objetivo, se emplea el parámetro  $c$  o de Wiseman que determina la forma o sigmoicidad de la isoterma y se describe como:

$$c = K_a [M]n \quad (2.6)$$

donde  $K_a$  es la constante de afinidad,  $[M]$  es la concentración molar de la diana en la celda al inicio del experimento y  $n$  es la estequiometría de unión.

Valores altos de  $c$  ( $> 1000$ ), debidos normalmente a una  $K_a$  elevada, conducirán a una isoterma con una pendiente demasiado grande para poder ser ajustada correctamente. Contrariamente, valores demasiado pequeños ( $< 10$ ) están relacionados con isotermas muy planas que son difíciles de ajustar a un modelo matemático y, sobre todo, de las que cuesta definir correctamente el punto de inflexión ( $n$ ). Para un correcto ajuste, con una consecuente correcta determinación de los parámetros termodinámicos, es imprescindible trabajar con valores de  $c$  entre 1 y 1000 unidades, aunque lo óptimo es entre 10 y 500 (Figura 2.4).<sup>[31]</sup> Una vez determinada la concentración a emplear de biomolécula, la concentración de ligando suele ser, como mínimo, entre 10 y 20 veces superior a ésta, siempre y cuando su solubilidad lo permita.<sup>[32]</sup>

Por otro lado, deben fijarse previamente los parámetros del experimento: número de inyecciones, su volumen y tiempo entre ellas. La cantidad de calor asociada a cada inyección se modula cambiando el volumen de la solución de ligando que se añade a la celda de la muestra. Por ejemplo, para ligandos con gran afinidad deben usarse volúmenes pequeños para no saturar la diana al inicio del experimento y para obtener una buena sigmoide. El valor se escogerá con el objetivo de obtener el máximo número posible de puntos cerca de la inflexión de la curva, para así, obtener ajustes más fiables.<sup>[33]</sup>



**Fig. 2.4.** Perfiles de las curvas de valoración por ITC dependiendo del parámetro de Wiseman ( $c$ ). Figura tomada de A.H. Daranas y cols.<sup>[31]</sup>

Finalmente, y con el objetivo de cuantificar exclusivamente el calor de la interacción, deben realizarse experimentos “blanco” donde se inyecte, en las mismas condiciones que en las propias valoraciones, la solución de ligando sobre la solución tampón en la celda de la muestra. El calor obtenido, correspondiente mayoritariamente al calor de dilución del ligando, deberá restarse de los valores obtenidos en los experimentos llevados a cabo con la diana y el ligando (*ver Materiales y Métodos*).

#### 1.2.4. Resonancia magnética nuclear

Hoy en día, la resonancia magnética nuclear (RMN) presenta un elevado potencial en el descubrimiento de nuevos fármacos debido a que permite un estudio muy detallado de las estructuras moleculares, tanto de biomoléculas como de sus complejos con ligandos. Mediante esta técnica, sin necesidad de modificaciones químicas, se puede obtener información a nivel atómico de las interacciones intermoleculares en solución entre ligandos y dianas.<sup>[34]</sup> La RMN puede emplearse en cualquier etapa del descubrimiento de un fármaco, pues permite la identificación de los ligandos más potentes a través de un cribado; puede ofrecer una detallada descripción del sitio de unión de las biomoléculas y, finalmente, aportar información a nivel atómico de la unión entre ambos. Aunque inicialmente el gran tamaño de las biomoléculas suponía una limitación en esta técnica, actualmente, gracias a las mejoras tecnológicas derivadas del uso de imanes superconductores de alto campo (800 MHz para  $^1\text{H}$ ), la introducción de la espectroscopía multidimensional o el marcaje isotópico, la determinación de estructuras de fragmentos de DNA o RNA de gran tamaño, así como el estudio de su interacción con pequeñas moléculas, se ha convertido en una metodología habitual en muchos laboratorios especializados.

El *desplazamiento químico* ( $\delta$ ) es un sencillo parámetro asociado a cada átomo de una molécula en un determinado entorno químico. El  $\delta$  es extremadamente sensible a su entorno y, por ello, las interacciones que pueda establecer una biomolécula con un ligando o pequeña molécula lo modificarán. De la perturbación que se provoque en el entorno de ciertos átomos se podrá obtener información de dónde tiene lugar la interacción y de qué átomos toman



parte en ella.<sup>[35]</sup> También puede emplearse para obtener valores de afinidad, tanto en el estudio de complejos ligando-proteína,<sup>[36–38]</sup> como en el campo de los ácidos nucleicos.<sup>[39]</sup>

En los siguientes apartados se realizará una breve introducción de las técnicas de RMN empleadas en esta tesis doctoral.

*RMN de  $^1\text{H}$ .* Al realizar espectros del oligonucleótido en presencia de un ligando, el entorno químico de muchos átomos cercanos al sitio de unión se verá modificado y, en consecuencia, el desplazamiento de sus protones también. Un análisis detallado de los espectros, tanto monodimensionales como bidimensionales, permite obtener información de todos los átomos implicados en la interacción.

En RMN- $^1\text{H}$  de un oligonucleótido se puede diferenciar dos tipos de protones, los no intercambiables, enlazados a un átomo de carbono (del azúcar o aromático), y los que sí intercambian, correspondientes a los protones amino, hidroxílicos e imino. Concretamente, son los protones imínicos los más relevantes para estos estudios, ya que se encuentran directamente relacionados con el apareamiento de las bases. Para poder observar los protones intercambiables, debido a que en  $\text{H}_2\text{O}$  están sometidos a un intercambio demasiado rápido, es necesario registrar los espectros en  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  9:1, a baja temperatura y emplear un gradiente de pulsos que permita eliminar la señal del agua.

*RMN de  $^{19}\text{F}$ .*<sup>[40]</sup> El estudio por RMN de un complejo ligando-diana detectando átomos de  $^{19}\text{F}$  tiene algunas ventajas frente la RMN de  $^1\text{H}$ . El átomo de  $^{19}\text{F}$  presenta una constante giromagnética solo un poco inferior al  $^1\text{H}$ , pero su abundancia natural es muy superior (100%). Se trata de un núcleo muy sensible que puede ser fácilmente observado con un aparato de RMN con la sonda apropiada y que ofrece una dispersión de desplazamiento químico aproximadamente 100 veces mayor que el  $^1\text{H}$ . Esto es debido a que un núcleo de flúor está rodeado, de media, por nueve electrones, mientras que el átomo de  $^1\text{H}$  solo lo está por uno. En consecuencia, el rango de  $\delta$  y la sensibilidad del flúor frente a cambios en su entorno químico son superiores a los del  $^1\text{H}$ .

La información que se puede obtener con RMN de  $^{19}\text{F}$  no es tan detallada como la que ofrece el estudio mediante RMN- $^1\text{H}$ . No obstante, se pueden determinar constantes de afinidad<sup>[41]</sup> o, simplemente, estudiar equilibrios conformacionales de estructuras de DNA o RNA<sup>[42]</sup> así como modos de unión de PNAs a DNA y RNA.<sup>[43]</sup>

El átomo de  $^{19}\text{F}$  puede ser introducido en el ligando o bien en la biomolécula. Se pueden encontrar ligandos con átomos de flúor en un gran número de familias de fármacos, ya que la sustitución de protones por flúor es una estrategia común para potenciar las propiedades farmacocinéticas de los candidatos a fármaco.<sup>[44]</sup> El uso de estos ligandos marcados en experimentos de competitividad ha dado lugar al método FAXS (*Fluorine Chemical shift anisotropy and exchange for screening*) que permite seleccionar los mejores ligandos frente a una diana.<sup>[45]</sup> Por otro lado, se han descrito y comercializado algunos aminoácidos que incorporan átomos de F permitiendo la aplicación de esta técnica en ligandos de tipo peptídico.<sup>[46]</sup> En cuanto al marcaje de los oligonucleótidos, se pueden introducir átomos de F en las nucleobases,<sup>[47]</sup> aunque la modificación puede llegar a tener consecuencias en la estructura o en las interacciones con otras moléculas. Otra opción es el marcaje en el anillo del azúcar, normalmente en la posición 2', metodología muy empleada debido al menor impacto que causa en las interacciones intra- y intermoleculares.<sup>[48,49]</sup>

### 1.2.5. Espectrometría de masas

Recientemente, la espectrometría de masas con ionización por electro spray (EM-ESI), que proporcionó el Premio Nobel de Química en 2002 a J.B. Fenn,<sup>[50,51]</sup> se ha convertido en una efectiva técnica para caracterizar las interacciones no covalentes ligando-diana. De hecho, la espectrometría de masas, gracias a los avances en sensibilidad y resolución de sus instrumentos, es una de las técnicas esenciales para el descubrimientos de nuevos fármacos, tanto para su identificación como para la determinación de su pureza, su toxicología y su farmacocinética.<sup>[52]</sup>

Mediante la EM-ESI de complejos no covalentes, descrita por primera vez por Ganem en 1991,<sup>[53]</sup> se pueden determinar la concentración de cada especie presente, la constante de disociación o asociación del complejo,<sup>[54]</sup> la estequiometría de la unión, la selectividad de un ligando frente a diferentes dianas e, incluso, se pueden llevar a cabo ensayos cinéticos.<sup>[55]</sup> No obstante, como describió Ganem, deben tenerse en cuenta ciertos parámetros para conseguir que los complejos formados en solución se mantengan en fase gas. Entre ellos está el pH, el tampón empleado y sus aditivos, los potenciales del cono de ionización, la temperatura y los flujos usados.

Actualmente, solo unos veinte años después de la publicación de Ganem, ya existen más de trescientas publicaciones en las que se detectan y se caracterizan complejos no covalentes con todo tipo de biomoléculas.<sup>[56-58]</sup> Respecto a otras técnicas biofísicas, el uso de EM-ESI requiere poca cantidad de muestra gracias a su alta sensibilidad y no se necesita un marcaje químico en ninguno de los compuestos a estudiar. Se trata de una técnica sencilla de emplear, rápida y automatizable. El mayor inconveniente que presenta es que los complejos de ligandos con afinidades bajas ( $K_d > 100 \mu\text{M}$ ) son difíciles de detectar.

Dentro de la espectrometría de masas se han empleado diferentes técnicas para obtener la información necesaria en cada investigación.<sup>[59]</sup> Entre ellas están las técnicas de *screening* como MASS (*Multitarget affinity/specificity screening*),<sup>[60-62]</sup> la SAR por EM (*structure-activity relationship by mass spectrometry*)<sup>[63]</sup> o la DOLCE-MS (*Detection of oligonucleotide-ligand complexes by ESI-MS*).<sup>[64]</sup> Por otro lado, se han optimizado técnicas para cuantificar la constante del equilibrio de complejación,<sup>[65,66]</sup> o bien la estequiometría de unión.<sup>[67,68]</sup>

En el caso de la determinación de la estequiometría de unión entre RNA y un ligando, la mayor limitación es la baja tolerancia que presenta la técnica a la concentración de sales, sobre todo de iones metálicos como  $\text{Na}^+$  o  $\text{K}^+$ . Por este motivo, en vez de soluciones con NaCl o KCl, normalmente se emplean soluciones de acetato amónico que parecen estabilizar igual los dúplexes.<sup>[69]</sup> Mediante esta técnica, y de manera sencilla, se puede determinar la estequiometría de unión de un ligando a una estructura de RNA y, aunque los complejos formados sean muy minoritarios en la mezcla global, serán detectados y plasmados en el espectro de EM-ESI.

## 2. Esquema del capítulo

Para facilitar la lectura, se ha dividido en tres bloques la evaluación mediante técnicas biofísicas de los diferentes ligandos sintetizados:

- Evaluación de los ligandos que contienen la base Janus  $J_T$  dirigida al par no canónico U·U asociado con la DM1.
- Evaluación de los ligandos que contienen la base Janus  $J_D$  (o, como se verá,  $J_T$ ) dirigida al par no canónico C·U asociado con la DM2.
- Evaluación de los ligandos que contienen la base  $J_W$  dirigida al par G·C, tanto de los que contienen únicamente  $J_W$  como de aquellos en que  $J_W$  se combina con  $J_T$  y  $J_D$ .

Antes de llevar a cabo la evaluación de los ligandos, fue necesario diseñar unas dianas de RNA adecuadas y determinar unas condiciones experimentales útiles para los estudios biofísicos. En cada apartado del capítulo se hará referencia a ambos aspectos.

Por último, al final del capítulo se describe la evaluación de la selectividad de los ligandos por sus dianas frente a otras estructuras de RNA.

### 3. Evaluación de ligandos que contienen la base Janus $J_T$ dirigidos al par no canónico U·U asociado a la DM1

Los ligandos que se evalúan en este apartado son los que solo contienen la Janus  $J_T$ , es decir, los ligandos  $J_TK$  y  $J_TG_nJ_TK$  ( $n=3-5$ ) que, en principio, debería reconocer los *mismatches* U·U.

En primer lugar, para la evaluación de los ligandos sintetizados es necesario disponer de un modelo de RNA válido para realizar los ensayos de interacción. La diana que se necesitaba para la evaluación de los ligandos sintetizados con  $J_T$  debía contener, como mínimo, un par no canónico U·U, como la empleada por Zimmerman y cols. para evaluar su triazina derivatizada.<sup>[70]</sup> Sin embargo, se pensó en un modelo más semejante a CUG<sup>exp</sup> que contuviera al menos dos pares U·U.

#### 3.1. Diana G(CUG)<sub>4</sub>C

El primer modelo que se diseñó y se sintetizó para los estudios de interacción fue una cadena 14-mer de RNA que contenía cuatro motivos CUG con una G y una C adicionales en sus extremos 5' y 3', respectivamente. Se esperaba que la cadena de RNA se estructurara como un dúplex estabilizado por los pares C-G dando lugar a cuatro pares no canónicos U·U (Figura 2.5). La síntesis se llevó a cabo siguiendo la metodología estándar de síntesis de oligonucleótidos en fase sólida mediante un sintetizador automático. Se obtuvieron unos rendimientos de entre el 9 y el 14% (ver *P.Exp. Capítulo 2*).<sup>[71]</sup>



**Fig. 2.5.** Estructura esperada del dúplex formado por dos cadenas del 14-mer G(CUG)<sub>4</sub>C sintetizado.

La elección de un tampón adecuado es un punto importante, aunque a veces no muy valorado, debido al importante papel que puede tener en muchos de los ensayos biofísicos. Por un lado, es esencial que el tampón no absorba en el UV si va a emplearse esta espectrofotometría y, por otro lado, el pK<sub>a</sub> de la sal escogida debe estar próximo al pH al que se desea trabajar. También es importante que el pK<sub>a</sub> del tampón no sea dependiente de la temperatura, o al menos, lo mínimo posible, ya que de lo contrario el pH de la solución cambiaría al variar la temperatura del sistema. Teniendo en cuenta los posibles fines terapéutico de los ligandos, en esta tesis doctoral se decidió trabajar, en general, a pH 7.0. Teniendo en cuenta estas premisas, se eligió inicialmente el cacodilato sódico como tampón (10 mM) puesto que presenta un pK<sub>a</sub> de 6.14 a t= 25°C, es uno de los tampones que menos dependencia muestra de la temperatura y también permite trabajar a pHs ligeramente ácidos.<sup>[15]</sup>

Para estabilizar la estructura del RNA, y como es habitual, se decidió adicionar al tampón NaCl (100 mM) y Na<sub>2</sub>EDTA (0.1 mM) para evitar la presencia de iones divalentes.

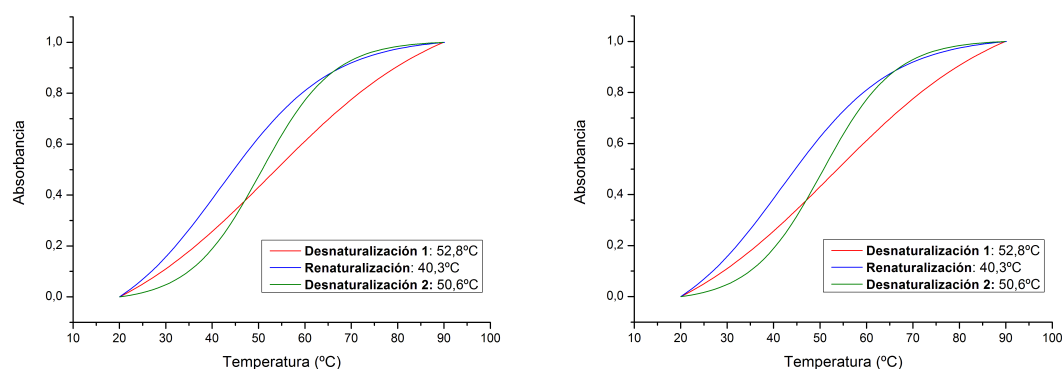
### 3.1.1. Desnaturalización térmica controlada por UV

En primer lugar se estudió la estabilidad térmica de la diana sola y se determinó su T<sub>m</sub>. Para ello se registraron curvas de fusión del RNA a una concentración 2 μM desde 20°C hasta 90°C con un gradiente de temperatura de 0.5 °C/min. Se realizaron experimentos tanto de *melting* (desnaturalización) como de *annealing* (renaturalización) y se observó que para obtener curvas reproducibles era imprescindible ser muy cuidadoso con el pretratamiento de estructuración de la muestra y con los tiempos de espera entre curvas. Trabajando metódicamente, se obtuvo una T<sub>m</sub> promedio del RNA G(CUG)<sub>4</sub>C a pH 7 de **51.1 ± 0.8°C**.

El valor de T<sub>m</sub> que se determinó es relativamente bajo, pero teniendo en cuenta que la estructura presenta cuatro pares no canónicos, no es de extrañar que no sea un dúplex muy estable. Otro hecho a destacar es que la forma de las curvas no estaba muy bien definida, pues el salto hipercrómico presentaba una pendiente bastante baja y los platos superior e inferior no se diferenciaban claramente.

Se prosiguió, no obstante, con los ensayos de desnaturalización térmica en presencia de algunos de los ligandos con el fin de evaluar si estabilizaban o, de lo contrario, desestabilizaban este modelo de RNA. Se realizaron curvas de fusión (*melting/annealing*) con distinto número de equivalentes del compuesto **12**, que contiene la base J<sub>T</sub> pero no el esqueleto de PNA, también con el ligando más sencillo de tipo PNA **J<sub>T</sub>K** y con el ligando dimérico **J<sub>T</sub>G<sub>4</sub>J<sub>T</sub>K**. Se tuvo especial precaución en el tratamiento de la muestra y en los tiempos de espera entre

experimentos para intentar obtener valores reproducibles. Aún así, no se observó ningún tipo de reproducibilidad en las curvas (Figura 2.6) y, en consecuencia, tampoco en los valores de  $T_m$  determinados. Como ya había sucedido en el estudio de estabilidad térmica del RNA solo, las curvas obtenidas no presentaban, por lo general, una forma sigmoidea bien definida y, además, había una dispersión importante entre todos los puntos de absorbancia obtenidos. Todo ello dificultó el tratamiento de datos y provocó que las desviaciones estándar de un mismo experimento fueran muy altas.



**Fig. 2.6.** Superposición de las curvas de fusión registradas con el RNA 14-mer G(CUG)<sub>4</sub>C en presencia de 4 eq del compuesto **12** (izquierda) y de 1 eq de J<sub>7</sub>G<sub>4</sub>J<sub>7</sub>K (derecha). Condiciones: tampón 10 mM de cacodilato sódico, 100 mM NaCl, 0.1 mM Na<sub>2</sub>EDTA a pH 7.0,  $c_{\text{oligo}} = 2 \mu\text{M}$ . Medidas de absorción UV-Vis a 260 nm.

Vistos estos resultados, se pensó que la cadena G(CUG)<sub>4</sub>C podría no estar totalmente estructurada como dúplex dando lugar a una mezcla de diferentes conformaciones (dúplex y *hairpin*) en solución. De hecho, algunos autores describen que las estructuras de tipo (CUG)<sub>n</sub> donde  $n > 10$  se estructuran en solución como *hairpin* mientras que si  $n < 10$  existe una mezcla del *stem-loop* y del dúplex.<sup>[72,73]</sup> Sin embargo, Sheardy y cols. afirman que para  $n \geq 4$ , la única estructura es la de *hairpin*.<sup>[74]</sup>

Para aclarar qué estaba sucediendo, se registraron curvas de fusión de G(CUG)<sub>4</sub>C a distintas concentraciones. En principio, a bajas concentraciones debería verse favorecida la estructura *hairpin* mientras que, a concentraciones altas debería aumentar la proporción de dúplex (Tabla 2.1). Vale la pena destacar que en todas las curvas registradas se experimentó la misma problemática que en los anteriores ensayos.

	Concentración G(CUG) <sub>4</sub> C			
	1 $\mu\text{M}$	2 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	50 $\mu\text{M}$
$T_m$ (°C)	47.3 ± 0.8	51.1 ± 0.8	49.4 ± 1.7	45.4 ± 1.8

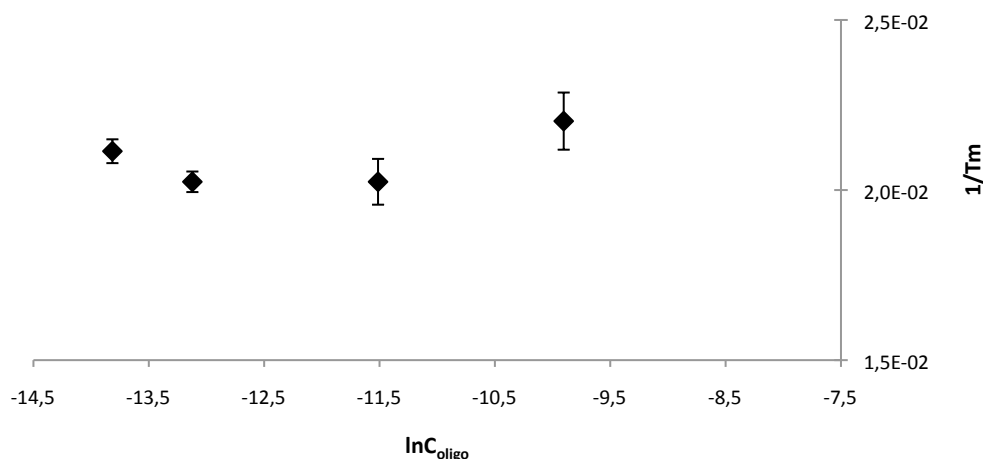
**Tabla 2.1.**  $T_m$  determinadas por desnaturalización térmica controlada por UV a diferentes concentraciones de oligonucleótido G(CUG)<sub>4</sub>C. Los valores presentados son la media de un mínimo de dos determinaciones. Condiciones: tampón 10 mM cacodilato sódico, 100 mM NaCl y 0.1 mM de EDTA a pH 7.0.

Al representar  $1/T_m$  vs el ln de la concentración total de oligonucleótido ( $\ln c_{\text{oligo}}$ ), se debería obtener una recta descrita por la ecuación (2.7). Si la molecularidad del sistema ( $n$ ) fuera 1, es decir que el oligonucleótido se estructurara como *hairpin*, se debería obtener una recta paralela al eje de abscisas; mientras que si formase un dúplex y, por lo tanto,  $n$  fuera 2, la recta

debería presentar una pendiente distinta de cero (Figura 2.7).<sup>[14]</sup>

$$\frac{1}{T_m} = \frac{(n-1)R}{\Delta H^\circ} \ln C_{oligo} + b \quad (2.7)$$

donde  $n$  es la molecularidad del sistema,  $\Delta H$  es la entalpía relacionada con el proceso de fusión,  $R$  es la constante universal de los gases ideales,  $C_{oligo}$  es la concentración total de oligonucleótido y  $b$  es el término independiente de la recta.



**Fig. 2.7.** Dependencia de la  $T_m$  de  $G(CUG)_4C$  con la concentración de oligonucleótido. Se representa el error asociado a cada valor.

Como se observa en la Figura 2.7, existe una dependencia de la  $T_m$  con la concentración de oligonucleótido, sin embargo, no hay ninguna correlación lineal entre los puntos.

De estos resultados se puede deducir que deben coexistir diferentes estructuras en solución. En consecuencia, los valores determinados de  $T_m$  del RNA son un promedio de la fusión de las diferentes estructuras presentes en la solución y, en presencia de ligando, un promedio de las estabilizaciones o desestabilizaciones producidas en cada una de las estructuras a las que se haya unido el ligando. Así pues,  $G(CUG)_4C$  no es un buen modelo para el estudio de los ligandos sintetizados ya que no presenta una única estructura en solución.

### 3.1.2. Dicroísmo Circular

Paralelamente a los estudios de desnaturalización térmica con la diana  $G(CUG)_4C$  se registraron espectros de DC para comprobar si la conformación global del RNA diana se veía afectada significativamente por la unión de los ligandos. Para ello, en las mismas condiciones tamponadas que los experimentos de fusión controlada por UV, se registró el espectro de DC de la diana  $G(CUG)_4C$  y, posteriormente, en presencia de 4 eq del compuesto **12** y del ligando **J7K**.

No se observó una variación importante en el perfil de elipticidad de la diana al añadirse el ligando, pues tan solo se produjo una pequeña disminución de intensidad en el máximo de absorción a 270 nm, aproximadamente.

El cambio observado no puede considerarse significativo, por un lado, ya que se trata de una

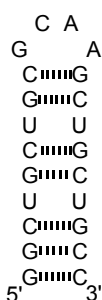
variación muy pequeña de elipticidad y, por otro lado, su interpretación es más que problemática debido a la mezcla de conformaciones que presenta la diana de RNA (ver *P. Exp. Capítulo 2*).

### 3.2. Diana hCUG

En vista que el RNA G(CUG)<sub>4</sub>C no era un buen modelo para el estudio de los ligandos sintetizados, se decidió diseñar un nuevo modelo que permitiera realizar un estudio exhaustivo y fiable de su interacción con los diferentes ligandos.

Para el diseño de la nueva diana se estableció el objetivo de obtener un RNA fuertemente estructurado y libre de equilibrios conformacionales. Por otro lado, parecía imprescindible que el modelo contuviera algunas repeticiones del triplete CUG y no sólo pares no canónicos U·U.

Con estos objetivos en mente, se decidió introducir en la nueva diana dos repeticiones CUG en cada lado del dúplex para permitir el estudio tanto de los ligandos con una sola base Janus, como de los diméricos. Para estabilizar estas repeticiones, se decidió alargar la estructura con dos pares C-G en ambos extremos, que ya están contenidos en la misma diana CUG<sup>exp</sup>. Finalmente, para conseguir un modelo estructuralmente bien definido, se creyó oportuno formar una estructura de tipo *hairpin* añadiendo un *loop* ultraestable y, además, introducir un par C-G adicional en el extremo del tallo (Figura 2.8). Los *loops* más comunes<sup>[75]</sup> y más estables son los conocidos 5'-GNRA-3'<sup>[76]</sup> o los 5'-UNCG-3' (donde N es cualquier nucleótido, R es una de las dos bases púricas, es decir G o A, y Y es una de las dos bases pirimidínicas, es decir C o U).<sup>[77,78]</sup> No obstante, también se conocen otros *loops* capaces de dar lugar a *hairpins* con secuencias cortas de RNA<sup>[79]</sup> como los tetra-loops CUYG,<sup>[75]</sup> GANC,<sup>[80]</sup> AGNN<sup>[81]</sup> o los tri-loops UNR<sup>[82]</sup>. Se escogió el tetra*loop* ultraestable 5'-GCAA-3' para la nueva diana puesto que ya había sido empleado por Gareiss en un modelo de RNA con repeticiones del triplete CUG para el estudio de sus ligandos.<sup>[83]</sup> La diana de RNA resultante, que denominamos hCUG, se sintetizó siguiendo la metodología estándar de síntesis de oligonucleótidos en fase sólida mediante un sintetizador automático (ver *Materiales y Métodos*).<sup>[71]</sup> Se obtuvieron unos rendimientos entre el 11 y el 26%.



**Fig. 2.8.** Estructura tallo-lazo de la diana hCUG que contiene un *loop* ultraestable GCAA y un tallo con dos repeticiones del triplete CUG relacionado con la DM1.

#### 3.2.1. Ensayos en condiciones de fuerza iónica alta

Inicialmente, se emplearon las condiciones ya establecidas en los ensayos biofísicos con la anterior diana G(CUG)<sub>4</sub>C: un tampón 10 mM de cacodilato sódico con 100 mM de NaCl y 0.1 mM de Na<sub>2</sub>EDTA. En este caso, con el objetivo de estudiar la dependencia de la interacción con el pH, se prepararon tampones a pH 5.5 y 7.0.

### 3.2.1.1. Desnaturalización térmica controlada por UV

Los ensayos de desnaturalización térmica controlada por UV se realizaron a una concentración de hCUG de 2  $\mu$ M en ausencia y presencia de diferentes equivalentes de los ligandos. Puesto que el  $pK_a$  de la base  $J_T$  se encuentra muy cercano a la neutralidad, se creyó interesante ver la influencia del pH sobre la interacción, por lo que se llevaron a cabo experimentos a pH 5.5 y 7.0. Se registraron curvas tanto de desnaturalización (de 20°C a 90°C) como de renaturalización (de 90°C a 20°C) con un gradiente de temperatura de 0.5°C/min.

En primer lugar, se determinaron las temperaturas de fusión de la diana (Tabla 2.2.) a los dos pHs. Ahora sí, las curvas obtenidas eran reproducibles y la dispersión entre puntos era muy pequeña. El perfil sigmoidal de las fusiones estaba muy bien definido y presentaba una pendiente bastante pronunciada. En ningún caso se observó dependencia de las curvas con el tratamiento de la muestra, lo que indicaba que hCUG se estructuraba fácilmente y que podría ser un buen modelo para el estudio de los ligandos sintetizados. Se realizaron cuatro curvas y se tomó el valor promedio como  $T_m$  de hCUG.

hCUG	pH 5.50	pH 7.00
$T_m$ (°C)	70.2 $\pm$ 0.6 °C	69.8 $\pm$ 1.2 °C

**Tabla 2.2.**  $T_m$  determinadas por desnaturalización térmica controlada por UV de la diana hCUG. Los valores presentados son la media de un mínimo de tres determinaciones. Condiciones: tampón 10 mM cacodilato sódico, 100 mM NaCl y 0.1 mM de EDTA al pH especificado.

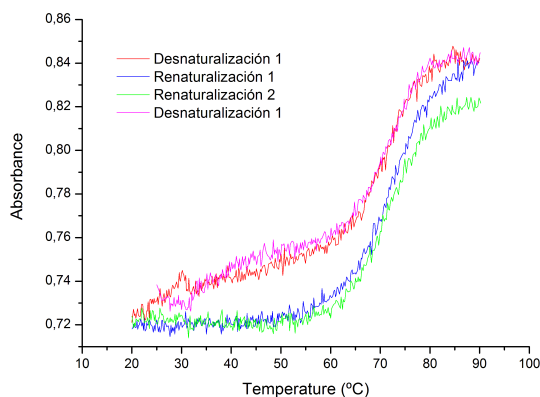
Los valores de  $T_m$  de la nueva diana son, aproximadamente, 20°C superiores a los de la diana  $G(CUG)_4C$  en las mismas condiciones, lo cual pone en evidencia que la diana hCUG presenta una estructura mucho más estable que la anterior. Como se puede observar en la tabla 2.2, la diferencia entre los valores de  $T_m$  a los dos pHs estudiados es tan pequeña que entra dentro del error experimental, así que puede considerarse que la estabilidad de hCUG es independiente del pH.

Se empezaron los estudios de desnaturalización térmica de hCUG en presencia de ligandos con el compuesto **12** y con los ligandos de tipo PNA  $J_TK$  y  $J_TG_4J_TK$ . Se emplearon distintos equivalentes de cada uno de ellos y se realizó cada ensayo por triplicado. Al comparar las curvas de *melting* con las de *annealing*, se observó que no eran superponibles para ninguno de los ligandos analizados. De hecho, las curvas de desnaturalización presentaban dos saltos mientras que, las de renaturalización, presentaban un perfil sigmoidal estándar (Figura 2.9).

El fenómeno observado en estos ensayos, por el que las curvas de desnaturalización y renaturalización no son superponibles, es conocido como *histéresis*.<sup>[84]</sup> Este fenómeno tiene lugar cuando el sistema no es capaz de alcanzar el equilibrio a medida que la temperatura aumenta o disminuye, es decir, que el complejo no se encuentra en equilibrio durante el experimento. Dado que normalmente los procesos de *melting/annealing* son más rápidos que el gradiente de temperatura, este fenómeno no suele observarse.<sup>[15]</sup> En algunos casos, como por ejemplo en la formación de tríplexes, es posible observar curvas de fusión con histéresis puesto que se trata de equilibrios bastante lentos.<sup>[85]</sup> De hecho, la formación de un tríplex puede llegar a ser entre 100 y 1000 veces más lenta que la de un dúplex.<sup>[86–88]</sup> Además, según algunos estudios, los PNAs, que también pueden formar estructuras tipo tríplex, se

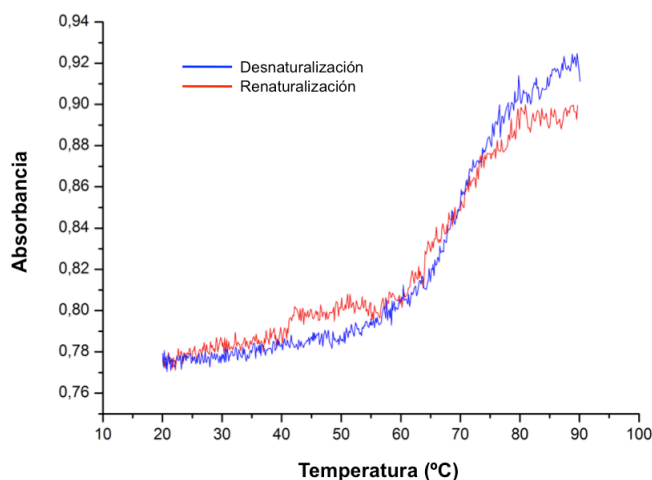


caracterizan por complejarse muy lentamente,<sup>[89-92]</sup> sobre todo en condiciones fisiológicas.<sup>[93,94]</sup> El mayor inconveniente es que cuando se produce histéresis entre las curvas de desnaturalización y renaturalización no se puede determinar la  $T_m$ , a pesar de que algunos autores tratan de encontrar alguna relación entre las curvas y la  $K_a$  del equilibrio.<sup>[90]</sup>



**Fig. 2.9.** Superposición de las curvas de fusión registradas con hCUG en presencia de 1 eq del compuesto **12**. Condiciones: tampón 10 mM de cacodilato sódico, 100 mM NaCl y 0.1 mM EDTA a pH 7.0,  $c_{oligo} = 2 \mu\text{M}$ . Medidas de absorción UV-Vis a 260 nm.

Para intentar eliminar la histéresis, se trabajó con una solución de hCUG con un equivalente del compuesto **12** a pH 7.0 reduciendo el gradiente de temperatura a  $0.2^\circ\text{C}/\text{min}$  (en vez de  $0.5^\circ\text{C}/\text{min}$ ), lo cual supuso aumentar el tiempo del experimento de 140 min a 350 min. Las curvas de desnaturalización y de renaturalización registradas no mostraron una histéresis tan pronunciada, sin embargo, aún no eran del todo superponibles (Figura 2.10). Los valores medios de  $T_m$  obtenidos para las desnaturalizaciones ( $70.6 \pm 0.4^\circ\text{C}$ ) y renaturalizaciones ( $75.5 \pm 0.8^\circ\text{C}$ ) aún discrepaban en aproximadamente  $5^\circ\text{C}$ , lo que indicaba que el proceso seguía siendo más lento que el gradiente de temperatura. Con este experimento se confirmó que el fenómeno observado era el de histéresis y que, lamentablemente, disminuyendo el gradiente de temperatura más de la mitad no era posible eliminarlo.



**Fig. 2.10.** Superposición de las curvas de desnaturalización y renaturalización de hCUG en presencia de 1 eq del compuesto **12**. Condiciones: tampón 10 mM de cacodilato sódico, 100 mM NaCl y 0.1 mM EDTA a pH 7.0,  $c_{oligo} = 2 \mu\text{M}$ . Medidas de absorción UV-Vis a 260 nm. Gradiente de temperatura de  $0.2^\circ\text{C}/\text{min}$ .

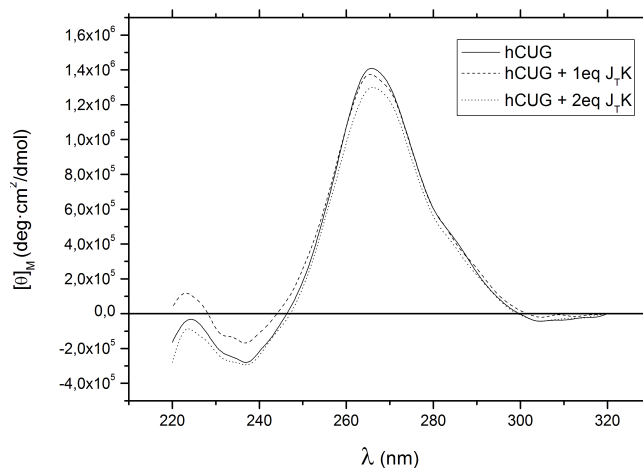
En resumen, los datos determinados (ver *P. Exp. Capítulo 2*) solo pueden considerarse “pseudo”  $T_m$  por lo que los valores de  $\Delta T_m$  calculados carecen de un significado preciso. Sin embargo, el hecho de que el perfil de las curvas de fusión y los valores de  $T_m$  en presencia de ligando se modificaran respecto al RNA solo, sugería que los ligandos ensayados interactuaban de alguna manera con la diana hCUG.

### 3.2.1.2. Dicroísmo circular

En estos experimentos se comparó el perfil de elipticidad molar de la diana en ausencia y presencia de ligando. Los ligandos estudiados y las condiciones experimentales fueron las mismas que en los experimentos de desnaturalización térmica.

Los espectros de DC de hCUG a ambos pHs, 5.5 y 7.0, mostraron perfiles característicos de los dúplex tipo A. Presentan un máximo de absorción sobre 265-270 nm y un mínimo alrededor de 240 nm.<sup>[95,96,21]</sup> Como puede apreciarse en la figura 2.11, el perfil de DC de hCUG presenta un sutil cambio de pendiente sobre los 280 nm que indica la presencia del *loop*.<sup>[97,98]</sup>

Posteriormente, se registraron los espectros de DC de hCUG en presencia de diferente número de equivalentes de **12**, **J<sub>7</sub>K** (Figura 2.11) y **J<sub>7</sub>G<sub>4</sub>J<sub>7</sub>K**. Los cambios observados en el perfil de elipticidad del RNA eran mínimos en todos los casos, lo que sugiere que la estructura global de los complejos formados no difiere sustancialmente de la del RNA (ver *P. Exp. Capítulo 2*). De modo general, se produjo una ligera y gradual disminución de intensidad en el máximo de absorción con la adición de ligando. En el caso del compuesto **12** a pH 5.50, se observó un pequeño desplazamiento hipsocrómico del máximo de absorción, mientras que a pH 7.0 éste se desplazó a longitudes de onda superiores (efecto batocrómico). Con el ligando **J<sub>7</sub>K** se produjo un pequeño efecto hipsocrómico de la banda máxima a ambos pH. En cambio, la presencia del ligando **J<sub>7</sub>G<sub>4</sub>J<sub>7</sub>K** no provocó ningún desplazamiento del máximo de absorción.



**Fig. 2.11.** Superposición de los espectros de DC de hCUG y hCUG en presencia de 1 y 2 equivalentes del ligando **J<sub>7</sub>K**. Condiciones: Tampón 10 mM de cacodilato sódico, 100 mM NaCl y 0.1 mM EDTA a pH 7.0,  $c_{\text{hCUG}} = 2 \mu\text{M}$ .

La única conclusión firme que puede deducirse de los ensayos de DC es que los ligandos no afectan sustancialmente la estructura del *hairpin*, ya que las variaciones registradas en los espectros son muy poco significativas.

Teniendo en cuenta la poca información obtenida de los ensayos de desnaturalización térmica

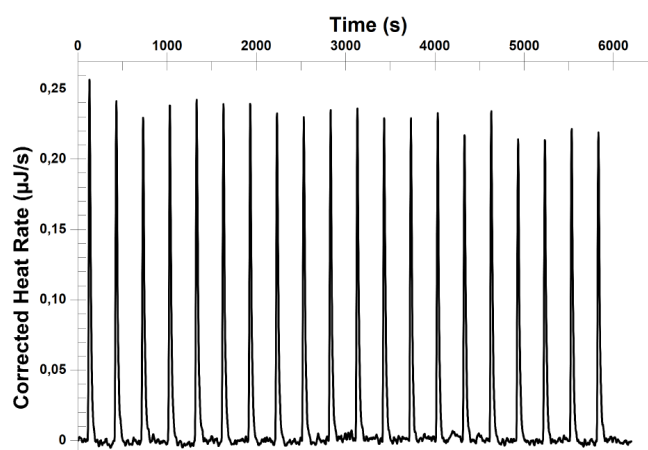
y de DC, se creyó oportuno trabajar con una técnica como la ITC que permitiese cuantificar la interacción entre hCUG y los ligandos .

### 3.2.1.3. Calorimetría de valoración isotérmica

El tampón que se empleó fue el mismo que en los ensayos anteriores, se trabajó a pH 7.0 y se decidió hacer los experimentos a 25°C. Como suele ser habitual en este tipo de experimentos, se introdujo la solución de RNA en la celda de la muestra mientras que el ligando fue añadido cada cierto intervalo de tiempo. Se tuvieron que optimizar las condiciones experimentales para poder obtener unos resultados reproducibles y sencillos de ajustar a los modelos matemáticos que describen los distintos modos de interacción sin mucho error asociado. Por un lado, se optimizaron las concentraciones necesarias de ligando y diana para obtener una buena señal y, por otro lado, los parámetros experimentales como el número de inyecciones, su volumen y el tiempo de espera entre ellas.

Después de muchos ensayos se llegó a la conclusión que era necesario trabajar con una concentración de RNA de 10  $\mu\text{M}$  y una concentración de los ligandos monoméricos de 500  $\mu\text{M}$  y de 250  $\mu\text{M}$  para los diméricos. En cuanto a los parámetros del instrumento, se observó que 20 inyecciones de 2.5  $\mu\text{L}$  eran suficientes para describir la curva y, como la recuperación de la línea de base era casi inmediata después de cada inyección, solo se dejaron 300 s entre ellas. Valoraciones con concentraciones de RNA inferiores dieron picos de calor con valores muy pequeños, y con concentraciones inferiores de ligando no se llegaba a la saturación en las 20 inyecciones.

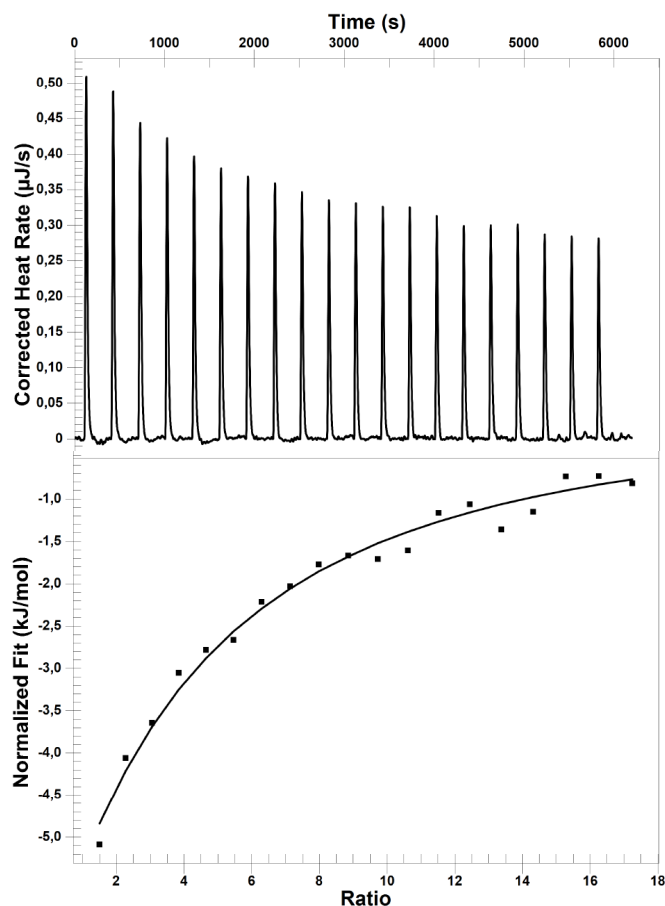
Se realizaron experimentos con el compuesto **12** y **J<sub>7</sub>K**. En ningún ensayo con el compuesto **12** se obtuvo un termograma con calores atribuibles a la interacción con la diana, pues la señal que se obtenía correspondía al calor de dilución de la solución de **12** en la celda de la muestra (corroborado mediante experimentos blanco). Aumentando extremadamente la concentración de la solución de **12** (hasta  $c_{12} = 800 \mu\text{M}$ ) tampoco se obtuvieron resultados (Figura 2.12).



**Fig. 2.12.** Termograma a 25°C del compuesto **12** sobre hCUG. Tampón 10 mM cacodilato sódico, 100 mM NaCl y 0.1 mM EDTA a pH 7.0.  $c_{\text{hCUG}} = 10 \mu\text{M}$  y  $c_{12} = 800 \mu\text{M}$ .

Se lograron mejores resultados con el ligando **J<sub>7</sub>K**. El calor asociado a cada adición no era muy grande pero podía diferenciarse fácilmente del calor de dilución. La cantidad de calor iba

disminuyendo a medida que la diana iba saturándose debido a las adiciones de ligando. No obstante, no parecía llegarse a la saturación de la diana, posiblemente por la baja constante de asociación y, tal vez, por posibles interacciones inespecíficas del ligando con otras zonas de hCUG (Figura 2.13). Debido a que los calores de cada inyección eran bastante pequeños, la integración de los picos obtenidos era compleja y, en consecuencia, el ajuste de los puntos a la isoterma presentaba un error asociado bastante elevado. Además, este hecho provocaba que los resultados de distintos experimentos no fueran reproducibles y, por lo tanto, que los valores obtenidos no pudieran considerarse fiables (Tabla 2.3).



**Fig. 2.13.** Termograma a 25°C del ligando J<sub>7</sub>K sobre hCUG (parte superior) y ajuste de los datos a la isoterma (parte inferior). El blanco ha sido restado. Tampón 10 mM cacodilato sódico, 100 mM NaCl y 0.1 mM EDTA a pH 7.0.  $c_{\text{hCUG}} = 10 \mu\text{M}$  y  $C_{\text{J7K}} = 500 \mu\text{M}$

Para verificar que se estaba operando en condiciones adecuadas, se llevó cabo una valoración de neomicina sobre la diana hCUG. La neomicina es uno de los antibióticos aminoglicosídicos más antiguos que presenta una gran afinidad tanto por el DNA como por el RNA.<sup>[99]</sup> Se realizó el experimento en las mismas condiciones que los anteriores y, el termograma registrado, reflejó un calor cuatro veces superior al obtenido para J<sub>7</sub>K. Dada la elevada intensidad de los picos, su integración, así como el ajuste a la isoterma, fue inmediato y con muy poco error asociado (ver *P. Exp. Capítulo 2*). Los datos obtenidos mostraban que neomicina se une con gran afinidad a hCUG ( $K_d = 3.8 \pm 0.2 \mu\text{M}$ ) para formar un complejo 4:1 (neomicina-hCUG).

J <sub>T</sub> K		
Parámetro termodinámico	Experimento 1	Experimento 2
K <sub>d</sub> (μM)	108.2 ± 16.0	147.8 ± 16.3
n	0.47 ± 0.81	0.27 ± 0.66
ΔH (KJ/mol)	-144.5 ± 37.9	-289.7 ± 56.4
ΔS (J/mol·K)	-408.8	-898.5
-T· ΔS (KJ/mol)	121.9	267.9
ΔG (KJ/mol)	-22.6	-21.8

**Tabla 2.3.** Comparación de los parámetros termodinámicos de dos experimentos de ITC con hCUG y J<sub>T</sub>K a 25°C. Condiciones: Tampón 10 mM cacodilato sódico, 100 mM NaCl y 0.1 mM EDTA a pH 7.0, c<sub>hCUG</sub>= 10 μM y C<sub>J<sub>T</sub>K</sub>= 500 μM.

En este punto se valoraron todos los datos obtenidos en los diferentes ensayos biofísicos llevados a cabo y se pensó que, si la complejación entre hCUG y los ligandos era muy lenta, como parecían indicar los experimentos de desnaturalización térmica, posiblemente tampoco se llegaba a alcanzar el estado de equilibrio en el tiempo tan reducido de un experimento de ITC (100 min aprox.). Si así fuese, solo se estaría cuantificando la unión de una pequeña proporción del ligando introducido, lo que explicaría que no se llegara a la saturación de la diana después de todas las inyecciones y que la estequiometría obtenida fuese tan reducida.

En este contexto, Bonham y *cols.* han descrito la lenta formación de un heterotríplex formado por un PNA y su cadena complementaria de RNA (2:1). La complejación alcanzaba el equilibrio después de más de 2.5 h a 25°C, y en experimentos de desnaturalización térmica empleando un gradiente de temperatura de 0.5°C/min observaron histéresis.<sup>[89]</sup> Por otro lado, en trabajos de Nielsen<sup>[100]</sup> y, posteriormente de Peffer<sup>[93]</sup>, en los que se ha estudiado la capacidad de una cadena de PNA para invadir un dúplex de DNA, se hace referencia a la importante inhibición que los cationes Na<sup>+</sup> provocan en el proceso. Peffer trabajaba con concentraciones de NaCl entre 10 y 100 mM y determinó que a medida que la concentración de cationes Na<sup>+</sup> aumentaba, el grado de invasión disminuía. De hecho, con una concentración 100 mM de NaCl, solo se observaba la formación de un 50% del tríplex por invasión después de una preincubación de 20 h. Por el contrario, Rozners y *cols.* que han trabajado con PNAs diseñados para interactuar con la cara Hoogsteen de una estructura tallo-lazo de RNA y han empleado un tampón 100 mM de acetato sódico, no describen problemas en la formación del tríplex. Estos autores obtuvieron muy buenos resultados de los experimentos de ITC y no hacen referencia a problemas de histéresis en las curvas de fusión que realizan con el mismo gradiente de temperatura que el empleado en esta tesis.<sup>[101–105]</sup>

Aunque los complejos aquí citados no son comparables a los de esta tesis doctoral, tanto por el tamaño de los ligandos como por el tipo de interacción que establecen con el oligonucleótido, se consideró que una complejación tan lenta entre los ligandos estudiados y la diana podía dificultar su estudio mediante las técnicas empleadas, provocando que no pudiese ser cuantificada. Además, la alta concentración de cationes en el tampón podría dificultar aún más la interacción.

En este punto, acuciados por la necesidad de obtener información válida sobre la interacción entre los ligandos y hCUG, se planteó la opción de realizar experimentos de RMN que, en principio, deberían permitir obtener datos claros y concluyentes. Los espectros de RMN suelen registrarse en condiciones de baja fuerza iónica para conseguir la mayor sensibilidad posible.<sup>[106,107]</sup> Por otro lado, conviene usar tampones que no contengan protones, cuyas señales podrían emmascarar los de la biomolécula. Por estos motivos, se decidió trabajar en unas nuevas condiciones que permitiesen realizar los estudios de RMN.

### 3.2.2. Ensayos en condiciones de fuerza iónica baja

Para registrar los espectros de RMN con el objetivo de estudiar las interacciones entre los compuestos **12**, **J<sub>7</sub>K** y **J<sub>7</sub>G<sub>4</sub>J<sub>7</sub>K** con hCUG, se decidió trabajar con un tampón 10 mM fosfato (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) sin sales adicionales y ajustando el pH según las necesidades.

#### 3.2.2.1. Desnaturalización térmica controlada por UV

Si la estructuración de un oligonucleótido es de tipo tallo-lazo, la molecularidad ( $n$ ) del sistema es 1, por lo que la  $T_m$  será independiente de la concentración de oligonucleótido. Para determinar si la diana hCUG se encontraba estructurada como *hairpin* en las nuevas condiciones y a mayores concentraciones, se determinó la  $T_m$  de hCUG a 2  $\mu$ M y a 40  $\mu$ M a pH 7.00 (Tabla 2.4). Aunque los experimentos de RMN se iban a realizar a una mayor concentración de hCUG, no se pudieron realizar ensayos a concentraciones superiores a 40  $\mu$ M para no sobrepasar los límites de saturación de la técnica.

$C_{\text{hCUG}}$	2 $\mu$ M	40 $\mu$ M
$T_m(^{\circ}\text{C})$	63.2 $\pm$ 0.2	63.1 $\pm$ 0.0

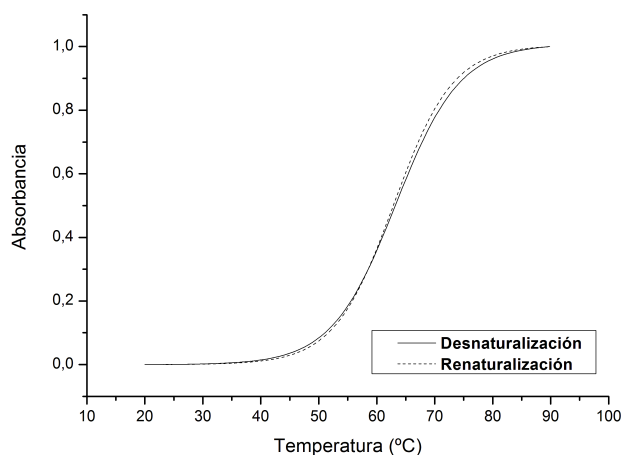
**Tabla 2.4.**  $T_m$  determinadas por desnaturalización térmica controlada por UV de hCUG a dos concentraciones diferentes. Los valores presentados son la media de dos determinaciones (desnaturalización y renaturalización). Condiciones: 10 mM tampón fosfato a pH 7.0.

Como se observa en la Tabla 2.4, la  $T_m$  de hCUG en las nuevas condiciones es independiente de la concentración del oligonucleótido, por lo que se puede considerar que hCUG adopta una estructura de tipo *hairpin*. Como era de esperar, la estabilidad térmica de hCUG se ve reducida casi 7 $^{\circ}$ C al reducir la fuerza iónica del medio.<sup>[108–110]</sup>

Llegados a este punto, se creyó interesante realizar alguna fusión en presencia de ligando para analizar si realmente existía alguna relación entre la concentración de Na<sup>+</sup> en el medio y la cinética de complejación. Como ya se ha comentado, algunos estudios ponen de manifiesto que concentraciones altas del catión ralentizan la formación de complejos tipo tríplex, por lo que parecía atractivo estudiar el comportamiento del sistema a concentraciones de Na<sup>+</sup> más bajas. Para ello se añadió un equivalente del compuesto **12** a una solución 2  $\mu$ M de hCUG a pH 7.0 y se registraron las curvas de 20 a 90 $^{\circ}$ C, y viceversa, con un gradiente de 0.5 $^{\circ}$ C/min (Figura 2.14).

Casi sorprendentemente, la curva de desnaturalización y la de renaturalización eran superponibles, es decir, ya no había histéresis. Todo parecía indicar que la complejación era

mucho más rápida al disminuir la fuerza iónica y, tanto en el proceso de desnaturalización como renaturalización térmica, se alcanzaba el equilibrio empleando un gradiente de 0.5°C/min. Estos resultados validaban parcialmente la hipótesis anteriormente explicada y, además, la buena noticia implicaba que si sucedía lo mismo con los otros ligandos, se podrían obtener valores fiables de  $\Delta T_m$  que dieran idea de la influencia que los ligandos tenían sobre la estabilidad térmica de hCUG.



**Fig. 2.14.** Superposición de las curvas de desnaturalización y renaturalización de hCUG en presencia de 1 eq del compuesto **12**. Condiciones: tampón 10 mM fosfato a pH 7.0,  $c_{\text{oligo}} = 2 \mu\text{M}$ . Medidas de absorción UV-Vis a 260 nm.

Así pues, empleando las nuevas condiciones, se registraron las curvas de fusión controladas por UV de hCUG en presencia de ligando. Se llevaron a cabo con diferentes equivalentes del compuesto **12**,  $J_TK$  y  $J_TG_nJ_TK$  ( $n = 3,4,5$ ) a pH 7.0 (Tabla 2.5). En todos los casos se realizaron curvas de *melting* y *annealing* y en ninguno de los ellos se experimentó el fenómeno de histéresis.

$T_m$ (hCUG, pH 7.0) = $63.2 \pm 0.2^\circ\text{C}$						
Ligando	1 eq		2 eq		4 eq	
	$T_m$ ( $^\circ\text{C}$ )	$\Delta T_m$ ( $^\circ\text{C}$ )	$T_m$ ( $^\circ\text{C}$ )	$\Delta T_m$ ( $^\circ\text{C}$ )	$T_m$ ( $^\circ\text{C}$ )	$\Delta T_m$ ( $^\circ\text{C}$ )
<b>12</b>	$62.7 \pm 0.8$	-0.5	$63.2 \pm 0.1$	0.0	$63.1 \pm 0.4$	-0.1
$J_TK$	$62.9 \pm 0.6$	-0.3	$63.0 \pm 0.1$	-0.2	-	-
$J_TG_3J_TK$	$62.8 \pm 0.1$	-0.5	-	-	-	-
$J_TG_4J_TK$	$63.2 \pm 0.3$	0.0	-	-	-	-
$J_TG_5J_TK$	$63.6 \pm 0.2$	+0.4	-	-	-	-

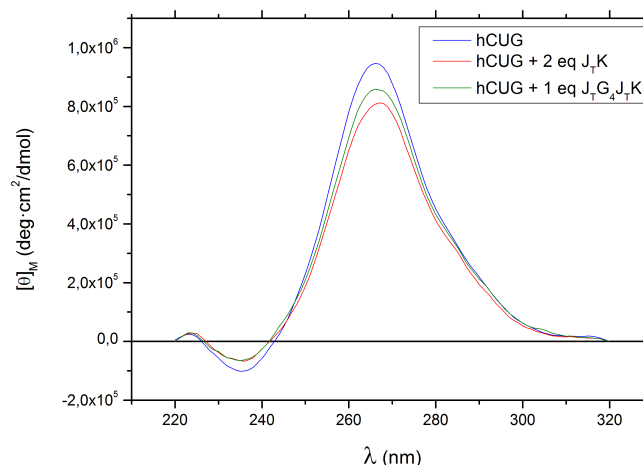
**Tabla 2.5.**  $T_m$  y  $\Delta T_m$  determinadas por desnaturalización térmica controlada por UV de hCUG con el correspondiente ligando y número de equivalentes. Los valores presentados son la media de un mínimo de tres determinaciones. Condiciones: tampón 10 mM fosfato a pH 7.0.

Como se puede apreciar en la Tabla 2.5, las  $T_m$  de los complejos son muy próximas a la  $T_m$  de hCUG y los valores de  $\Delta T_m$  (positivos o negativos) son, en todo los casos, iguales o inferiores a 0.5°C. Teniendo en cuenta el error experimental asociado a las medidas y las desviaciones

estándar de cada  $T_m$ , se podría decir que la mayoría de los ligandos no alteran la estructura de hCUG. La posibilidad de que no existiera interacción entre los ligandos y hCUG se consideró poco probable puesto que todos los ensayos biofísicos realizados en las condiciones de fuerza iónica alta ponían de manifiesto una cierta interacción entre ambos. Así pues, se concluyó que los ligandos ensayados no parecen tener ningún efecto sobre la estabilidad térmica del *hairpin* hCUG, posiblemente, porque su interacción no modifica significativamente la estructura del RNA.

### 3.2.2.2. Dicroísmo circular

De nuevo, se empleó el DC para evaluar si los ligandos tenían algún efecto sobre la estructura de hCUG. En primer lugar se registró el espectro de hCUG solo y después en presencia de 2 eq de  $J_TK$  y 1 eq de  $J_TG_4J_TK$  (Figura 2.15).



**Fig. 2.15.** Superposición de los espectros de DC de hCUG (azul), hCUG con 2 eq de  $J_TK$  (rojo) y hCUG con 1 eq de  $J_TG_4J_TK$  (verde). Condiciones: Tampón 10 mM fosfato a pH 7,0,  $C_{\text{hCUG}} = 2 \mu\text{M}$ .

Como puede verse en la figura 2.15, el perfil de elipticidad de hCUG corresponde al de una estructura secundaria de tipo A-RNA. Como se observa en el espectro de hCUG (azul), existe un máximo de elipticidad a 266 nm y un mínimo sobre 235 nm.<sup>[95,96,21]</sup> El pequeño codo apreciable sobre los 280 nm indica la presencia de un *loop*.<sup>[97,98]</sup>

La adición de 2 eq de  $J_TK$  y la de 1 eq de  $J_TG_4J_TK$  provocaron efectos muy parecidos en el perfil de DC de hCUG. Por un lado, se observó una ligera disminución de la intensidad en la banda máxima a 266 nm, más pronunciada para  $J_TK$  que para  $J_TG_4J_TK$  y, por otro lado, un mínimo menos pronunciado de la banda a 235 nm. Sin embargo, los cambios observados son tan pequeños que no puede considerarse que los ligandos provoquen un efecto sustancial en la estructura de hCUG. Esta conclusión encaja con los resultados obtenidos en los ensayos de desnaturalización térmica controlada por UV.

También se determinaron las temperaturas de fusión empleando la técnica de DC. Inicialmente, se determinó la  $T_m$  de hCUG y, posteriormente, en presencia de los ligandos  $J_TK$  (2 eq) y  $J_TG_4J_TK$  (1 eq).



Como puede apreciarse en la tabla 2.6, los valores de  $T_m$  de los complejos son esencialmente iguales a los obtenidos por UV, sin embargo, los valores de  $\Delta T_m$  son superiores debido a que la  $T_m$  de hCUG determinada por DC es 1.2°C mayor que la obtenida por UV. Se repitieron varias veces los experimentos con hCUG solo, pero el resultado fue siempre el mismo. No se encontró una explicación plausible a estos hechos puesto que, idealmente, los valores deducidos por ambas técnicas deberían ser los mismos. Con todo, la conclusión final es que los ligandos no alteran sustancialmente la estructura del RNA y, en todo caso, la desestabilizan ligeramente.

Ligando	DC				UV			
	$T_m(\text{hCUG, pH 7.0}) = 64.4 \pm 0.1^\circ\text{C}$				$T_m(\text{hCUG, pH 7.0}) = 63.2 \pm 0.2^\circ\text{C}$			
	1 eq		2 eq		1 eq		2 eq	
	$T_m$ (°C)	$\Delta T_m$ (°C)	$T_m$ (°C)	$\Delta T_m$ (°C)	$T_m$ (°C)	$\Delta T_m$ (°C)	$T_m$ (°C)	$\Delta T_m$ (°C)
J <sub>7</sub> K	-	-	62.9	-1.5	62.9	-0.3	63.0	-0.2
J <sub>7</sub> G <sub>4</sub> J <sub>7</sub> K	62.7	-1.7	-	-	63.2	0.0	-	-

**Tabla 2.6.** Comparación de  $T_m$  y  $\Delta T_m$  determinadas mediante DC y UV de hCUG con el correspondiente ligando y número de equivalentes. Datos correspondientes a una sola determinación. Condiciones: Tampón 10 mM fosfato a pH 7.0,  $c_{\text{oligo}} = 2 \mu\text{M}$ .

### 3.2.2.3. Calorimetría de valoración isotérmica

#### 3.2.2.3.1. Compuesto 12

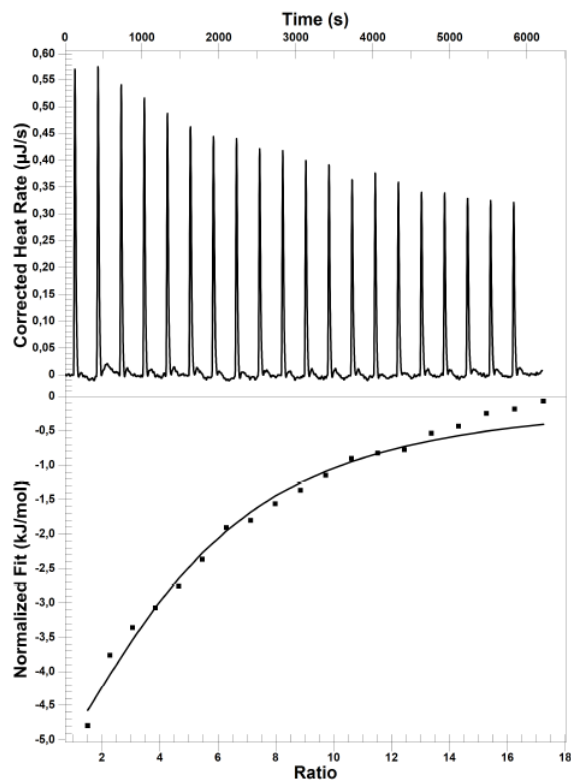
Los ensayos con el compuesto **12** se llevaron a cabo en un tampón 10 mM fosfato a pH 7.0. Los parámetros experimentales, así como las concentraciones de RNA y ligando, fueron los optimizados en los anteriores experimentos de ITC.

A 25°C, se obtuvo un termograma donde solo se detectaba el calor de dilución de la solución de **12** sobre la celda de la muestra. Una posible explicación era que la entalpía ( $\Delta H$ ) asociada a la interacción a esa temperatura fuera próxima a cero, cosa difícil de creer teniendo en cuenta el gran número de enlaces de hidrógeno que podía establecer la base Janus con el par U·U. Una segunda posibilidad era que el ligando tuviera poca afinidad por hCUG y la concentración de cationes presentes en el tampón aún fuera capaz de inhibir la asociación. Finalmente, también podía ser que no existiera interacción entre **12** y hCUG.

Se realizó un experimento en el que se disminuyó aún más la fuerza iónica y se trabajó con un tampón 1 mM fosfato a pH 7.0 (Figura 2.16). Se obtuvo una isoterma bastante bien definida aunque, posiblemente debido a la baja afinidad del compuesto **12**, no se alcanzó la saturación de la diana. Los parámetros termodinámicos que se obtuvieron en el ajuste a un modelo independiente (un solo sitio de unión, o más de uno, pero equivalentes termodinámicamente) se encuentran resumidos en la Tabla 2.7. La constante de disociación obtenida es bastante alta (32  $\mu\text{M}$ ) y la estequiometría del complejo ( $n = 4$ ) no es la esperada para la interacción de **12** con la diana que contiene dos pares U·U. La interacción parece estar dirigida entrópicamente aunque la  $\Delta H$ , a pesar de tener un valor muy pequeño, es negativa y, por lo tanto, favorable. Los valores obtenidos no pueden considerarse muy fiables debido a los calores tan pequeños

detectados que no permitieron una sencilla integración del termograma ni un buen ajuste de los datos al modelo matemático.

Teniendo en cuenta que el compuesto **12** era un simple modelo para llevar a cabo ensayos preliminares, se decidió seguir adelante con el estudio de los ligandos tipo PNA.



**Figura 2.16.** Termograma a 25°C del compuesto **12** sobre hCUG (parte superior) y ajuste de los datos a la isoterma (parte inferior). El blanco ha sido restado. Tampón 1 mM fosfato a pH 7.0.  $c_{\text{hCUG}} = 10 \mu\text{M}$  y  $c_{12} = 500 \mu\text{M}$ .

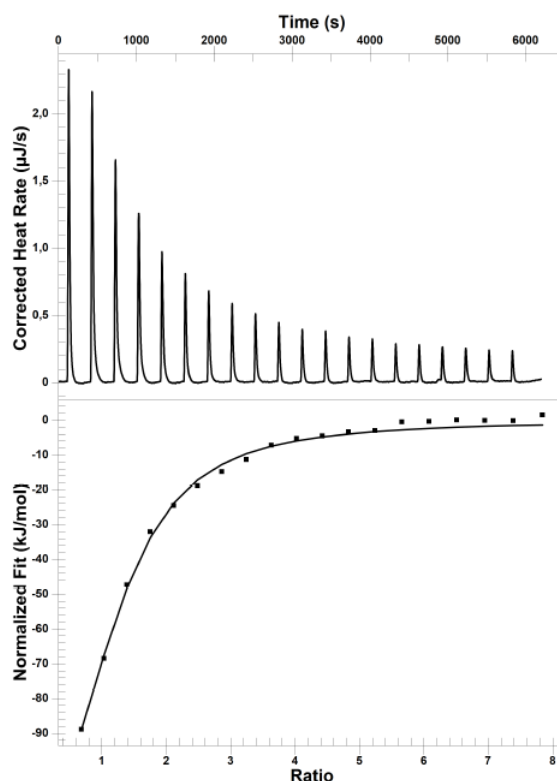
Parámetro termodinámico	Compuesto 12
$K_d$ ( $\mu\text{M}$ )	$32.0 \pm 5.6$
$n$	$4.21 \pm 0.78$
$\Delta H$ (KJ/mol)	$-9.5 \pm 3.9$
$\Delta S$ (J/mol·K)	54.3
$-T \cdot \Delta S$ (KJ/mol)	-16.2
$\Delta G$ (KJ/mol)	-25.7

**Tabla 2.7.** Parámetros termodinámicos a 25°C de la unión entre hCUG y **12**. Condiciones: Tampón 1 mM fosfato a pH 7.0,  $c_{\text{hCUG}} = 10 \mu\text{M}$  y  $c_{12} = 500 \mu\text{M}$ .

### 3.2.2.3.2. Ligandos $J_TK$ y $J_TG_nJ_TK$

Los estudios con  $J_TK$  y  $J_TG_nJ_TK$  ( $n = 3-5$ ) se llevaron a cabo con los parámetros experimentales anteriores y el tampón 10 mM fosfato a pH 7.0 a 25°C. En este caso, los termogramas

obtenidos presentaron un calor asociado a la interacción muy grande y un perfil ideal (Figura 2.17). La integración de los picos fue automática y el ajuste al modelo independiente directo. El hecho de que el calor asociado a cada inyección fuera tan grande permitió obtener unos errores muy bajos en el ajuste de la isoterma y en los parámetros termodinámicos que se deducen (Tabla 2.8). Vale la pena destacar que, para obtener una buena definición del salto de la isoterma, se redujo a la mitad (de 500 a 250  $\mu\text{M}$ ) la concentración de las soluciones de los tres ligandos diméricos  $\text{J}_T\text{G}_n\text{J}_T\text{K}$  ( $n=3-5$ ).



**Fig. 2.17.** Termograma a 25°C del ligando  $\text{J}_T\text{G}_3\text{J}_T\text{K}$  sobre hCUG (parte superior) y ajuste de los datos a la isoterma (parte inferior). El blanco ha sido restado. Tampón 10 mM fosfato a pH 7.0.  $c_{\text{hCUG}} = 10 \mu\text{M}$  y  $c_{\text{Ligando}} = 250 \mu\text{M}$ .

Parámetro termodinámico	$\text{J}_T\text{K}$	$\text{J}_T\text{G}_3\text{J}_T\text{K}$	$\text{J}_T\text{G}_4\text{J}_T\text{K}$	$\text{J}_T\text{G}_5\text{J}_T\text{K}$
$K_d$ ( $\mu\text{M}$ )	$9.7 \pm 0.6$	$4.4 \pm 0.5$	$4.6 \pm 0.4$	$4.3 \pm 0.3$
n	$2.06 \pm 0.06$	$1.05 \pm 0.07$	$1.09 \pm 0.04$	$1.18 \pm 0.04$
$\Delta H$ (KJ/mol)	$-42.6 \pm 1.4$	$-154.8 \pm 13.9$	$-107.9 \pm 5.4$	$-108.2 \pm 5.2$
$\Delta S$ (J/mol·K)	-47.0	-416.6	-259.7	-259.9
$-T \cdot \Delta S$ (KJ/mol)	14.0	124.2	77.4	77.5
$\Delta G$ (KJ/mol)	-28.6	-30.6	-30.5	-30.7

**Tabla 2.8.** Parámetros termodinámicos a 25°C de la unión entre hCUG y los ligandos  $\text{J}_T\text{K}$  y  $\text{J}_T\text{G}_n\text{J}_T\text{K}$  ( $n=3-5$ ). Condiciones: Tampón 10 mM fosfato a pH 7.0,  $c_{\text{hCUG}} = 10 \mu\text{M}$ ,  $C_{(\text{J}_T\text{K})} = 500 \mu\text{M}$  y  $C_{(\text{J}_T\text{G}_n\text{J}_T\text{K})} = 250 \mu\text{M}$ .

*Contribución de la lisina a la unión de los ligandos.*

Al comparar los resultados obtenidos con  $J_TK$  y  $J_TG_nJ_TK$  ( $n= 3-5$ ) con los del compuesto **12**, se planteó la posibilidad de que la interacción cuantificada en los experimentos fuera la de la lisina cargada de los ligandos con los aniones fosfato del oligonucleótido, es decir, una interacción puramente electrostática. En las mismas condiciones, se llevó a cabo una valoración con Ac-Lys-CONH<sub>2</sub> sobre hCUG y se pudo verificar que no existe ningún tipo de interacción detectable entre ambos (ver *P.Exp. Capítulo 2*). De este hecho se dedujo que los valores obtenidos se debían, mayoritariamente, a la interacción de las Janus  $J_T$  con hCUG.

*Constante de disociación y estequiometría de los complejos.*

Como queda resumido en la tabla 2.8, todos los ligandos presentan una constante de disociación ( $K_d$ ) del orden  $\mu M$  bajo, no obstante, es bastante menor para los ligandos diméricos que para el monomérico. Se trata de valores bastante aceptables comparados con los ligandos descritos dirigidos al RNA tóxico de la DM1.<sup>[70,111-115]</sup>

Un valor muy importante a destacar es la estequiometría del complejo formado. El valor  $n$  hace referencia al número de moles de ligando que se une por cada mol de hCUG. Los ligandos se diseñaron para que una Janus  $J_T$  se introdujera entre un par no canónico U·U por lo que, teniendo en cuenta que hCUG presenta dos pares U·U, deberían unirse dos ligandos monoméricos por cada molécula de hCUG mientras que solo uno en el caso de los ligandos diméricos. Las estequiometrías obtenidas concordaron exactamente con las expectativas. Los valores de  $n$  evidenciaron que los complejos formados contienen el mismo número de pares U·U que de bases Janus  $J_T$ , es decir que, muy probablemente,  $J_T$  reconoce los pares U·U de la diana.

*Contribución de los efectos entálpicos y entrópicos a la unión.*

En cuanto a los parámetros termodinámicos, una interacción tendrá lugar espontáneamente siempre y cuando la variación de energía de Gibbs ( $\Delta G$ ), compuesta de los términos entálpico y entrópico (2.3), sea negativa. Las contribuciones entálpicas reflejan la especificidad y la fuerza de las interacciones intermoleculares no covalentes, incluyendo interacciones iónicas y electrostáticas, enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals y polarizaciones de los grupos que interaccionan, entre otras. En procesos de complejación, son comunes las variaciones de entalpía negativas, aunque no omnipresentes, reflejando la tendencia natural de un sistema a caer en el estado de menor energía. El término entrópico, en líneas generales, mide la dinámica de todo el sistema. Todos los procesos de complejación deben superar unos costes entrópicos que vienen dados, por un lado, por la pérdida de grados de libertad rotacional y translacional consecuencia de que un ligando y una biomolécula se combinen para dar un complejo y, por otro lado, por la restricción rotacional individual de los enlaces, por ejemplo, cuando un ligando queda bloqueado en una conformación particular para al unirse a la biomolécula. Los principales fenómenos capaces de contrarrestar estos “castigos entrópicos” son los efectos de solvatación, así como la reorganización del disolvente en el complejo o la liberación de moléculas de agua de solvatación y de cationes, entre otras.<sup>[116]</sup>

La interacción entre los ligandos estudiados y hCUG es exotérmica y está totalmente dirigida entálpicamente. Por este motivo, los termogramas obtenidos mostraban picos de calor tan intensos permitiendo obtener perfiles de la isoterma muy bien definidos. El factor entrópico es

bastante grande y completamente desfavorable a la interacción (Figura 2.18). Este perfil de interacción concuerda, generalmente, con los obtenidos para ligandos de tipo intercalante.<sup>[28]</sup> Existen algunos ejemplos muy interesantes en la literatura<sup>[117]</sup> que destacan por su semejanza con los ligandos aquí estudiados y que presentan interacciones de este tipo. Uno de ellos es el estudio de la unión de la 2,4,6-triaminopirimidina a un ribointerruptor,<sup>[118]</sup> y otro es toda la investigación de Rozners donde cadenas de PNAs se hibridan con *hairpins* de RNA.<sup>[101–105]</sup>

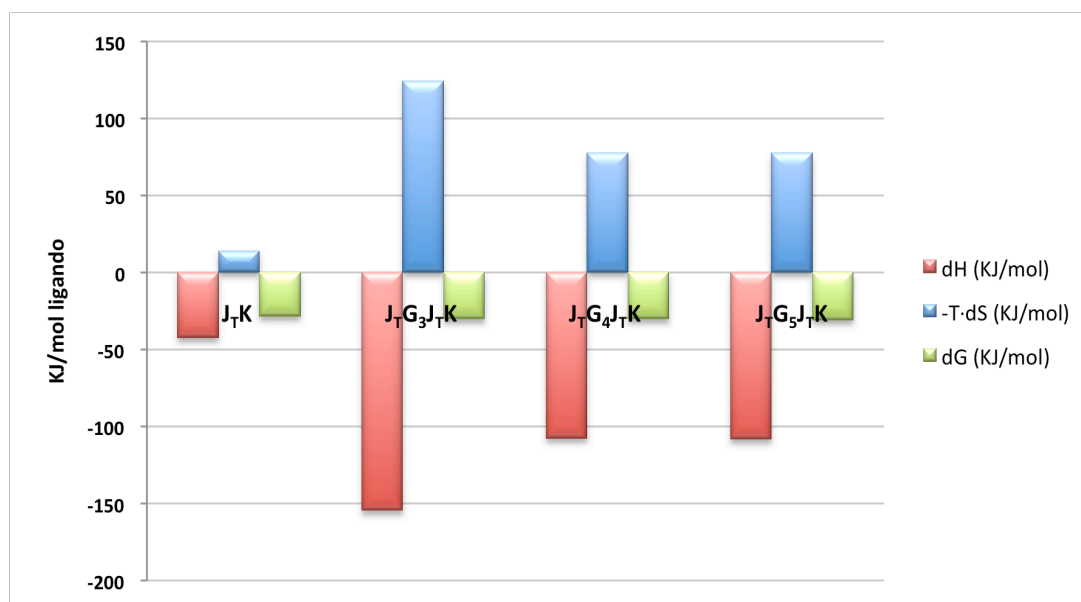


Fig. 2.18. Contribuciones energéticas a 25°C de la interacción de los ligandos J<sub>T</sub>K y J<sub>T</sub>G<sub>n</sub>J<sub>T</sub>K (n=3-5) con la diana hCUG.

Teniendo en cuenta las premisas teóricas, los valores entálpicos obtenidos parecían indicar que los ligandos establecen una interacción no covalente muy fuerte con hCUG, probablemente fruto del gran número de enlaces de hidrógeno que la base Janus J<sub>T</sub> puede formar con las nucleobases U. Otros factores también importantes pueden ser las interacciones electrostáticas debido a las cargas de los ligandos y el apilamiento producido (interacciones de tipo Van der Waals). Es interesante destacar la relación que se observó entre la ΔH de los ligandos diméricos y el monomérico. El valor de ΔH para los ligandos diméricos es aproximadamente el doble que para el ligando monomérico, lo cual tiene mucho sentido, ya que un ligando dimérico contiene dos módulos de reconocimiento que permiten establecer el doble de interacciones.

En contra del término entálpico, la entropía es totalmente desfavorable a la interacción. Como en la mayoría de interacciones, se produce una pérdida de libertad conformacional de ambas especies, puesto que al unirse para formar un complejo, se pierden muchos grados de libertad estructural. Además, teniendo en cuenta que las interacciones no covalentes parecen ser tan fuertes (ΔH), la restricción conformacional que probablemente sufren los ligandos debe ser muy alta. Esto es lo que se conoce como el fenómeno de la compensación entálpico-entrópica<sup>[119]</sup> que surge de la observación de que, en numerosas ocasiones, la entalpía y la entropía están relacionadas.<sup>[120]</sup> Normalmente, cuando hay un aumento en la entalpía debido a una fuerte unión no covalente, la entropía suele verse afectada debido a la restricción de movilidad de las moléculas que interactúan. Este fenómeno se ha observado extensamente aunque no se ha llegado a un consenso sobre su relevancia.<sup>[121,122]</sup>

Por otro lado, a pesar de que el trabajar en condiciones de fuerza iónica baja permitió poder observar y cuantificar la unión de los ligandos a hCUG, muy posiblemente, también pudo afectar negativamente al término entrópico. Esto es debido a que en la formación del complejo, la presencia de pocos cationes estabilizando el RNA limitaría la cantidad de contraiones liberados al medio, la cual es favorable al factor entrópico.<sup>[123]</sup> Los valores obtenidos parecían indicar que no se superaron los castigos entrópicos propios de una complejación provocando que el término entrópico sea totalmente desfavorable a la unión.

*Efecto de la distancia entre bases  $J_T$  en la unión de los ligandos diméricos.*

Como ya se ha comentado, se creía que la distancia entre los pares no canónicos U·U concordaba con la distancia cubierta por cuatro glicinas. Sin embargo, los resultados experimentales indicaron que los espaciadores de tres y cinco glicinas también permitían que las dos Janus se introdujesen entre los pares U·U. En definitiva, se determinó que los tres ligandos sintetizados se unen con aproximadamente la misma afinidad ( $K_d \approx 4 \mu\text{M}$ ) a la diana hCUG.

Las contribuciones entálpicas y entrópicas obtenidas de los ligandos con cuatro y cinco glicinas son prácticamente iguales. En cambio, no deja de ser intrigante que a pesar de tener la misma  $K_d$ , el ligando con tres glicinas presentase una entalpía mucho más favorable y una entropía más desfavorable. Este caso es un buen ejemplo de la compensación entálpico-entrópica, anteriormente comentada. En el figura 2.19 puede apreciarse que, a pesar de tener valores absolutos distintos, las proporciones entálpicas y entrópicas se mantienen constantes.

Estos datos hacen pensar que, posiblemente, además de existir una interacción no covalente muy fuerte debida a los enlaces de hidrógeno entre las Us y las  $J_T$ , tal vez el esqueleto de  $G_3$  establece unas interacciones con el dúplex de hCUG que no se dan con  $G_4$  y  $G_5$ . Por otro lado, el hecho de tener un espaciador más corto entre las  $J_T$ , puede provocar que  $J_T G_3 J_T K$  esté mucho más restringido conformacionalmente con el consecuente impacto desfavorable sobre el término entrópico. Es interesante recordar en este punto que, respecto a los PNAs ideales, los PNAs con la base  $J_T$  presentan un metileno adicional entre la base y su esqueleto. Por lo que podría deducirse que al alargar la longitud del PNA con dos metilenos adicionales, la unión del ligando  $J_T G_3 J_T K$  a hCUG resulta ser viable.

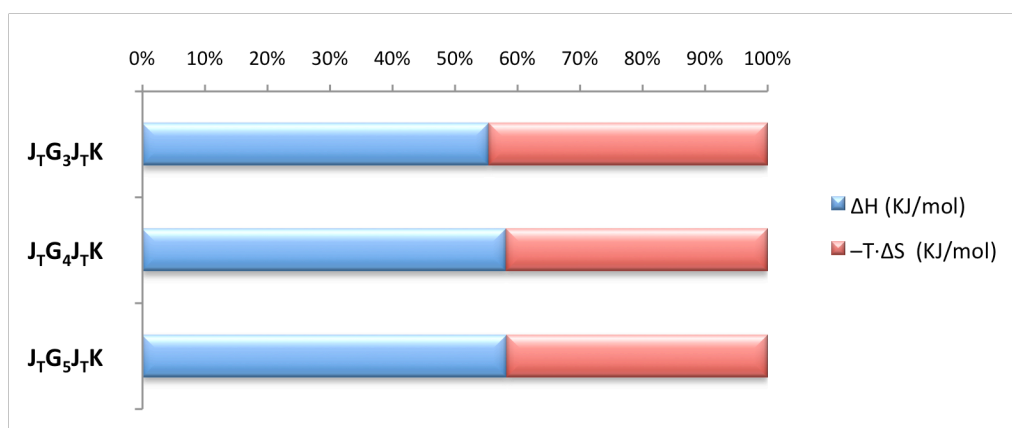


Fig. 2.19. Porcentaje de las contribuciones energéticas  $\Delta H$  y  $-T \cdot \Delta S$  a 25°C a la interacción de los ligandos  $J_T G_n J_T K$  ( $n=3-5$ ) con la diana hCUG.

*Efecto del pH en la unión de los ligandos.*

También se creyó interesante estudiar cuál es el efecto del pH en la unión, ya que el  $pK_a$  de la base  $J_T$  está muy próximo a la neutralidad (ver *Apartado 3.1.1., Cap.1.*). Se escogió para estos ensayos el ligando monomérico  $J_TK$  y se realizaron los experimentos de ITC empleando un tampón a pH más ácido (5.50) y otro a pH más básico (8.0). Los resultados obtenidos quedan resumidos en la tabla 2.9.

<b><math>J_TK</math></b>			
<b>Parámetro termodinámico</b>	<b>pH= 5.5</b>	<b>pH= 7.0</b>	<b>pH= 8.0</b>
<b><math>K_d</math> (<math>\mu M</math>)</b>	7.5 $\pm$ 0.3	9.7 $\pm$ 0.6	9.7 $\pm$ 1.7
<b>n</b>	1.85 $\pm$ 0.03	2.06 $\pm$ 0.06	1.82 $\pm$ 0.20
<b><math>\Delta H</math> (KJ/mol)</b>	-37.2 $\pm$ 0.8	-42.6 $\pm$ 1.4	-31.1 $\pm$ 4.4
<b><math>\Delta S</math> (J/mol·K)</b>	-26.6	-47.0	-8.2
<b>-T· <math>\Delta S</math> (KJ/mol)</b>	7.9	14.0	2.4
<b><math>\Delta G</math> (KJ/mol)</b>	-29.3	-28.6	-28.6

**Tabla 2.9.** Parámetros termodinámicos a 25°C de la unión entre hCUG y  $J_TK$  a diferentes pHs. Condiciones: Tampón 10 mM fosfato,  $c_{hCUG}$  = 10  $\mu M$ ,  $C_{(J_TK)}$  = 500  $\mu M$ .

En los tres pHs estudiados, la interacción está entálpicamente dirigida y la afinidad ( $K_d$ ) es del mismo orden. Estos valores ponían en evidencia que en el intervalo de pH entre 5.50 y 8.0, el ligando es efectivo y forma un complejo con una estequiometría 1:2 (hCUG :  $J_TK$ ). Las  $K_d$ s obtenidas, sobre todo a pH 7.0 y 8.0, son tan semejantes que hacen pensar que tal vez el  $pK_a$  de la base  $J_T$  en los ligandos no es el mismo que en el compuesto **12**.

La superposición del equilibrio de asociación/disociación del ligando a hCUG con un equilibrio ácido-base y fenómenos de protonación/desprotonación, provocan variaciones importantes y sin razón aparente en los factores entálpicos aunque también en los entrópicos, por lo que su justificación es más compleja.<sup>[124]</sup> Serán necesarios estudios más exhaustivos para aclarar la dependencia de las contribuciones energéticas con el pH.

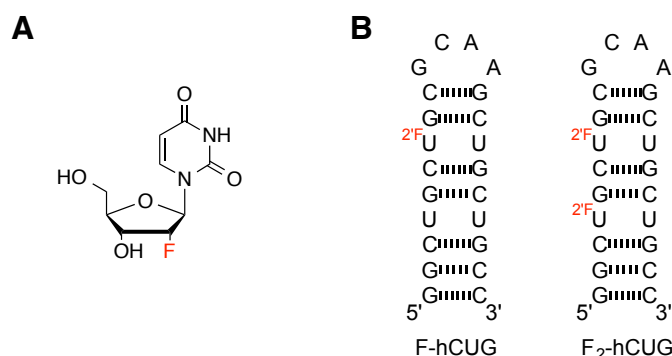
Finalmente, vale la pena destacar que el hecho de no haber obtenido evidencias de la interacción entre el compuesto **12** y hCUG en las mismas condiciones en que sí se obtuvieron para los ligandos  $J_TK$  y  $J_TG_nJ_TK$  (n= 3-5), resalta la importancia del esqueleto de PNA en la interacción. En resumen, mediante la ITC, se ha verificado la unión de los ligandos  $J_TK$  y  $J_TG_nJ_TK$  (n= 3-5) a la diana hCUG y se han podido obtener los parámetros termodinámicos de la interacción.

### 3.2.2.4. RMN

A la vista de los resultados obtenidos mediante ITC descritos en el apartado anterior, se decidió estudiar los complejos mediante RMN. En primer lugar, utilizando la diana marcada con  $^{19}F$  y, en segundo lugar, por RMN de protón.

3.2.2.4.1. RMN de  $^{19}\text{F}$ 

Para realizar los experimentos mediante RMN- $^{19}\text{F}$  era necesario obtener los ligandos marcados con un átomo de F o bien, marcar la diana hCUG. La opción más viable, teniendo en cuenta la dificultad de obtener ligandos con un átomo de F, fue introducir la marca en la diana. La introducción de un átomo de F en la posición 2' de un nucleótido es un recurso muy empleado puesto que puede facilitar información cualitativa de la interacción de moléculas con el RNA o estudiar cambios conformacionales. Por este motivo, se decidió sintetizar unas nuevas dianas análogas a hCUG que contuvieran residuos de 2'-desoxi-2'-fluorouridina (2'-F-U) (Figura 2.20).

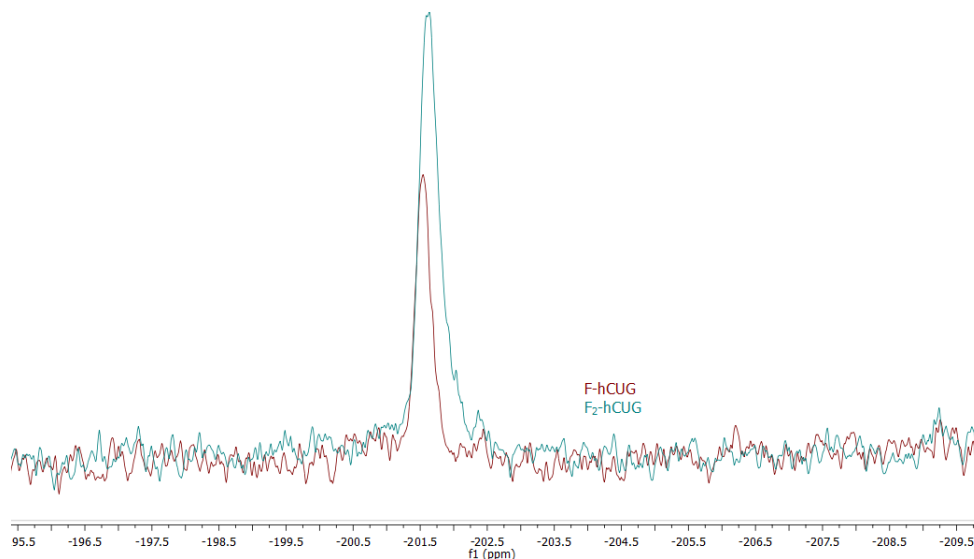


**Fig. 2.20.** A. 2'-desoxi-2'-fluorouridina (2'-F-U). B. Estructura tallo-lazo de la diana hCUG marcada con  $^{19}\text{F}$  en la posición 7 (F-hCUG) y en las posiciones 4 y 7 (F<sub>2</sub>-hCUG).

La diana F-hCUG contenía una sola 2'-F-U en la posición 7, mientras que F<sub>2</sub>-hCUG contenía dos átomos de  $^{19}\text{F}$ , uno en la misma posición que la anterior y otro en la posición 4. De este modo, si se lograban observar dos señales en el espectro de RMN- $^{19}\text{F}$  de F<sub>2</sub>-hCUG, se podría evaluar si el ligando monomérico tenía alguna preferencia sobre uno de los dos pares U·U de la diana. La síntesis de los RNAs se llevó a cabo mediante síntesis automatizada en fase sólida empleando el fosforamidito marcado comercial (ver *Materiales y Métodos*). Se lograron obtener ambos RNAs puros con unos rendimientos entre el 20 y el 26%. La estabilidad térmica de ambos productos se determinó mediante desnaturalización térmica controlada por UV a alta concentración (40  $\mu\text{M}$ ) comprobándose que se correspondían con las del modelo hCUG (ver *P.Exp. Capítulo 2*).

Inicialmente, se registraron los espectros de ambas dianas a 25°C en D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O (1:9) con tampón 10 mM fosfato a pH 7.0 y a una concentración de 150  $\mu\text{M}$ . Se llevaron a cabo experimentos tanto desacoplando la señal del protón como dejándola acoplada. Por un lado, se observó que las señales de  $^{19}\text{F}$  obtenidas en los experimentos sin desacoplamiento de  $^1\text{H}$  eran mucho más definidas e intensas que las obtenidas en los espectros donde se había realizado el desacoplamiento. Estos resultados parecían indicar que el desacoplamiento de  $^1\text{H}$  era defectuoso, probablemente, por la cantidad de sales de la muestra. Por otro lado, lamentablemente, en el espectro de F<sub>2</sub>-hCUG no se diferenciaron los dos átomos de  $^{19}\text{F}$  de U<sup>4</sup> y U<sup>7</sup> debido a la semejanza estructural en el entorno de ambos (Figura 2.21). En vista de estas observaciones, se decidió trabajar con F<sub>2</sub>-hCUG y sin desacoplar de protón ya que la intensidad de la señal era superior a la que producía F-hCUG.





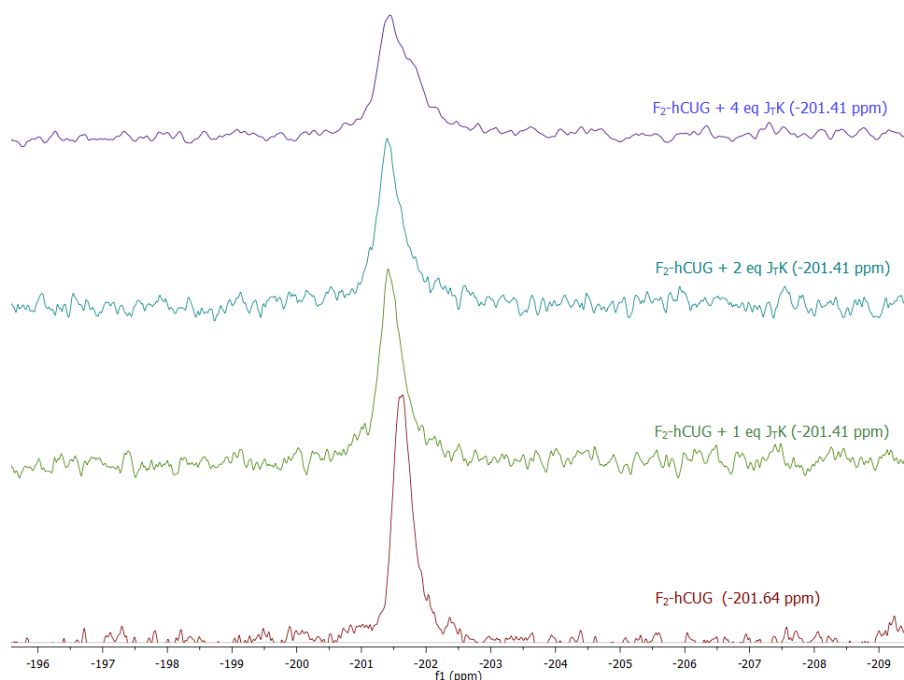
**Fig. 2.21.** Espectro de RMN- $^{19}\text{F}$  ampliado de F-hCUG (rojo) y F<sub>2</sub>-hCUG (azul) referenciado a trifluorotolueno.  $C_{\text{RNA}} = 150 \mu\text{M}$ .

A partir de aquí, se prosiguió con el estudio de los complejos de F<sub>2</sub>-hCUG con el compuesto **12** y con **J<sub>7</sub>K** y **J<sub>7</sub>G<sub>4</sub>J<sub>7</sub>K**. Se escogió **J<sub>7</sub>G<sub>4</sub>J<sub>7</sub>K** frente los otros ligandos con 3 o 5 glicinas debido a que se disponía de mayor cantidad y presentaba una afinidad muy similar por la diana. Los experimentos se llevaron a cabo añadiendo a la diana diferente número de equivalentes del correspondiente ligando mientras se valoraba el efecto que producían en el desplazamiento de la señal de F<sub>2</sub>-hCUG.

Para el compuesto **12**, se registraron espectros en presencia de 1, 2 y 4 eq y en ninguno de ellos se observó una variación en el desplazamiento de la señal de  $^{19}\text{F}$  (ver *P. Exp. Capítulo 2*). Se procedió del mismo modo con el ligando **J<sub>7</sub>K** y, en este caso, se observó una pequeña variación en el desplazamiento químico de la señal de -0.22 ppm. Se produjo también una disminución de la intensidad de la señal y un ensanchamiento pronunciado al aumentar el número de equivalentes de ligando (Figura 2.22).

Los resultados obtenidos en los experimentos con 1 y 2 eq del ligando **J<sub>7</sub>G<sub>4</sub>J<sub>7</sub>K** fueron muy similares aunque la variación en el desplazamiento de la señal fue inferior ( $\Delta\delta = -0.15$  ppm). Ambos ligandos, **J<sub>7</sub>K** y **J<sub>7</sub>G<sub>4</sub>J<sub>7</sub>K**, provocaron prácticamente el mismo efecto sobre la señal de  $^{19}\text{F}$  de F<sub>2</sub>-hCUG. Los pequeños cambios observados en el desplazamiento químico de la señal tenían lugar al adicionar un solo equivalente de ligando (**J<sub>7</sub>K** o **J<sub>7</sub>G<sub>4</sub>J<sub>7</sub>K**). En cambio, el ensanchamiento progresivo de la señal acompañado de la disminución de su intensidad sucedía en la adición de más equivalentes. Estas observaciones hacen pensar en que la diferencia de  $\delta$  de la señal de  $^{19}\text{F}$  de F<sub>2</sub>-hCUG libre y F<sub>2</sub>-hCUG complejado debe ser tan pequeña que no es posible distinguirlos a causa de la importante anchura de las señales. Además, esta pequeña variación en el desplazamiento químico sugiere que los cambios estructurales que provocan los ligandos en la diana son muy pequeños. Vale la pena señalar que cambios estructurales importantes, como los provocados por ligandos tipo aminoglicosídico, se traducen en  $\Delta\delta$  de entre una y dos ppm.<sup>[48]</sup> La conclusión de estos ensayos concuerda con la obtenida empleando otras técnicas (UV, DC): al unirse a hCUG, los ligandos parecen no

modificar significativamente su estructura. No obstante, la pequeñísima variación de desplazamiento químico de  $^{19}\text{F}$  producida por los ligandos  $\text{J}_7\text{K}$  y  $\text{J}_7\text{G}_4\text{J}_7\text{K}$  confirma su unión a hCUG e indica que ésta tiene lugar cerca de las nucleobases U.



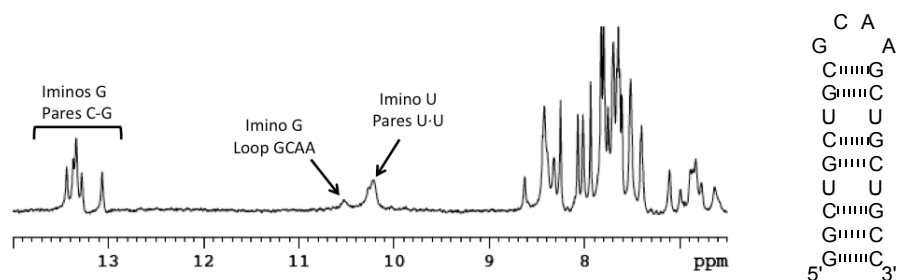
**Fig. 2.22.** Espectros de RMN- $^{19}\text{F}$  de  $\text{F}_2\text{-hCUG}$  y de  $\text{F}_2\text{-hCUG}$  en presencia de 1, 2 y 4 eq de  $\text{J}_7\text{K}$ . Referencia interna: trifluorotolueno.  $C_{\text{RNA}} = 150 \mu\text{M}$ .

#### 3.2.2.4.2. RMN de $^1\text{H}$

Para obtener información más detallada de dónde tiene lugar la interacción entre los ligandos  $\text{J}_7\text{K}$  y  $\text{J}_7\text{G}_4\text{J}_7\text{K}$  y la diana hCUG, se creyó oportuno realizar un estudio mediante RMN- $^1\text{H}$ . Para ello, se contó con la colaboración del Dr. Carlos González del Instituto de Química Física Rocasolano del CSIC en Madrid.

Inicialmente se registraron los espectros monodimensionales, NOESY y TOCSY de la diana hCUG a distintas temperaturas y con una concentración de RNA entre 100 y 200  $\mu\text{M}$  en  $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$  (1:9) con tampón 10 mM fosfato a pH 7.0. Lo más importante fue asignar la zona de los grupos imino los cuales resuenan a campos más bajos (entre 10 y 15 ppm, aproximadamente) que el resto de protones, facilitando así su estudio. El desplazamiento de estos grupos depende de si las nucleobases están apareadas o desapareadas y del tipo de apareamiento. Si se encuentran desapareadas, los protones imino suelen aparecer a campos más altos (11 ppm) que si están formando par (12-14 ppm). En el caso de pares de bases no canónicos, como los U·U, los iminos suelen aparecer entre 10-11 ppm.

La región de los protones imínicos y de los aromáticos del espectro monodimensional de hCUG a 25 °C se muestra en la figura 2.23.



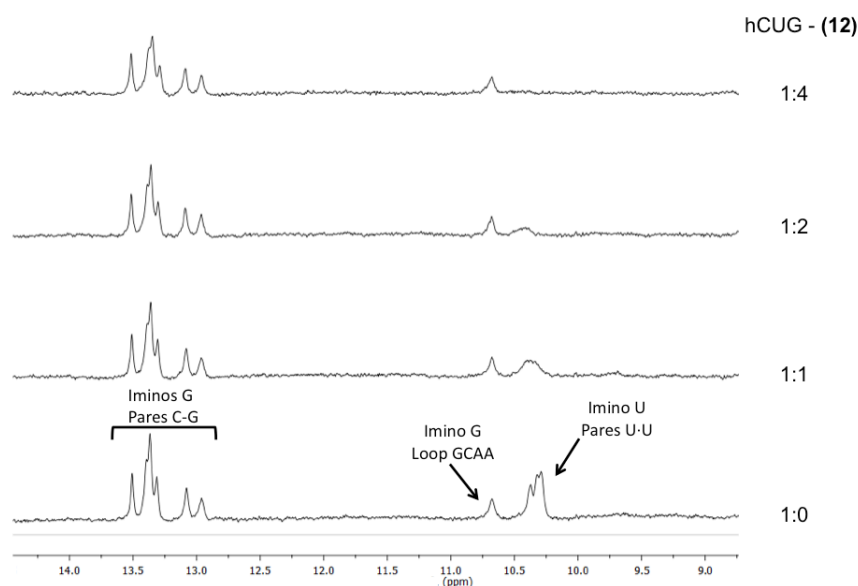
**Fig. 2.23.** Ampliación del espectro monodimensional de RMN-<sup>1</sup>H hCUG a 25°C en D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O (1:9) con tampón 10 mM fosfato y pH 7.0. Se indican los grupos imino de las nucleobases.

Las señales a campos más bajos, entre 13.0 y 13.8 ppm, corresponden a los protones imínicos de las guaninas que se encuentran apareadas con sus respectivas citosinas. La señal situada a 10.7 ppm se asigna al grupo imino de la G que forma parte del *tetra*loop de hCUG<sup>[76,79,125]</sup> y, finalmente, las señales comprendidas entre 10.2 y 10.4 ppm se atribuyen a los grupos imino de las U, los cuales probablemente estarían formando un enlace de hidrógeno. Con todo, es destacable que los datos de RMN confirmaron la estructuración de la diana hCUG como horquilla. Debido a la secuencia tan repetitiva de hCUG, la asignación completa del espectro no se pudo llevar a cabo ya que se observaron muchos solapamientos entre señales tanto en los espectros monodimensionales como bidimensionales (NOESY, TOCSY).

Para las valoraciones con los ligandos se escogieron los compuestos **12**, **J<sub>7</sub>K** y **J<sub>7</sub>G<sub>4</sub>J<sub>7</sub>K**, principalmente porque se disponía de mayor cantidad de ellos.

*Espectros monodimensionales de hCUG con el compuesto 12 y los ligandos J<sub>7</sub>K y J<sub>7</sub>G<sub>4</sub>J<sub>7</sub>K.*

En la figura 2.24 se muestran los espectros monodimensionales de hCUG en presencia de 1, 2 y 4 equivalentes del compuesto **12** a 5°C.

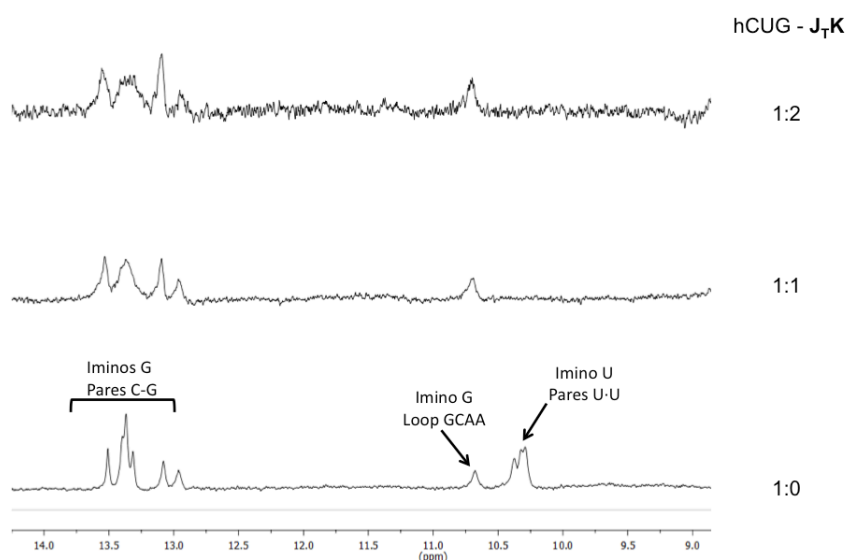


**Fig. 2.24.** Ampliación de los espectros monodimensionales de RMN-<sup>1</sup>H de hCUG y hCUG en presencia de 1, 2 y 4 eq de **12**. Espectros realizados a 5°C en D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O (1:9) con tampón 10 mM fosfato a pH 7.0. Se indican los grupos imino de las nucleobases.

Los cambios observables en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H de hCUG debido a la adición del compuesto **12** se localizaron, principalmente, en el grupo imino de las U alrededor de 10.4 ppm. La intensidad de la señal disminuyó casi totalmente con la adición del segundo equivalente de **12** y desapareció con el exceso de 4 equivalentes. Sin embargo, no se observaron cambios sustanciales en el resto del espectro de hCUG, lo que sugiere que el compuesto **12** se une preferentemente a los pares no canónicos U-U y que, por lo tanto, actúa como base Janus. Se realizaron valoraciones con excesos superiores de ligando (10 y 20 equivalentes), pero la calidad y resolución de los espectros era muy baja produciéndose un importante ensanchamiento de las señales (ver *P. Exp. Capítulo 2*).

También se llevó a cabo un estudio de la estabilidad térmica del complejo hCUG-**12** (1:4). Los diferentes ensayos evidenciaron que la adición de **12** no afecta a la fusión de hCUG, lo que corrobora los resultados obtenidos en los experimentos de desnaturalización térmica controlada por UV (ver *P. Exp. Capítulo 2*).

Por último, se realizaron los mismos estudios con los ligandos **J<sub>7</sub>K** y **J<sub>7</sub>G<sub>4</sub>J<sub>7</sub>K**: valoraciones con 1 y 2 equivalentes de ambos (ver ejemplo con **J<sub>7</sub>K** en la figura 2.25) y experimentos de fusión de los complejos hCUG-ligando.



**Fig. 2.25.** Ampliación de los espectros monodimensionales de RMN-<sup>1</sup>H de hCUG y hCUG en presencia de 1 y 2 eq de **J<sub>7</sub>K**. Espectros realizados a 5°C en D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O (1:9) con tampón 10 mM fosfato a pH 7.0. Se indican los grupos imino de las nucleobases.

En estos experimentos se pudo comprobar que ambos ligandos tienen el mismo efecto que el compuesto **12** sobre los grupos imino de las Us. No obstante, con los ligandos de tipo PNA sí se observaron cambios importantes tanto en la región de los iminos de G (13-14 ppm) como en otras zonas del espectro. Este efecto puede ser debido a que estos dos ligandos son mucho más voluminosos que el compuesto **12** y, al unirse a hCUG, muy probablemente afectan el entorno químico de una región mayor del RNA. Además, el esqueleto de poliamida, o la misma lisina, pueden llegar a interactuar con zonas próximas al par U-U. Por otro lado, el ensanchamiento generalizado de las señales indica que, al tener unos ligandos con afinidad

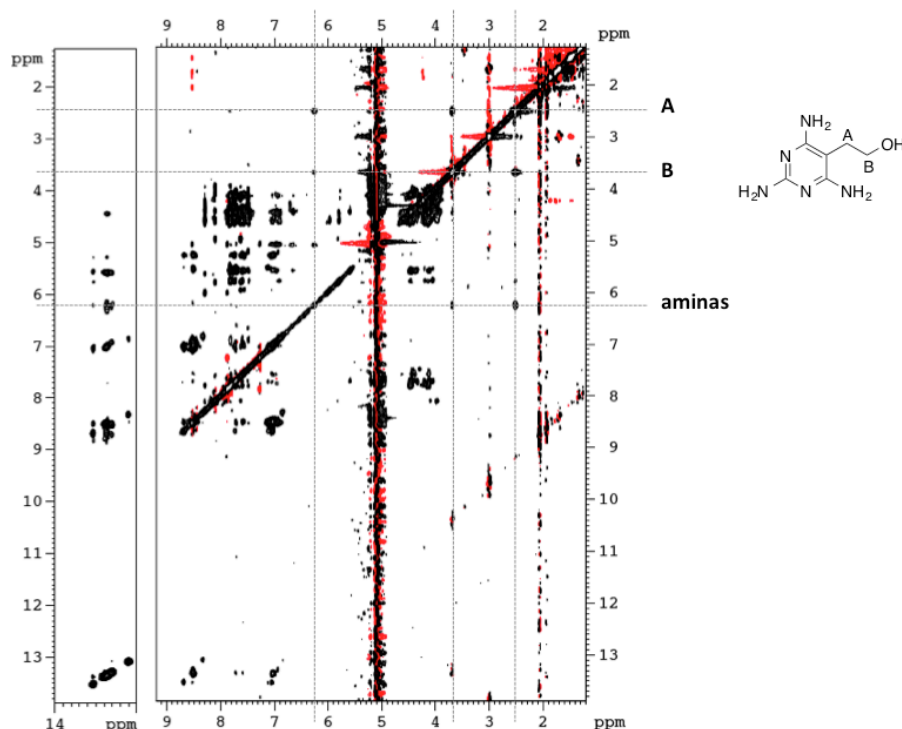
moderada a hCUG, se podrían estar observando tanto las señales de las especies libres como las del complejo, lo que se traduce en señales de una anchura superior.

De los experimentos de fusión de hCUG con **J<sub>7</sub>K** (espectros a diferentes temperaturas desde 5 hasta 45°C) se llegó a la conclusión de que el ligando no tiene ningún efecto importante sobre la estabilidad térmica de hCUG, en cambio, el ligando **J<sub>7</sub>G<sub>4</sub>J<sub>7</sub>K** parece desestabilizar ligeramente la diana de RNA, como ya se había observado en los experimentos de desnaturalización térmica controlada por UV (ver *P. Exp. Capítulo 2*).

*Espectros NOESY de hCUG con el compuesto 12 y el ligando J<sub>7</sub>G<sub>4</sub>J<sub>7</sub>K.*

Se registraron espectros bidimensionales NOESY de los complejos hCUG-**12** (1:2) y (1:4) y hCUG-**J<sub>7</sub>G<sub>4</sub>J<sub>7</sub>K** (1:1) a 1°C. Se escogió **12** para estos estudios debido a que los espectros monodimensionales tenían muy buena resolución y se disponía de una importante cantidad del compuesto. Por otro lado, se eligió el ligando dimérico **J<sub>7</sub>G<sub>4</sub>J<sub>7</sub>K** ya que se trata de un ligando de mayores dimensiones que **J<sub>7</sub>K**, por lo que la posibilidad de observar NOEs intermoleculares era superior.

Del espectro NOESY del complejo hCUG-**12** (1:4) se pudo obtener mayor información que del (1:2). La primera evidencia a destacar es que los NOEs intramoleculares observados del ligando presentaban el mismo signo que los protones del RNA. Este hecho indica que, a pesar de su bajo peso molecular, el ligando se mueve en la solución con el mismo tiempo de correlación que el RNA, de lo que puede deducirse que muy probablemente ambos están unidos formando un complejo (Figura 2.26).



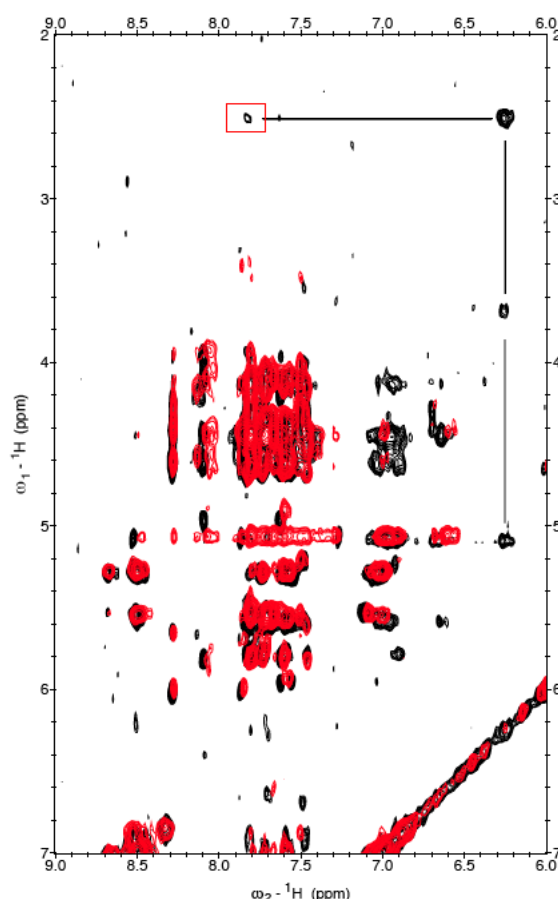
**Fig. 2.26.** Espectro NOESY de hCUG con 4 eq de **12** registrado a 1°C en D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O (1:9) con tampón 10 mM fosfato a pH 7.0. Se indican las señales de los protones de **12**.

Desafortunadamente, no se detectó ningún NOE intermolecular entre las aminas de **12** y el RNA hCUG, lo cual hubiera sido una evidencia clara de que **J<sub>7</sub>** actúa como cuña *Janus* con el par

no canónico U·U. Sin embargo, analizando detenidamente el espectro, se pudo observar un posible NOE intermolecular entre  $H_A$  de **12** y hCUG (Figura 2.27). Sin embargo, al no tener una asignación completa de hCUG no es posible confirmar con que protón de la diana tiene lugar el NOE. No obstante, por el desplazamiento observado ( $\approx 7.8$  ppm), podría tratarse de un protón aromático de una U o de una C.

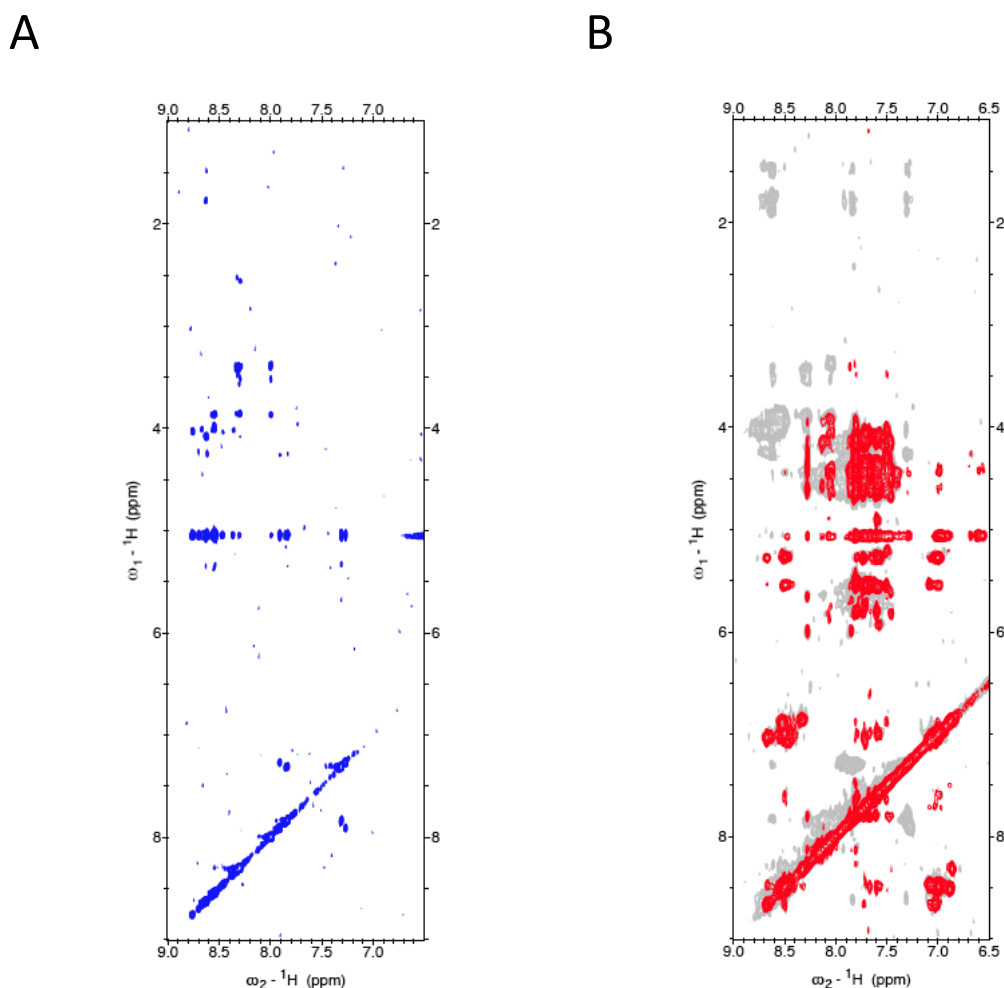
Vale la pena destacar que, como ya se había observado en el espectro monodimensional con el compuesto **12**, solo se vieron modificadas por la formación del complejo las señales de los grupos imino de las Us, mientras que el resto de señales permanecieron inalteradas. Esta evidencia confirma la unión preferente del compuesto a la zona del par no canónico U·U.

En cuanto al complejo con el ligando **J<sub>1</sub>G<sub>4</sub>J<sub>1</sub>K**, se constató que la presencia de este ligando afecta bastante más las señales de hCUG, seguramente porque su mayor tamaño le permite establecer muchas más interacciones. El espectro NOESY del ligando (sin RNA) presentaba señales muy débiles que ponían de manifiesto que **J<sub>1</sub>G<sub>4</sub>J<sub>1</sub>K** no está muy estructurado en solución. Las señales, a pesar de su baja intensidad, presentaban el mismo signo que la diagonal, lo que sugería que su tiempo de correlación es mayor que el de los ligandos anteriores y más parecido al del RNA (Figura 2.28A).



**Fig. 2.27.** Ampliación de la superposición de los espectros NOESY del complejo hCUG-(**12**) (1:4) (negro) y hCUG (rojo). El posible NOE intermolecular entre **12** y hCUG se enmarca en rojo. Espectro realizado a 1°C en  $D_2O/H_2O$  (1:9) con tampón 10 mM fosfato a pH 7.0.

En el estudio del complejo hCUG-J<sub>7</sub>G<sub>4</sub>J<sub>7</sub>K se observó que los NOEs intramoleculares del ligando aumentaban mucho en número e intensidad, lo que indicaba una mayor estructuración de J<sub>7</sub>G<sub>4</sub>J<sub>7</sub>K en el complejo que en el estado libre (Figura 2.28B). Esta era una evidencia clara de que se forma un complejo entre ambos. Lamentablemente, el considerable solapamiento de señales no permitió asegurar de manera inequívoca la presencia de NOEs intermoleculares.



**Fig. 2.28.** A. Espectro NOESY del ligando J<sub>7</sub>G<sub>4</sub>J<sub>7</sub>K. B. Superposición de los espectros NOESY del complejo hCUG-J<sub>7</sub>G<sub>4</sub>J<sub>7</sub>K (1:1) (gris) y hCUG solo (rojo). Espectros registrados a 5°C en D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O (1:9) con tampón 10 mM fosfato a pH 7.0.

Así pues, las evidencias acumuladas mediante RMN-<sup>1</sup>H confirman la formación de un complejo entre hCUG y los tres compuestos ensayados (**12** y los ligandos J<sub>7</sub>K y J<sub>7</sub>G<sub>4</sub>J<sub>7</sub>K). La interacción principal parece tener lugar con el par U·U, puesto que las señales de los grupos iminos de estas nucleobases son las más afectadas. No obstante, no se han podido asignar claramente NOEs intermoleculares entre el RNA y los ligandos en las condiciones experimentales empleadas.

### 3.2.2.5. Espectrometría de masas

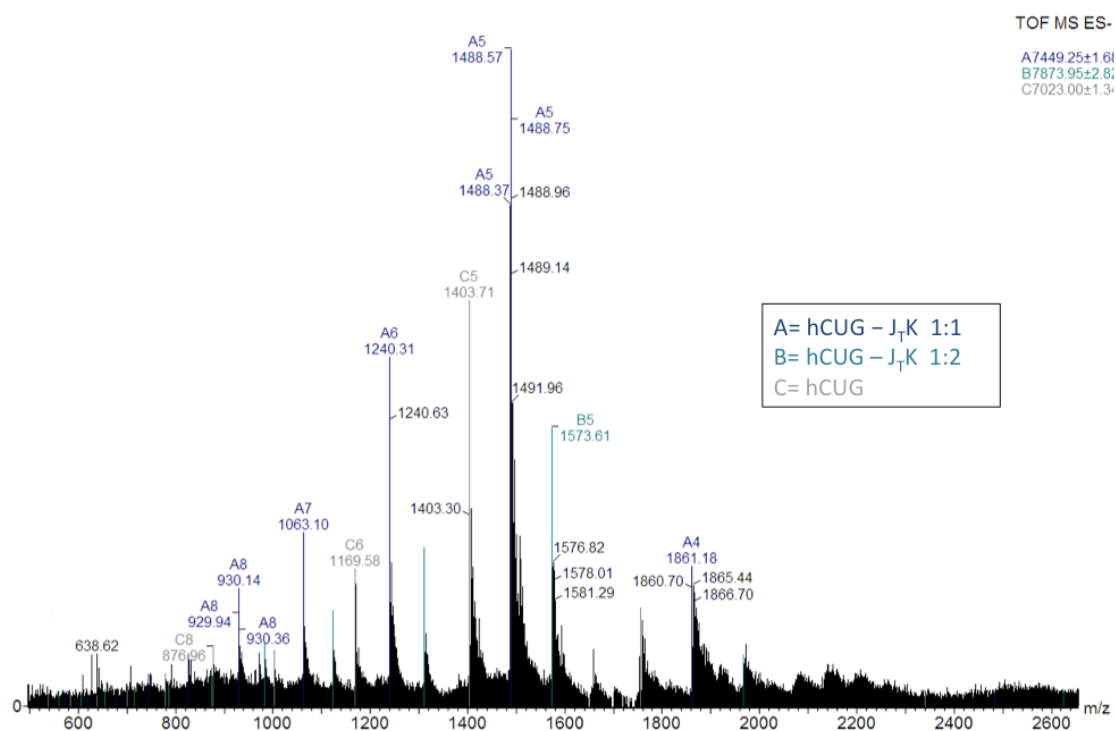
La estequiometría de un complejo puede determinarse mediante distintas técnicas analíticas, De hecho, a través de una de ellas, la ITC, ya se ha podido determinar las estequiometrías de los complejos estudiados. No obstante, parecía interesante corroborar los datos obtenidos

mediante otra técnica. Para ello, se decidió emplear la espectrometría de masas con ionización por electrospray<sup>[59]</sup> y estudiar los complejos de hCUG con los ligandos  $J_TK$  y  $J_TG_4J_TK$ .

Se prepararon una soluciones 50  $\mu$ M de hCUG con un exceso de  $J_TK$  y  $J_TG_4J_TK$  en un tampón 50 mM de  $AcONH_4$  a pH 7.0 y se analizaron las muestras en modo negativo.

#### Estequiometría del complejo hCUG- $J_TK$ .

En el espectro obtenido (Figura 2.29) se lograron observar tres grupos de señales correspondientes a hCUG (gris), hCUG- $J_TK$  1:1 (azul oscuro) y hCUG- $J_TK$  1:2 (azul claro) con distinta carga ( $z= 4$  a 8). Dadas las características del experimento, en el que se empleaba un exceso de ligando en la preparación del complejo, este resultado indica que la estequiometría del complejo hCUG- $J_TK$  es 1:2. En ningún experimento realizado se observó la presencia de complejos con estequiometrías superiores, hecho que indicaba que la diana hCUG puede aceptar un máximo de dos ligandos, seguramente uno por cada par no canónico U·U.

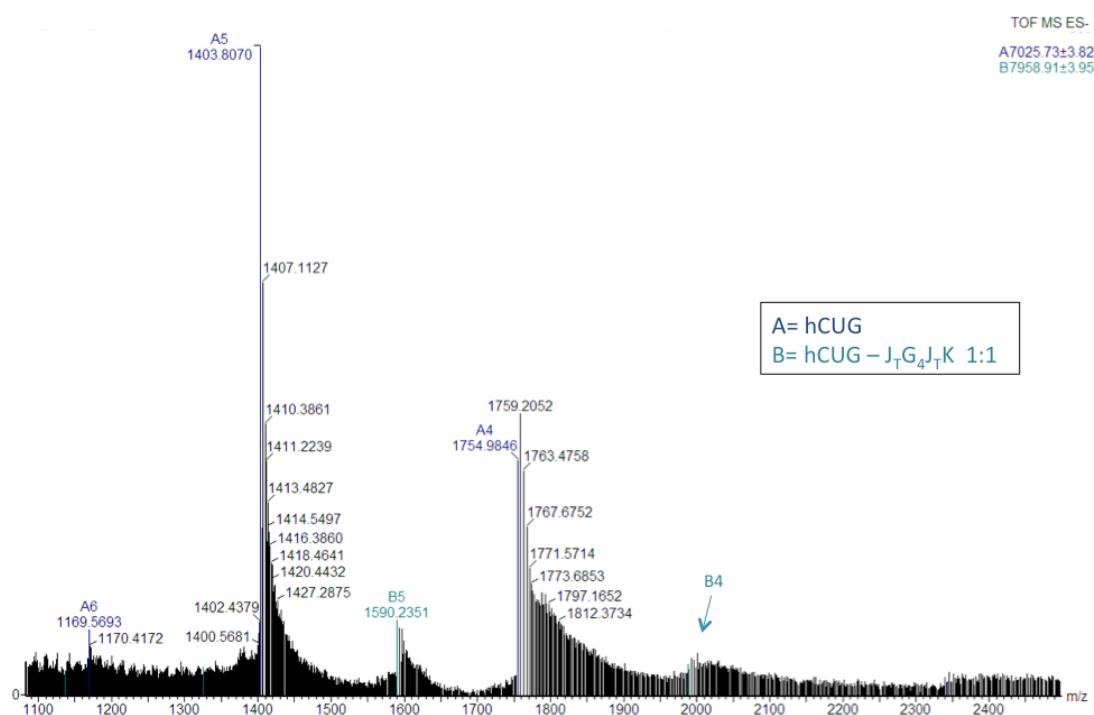


**Fig. 2.29.** Espectro de EM-ESI de los complejos formados entre hCUG y  $J_TK$ . Se observan los iones multicargados de distintas especies resaltadas en distintos colores. El número que sigue a la letra (A, B o C) indica el número de cargas ( $z$ ) que posee cada especie observada.

#### Estequiometría del complejo hCUG- $J_TG_4J_TK$ .

En el espectro de masas del complejo hCUG- $J_TG_4J_TK$  (Figura 2.30) se detectó la masa de hCUG libre y la del complejo hCUG- $J_TG_4J_TK$  1:1 con distinto número de cargas. Estos datos indicaban que la estequiometría del complejo es 1:1, tal y como se había determinado mediante ITC. Esta estequiometría concuerda también con el hecho de que los ligandos diméricos son capaces de reconocer, a la vez, los dos pares U·U de la estructura de hCUG debido a la interacción con  $J_T$ .



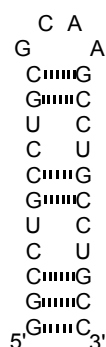


**Fig. 2.30.** Espectro de EM-ESI de los complejos formados entre hCUG y J<sub>T</sub>G<sub>4</sub>J<sub>T</sub>K. Se observan los iones multicargados de distintas especies resaltadas en distintos colores. El número que sigue a la letra (A, B) indica el número de cargas (z) que posee cada especie observada.

#### 4. Evaluación de ligandos que contienen J<sub>D</sub> o J<sub>T</sub> dirigidos al par no canónico C-U asociado a la DM2. Diana hCCUG.

Para el estudio de los ligandos diseñados para el RNA tóxico relacionado con la DM2 era también necesario tener una diana de RNA que contuviese las repeticiones características de esta patología, el tetranucleótido CCUG. Teniendo en cuenta que el modelo hCUG había permitido llevar a cabo satisfactoriamente el estudio de los ligandos de DM1, se creyó apropiado sintetizar la misma estructura de tipo tallo-lazo con dos repeticiones de CCUG en vez de CUG. Así pues, se sintetizó el RNA 26-mer al que se hace referencia en el texto como hCCUG (Figura 2.31). La síntesis se llevó a cabo en fase sólida siguiendo la metodología estándar de síntesis de oligonucleótidos (ver *Materiales y Métodos*)<sup>[71]</sup> mediante un sintetizador automático. Se obtuvo la diana hCCUG con unos rendimientos de entre el 18 y el 20%.

En este apartado se describen y analizan los estudios biofísicos realizados con los ligandos diseñados para reconocer los *mismatches* C-U. El apartado se ha dividido en dos subapartados distintos según la base Janus que contienen los ligandos.



**Fig. 2.31.** Estructura tallo-lazo de la diana de RNA hCCUG que contiene un tallo con dos repeticiones del cuadruplete CCUG relacionado con la DM2.

#### 4.1. Ligandos que contienen $J_D$

Empleando la base Janus  $J_D$ , se sintetizaron dos ligandos tipo PNA, el monomérico  $J_DK$  y el dimérico  $J_DJ_DK$ . Para realizar los estudios biofísicos de estos ligandos se trabajó en condiciones de fuerza iónica baja con un tampón 10 mM fosfato ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) a pH 7.0.

##### 4.1.1. Desnaturalización térmica controlada por UV

Para empezar, se realizaron ensayos de desnaturalización térmica controlada por UV para comprobar el efecto de los ligandos sobre la  $T_m$  de la diana hCCUG. Los experimentos se llevaron a cabo de 20 a 90°C (desnaturalización y renaturalización) con un gradiente de 0.5°C/min. Inicialmente, se determinó la  $T_m$  de hCCUG y, posteriormente, se llevaron a cabo las fusiones en presencia de distintos equivalentes de los ligandos  $J_DK$  y  $J_DJ_DK$  (Tabla 2.10.). No se observó histéresis en ninguno de los experimentos.

$T_m$ (hCCUG, pH 7.0) = $68.4 \pm 0.8$ °C			
$T_m$ ( $\Delta T_m$ )			
Ligando	1 eq	2 eq	4 eq
$J_DK$	$67.9 \pm 0.5$ °C (-0.5°C)	$67.8 \pm 0.2$ °C (-0.6°C)	$67.9 \pm 0.0$ °C (-0.5°C)
$J_DJ_DK$	$68.0 \pm 0.3$ °C (-0.4°C)	$68.0 \pm 0.4$ °C (-0.4°C)	-

**Tabla 2.10.**  $T_m$  y  $\Delta T_m$  determinadas por desnaturalización térmica controlada por UV de hCCUG con el correspondiente ligando y número de equivalentes. Los valores presentados son la media de un mínimo de dos determinaciones. Condiciones: tampón 10 mM fosfato a pH 7.0.

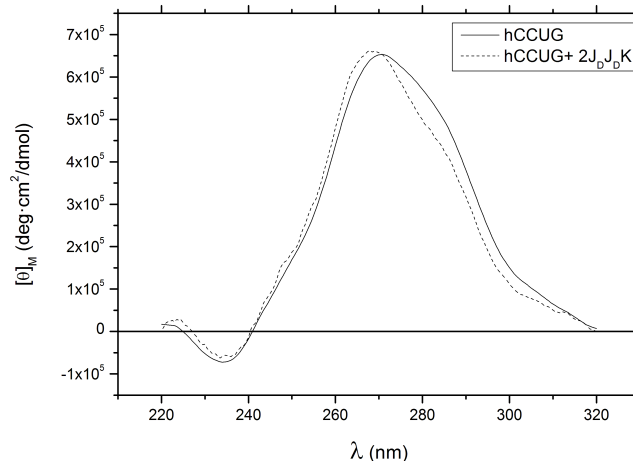
Como puede comprobarse en la tabla 2.10, los valores de  $\Delta T_m$  obtenidos son negativos, extremadamente pequeños y, en general, menores que la desviación estándar asociada a la  $T_m$ . Estos resultados sugerían que, o bien no existía interacción entre los ligandos y hCCUG, o bien que la interacción no afectaba prácticamente a la estabilidad térmica del *hairpin*. Teniendo en cuenta que los ligandos estudiados en el apartado anterior no afectan prácticamente la estructura de la diana hCCUG, se pensó que lo más probable fuese que sucediera lo mismo con estos ligandos.

Así pues, de los datos experimentales obtenidos se podría decir que los ligandos  $J_D K$  y  $J_D J_D K$  muestran un carácter débilmente desestabilizante aunque no parecen tener un efecto significativo en la estabilidad térmica de hCCUG.

#### 4.1.2. Dicroísmo circular

Con el objetivo de evaluar si los ligandos distorsionaban la estructura de la diana hCCUG, se registraron los espectros de DC del RNA en ausencia y presencia del ligando dimérico  $J_D J_D K$  pensando que posiblemente éste afectaría más la estructura de hCCUG que el ligando monomérico  $J_D K$ . Los espectros se registraron en el mismo tampón 10 mM de fosfato a pH 7.0 y entre una longitud de onda de 220 y 320 nm. El perfil de elipticidad de la diana hCCUG, al igual que hCUG, encajaba con una estructura de tipo A-RNA. Como puede observarse en la figura 2.32, presenta un máximo de absorción a 270 nm, un mínimo sobre 235 nm y una espalda relativamente pronunciada alrededor de los 285 nm, indicativa de la presencia del *loop*.<sup>[21,95-98]</sup>

El espectro de DC de hCCUG registrado en presencia de 2 eq del ligando  $J_D J_D K$  presentaba un pequeño desplazamiento hipsocrómico del máximo de absorción y un perfil algo diferente al del RNA solo (Figura 2.32). La variación producida, a pesar de no ser muy significativa, parecía indicar que había una cierta interacción entre  $J_D J_D K$  y hCCUG aunque la formación del complejo no modificase demasiado la estructura inicial de la diana.



**Fig. 2.32.** Superposición de los espectros de DC de hCCUG y hCCUG con 2 eq de  $J_D J_D K$ . Condiciones: Tampón 10 mM fosfato a pH 7.0,  $c_{\text{hCCUG}} = 2 \mu\text{M}$ .

También se llevaron a cabo experimentos de estabilidad térmica de hCCUG con el ligando dimérico  $J_D J_D K$  empleando el DC (Tabla 2.11).

El valor de  $\Delta T_m$  determinado, que podría llegar a considerarse nulo, corroboró las conclusiones obtenidas en los experimentos de desnaturalización térmica, es decir, que el ligando  $J_D J_D K$  no tiene casi ningún efecto, ni sobre la estructura del *hairpin* hCCUG ni en su estabilidad térmica.

$T_m$ (hCCUG)= 70.8 °C			
$T_m$ ( $\Delta T_m$ )			
Ligando	1 eq	2 eq	4 eq
$J_D J_D K$	-	71.0 °C (+0.2 °C)	-

**Tabla 2.11.** Valores de  $T_m$  y  $\Delta T_m$  determinados por DC de hCCUG y hCCUG con 2 eq de  $J_D J_D K$ . Datos correspondientes a una sola determinación. Condiciones: Tampón 10 mM de fosfato a pH 7.0,  $c_{oligo}$ = 2  $\mu$ M.

#### 4.1.3. Calorimetría de valoración isotérmica

Como punto de partida se emplearon las mismas condiciones y parámetros experimentales que en los experimentos con la base  $J_T$  y la diana hCUG, es decir, en un tampón 10 mM fosfato a pH 7.0 y a 25°C. Los parámetros termodinámicos determinados se muestran en la Tabla 2.12. Es importante destacar que el termograma obtenido con ambos ligandos mostraba unos considerables calores asociados a la interacción que permitieron un buen ajuste a un modelo independiente.

Parámetro termodinámico	$J_D K$	$J_D J_D K$
$K_d$ ( $\mu$ M)	15.0 $\pm$ 1.4	6.1 $\pm$ 0.8
n	2.01 $\pm$ 0.22	2.39 $\pm$ 0.12
$\Delta H$ (KJ/mol)	-10.1 $\pm$ 1.6	-9.2 $\pm$ 0.7
$\Delta S$ (J/mol·K)	58.4	69.0
$-T \cdot \Delta S$ (KJ/mol)	-17.4	-20.6
$\Delta G$ (KJ/mol)	-27.5	-29.8

**Tabla 2.12.** Parámetros termodinámicos a 25°C de la unión entre hCCUG y los ligandos  $J_D K$  y  $J_D J_D K$ . Condiciones: Tampón 10 mM fosfato a pH 7.0,  $c_{hCCUG}$ = 10  $\mu$ M,  $c_{(ligando)}$ = 500  $\mu$ M.

#### Constante de disociación y estequiometría de los complejos.

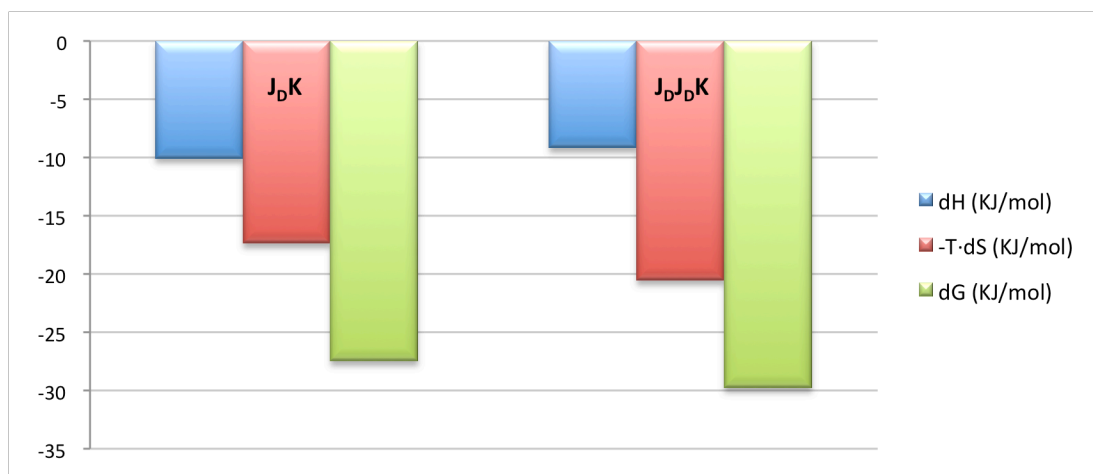
La constante de disociación obtenida para el ligando monomérico  $J_D K$  ( $K_d$ = 15  $\mu$ M) indica que su afinidad por la diana hCCUG no es demasiado grande. Sin embargo, el ligando dimérico  $J_D J_D K$ , que pretendía interactuar con los dos pares C·U contiguos, muestra una afinidad por la diana sustancialmente mayor, que se traduce en una constante del orden  $\mu$ molar bajo ( $K_d$ = 6.1  $\mu$ M).

En cuanto a la estequiometría de los complejos, en los dos casos se obtuvo una relación 2:1 (ligando-hCCUG). En el caso del ligando dimérico, la estequiometría obtenida es la esperada, ya que cada *hairpin* hCCUG contiene dos *loops* internos con dos *mismatches* C·U que pueden ser reconocidos por un ligando  $J_D J_D K$ . Para el ligando  $J_D K$  se obtuvo la misma estequiometría aunque podía haberse esperado una relación ligando-hCCUG 4:1 indicando que cada ligando interactuaba con un par C·U. El valor obtenido hace pensar que cada *loop* interno 5'CU/UC3' solo puede acomodar un ligando monomérico  $J_D K$ . Por lo visto, la interacción de  $J_D K$  con un par C·U debe provocar un impedimento estérico (o de otro tipo) que inhibe la unión de otro

ligando en el mismo *loop* reconociendo el otro par C·U.

*Contribución de los efectos entálpicos y entrópicos a la unión.*

En cuanto a las contribuciones energéticas de la interacción, a diferencia de los ligandos de DM1 (ver *Apartado 3, Capítulo 2*), tanto la contribución entálpica como la entrópica son favorables a la interacción y, en este caso, es el factor entrópico el que parece dirigirla (Figura 2.33.).



**Fig. 2.33.** Contribuciones energéticas a 25°C de la interacción de los ligandos con  $J_DK$  y  $J_DJ_DK$  con la diana hCCUG.

La interacción de  $J_DK$  y  $J_DJ_DK$  con hCCUG es exotérmica. El valor de  $\Delta H$  para ambos ligandos es muy parecido, incluso algo menor para el ligando dimérico  $J_DJ_DK$ . Este hecho resulta sorprendente puesto que, en principio, lo que podría esperarse es que la  $\Delta H$  asociada a la unión del ligando dimérico fuera aproximadamente el doble que la del monomérico. Teniendo en cuenta que el valor de  $\Delta H$  refleja todo un conjunto de fenómenos relacionados con las interacciones no covalentes entre el ligando y la diana, se podría interpretar que la unión del ligando dimérico rompe o debilita algunos enlaces como consecuencia de su introducción entre los pares C·U. Por ejemplo, ya se ha comentado en la introducción de esta tesis que en una estructura de dúplex con repeticiones CCUG se observan mediante rayos X dos enlaces de hidrógeno entre Cs y Us. Estos enlaces deberían romperse para que se produjera la interacción con  $J_D$ , aunque no parece que ello justifique la entalpías de interacción observadas pues  $J_DJ_DK$  debería romper el doble de enlaces C·U que  $J_DK$ , a la vez que formaría el doble de enlaces de hidrógeno actuando de Janus de los pares C·U. Sin embargo, podría plantearse que los pares C-G anteriores y posteriores a los dos pares C·U se vieran debilitados por la introducción de la cuña  $J_DJ_DK$  en el *loop* interno, cosa que no sucede con  $J_DK$ . Por otro lado, podría también interpretarse que para que se produzca la unión de  $J_DJ_DK$  y hCCUG, deba romperse primero alguna interacción (intra o intermolecular) del propio ligando. Alternativamente, podría pensarse que el residuo de lisina del ligando  $J_DK$  aporta alguna contribución a la unión que no tiene lugar con  $J_DJ_DK$ .

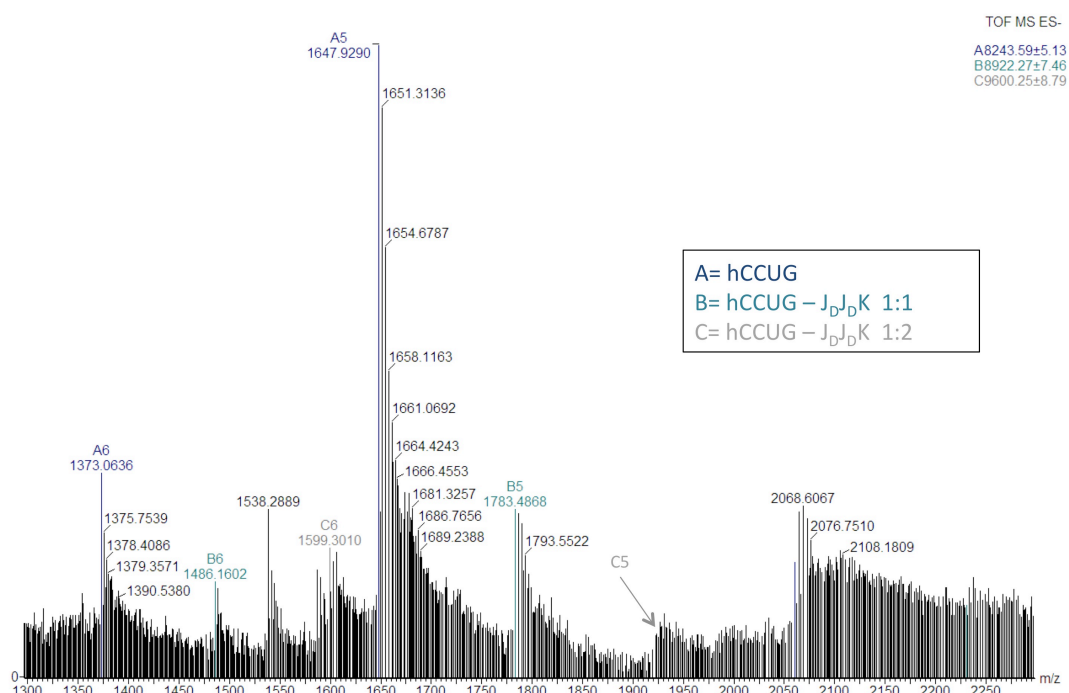
El factor entrópico es favorable a la interacción y es el término que predomina y la dirige. Por lo general, las interacciones dirigidas entrópicamente están asociadas a los ligandos de los surcos del DNA.<sup>[28]</sup> Un cambio positivo en la entropía suele atribuirse, principalmente, a efectos del disolvente, y es una importante indicación de que se liberan moléculas de agua, así como cationes, de los alrededores de las moléculas implicadas en la formación del complejo.

Existen evidencias de la presencia de una molécula de agua entre las nucleobases C y U que conforman el *mismatch* C·U,<sup>[126,127]</sup> la liberación de esta molécula sería favorable al término entrópico. Por otro lado, aunque posiblemente sea menos trascendente en comparación con los ligandos diméricos de DM1 estudiados (ver *Apartado 3, Capítulo 2*) que sufren un castigo entrópico muy elevado en su unión con hCUG, los ligandos  $J_D K$  y  $J_D J_D K$  no presentan tanta libertad conformacional. Por ello, el coste asociado a la pérdida de grados de libertad podría ser inferior para los ligandos con  $J_D$ .

En resumen, mediante la ITC se ha podido estudiar y caracterizar la unión entre los ligandos formados por la base Janus  $J_D$  y hCCUG. Ambos ligandos forman complejos de estequiometría 2:1 (ligando-hCCUG) y el ligando dimérico  $J_D J_D K$  presenta una afinidad del orden  $\mu$ molar bajo. La unión está dirigida entrópicamente y muestra un perfil termodinámico de interacción completamente distinto al de los ligandos con la base Janus  $J_T$ .

#### 4.1.4. Espectrometría de masas

La estequiometría de los complejos hCCUG- $J_D K$  y hCCUG- $J_D J_D K$  se había determinado mediante los experimentos de ITC. No obstante, se decidió corroborar los valores obtenidos mediante otra técnica, la espectrometría de masas con ionización por ESI. Para ello, se escogió el ligando dimérico  $J_D J_D K$  ya que presentaba mayor afinidad por hCCUG y se disponía de mayor cantidad (Figura 2.34).



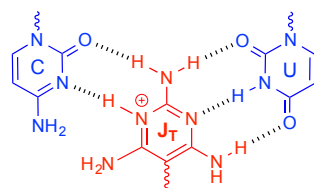
**Fig. 2.34.** Espectro de EM-ESI de los complejos formados entre hCCUG y  $J_D J_D K$ . Se observan los iones multicargados de distintas especies resaltadas en distintos colores. El número que sigue a la letra (A, B y C) indica el número de cargas (z) que posee cada especie observada.

La resolución de este espectro no fue tan buena como la obtenida en los anteriores ensayos. Pese a ello, se detectaron tres grupos de señales correspondientes a hCCUG libre y a los complejos hCCUG- $J_D J_D K$  1:1 y 1:2 con distinto número de carga ( $z=5-6$ ). De nuevo, se confirmó la estequiometría obtenida mediante ITC, es decir que se unen dos ligandos  $J_D J_D K$  a cada

estructura hCCUG, muy probablemente interaccionando cada uno de ellos con un *loop* interno 5'-CU/UC-3'.

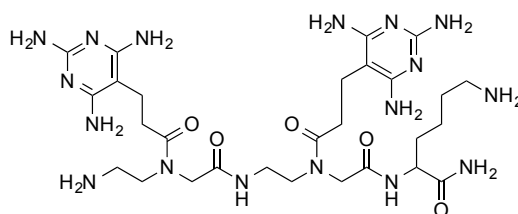
#### 4.2. Ligandos con J<sub>T</sub> para la diana hCCUG

Habiendo definido experimentalmente que el pK<sub>a</sub> de la base J<sub>T</sub> tiene un valor de  $7.07 \pm 0.02$  (ver *Apartado 3.1.1., Capítulo 1*), en condiciones de pH neutras la especie ácida y la básica coexisten con una relación casi equimolar. Analizando el perfil dador-aceptor de enlaces de hidrógeno de ambas caras de la especie protonada de J<sub>T</sub> se observó que, sobre el papel, podía reconocer el par no canónico C·U mediante cinco enlaces de hidrógeno (Figura 2.35).



**Fig. 2.35** Interacción de la base J<sub>T</sub> protonada con el par no-canónico C·U presente en la estructura de RNA tóxico asociado a la DM2.

Teniendo en cuenta estos hechos, se realizó un estudio preliminar de ITC con el ligando ya sintetizado J<sub>T</sub>K a pH 5.50 y 7.0 (Tabla 2.15) y, observando unos resultados bastante interesantes debido a su dependencia del pH, se decidió sintetizar un nuevo ligando dimérico con dos bases J<sub>T</sub> consecutivas para poder interaccionar con los dos *mismatches* que conforman los *loops* internos de la estructura CCUG<sub>n</sub> (Figura 2.36). La síntesis del PNA se llevó a cabo mediante síntesis en fase sólida empleando las mismas condiciones que anteriormente (ver *P.Exp. Capítulo 2*) obteniendo el ligando con un rendimiento del 41%.



**Fig. 2.36.** Ligando J<sub>T</sub>J<sub>T</sub>K diseñado para la diana CCUG<sub>n</sub> relacionada con la DM2.

Obtenido el ligando, se procedió con el estudio biofísico de su interacción con la diana hCCUG. La interacción óptima debía tener lugar a pH ácido, por lo que la mayoría de los ensayos biofísicos que se explican a continuación se llevaron a cabo a pHs 5.50 y 7.0 para analizar la dependencia de la interacción con el pH.

##### 4.2.1. Desnaturalización térmica controlada por UV

En primer lugar, se analizó el efecto que los ligandos J<sub>T</sub>K y J<sub>T</sub>J<sub>T</sub>K provocan sobre la estabilidad térmica del *hairpin* hCCUG. Mediante espectroscopía UV, se determinó la T<sub>m</sub> de hCCUG a pH

5.50 y, posteriormente, se registraron curvas de fusión con distinto número de equivalentes de ambos ligandos a pH 5.50 y 7.0 (Tabla 2.13).

<b><math>T_m</math> (<math>\Delta T_m</math>) (°C) pH 5.5</b>			
$T_m$ (hCCUG, pH 5.5)= 74.2 ± 0.4 °C			
Ligando	1 eq	2 eq	4 eq
<b>J<sub>T</sub>K</b>	74.3 ± 0.8 °C (+0.1°C)	73.8 ± 0.4 °C (-0.4°C)	73.5 ± 0.4 °C (-0.7°C)
<b>J<sub>T</sub>J<sub>T</sub>K</b>	74.2 ± 0.1 °C (0.0°C)	73.7 ± 1.2 °C (-0.5°C)	-
<b><math>T_m</math> (<math>\Delta T_m</math>)(°C) pH 7.0</b>			
$T_m$ (hCCUG, pH 7.0)= 68.4 ± 0.8 °C			
<b>J<sub>T</sub>J<sub>T</sub>K</b>	68.5 ± 1.1 °C (+0.1°C)	68.9 ± 0.6 °C (+0.5°C)	-

**Tabla 2.13.**  $T_m$  y  $\Delta T_m$  determinadas por desnaturalización térmica controlada por UV de hCCUG el correspondiente ligando y número de equivalentes. Los valores son la media de un mínimo de dos determinaciones. Condiciones: tampón 10 mM de fosfato al pH indicado.

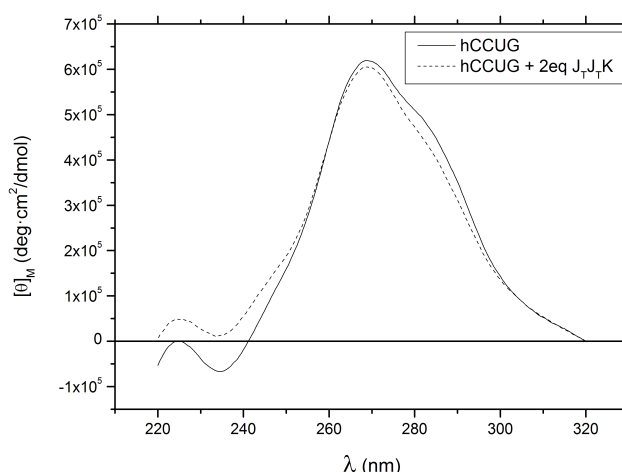
En la misma línea que los ligandos con  $J_D$ , los valores de  $\Delta T_m$  determinados son muy pequeños y pueden considerarse prácticamente nulos. Sin embargo, en este caso se apreciaba una cierta diferencia en los resultados obtenidos: a pH 5.50, condiciones en las que la base Janus está mayoritariamente protonada, los ligandos parecían desestabilizar la estructura del *hairpin*, mientras que, a pH 7.0, en el que coexisten la forma básica y ácida de  $J_T$ , el ligando dimérico estabilizaba ligeramente hCCUG. En ambos casos se observaba una correlación entre el número de equivalentes de ligando y la  $\Delta T_m$ . Al aumentar la relación ligando:RNA a pH ácido, se aprecia una disminución progresiva de la  $T_m$  mientras que, a pH neutro, se produce un aumento.

No obstante, teniendo en cuenta que las  $\Delta T_m$  obtenidas son muy pequeñas y, en algunos casos incluso inferiores a la desviación de la  $T_m$  y al error del método, no se pueden obtener conclusiones fiables sobre el efecto de los ligandos en la estabilidad térmica de hCCUG.

#### 4.2.2. Dicroísmo circular

Con el objetivo de determinar si el ligando dimérico  $J_T J_T K$  perturba la estructura del *hairpin* hCCUG a pH ácido, se registraron los espectros de DC a pH 5.5 del RNA solo y en presencia de 2 equivalentes del ligando. Teniendo en cuenta la experiencia previa, no fue ninguna sorpresa no observar cambios importantes en el perfil de elipticidad de hCCUG en presencia de  $J_T J_T K$  (Figura 2.37). Del mismo modo que los ligandos con la base  $J_D$ ,  $J_T J_T K$  no parece modificar la estructura de hCCUG a pH ácido.





**Fig. 2.37.** Superposición de los espectros de DC de hCCUG y hCCUG con 2 eq de J<sub>7</sub>J<sub>7</sub>K. Condiciones: Tampón 10 mM fosfato a pH 5.5, c<sub>hCCUG</sub> = 2 μM.

También se llevaron a cabo experimentos de estabilidad térmica empleando el DC a pH 5.5. Se estudió hCCUG solo y en presencia de 2 equivalentes del ligando dimérico J<sub>7</sub>J<sub>7</sub>K (Tabla 2.14).

<b>T<sub>m</sub> (hCCUG, pH 5.5) = 74.6 °C</b>		
<b>T<sub>m</sub> (ΔT<sub>m</sub>)(°C)</b>		
<b>Ligando</b>	<b>1 eq</b>	<b>2 eq</b>
<b>J<sub>7</sub>J<sub>7</sub>K</b>	-	<b>74.2 °C</b> <b>(-0.4°C)</b>

**Tabla 2.14.** Valores de T<sub>m</sub> y ΔT<sub>m</sub> determinados por DC de hCCUG y hCCUG con 2 eq de J<sub>7</sub>J<sub>7</sub>K. Datos correspondientes a una sola determinación. Condiciones: tampón 10 mM de fosfato a pH 5.5, c<sub>oligo</sub> = 2 μM.

La ΔT<sub>m</sub> obtenida por DC, que es la misma que la determinada empleando la espectroscopia UV, indica que el ligando desestabiliza ligeramente la diana hCCUG. A pesar de ello, se trata de un valor tan pequeño que no se pueden sacar unas conclusiones definitivas.

Hasta este punto y, como en los anteriores estudios de la interacción ligando-diana sucedía, los ensayos biofísicos realizados parecen indicar que no se modifica sustancialmente la estructura de hCCUG debido a su interacción con los ligandos J<sub>7</sub>K y J<sub>7</sub>J<sub>7</sub>K ni a pH 5.5 ni a 7.0.

#### 4.2.3. Calorimetría de valoración isotérmica

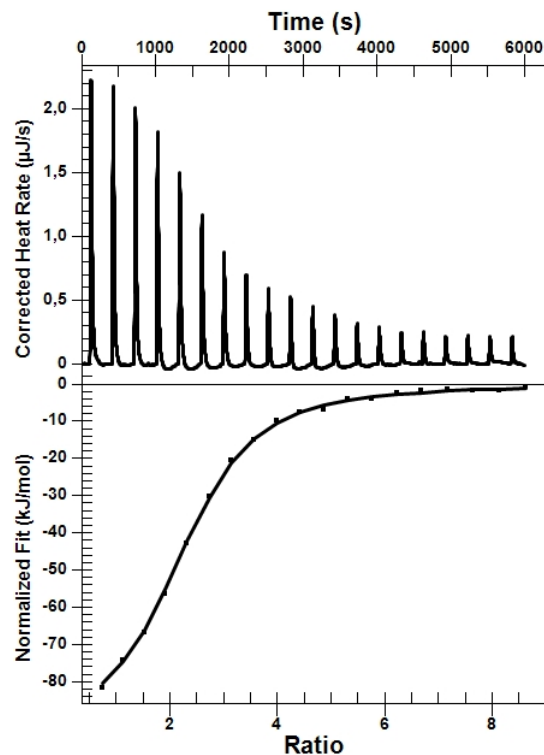
El objetivo del estudio preliminar de ITC del ligando J<sub>7</sub>K con hCCUG era determinar si existía o no alguna interacción entre ellos y, si tenía lugar la complejación, parecía interesante determinar sus parámetros termodinámicos así como estudiar su dependencia con el pH. Como se ha comentado, al observar que la interacción liberaba un gran calor y que existía una importante dependencia del pH, se procedió con la síntesis y el estudio del ligando dimérico J<sub>7</sub>J<sub>7</sub>K.

Así pues, se procedió con un estudio exhaustivo de los ligandos  $J_TK$  y  $J_TJ_TK$  a pH 5.5 y 7.0 (Tabla 2.15).

Parámetro termodinámico	pH=5.5		pH=7.0	
	$J_TK$	$J_TJ_TK$	$J_TK$	$J_TJ_TK$
$K_d$ ( $\mu M$ )	$10.1 \pm 0.8$	$2.6 \pm 0.1$	$63.5 \pm 2.9$	$14.5 \pm 1.2$
n	$2.03 \pm 0.10$	$2.24 \pm 0.23$	-	$1.88 \pm 0.12$
$\Delta H$ (KJ/mol)	$-47.3 \pm 2.63$	$-95.9 \pm 2.8$	$-32.3 \pm 0.9$	$-56.3 \pm 4.5$
$\Delta S$ (J/mol·K)	-62.9	-214.5	-30.7	-96.3
$-T \cdot \Delta S$ (KJ/mol)	18.7	64.0	9.2	28.7
$\Delta G$ (KJ/mol)	-28.5	-31.9	-23.2	-27.6

**Tabla 2.15.** Parámetros termodinámicos a 25°C de la unión entre hCCUG y los ligandos  $J_TK$  y  $J_TJ_TK$ . Condiciones: Tampón 10 mM fosfato a pH indicado,  $C_{hCCUG} = 10 \mu M$ ,  $C_{(ligando)} = 500 \mu M$ .

El termograma registrado en la valoración de  $J_TJ_TK$  sobre hCCUG a pH 5.5 y su ajuste a la isoterma fueron casi inmejorables (Figura 2.38) y, asombrosamente, la constante de disociación obtenida era mejor que cualquiera de las determinadas anteriormente ( $K_d = 2.6 \mu M$ ).



**Figura 2.38.** Termograma a 25°C del ligando  $J_TJ_TK$  sobre hCCUG (parte superior) y ajuste de los datos a la isoterma (parte inferior). El blanco ha sido restado. Tampón 10 mM fosfato a pH 5.5.  $C_{hCCUG} = 10 \mu M$  y  $C_{Ligando} = 500 \mu M$ .

*Constante de disociación y estequiometría de los complejos.*

Si se comparan las constantes de disociación ( $K_d$ ) obtenidas, se puede observar que, por un lado, el ligando dimérico presenta mayor afinidad por la diana que el monomérico y, por otro lado, que el pH tiene un impacto importante en el valor de la  $K_d$ .

En cuanto a la primera observación, la  $K_d$  de  $J_T J_T K$  es, a ambos pHs, unas cuatro veces mejor que la del ligando monomérico. Ello no es de extrañar puesto que el ligando dimérico puede establecer mayor número de interacciones con la diana que el monomérico. La afinidad de  $J_T J_T K$  a pH 5.5 por hCCUG es del orden  $\mu M$  bajo ( $K_d = 2.6 \mu M$ ) y es una de las mejores  $K_d$  obtenidas en esta tesis doctoral. La constante obtenida para el ligando monomérico a pH 5.50 ( $K_d = 10.1 \mu M$ ) también puede considerarse bastante buena teniendo en cuenta que es del mismo orden que la obtenida para el mismo ligando con la diana hCUG a pH neutro ( $K_d = 9.7 \mu M$ ).

En cuanto a la dependencia del pH, para ambos ligandos puede observarse que la afinidad por hCCUG es unas seis veces mayor a pH ácido que a pH neutro. A pH 7.0, ambos ligandos parecen interactuar con la diana, pero la afinidad por ella se ve muy reducida.

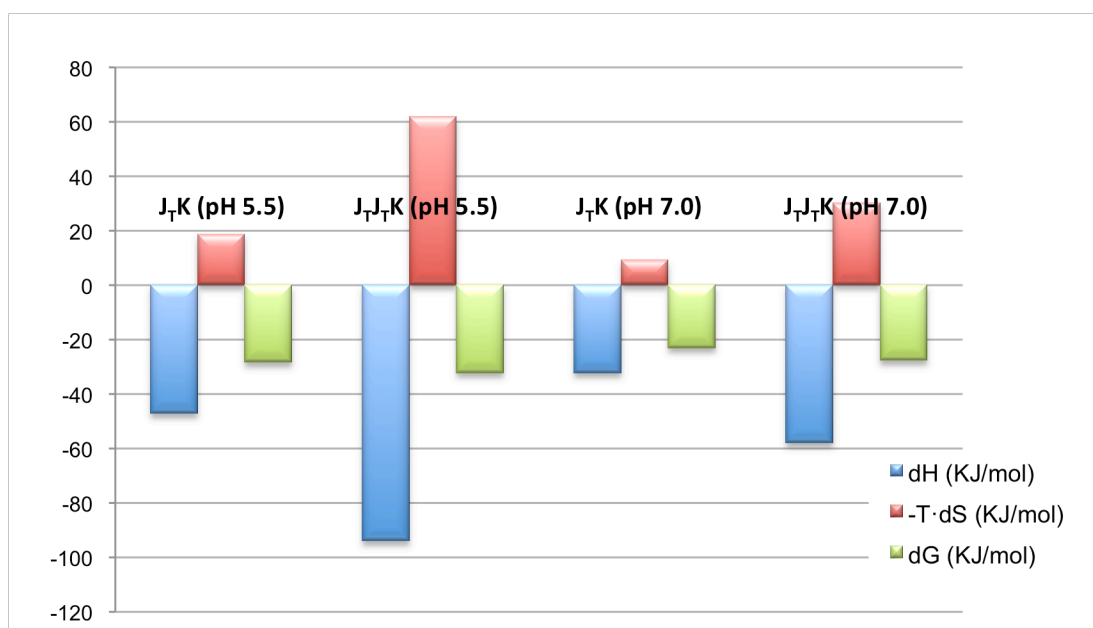
La estequiometría de los complejos es en todos los casos de 2:1 (ligando-RNA). Estos resultados se pueden interpretar del mismo modo que se ha hecho para los ligandos con la base  $J_D$  (ver *Apartado 4.1.3., Capítulo 2*), es decir, entendiendo que cada ligando interactúa con un *loop* interno formado por dos pares consecutivos C-U. Hay que decir que, debido a la elevada constante de disociación que presenta  $J_T K$  por hCCUG a pH 7.0, el ajuste de la isoterma dio valores de  $n$  con mucho error asociado y sin interpretación posible ( $n$  próximos a cero).

*Contribución de los efectos entálpicos y entrópicos a la unión.*

En cuanto a las contribuciones energéticas de la interacción (Figura 2.39), en todos los casos la unión es exotérmica y está dirigida entálpicamente. Sin embargo, los valores entrópicos son completamente desfavorables a la complejación ( $\Delta S < 0$ ). Así pues, los ligandos presentan un perfil de unión de tipo intercalante, tal y como sucedía con los ligandos con esta misma base y la diana hCUG. Hay que destacar que este perfil de interacción se aparta del que tienen los ligandos con  $J_D$  con la diana hCCUG ( $\Delta H < 0$ ,  $\Delta S > 0$ ) en que ambas contribuciones son favorables y es la entrópica la que dirige la formación del complejo.

A los dos pHs estudiados, la interacción del ligando dimérico es el doble de exotérmica que la del ligando monomérico, lo que es totalmente coherente con el hecho que el ligando dimérico puede establecer el doble de enlaces de hidrógeno con la diana. También se puede observar una compensación entálpico-entrópica, pues cuanto más exotérmica es la interacción, más desfavorable es la variación de entropía.

Así pues, aunque la base Janus  $J_T$  no se diseñó para reconocer los apareamientos no canónicos C-U, se ha podido comprobar mediante ensayos biofísicos que a pHs ácidos  $J_T$  es capaz de reconocerlos y unirse a ellos con gran afinidad. Concretamente, el ligando dimérico  $J_T J_T K$  se une al *hairpin* hCCUG a pH 5.5 con una  $K_d$  del orden  $\mu M$  bajo para formar un complejo 2:1 ( $J_T J_T K$ - hCCUG). Ciertamente, el interés práctico de esta observación es por ahora limitado ya que la afinidad de los ligandos con  $J_T$  por hCCUG a pH fisiológico es muy baja ( $J_T K$ ) o intermedia ( $J_T J_T K$ ), además de ser inferior a la de  $J_D J_D K$ .



**Fig. 2.39.** Contribuciones energéticas a 25°C de la interacción de los ligandos con J<sub>T</sub>K y J<sub>T</sub>J<sub>T</sub>K con la diana hCCUG al pH especificado.

## 5. Evaluación de los ligandos que contienen la base Janus J<sub>w</sub>

Paralelamente al estudio de los complejos descritos en los apartados anteriores, se realizaron ensayos biofísicos con los ligandos que contenían la base Janus J<sub>w</sub>, diseñada para reconocer el par canónico C-G. Como ya se ha comentado en el capítulo anterior, se sintetizaron ligandos tipo PNA con la Base J<sub>w</sub> únicamente o en combinación con J<sub>T</sub>, con el objetivo de interactuar con dianas de RNA de DM1 o bien, en combinación con J<sub>D</sub>, para unirse a dianas de DM2. En este apartado se describe el comportamiento de todos los ligandos que contienen J<sub>w</sub> y, para mayor claridad, se ha dividido la discusión en dos subapartados, uno para cada diana estudiada: la diana hCUG de DM1 y la diana hCCUG de DM2.

Antes de entrar los detalles de los ensayos, hay que decir que las expectativas que se tenían respecto al comportamiento de los ligandos con J<sub>w</sub> eran más bien escasas. Las bases Janus J<sub>T</sub> y J<sub>D</sub> estaban pensadas para introducirse como cuña entre los pares no canónicos pirimidínicos U·U y C·U, respectivamente. De lo contrario, J<sub>w</sub> estaba diseñada para hacer de cuña en un par canónico G-C, es decir, un par purina-pirimidina, por lo que la distorsión que produciría en el dúplex de RNA debía ser superior que la ejercida por J<sub>T</sub> y J<sub>D</sub>. Así pues, probablemente, la interacción no estaría tan favorecida.

### 5.1. Ligandos con las bases Janus J<sub>w</sub> y J<sub>T</sub> dirigidos a la diana hCUG

Se realizaron estudios de desnaturalización térmica y de DC con la diana G(CUG)<sub>4</sub>C y el ligando monomérico J<sub>w</sub>K. Los resultados fueron análogos a los obtenidos para los ligandos que sólo contenían J<sub>T</sub>, es decir, que la estructuración deficiente de G(CUG)<sub>4</sub>C no permitió obtener datos reproducibles ni fiables de los experimentos realizados (ver *P. Exp. Capítulo 2*).

### 5.1.1. Condiciones de fuerza iónica alta

Con la diana hCUG se llevaron a cabo algunos ensayos de desnaturalización térmica en condiciones de fuerza iónica alta con los ligandos  $J_WK$ ,  $J_TJ_WK$ ,  $J_WJ_TK$ ,  $J_WJ_TJ_WK$  y  $J_TJ_WJ_WJ_TK$ . Análogamente a cómo sucedió con los ligandos comentados en el *Apartado 3.2.1.1* de este capítulo, las curvas obtenidas presentaron histéresis y, a pesar de determinar los valores de  $\Delta T_m$ , la única conclusión que pudo extraerse fue que parecía existir una interacción de los ligandos con hCUG (ver *P. Exp. Capítulo 2*). De las valoraciones por DC de  $J_WK$  sobre hCUG se determinó que el ligando no modifica significativamente la estructura del RNA por lo que, teniendo en cuenta que tampoco se habían obtenido cambios en el perfil de elipticidad de los ligandos con  $J_T$ , se decidió no proseguir con el resto de ligandos en los que se combinaban ambas Janus. Finalmente, se estudió mediante ITC la posible interacción de  $J_WK$ ,  $J_TJ_WK$ ,  $J_WJ_TK$  y  $J_WJ_TJ_WK$  con hCUG. No se obtuvieron datos termodinámicos de la interacción entre el ligando monomérico  $J_WK$  y hCUG puesto que los calores registrados tras cada inyección correspondían al calor de dilución de la solución de ligando en la celda de la muestra. Sin embargo, con los ligandos diméricos  $J_TJ_WK$  y  $J_WJ_TK$  y el trimérico  $J_WJ_TJ_WK$  se pudo registrar un pequeño calor asociado a la interacción, sin embargo, el ajuste de los datos a la isoterma fueron muy defectuosos y los valores obtenidos muy poco reproducibles.

La discusión de la problemática experimentada en los ensayos biofísicos en condiciones de fuerza iónica alta realizada en el *Apartado 3.2.1.* de este capítulo puede hacerse extensiva a estos ligandos. Además, teniendo en cuenta que de los ensayos aquí resumidos no se pudieron obtener datos sólidos de la interacción, se ha creído conveniente trasladarlos a la *Parte Experimental (Capítulo 2)* de esta tesis.

A continuación solo se detallará el análisis y discusión de los ensayos realizados con hCUG en condiciones de fuerza iónica baja.

### 5.1.2. Condiciones de fuerza iónica baja

En este apartado se describen los resultados obtenidos del estudio mediante técnicas biofísicas de los ligandos  $J_WK$ ,  $J_WJ_WK$ ,  $J_TJ_WK$ ,  $J_WJ_TK$ ,  $J_WJ_TJ_WK$  y  $J_TJ_WJ_WJ_TK$  con la diana hCUG en un tampón 10 mM fosfato a pH 7.0.

#### 5.1.2.1. Desnaturalización térmica controlada por UV

Para realizar un estudio preliminar del posible efecto de los ligandos sobre la estabilidad térmica de hCUG se escogió  $J_WK$ , para ver qué efecto tenía la nueva base Janus, y  $J_TJ_WK$ , en el que  $J_W$  se combinaba con  $J_T$ . Se registraron curvas de desnaturalización (*melting* y *annealing*) controlando la absorción a 260 nm y con un gradiente de 0.5°C/min, pudiéndose comprobar que no se producía histéresis (Tabla 2.16).

Las conclusiones a las que se llegó a partir de las  $\Delta T_m$  determinadas son las mismas que para los ligandos anteriormente estudiados. Las variaciones de  $T_m$  ( $\Delta T_m$ ) son tan pequeñas que casi podrían considerarse nulas. Incluso en algunos casos, la desviación estándar asociada al valor de  $T_m$  es superior a la  $\Delta T_m$  determinada. Tal vez, la única salvedad es que  $J_WK$  parece desestabilizar el *hairpin* de hCUG, aunque sólo ligeramente. Menos consistentes son las  $\Delta T_m$

asociadas a  $J_TJ_WK$ , pues no hay ninguna correlación clara con el número de equivalentes de ligando.

$T_m$ (hCUG, pH 7.0) = $63.2 \pm 0.2$ °C			
$T_m$ ( $\Delta T_m$ ) (°C)			
Ligando	1 eq	2 eq	4 eq
$J_WK$	$63.2 \pm 0.0$ °C (0.0°C)	$62.9 \pm 0.0$ °C (-0.3°C)	$62.4 \pm 0.1$ °C (-0.8°C)
$J_TJ_WK$	$62.9 \pm 0.5$ °C (-0.3°C)	$62.9 \pm 0.5$ °C (-0.3°C)	$62.8 \pm 0.5$ °C (-0.5°C)

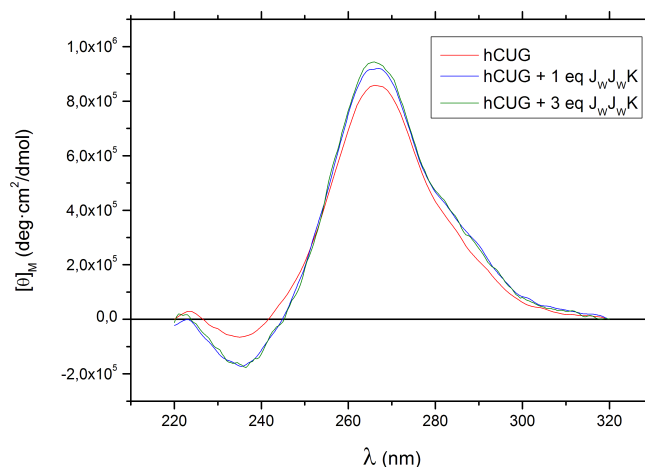
**Tabla 2.16.**  $T_m$  y  $\Delta T_m$  determinadas por desnaturalización térmica controlada por UV de hCUG con el correspondiente ligando y número de equivalentes. Los valores presentados son la media de un mínimo de dos curvas. Condiciones: tampón 10 mM fosfatos a pH 7.0.

### 5.1.2.2. Dicroísmo Circular

Se realizaron valoraciones por DC con el objetivo de determinar si alguno de los ligandos modificaba la estructura del RNA diana. Se eligieron los ligandos de mayor tamaño pensando en poder detectar la mayor distorsión posible del *hairpin*:  $J_WJ_WK$ , como ligando con solo  $J_W$ , y  $J_TJ_WJ_WJ_TK$ , como representante de los ligandos en los que se combinan las dos bases Janus (Figura 2.40).

Los cambios en la elipticidad de hCUG producidos por los ligandos estudiados eran muy pequeños en ambos casos, prueba de que prácticamente no se modifica la estructura de la diana. De nuevo, los ligandos estudiados parecen no modificar la estructura del *hairpin* hCUG. Simplemente mencionar, casi como curiosidad, que por primera vez se observó un aumento de la elipticidad como resultado de la interacción de  $J_WJ_WK$  con hCUG.

Se creyó innecesario proseguir con el resto de ligandos.



**Fig. 2.40.** Superposición de los espectros de DC de hCUG y hCUG con  $J_WJ_WK$ . Condiciones: Tampón 10 mM fosfato a pH 7.0,  $c_{hCUG} = 2$   $\mu$ M.

### 5.1.2.3. Calorimetría de valoración isotérmica

La ITC había sido hasta este punto la técnica que había aportado más información acerca de la interacción entre los ligandos sintetizados y la correspondiente diana. Por este motivo, se decidió realizar algunos experimentos de ITC en las condiciones optimizadas anteriormente y determinar si existía, o no, interacción entre los ligandos con  $J_W$  y hCUG.

El estudio se inició con los ligandos que solo contenían la nueva base  $J_W$ . Sin embargo, ni para el ligando monomérico  $J_WK$  ni para el dimérico  $J_WJ_WK$  se consiguió obtener un termograma con suficiente calor asociado a la interacción. En cada inyección solo se detectó el calor de dilución de la solución de ligando en la celda de la muestra. Estos resultados parecían indicar que la Base  $J_W$  no era capaz de introducirse por sí sola entre los pares C-G del *hairpin* hCUG. Analizando con detalle el estudio publicado por McLaughlin donde se describe  $J_W$  como cuña Janus del par C-G, se vio que no se mencionaba la capacidad de  $J_W$  para reconocer pares C-G aislados, es decir, que se empleaba un PNA 8-mer con una  $J_W$  exclusivamente combinada con otra Janus capaz de reconocer *mismatches* pirimidínicos.<sup>[129]</sup> Se pensó entonces en la posibilidad de que  $J_W$  no fuese capaz de introducirse entre un par canónico C-G, pues posiblemente su introducción distorsionaría demasiado el dúplex de hCUG además de requerir la rotura de los enlaces de hidrógeno del par Watson-Crick. Ya que los ligandos que contenían exclusivamente  $J_T$  presentaban buenas afinidades, se pensó que tal vez los ligandos en los que se combinaban ambas bases darían mejores resultados. Quizá, si  $J_T$  se introducía entre un par U·U, la base  $J_W$  del mismo ligando podría reconocer más fácilmente el par C-G contiguo. Así pues, se procedió con los ensayos del resto de ligandos.

Los calores obtenidos asociados a la interacción no fueron muy grandes y, generalmente, no se llegó a la saturación completa de la diana debido a las pequeñas afinidades de los ligandos. No obstante, los ajustes se realizaron a un modelo independiente sin demasiado error asociado (Tabla 2.17).

Parámetro termodinámico	$J_TJ_WK$	$J_WJ_TK$	$J_WJ_TJ_WK$	$J_TJ_WJ_WJ_TK$
$K_d$ ( $\mu\text{M}$ )	$46.7 \pm 3.8$	$47.3 \pm 2.8$	$100.1 \pm 4.6$	$37.3 \pm 2.9$
n	$2.40 \pm 0.36$	$2.14 \pm 0.22$	$1.78 \pm 0.17$	$2.85 \pm 0.28$
$\Delta H$ (KJ/mol)	$-79.9 \pm 15.4$	$-85.5 \pm 10.5$	$-113.6 \pm 9.0$	$-90.3 \pm 4.1$
$\Delta S$ (J/mol·K)	-185.3	-203.9	-304.4	-222.4
$-T \cdot \Delta S$ (KJ/mol)	55.3	60.8	90.8	66.3
$\Delta G$ (KJ/mol)	-24.7	-24.7	-22.8	-24.0

**Tabla 2.17.** Parámetros termodinámicos a 25°C de la unión entre hCUG y el ligando indicado: Tampón 10 mM fosfato a pH 7.0,  $c_{\text{hCUG}} = 10 \mu\text{M}$ ,  $c_{(\text{ligandos})} = 500 \mu\text{M}$ .

*Constantes de disociación y estequiometría de los complejos.*

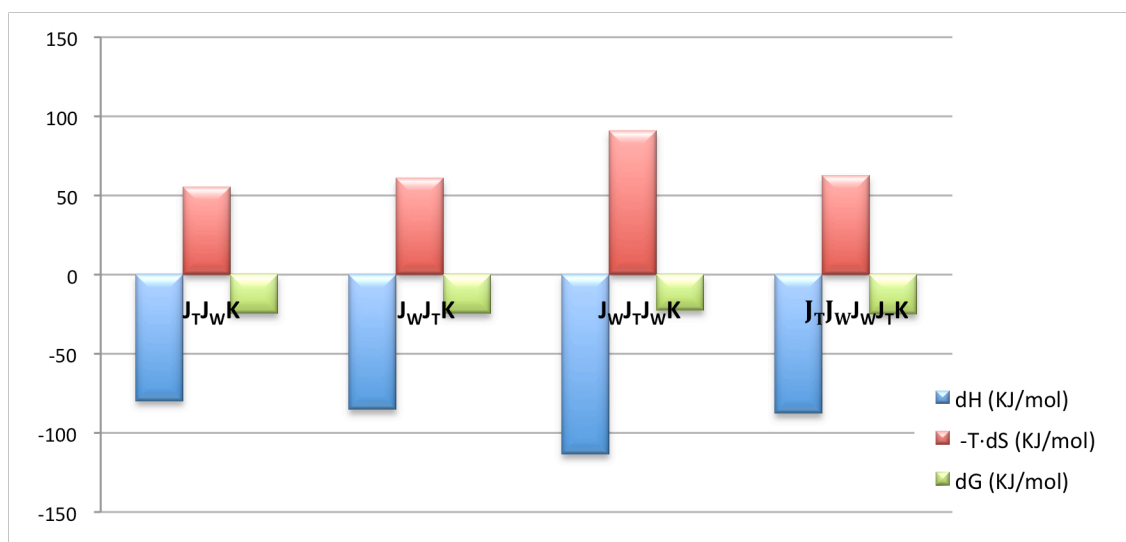
Como puede valorarse en la tabla 2.17, todos los ligandos estudiados tienen unas constantes de disociación mucho mayores que los ligandos con la base  $J_T$  exclusivamente. Las afinidades

obtenidas parecen indicar que la presencia de esta base en los ligandos influye negativamente en la interacción. De hecho, las  $K_d$  de  $J_T J_W K$  y  $J_W J_T K$  son casi cinco veces mayores que la del ligando  $J_T K$ . Más aún, el ligando con dos bases  $J_W$  flanqueando  $J_T$  ( $J_W J_T J_W K$ ) presenta una afinidad más de diez veces inferior. Para el tetrámero  $J_T J_W J_W J_T K$  se obtuvo una constante muy similar a la de los ligandos diméricos, lo que hace pensar en que se contrarrestan los efectos negativos de  $J_W$  con la presencia de  $J_T$ .

Las estequiometrías obtenidas para los ligandos diméricos, así como para el trimérico, indican la formación de complejos 2:1 (ligando:hCUG), lo que encaja con que cada base  $J_T$  interactúe con uno de los pares U·U. No obstante, para el ligando  $J_T J_W J_W J_T K$  se obtuvo una estequiometría más próxima a 3:1 que es difícil de comprender. Una estequiometría tan alta solo podría explicarse si el ligando provocara la apertura del *hairpin* y éste estableciera interacciones con distintos ligandos a la vez. Sin embargo, este fenómeno implicaría un notable cambio estructural que tal vez debería haberse visto reflejado en el perfil de elipticidad de hCUG. Por este motivo, la explicación que parecía más realista era que se tratase de un problema en el ajuste matemático de la isoterma. Constantes de asociación tan bajas implican pendientes muy pequeñas en la isoterma, con lo que la determinación de  $n$ , que corresponde al punto de inflexión de la sigmoide, se ve fácilmente afectada.

#### Contribución de los efectos entálpicos y entrópicos a la unión.

Las contribuciones energéticas que se obtuvieron indican que la interacción entre los ligandos y hCUG está dirigida entálpicamente, mientras que la entropía presenta valores muy desfavorables a la interacción. Este perfil de interacción se correspondía con el obtenido para los ligandos con  $J_T$  exclusivamente y describe un tipo de unión intercalante. Para estos ligandos no se observa una correlación lógica entre las entalpías de unión, pero se adivina una cierta compensación entálpico-entrópica (Figura 2.41).



**Fig. 2.41.** Contribuciones energéticas determinadas por ITC a 25°C de la interacción de los ligandos en los que se combina la Janus  $J_T$  y  $J_W$  con la diana hCUG.

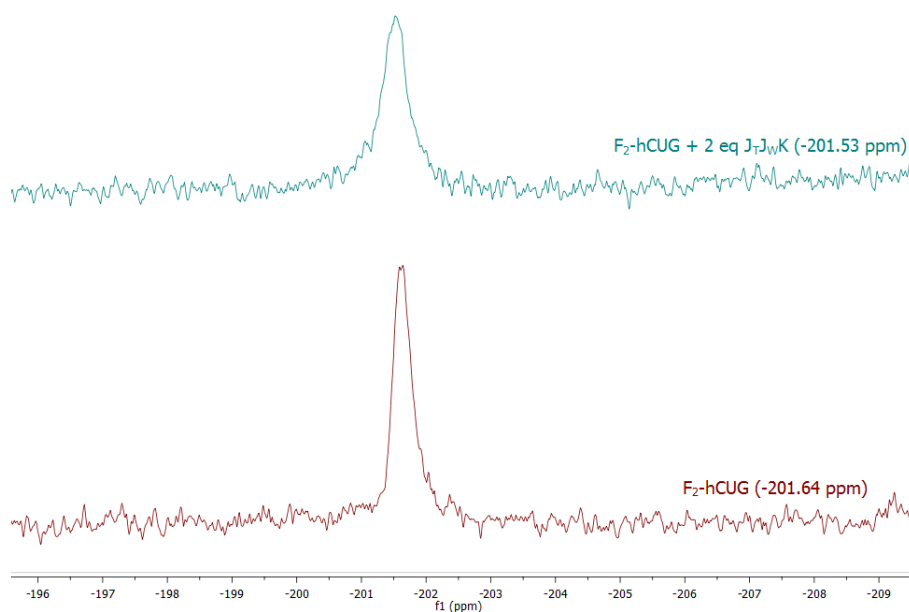
Finalmente, vale la pena destacar que los ligandos diméricos ( $J_T J_W K$  y  $J_W J_T K$ ) presentan parámetros termodinámicos muy parecidos, de lo que podría concluirse que no existe una orientación preferente en su unión a la diana.



En cualquier caso, los ligandos aquí estudiados presentan unas afinidades demasiado bajas por la diana hCUG para ser considerados unos buenos cabezas de serie y necesitarían ser estudiados con más detenimiento para comprender su modo de unión.

#### 5.1.2.4. RMN de $^{19}\text{F}$

También se intentó obtener información estructural de la interacción entre los ligandos con  $J_W$  y hCUG mediante RMN- $^{19}\text{F}$ . Los experimentos se realizaron con los mismos parámetros que anteriormente (ver *Materiales y Métodos*) con la diana  $F_2$ -hCUG y el ligando  $J_TJ_WK$  (Figura 2.42). La adición de 2 eq del ligando  $J_TJ_WK$  a  $F_2$ -hCUG provocó un pequeño cambio en el desplazamiento de la señal de  $^{19}\text{F}$  correspondiente a  $\Delta\delta = -0.09$  ppm, así como un ensanchamiento de ésta. El incremento en el desplazamiento era inferior a los obtenidos con los ligandos  $J_TK$  y  $J_TG_4J_TK$ , lo que podría interpretarse como que el complejo no se forma o, al menos, no lo suficiente con esta relación ligando:RNA, probablemente, debido a la baja afinidad del ligando por hCUG. En cualquier caso, de producirse la formación del complejo, ésta no implicaría una importante distorsión de la estructura de hCUG la cual se hubiera visto reflejada en el espectro con una  $\Delta\delta$  mayor.



**Fig. 2.42.** Espectros de RMN- $^{19}\text{F}$  de  $F_2$ -hCUG y  $F_2$ -hCUG en presencia de 2 eq de  $J_TJ_WK$ . Referencia interna: trifluorotolueno.  $C_{\text{RNA}} = 150 \mu\text{M}$ .

Hubiera sido deseable poder realizar un estudio más detallado de RMN- $^1\text{H}$  para intentar comprender cómo es la interacción de los ligandos con las bases  $J_T$  y  $J_W$ . No obstante, para ello hubiera sido conveniente tener una asignación casi completa del espectro de RMN- $^1\text{H}$  de hCUG y una importante cantidad de RNA y de ligando, de la que no se disponía. Además, teniendo en cuenta la poca afinidad que presentan estos ligandos, no se consideró una prioridad.

### 5.1.2.5. Espectrometría de masas

La estequiometría obtenida por ITC del complejo formado por hCUG y el ligando  $J_T J_W J_W J_T K$  fue aproximadamente de 3:1 (ligando:hCUG), que como ya se ha comentado, es difícil de justificar. Por este motivo, se creyó interesante emplear la EM-ESI para aclarar este punto. Sin embargo, el espectro de EM-ESI registrado de hCUG con  $J_T J_W J_W J_T K$  presentaba muy baja resolución y la determinación estequiométrica del complejo (o de los complejos) fue muy problemática. En el espectro se podía observar la masa de hCUG libre y solo la del complejo 1:1 (hCUG-  $J_T J_W J_W J_T K$ ), sin embargo, no se puede asegurar que sea el único complejo formado (ver *P.Exp. Capítulo 2*).

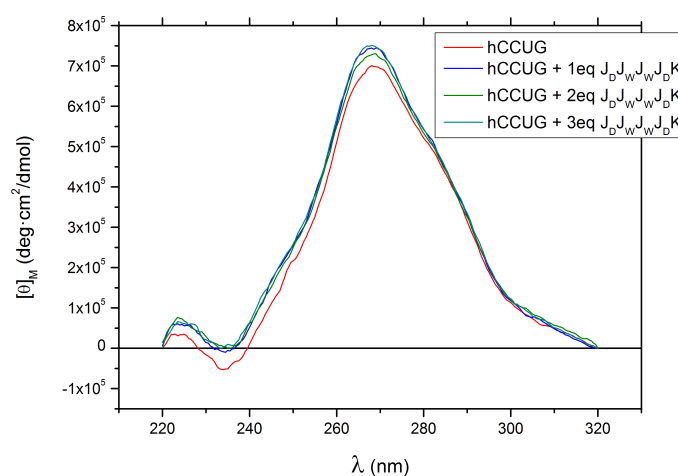
## 5.2. Ligandos con las bases Janus $J_W$ y $J_D$ dirigidos a la diana hCCUG

Con los ligandos sintetizados que contenían la base  $J_D$ , diseñada para reconocer el par no canónico C-U, en combinación con  $J_W$ , también se llevaron a cabo estudios biofísicos de su interacción con la diana hCCUG en condiciones de fuerza iónica baja (tampón 10 mM fosfato a pH 7.0). A continuación se describen y discuten los datos obtenidos para los ligandos  $J_D J_W J_W J_D K$  y  $J_D J_W J_W J_D K$ .

### 5.2.1. Dicroísmo circular

Teniendo en cuenta la poca información que aportaron estos ensayos en los casos anteriores, se decidió realizar sólo el estudio con el ligando tetramérico  $J_D J_W J_W J_D K$  puesto que, posiblemente, sería el que provocaría un mayor efecto sobre la estructura de hCCUG. Se registraron espectros de DC de la diana con cantidades crecientes de ligando. En la figura 2.43 se muestra la superposición de los perfiles registrados; principalmente se puede observar que el ligando no parece tener un efecto significativo en la estructura de la diana, ya que la variación de elipticidad de hCCUG en ausencia y presencia de ligando es mínima.

Puede apreciarse un pequeño aumento de elipticidad en la adición de 1 equivalente de ligando que se mantiene con las posteriores adiciones; este hecho, inicialmente, hizo pensar en que se podía estar saturando la diana, sin embargo, esto hubiera significado que  $J_D J_W J_W J_D K$  presentaba una altísima afinidad por hCCUG, contrariamente a lo esperado.



**Fig. 2.43.** Superposición de los espectros de DC de hCCUG y hCCUG con distintos equivalentes de  $J_D J_W J_W J_D K$ . Condiciones: Tampón 10 mM fosfato a pH 7.0,  $c_{\text{hCCUG}} = 2 \mu\text{M}$ .

Las curvas de fusión se registraron de 10 a 90°C con un incremento de 0.5°C/min y se registró la variación de elipticidad a 270 nm (Tabla 2.18).

<b>T<sub>m</sub> (hCCUG)= 70.8 °C</b>		
<b>T<sub>m</sub> (ΔT<sub>m</sub>)</b>		
<b>Ligando</b>	<b>1 eq</b>	<b>2 eq</b>
<b>J<sub>D</sub>J<sub>W</sub>J<sub>W</sub>J<sub>D</sub>K</b>	69.3 °C <b>(-1.5°C)</b>	69.4 °C <b>(-1.6°C)</b>

**Tabla 2.18.** Valores de T<sub>m</sub> y ΔT<sub>m</sub> determinados por DC de hCCUG con distinto número de equivalentes del ligando J<sub>D</sub>J<sub>W</sub>J<sub>W</sub>J<sub>D</sub>K. Condiciones: Tampón 10 mM de fosfato a pH 7.0, c<sub>oligo</sub>= 2μM.

Los valores de ΔT<sub>m</sub> obtenidos no son muy grandes, sin embargo, parecen indicar que el ligando J<sub>D</sub>J<sub>W</sub>J<sub>W</sub>J<sub>D</sub>K tiene un efecto desestabilizante sobre la diana hCCUG. Por otro lado, los valores determinados de ΔT<sub>m</sub> para 1 y 2 equivalentes del ligando eran, aparentemente, los mismos, lo que se correspondía con la observación hecha en las valoraciones de DC.

### 5.2.2. Calorimetría de valoración isotérmica

Aunque sin demasiadas expectativas, se prosiguió con el estudio mediante ITC de la interacción de J<sub>D</sub>J<sub>W</sub>K y J<sub>D</sub>J<sub>W</sub>J<sub>W</sub>J<sub>D</sub>K con hCCUG. Las valoraciones se llevaron a cabo en las mismas condiciones y con los mismos parámetros experimentales que anteriormente. Los calores obtenidos en cada adición de ligando no fueron muy grandes y, en consecuencia, el ajuste de los datos a la isoterma se vio dificultado. No obstante, se pudieron determinar con poco error asociado los parámetros termodinámicos de la complejación de los ligandos con hCCUG (Tabla 2.19).

<b>Parámetro termodinámico</b>	<b>J<sub>D</sub>J<sub>W</sub>K</b>	<b>J<sub>D</sub>J<sub>W</sub>J<sub>W</sub>J<sub>D</sub>K</b>
<b>K<sub>d</sub> (μM)</b>	24.3 ± 2.7	17.6 ± 0.3
<b>n</b>	2.38 ± 0.28	2.20 ± 0.35
<b>ΔH (KJ/mol)</b>	-14.2 ± 2.4	-24.8 ± 8.3
<b>ΔS (J/mol·K)</b>	40.6	7.8
<b>-T · ΔS (KJ/mol)</b>	-12.1	-2.3
<b>ΔG (KJ/mol)</b>	-26.3	-27.1

**Tabla 2.19.** Parámetros termodinámicos a 25°C de la unión entre hCCUG y el ligando indicado. Condiciones: Tampón 10 mM fosfato a pH 7.0, c<sub>hCCUG</sub>= 10 μM, c<sub>(ligandos)</sub>= 500 μM.

#### *Constantes de disociación y estequiometría de los complejos.*

Como era de esperar, las constantes de disociación determinadas son mucho mayores que las determinadas para los ligandos que sólo contienen la base J<sub>D</sub>. De nuevo, los datos obtenidos parecen indicar que la interacción entre los ligandos y el RNA se ve dificultada por la presencia

de esta nueva base adicionada a  $J_D$  aunque, en este caso, los valores de  $K_d$  son mejores que los descritos en el apartado anterior para los ligandos con  $J_T$  y  $J_W$  y la diana de DM1.

La afinidad del ligando  $J_D J_W J_D K$  ( $K_d = 18 \mu M$ ), a pesar de ser superior a la del ligando dimérico  $J_D J_W K$  ( $K_d = 24 \mu M$ ), es unas tres veces inferior a la de ligando  $J_D J_D K$ . Por otro lado, si se compara el ligando  $J_D J_W K$  con el monomérico  $J_D K$ , se puede comprobar que la constante de disociación es más de dos veces superior. Estos hechos corroboran la contribución negativa de la Janus  $J_W$  a la interacción.

Las estequiometrías obtenidas indican que ambos ligandos forman un complejo 2:1 (ligando:hCCUG). En el caso de  $J_D J_W K$ , esta relación sugiere la unión de cada ligando a uno de los *loops* internos del RNA. Sin embargo, no tiene mucho sentido en el caso del ligando tetramérico ( $J_D J_W J_W J_D K$ ) y, del mismo modo que antes, se pensó que podía atribuirse a un error en su determinación puesto que la pendiente de la isoterma era muy pequeña.

*Contribución de los efectos entálpicos y entrópicos a la unión.* Para los dos ligandos, las interacciones son exotérmicas y la entropía es favorable a la unión, por lo tanto, el perfil termodinámico de la interacción es semejante al de los ligandos con solo  $J_D$ . No obstante, ambos términos son ahora muy semejantes para el ligando  $J_D J_W K$  y, en el caso del tetrámero  $J_D J_W J_W J_D K$ , la unión está claramente dirigida por el término entálpico (Figura 2.44). La  $\Delta H$  de la unión del ligando  $J_D J_W J_W J_D K$  a hCCUG es casi el doble que la determinada para el ligando  $J_D J_W K$ , lo que tiene mucho sentido ya que tendría que poder establecer el doble de interacciones. En cambio, a pesar de que ambos tienen una variación de entropía favorable a la unión, el término entrópico de  $J_D J_W J_W J_D K$  tiene muy poco peso en la interacción. Este hecho podría explicarse si se tiene en cuenta que, posiblemente, los castigos entrópicos que debe sufrir el ligando  $J_D J_W J_W J_D K$  son mucho mayores que los de  $J_D J_W K$  debido a la superior libertad conformacional del primero. Además, se puede también observar el efecto de compensación entálpico-entrópica.

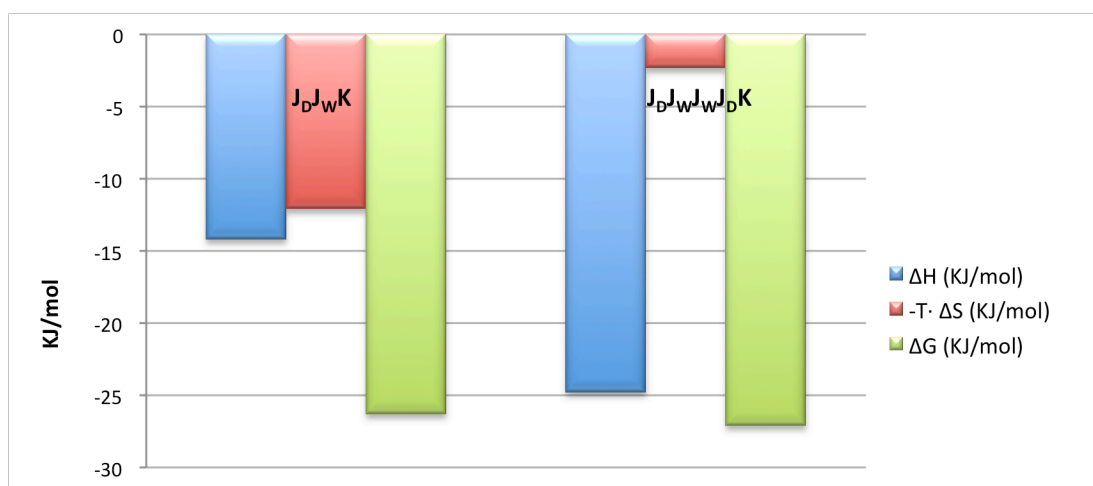


Fig. 2.44. Contribuciones energéticas a 25°C de la interacción de los ligandos en los que se combina la Janus  $J_D$  y  $J_W$  con la diana hCCUG.

En resumen, los resultados obtenidos por ITC evidencian que existe una interacción, aunque débil, entre los ligandos  $J_D J_W K$  y  $J_D J_W J_W J_D K$  y hCCUG.

Como conclusión global de los ligandos mixtos,  $J_T$  con  $J_W$  o  $J_D$  con  $J_W$ , se puede decir que la presencia de la base  $J_W$  contribuye negativamente en la interacción de los ligandos con sus respectivas dianas, por lo que no deben ser considerados unos buenos cabezas de serie.

### 5.2.3. Espectrometría de masas

Como ya se ha comentado, la estequiometría de 2:1 (ligando:hCUG) obtenida mediante ITC para el complejo entre hCCUG y  $J_DJ_WJ_WJ_DK$  es muy difícil de justificar. Por este motivo, se llevaron a cabo unos experimentos de EM-ESI del complejo. En este caso, la resolución del espectro fue mucho inferior a la obtenida para el complejo  $J_TJ_WJ_WJ_TK$ :hCUG y, además, se detectó una gran cantidad de ligando y RNA libres. Así pues, la determinación estequiométrica del complejo no pudo considerarse demasiado fiable. En el espectro obtenido se detectó únicamente la masa del complejo 1:1 ( $J_DJ_WJ_WJ_DK$  : hCCUG) aunque no puede asegurarse que sea el único complejo formado (ver *P.Exp. Capítulo 2*).

## 6. Selectividad

Una característica imprescindible que debe presentar cualquier molécula con actividad terapéutica es selectividad. La selectividad es la capacidad de una molécula o fármaco de interactuar y reconocer su diana frente otras posibles biomoléculas presentes en cualquier organismo. Es una propiedad muy importante ya que, a mayor selectividad, menores serán los efectos secundarios que se puedan derivar de la administración de un fármaco. En cuanto a los ligandos de RNA, es importante diseñar pequeñas moléculas con buenas selectividades para que reconozcan de forma específica su diana de RNA sobre todo frente a otras de las múltiples estructuras de RNA, pero también frente a DNA y proteínas. De lo contrario, la toxicidad del producto podría tener consecuencias indeseadas y perjudiciales.

Así pues, era imprescindible evaluar la selectividad de los mejores ligandos sintetizados por otras estructuras de RNA ya que, seguramente, debido a su naturaleza de PNA tendrían mayor afinidad por estructuras oligonucleotídicas que por proteicas. Para ello, se decidió evaluar los ligandos que mejores resultados y constantes de disociación habían mostrado y que podrían llegar a ser unos buenos cabezas de serie para futuras generaciones de ligandos:  $J_TK$ ,  $J_TG_4J_TK$ ,  $J_DK$  y  $J_DJ_DK$ .

Puesto que la técnica que más información nos había aportado de la interacción entre los ligandos y sus dianas había sido la ITC, se decidió emplearla para el estudio de la selectividad. Se trataba, pues, de valorar cada uno de los ligandos escogidos con otras dianas de RNA, determinar la  $K_d$  y compararla con la obtenida con su diana objetivo. En primer lugar, se decidió realizar el experimento con una estructura tallo-lazo de RNA 22-mer análoga a hCUG pero en la que los pares no canónicos U·U habían sido sustituidos por pares canónicos A·U, por lo que su tallo era complementario (Hairpin Control, Figura 2.45). Por otro lado, se llevaron a cabo experimentos “cruzados” para evaluar la selectividad de las bases Janus para reconocer *mismatches* distintos a su *mismatch* objetivo. Para ello se evaluó la unión entre el ligando  $J_TK$  con la diana hCCUG que presentaba pares no canónicos C·U y el ligando  $J_DK$  con la diana hCUG con *mismatches* U·U.

Para evaluar la unión de los ligandos a otras estructuras secundarias de RNA, se escogió un fragmento 34-mer de un IRES viral (IRES34, Figura 2.45) que forma una estructura tipo *stem-loop* con una protuberancia en la doble hélice, y el  $tRNA^{Phe}$  que tiene unas grandes dimensiones y presenta una gran variedad estructural (Figura 2.45).

La selectividad se calculó mediante la ecuación (2.8):

$$Selectividad = \frac{K_{d(RNAcontrol)}}{K_{d(diana)}} \quad (2.8)$$

Para poder realizar una comparación válida de las  $K_d$  es necesario realizar los experimentos con las estructuras de control exactamente en las mismas condiciones en que se han realizado con las dianas objetivo. En la tabla 2.20 se detallan los valores determinados de  $K_d$  y las selectividades calculadas. En cursiva se indican las  $K_d$  de cada ligando con su diana objetivo.

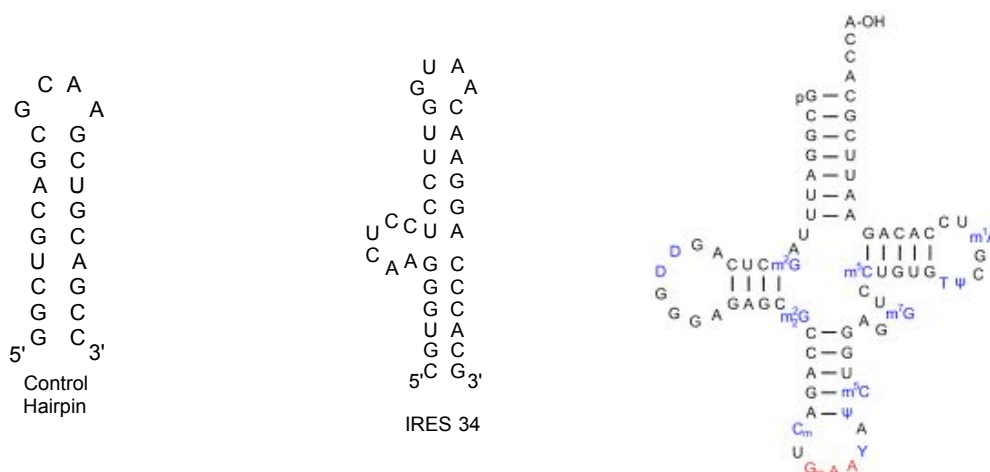


Fig. 2.45. Estructuras de los RNAs escogidos para evaluar la selectividad de los ligandos  $J_TK$ ,  $J_TG_4J_TK$ ,  $J_DK$  y  $J_DJ_DK$ .

RNA	Selectividad ( $K_d$ )			
	$J_TK$	$J_TG_4J_TK$	$J_DK$	$J_DJ_DK$
Hairpin Control	<b>4.3</b> (42 $\mu M$ )	<b><math>\geq 43.5</math></b> ( $\geq 200 \mu M$ )	ND	<b><math>\geq 16</math></b> ( $\geq 200 \mu M$ )
hCUG	- <i>9.7 <math>\mu M</math></i>	- <i>4.4 <math>\mu M</math></i>	<b><math>\geq 13</math></b> ( $\geq 200 \mu M$ )	ND
hCCUG	<b>6.6</b> (64 $\mu M$ )	ND	- <i>15.0 <math>\mu M</math></i>	- <i>6.1 <math>\mu M</math></i>
IRES 34	ND	<b>8.7</b> (40 $\mu M$ )	ND	<b>8.4</b> (51 $\mu M$ )
$tRNA^{Phe}$	ND	<b><math>\geq 45.5</math></b> ( $\geq 200 \mu M$ )	ND	<b><math>\geq 32.8</math></b> ( $\geq 200 \mu M$ )

Tabla 2.20. Selectividad calculada mediante la ecuación (2.10) (en negrita) y  $K_d$  de los mejores ligandos frente a algunas estructuras de RNA. En cursiva se detalla la  $K_d$  del ligando con su diana objetivo.  $K_d$  determinadas mediante ITC. ND= no determinado.

La selectividad del **ligando  $J_TK$**  hacia hCUG se evaluó determinando su afinidad por el Hairpin Control y por el RNA hCCUG que presenta pares no canónicos C·U (control cruzado). En ambos casos se observó una interacción con los RNAs, aunque las  $K_d$  determinadas denotan que es

muy débil. **J<sub>7</sub>K** resulta ser 4 y 7 veces más afín por hCUG que por el Hairpin Control y por hCCUG, respectivamente. Es importante destacar que **J<sub>7</sub>K** es una molécula con una alta capacidad de formar enlaces de hidrógeno y de establecer interacciones electrostáticas y, además, es bastante pequeña. Por todo ello, puede unirse de forma no específica a muchas zonas del RNA, por lo que no es de extrañar que los valores obtenidos indiquen una selectividad media.

En cuanto al **ligando J<sub>7</sub>G<sub>4</sub>J<sub>7</sub>K**, se determinó la  $K_d$  con el Hairpin Control, el IRES 34 y el <sup>tRNA</sup><sup>Phe</sup>. En principio, se esperaba que el ligando **J<sub>7</sub>G<sub>4</sub>J<sub>7</sub>K** mostrase una mayor selectividad que **J<sub>7</sub>K**, puesto que tiene un tamaño mucho mayor y contiene dos bases Janus J<sub>7</sub> relativamente separadas. Los valores obtenidos corroboraron las expectativas ya que las selectividades obtenidas fueron elevadas. Hay que decir que los termogramas obtenidos con el Hairpin Control y el <sup>tRNA</sup><sup>Phe</sup> fueron muy complejos de tratar y ajustar a las isotermas debido al poco calor liberado y la escasa definición de la sigmoide (ver *P. Exp. Capítulo 2*). La interacción con el RNA IRES 34 se pudo cuantificar mejor, aunque la afinidad del ligando es 9 veces inferior a la que la presenta por su diana objetivo hCUG. Hay que destacar que el ligando **J<sub>7</sub>G<sub>4</sub>J<sub>7</sub>K** muestra una selectividad por su diana objetivo hCUG frente al Hairpin Control mayor de 43, es decir, más de diez veces superior a la que tiene el ligando monomérico **J<sub>7</sub>K**. Este hecho valida de algún modo la estrategia de ensamblado modular de bases Janus J<sub>7</sub> para generar ligandos selectivos de RNA expandido (CUG<sup>exp</sup>) asociado con la DM1. Además, esta selectividad apunta inequívocamente a que los ligandos que contienen J<sub>7</sub> se dirigen selectivamente a los pares no canónicos U·U de hCUG, y no a cualquier otro elemento estructural que también está presente en el Hairpin Control.

A pesar de que el ligando monomérico **J<sub>0</sub>K** de los pares C·U no presentó una gran afinidad por hCCUG, se decidió valorar su selectividad frente el par U·U presente en hCUG. El termograma del experimento de ITC solo mostraba los calores de dilución de la solución en la celda de la muestra y ningún calor asociado a la interacción del ligando con hCUG. Con estos resultados, se puede afirmar que **J<sub>0</sub>K** presenta una excelente selectividad hacia el *mismatch* C·U frente al U·U, incluso mejor de la que tiene **J<sub>7</sub>K** para los pares U·U frente C·U.

El **ligando** dimérico **J<sub>0</sub>J<sub>0</sub>K** se evaluó frente al Hairpin Control, al IRES 34 y al <sup>tRNA</sup><sup>Phe</sup>. No se detectó unión a la primera diana pues el termograma obtenido no mostraba calor asociado a la interacción. Sin embargo, sí se detectó una interacción con las otras dos dianas aunque el ajuste fue muy complejo debido al poco calor detectado. Las constantes obtenidas, a pesar de tener un importante error asociado, permitieron concluir que **J<sub>0</sub>J<sub>0</sub>K** presenta una afinidad unas 8 veces y más de 33 veces superior por hCCUG que por el IRES 34 y el <sup>tRNA</sup><sup>Phe</sup>, respectivamente.

De los resultados obtenidos en los ensayos de selectividad se puede concluir que los ligandos Janus diseñados tienen una buena selectividad por sus respectivas dianas frente a otras estructuras variadas de RNA. Concretamente, la base Janus J<sub>7</sub> es selectiva del par no canónico U·U y la J<sub>0</sub> lo es del par C·U. No menos importante es constatar que su ensamblaje modular genera ligandos altamente selectivos de los RNAs tóxicos. Teniendo en cuenta que la mayoría de los ligandos presentan unas afinidades del orden  $\mu\text{M}$  bajo, pueden ser unos buenos cabezas de serie para el diseño de una segunda generación de ligandos.

## 7. Bibliografía

- [1] A. Dejaegere, B. Kieffer, A. Podjarny, in *RSC Biomol. Sci.* (Eds.: A. Podjarny, A.P. Dejaegere, B. Kieffer), Royal Society Of Chemistry, Cambridge, **2011**, pp. 1–14.
- [2] B. D. Blakeley, S. M. DePorter, U. Mohan, R. Burai, B. S. Tolbert, B. R. McNaughton, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 8837–8855.
- [3] A. Podjarny, A. P. Dejaegere, B. Kieffer, Eds., *Biophysical Approaches Determining Ligand Binding to Biomolecular Targets*, Royal Society Of Chemistry, Cambridge, **2011**.
- [4] J. D. Puglisi, I. Tinoco, Ignacio, in *RNA Process. Part Gen. Methods*, Academic Press, **1989**, pp. 304–325.
- [5] T. R. Sosnick, X. Fang, V. M. Shelton, *Methods Enzymol.* **2000**, *317*, 393–409.
- [6] J.-L. Mergny, J.-C. Maurizot, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 124–132.
- [7] P. Cahen, M. Luhmer, C. Fontaine, C. Morat, J. Reisse, K. Bartik, *Biophys. J.* **2000**, *78*, 1059–1069.
- [8] I. Tinoco, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 4785–4790.
- [9] H. DeVoe, I. Tinoco Jr., *J. Mol. Biol.* **1962**, *4*, 518–527.
- [10] D. E. Draper, T. C. Gluick, *Methods Enzymol.* **1995**, *259*, 281–305.
- [11] C. H. Spink, S. E. Wellman, *Methods Enzymol.* **2001**, *340*, 193–211.
- [12] W. D. Wilson, F. A. Tanious, M. Fernandez-Saiz, C. T. Rigl, in *Drug-DNA Interact. Protoc.* (Ed.: K.R. Fox), Springer New York, **1997**, pp. 219–240.
- [13] D. M. Crothers, *Biopolymers* **1971**, *10*, 2147–2160.
- [14] K. J. Breslauer, in *Methods Enzymol.*, Elsevier, **1995**, pp. 221–242.
- [15] J.-L. Mergny, L. Lacroix, *Oligonucleotides* **2003**, *13*, 515–537.
- [16] S. R. Martin, M. J. Schilstra, G. Siligardi, in *RSC Biomol. Sci.* (Eds.: A. Podjarny, A.P. Dejaegere, B. Kieffer), Royal Society Of Chemistry, Cambridge, **2011**, pp. 226–246.
- [17] M. Eriksson, B. Nordén, *Methods Enzymol.* **2001**, *340*, 68–98.
- [18] A. Rodgers, N. Bengt, *Circular Dichroism and Linear Dichroism*, Oxford University Press, New York, **1997**.
- [19] K. Nakamishi, N. Berova, R. W. Woody, *Circular Dichroism. Principles and Applications*, VCH, New York, **1994**.
- [20] D. M. Gray, R. L. Ratliff, M. R. Vaughan, in *Methods Enzymol.* (Ed.: J.E.D. David M.J. Lilley), Academic Press, **1992**, pp. 389–406.
- [21] J. Kypr, I. Kejnovska, D. Renciuik, M. Vorlickova, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 1713–1725.
- [22] G. R. Bishop, J. R. Chaires, *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* **2002**, *Unit 7.11*.
- [23] Y.-M. Chang, C. K.-M. Chen, M.-H. Hou, *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 3394–3413.
- [24] A. L. Lavoisier, P. S. Laplace, *Mem.Acad.Roy.Sci.* **1784**, *3*, 355–408.
- [25] O. Okhrimenko, I. Jelesarov, *J. Mol. Recognit.* **2008**, *21*, 1–19.
- [26] J. H. Lakey, E. M. Raggett, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1998**, *8*, 119–123.
- [27] A. L. Feig, in *Methods Enzymol.*, Elsevier, **2009**, pp. 409–422.
- [28] J. B. Chaires, *Annu. Rev. Biophys.* **2008**, *37*, 135–151.
- [29] M. J. Blandamer, P. M. Cullis, J. B. F. N. Engberts, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1998**, *94*, 2261–2267.
- [30] N. N. Salim, A. L. Feig, *Methods* **2009**, *47*, 198–205.
- [31] W. B. Turnbull, A. H. Daranas, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14859–14866.
- [32] S. D. Gilbert, R. T. Batey, *Methods Mol. Biol.* **2009**, *540*, 97–114.
- [33] M. W. Freyer, E. A. Lewis, *Methods Cell Biol.* **2008**, *84*, 79–113.
- [34] M. Pellecchia, D. S. Sem, K. Wüthrich, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 211–219.
- [35] M. Pellecchia, I. Bertini, D. Cowburn, C. Dalvit, E. Giralt, W. Jahnke, T. L. James, S. W. Homans, H. Kessler, C. Luchinat, et al., *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, *7*, 738–745.
- [36] L. Fielding, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2007**, *51*, 219–242.



- [37] X. Zhang, A. Sanger, R. Hemmig, W. Jahnke, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6691–6694.
- [38] B. Kieffer, S. Homans, W. Jahnke, in *RSC Biomol. Sci.* (Eds.: A. Podjarny, A.P. Dejaegere, B. Kieffer), Royal Society Of Chemistry, Cambridge, **2011**, pp. 15–55.
- [39] C. Yuan, R. M. Williams, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 1945–1948.
- [40] J. T. Gerig, *Online Textb.* **2001**, *4*, 2011.
- [41] T. Lombès, R. Mourné, V. Larue, E. Prost, M. Catala, T. Lecourt, F. Dardel, L. Micouin, C. Tisné, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 9530–9534.
- [42] C. Kreutz, H. Kahlig, R. Konrat, R. Micura, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 11558–11559.
- [43] A. Kiviniemi, M. Murtola, P. Ingman, P. Virta, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 5153–5159.
- [44] S. Purser, P. R. Moore, S. Swallow, V. Gouverneur, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 320–330.
- [45] C. Dalvit, P. E. Fagerness, D. T. A. Hadden, R. W. Sarver, B. J. Stockman, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7696–7703.
- [46] N. C. Yoder, K. Kumar, *Chem. Soc. Rev.* **2002**, *31*, 335–341.
- [47] K. Tanabe, T. Tsuda, T. Ito, S. Nishimoto, *Chem. - Eur. J.* **2013**, *19*, 15133–15140.
- [48] C. Kreutz, H. Kahlig, R. Konrat, R. Micura, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 3450–3453.
- [49] K. Fauster, C. Kreutz, R. Micura, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 13080–13084.
- [50] M. Yamashita, J. B. Fenn, *J. Phys. Chem.* **1984**, *88*, 4451–4459.
- [51] J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse, *Science* **1989**, *246*, 64–71.
- [52] S. A. Hofstadler, R. H. Griffey, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 377–390.
- [53] B. Ganem, Y. T. Li, J. D. Henion, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 6294–6296.
- [54] E. C. Kempen, J. S. Brodbelt, *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 5411–5416.
- [55] F. Rosu, E. De Pauw, V. Gabelica, *Biochimie* **2008**, *90*, 1074–1087.
- [56] R. D. Smith, K. J. Light-Wahl, B. E. Winger, J. A. Loo, *Org. Mass Spectrom.* **1992**, *27*, 811–821.
- [57] J. A. Loo, *Mass Spectrom. Rev.* **1997**, *16*, 1–23.
- [58] K. Breuker, *Int. J. Mass Spectrom.* **2004**, *239*, 33–41.
- [59] S. A. Hofstadler, K. A. Sannes-Lowery, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 585–595.
- [60] R. H. Griffey, S. A. Hofstadler, K. A. Sannes-Lowery, D. J. Ecker, S. T. Crooke, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 10129–10133.
- [61] S. A. Hofstadler, K. A. Sannes-Lowery, S. T. Crooke, D. J. Ecker, H. Sasmor, S. Manalili, R. H. Griffey, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 3436–3440.
- [62] K. A. Sannes-Lowery, J. J. Drader, R. H. Griffey, S. A. Hofstadler, *Trends Anal. Chem.* **2000**, *19*, 481–491.
- [63] E. E. Swayze, E. A. Jefferson, K. A. Sannes-Lowery, L. B. Blyn, L. M. Risen, S. Arakawa, S. A. Osgood, S. A. Hofstadler, R. H. Griffey, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 3816–3819.
- [64] M. J. Greig, J. M. Robinson, *J. Biomol. Screen.* **2000**, *5*, 441–454.
- [65] T. J. D. Jorgensen, P. Roepstorff, A. J. R. Heck, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 4427–4432.
- [66] S. W. A. Bligh, T. Haley, P. N. Lowe, *J. Mol. Recognit.* **2003**, *16*, 139–148.
- [67] D. C. Gale, D. R. Goodlett, K. J. Light-Wahl, R. D. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 6027–6028.
- [68] D. C. Galefn, R. D. Smithcor, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1995**, *6*, 1154–1164.
- [69] F. Rosu, V. Gabelica, C. Houssier, E. D. Pauw, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, e82–e82.
- [70] J. F. Arambula, S. R. Ramisetty, A. M. Baranger, S. C. Zimmerman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 16068–16073.
- [71] B. S. Sproat, in *Oligonucleotide Synth. Methods Appl. PHerdewijn*, Humana Press, **2005**, pp. 17–31.
- [72] J. W. Miller, C. R. Urbinati, P. Teng-umnuay, M. G. Stenberg, B. J. Bryne, C. A. Thornton, M. S. Swanson, *EMBO J.* **2000**, *19*, 4439–4448.
- [73] M. B. Warf, J. A. Berglund, *RNA* **2007**, *13*, 2238–2251.
- [74] A. M. Paiva, R. D. Sheardy, *Biochemistry* **2004**, *43*, 14218–14227.

- [75] C. R. Woese, S. Winker, R. R. Gutell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 8467–8471.
- [76] F. M. Jucker, H. A. Heus, P. F. Yip, E. H. Moors, A. Pardi, *J. Mol. Biol.* **1996**, *264*, 968–980.
- [77] J. P. Sheehy, A. R. Davis, B. M. Znosko, *RNA* **2010**, *16*, 417–429.
- [78] G. Varani, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1995**, *24*, 379–404.
- [79] S. Mohan, C. Hsiao, J. C. Bowman, R. Wartell, L. D. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 12679–12689.
- [80] K. S. Keating, N. Toor, A. M. Pyle, *J. Mol. Biol.* **2008**, *383*, 475–481.
- [81] H. Wu, P. K. Yang, S. E. Butcher, S. Kang, G. Chanfreau, J. Feigon, *EMBO J.* **2001**, *20*, 7240–7249.
- [82] R. R. Gutell, J. J. Cannone, D. Konings, D. Gautheret, *J. Mol. Biol.* **2000**, *300*, 791–803.
- [83] P. C. Gareiss, K. Sobczak, B. R. McNaughton, P. B. Palde, C. A. Thornton, B. L. Miller, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 16254–16261.
- [84] V. V. Anshelevich, A. V. Vologodskii, A. V. Lukashin, M. D. Frank-Kamenetskii, *Biopolymers* **1984**, *23*, 39–58.
- [85] M. Rougee, B. Faucon, J. L. Mergny, F. Barcelo, C. Giovannangeli, T. Garestier, C. Helene, *Biochemistry* **1992**, *31*, 9269–9278.
- [86] L. J. Maher, P. B. Dervan, B. J. Wold, *Biochemistry* **1990**, *29*, 8820–8826.
- [87] H. Shindo, H. Torigoe, A. Sarai, *Biochemistry* **1993**, *32*, 8963–8969.
- [88] L. E. Xodo, *Eur. J. Biochem. FEBS* **1995**, *228*, 918–926.
- [89] M. A. Bonham, S. Brown, A. L. Boyd, P. H. Brown, D. A. Bruckenstein, J. C. Hanvey, S. A. Thomson, A. Pipe, F. Hassman, J. E. Bisi, et al., *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23*, 1197–1203.
- [90] E. A. Lesnik, L. M. Risen, D. A. Driver, M. C. Griffith, K. Sprankle, S. M. Freier, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 568–574.
- [91] F. Boutimah-Hamoudi, E. Leforestier, C. Senamaud-Beaufort, P. E. Nielsen, C. Giovannangeli, T. E. Saison-Behmoaras, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 3907–3917.
- [92] S. Lecosnier, C. Cordier, P. Simon, J.-C. François, T. E. Saison-Behmoaras, *FASEB J.* **2011**, *25*, 2201–2210.
- [93] N. J. Peffer, J. C. Hanvey, J. E. Bisi, S. A. Thomson, C. F. Hassman, S. A. Noble, L. E. Babiss, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 10648–10652.
- [94] M. C. Griffith, L. M. Risen, M. J. Greig, E. A. Lesnik, K. G. Sprankle, R. H. Griffey, J. S. Kiely, S. M. Freier, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 831–832.
- [95] V. A. Bloomfield, D. M. Crothers, I. Tinoco Jr., *Nucleic Acids: Structures, Properties, and Functions*, University Science Books, **2000**.
- [96] B. Ranjbar, P. Gill, *Chem. Biol. Drug Des.* **2009**, *74*, 101–120.
- [97] D. J. Proctor, J. E. Schaak, J. M. Bevilacqua, C. J. Falzone, P. C. Bevilacqua, *Biochemistry* **2002**, *41*, 12062–12075.
- [98] S. R. Ramisetty, A. M. Baranger, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 3134–3137.
- [99] S. A. Waksman, H. A. Lechevalier, *Science* **1949**, *109*, 305–307.
- [100] P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 197–200.
- [101] M. Li, T. Zenggeya, E. Rozners, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8676–8681.
- [102] P. Gupta, T. Zenggeya, E. Rozners, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 11125–11127.
- [103] T. Zenggeya, M. Li, E. Rozners, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 2121–2124.
- [104] T. Zenggeya, P. Gupta, E. Rozners, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 12593–12596.
- [105] P. Gupta, O. Muse, E. Rozners, *Biochemistry* **2012**, *51*, 63–73.
- [106] P. F. Flynn, D. L. Mattiello, H. D. W. Hill, A. J. Wand, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4823–4824.
- [107] A. E. Kelly, H. D. Ou, R. Withers, V. Dötsch, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12013–12019.
- [108] N. de Marky, G. S. Manning, *Biopolymers* **1975**, *14*, 1407–1422.
- [109] R. Owczarzy, Y. You, B. G. Moreira, J. A. Manthey, L. Huang, M. A. Behlke, J. A. Walder, *Biochemistry* **2004**, *43*, 3537–3554.

- [110] R. Owczarzy, B. G. Moreira, Y. You, M. A. Behlke, J. A. Walder, *Biochemistry* **2008**, *47*, 5336–5353.
- [111] M. M. Lee, J. L. Childs-Disney, A. Pushechnikov, J. M. French, K. Sobczak, C. A. Thornton, M. D. Disney, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 17464–17472.
- [112] M. B. Warf, M. Nakamori, C. M. Matthys, C. A. Thornton, J. A. Berglund, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 18551–18556.
- [113] M. D. Disney, M. M. Lee, A. Pushechnikov, J. L. Childs-Disney, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 375–382.
- [114] C. H. Wong, S. Richardson, Y. J. Ho, A. M. H. Lucas, T. Tuccinardi, A. M. Baranger, S. C. Zimmerman, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 2505–2509.
- [115] R. Parkesh, J. L. Childs-Disney, M. Nakamori, A. Kumar, E. Wang, T. Wang, J. Hoskins, T. Tran, D. Housman, C. A. Thornton, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 4731–4742.
- [116] A. K. Bronowska, in *Thermodyn. - Interact. Stud. - Solids Liq. Gases* (Ed.: J.C. Moreno Pirajón), InTech, **2011**.
- [117] L. Pascale, S. Azoulay, A. D. Giorgio, L. Zenacker, M. Gaysinski, P. Clayette, N. Patino, *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 5851–5863.
- [118] S. D. Gilbert, S. J. Mediatore, R. T. Batey, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14214–14215.
- [119] J. D. Dunitz, *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 709–712.
- [120] C. H. Reynolds, M. K. Holloway, *ACS Med. Chem. Lett.* **2011**, *2*, 433–437.
- [121] D. M. Ford, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 16167–16170.
- [122] V. Lafont, A. A. Armstrong, H. Ohtaka, Y. Kiso, L. Mario Amzel, E. Freire, *Chem. Biol. Drug Des.* **2007**, *69*, 413–422.
- [123] J. R. Thomas, X. Liu, P. J. Hergenrother, *Biochemistry* **2006**, *45*, 10928–10938.
- [124] J. E. Ladbury, G. Klebe, E. Freire, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *9*, 23–27.
- [125] H. A. Heus, A. Pardi, *Science* **1991**, *253*, 191–194.
- [126] Y. Tanaka, C. Kojima, T. Yamazaki, T. S. Kodama, K. Yasuno, S. Miyashita, A. Ono, A. (Sho) Ono, M. Kainosho, Y. Kyogoku, *Biochemistry* **2000**, *39*, 7074–7080.
- [127] C. Schneider, M. Brandl, J. Sühnel, *J. Mol. Biol.* **2001**, *305*, 659–667.
- [128] I. Jelesarov, H. R. Bosshard, *J. Mol. Recognit. JMR* **1999**, *12*, 3–18.
- [129] H. Chen, Meena, L. W. McLaughlin, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13190–13191.

***Discusión*** ||



La conclusión global de esta tesis doctoral parece clara. Se ha conseguido diseñar y sintetizar unos ligandos Janus que reconocen los pares U·U y C·U que son característicos de las estructuras *hairpin* que forman los RNAs tóxicos asociados a las distrofias miotónicas de los tipos 1 y 2. Sin embargo, hay una serie de cuestiones y reflexiones que no se han abordado hasta aquí y que vale la pena discutir.

#### *Afinidad y fuerza iónica*

La primera de ellas, es que la afinidad de los ligandos por sus dianas se ha determinado mediante ITC en unas condiciones de baja fuerza iónica que se alejan bastante de las que existen en el interior de la célula. La duda que puede surgir es si estas condiciones ficticias pueden invalidar a los ligandos como posibles agentes terapéuticos. Lo cierto es que está ampliamente documentado que el RNA, así como el DNA, está enmascarado por cationes que contrarrestan la densidad de carga negativa que produce el anión polifosfato.<sup>[1,2]</sup> Por este motivo, los ligandos cargados positivamente, como los descritos en este trabajo que tienen como mínimo la carga positiva del residuo de lisina y la del grupo amino terminal, sufren una importante disminución de la atracción electrostática (o de Coulomb) que facilitaría el reconocimiento entre ligando y diana. Además, los ligandos deben desplazar a los cationes para poder interactuar con sus dianas. En consecuencia, la afinidad de los ligandos catiónicos (e incluso la de otros sin carga) por los ácidos nucleicos disminuye al aumentar la fuerza iónica del medio.<sup>[3-5]</sup> En definitiva, las constantes de disociación que se han determinado son, seguramente, mejores que las que podrían darse en condiciones fisiológicas. A esta cuestión termodinámica debe sumarse la baja cinética de unión de los ligandos puesta de manifiesto en la histéresis observada de las curvas de fusión en condiciones de alta fuerza iónica. Al respecto hay que decir que:

1. En la literatura se pueden encontrar casos en los que la afinidad de los ligandos por sus dianas de ácidos nucleicos se ha determinado en condiciones parecidas a las nuestras.<sup>[6]</sup>
2. El problema cinético no es fácil de resolver y ha sido una traba importante a la hora de evaluar la complejación. El principal problema es que es poco viable llevar a cabo experimentos de ITC de interacciones con cinéticas muy lentas.
3. En cuanto a la cuestión termodinámica, es difícil saber hasta qué punto las afinidades pueden ser diferentes en condiciones fisiológicas. En una publicación reciente<sup>[7]</sup> se analiza la dependencia de las constantes de afinidad de un par de ligandos de RNA con la concentración de  $\text{Na}^+$  en un rango de 10 a 50 mM de  $\text{Na}^+$ . Los resultados muestran que existe una dependencia concentración salina-afinidad,<sup>[8-10]</sup> pero que al multiplicar por cinco la concentración de  $\text{Na}^+$ , la afinidad no disminuye en la misma proporción sino que lo hace alrededor de 2-2.5 veces, dependiendo de las dianas. En el mismo trabajo desglosan la variación de la energía de Gibbs ( $\Delta G_{obs}$ ), relacionada directamente con la constante de afinidad ( $K_a$ ), en dos términos, la contribución no polielectrostática ( $\Delta G^t$ ) y la polielectrostática ( $\Delta G^{pe}$ ) (E.1). La contribución polielectrostática ( $\Delta G^{pe}$ ), que es favorable a la interacción, proviene de la liberación de cationes condensados en la hélice del RNA debido a la unión de los ligandos. El aumento de la concentración catiónica, como puede verse en la ecuación, supone la disminución de la contribución polielectrostática ( $\Delta G^{pe}$ ) y, en consecuencia, de la constante de afinidad. No obstante, en el estudio citado se muestra que, para los ligandos estudiados, la

contribución de  $\Delta G^{pe}$  supone sólo entre un 10 y un 25% de la energía de Gibbs observada en el rango de 10 a 50 mM de  $Na^+$ .

$$\Delta G_{obs} = -RT \ln K_a = \Delta G^{pe} + \Delta G^t = z\psi \cdot RT \ln[M^+] + \Delta G^t \quad (E.1)$$

donde  $[M^+]$  es la concentración de cationes monovalentes en el medio,  $z$  es la carga aparente del ligando y  $\psi$  la fracción de cationes  $M^+$  unida por grupo fosfato

Se tendría que realizar un estudio parecido, aumentando paulatinamente la fuerza iónica en diferentes experimentos de ITC y valorar la influencia de los cationes en la afinidad de nuestros ligandos por sus dianas objetivo. Todo ello sin olvidar que el techo de dichos experimentos viene fijado por la necesidad de obtener calores de interacción de una magnitud que permita un buen ajuste de la isoterma.

#### *¿Debe un buen ligando estabilizar los hairpins?*

Una sorpresa relativa de los ligandos Janus es que, contrariamente a lo que sucede con la inmensa mayoría de ligandos, no estabilizan la estructura de sus RNAs diana. Como se ha descrito en la memoria, las curvas de desnaturalización térmica controlada por UV y el dicroísmo circular indican que la alteración que producen los ligandos en sus correspondientes dianas son mínimas y, más bien, provocan una ligera desestabilización de los *hairpins*. Al respecto, hay que decir que estos resultados no entran en contradicción con los datos de ITC que muestran que los ligandos se unen a sus dianas con notable afinidad. Como está bien documentado, es complicado intentar correlacionar variaciones de  $T_m$  con  $K_a$  puesto que  $\Delta T_m$  depende de muchos otros factores además de la afinidad.<sup>[11]</sup> Lo que sí es cierto, es que las propiedades ópticas (UV) o quiroópticas (DC) de los complejos ligando-RNA difieren muy poco de las de las dianas de RNA. Cualitativamente, es fácil imaginar que la introducción de las bases Janus pirimidínicas entre los pares de pirimidinas U·U y C·U prácticamente no distorsiona los tallos de los *hairpin* y sólo los ensancha ligeramente en el punto de interacción. Este leve ensanchamiento es el que equivale a la formación de un triplete constituido por tres pirimidinas respecto al patrón habitual de purina-pirimidina. Por otro lado, el objetivo de los ligandos no es estabilizar los *hairpins*, sino impedir que la proteína MBNL1 se una a los RNAs tóxicos. En otros términos, aquellas moléculas que desestabilicen la estructura de los RNAs mutantes también pueden inhibir la unión de la proteína MBNL1 y ser unos buenos agentes terapéuticos. Un ejemplo es el péptido ABP1 descrito por Perez-Payá y cols. que parece desestructurar CUG<sup>exp</sup>.<sup>[12]</sup>

#### *¿La interacción de los ligandos Janus se produce por el surco mayor del RNA o por el menor?*

Una cuestión que no se ha abordado hasta ahora es si los ligandos Janus acceden a las dianas de RNA a través del surco mayor o del menor. Lo primero que hay que recordar al respecto es la gran diferencia que existe entre los surcos del DNA y los del RNA (Figura D.1). El surco mayor del RNA es considerablemente más estrecho y profundo que el del DNA, mientras que el surco menor es más superficial en el RNA que en el DNA. Así pues, ninguno de los surcos del RNA es particularmente receptivo a la unión de ligandos. En principio, el surco mayor contiene más sitios de unión potenciales y es más electronegativo, pero es muy estrecho. Por otro lado, el surco menor parece más accesible aunque es informativamente menos rico. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la perturbación que introducen los *mismatches* en la doble hélice,

como los U·U y C·U de las dianas de DM, puede proporcionar un sitio de unión de proteínas y pequeñas moléculas.

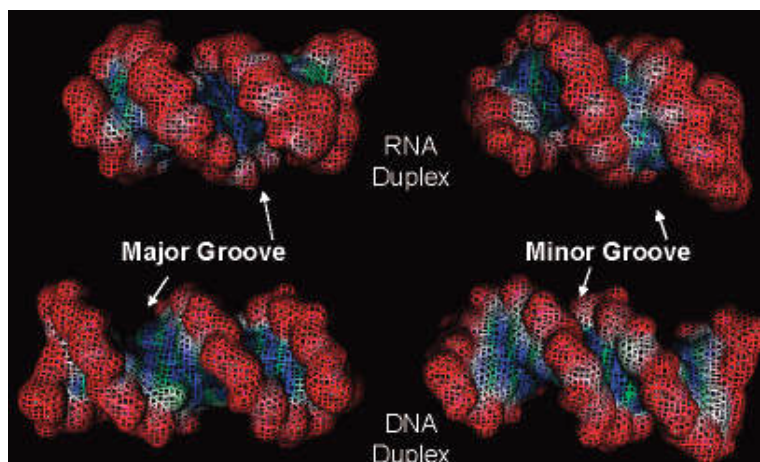


Fig. D.1. Comparativa de los surcos mayor y menor de los dúplexes de DNA y RNA.

Las bases Janus  $J_T$  y  $J_D$  son distintas en su modo potencial de interactuar con los pares U·U y C·U de sus respectivas dianas. En efecto,  $J_T$  presenta en ambas caras una distribución simétrica D-A-D de sus grupos dadores y aceptores de enlaces de hidrógeno por lo que, sobre el papel, tanto podría acceder al par U·U por el surco mayor como por el menor. Por el contrario,  $J_D$  tiene una de las caras con la misma distribución D-A-D, mientras que la que debe interactuar con C es asimétrica del tipo D-D-A. Por este motivo,  $J_D$  sólo puede interactuar con el par C·U por el surco mayor (Figura D.2). Hay que mencionar que Zimmerman y cols. deducen mediante estudios de modulado molecular que ligandos análogos a los que contienen  $J_T$  se unen a los pares U·U a través del surco mayor.<sup>[13-15]</sup>

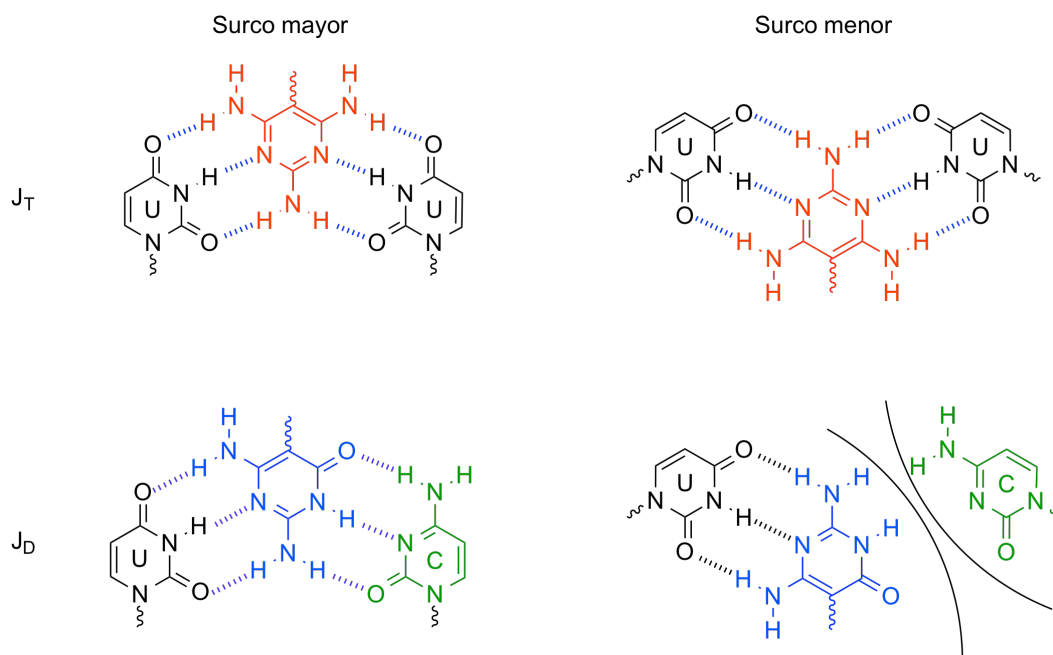


Fig.D.2. Reconocimiento de los pares U·U y C·U por las bases  $J_T$  y  $J_D$ , respectivamente, por el surco mayor y menor.



*Perfil termodinámico de la interacción de los ligandos Janus*

Es tentador relacionar el diferente perfil termodinámico de la interacción de los ligandos Janus con sus dianas con la unión a través de surcos diferentes. Recordemos que la interacción de los ligandos  $J_T$  con la diana hCUG está entálpicamente dirigida ( $\Delta H < 0$ ,  $\Delta S < 0$ ) mientras que, la unión de los ligandos  $J_D$  a hCCUG, está dominada por el factor entrópico, aunque el término entálpico también es favorable ( $\Delta H < 0$ ,  $\Delta S > 0$ ). Se ha dicho en la memoria que el perfil de interacción de  $J_T$  ( $\Delta H < 0$ ,  $\Delta S < 0$ ) es propio de intercalantes y el de  $J_D$  ( $\Delta H < 0$ ,  $\Delta S > 0$ ) de ligandos de surco. En realidad, esta generalización es válida, sobre todo, para la interacción de ligandos con el DNA, que es de quien se dispone de mayor abundancia de datos. Con el RNA la situación puede ser muy diferente, entre otros motivos por las diferencias que existen entre sus surcos y los del DNA. A falta de un número suficiente de estudios con RNA que permitan hacer generalizaciones, se ha escogido un caso concreto para ilustrar esta diferencia. En un estudio de la unión al RNA de dos ligandos típicos de ácidos nucleicos, proflavina y Hoechst 33258, se llega a la conclusión de que su perfil termodinámico es peculiar.<sup>[16]</sup> La interacción de la proflavina, un típico intercalante, con el RNA está entrópicamente dirigida y las variaciones entálpicas son ligeramente positivas y desfavorables ( $\Delta H > 0$ ,  $\Delta S > 0$ ). El ligando de surco Hoechst 33258 tiene el perfil opuesto y su interacción con el RNA está controlada entálpicamente. Es decir, ambos perfiles termodinámicos son significativamente distintos a los que tienen los mismos ligandos con el DNA. Parece que sólo permitiría salir de dudas un estudio estructural detallado, por RMN o difracción de rayos X, de los complejos que forman nuestros ligandos Janus con sus RNAs diana.

*Los ligandos  $J_TG_nJ_TK$*

Resulta en cierto modo intrigante, como ya se ha comentado en el Capítulo 2, el perfil termodinámico de la interacción de  $J_TG_3J_TK$  con hCUG respecto al que tienen  $J_TG_4J_TK$  y  $J_TG_5J_TK$ . En efecto, la entalpía de unión de  $J_TG_3J_TK$  es mucho mayor, y por tanto más favorable a la interacción que las de los otros dos ligandos. A simple vista, tres residuos de glicina entre las  $J_T$  a duras penas abarcan la distancia que hay que cubrir entre dos pares U·U en hCUG. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el monómero de PNA de  $J_T$  tiene un grupo metileno adicional entre la base y el esqueleto, respecto a los monómeros de PNA habituales. Además, la doble hélice del RNA está algo más compactada (11 bases por vuelta) que la del DNA (unas 10 bases). Bien podría estar sucediendo que el esqueleto de  $J_TG_3J_TK$  se ajustara mejor al surco y que la superior entalpía de unión de  $J_TG_3J_TK$  reflejara interacciones favorables entre su esqueleto y el RNA. Otra cosa es que, como resultado de una compensación entálpico-entrópica, la superior entalpía de unión de  $J_TG_3J_TK$  no se ve reflejada en la constante de disociación y, finalmente, las constantes de disociación de los tres ligandos diméricos son muy parecidas.

En cuanto al metileno adicional del monómero de  $J_T$ , parece interesante recordar que en un estudio de formación de tríplex entre PNAs y RNAs de doble cadena se llega a la conclusión que un conector  $CH_2-CH_2-CO$  (como en  $J_T$ ) entre las bases y el esqueleto de PNA es más efectivo que un conector con un grupo metileno menos.<sup>[17]</sup> Puesto que desde el punto de vista sintético resulta complicado obtener el monómero de  $J_T$  con un metileno menos, tal vez podría ser interesante estudiar cómo afecta en la interacción la adición al monómero de  $J_D$  de este metileno entre la base y el esqueleto. Por otro lado, se podría reflexionar si la diferencia de este grupo metileno entre los ligandos con  $J_T$  y  $J_D$  explica de algún modo su distinto perfil

termodinámico de interacción. En cualquier caso, se pone de nuevo de manifiesto que un estudio estructural a nivel atómico de los complejos podría permitir aclarar muchos de estos aspectos.

#### *Ligandos con $J_W$*

En cuanto a la base  $J_W$ , se puede añadir bien poco a lo comentado en la memoria. La información obtenida mediante las técnicas biofísicas empleadas es escasa y relativamente confusa. La única conclusión clara es que su presencia en ligandos que ya contienen las bases  $J_T$  o  $J_D$  influye negativamente en la interacción con sus respectivas dianas. A esto hay que añadir que no se han podido obtener datos termodinámicos de los ligandos  $J_WK$  y  $J_WJ_WK$ . En principio, parece lógico pensar que si  $J_W$  se introduce entre C (pirimidina) y G (purina) provocará una distorsión significativa en la doble hélice de hCUG o hCCUG. Además, su introducción implica romper los enlaces de hidrógeno Watson-Crick existentes entre C y G, con el consiguiente coste entálpico, y, no menos importante, perturbar el apilamiento de mayor energía que existe, el de (CG)·(GC) (14.59 kcal/mol par).<sup>[18]</sup> Pese a todo, no se han encontrado evidencias claras de que este efecto se produzca. En resumen, se ha puesto de manifiesto que la base Janus  $J_W$  no es útil en el contexto de los ligandos de CUG<sup>exp</sup> y CCUG<sup>exp</sup>. En todo caso, la única manera de llegar a entender cómo interaccionan los ligandos que contienen  $J_W$  con hCUG y hCCUG sería mediante un minucioso estudio estructural.

#### *El papel de la lisina*

Otra cuestión interesante es el papel que juega en la interacción el residuo de lisina presente en el extremo C-terminal de todos los ligandos. Ha quedado claro que la lisina no es decisiva en la interacción, pues la Ac-Lys-NH<sub>2</sub> no se une apreciablemente a las dianas. Sin embargo, para complementar este dato habría que preparar, evaluar y comparar el comportamiento de unos ligandos análogos a los evaluados en esta tesis doctoral pero sin lisina.

Aunque menos relevante, cabe preguntarse por la orientación de los ligandos Janus respecto al dúplex de los RNAs diana. ¿Existe una orientación preferente? ¿Hacia dónde se orienta la lisina? Lo único que se ha logrado determinar es que los ligandos monoméricos  $J_DK$  unidos a un par C·U impiden que otro ligando igual interaccione con el par U·C contiguo. Podría suceder que la lisina del primer ligando  $J_DK$  se situara frente del par U·C contiguo y bloqueara el acceso de una segunda molécula, sin embargo, no se tiene ninguna certeza empírica que lo demuestre.

#### *¿Cómo mejorar la afinidad y selectividad de los ligandos Janus?*

Una de las preguntas más trascendentes es cómo aumentar la afinidad de los ligandos Janus por sus dianas de RNA. La respuesta más evidente es que hay que proseguir con el ensamblado modular, preparando ligandos Janus que puedan interaccionar con un mayor número de pares U·U o C·U. Obviamente se hace referencia a ligandos del tipo  $J_TG_nJ_TG_nJ_T$  para reconocer tres pares U·U del *hairpin* de CUG<sup>exp</sup> de la DM1, o a ligandos del tipo  $J_DJ_DG_nJ_DJ_D$  para unirse al CCUG<sup>exp</sup> de la DM2. De todos modos, hay otras estrategias potenciales para aumentar la afinidad de los ligandos, como son la introducción de algún residuo de aminoácido cargado positivamente reemplazando a una glicina o el incorporar intercalantes en diferentes posiciones, o bien entre bases Janus o en los extremos del ligando de PNA. Sin embargo, lo que hay que tener muy presente es que el posible aumento de la afinidad de los ligandos no debe

en ningún momento comprometer la selectividad de los ligandos Janus que, como hemos visto, es bastante buena. Parece difícil que el alargar los ligandos con más bases Janus para reconocer un mayor número de pares no canónicos pueda conducir a ligandos menos selectivos, pero no puede decirse lo mismo de las otras alternativas planteadas. Al respecto, conviene no olvidar que la afinidad y la selectividad son como las caras de las bases Janus: dos caras de la misma moneda,<sup>[19]</sup> pues a veces resulta que un aumento excesivo o poco meditado en la afinidad hace perder selectividad a los ligandos.

#### *De fármacos potenciales a fármacos útiles*

Finalmente, conviene discutir aquellos pasos a dar, al menos los primeros, para convertir a los ligandos Janus en agentes terapéuticos para el tratamiento de las distrofias miotónicas de los tipos 1 y 2. A lo largo de esta discusión han surgido varios temas que van en la dirección de la optimización de los ligandos. Con todo, no hay duda de que el experimento más decisivo consiste en evaluar la capacidad de los ligandos de perturbar el complejo MBNL1-C(C)UG<sup>exp</sup>. En la literatura se describen dos tipos de métodos para verificar si un ligando inhibe la unión de la proteína al RNA y para comprobar si el ligando es capaz de desplazar a la proteína del complejo MBNL1-RNA. Uno de los métodos de análisis es un complicado y laborioso ensayo de fluorescencia,<sup>[20-22]</sup> pero el segundo es un sencillo ensayo de variación de la movilidad electroforética (EMSA, *electrophoretic mobility shift assay*)<sup>[23,24]</sup>. En cualquier caso, el factor limitante es disponer de la proteína MBNL1, es decir, del vector de expresión, y posteriormente expresar y purificar la proteína.

Si se demostrara que los ligandos Janus tienen capacidad de inhibir la unión de MBNL1 a CUG<sup>exp</sup> y a CCUG<sup>exp</sup>, se podría pasar a comprobar si hacen desaparecer los focos nucleares en que se colocalizan MBNL1 y los RNAs tóxicos y si se restablecen las funciones de procesado alternativo de varios *pre*-mRNAs en los músculos y en las células neuronales.

Hasta conseguir validar los ligandos Janus como fármacos para tratar las distrofias miotónicas todavía restarían un buen número de pasos, uno de los cuales, y no menor, sería evaluar su aptitud para penetrar las membranas celulares. En este punto parece interesante resaltar la gran barrera que separa un ligando afín y selectivo de ser un fármaco potencial, ya que muchos de los ligandos descritos que parecían grandes promesas no han respondido a las expectativas que despertaron. En una revisión muy reciente de las estrategias para combatir las DMs se hace un análisis crítico de muchos de los ligandos descritos.<sup>[25]</sup> Por poner sólo algunos ejemplos, la pentamidina, que presuntamente conseguía liberar MBNL1 de CUG<sup>exp</sup> uniéndose al surco menor del *hairpin*,<sup>[26]</sup> no sólo tiene una elevada toxicidad sino que además parece que su administración provoca una reducción de los transcritos de CUG<sup>exp</sup>, tal vez porque inhibe la transcripción de las repeticiones CTG/CAG del DNA.<sup>[27]</sup> Un segundo ejemplo es el de una pequeña molécula que contiene un fragmento tiofénico que perturba el complejo MBNL1-CUG<sup>exp</sup>. Su modo de actuación es unirse a uno de los dominios de MBNL1 alterando los procesados alternativos regulados por la proteína desencadenando un efecto patológico similar al de la DM1.<sup>[28]</sup> Como último ejemplo, los ligandos modulares de kanamicina no presentan actividad en modelos celulares de DM1 debido a su baja permeabilidad celular.<sup>[29]</sup>

## Bibliografía

- [1] R. Owczarzy, Y. You, B. G. Moreira, J. A. Manthey, L. Huang, M. A. Behlke, J. A. Walder, *Biochemistry* **2004**, *43*, 3537–3554.
- [2] R. Owczarzy, B. G. Moreira, Y. You, M. A. Behlke, J. A. Walder, *Biochemistry* **2008**, *47*, 5336–5353.
- [3] M. T. R. Jr., T. M. Lohman, P. Haseh, *J. Mol. Biol.* **1976**, *107*, 145–158.
- [4] K. A. Sharp, B. Honig, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1995**, *5*, 323–328.
- [5] R. C. Harris, J. H. Bredenber, A. R. J. Silalahi, A. H. Boschitsch, M. O. Fenley, *Biophys. Chem.* **2011**, *156*, 79–87.
- [6] J. R. Thomas, X. Liu, P. J. Hergenrother, *Biochemistry* **2006**, *45*, 10928–10938.
- [7] A. Das, G. Suresh Kumar, *Mol. Biosyst.* **2012**, *8*, 1958.
- [8] M. M. Islam, S. R. Chowdhury, G. S. Kumar, *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 1210–1224.
- [9] A. Das, K. Bhadra, G. Suresh Kumar, *PLoS ONE* **2011**, *6*, e23186.
- [10] I. Haq, *Arch. Biochem. Biophys.* **2002**, *403*, 1–15.
- [11] J.-L. Mergny, L. Lacroix, *Oligonucleotides* **2003**, *13*, 515–537.
- [12] A. García-López, B. Llamusi, M. Orzáez, E. Pérez-Payá, R. D. Artero, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 11866–11871.
- [13] J. F. Arambula, S. R. Ramisetty, A. M. Baranger, S. C. Zimmerman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 16068–16073.
- [14] C. H. Wong, S. Richardson, Y. J. Ho, A. M. H. Lucas, T. Tuccinardi, A. M. Baranger, S. C. Zimmerman, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 2505–2509.
- [15] C.-H. Wong, L. Nguyen, J. Peh, L. M. Luu, J. S. Sanchez, S. L. Richardson, T. Tuccinardi, H. Tsoi, W. Y. Chan, H. Y. E. Chan, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 6355–6361.
- [16] R. Sinha, M. Hossain, G. S. Kumar, *DNA Cell Biol.* **2009**, *28*, 209–219.
- [17] P. Gupta, T. Zengeya, E. Rozners, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 11125–11127.
- [18] R. L. Ornstein, R. Rein, *Biopolymers* **1978**, *17*, 2341–2360.
- [19] V. V. Demidov, M. D. Frank-Kamenetskii, *Trends Biochem. Sci.* **2004**, *29*, 62–71.
- [20] M. M. Lee, A. Pushechnikov, M. D. Disney, *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4*, 345–355.
- [21] M. M. Lee, J. L. Childs-Disney, A. Pushechnikov, J. M. French, K. Sobczak, C. A. Thornton, M. D. Disney, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 17464–17472.
- [22] M. D. Disney, M. M. Lee, A. Pushechnikov, J. L. Childs-Disney, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 375–382.
- [23] J. F. Arambula, S. R. Ramisetty, A. M. Baranger, S. C. Zimmerman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**.
- [24] C. H. Wong, Y. Fu, S. R. Ramisetty, A. M. Baranger, S. C. Zimmerman, *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 8881–8890.
- [25] P. Konieczny, E. Stepniak-Konieczna, K. Sobczak, *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 10873–10887.
- [26] M. B. Warf, M. Nakamori, C. M. Matthys, C. A. Thornton, J. A. Berglund, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 18551–18556.
- [27] L. A. Coonrod, M. Nakamori, W. Wang, S. Carrell, C. L. Hilton, M. J. Bodner, R. B. Siboni, A. G. Docter, M. M. Haley, C. A. Thornton, et al., *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 2528–2537.
- [28] J. L. Childs-Disney, E. Stepniak-Konieczna, T. Tran, I. Yildirim, H. Park, C. Z. Chen, J. Hoskins, N. Southall, J. J. Marugan, S. Patnaik, et al., *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 2044.
- [29] J. L. Childs-Disney, R. Parkesh, M. Nakamori, C. A. Thornton, M. D. Disney, *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 1984–1993.



***Conclusiones*** ||



- En esta tesis doctoral se ha diseñado y validado una estrategia para reconocer los RNAs expandidos asociados a las distrofias miotónicas (DMs) mediante ligandos con estructura de poliamida (tipo PNA) conteniendo las bases Janus  $J_T$  y  $J_D$  capaces de unirse a los apareamientos no canónicos U·U y C·U.
- La obtención del monómero de PNA con la base Janus  $J_T$  se ha logrado adaptando y complementando un esquema sintético previamente descrito. El monómero presenta un metileno adicional en la cadena que separa la base del esqueleto de N-(2-aminoetil)glicina. Los intentos de obtención del monómero de PNA con  $J_T$  sin el grupo metileno adicional llevando a cabo la ruta anterior adaptada han fracasado, muy probablemente, debido al gran impedimento estérico provocado por los dos grupos protectores Boc de cada una de las aminas exocíclicas de  $J_T$ . Los empeños por conseguir intermedios de la ruta con menor número de grupos Boc no han dado buenos resultados, principalmente por la dificultad de obtener un único, o muy mayoritario, producto de reacción. Asimismo, se ha observado que los grupos Boc de los derivados de  $J_T$  parcialmente protegidos presentan una importante inestabilidad en disolución. Las alternativas ensayadas para superar los problemas surgidos mediante nuevas rutas sintéticas tampoco han dado el fruto deseado.
- El monómero de PNA con la base  $J_D$  se ha preparado siguiendo una ruta sintética basada en un esquema de síntesis previamente descrito en el que se ha puesto a punto una nueva estrategia de protección con grupos Boc.
- El desarrollo de un nuevo esquema sintético para la obtención del monómero de PNA con la base  $J_W$  a partir de la triazina amelida no ha sido viable debido, principalmente, a la gran insolubilidad del heterociclo. La obtención del monómero se ha llevado a cabo finalmente reproduciendo una síntesis ya descrita en la literatura.
- Partiendo de la estructura de los RNAs tóxicos de las DMs se ha llevado a cabo el diseño racional y la síntesis de una batería de ligandos de tipo PNA que contienen las mencionadas bases Janus. Todos los ligandos contienen una lisina en su extremo C-terminal y, en los ligandos modularmente ensamblados, se han separado las unidades con bases Janus mediante residuos de glicina. La síntesis de los ligandos se ha realizado manualmente, con rendimientos aceptables, siguiendo los procedimientos habituales de síntesis de PNAs y péptidos en fase sólida.
- La elección de la diana ha sido un punto clave para poder evaluar los ligandos mediante ensayos biofísicos. La diana G(CUG)<sub>4</sub>C no ha permitido llevar a cabo la evaluación de los ligandos debido a la mezcla de conformaciones que presenta en solución. Se han tenido que diseñar unos modelos estructurados como *hairpin* (hCUG y hCCUG) estabilizados por la incorporación de un *loop* ultra estable y un par C-G adicional para poder llevar a cabo los estudios biofísicos.
- En los ensayos de desnaturalización y renaturalización térmica llevados a cabo con algunos ligandos  $J_T$  y la diana hCUG en las condiciones habituales de fuerza iónica se ha observado histéresis, que pone de manifiesto la lenta cinética de la interacción. Este



fenómeno ha podido ser eliminado disminuyendo la concentración de sales en el medio, lo que resalta la importancia de las condiciones salinas en los ensayos biofísicos, ya que influyen tanto en la estructuración del RNA como en su interacción con los ligandos. A lo largo de esta tesis se ha logrado obtener datos de la interacción entre los ligandos estudiados y sus respectivas dianas trabajando en condiciones de fuerza iónica baja.

- Las interacciones de los ligandos con las bases  $J_T$  y  $J_D$  con sus respectivas dianas han mostrado ciertas características en común, según indican los ensayos de desnaturalización térmica controlada por UV, DC, y RMN-<sup>19</sup>F. Generalmente, los ligandos no modifican las estructuras de los *hairpins* hCUG y hCCUG significativamente ni afectan a su estabilidad térmica. Seguramente esto es debido a que las bases Janus reconocen e interaccionan con el *mismatch* U·U o C·U correspondiente introduciéndose como una cuña entre las dos bases pirimidínicas sin provocar una apertura o distorsión sustancial de la doble hélice.
- La calorimetría de valoración isotérmica (ITC) ha sido, sin ninguna duda, la técnica biofísica más informativa y útil de todas las empleadas para evaluar la unión de los ligandos a sus dianas. La ITC, que tiene la ventaja de que no requiere marcaje ni de la diana ni de los ligandos, ha permitido determinar las constantes de disociación y los parámetros termodinámicos ( $\Delta H$ ,  $\Delta S$  y  $\Delta G$ ) de la interacción, así como la estequiometría de los complejos formados.
- Los ligandos que contienen solamente la base  $J_T$ , es decir  $J_TK$  y  $J_TG_nJ_TK$  ( $n= 3-5$ ), se unen a la diana hCUG con constantes de disociación del orden  $\mu M$  bajo ( $9 \mu M$  y  $4 \mu M$ , respectivamente). Los tres ligandos  $J_TG_nJ_TK$  ( $n= 3-5$ ) muestran la misma afinidad por la diana, observándose una notable compensación entálpico-entrópica en sus contribuciones energéticas. La interacción de todos los ligandos está fuertemente dirigida por el factor entálpico, mientras que el término entrópico es completamente desfavorable a la unión. No existe una dependencia clara de la unión de los ligandos con el pH, aunque se ha podido comprobar que la efectividad del ligando  $J_TK$  es aproximadamente la misma en todo el intervalo de pH 5.5-8.0. La estequiometría de los complejos ligando-hCUG, 2:1 para  $J_TK$  y 1:1 para  $J_TG_nJ_TK$  ( $n= 3-5$ ), pone en evidencia que se une una base Janus  $J_T$  por cada par no canónico U·U de hCUG. Toda la información obtenida de un estudio preliminar por resonancia magnética nuclear de protón (RMN- $H^1$ ) de los complejos entre hCUG y los ligandos  $J_TK$  y  $J_TG_nJ_TK$ , avala la formación de los complejos deseados y el reconocimiento de los pares U·U por  $J_T$ , aunque no se han podido detectar NOEs intermoleculares.
- Los complejos formados entre los ligandos que contienen exclusivamente la base  $J_D$ ,  $J_DK$  y  $J_DJ_DK$ , y la diana hCCUG presentan unas constantes de disociación de  $15 \mu M$  y  $6 \mu M$ , respectivamente. La interacción está dirigida entrópicamente, aunque el término entálpico también es favorable a la unión. La estequiometría de los complejos es en ambos casos 2:1 (ligando-hCCUG), lo que indica que cada ligando se une a un *loop* interno del tallo de la diana y que la base  $J_D$  reconoce los pares C·U. En el caso del

ligando  $J_DK$ , la estequiometría observada indica que la ocupación del *loop* interno por una primera molécula de ligando inhibe la unión de una segunda molécula.

- Los ligandos  $J_TK$  y  $J_TJ_TK$ , pensados para pares U·U, se han analizado con la diana hCCUG, que contiene pares C·U, para evaluar su potencial de unión a pH ácido. La afinidad de ambos ligandos por hCCUG es unas seis veces mayor a pH 5.50 que a pH neutro, lo que indica que la protonación de la base  $J_T$  modifica su perfil dador-aceptor de enlaces de hidrógeno permitiendo que reconozca el par C·U. Las contribuciones energéticas ( $\Delta H$  y  $\Delta S$ ) a la unión presentan el mismo perfil que las obtenidas para los ligandos con  $J_T$  y la diana hCUG, es decir, se trata de una unión entálpicamente dirigida. La estequiometría de los complejos formados es 2:1 (ligando-hCCUG), que es consistente con la unión de cada ligando a un *loop* interno del tallo de la diana. A pesar de la elevada afinidad del ligando  $J_TJ_TK$  por hCCUG a pH 5.5 ( $K_d = 2.6 \mu M$ ), su potencial utilidad es limitada puesto que a pH fisiológico la afinidad es bastante inferior.
- La espectrometría de masas (EM-ESI) de los complejos analizados,  $J_TK$  y  $J_TG_4J_TK$  con hCUG y  $J_DJ_DK$  con hCCUG, en condiciones de exceso de ligando, muestra que en ningún caso se detecta la formación de un complejo de masa superior al correspondiente a la unión de una base Janus por cada par U·U o C·U de la diana. Estos datos, junto con las estequiometrías determinadas mediante ITC, evidencian el inequívoco reconocimiento de los pares U·U y C·U por parte de los ligandos Janus y, por tanto, el correcto desempeño de la función para la que han sido diseñados.
- No se ha detectado por ITC calor asociado a la interacción de los ligandos que contienen exclusivamente la base  $J_W$ ,  $J_WK$  y  $J_WJ_WK$ , con la diana hCUG. En la evaluación de los ligandos en los que se combina  $J_W$  con  $J_T$  frente a la diana hCUG, se han obtenido unas bajas afinidades de entre 40 y 100  $\mu M$ . Cuando se combina  $J_W$  con  $J_D$  y se estudia su interacción con hCCUG, las  $K_d$  determinadas de  $J_DJ_WK$  y  $J_DJ_WJ_DK$  son del orden de 20  $\mu M$ . De los ensayos de desnaturalización térmica, DC y RMN- $^{19}F$ , se deduce que ninguno de los ligandos con  $J_W$  altera sustancialmente la estructura *hairpin* de las dianas. La considerable disminución de las afinidades observadas respecto a las de los ligandos que no contienen la base  $J_W$  indica que, muy probablemente,  $J_W$  no actúa como cuña Janus de los pares G·C y, además, dificulta de algún modo el reconocimiento de los pares U·U y C·U por  $J_T$  y  $J_D$ .
- La evaluación de la selectividad de los ligandos con mayores afinidades ( $J_TK$ ,  $J_TG_4J_TK$ ,  $J_DK$  y  $J_DJ_DK$ ) se ha realizado mediante ITC frente a un *hairpin* totalmente complementario, un fragmento de IRES viral y el tRNA<sup>Phe</sup>. El ligando monomérico  $J_TK$  presenta por hCUG selectividades (entre 4 y 7) inferiores a las del ligando dimérico  $J_TG_4J_TK$  (entre 9 y 44), lo que valida la estrategia de ensamblado modular de las bases  $J_T$  para generar ligandos selectivos de los RNAs expandidos. Los ligandos  $J_DK$  y  $J_DJ_DK$  presentan también unas buenas selectividades por hCCUG (entre 8 y 23). Las elevadas selectividades observadas de esta primera generación de ligandos por sus respectivas dianas, junto con sus no despreciables afinidades, avalan la estrategia diseñada y ratifican a los ligandos con bases Janus como firmes candidatos para el reconocimiento de los RNAs tóxicos asociados a las DMs.



***Apéndice*** ||

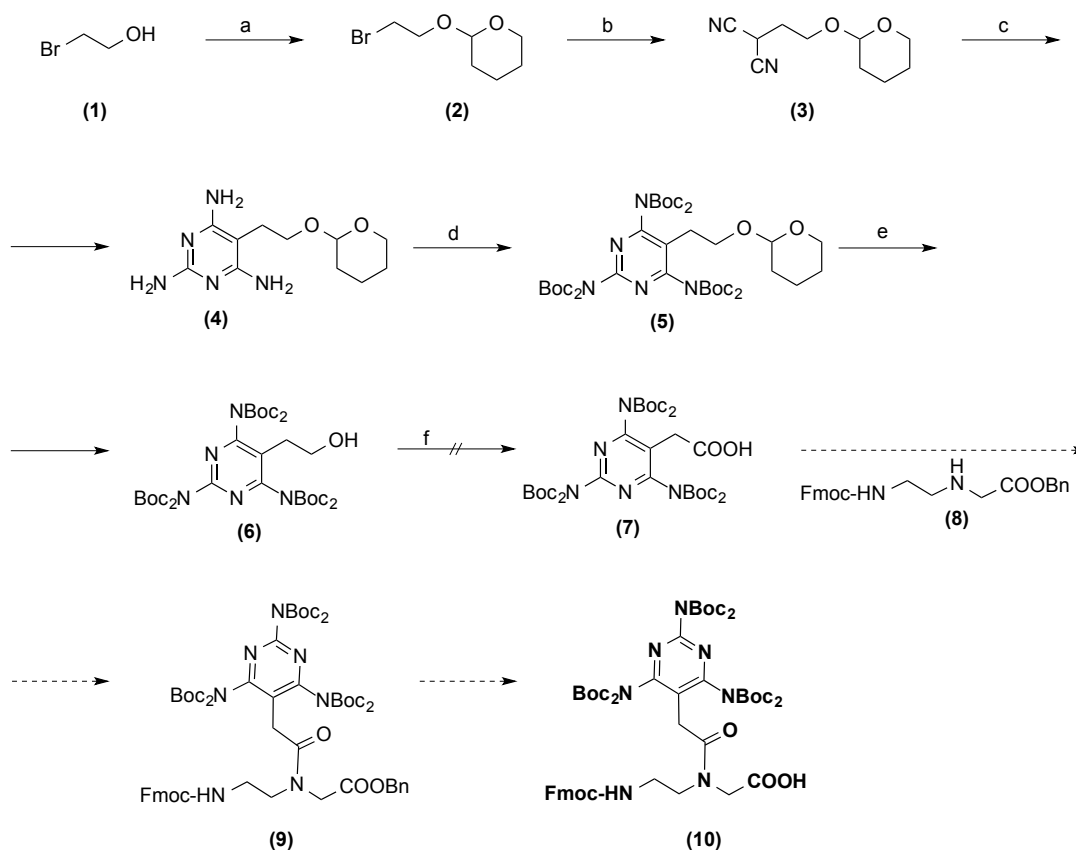


## 1. Intentos de obtención del monómero de PNA no modificado de J<sub>T</sub>

### 1.1. Primera Ruta Sintética

#### 1.1.1. Bis-protección de J<sub>T</sub> con grupos Boc

Inicialmente, se diseñó una primera ruta sintética para la obtención del monómero de PNA con la base de Janus J<sub>T</sub> basada en una patente descrita por Fenniri y cols. (Figura A.1).<sup>[1]</sup>

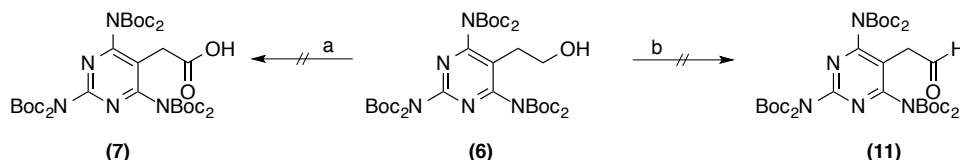


**Fig. A.1.** Ruta sintética inicial diseñada para la obtención del monómero de PNA con J<sub>T</sub>. Los reactivos empleados y los rendimientos obtenidos son los siguientes: (a) DHP (1.1 eq), HCl<sub>cat</sub>, rt, 2.5 h, **100%**; (b) Malononitrilo (2.1 eq), NaH 60% (1.2 eq), DME<sub>anh</sub>, rt, *overnight*, **87%**; (c) 1. Na<sub>(s)</sub> (2 eq) y EtOH<sub>(abs)</sub>, 2. Hidrocloruro de guanidinio (1.3 eq), reflujo, 6 h, **73%**; (d) Boc<sub>2</sub>O (20 eq), DMAP (0.7 eq), TEA (8 eq), THF<sub>anh</sub>, rt, 24-30 h, **58%**; (e) pTsOH<sub>cat</sub>, MeOH, rt, 6 h, **85%**; (f) Oxidación, diferentes reactivos, ver Tabla A.1.

En la síntesis llevada a cabo se partió del compuesto comercial 2-bromoetanol **1** que se protegió como acetal con el grupo tetrahidropiraniolo (THP) con un rendimiento cuantitativo. Sobre el compuesto **2** se le realizó una sustitución nucleófila para incorporar el grupo malononitrilo a la cadena y se obtuvo el producto **3** con buen rendimiento. Posteriormente, se se hizo reaccionar **3** con hidrocloreuro de guanidinio empleando etóxido sódico como base para formar la 2,4,6-triaminopirimidina **4** ya derivatizada en la posición 5. Las aminas del heterociclo debían permanecer protegidas para evitar la posibilidad de tener reacciones secundarias indeseadas en las posteriores etapas sintéticas. Como ya se ha comentado, los grupos protectores escogidos para las bases eran los grupos Boc, así que el siguiente proceso químico fue la *bis*-protección de las aminas de J<sub>T</sub> con anhídrido de Boc (Boc<sub>2</sub>O) empleando la 4-dimetilaminopirimidina (DMAP) como agente catalítico. En esta reacción se empleó un exceso de Boc<sub>2</sub>O para favorecer la completa protección de las aminas y así, mejorar el rendimiento.

Una vez obtenido el producto **5**, se procedió a la desprotección del grupo alcohol mediante hidrólisis ácida (*p*TsOH). El intermedio **6** se obtuvo con muy buen rendimiento y alta pureza sin necesidad de llevar a cabo una purificación.

Los procedimientos experimentales descritos en la patente de Fenniri hasta el compuesto **6** fueron reproducibles en la mayoría de casos, aunque se optimizaron ciertas reacciones y condiciones de purificación.



**Fig. A.2.** Oxidación del alcohol **6** a ácido carboxílico (a) y a aldehído (b). Los agentes oxidantes empleados han sido: (a)  $\text{KMnO}_4$  y TEMPO/ $\text{NaClO}_2$ ; (b) DMP, oxidación de Swern y PCC. (Ver tabla A.1)

Con una apreciable cantidad del alcohol **6**, se planteó todo un abanico de métodos para oxidarlo al ácido carboxílico **7** (Figura A.2 proceso a). Se llevaron a cabo distintos intentos (Tabla A.1) aunque ninguno de ellos con éxito. Los diferentes ensayos fueron controlados mediante CCF y espectrometría de masas (EM-ESI). En una primera aproximación, se intentó la oxidación de **6** empleando  $\text{KMnO}_4$  y trabajando en condiciones básicas para evitar la desprotección de las aminas del heterociclo.<sup>[2]</sup> Ni a temperatura ambiente, ni a  $70^\circ\text{C}$ , la reacción avanzó, únicamente se detectaba producto de partida en el crudo de reacción. Posteriormente, se intentó con el radical TEMPO en combinación con clorito e hipoclorito sódico (lejía comercial).<sup>[3,4]</sup> La reacción se llevó a cabo en un tampón 0.7 M fosfato ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) a pH 6.8 y se dejó evolucionar durante 35 h sin observar indicios de que tuviera lugar la oxidación. Finalmente, se recuperó mayoritariamente el alcohol **6** y productos derivados de la pérdida de algunos grupos protectores Boc.

En ninguno de los intentos de oxidar el alcohol a ácido carboxílico se detectó conversión del alcohol **6**, posiblemente, porque no era capaz de interactuar con los reactivos oxidantes empleados. Viendo los resultados obtenidos, se intentó la oxidación de **6** al aldehído **11** (Figura A.2 proceso b) con periodinato de Dess-Martin (DMP), tal y como Fenniri había descrito para el compuesto análogo a **6** con un metileno adicional en su cadena lateral. Aunque se alargó el tiempo de reacción y se aumentó el número de equivalentes de DMP, el intento fracasó y se recuperó completamente el alcohol de partida **6**. Teniendo en cuenta que la estabilidad del reactivo de Dess-Martin es reducida,<sup>[5]</sup> se pensó que si la reacción evolucionaba muy lentamente y los tiempos de reacción se alargaban mucho, era posible que el oxidante fuera degradándose y, en consecuencia, su efectividad disminuyera. El producto de hidrólisis del DMP es el ácido *o*-iodoxibenzoico (IBX), el cual presenta una importante capacidad oxidante si se emplea en presencia de DMSO.<sup>[6]</sup> Así pues, se creyó interesante realizar la reacción empleando DMSO como disolvente. El ensayo se dejó evolucionar durante algo más de 24 h sin tener evidencias, de nuevo, de que la reacción avanzase.

Agente oxidante	Condiciones de reacción	Producto esperado	Observaciones
KMnO <sub>4</sub> <sup>[2]</sup>	Disolución de NaOH (0.75 eq). rt, 48 h.	<b>7</b>	Recuperación del alcohol <b>6</b> y productos derivados de la pérdida de algún protector Boc.
KMnO <sub>4</sub> <sup>[2]</sup>	Disolución de NaOH (0.75 eq). 70°C, 24 h.	<b>7</b>	
TEMPO/NaClO <sub>2</sub> <sup>[3,4]</sup>	Condiciones tamponadas con fosfatos a pH 6.8. Iniciador NaClO. 35°C, 35 h.	<b>7</b>	
Periodinato de Dess-Martin (DMP) <sup>[1]</sup>	2 eq DMP (2 eq) DCM rt, 20 h.	<b>11</b>	Recuperación del alcohol <b>6</b> .
DMP	DMP (3 eq) DCM rt, 6 h.	<b>11</b>	
DMP	DMP (3 eq) DMSO. rt, 24 h.	<b>11</b>	
Oxidación de Swern <sup>[7]</sup>	Cond. anhidras, DMSO, (COCl) <sub>2</sub> , TEA, DCM. -78°C, 7 h.	<b>11</b>	
Clorocromato de piridinio (PCC) <sup>[8]</sup>	DCM anh. a) rt b) 30°C, 32 h.	<b>11</b>	

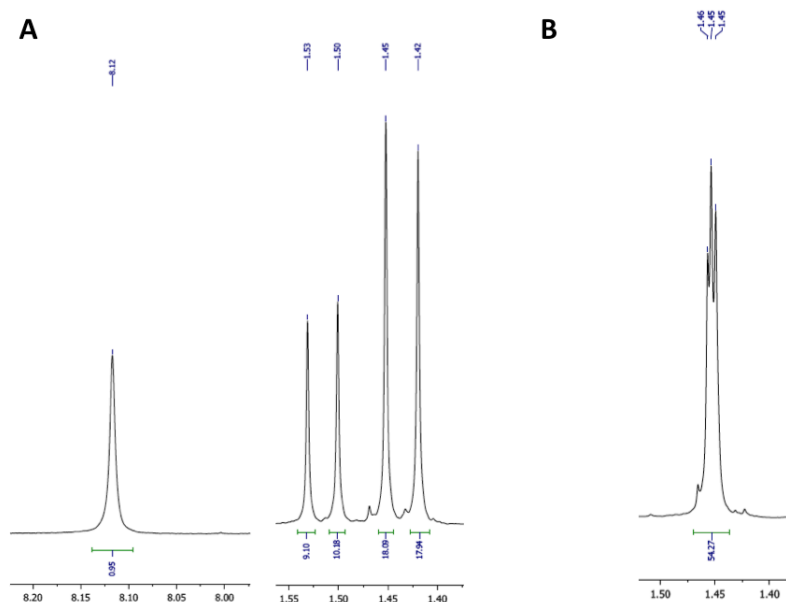
**Tabla A.1.** Intentos de oxidación del alcohol **6** a aldehído o a ácido carboxílico.

También se ensayó el agente oxidante clorocromato de piridinio (PCC)<sup>[8]</sup> y la oxidación de Swern; sin embargo, se obtuvieron los mismos resultados que en los anteriores ensayos. Con el objetivo de comprobar que las condiciones empleadas eran válidas para oxidar un alcohol primario y que los reactivos usados estaban en buenas condiciones, se llevaron a cabo dos ensayos en los que se oxidó alcohol bencílico con DMP y vía la oxidación de Swern. En ambos casos, la obtención del producto de oxidación fue inmediata, lo que ponía en evidencia que si el producto **6** no se lograba oxidar en las mismas condiciones era porque el grupo -CH<sub>2</sub>OH no era capaz de interactuar con los agentes oxidantes y la reacción no se iniciaba.

En la caracterización del alcohol **6** se pudo observar un hecho bastante curioso. Estudiando el RMN-<sup>1</sup>H del compuesto (Figura A.3A) realizado en CDCl<sub>3</sub>, se detectó que la señal del H del grupo hidroxilo presentaba un desplazamiento a campos más bajos de lo esperado ( $\delta = 8.12$



ppm), hecho que podía estar indicando que estuviera formando un enlace de hidrógeno. Además, se diferenciaban cuatro señales distintas correspondientes a los grupos metilo de los protectores Boc con una relación de integraciones 2:2:1:1. Si se analiza la simetría de **6**, se puede encontrar un eje  $C_2$  y dos planos de simetría que convierten en equivalentes los grupos Boc de las posiciones 4 y 6. Así pues, como sucedía en el espectro del intermedio **5**, lo esperado era obtener dos singuletes con integraciones de 36H y 18H, respectivamente. Se planteó la hipótesis de que el protón del grupo hidroxilo de **6** formara un enlace de hidrógeno intramolecular que causara la pérdida de simetría de la molécula dando lugar a una estructura en la que la equivalencia de los grupos protectores Boc fuera distinta a la esperada. Para corroborar la hipótesis se realizó un nuevo espectro de RMN- $^1\text{H}$  disolviendo **6** en MeOD, un disolvente que evitaría la formación del posible enlace de hidrógeno. En este espectro (Figura A.3B), la señal del alcohol desapareció debido al intercambio con el D del disolvente y, además, no se observó el mismo desdoblamiento de las señales de los metilos del grupo Boc. Los datos obtenidos indican que la hipótesis planteada podría ser plausible, sin embargo, no se han realizado más estudios para determinar la estructura adoptada por **6**. Así pues, sin tener más evidencias, se podría conjeturar sobre la formación de un enlace de hidrógeno entre el grupo hidroxilo y el N básico de la pirimidina formando un ciclo de siete eslabones. Esta conclusión permitía explicar los resultados obtenidos en los intentos de oxidación del alcohol, pues la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular provocaría que el grupo hidroxilo fuese poco accesible y mucho menos reactivo. Además, el gran impedimento estérico que provocaban los grupos protectores Boc de las posiciones 4 y 6 también podían dificultar la interacción del alcohol con los agentes oxidantes.

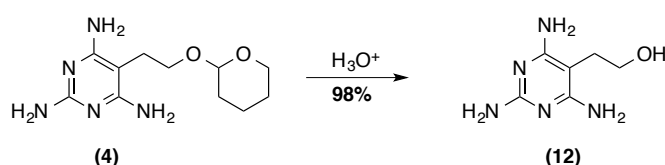


**Fig. A.3.** Zonas del espectro del alcohol **6**. A) Espectro realizado en  $\text{CDCl}_3$ . Zonas del espectro de  $^1\text{H}$  correspondientes al grupo hidroxilo y a los metilos de los grupos protectores Boc; B) Espectro realizado en MeOD. Zona del espectro correspondiente a los metilos de los grupos protectores Boc.

Aceptada la incapacidad de oxidar el compuesto **6**, se planteó la síntesis del compuesto **12** que no presenta protección de las aminas. Esta síntesis tenía dos objetivos: en primer lugar,

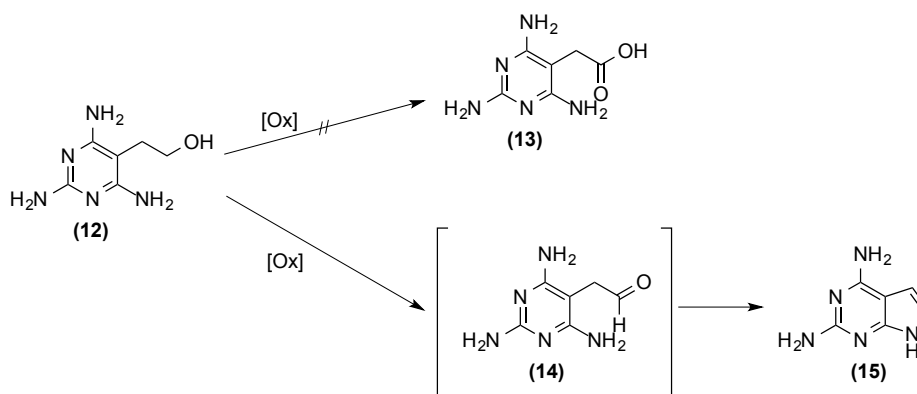
obtener un derivado simple de la base J<sub>T</sub> con el que llevar a cabo algunos ensayos preliminares de interacción y, en segundo lugar, intentar su oxidación evitando el impedimento estérico que los grupo Boc causaban en el compuesto protegido.

La síntesis se realizó a partir del compuesto **4** vía la desprotección del alcohol en condiciones ácidas (Figura A.4). Inicialmente, empleando ácido *p*TsOH (1.2 eq) en MeOH, se consiguió aislar el *p*-toluensulfonato de **12** que se caracterizó por EM-ESI (+) y RMN-<sup>1</sup>H. Con el objetivo de aislar el producto **12** neutro, se llevó la solución a pH básico y se purificó por MPLC. Sin embargo, sólo se logró aislar una pequeña fracción de **12** en la que, por RMN-<sup>1</sup>H, aún se detectaba la presencia de *p*TsOH. Así pues, se plantearon unas nuevas condiciones de reacción en las que se utilizó ácido acético acuoso (1:1) para la hidrólisis del acetal y NH<sub>3(ac)</sub> para la posterior neutralización. El AcONH<sub>4</sub> formado se eliminó en la liofilización del crudo de reacción ya que se trata de una sal volátil. Las condiciones de la reacción se optimizaron logrando obtener casi cuantitativamente el producto **12** después de una rápida purificación por MPLC.



**Fig. A.4.** Desprotección en condiciones ácidas del grupo alcohol de **4**. Las condiciones optimizadas permiten obtener **12** con un rendimiento del 98% después del tratamiento de **4** con AcOH/H<sub>2</sub>O (1:1) *overnight* a 70°C y neutralización con NH<sub>3(ac)</sub>.

Obtenido el compuesto **12**, se intentó su oxidación (Figura A.5) a pesar de saber que las aminas desprotegidas podían interferir en la reacción (Tabla A.2).



**Fig. A.5.** Productos de la oxidación del alcohol **12**

A diferencia de los resultados obtenidos con el alcohol **6**, donde no había conversión alguna del reactivo, en los intentos de oxidación de **12** se observó su completa desaparición en un corto período de tiempo. Aunque en todos los ensayos se generaron un gran número de productos, en ninguno de ellos se detectó la presencia del ácido carboxílico **13**. En el caso de la oxidación con KMnO<sub>4</sub>, se detectó por EM-ESI la formación del biciclo **15** aunque su aislamiento no fue posible. En la reacción con DMP, se observó en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H del crudo de reacción la presencia de los productos de descomposición del reactivo oxidante. La

identificación de otros productos no pudo completarse debido a la dificultad de aislarlos y caracterizarlos.

Agente oxidante	Condiciones de Reacción	Observaciones
KMnO <sub>4</sub> <sup>[2]</sup>	Disolución de NaOH (0.75 eq). rt, <i>overnight</i> .	Desaparición de <b>12</b> . Se detecta por EM-ESI la presencia de <b>15</b> aunque no se logra aislarlo.
DMP <sup>[1]</sup>	DMP (1.5 eq) DCM, rt, 2h.	Desaparición de <b>12</b> . Indicios de la formación de un complejo <b>12</b> -DMP así como la hidrólisis de DMP.
PCC <sup>[8]</sup>	DMC anh. rt, <i>overnight</i> .	Desaparición de <b>12</b> . Formación de multitud de productos sin determinar.

Tabla A.2. Intentos de oxidación llevados a cabo del alcohol **12**.

### 1.1.2. Protección parcial de J<sub>T</sub> con grupos Boc

#### *Mono-protección de las aminas.*

Se planteó la obtención de un producto análogo a **6** que presentara únicamente un grupo Boc por amina para disminuir el impedimento estérico causado por los grupos protectores (Figura A.6). De este modo, posiblemente el alcohol primario podría interactuar más fácilmente con los agentes oxidantes y, en definitiva, se podría obtener el producto de oxidación.

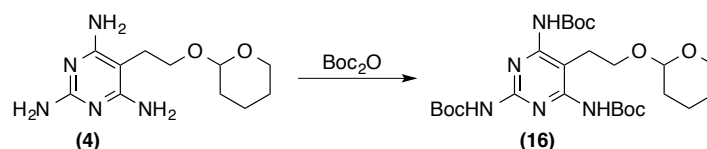


Fig. A.6. Síntesis planteada para la obtención del producto *mono*-protegido en cada amina **16**. Se ensayaron distintas metodologías para la introducción del grupo protector Boc (ver tablas A.3 y A.4).

En una primera aproximación, se procedió a realizar distintos ensayos empleado Boc<sub>2</sub>O (Tabla A.3). En la bibliografía está descrita la *mono*-protección de las aminas de la 5-bromo-2,4,6-triaminopirimidina,<sup>[9]</sup> para la que se emplean siete equivalentes de Boc<sub>2</sub>O, DMAP en cantidad catalítica y TEA como base en THF anh. Se realizó la reacción en las mismas condiciones y se dejó evolucionar durante un día (ensayo *a*). El análisis por RMN-<sup>1</sup>H y EM-MALDI-TOF del crudo confirmaron que el producto mayoritario obtenido era **6**, es decir, el producto de la *bis*-protección de las aminas. En vista de los resultados, se pensó que reduciendo el tiempo de reacción se podría evitar la formación de los productos *bis*-protegidos. Disminuyendo el tiempo de reacción a 15 h (ensayo *b*), el producto mayoritario fue el producto con cinco grupos Bocs que se aisló mediante columna cromatográfica con gel de sílice. Por EM-MALDI-TOF se detectó la presencia de los productos con menor número de grupos Boc en el crudo aunque su aislamiento no pudo completarse debido a la poca cantidad presente.

Los resultados de los dos ensayos explicados indican que el exceso de Boc<sub>2</sub>O en presencia de DMAP favorece la *bis*-protección de las aminas.

Ensayo	Condiciones iniciales	Tiempo	Adiciones	Observaciones
a	7 eq Boc <sub>2</sub> O, 0.85 eq DMAP, 8 eq TEA, THF, rt	24 h.	-	Producto mayoritario: <i>Hexa</i> -protegido (RMN- <sup>1</sup> H, EM-MALDI-TOF)
b	7 eq Boc <sub>2</sub> O, 0.85 eq DMAP, 8 eq TEA, THF, rt.	15 h.	-	Producto mayoritario: <i>Penta</i> -protegido. No se consigue aislar el producto <b>16</b> .
c	3 eq Boc <sub>2</sub> O, 0.85 eq DMAP, 8 eq TEA, THF, rt.	48 h.	0.5 eq Boc <sub>2</sub> O hasta 5.5 eq	Mezcla prácticamente equimolar de todos los productos posibles (1 a 6 Boc)
d	3.3 eq Boc <sub>2</sub> O, 0 eq DMAP, 8 eq TEA, THF, rt.	<i>Overnight</i>	-	La reacción no evoluciona
e	3.3 eq Boc <sub>2</sub> O, 0.1 eq DMAP, 8 eq TEA, THF, rt. T= 40°C .	48h. <i>Overnight</i>	-	La reacción no evoluciona (CCF). Se observa el producto con un grupo Boc por EM-ESI(+).
f	4 eq Boc <sub>2</sub> O, 0.5 eq DMAP, 8 eq TEA, MeOH, rt.	20 h.	-	La reacción no evoluciona.
g	4 eq Boc <sub>2</sub> O, 0.5 eq DMAP, 8 eq TEA, DMF, rt.	48 h.	0.5 eq Boc <sub>2</sub> O hasta 9 eq	Mezcla equimolar de todos los productos posibles
h	3.3 eq Boc <sub>2</sub> O, 3.3 eq pyr (cat. y base), ACN, rt.	7d	-	Mezcla equimolar de todos los productos posibles.
i	3.3 eq Boc <sub>2</sub> O, 0.3 eq pyr (cat.), 3 eq TEA (base), ACN, rt.	7d	-	
j	3.3 eq Boc <sub>2</sub> O, 3.3 eq pyr (cat. y base), DMF, rt.	7d	-	
k	3.3 eq Boc <sub>2</sub> O, 0.3 eq pyr (cat.), 3 eq TEA (base), DMF, rt.	7d	-	

**Tabla A.3.** Intentos realizados con Boc<sub>2</sub>O para la obtención del producto **16** a partir de **4**.

A continuación, manteniendo las mismas proporciones de los otros reactivos, se emplearon sólo 3 eq de Boc<sub>2</sub>O (ensayo c). La reacción se dejó evolucionar *overnight* y, posteriormente, se evidenció mediante CCF y EM-MALDI-TOF que el producto mayoritario era el reactivo de partida **4**. La conversión química había sido muy pequeña y se detectaban únicamente los productos con uno y dos grupos protectores. Se decidió realizar adiciones fraccionadas de 0.5 eq de Boc<sub>2</sub>O cuando no se percibiera avance de la reacción. A las 48 h de reacción, cuando ya

se habían añadido un total de 5.5 eq de Boc<sub>2</sub>O, se paró la reacción puesto que se detectaba una mezcla casi equimolar de todos los productos posibles, es decir que, aún existiendo producto de partida en la mezcla de reacción, ya se empezaba a detectar la formación del producto con seis Bocs **6** y, obviamente, de todos los productos intermedios con 1 hasta 5 grupos Boc.

Viendo estos resultados, se decidió modificar la cantidad de DMAP, que inicialmente era de 0.85 eq, y así poder evitar la *bis*-protección de las aminas (ensayos *d-e*). Empleando 3.3 eq de Boc<sub>2</sub>O (exceso de 0.3 eq) se realizaron dos ensayos, uno sin DMAP y otro con 0.1 eq. En el primero (ensayo *d*), después de dejar evolucionar una noche la reacción, no se detectó avance alguno y se recuperó inalterado el producto de partida. En el segundo ensayo (ensayo *e*), después de 48 h a temperatura ambiente con una nula conversión, se decidió aumentar la temperatura a 40°C. Después de una noche, la evolución fue mínima y solo se detectó por EM-MALDI-TOF la presencia minoritaria del producto con un grupo Boc. Estos datos ponen en evidencia que las aminas de la pirimidina son muy poco nucleófilas y requieren de un activante como la DMAP para que la protección con grupos Boc tenga lugar.

En los siguientes ensayos se trabajó con 4 eq de Boc<sub>2</sub>O (1 eq de exceso), 0.5 eq de DMAP, una cantidad común en este tipo de reacciones, y se emplearon diferentes disolventes para mejorar la solubilidad de **4** que en THF no era del todo completa (ensayos *f-g*). En primera instancia se intentó sin éxito el uso de MeOH anh. Después de 20 h de reacción sólo se detectaba producto de partida, muy posiblemente, porque el MeOH consumía el Boc<sub>2</sub>O. Los intentos con DMF en las mismas condiciones requirieron adiciones extras de Boc<sub>2</sub>O debido a la lenta evolución de la reacción. Después de 48 h de reacción y un total de 9 eq de Boc<sub>2</sub>O, se evidenció la formación casi equimolar de los 6 posibles productos cuando aún se observaba la presencia del producto de partida.

Posteriormente, se planteó emplear piridina como catalizador y, en algún experimento, también como base. Con una cantidad de 3.3 eq de Boc<sub>2</sub>O se hicieron cuatro ensayos combinando dos disolventes, el ACN y la DMF, con distinta cantidad de piridina (ensayos *h-k*). Los cuatro ensayos se dejaron evolucionar durante una semana y se controlaron por CCF y EM-MALDI-TOF. En todos ellos se obtuvieron los mismos resultados que en los anteriores intentos.

De los ensayos realizados con Boc<sub>2</sub>O se puede llegar a la conclusión que, a causa de la baja nucleofilia de las aminas pirimidínicas, la reacción no evoluciona en ausencia de un activante y, en contrapartida, este activante favorece la *bis*-protección de las aminas. Estos hechos conllevan a la formación de un gran número de productos, desde el que tiene un grupo Boc hasta el que tiene seis. El rendimiento que puede obtenerse es muy pequeño, ya no solo por la baja cantidad presente de cada uno de los productos generados, sino porque la purificación es muy compleja debido a la gran similitud química que presentan. La optimización de unas condiciones para obtener mayoritariamente el producto con un Boc por amina ha sido infructuosa.

En la literatura se pueden encontrar muchos reactivos para introducir un grupo Boc, algunos ejemplos entre otros son los Boc-X (donde X es un halógeno)<sup>[10,11]</sup> que son muy reactivos e inestables, la Boc azida (Boc-N<sub>3</sub>) que puede llegar a ser peligrosa debido a que es explosiva<sup>[12]</sup>,

el BOC-ON (2-(*tert*-butoxicarboniloxiimino)-2-fenilacetoniitrilo)<sup>[13]</sup> y el BBDI (1-*tert*-butoxi-2-*tert*-butoxicarbonil-1,2-dihidroisoquinolina)<sup>[14]</sup> que debe formarse *in situ* pero no es muy indicado para aminas.

Otro reactivo comúnmente empleado es el *tert*-butoxicarbonilimidazol (Boc-Im) que es un reactivo comercial aunque sencillo de sintetizar. Su síntesis está descrita a partir de *tert*-butanol y carbonildiimidazol (CDI) con un buen rendimiento.<sup>[15]</sup> A partir de la reactividad de Boc-Im y su síntesis, surgió la idea de introducir el grupo protector Boc mediante reacción de **4** con CDI y *tert*-butanol (Figura A.7).

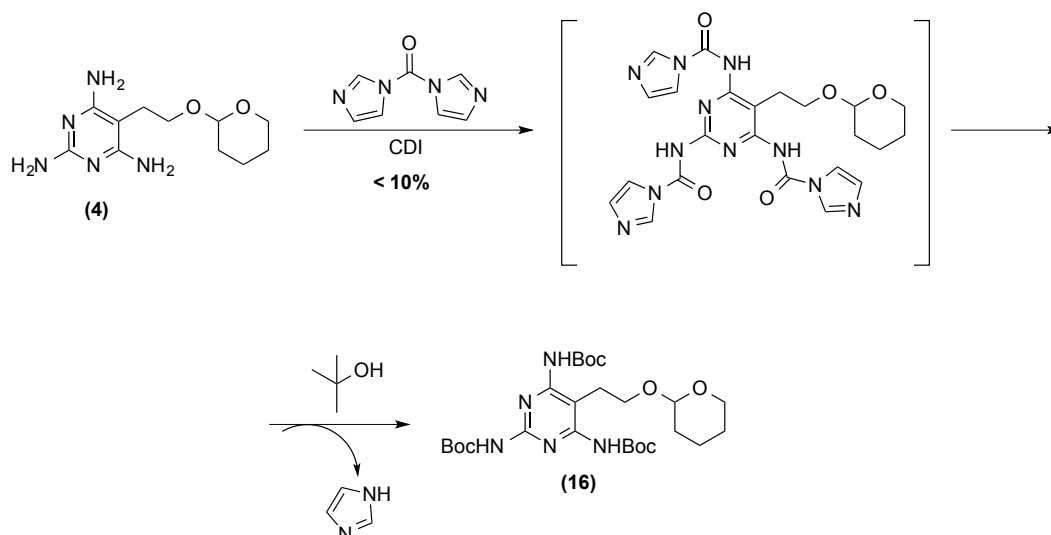


Fig. A.7. Introducción del grupo Boc mediante reacción de **4** con CDI y *tert*-butanol

En primera instancia, CDI debería reaccionar con las aminas de **4** formando el intermedio reactivo de la figura A.7 el cual, en un segundo paso de reacción, sería atacado por *tert*-butanol para dar lugar al grupo Boc liberando imidazol (Tabla A.4).

El primer ensayo se realizó en dos etapas: en la primera se añadió CDI a una solución de **4** en DMF y, posteriormente, en una segunda etapa, se adicionó el *tert*-butanol (ensayo *a*). En este ensayo se empleó un CDI parcialmente hidrolizado en el que había una proporción aproximada de CDI:imidazol 1:1 (determinada por RMN-<sup>1</sup>H). La primera etapa de la reacción se dejó evolucionar durante 5 días, momento en el que el producto **4** dejó de observarse por CCF. Se realizó la adición de *tert*-butanol y se dejó avanzar la reacción durante 8 h. Después de este tiempo, el crudo de reacción se analizó vía EM-ESI y se detectó la formación del producto **16** sin el grupo tetrahidropiraniilo. El análisis del crudo por RMN-<sup>1</sup>H mostraba una elevadísima proporción de *N*-metilimidazol. Llevando a cabo una purificación mediante columna cromatográfica de gel de sílice, no se pudo aislar el producto detectado debido a la imposibilidad de separarlo de la gran cantidad de *N*-metilimidazol generada.

La formación del *N*-metilimidazol no es un proceso sencillo de explicar puesto que no hay ningún agente alquilante en el medio de la reacción. Se podría especular que el imidazol, con un p*K*<sub>a</sub> próximo a 7, atacase la DMF para formar *N*-metilimidazol y *N*-metilformamida. No obstante, no se encuentran precedentes descritos en la literatura.

En el segundo ensayo realizado, se empleó CDI completamente puro (ensayo *b*). Pocas horas después del inicio de la reacción se empezó a detectar la formación de dímeros de **4**. Estos compuestos, en los que dos moléculas de **4** se encontraban unidas por un carbonilo a través de sus aminas exocíclicas, se generaban por el ataque nucleófilo intermolecular de una de las aminas de **4** sobre el intermedio activo. Dejando evolucionar durante más tiempo la reacción, se llegaron a detectar trímeros y tetrámeros. Este hecho parecía indicar que la presencia de imidazol, considerado un contaminante en el ensayo anterior, evitaba la formación de estos compuestos poliméricos puesto que competía con **4** para atacar al intermedio activo de la reacción. Viendo la trascendencia que tenía la presencia de imidazol, se decidió que debía ser uno más de los reactivos a emplear.

Ensayo	Condiciones iniciales	Tiempo	Adiciones	Observaciones
a	a) 3 eq CDI conteniendo imidazol, DMF b) 6 eq <sup>t</sup> BuOH	a) 5 d b) 8 h	+10 eq CDI	Se detecta el producto <b>16</b> sin <b>THP</b> mayoritariamente, no se consigue aislar. Formación de N-metilimidazol. Muy difícil de separar.
b	a) 3 eq CDI, DMF b) 6 eq <sup>t</sup> BuOH	a) 5 d b) 8 h	+10 eq CDI	Formación mayoritaria de dímeros.
c	<i>One pot</i> : 3 eq CDI, imidazol, 6 eq <sup>t</sup> BuOH, DMF.	11 d	+45 eq CDI. +6 eq <sup>t</sup> BuOH	<b>16</b> aislado con $\eta_{\text{max}}=10\%$ Dos purificaciones mínimas necesarias. Formación de N-metilimidazol que dificulta el aislamiento.
d	<i>One pot</i> : 3 eq <i>p</i> - nitrofenilcarbonato, 3 eq <sup>t</sup> BuOH, DMF.	30 d	+30 eq <i>p</i> - nitrofenilcarbonat	La reacción no evoluciona.

**Tabla A.4.** Intentos para la obtención del producto **16** realizados con CDI o *p*-nitrofenilcarbonato y <sup>t</sup>BuOH.

El siguiente ensayo se llevó a cabo añadiendo todos los reactivos a la vez, es decir, *one pot* (ensayo *c*). Se tomó esta decisión al reflexionar que la lentitud de la primera etapa de la reacción, en la que **4** reaccionaba con CDI, podía estar favoreciendo ciertas reacciones secundarias indeseadas, como la formación del N-metilimidazol. Después de 11 días y distintas adiciones de CDI y <sup>t</sup>BuOH, la reacción se paró y se analizó el crudo. Esta vez, por EM-ESI se detectó la formación del producto **16** aunque también había mucha cantidad de N-metilimidazol. Se tuvieron que realizar dos purificaciones para obtener, finalmente, el compuesto **16** puro con un rendimiento del 10%.

Este último ensayo se repitió dos veces aumentando la escala de trabajo y no se pudo reproducir el rendimiento obtenido anteriormente, sino que disminuyó. La presencia de N-metilimidazol en el crudo de reacción dificultaba mucho la purificación y su eliminación no era sencilla. Aunque estas condiciones nos permitieron obtener el producto deseado **16**, el balance de los resultados no era muy esperanzador puesto que un rendimiento tan bajo solo permitía obtener pequeñas cantidades de producto, después de consumir una gran cantidad

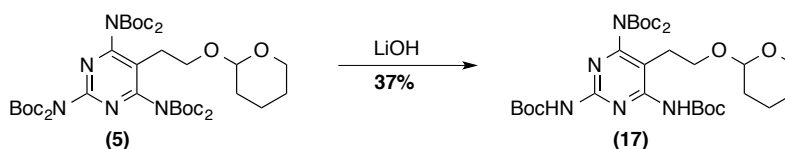
de reactivos así como de disolventes para su doble o triple purificación. Estas cantidades tan reducidas no permitían seguir adelante con la ruta sintética planteada ya que aún restaban cuatro etapas sintéticas para obtener el monómero de PNA deseado.

Finalmente, en un intento de mejorar el rendimiento y el aislamiento de **16**, se empleó *p*-nitrofenilcarbonato en vez de CDI. Después de 30 días de reacción y diferentes adiciones extras, se abandonó el ensayo puesto que no se tenían evidencias de que la reacción progresase.

#### Desprotección parcial de las aminas del intermedio **5**.

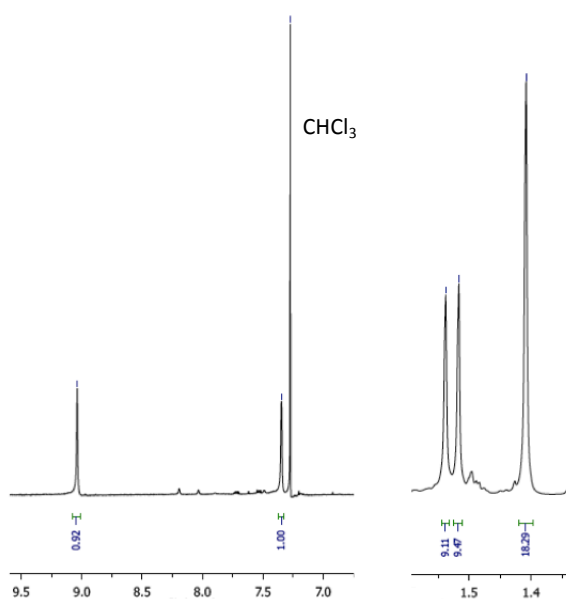
Los grupos protectores Boc son lábiles en condiciones ácidas, sin embargo, en presencia de grupos hidroxilos y en determinadas condiciones de tiempo y/o temperatura su estabilidad también se ve comprometida. Así pues, se intentaron optimizar unas condiciones para desproteger parcialmente el compuesto **6** utilizando hidróxido de litio (LiOH) (Figura A.8). En el primer intento se emplearon 2 eq de LiOH en una mezcla THF/agua (8:2) a 40°C (Tabla A.5). Después de 7 h de reacción, el producto de partida no se detectaba por CCF y un análisis del crudo de reacción por EM-ESI evidenció que, además de producirse una pérdida de los grupos protectores Boc, tenía lugar la deshidratación del alcohol. Teniendo en cuenta estos resultados, se creyó oportuno realizar el mismo ensayo empleando el intermedio **5** que presentaba el alcohol protegido como acetal. A las 10 h de empezar el ensayo, se observó por CCF la desaparición del producto de partida y la formación de un producto muy mayoritario respecto a los demás. Parada la reacción y separados los distintos productos generados por cromatografía en columna de sílice, se obtuvo el producto con 4 grupos protectores Boc (determinado por EM-ESI) con un rendimiento del 28%. El producto obtenido se analizó por HPLC para confirmar que se trataba de un único compuesto y por RMN-<sup>1</sup>H para determinar en que posiciones estaban los grupos protectores.

Se pueden formar distintos isómeros con cuatro grupos Boc, los que presentan dos aminas *bis*-protegidas y una libre, o bien, aparentemente más favorecidos, los compuestos con dos aminas *mono*-protegidas y una *bis*-protegida. Así pues, se planteó la cuestión de si el producto contenía la amina *bis*-protegida en la posición 2, y era simétrico, o en la posición 4 (o 6), dando lugar al producto asimétricamente sustituido. Mediante RMN-<sup>1</sup>H (Figura A.9) se determinó que el producto obtenido era el producto asimétrico **17**.



**Fig. A.8.** Desprotección parcial de los grupo amino del compuesto **5** con LiOH. Condiciones: LiOH (4 eq), THF/agua, 40°C, 19 h.





**Fig A.9.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H en CDCl<sub>3</sub> (δ= 7.27 ppm) del producto **17** obtenido vía la desprotección con LiOH de **5**. A campos altos se pueden ver las señales correspondientes a los metilos de los grupos protectores Boc y a campo bajos los protones de las aminas. El número de señales y sus integraciones verifican la formación del compuesto asimétrico **17**.

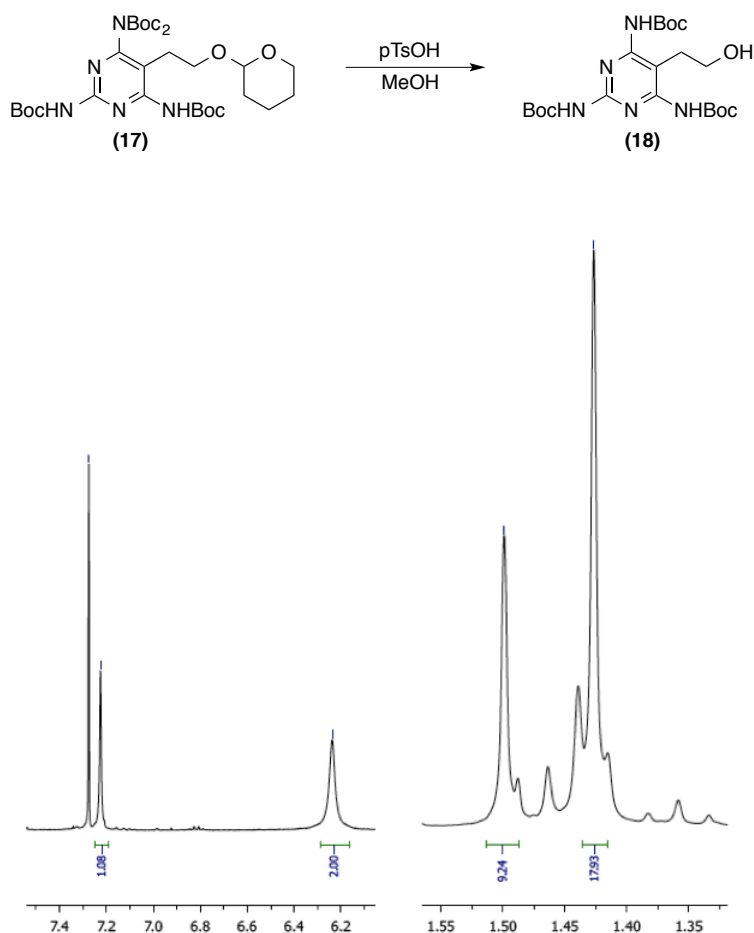
Una vez caracterizado el producto, se procedió a optimizar las condiciones de reacción para mejorar así el rendimiento. En los ensayos a temperaturas superiores a 40°C se observó la pérdida de selectividad para obtener un producto mayoritario. El mejor rendimiento para la obtención de **17** se obtuvo empleando 4 eq de LiOH durante 19 h a 40°C (Tabla A.5).

Producto aislado		Condiciones		
		2 eq LiOH, 40°C , 24 h	4 eq LiOH, 40°C , 19 h	2 eq LiOH, 60°C , 24 h
Proporción de producto	Producto de Partida: 6 Bocs <b>5</b>	32%	34%	Mezcla de todos los productos posibles: de 0 a 6 Bocs
	5 Bocs	17%	10%	
	4 Bocs: producto <b>17</b>	34%	42%	
	3 Boc	17%	14%	
	2 Bocs	(Mezcla)	(Mezcla)	
	TOTAL	100%	100%	
<b>Rendimiento 17</b>		<b>28%</b>	<b>37%</b>	

**Tabla A.5.** Resultados obtenidos en los ensayos para optimizar la desprotección parcial de **5** con LiOH.

Obtenido el producto **17**, se procedió a la hidrólisis de su acetal poniendo en práctica las mismas condiciones de catálisis ácida utilizadas con el compuesto **5** con seis grupos Boc (Figura A.1). Sorprendentemente, las condiciones tuvieron que modificarse notablemente sobre la marcha. Por un lado, se tuvo que alargar el tiempo de reacción de 6 h a 13 días para tener una completa conversión y, además, se necesitó el doble de concentración de ácido *p*TsOH (0.2 eq). Por otro lado, fue necesaria una purificación en columna ya que en el crudo de la reacción

se detectaba una mezcla de productos debido a que parte del producto había perdido algún grupo Boc. Finalmente, se obtuvo con un rendimiento extremadamente bajo (30%) el producto con tres grupos Boc **18**. La distribución de los grupos protectores se estudió por RMN-<sup>1</sup>H llegando a la conclusión que se trataba del producto con sus tres aminas *mono*-protegidas (Figura A.10). Teniendo en cuenta el bajo rendimiento obtenido y el largo tiempo de reacción necesario, se probaron unas nuevas condiciones. Se empleó LiCl en una mezcla de agua y DMSO<sup>[16]</sup> y se dejó evolucionar la reacción durante 3 h a 90°C. El análisis del crudo por EM-MALDI-TOF evidenció que los grupos protectores Boc fueron completamente eliminados mientras que el protector del alcohol seguía intacto. Se recuperó completamente el compuesto **4**.



**Fig. A.10.** Reacción de desprotección del alcohol de **17** vía catálisis ácida y señales del RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) de **18**. Debido a la simetría de la molécula, se observan dos señales para los protones de las aminas y para los grupos <sup>t</sup>Bu de los protectores Boc.

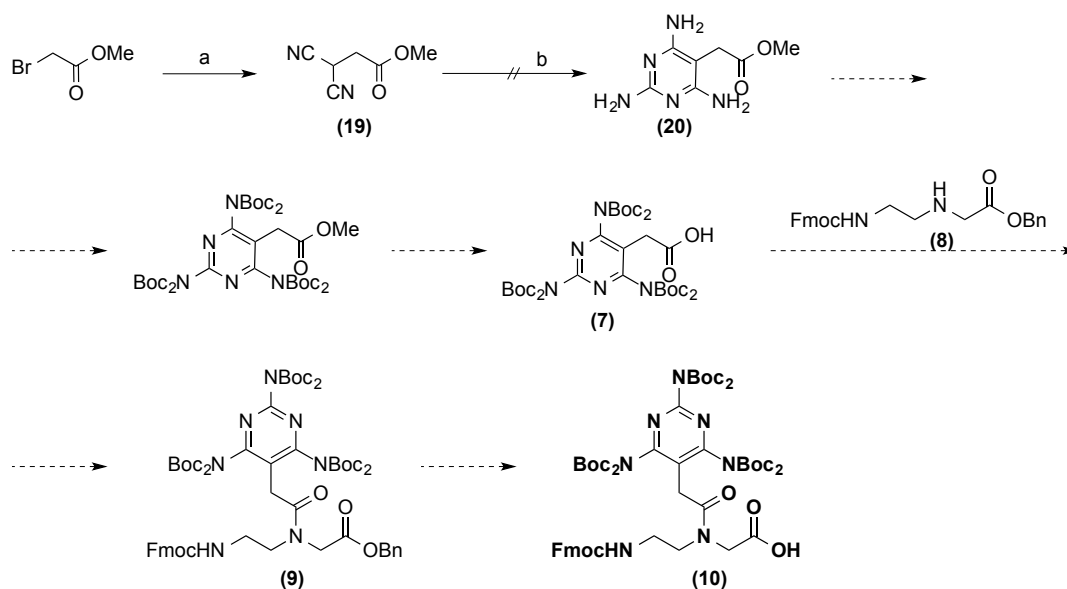
El hecho de que las condiciones de desprotección y el rendimiento obtenido difirieran tanto con los del producto **5**, se explicó poco después cuando se observó que **18** era inestable en solución y perdía los grupos protectores Boc. Se comprobó, realizando a diferentes tiempos espectros de RMN-<sup>1</sup>H de la misma muestra en CDCl<sub>3</sub> que los grupos Boc se iban eliminando. Se pasó el solvente por alúmina ya que, como es conocido, el cloroformo puede contener trazas

de ácido. No obstante, se obtuvieron los mismos resultados así como cuando se cambió el solvente a DMSO- $d_6$ . Todo parecía indicar que los grupos protectores Boc eran más lábiles en **18** que en los compuestos *hexa*-protegidos, así que se planteó la posibilidad que sucediera lo mismo en los compuestos **16** y **17**. Se estudió la estabilidad en solución de estos compuestos mediante CCF y se observó que, como se había previsto, los grupos protectores en los productos con cuatro y tres grupos Boc se eliminaban espontáneamente en solución (DCM, MeOH,  $CDCl_3$ , DMSO). La observación de la labilidad en solución de los grupos protectores Boc tanto en **16**, **17** y **18**, que sin duda hubiera sido el motivo de posteriores trabas, decantó la balanza y se decidió abandonar esta ruta sintética y plantear una nueva.

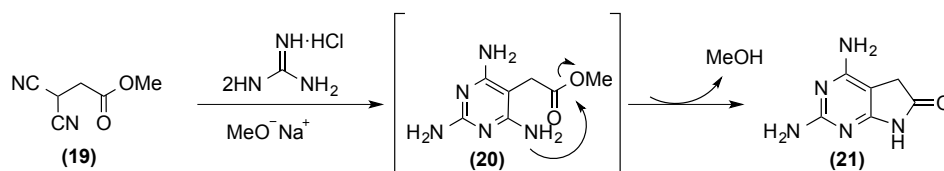
### 1.2. Segunda Ruta Sintética

En la nueva ruta sintética planteada, con el objetivo de evitar los problemas encontrados en el esquema anterior, la funcionalización de ácido en la cadena lateral de  $J_T$  ya estaba implícita antes de la protección de las aminas (Figura A.11).

La síntesis se inició con una sustitución nucleófila sobre 2-bromoacetato de metilo por parte del anión del malononitrilo. Empleando las mismas condiciones que en la primera ruta sintética, se consiguió obtener el predecesor del anillo pirimidínico de 2,4,6-triaminopirimidina con un rendimiento del 60% después de una purificación por columna cromatográfica con gel de sílice. En la siguiente etapa, se planteó la formación del anillo  $J_T$  haciendo reaccionar **19** con hidrocloreuro de guanidinio en metóxido sódico. No se aisló el compuesto **20** sino que se obtuvo el biciclo **21** producto del ataque nucleófilo de la amina exocíclica de la posición 2 sobre el ester metílico de la cadena lateral (Figura A.12).



**Fig. A.11.** Segunda ruta sintética planteada para la síntesis del monómero de PNA con la base  $J_T$ . Condiciones de las reacciones llevadas a cabo: a. Malononitrilo (1.5 eq), 60% NaH (1.6 eq), DME anh., rt, overnight, 60%; b. 1.  $Na_{(s)}$  (2 eq), MeOH anh. 2. hidrocloreuro de guanidinio (1.3 eq), reflujo, 3.5 h.



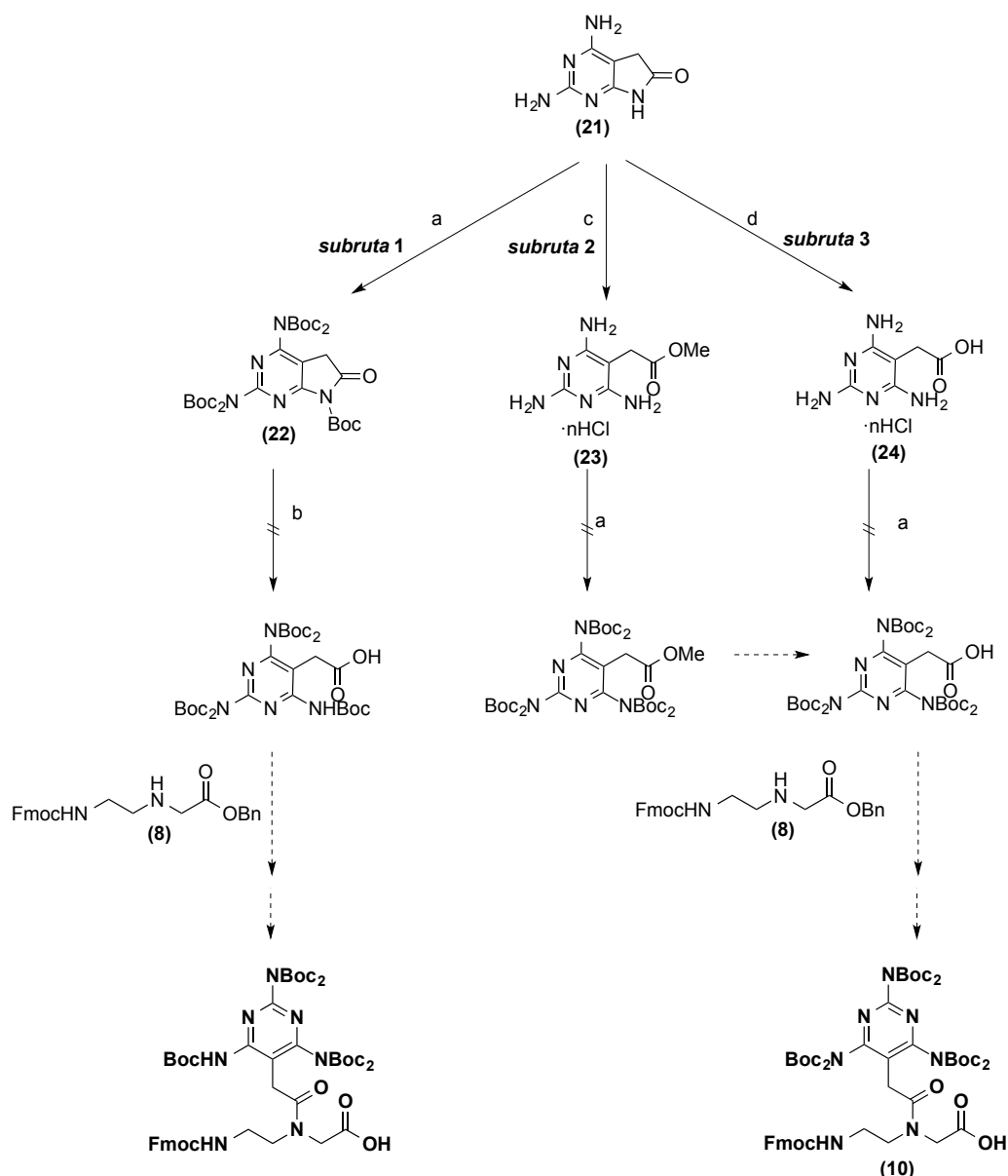
**Fig. A.12.** Formación del producto bicíclico **21** debido al ataque de la amina en la posición 2 de  $J_T$  sobre el ester metílico de la cadena lateral.

La formación del producto bicíclico **21** no fue del todo una sorpresa, en la literatura pueden encontrarse ciclaciones de este tipo para compuestos estructuralmente semejantes al aquí descrito.<sup>[17]</sup> Por esta razón, ya se habían pensado algunas alternativas sintéticas para seguir con la síntesis (Figura A.13). Sin embargo, primero tuvo que purificarse el producto **21**. Debido a la gran polaridad del compuesto y a su baja solubilidad tanto en disolventes orgánicos como en agua, su purificación fue bastante compleja. No se pudo realizar con éxito en fase normal por columna cromatográfica con gel de sílice y la recuperación por MPLC fue inferior al 10%. Después de realizar algunos ensayos, se observó que al triturar con agua el crudo de la reacción, parte del crudo se disolvía mientras que un producto quedaba insolubilizado. El precipitado, que fue analizado por RMN-<sup>1</sup>H en DMSO-<sup>d</sup><sub>6</sub> y por EM-ESI, resultó ser el compuesto **21** puro. Así pues, se consiguió forma una sencilla y eficaz de purificarlo.

*Subruta 1.* En primera instancia se planteó proseguir con la protección del producto **21** empleando un exceso de Boc<sub>2</sub>O (entre 12 y 20 eq). Se pretendía introducir un grupo Boc en la lactama con el objetivo de realizar una rotura oxidativa, pues la presencia del grupo Boc provoca que el enlace carbonilo-nitrógeno sea más débil facilitando, consecuentemente, su rotura. Para la escisión se escogieron unas condiciones previamente descritas por Feng y Chen en las que se usa agua oxigenada al 35% y LiOH.<sup>[18]</sup> En la literatura se pueden encontrar otras metodologías para llevar a cabo el mismo proceso químico,<sup>[19,20]</sup> sin embargo, se decidió aplicar la metodología de Feng debido a su compatibilidad con otros grupos Boc en la molécula así como con otros heterociclos.

Así pues, se llevó a cabo la protección de **21** empleando un exceso de Boc<sub>2</sub>O y 3 eq de DMAP. La reacción se dejó evolucionar a 70°C mientras se fue controlando por CCF y EM-ESI. Se realizaron dos intentos de protección empleando distintos tiempos de reacción, en el primero toda una noche y en el segundo 9 h. En ambos casos se detectaba por EM-MALDI-TOF el producto deseado **22** en el del crudo de la reacción y nada de producto de partida. En los dos crudos de reacción se podían detectar un gran número de productos, por lo que se decidió separarlos por cromatografía en columna. En el primer ensayo se emplearon eluciones de distintas proporciones de acetato de etilo y hexano y, en el segundo, DCM con porcentajes crecientes de MeOH. En los dos casos fue imposible aislar el producto o volverlo a detectar. Así pues, se realizaron dos nuevos intentos en las mismas condiciones pero a temperatura ambiente. En uno de ellos se realizó el *work-up* y dos purificaciones sin éxito y, con la otra muestra, en el que se detectaba como anteriormente la masa del producto **22**, se decidió intentar la rotura oxidativa sin purificación previa. Para ello, se emplearon 6 eq de agua oxigenada al 35% y 2 eq de LiOH en una mezcla de disolventes que favoreciese la solubilización de todos los reactivos, THF:H<sub>2</sub>O (3:1). Después de 3 días siguiendo la reacción por EM-MALDI-

TOF y CCF no había evidencias de la formación del producto deseado y tampoco se observaba producto de partida. Así pues, se decidió abandonar esta vía.



**Fig. A.13.** Diferentes opciones sintéticas a partir del compuesto bicíclico obtenido **21** para la obtención del monómero de PNA con la base  $J_7$ . Condiciones de reacción: a.  $\text{Boc}_2\text{O}$  (3-20 eq), DMAP (0.5-3eq), TEA (5 eq), ACN entre 10 h y 8 días a  $70^\circ\text{C}$  o rt; b.  $\text{H}_2\text{O}_2$  (6 eq), LiOH (2 eq), THF/ $\text{H}_2\text{O}$ , rt, 3 días; c.  $\text{HCl}_{(\text{g})}$ ,  $\text{MeOH}_{\text{anh}}$ , rt, 1.5 h, **100%**; d.  $\text{HCl}_{(\text{aq})}$  7%, reflujo, 5 h, **100%**.

**Subruta 2.** En la siguiente aproximación planteada se pensó en la metanólisis de **21** para abrir la lactama y obtener el ester metílico correspondiente. El producto obtenido se protegería con grupos Boc y, finalmente, vía la saponificación del ester se obtendría el ácido ya listo para ser unido al esqueleto de *N*-(2-aminoetil)glicina **8**.

Para llevar a cabo la metanólisis de **21** se disolvió el producto en  $\text{MeOH}_{\text{anh}}$  recién destilado y se burbujeó durante 1.5 h  $\text{HCl}_{(\text{g})}$  generado *in situ*. La solución, evaporada hasta sequedad, fue analizada para confirmar la formación cuantitativa de la sal **23**. Se procedió con la protección de las aminas con  $\text{Boc}_2\text{O}$  y cantidad catalítica de DMAP. Después de 18 h de reacción se analizó

la evolución de ésta por EM-ESI y se comprobó que el producto estaba ciclando, como ya había sucedido anteriormente, para obtener de nuevo el producto **21** y los productos resultantes de la introducción de grupos Boc.

*Subruta 3.* Pensando en evitar la ciclación indeseada al intentar proteger las aminas, se decidió llevar a cabo la hidrólisis de la lactama puesto que el ácido carboxílico debía ser menos reactivo al ataque de una amina. Inicialmente, la hidrólisis se llevó a cabo siguiendo la experimental de Booth,<sup>[21]</sup> aunque tuvo que optimizarse debido a que la concentración de ácido clorhídrico empleada y la temperatura eran demasiado altas y se observaba la degradación del producto. Así pues, se determinó que usando  $\text{HCl}_{(\text{aq})}$  al 7% durante 5 h a reflujo se obtenía la sal **24** con un rendimiento cuantitativo. La protección de **24**, que se llevó a cabo en las mismas condiciones que anteriormente, se intentó sin éxito. A las 15 h de reacción, el análisis mediante EM-ESI evidenciaba una mezcla de productos derivados de la ciclación. Entre estos, se detectó la masa de **21**, de otros productos derivados de la introducción de grupos Boc, así como una serie de masas que concordarían con la adición de un grupo <sup>t</sup>Butilo a **21**.

Los dos últimos intentos parecen indicar que los hidrocloruros **23** y **24** son estables pero cuando se neutralizan en presencia de DMAP, necesaria para la protección de las aminas de  $J_T$ , se favorece su ciclación para dar lugar al biciclo **21**.

Después de intentar dos rutas sintéticas con sus variantes para obtener el monómero de PNA ideal sin éxito, se decidió abandonar este objetivo inicial e intentar la síntesis de otros monómeros con la base  $J_T$  en los que la distancia entre la base y el esqueleto de *N*-(2-aminoetil)glicina fuera mayor. De esta manera, quizá se podría evitar toda la problemática experimentada con el monómero “ideal” (ver *Apartado 2.1.2, Capítulo 1*).

**2. Bibliografía**

- [1] H. Fenniri, *Method and Associated Compounds for Forming Nanotubes*, WO 02/066482 A.
- [2] J. Kenyon, B. C. Platt, *J. Chem. Soc. Resumed* **1939**, 633–637.
- [3] M. Zhao, J. Li, E. Mano, Z. Song, D. M. Tschaen, E. J. J. Grabowski, P. J. Reider, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2564–2566.
- [4] M. M. Zhao, J. Li, E. Mano, Z. J. Song, D. M. Tschaen, in *Org. Synth.*, John Wiley & Sons, Inc., **2003**.
- [5] D. B. Dess, J. C. Martin, *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 4155–4156.
- [6] S. De Munari, M. Frigerio, M. Santagostino, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 9272–9279.
- [7] R. Warrenner, T. Lee, R. Russell, M. Paddon-Row, *Aust. J. Chem.* **1978**, *31*, 1113–1127.
- [8] A. Vázquez-Romero, L. Cárdenas, E. Blasi, X. Verdaguer, A. Riera, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 3104–3107.
- [9] F. Rakotondradany, H. Sleiman, M. A. Whitehead, *Can. J. Chem.* **2009**, *87*, 627–639.
- [10] R. B. Woodward, K. Heusler, J. Gosteli, P. Naegeli, W. Oppolzer, R. Ramage, S. Ranganathan, H. Vorbrüggen, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 852–853.
- [11] U. v. Gizycki, G. Oertel, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1968**, *7*, 380–381.
- [12] J. M. Stewart, J. D. Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, Pierce Chemical Company.
- [13] M. Itoh, D. Hagiwara, T. Kamiya, *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16*, 4393–4394.
- [14] H. Ouchi, Y. Saito, Y. Yamamoto, H. Takahata, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 585–587.
- [15] S. P. Rannard, N. J. Davis, *Org. Lett.* **1999**, *1*, 933–936.
- [16] G. Maiti, S. C. Roy, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 6038–6039.
- [17] T. Miwa, T. Hitaka, H. Akimoto, H. Nomura, *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 555–560.
- [18] Y. Feng, G. Chen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 958–961.
- [19] D. L. Flynn, R. E. Zelle, P. A. Grieco, *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 2424–2426.
- [20] D. A. Evans, T. C. Britton, J. A. Ellman, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 6141–6144.
- [21] H. Booth, F. E. King, K. G. Mason, J. Parrick, R. L. S. D. Whitehead, *J. Chem. Soc. Resumed* **1959**, 1050.

***Experimental section*** ||





# MATERIALS AND METHODS

## 1. Reagents, solvents and buffer solutions.

### 1.1. Reagents and solvents

Acetonitrile (ACN): HPLC grade (>99.9% purity) from VWR. To obtain anh. ACN, it was distilled and kept in CaH<sub>2</sub> under an Ar<sub>(g)</sub> atmosphere. The anh. ACN employed in oligonucleotide synthesis was purchased from Applied Biosystems and kept with a Trap Pack to avoid moisture contamination.

Ac<sub>2</sub>O: from Fluka.

Aqueous ammonia: commercial high purity solution of 32% ammonium from Scharlau.

Anh. pyridine: from Sigma Aldrich.

Deionized water: (18.2 MΩ·cm<sup>-1</sup>) obtained from a Milli-Q Synthesis A10 system from Millipore.

D<sub>2</sub>O: from Euriso-top.

Dichloromethane (DCM): synthesis grade from Scharlau and HPLC grade from VWR. To eliminate acid traces it was passed through an alumina (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) column. To make it anh., it was distilled over P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> and kept in a bottle with CaH<sub>2</sub> under an Ar<sub>(g)</sub> atmosphere.

Diethylether: synthesis grade from Scharlau or Spectrophotometric grade from Sigma Aldrich.

Dioxane: from Sigma-Aldrich. Before usage, it was filtered through a basic alumina column to avoid the presence of peroxides.

DIEA: from Sigma-Aldrich.

DMAP: from Alfa Aesar.

Dimethylformamide (DMF): high purity grade from Panreac. It was kept dry by the addition of 4Å activated molecular sieves. Before being used, a N<sub>2(g)</sub> flow was passed through for a minimum of 2 h to eliminate volatile amines.

Ethylene glycol dimethyl ether (DME): 99+% extra pure stabilized with BHT from Acros.

EtOH (absolut): from Panreac.

Glacial acetic acid: from Scharlau.

HATU: from Applied Biosystems.

HOBt: from Acros or Iris Biotech.

HCl: reagent grade of 37% concentration from Scharlau.

Methanol: HPLC grade from VWR or synthesis grade from Panreac. To obtain anh. methanol it was distilled over Mg<sub>(s)</sub> and I<sub>2(s)</sub> (to avoid distillation of the MeOH-water azeotrop), collected over 3Å activated molecular sieves and kept under an Ar<sub>(g)</sub> atmosphere.

NMP: from Fluka. To make it anh., NMP was kept over 3Å activated molecular sieves under an Ar<sub>(g)</sub> atmosphere.

Piperidine: synthesis grade from Sigma Aldrich.

THF: synthesis grade from Scharlau. To obtain anh. THF, the solvent was distilled over Na<sub>(s)</sub> using benzophenone as an indicator of humidity. It was kept over Na<sub>(s)</sub> wire and under an Ar<sub>(g)</sub> atmosphere.

Triethylamine: ≥99% from Sigma Aldrich.

Buffer solutions employed in HPLC analysis and purification were prepared using Milli-Q water and filtered through a 45 $\mu$ m filter. MS-MALDI-TOF matrices were purchased at Sigma-Aldrich. Salts and bases employed in synthesis such as NaCl, MgSO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>...were from Jescuter.

The other reagents were from commercial sources and were employed without any previous treatment, except in the case of using them in reactions taking place under anh. conditions. For this purpose, they were dried in a desiccator containing P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

### 1.2. Buffer solutions

2 M Ammonium acetate solution (NH<sub>4</sub>Ac) pH 7: To prepare 1 L of this buffer solution, ammonium acetate (154.2 g) was dissolved in Milli-Q water and the pH was adjusted to 7 by adding NH<sub>3</sub> or AcOH as required. Finally, the solution was diluted with more Milli-Q water until the volume was adjusted to 1 L in a volumetric flask.

2 M Triethylammonium acetate solution (TEAAc) pH 7: To prepare 500 mL of this buffer solution, TEA (140 mL) and glacial acetic acid (58 mL) were mixed in an erlenmeyer with 200 mL of Milli-Q water. Magnetic stirring was kept during an hour, the pH was adjusted to 7.0 with TEA or AcOH as required and water was added until the volume was adjusted to 500 mL in a volumetric flask.

10 mM Cacodylate buffer pH 5.50: To prepare 500 mL of this buffer solution, sodium cacodylate (1.07 g), NaCl (2.92 g) and of Na<sub>2</sub>EDTA (15 mg) were dissolved in 450 mL of Milli-Q water (final concentrations of reagents: 10 mM, 100 mM and 0.1 mM, respectively). The pH was adjusted to 5.50 with diluted solutions of HCl or NaOH, as required. Finally, the volume was adjusted to 500 mL with Milli-Q water in a volumetric flask.

10 mM Cacodylate buffer 10 mM pH 7.00: The procedure is the same as above, but the pH was adjusted to 7.00 with diluted solutions of HCl or NaOH, as required.

10 mM Phosphate buffer solution pH 5.50: To prepare 500 mL of this buffer solution, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (769 mg) and Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (12 mg) were dissolved in 450 mL of Milli-Q water. The pH was adjusted to 5.50 with the required phosphate salt and the volume was adjusted to 500 mL with Milli-Q water in a volumetric flask.

10 mM Phosphate buffer solution pH 7.00: To prepare 100 mL of this buffer solution, a 0.2 M aq solution of Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (30.5 mL) was mixed with 19.5 mL of a 0.2 M aq solution (19.5 mL) of NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. The pH was adjusted to 7.0 with the required phosphate salt and the volume was adjusted to 100 mL in a volumetric flask.

## 2. General techniques.

### 2.1. Chromatographic techniques

*Thin Layer Chromatography (TLC).* Thin layer chromatography analysis was done using aluminum foils coated with silica gel (60 F, 0.2 mm, Merck). Different methods and reagents

were employed to visualize spots depending on the nature of the analyzed compounds: UV lamp (254 nm), iodine and potassium permanganate...

*Column Chromatography.* Purification by column chromatography was carried out using 60 Å CC Chromatogel silica gel (35-70 µm, from SDS) as stationary phase. Mixtures of organic solvents were used as mobile phase.

*High performance liquid chromatography (HPLC).* *Reversed-phase* analysis by HPLC was carried out in Shimadzu (LC-20AD pump, SIL-20A HT Autosampler and SPD-M20A or SPD-20A detector) or Waters 2695 (Separations Module 2695 and PDA detector 2996) instruments. For purifications, a semi-preparative HPLC Waters 600 (Controller 600, Detector 2487) was employed.

The HPLC column was chosen depending on the compounds to be analyzed and the elution conditions:

Buffered conditions (A= TEAAc or NH<sub>4</sub>Ac buffer and B= ACN): for analyses a Kromasil 100 C18 column (250 × 4 mm, 10 µm particle size) from Teknokroma was used, and elution was carried out with a 1 mL/min flow. For purifications a Jupiter C18 column from Phenomenex (250×10 mm, 10 µm of particle size, 300 Å) was used, and the flow was 3 mL/min.

Acidic conditions (A= 0.1% TFA/H<sub>2</sub>O and B= 0.1% TFA/ACN): for analyses GraceSmart RP-18 (250×4.6 mm, 10 µm of particle size) or Jupiter Proteo C18 (250×4.6 mm, 4 µm of particle size, 90Å) columns from Phenomenex were employed, using a 1 mL/min flow. Purifications were done with a Jupiter C18 Proteo column (250×10 mm, 10 µm of particle size, 90 Å) from Phenomenex using a 3 mL/min flow.

Before being used, the HPLC eluents were sonicated for 15 min in a sonicator bath to avoid the formation of air bubbles. Detection of analyzed compounds was done at 260 nm in the case of oligonucleotides, and either 220 or 254 nm for PNAs and simple organic compounds.

*Medium performance liquid chromatography (MPLC).* MPLC was performed in a system composed by a Duramat piston pump from Ismatec Mc-Z, an Uvicord SII UV-Vis detector from Pharmacia Biotech, and an Ultrorac 7000 automatic collector from LKB. The recorders used were either a REC 101 from Pharmacia Biotech or an Ecograph RSG30 from Endress+Hauser. Glass columns were filled with C18 phase (Vydac, 20×2 cm, 15-20 µm diameter size and 300 Å of porus size), and washed with aqueous solutions (solvent A, 2-4 mL/min flow) before use.

*Ionic exchange chromatography (Dowex).* To exchange the oligonucleotide counterions to Na<sup>+</sup>, Dowex® (50WX8 hydrogen form, 200-400 mesh from Sigma-Aldrich) ion exchange chromatography was performed.

## 2.2. Nuclear magnetic resonance

<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded in Varian Inova 300 or Varian Mercury-400 spectrometers from the NMR Unit of the *Centres Científics i -Tecnològics (CCiT)* of the UB. 5-10 mg of sample and 0.7 mL of the appropriate deuterated solvent are required (CDCl<sub>3</sub>, DMSO-d<sub>6</sub>, acetone-d<sub>6</sub> or CD<sub>3</sub>OD depending on the sample). Chemical shifts were either referenced to TMS (δ= 0 ppm) or to the same solvent signal.

Interaction studies using  $^{19}\text{F}$ -NMR and  $^1\text{H}$ -NMR were performed in a Bruker Digital Avance AV-600 MHz from either the NMR Unit of the CCiT-UB or from the Spectroscopic and Molecular Structure Department of the *Instituto de Química-Física Rocasolano* (CSIC, Madrid), respectively. In  $^{19}\text{F}$ -NMR spectra, chemical shifts were referenced to TFA (internal reference,  $\delta = -76.55$  ppm) or trifluorotoluene (external reference). Experiments were performed in Shigemi tubes (SHIGEMI Co., LTD) with a solution volume of 350  $\mu\text{L}$ . In the case of  $^1\text{H}$ -NMR, the internal reference was DSS, and 5 mm tubes were employed with a total solution volume of 500  $\mu\text{L}$ .

### 2.3. Mass spectrometry

*MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight)*. Routine experiments were carried out in a 4800 Plus MALDI TOF/TOF from Applied Biosystems (CCiT, UB). Samples were generally prepared by mixing 1  $\mu\text{L}$  of an aqueous solution of the analyte and 1  $\mu\text{L}$  of the appropriate matrix. In some cases, in order to promote protonation of the analyte, 1  $\mu\text{L}$  of ammonium citrate (AC) solution (10 mg/mL) was added. 1  $\mu\text{L}$  of the final mixture was placed on the MALDI plate and the solvent was allowed to evaporate. The matrixes used in this work were:

THAP (2,4,6-trihydroxyacetophenone): 10 mg/mL in 1:1  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$  (v/v).

Analysis of small molecules in positive and negative mode.

HPA (3-hydroxypicolinic acid): 25 mg/mL in 1:1  $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$  (v/v).

Analysis of oligonucleotides in negative mode, always used with AC.

Different experimental parameters were used depending on the behavior and the molecular weight of the analyte. Reflector mode was employed as a first option because of its accuracy. The linear mode, which is less precise but more sensitive than the reflector mode, was used to analyze long RNAs with large molecular weights. Depending on the structure of the analyte, positive or negative analysis mode was employed. Oligonucleotides are always analyzed in the negative mode and, normally, small molecules in the positive mode.

*Electrospray MS (ESI-MS)*. ESI-MS High resolution experiments for simple organic compounds characterization were carried out by the *Unitat d'Espectrometria de Masses* of the CCiT of the UB using an ESI-MS LC/MSD-TOF mass spectrometer from Agilent Technologies.

A Micromass ZQ with a quadrupole detector from Waters, connected to an HPLC Waters 2695, was also been used as a self-service instrument. Electrospray samples were prepared by dissolving the analyte in Milli-Q water or methanol to obtain a 1 mM solution, approximately. Samples were injected using a Reodyne injector or directly from the HPLC to the mass instrument with a 0.2 mL/min constant flow of Milli-Q water or methanol (depending on the solvent of the sample). Depending on the analyte, positive or negative analysis mode was employed.

To determine the stoichiometry of ligand-RNA complexes a Synapt G1 HDMS (Waters, Manchester, UK) mass spectrometer with direct infusion was employed (IRB Mass Services).

*Chemical Ionization (CI) MS.* CI spectra were carried out by the *Unitat d'Espectrometria de Masses* of the *CCiT* of the UB. The instrument used was a mass spectrometer Trace DSQ of Thermo Finnigan with direct injection of the sample using methane as a carrier gas.

#### **2.4. UV-Vis Spectroscopy and circular dichroism**

UV-Vis absorption spectra and melting curves were performed in a Jasco V-550 spectrophotometer interfaced with a computer and equipped with a Jasco Peltier ETC-505T temperature controller connected to a water bath from Pharmacia Biotech Multitemp III.

A Jasco-J810 spectropolarimeter was been employed to carry out circular dichroism (CD) experiments. The instrument was computer-controlled and the cell temperature was stabilized with a Neslab RP-100 water bath.

In both UV and CD experiments, Hellman quartz cells with an optic path length of 1 or 10 mm were used.

#### **2.5. Other instrumentation**

Isothermal titration calorimetry was carried out in a low volume nanocalorimeter Nano ITC<sup>26</sup> from TA Instruments equipped with a degassing station.

Lyophilization of aqueous solutions was accomplished in either a Labconco Freezone 6 or a Virtis Freezemobile 25EL freeze-dryers.

Melting points were measured in a Bibby Stuart Scientific SMP10 instrument.

Suspensions were centrifuged in a 5430R Eppendorf centrifuge.

pH Was measured with a Crison micropH Basic 20 pH-meter.

When required, labware was sterilized in an Autester ST P autoclave from Selecta.

The microwave oven employed was a Biotage Initiator. For MW-promoted reactions sealed vials of volumes ranging from 0.2 mL to 20 mL were used.

### **3. Solid-phase Synthesis**

#### **3.1. Peptide Nucleic Acids (PNA) synthesis**

##### **3.1.1. Instrumentation and general reagents**

PNA oligomers were manually elongated in polypropylene syringes fitted with polypropylene disks. Solid-phase assembly was carried out on polyethylenglycol-polystyrene supports (PEG-PS) functionalized with the XAL bifunctional linker (XAL= 5-(9-aminoxanten-2-oxy)valeric acid, f= 0.20 mmol/g, NovaSyn TG Sieber resin from NovaBiochem), which allows the oligomer to be obtained as the C-terminal carboxamide. Fmoc-protected building blocks were used, and 2-(7-aza-1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HATU, Applied Biosystems) as coupling agent. The PNA monomers were synthesized as described in Chapter 1. Amino acids (Fmoc-Gly-OH and Fmoc-Lys(Boc)-OH) were obtained from NovaBiochem.

##### **3.1.2. Synthesis cycle and elongation of the chain**

PNA synthesis involves repetitive cycles composed by (Table.E.1):

- (i) deprotection of the amine with a 20% piperidine solution in DMF (2 × 10 minutes)
- (ii) coupling of the incoming monomer (3 eq) to the free, resin-linked amine. Carboxyl activation takes place by reaction with HATU (2.7 eq), DIEA (4 eq) and 2,6-lutidine (4 eq) in NMP. The coupling time was 2 h for PNA monomers and 90 minutes for amino acids. During this time, the reaction mixture was stirred in a laboratory orbital shaker under an Ar<sub>(g)</sub> atmosphere.

The efficiency of the coupling reaction was assessed by the Kaiser's test (see 3.1.4.). In case it was positive, the coupling step (ii) was repeated. If not, the synthesis cycle was completed with:

- (iii) capping of the unreacted amino groups with the capping solution: Ac<sub>2</sub>O (6%) and 2,6-lutidine (6%) in NMP (1 × 10 minutes).

Between the different cycle steps, the resin is normally washed with DMF or NMP, MeOH and DCM.

Before the treatment that removes all permanent protecting groups, the *N*-terminal Fmoc protecting group was removed as explained above (i). The amount of 9-fluorenylmethylpiperidine formed was quantified to obtain a global solid-phase synthesis yield (see 3.1.4.2).

	Step	Reagents	No. of treatments	T (minutes)
1	Washing	DMF, MeOH, DCM	3×, each	0.5
2	Deprotection	20% piperidine/DMF	2	10
3	Washing	DMF, MeOH, DCM	3×, each	0.5
4	Coupling	Fmoc-AEG <sub>(Janus)</sub> -OH or aminoacid (3 eq) HATU (2.7 eq) DIEA (4 eq) 2,6-lutidine (4 eq) NMP <sub>anh</sub>	1	90-120
5	Washing	NMP <sub>anh</sub> , DCM, MeOH, DCM	3×, each	0.5
6	Control	Kaiser test	1	3
7	Capping	5% Ac <sub>2</sub> O and 6% 2,6-lutidine/DMF	1	10

Table.E.1. Summary of a standard PNA synthesis cycle.

### 3.1.3. Cleavage, deprotection and purification

PNA oligomers containing only Boc-protected amines were treated with a 9:1 (v/v) TFA/*m*-cresol mixture (2 mL of solution per 10 μmol PNA) during 30 minutes. Then, the reaction mixture was filtered and the resin washed with TFA (3 × 1 mL). Filtrate and washings were combined. The crude PNA oligomer was precipitated by addition of high quality diethylether (5-10 mL approximately).

PNA oligomers containing Boc- and mesitylenesulfonyl-protecting groups were cleaved from the solid support and deprotected using a TFA-trifluoromethanesulfonic acid (TFMSA) cocktail.

The resin-bound PNA oligomer (10  $\mu\text{mol}$ s) was mixed with anisole (150  $\mu\text{L}$ ) and TIS (150  $\mu\text{L}$ ) and allowed to cool for 10 min in the fridge. Then, TFA (900  $\mu\text{L}$ ) was added and the mixture was chilled again in the fridge for an additional 10 min. The reaction mixture was then cooled in an ice-bath and TFMSA (300  $\mu\text{L}$ ) was carefully added dropwise. Finally, the reaction mixture was allowed to warm to room temperature, where it remained for 2 h under constant stirring. When the reaction time was completed, the mixture was filtered through and the resin washed with TFA (3  $\times$  1 mL). Filtrates and washings were combined and evaporated to dryness. The crude PNA oligomer was precipitated by addition of high quality diethylether.

Crude PNAs were analyzed and purified by HPLC. Generally, the gradient used for purification was from 0 to 30% of B eluent in 30 minutes, where eluent A was 0.1% TFA in water and eluent B was 0.1% TFA in ACN. The fraction containing the target PNA was collected and lyophilized. The purity of the PNA oligomer was assessed by analytical HPLC. PNAs were characterized by MALDI-TOF or ESI MS (positive mode).

#### 3.1.4. Assay and determination of resin functionalization

*Kaiser test.* <sup>[1]</sup> The ninhydrin test is used to detect the presence of free primary amines in a solid polymeric support. A small amount (0.5-2  $\mu\text{g}$ ) of dry resin is treated with 6 drops of reagent A and 2 drops of reagent B (see below). The suspension is heated to 110°C for 3 min in a sand bath (in an oven). After this time, if the resulting solution has a blue color (positive test), it means that there are free amine groups (more than 1 %), whereas if it becomes colorless or exhibits a pale yellow color, the test is negative and chain elongation can be continued.

Reagent A: on the one hand, a solution containing 40 g of phenol in 10 mL of absolute ethyl alcohol is prepared. On the other, another solution is obtained by mixing 2 mL of 10 mM KCN in 100 mL of anh. pyridine. Both solutions are stirred separately with 4 g of Amberlite MB-3 resin (Merck) for 45 minutes, filtered and mixed together.

Reagent B: 2.5 g of ninhydrin is dissolved in 50 mL of absolute ethanol. This solution must be kept in a opaque bottle protected from light.

*Determination of the substitution degree of a Fmoc-PNA-resin.* To have information on the total solid-phase yield, the resin-linked Fmoc-protected PNA was treated twice with 1 mL of 20% piperidine in DMF for 10 minutes. Both filtrates and the subsequent washings with DCM were combined in a 10 mL volume flask and the solution was made up to the mark with DCM. Then, the absorbance value of the solution was determined at 300 nm, which is the absorption maximum of the *N*-(9-fluorenylmethyl)piperidine adduct formed during the deprotection step. The determined quantity (mol) of Fmoc groups, which can be calculated applying the Lambert-Beer law, is equivalent to the quantity (mol) of PNA chains attached to the resin:

$$n_{PNA} (\mu\text{mole}) = \frac{A_{300} \cdot V \cdot 10^3}{\epsilon_{300} \cdot l} \quad (1)$$

where  $A_{300}$  is the absorbance of the solution at 300 nm,  $V$  is the volume (mL) of the volume flask and  $l$  is the path length (cm) of the cell.



### 3.1.5. PNA quantification by UV-Vis absorption

To calculate the amount of peptide nucleic acid (PNA) obtained by UV absorption, the molar extinction coefficient ( $\epsilon_{PNA}$ ) of the oligomer needs to be known. This is the result of the individual contributions of all the chromophores present in the molecule, in this case, the Janus bases ( $J_T$ ,  $J_D$ ,  $J_W$ ).

#### 3.1.5.1. PNAs molar extinction coefficient

To calculate the  $\epsilon$  of the different synthesized PNAs, it was been assumed that:

$$\epsilon_{PNA} = \sum n_i \cdot \epsilon_{Janus_i} \quad (2)$$

where  $n_i$  is the number of Janus bases present in this PNA and  $\epsilon_{Janus,i}$  is the corresponding molar extinction coefficient.

PNAs containing  $J_T$  or  $J_D$  bases were quantified at  $\lambda = 280$  nm whereas PNAs only containing  $J_W$  were quantified at  $\lambda = 230$  nm (see Experimental Section, Chapter 1).

## 3.2. Oligonucleotide synthesis

### 3.2.1. Instrumentation and general reagents

The synthesis of all ribonucleic acids was performed in an automatic 3400 Applied Biosystems synthesizer using the standard phosphite triester methodology and at the 1  $\mu$ mol scale. Standard  $\beta$ -cyanoethyl phosphoramidite chemistry with *tert*-butyldimethylsilyl (TBDMS) protection of the ribose 2'-hydroxyl group was employed ( $A^{Pac}$ ,  $G^{iPr-Pac}$  and  $C^{Ac}$  monomers were purchased from either Glen Research or Link Technologies). In the case of the synthesis of F-labeled RNAs, the commercially available 2'-F-5'-DMT-U phosphoramidite was used. The solid support used was controlled pore glass (CPG) (from Glen Research or Link Technologies). Other reagents and solutions needed to carry out the chain elongation were from Glen Research and purchased to Eurogentec, with the exception of BTT that was from Link Technologies.

The required amounts of phosphoramidites and BTT, previously dried overnight in a desiccator with  $P_2O_5$  and KOH, were dissolved in anh. ACN under an Ar atmosphere to yield 0.1 M and 0.3 M solutions, respectively. To prevent moisture contamination, all labware was previously dried in an oven at 110°C for 24 h, and allowed to cool down in a desiccator.

### 3.2.2. Synthesis cycle and elongation of the chain<sup>[2]</sup>

Each cycle comprises (Figure E.1):

- i) a **detrytilation** step that unmaskes the 5'-hydroxyl group for chain extension (3% TCA in DCM)
- ii) washes with ACN
- iii) a **coupling step** in which the desired nucleoside as a phosphoramidite building block (0.1 M in ACN) is activated with BTT (5-(benzylmercapto)-1H-tetrazole) (0.3 M in ACN) (10 minutes)

- iv) a **capping step** to acylate any unreacted 5'-hydroxyl group to avoid the possibility of obtaining deletion sequences. Two capping solutions are used, namely cap mix solutions A and B containing a 1:1:8 Pac<sub>2</sub>O/pyr/THF mixture (v/v/v) and 16% 1-metilimidazole in THF, respectively
- v) an **oxidation step** that converts the phosphite triester (P(III)) into a phosphate triester (P(V)) using a 0.1 M solution of I<sub>2</sub> in H<sub>2</sub>O/Pyr/THF
- vi) washes with ACN

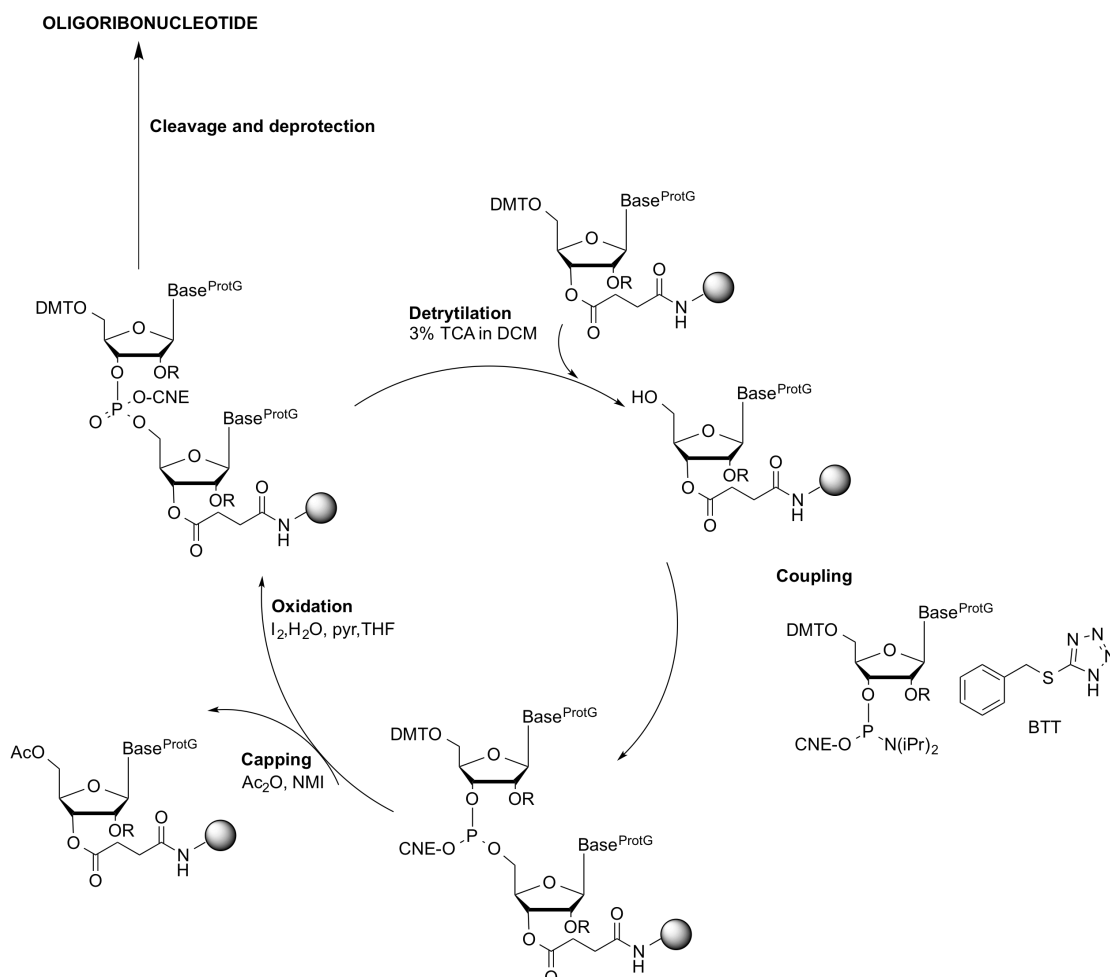


Fig.E.1. Scheme of in solid phase RNA synthesis employing the phosphite triester methodology.

The extension of the coupling reaction can be controlled by DMT quantification by conductimetry. The use of BTT for activation of the 2'-O-TBDMS protected phosphoramidites was strongly preferred over conventional 1*H*-tetrazole to increase speed and coupling efficiency.

### 3.2.3. Manual cleavage, deprotection and purification

After chain elongation, treatment with a 1:1 mixture of conc. aq ammonia (32%) and a 8 M solution of methylamine in ethanol (2 mL/ $\mu$ mol oligoribonucleotide) at 65°C for 30 minutes cleaves the oligonucleotide and removes all protecting groups except the TBDMS on the 2'-hydroxyls and 5'-DMT. These deprotection conditions prevent premature loss of the TBDMS

groups, which would otherwise lead to degradation of the RNA under basic conditions or to migration of phosphates from 3' to 2'. After filtration and washing with ethanol and water, the solvent is removed under reduced pressure and the crude is treated with a 6:3:4 mixture of NMP, TEA and TEA·3HF at 65°C for 2.5 h (600 μL/μmol oligoribonucleotide). The RNA precipitates upon addition of 2 volumes of isopropoxytrimethylsilane (1.2 mL/ μmol of oligonucleotide). Diethyl ether (5 mL/μmol) is added, the suspension is centrifuged at 2200 rpm at 5°C for 5 minutes and the supernatant is discarded. This process is repeated twice to remove undesired reagents or byproducts.

Purification is then carried out using a semi-preparative HPLC column (*see conditions in Experimental Section, Chapter 2*): The crude oligonucleotide was dissolved in 600 μL of Milli-Q water and was purified using RNase-free eluents. The pure 5'-DMT-oligonucleotide was dissolved in a 3% aqueous solution of AcOH to deprotect the 5'-terminal hydroxyl (the mixture was left at rt for 45 min and then lyophilized). The resulting crude was analyzed and repurified, if required, to obtain the desired product. Characterization was carried out by HPLC and EM-MALDI-TOF.

### 3.2.4. RNA quantification by UV-Vis absorption<sup>[3]</sup>

Quantification of the synthesized oligonucleotides was done by measuring the absorbance of a well-known volume solution at 260 nm, which is the maximum absorption wavelength of nucleobases. The amount of oligonucleotide was calculated applying the Lambert-Beer law and was expressed in μmol, nmol or OD<sub>260</sub>.

An OD<sub>260</sub> (optical density at 260 nm) is the amount of oligonucleotide that contained in 1 mL volume solution in a 1 cm of path length cell results in a unit absorbance. It can be calculated:

$$OD_{260} = A_{260} \cdot V(mL) \quad (3)$$

In this work the amount of oligonucleotide is normally given in nmol, the easiest magnitude easier to manage in all biophysics assays.

To calculate the amount of oligonucleotide using the Lambert-Beer law, the molar extinction coefficient ( $\epsilon_{oligo}$ ) of each oligonucleotide needs to be known. This is the result of the individual contributions of all the present bases (Table E.2) in the oligonucleotide corrected by a factor ( $f$ ) related to stacking phenomena, which produce a decrease in the absorption of DNA or RNA compared with the individual nucleosides. This factor is  $f= 0.9$  in the case of single-stranded chains and  $f= 0.8$  in the case of double-stranded chains.

$$\epsilon_{oligo} = \sum f \cdot \epsilon_{bases} \quad (4)$$

Nucleoside	$\epsilon_{260}(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1})$
A	15100
G	11500
U	10100
C	7700

**Table E.2.** Molar extinction coefficients of the different nucleosides determined at 25°C, pH 7.0 and 260 nm.

The molar extinction coefficient ( $\epsilon$ ) can also be calculated in a more accurate way via the *nearest-neighbour method*, which takes into account the effect produced by the neighboring nucleosides.<sup>[4]</sup>

This method was the one employed to calculate the  $\epsilon$  of the synthesized oligonucleotides in this PhD thesis (Table E.3). The application used is called OligoAnalyzer 3.1 and can be found in the internet: <http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/default.aspx>.

The employed  $\epsilon$  in this PhD are collected in Table E.3.

Sequence	Name	$\epsilon_{260}$ ( $M^{-1}cm^{-1}$ )
rG(CUG) <sub>4</sub> C	G(CUG) <sub>4</sub> C	135600
rGG(CUG) <sub>2</sub> CGCAAG(CUG) <sub>2</sub> CC	hCUG	209800
rGGCUGCU <sup>2F</sup> GCGCAAG(CUG) <sub>2</sub> CC	F-hCUG	209800
rGG(CU <sup>2F</sup> G) <sub>2</sub> CGCAAG(CUG) <sub>2</sub> CC	F <sub>2</sub> -hCUG	209800
rGG(CCUG) <sub>2</sub> CGCAAG(CCUG) <sub>2</sub> CC	hCCUG	220300
rGGCUGCAGCGCAAGCUGCAGCC	CUG <sub>cont</sub>	200900
rCGUG <sub>3</sub> A <sub>2</sub> CUC <sub>2</sub> UC <sub>2</sub> U <sub>2</sub> G <sub>2</sub> UA <sub>2</sub> CA <sub>2</sub> G <sub>2</sub> AC <sub>3</sub> ACG	IRES-34	312600
<sup>t</sup> RNA <sup>Phe</sup> [5,6]		581395

**Table E.3.** Molar extinction coefficients of the different oligonucleotides employed in this PhD (25°C, pH 7.0 and 260 nm).

### 3.2.5. Ion exchange chromatography

In order to obtain the sodium salt of the oligoribonucleotides, purified RNAs were passed through a Dowex® column (50WX8 hydrogen form, 200-400 mesh, from Sigma-Aldrich). The resin (approximately 15 mL/ $\mu$ mol RNA) was introduced into a polyethylene syringe fitted with a polypropylene filter. The protocol followed was:

- wash the resin with water (Milli-Q grade)
- pass 200 mL of 10% HCl slowly
- wash the resin with water (Milli-Q grade) until neutral pH
- pass 200 mL of 1 M NaOH (8 g NaOH in 200 mL Milli-Q water) slowly
- repeat step iii)

After this, an aqueous solution of the oligoribonucleotide (approximately 1 mL water/ $\mu$ mol RNA) was passed through the column and the eluate collected with eppendorfs. All fractions were analyzed by UV-Vis spectroscopy. The fractions containing oligoribonucleotide were combined and lyophilized to obtain the sodium salt of the oligomer.

## 4. RNA-ligand Interaction Studies

### 4.1. Thermal denaturation assays monitored by UV-Vis and circular dichroism<sup>[7,8]</sup>

The effect of the ligands on the thermal stability of the RNA duplex structures was assessed by cooling/heating experiments. Solutions containing 2  $\mu$ M RNA (unless otherwise stated) and the corresponding ligand (the number of equivalents required) in 1 mL of buffer solution were prepared, and transferred into 1 cm path length quartz cells to run the experiments (the chamber was provided with a continuous flow of N<sub>2(g)</sub> to avoid condensation upon cooling).

The cell was kept at 90°C for 10 minutes and then cooled from 90°C to 20°C. With a normal The solution was heated and cooled for a minimum of three times (typical rate was 0.5 °C/min, only in one particular case the rate was 0.2°C/min) and the absorption of the sample at 260 nm was measured. Transitions should be reversible and follow the same path to indicate a true equilibrium process. Absorption measurements were done every 0.5 minutes.

CD-Monitored melting curves were carried out by measuring the variation of the sample ellipticity at the  $\lambda_{\max}$  of each RNA (266 nm for hCUG and 270 nm for hCCUG). The temperature was ramped up at a rate of 0.5°C/min. Experiments were done in the 10 to 90°C range. Ellipticity vs wavelength spectra were recorded every 10°C over 220-320 nm.

Data were treated using the Origin V7.5886 and Microsoft Excel softwares. The melting point corresponds to the inflection point of the obtained sigmoid curve. Two base lines (upper and lower) were drawn for the folded and unfolded forms of the RNA. These baselines were chosen as straight tangential lines with positive or negative slope. After setting the base lines, median line between both is drawn. The melting temperature ( $T_m$ ) simply corresponds to the intersection between the experimental curve and median line. Determined  $T_m$  values were the average of a minimum of two melting experiments.

#### 4.2. Circular dichroism assays

RNA was annealed by heating the sample solution (see above) in a sealed eppendorf at 90°C in a sand bath and allowing it to cool down to rt. Samples were transferred into 1 cm path length quartz cells for CD experiments.

The scans ranged from 220 to 320 nm at a rate of 100 nm/min, and the data were gathered at the average of 8 time scans. Experiments were performed at constant temperature with a  $N_{2(g)}$  flow of 3 mL/min to prevent water condensation upon cooling.

Data were processed using Origin V7.5886 and Microsoft Excel softwares. To facilitate the comparison between different spectra, molar ellipticity ( $\theta_M$ ) was normally plotted against wavelength instead of absolute ellipticity ( $\theta_\lambda$ ).

$$[\theta]_M = \frac{\theta_\lambda}{10 \cdot l \cdot c} (\text{deg cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}) \quad (5)$$

where  $\theta_M$  is the molar ellipticity,  $\theta_\lambda$  is the absolute ellipticity,  $l$  is the path length way of the cell and  $c$  is the molar concentration.

#### 4.3. Isothermal titration calorimetry (ITC) assays

The instrument (see 2.5) possesses two identical cells, the sample cell (190  $\mu$ L) and the reference cell, and an analytical stirring syringe of 50  $\mu$ L. In all the experiments carried out in this work, the ligand in the syringe (50  $\mu$ L) was titrated over the RNA in the sample cell (170  $\mu$ L); the reference cell was filled with the same buffer solution employed to dissolve the ligand and the biomolecule and was previously degassed at 25°C for 5 minutes under reduced pressure.

The required amount of previously quantified RNA and ligand was lyophilized. The RNA (10  $\mu\text{M}$ ) and the ligand (250-500  $\mu\text{M}$ ) were dissolved in the corresponding buffer solution previously degassed in the Degassing Station (25°C for 5 minutes under reduced pressure). The RNA was annealed by heating the solution in a sealed eppendorf at 90°C in a sand bath and allowing it to cool down. Before starting the experiment, both solutions were thermostated at 25°C in the Degasser Station. The cell was cleaned and dried, and the RNA solution (300  $\mu\text{L}$ ) was introduced carefully. The stirring syringe was filled with the ligand solution (50  $\mu\text{L}$ ) avoiding the formation of bubbles, coupled to the burette and introduced into the microcalorimeter.

All experiments were computer-controlled and required the introduction of some parameters such as temperature, stirring rate, number of injections, injections volume and time between injections. In table E.4 the experiment normal parameters are shown.

Experimental Parameters	Value
Temperature	25°C
Baseline time	100 s
Stirring rate	250 rpm
Number of injections	20
Injection volume	2.5 $\mu\text{L}$
Delay time	300 s

Table E.4. Experimental parameters in ITC assays.

A blank experiment has to be done to subtract all the heats that are not derived from the interaction between the RNA and the corresponding ligand, such as the heat of dilution of the ligand in the buffer. The experiment was carried out by titrating the corresponding ligand to the buffer solution in the sample cell using the same parameters, concentrations and conditions employed in the titration experiments. The average heat of this experiment was subtracted of all injections performed in the titration experiments.

To obtain the thermodynamic parameters of the interaction, data were treated with the Launch NanoAnalyze Data Analysis v.2.4.1. software, from TA Instruments. The different peaks obtained in the thermogram were integrated, the blank was subtracted and the resulting points were plotted on a heat vs [ligand]/[target] ratio graphic. The sigmoid curve thus obtained was adjusted to a mathematical model of the program. In all cases, the *Independent Model* was been used to get all thermodynamic parameters.

#### 4.4. Nuclear magnetic resonance

##### 4.4.1. Sample preparation.

10 mM Phosphate buffer, pH 7.0, in deuterium-depleted water ( $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ , 9:1) was the solvent. RNA concentrations were 100 or 150  $\mu\text{M}$  (for  $^1\text{H-NMR}$  or  $^{19}\text{F-NMR}$ , respectively). The ligand concentration was chosen taking into account that the added aliquots should not produce a considerable change in the concentration of the RNA solution. On this basis, it was decided that 5  $\mu\text{L}$  of ligand solution had to contain 1 equivalent of ligand. Working with these concentrations, the addition of four equivalents of ligand to the RNA solution corresponded to a 5% increase in the total volume.

To prepare the NMR samples, both ligands and oligonucleotide (Na<sup>+</sup> salt) were quantified by UV spectroscopy, to allow the precise amount needed to be taken. The ligand sample was lyophilized. In parallel, 10 mM phosphate buffer pH 7.0 (350-500  $\mu$ L) was added to the oligonucleotide to obtain, after lyophilization, a sample of the biomolecule with the required quantity of salts. Finally, the oligonucleotide was dissolved in 350-500  $\mu$ L of a 1:9 (v/v) D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O mixture. The solution was warmed to 90°C and allowed to cool to room temperature (annealing). The ligand was dissolved in Milli-Q water.

#### 4.4.2. Acquisition parameters.

<sup>19</sup>F-NMR spectra were recorded without <sup>1</sup>H-decoupling at a frequency of 564.6 MHz. Typical experimental parameters were as follows: spectral width 7.5 kHz, <sup>19</sup>F excitation pulse 12  $\mu$ s, acquisition time 2 s, relaxation delay 2 s, number of scans 1200-1800. All experiments were performed at 298 K. Time domain data was processed with an exponential window function using a line-broadening factor of 12-30 Hz.

<sup>1</sup>H-NMR spectra were recorded at a frequency of 600.133 MHz. NOESY spectra were acquired with mixing times of 150, or 250 ms, and the TOCSY spectra were recorded with standard MLEV-17 spin-lock sequence, and 80-ms mixing time. In 2D experiments in H<sub>2</sub>O, water suppression was achieved by including an excitation sculping module in the pulse sequence. 1D-experiments were carried out at different temperatures, namely 5, 25, 35 and 45°C, and 2D-experiments at 1 or 5 °C to reduce the exchange with water.

#### 4.4.3. Titration experiments

To carry out titration experiments, small aliquots of ligand were added into the RNA solution and spectra were acquired with different number of ligand equivalents. Once the spectrum of RNA alone was acquired, the solution was poured into an eppendorf and 5  $\mu$ L (1 eq) of a 10.5 mM aqueous solution of the corresponding ligand was added. The resulting mixture was heated to 90°C for 3 minutes and allowed to cool down to room temperature. After that, using a pipette, the sample was introduced again into the tube and a new spectrum was acquired. This process was repeated as many times as desired number of equivalents were added.

#### 4.4.4. Data processing

Data was processed using either the TopSpin software or MestReNova v.6.0.2-5475, and the spectral analysis program Sparky was employed for spectral manipulation and evaluation of NOE intensities. In <sup>19</sup>F-NMR experiments an exponential apodization of 25 Hz was employed.

### 4.5. Stoichiometry determination by mass spectrometry

First of all, both the oligonucleotide and the ligands were quantified by UV spectroscopy to take the precise amount required for the experiment. RNA (hCUG or hCCUG) was mixed with 6-15 eq of ligand (J<sub>T</sub>K, J<sub>T</sub>G<sub>4</sub>J<sub>T</sub>K, J<sub>D</sub>J<sub>D</sub>K, J<sub>T</sub>J<sub>W</sub>J<sub>W</sub>J<sub>T</sub>K, J<sub>D</sub>J<sub>W</sub>J<sub>W</sub>J<sub>D</sub>K) and the resulting suspension was lyophilized. The residue obtained was dissolved in 50 mM aq ammonium acetate to a final RNA concentration of 50  $\mu$ M. The samples were annealed by heating at 90°C and cooling down

slowly. A Micro Bio-Spin 6 column (Bio-Gel® P polyacrylamide, from Bio-Rad) was used for sample desalting and excess ligand removal using a 150 mM ammonium acetate buffer as the exchanging buffer. Cleaned samples (75-100  $\mu$ L) were injected for IM-MS analysis. Samples were negatively ionized by electrospray, IM-MS mode (V mode, Mobility-TOF mode). Other settings of the instrument are as follows:

Sampling cone: 45 V  
Source temperature: 100 °C  
Trap collision energy: 10 V  
Transfer collision energy: 10 V  
IM-gas flow: 24 mL/min  
Trap gas flow: 5 mL/min  
Bias: 15 V  
IM wave height: 8.0 V  
IM wave velocity: 300 m/s  
Pressures: backing 5.75e0 mbar

Trap 4.00e-2 mbar  
IMS 4.67e-1 mbar  
TOF 2.17 e-6 mbar  
m/z range: 500 to 8000  
Scan time 1s  
RF (Offset/Limit): Source 350/450, IMS 350/380, Trap 350/380, Transfer 350/380  
External calibration with CsI, m/z range: 500 to 8000

Data were acquired and processed with the MassLynx software v 4.1 (SCN 704). MS spectra were deconvoluted to the average masses with integrated algorithms in MassLynx. IM-MS data were processed with the Driftscope software vs. 2.4.



## EXPERIMENTAL SECTION: Chapter 1

### 1. Synthesis and characterization of organic compounds

#### 1.1. PNA monomers containing J<sub>T</sub>

##### 1.1.1. Janus J<sub>T</sub> with one methylene group: First synthetic route

*2-(2-Bromoethoxy)tetrahydro-2H-pyran (2)*. 3-bromo-1-propanol (15 g, 120 mmol) was cooled to 0°C in a round-bottom flask and 3,4-dihydro-2H-pyran (DHP) (11 g, 132 mmol) was added dropwise. 12 M HCl (2 drops) was added and the reaction mixture was stirred at rt for 2.5 h. The reaction was quenched with Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2 g) and the solid was filtered and washed with DCM. The filtrate was evaporated under reduced pressure to yield compound **2** as a colorless oil (25 g, 100%); R<sub>f</sub> (AE/Hexane 3:7)= 0.38; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ: 4.58 (1H, t, J= 4.7 Hz), 3.91-3.42 (m, 6H), 1.75-1.46 (m, 6H) ppm; <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ: 98.6, 67.3, 61.9, 30.6, 30.2, 25.1, 19.0 ppm. MS (ESI, negative mode): *m/z* 206.99 [M-H]<sup>-</sup>, M calcd for C<sub>7</sub>H<sub>13</sub>BrO<sub>2</sub> 208.01.

*2-[2-(Tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)ethyl]malononitrile (3)*. Malononitrile (8.9 g, 132.9 mmol) in DME<sub>anh</sub> (60 mL) was added dropwise to a suspension of 60% NaH (3.1 g, 76 mmol) in DME<sub>anh</sub> (40 mL) under an Ar atmosphere. After ten min, a solution of **2** (10 mL, 63.3 mmol) in anh. DME (13 mL) was added dropwise and the reaction mixture was stirred at room temperature overnight under an Ar atmosphere. The reaction was quenched by adding 5% aq NH<sub>4</sub>Cl to pH≈ 8. The reaction mixture was diluted with AcOEt (90 mL) and washed with H<sub>2</sub>O (3 x 150 mL) and brine (75 mL). The organic layer was dried over anh. MgSO<sub>4</sub>, filtered, and the solvent was evaporated under reduced pressure. The crude was purified by silica gel flash column chromatography eluting with DCM and increasing amounts of MeOH (from 0 to 5%) to furnish a colorless oil (10.6 g, 87%); R<sub>f</sub> (DCM/MeOH 95:5)= 0.80; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 4.60 (t, J=3.6 Hz, 1H), 4.11 (t, J= 7.6 Hz, 1H), 3.97 and 3.65 (m, 2H), 3.84 and 3.55 (m, 2H), 2.33 (m, 2H), 1.54-1.74 (m, 6H) ppm; <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ 112.7, 112.6, 99.5, 62.9, 62.4, 31.6, 30.4, 25.2, 19.7, 19.6 ppm; HR MS (ESI, negative mode): *m/z* 193.0978 [M-H]<sup>-</sup>, M calcd for C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 194.1055.

*5-[2-(Tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)ethyl]pyrimidine-2,4,6-triamine (4)*. Absolute EtOH (85 mL) and sodium (950 mg, 41.2 mmol) were stirred under an Ar atmosphere until sodium was consumed. The solution was transferred to a round-bottom flask containing **3** (4 g, 20.5 mmol) and guanidinium hydrochloride (2.5 g, 26.7 mmol), and the reaction mixture was refluxed for 6 h under an Ar atmosphere and constant stirring. The reaction was then cooled down to room temperature and quenched by addition of 1 M HCl aq until pH≈ 8. Solvents were evaporated under reduced pressure and the crude was purified by silica gel flash column chromatography eluting with DCM and increasing amounts of MeOH (0-10%) in the presence of 2% TEA. Finally, **4** was obtained as a light yellow solid (3.7 g, 73%); R<sub>f</sub> (DCM/MeOH 90:10)= 0.45; mp= 179°C; <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ 5.83 (s, 4H), 5.69 (s, 2H), 4.58 (t, J= 3.3 Hz, 2H), 3.60 (m, 2H), 3.36 (m, 2H), 2.55 (t, J= 6.4 Hz, 2H), 1.70-1.46 (m, 6H) ppm; <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz): δ 161.4, 158.7, 97.9, 82.7, 65.9, 61.1, 30.2, 24.9, 23.6, 19.0 ppm; MS (CI, NH<sub>3</sub>, positive mode): *m/z* 254.1 [M+H]<sup>+</sup>, calcd for C<sub>11</sub>H<sub>19</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub> 253.15.

*5-[2-(Tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)ethyl]-2,4,6-[hexakis(tert-butoxycarbonyl)]triaminopyrimidine (5)*. Compound **4** (1.5 g, 5.9 mmol), Boc<sub>2</sub>O (27.9 g, 123.9 mmol), DMAP (510 mg, 4.13 mmol), TEA (6.6 mL, 47.5 mmol) and anh. THF were mixed and stirred under an Ar atmosphere for 24-30 h. The reaction was quenched with 5% aq NaHCO<sub>3</sub> (4 mL) and THF was evaporated under reduced pressure. The resulting material was dissolved in Et<sub>2</sub>O (80 mL) and washed with 5% aq NaHCO<sub>3</sub> (2 x 80 mL), H<sub>2</sub>O (1 x 80 mL) and brine (40 mL). The organic layer was dried over

anh.  $\text{MgSO}_4$ , filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude was purified by silica gel flash chromatography eluting with hexane and increasing amounts of AcOEt (0-20%) to provide **3** as a white foam (2.9 g, 58%);  $R_f$ (hexanes/AcOEt 80:20)= 0.41; mp= 137-139°C;  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  4.57 (t,  $J$ = 3.4 Hz, 1H), 3.82 (m, 2H), 3.52 (m, 2H), 2.82 (m, 2H), 1.84-1.54 (m, 6H), 1.43 and 1.44 (s, 54H) ppm;  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  162.4, 156.6, 150.7, 150.1, 125.2, 99.3, 84.3, 83.6, 64.8, 62.5, 30.8, 28.1, 28.0, 27.5, 25.6, 19.8 ppm; MS (ESI, positive mode):  $m/z$  854.5  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 876.5  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , M calcd for  $\text{C}_{41}\text{H}_{67}\text{N}_5\text{O}_{14}$  853.47.

*5-(2-Hydroxyethyl-1-yl)-2,4,6-[hexakis(tert-butoxycarbonyl)triaminopyrimidine (6)*. Compound **5** (2 g, 2.3 mmol) and *p*-toluenesulfonic acid (pTsOH) (45 mg, 0.23 mmol) were suspended in MeOH (70 mL). The reaction mixture was stirred for 6 h under an Ar atmosphere at room temperature. The reaction was quenched with 5% aq  $\text{NaHCO}_3$  (2.2 mL) and the solvents were evaporated under reduced pressure. The solid material obtained was dissolved in  $\text{Et}_2\text{O}$  (70 mL) and washed with 5% aq.  $\text{NaHCO}_3$  (5  $\times$  70 mL),  $\text{H}_2\text{O}$  (1  $\times$  70 mL) and brine (35 mL). The organic layer was dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered and evaporated under reduced pressure. The crude was purified by silica gel flash column chromatography eluting with hexanes and increasing amounts of AcOEt (10-30%) to furnish **5** as a white foam (1.51 g, 85%);  $R_f$  (hexanes/AcOEt 70:30)= 0.58; mp= 67-69°C;  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  8.12 (s, 1H), 4.12 (t,  $J$ = 7.2 Hz, 2H), 2.90 (t,  $J$ = 7.2 Hz, 2H), 1.53 (s, 9H), 1.50 (s, 9H), 1.45 (s, 18H), 1.42 (s, 18H) ppm;  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  160.4, 160.2, 156.5, 153.7, 149.8, 150.5, 149.9, 113.3, 84.0, 83.1, 83.1, 81.4, 64.3, 28.1, 27.7, 27.8, 27.8 ppm; MALDI-TOF MS (THAP, positive mode):  $m/z$  770.86  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 792.82  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 808.82  $[\text{M}+\text{K}]^+$ , M calcd for  $\text{C}_{36}\text{H}_{59}\text{N}_5\text{O}_{13}$  769.41

*2-(2,4,6-Triaminopyrimidin-5-yl)ethanol (12)*. Compound **4** (823 mg, 3.25 mmol) was mixed with a 50% aq AcOH solution (Milli-Q water) (5.6 mL, 48.8 mmol). The reaction was stirred overnight at 70°C. The mixture was allowed to cool down to room temperature and neutralized with a mixture of Milli-Q water and concentrated  $\text{NH}_3$  (1:1) to pH 10. The resulting solution was lyophilized. The crude was purified by MPLC (isocratic elution with 1% ACN in Milli-Q water) to yield **4** as a white solid (541 mg, 98% as assessed by HPLC analysis); analytical HPLC (A: 0.05M TEAAc buffer, B: ACN, Kromasil 100 C18 column, 1 mL/min, linear gradient from 0 to 30% of B in 30 min):  $t_R$ =5.9 min; mp= 238-239°C;  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ , 400 MHz):  $\delta$  5.47 (s, 4H), 5.24 (s, 2H), 3.41 (t,  $J$ = 6.8 Hz, 2H), 2.37 (t,  $J$ = 6.8 Hz, 2H) ppm;  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ , 100 MHz):  $\delta$  161.2, 158.1, 83.0, 60.0, 26.6 ppm; MS (CI,  $\text{NH}_3$ , positive mode):  $m/z$  170.4  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , M calcd for  $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{N}_5\text{O}$  169.10.

*Tri-tert-butyl(5-(2-((tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)ethyl)pyrimidine-2,4,6-triyl)tricarbamate (16)*. Compound **4** (2 g, 7.9 mmol), CDI (7.7 g, 47.4 mmol), imidazole (3.2 g, 47.4 mmol) and  $t\text{BuOH}$  (4.5 mL, 47.4 mmol) were dissolved in DMF. The mixture was stirred for 24 h at room temperature and an additional amount of CDI (10 g, 10.5 mmol) was added. The mixture was stirred for 5 days, after which time solvent was evaporated under reduced pressure. The resulting material was dissolved in AcOEt (150 mL) and washed with 0.05M TEAAc pH= 5 (5  $\times$  100 mL) to eliminate the excess imidazole. The organic layer was washed with water and dried over anh.  $\text{MgSO}_4$ , filtered and evaporated to dryness using a rotavap. The crude was purified by silica gel flash chromatography eluting with hexanes and increasing amounts of AcOEt (10-50%) to yield **16** as a white foam (387 mg, 9%);  $R_f$  (hexanes/AcOEt 60:40)= 0.73;  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  8.25 (s, 2H), 7.66 (s, 1H), 4.68 (t,  $J$ = 3.6 Hz, 1H), 4.21-3.81 (m, 4H), 3.54 (m, 4H), 2.74 (m, 2H), 1.84-1.54 (m, 6H), 1.49 (s, 9H), 1.49 (s, 18H) ppm; MS (ESI, positive mode):  $m/z$  554.1  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 1107.4  $[\text{2M}+\text{H}]^+$ , M calcd for  $\text{C}_{26}\text{H}_{43}\text{N}_5\text{O}_8$  553.4

*Di-tert-butyl(6-(bis(tert-butoxycarbonyl)amino)-5-(2-((tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)ethyl)pyrimidine-2,4-diyl)dicarbamate (17)*. Compound **5** (200 mg, 0.23 mmol) was dissolved in 4:1 THF/water (v/v) and LiOH (39 mg, 0.92 mmol) was added. The reaction mixture was stirred for 19 h

at 40°C. Then, the mixture was allowed to cool down to room temperature and THF was evaporated under reduced pressure. The resulting material was dissolved in DCM (20 mL) and washed with water (2 × 20 mL) and brine (15 mL). The organic layer was dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. The crude was purified by silica gel flash chromatography eluting with hexanes and increasing amounts of AcOEt (5-30%) to yield **17** as a white foam (55 mg, 37%); R<sub>f</sub> (hexanes/AcOEt 70:30) = 0.37; analytical HPLC (A: 0.05M TEAAc buffer, B: ACN, Kromasil 100 C18 column, 1 mL/min, linear gradient from 70 to 100% of B in 20 min and 100% of B for 10 min): t<sub>R</sub> = 13.9 min; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 9.04 (s, 1H), 7.35 (s, 1H), 4.61 (t, J = 4.4 Hz, 1H), 3.98 and 3.72 (m, 2H), 3.52 (m, 2H), 2.75 (m, 2H), 1.84-1.54 (m, 6H), 1.54 (s, 9H), 1.52 (s, 9H), 1.40 (s, 18H) ppm; <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ 160.8, 159.3, 155.8, 150.1, 149.9, 111.5, 99.1, 83.7, 81.3, 81.0, 67.4, 61.9, 30.0, 28.2, 27.9, 26.3, 25.1, 19.2 ppm; MS (ESI, positive mode): m/z 654.0 [M+H]<sup>+</sup>, 676.2 [M+Na]<sup>+</sup>, 1329.4 [2M+Na]<sup>+</sup>, M calcd for C<sub>31</sub>H<sub>51</sub>N<sub>5</sub>O<sub>10</sub> 653.4.

*Tri-tert-butyl(5-(2-hydroxyethyl)pyrimidine-2,4,6-triyl)tricarbamate (18)*. Compound **17** (55 mg, 0.09 mmol) and pTsOH (8 mg, 0.04 mmol) were suspended in MeOH (2 mL). The reaction mixture was stirred for 13 days under an Ar atmosphere at room temperature. The reaction was quenched with 5% aq NaHCO<sub>3</sub> (2 mL) and the solvents were evaporated under reduced pressure. The resulting solid material was dissolved in AcOEt (5 mL) and washed with 5% aq NaHCO<sub>3</sub> (3 × 5 mL), H<sub>2</sub>O (1 × 5 mL) and brine (3 mL). The organic layer was dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, filtered, and the solvent was evaporated under reduced pressure. The crude was purified by silica gel flash column chromatography eluting with DCM and increasing the polarity with MeOH (0-4%) in the presence of 2% TEA. **18** was obtained as a white foam (14 mg, 30%); R<sub>f</sub> (DCM/MeOH 95:5 + 2% TEA) = 0.58; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 7.23 (s, 1H), 6.24 (s, 1H), 5.50 (s, 2H), 3.78 (t, J = 8.2 Hz, 2H), 3.52 (m, 2H), 2.75 (t, J = 8.2 Hz, 2H), 1.50 (s, 9H), 1.43 (s, 18H) ppm; MS (ESI, positive mode): m/z 470.1 [M+H]<sup>+</sup>, 939.5 [2M+H]<sup>+</sup>, 961.0 [2M+Na]<sup>+</sup>, M calcd for C<sub>21</sub>H<sub>35</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub> 469.3.

### 1.1.2. Janus J<sub>T</sub> with one methylene group: Second Synthetic Route

*Methyl 3,3-dicyanopropanoate (19)*. A solution of malononitrile (5.2 g, 78.5 mmol) in anhydrous DME (35 mL) was added dropwise to a suspension of 60% NaH (3.3 g, 83.3 mmol) in anhydrous DME (35 mL) under an Ar atmosphere. After 10 min, a solution of methyl bromoacetate (8 g, 52.3 mmol) in anhydrous DME (10 mL) was added dropwise and the reaction mixture was stirred overnight at room temperature under an Ar atmosphere. The reaction was quenched by addition of 10% aq NH<sub>4</sub>Cl until pH ≈ 8. The reaction mixture was diluted with AcOEt (100 mL) and washed with H<sub>2</sub>O (2 × 150 mL) and brine (100 mL). The organic layer was dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, filtered, and the solvents were evaporated under reduced pressure. The product was purified by silica gel flash column chromatography eluting with hexanes and increasing amounts of AcOEt (10-30%) to yield **19** as a white solid (4.3 g, 60%); R<sub>f</sub> (hexanes/AcOEt 70:30) = 0.41 (visualized with iodine); mp = 78-81°C, <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 4.18 (t, J = 7.0 Hz, 1H), 3.84 (s, 3H), 3.09 (d, J = 7.0 Hz, 2H) ppm; <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ 167.3, 111.7, 53.2, 34.7, 18.8 ppm; MS (ESI, negative mode): m/z 137.0 [M-H]<sup>-</sup>, M calcd for C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 138.04

*2,4-Diamino-5H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-6(7H)-one (21)*. A mixture of distilled MeOH (90 mL) and sodium (1 g, 43.5 mmol) was stirred under an Ar atmosphere until sodium was consumed. The solution was transferred to a round-bottom flask containing compound **19** (3 g, 21.7 mmol) and guanidinium hydrochloride (2.70 g, 28.3 mmol), and the mixture was refluxed for 3.5 h under an Ar atmosphere and constant stirring. The reaction mixture was allowed to cool down to room temperature and quenched with 10% aq HCl to pH ≈ 8. Solvents were removed under reduced pressure. Water (90 mL) was added to the resulting residue and **21** was isolated

by simple filtration (2.72 g, 76%); analytical HPLC (A: 0.05M TEAAc buffer, B: ACN, Kromasil 100 C18 column, 1 mL/min, linear gradient from 0 to 30% of B in 30 min):  $t_R$  = 7.9 min; mp = 296–300°C;  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz):  $\delta$  6.07 (s, 2H), 5.85 (s, 2H), 3.11 (s, 2H) ppm;  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 100 MHz):  $\delta$  176.8, 164.5, 162.6, 158.0, 83.7, 32.9 ppm; MS (ESI, positive mode):  $m/z$  166.1  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , M calcd for  $\text{C}_6\text{H}_7\text{N}_5\text{O}$  165.07

*2,4-Bis[bis(tert-butoxycarbonyl)]diamino-6-oxo-5H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidine-7-tert-butoxycarbonyl (22)*. A mixture of compound **21** (275 mg, 1.67 mmol),  $\text{Boc}_2\text{O}$  (7.5 g, 33.3 mmol), DMAP (250 mg, 5.01 mmol), TEA (1.2 mL, 8.35 mmol) and anh. ACN (4 mL) was stirred under an Ar atmosphere for a week. The reaction was quenched by addition of 5% aq  $\text{NaHCO}_3$  to pH  $\approx$  8 and ACN was evaporated under reduced pressure. The resulting material was dissolved in  $\text{Et}_2\text{O}$  (15 mL) and washed with 5% aq  $\text{NaHCO}_3$  (2  $\times$  15 mL),  $\text{H}_2\text{O}$  (1  $\times$  15 mL) and brine (10 mL). The organic layer was dried over anh.  $\text{MgSO}_4$ , filtered and  $\text{Et}_2\text{O}$  was evaporated under reduced pressure. Column chromatography eluting with either DCM and increasing amounts of MeOH (0–20%), or hexanes and increasing amounts of AcOEt (0–100%) did not allow the product to be isolated. The crude, which was shown to contain essentially **22** (ESI MS,  $^1\text{H-NMR}$ ), was used in further steps without purification; MS (ESI, positive mode):  $m/z$  666.3  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , M calcd for  $\text{C}_{31}\text{H}_{47}\text{N}_5\text{O}_{11}$  665.33.

*Methyl 2-(2,4,6-triaminopyrimidin-5-yl)acetate hydrochloride salt (23)*. Compound **21** (100 mg, 0.6 mmol) was suspended in distilled MeOH and warmed to 60°C. Fresh  $\text{HCl}_{(\text{g})}$  was fizzed for 1.5 h, while suspension of **21** disappeared and the solution became yellow. After this time, the mixture was allowed to cool down to room temperature and evaporated under reduced pressure. Pure **(23)** was obtained as a hydrochloride salt (190 mg, quantitative); MS (ESI, positive mode):  $m/z$  198.09  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 184.09  $[\text{M}-\text{Me}+\text{H}]^+$ , 138.08  $[\text{M}-\text{COOMe}+\text{H}]^+$  M calcd for  $\text{C}_7\text{H}_{11}\text{N}_5\text{O}_2$  197.09.

*2-(2,4,6-Triaminopyrimidin-5-yl)acetic acid hydrochloride salt (24)*. Compound **21** (400 mg, 2.4 mmol) was refluxed for 5 h with 7% HCl (6.4 mL, 12 mmol). When the reaction had gone to completion, as assessed by TLC monitoring, the crude was dried by solvent removal under reduced pressure. Pure **24** was obtained as hydrochloride salt (700 mg, quantitative);  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 400MHz):  $\delta$  7.49 (s, 2H), 7.35 (s, 2H), 7.23 (s, 2H), 2.41 (s, 2H) ppm; MS (ESI, positive mode):  $m/z$  184.1  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 138.1  $[\text{M}-\text{COOH}+\text{H}]^+$ , M calcd for  $\text{C}_6\text{H}_9\text{N}_5\text{O}_2$  183.08.

### 1.1.3. Synthesis of AEG PNA backbone

*N-(2-Aminoethyl)glycine (29)*.<sup>[9]</sup> Ethylenediamine (71 mL, 1.06 mol) was rapidly stirred in an ice bath while chloroacetic acid (10 g, 105.8 mmol) was added portionwise. The reaction was stirred at room temperature overnight and evaporated *in vacuo*. The resulting material was triturated with DMSO and left for one week at 0°C. The precipitate formed was filtered and washed with DMSO and finally with diethylether to yield **29** (6.1 g, 49%); mp = 150–152°C;  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400MHz):  $\delta$  3.26 (s, 2H), 3.02 (t,  $J$  = 6.2 Hz, 2H), 2.89 (t,  $J$  = 6.2 Hz, 2H) ppm;  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 100MHz):  $\delta$  177.6, 51.1, 46.0, 38.1 ppm; MS (ESI, positive mode) =  $m/z$  119.0  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 236.9  $[2\text{M}+\text{H}]^+$ , 355.1  $[3\text{M}+\text{H}]^+$ , 473.11  $[4\text{M}+\text{H}]^+$ , M calcd for  $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$  118.07.

*Benzyl N-(2-aminoethyl)glycinate tosylate salt (30)*.<sup>[10]</sup> Benzyl alcohol (10.8 mL, 103.2 mmol) was added to a suspension of **29** (677 mg, 5.7 mmol) and pTsoH (2.4 g, 13.8 mmol) in toluene (45 mL). The suspension was refluxed (135°C) for 6.5 h, and then the reaction mixture was concentrated *in vacuo*. Ether (45 mL) was added and the resulting suspension was stored at -

25°C for 15 h. **30** Was obtained as a white solid (2.8 g, 90%) after simple filtration and washing with Et<sub>2</sub>O; mp= 163-166°C; <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ 7.49 (d, *J*=7.8 Hz, 4H), 7.41 (m, 5H), 7.12 (d, *J*= 7.8 Hz, 4H), 5.26 (s, 2H), 4.16 (s, 2H), 3.17 (m, 4H), 2.29 (s, 6H) ppm; <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz): δ 166.7, 145.2, 137.8, 135.0, 128.4, 128.3, 128.2, 128.0, 125.4, 67.0, 47.1, 43.7, 35.0, 20.7 ppm; MS (ESI, positive mode): *m/z* 209.1 [M+H]<sup>+</sup>, M calcd for C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 208.12; MS (ESI, negative mode)= *m/z* 171.0 [pTsO<sup>-</sup>], M calcd for C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>S 172.02.

*Benzyl N-[(fluorenylmethoxycarbonyl)aminoethyl]glycinate hydrochloride (8)*.<sup>[10]</sup> To a mixture of **30** (2.6 g, 4.7 mmol) and Fmoc-OSu (1.8 g, 5.3 mmol) was added THF (12 mL) and the resulting suspension was cooled down to 0°C. A solution of DIEA (2.6 mL, 14.8 mmol) in THF (3.5 mL) was added dropwise over 5 min. The reaction mixture was stirred at 0°C for 2.5 h, removed from the ice bath, and stirred for a further 15 min. The reaction crude was poured into a separatory funnel containing AcOEt (50 mL) and 10% aq NaHCO<sub>3</sub> (15 mL). The organic layer was washed with 10% aq NaHCO<sub>3</sub> (15 mL), water (15 mL) and brine (2 × 15 mL), dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo*. The resulting residue was dissolved in the minimal amount of AcOEt and filtered through silica gel eluting with a solvent gradient from AcOEt to AcOEt/acetone 6:4. The solvent was removed in vacuo, the crude oil was dissolved in ether (12 mL) and cooled to 0°C. A 1:1 mixture of 4M HCl in dioxane and ether (4.8 mL) was added dropwise. The flask was kept at -25°C for 2 h, after which time the precipitate was collected by filtration and rinsed with ether to give **8** as a white solid (1.52 g, 70%); mp = 165-166°C; <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ 9.35 (br s, 2H), 7.89 (d, *J*= 7.6 Hz, 2H), 7.69 (d, *J*= 7.6 Hz, 2H), 7.53 (t, *J*= 5.6 Hz, 1H), 7.40 (m, 8H), 5.25 (s, 2H), 4.34 (d, *J*= 6.7 Hz, 2H), 4.23 (t, *J*= 6.7 Hz, 1H), 4.08 (s, 2H), 3.34 (m, 2H), 3.03 (m, 2H) ppm; <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz): δ 166.5, 156.2, 143.7, 140.7, 135.0, 128.4, 128.3, 128.2, 127.6, 127.0, 125.0, 120.1, 66.8, 65.5, 46.6, 46.5, 46.4, 36.5 ppm; MS (ESI, positive mode): *m/z* 431.2 [M+H]<sup>+</sup>, 453.2 [M+Na]<sup>+</sup>, M calcd for C<sub>26</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 430.19.

#### 1.1.4. Janus J<sub>T</sub> PNA monomer J<sub>T</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CO-PNA (J<sub>T</sub>-O-PNA)

*Ethyl 2-{2-[2,4,6-tris(bis(tert-butoxycarbonyl)amino)pyrimidin-5-yl]ethoxy}acetate (25)*. To a solution of **6** (300 mg, 0.39 mmol) in anh. DME (200 μL) was added dropwise a suspension of 60% NaH (23.6 mg, 0.59 mmol) in anh. DME (225 μL) under an Ar atmosphere. After 10 min, a solution of methyl bromoacetate (53 μL, 0.55 mmol) in anh. DME (3 mL) was added dropwise and the reaction mixture was stirred at room temperature overnight under an Ar atmosphere. The reaction was quenched by addition of 10% aq NH<sub>4</sub>Cl to pH≈ 8. The reaction mixture was diluted with AcOEt (10 mL) and washed with H<sub>2</sub>O (2 x 10 mL) and brine (10 mL). The organic layer was dried over anh. MgSO<sub>4</sub>, filtered, and solvents were evaporated under reduced pressure. The crude was purified by silica gel flash column chromatography (elution with hexanes/AcOEt mixtures, from 90:10 to 80:20) to yield **25** as a colorless foam (130 mg, 40%); R<sub>f</sub> (hexanes/AcOEt 70:30)= 0.58; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 4.46 (s, 2H), 4.19 (t, *J*= 7.4 Hz, 2H), 3.73 (s, 3H), 2.98 (t, *J*= 7.4 Hz, 2H), 1.46 (s, 9H), 1.45 (s, 9H), 1.44 (s, 18H), 1.43 (s, 18H) ppm; MALDI-TOF MS: *m/z* 843.19 [M+H]<sup>+</sup>, 865.18 [M+Na]<sup>+</sup>, 881.18 [M+K]<sup>+</sup>, 743.02 [M-Boc+H]<sup>+</sup>, 765.02 [M-Boc+Na]<sup>+</sup>, M calcd for C<sub>39</sub>H<sub>63</sub>N<sub>5</sub>O<sub>15</sub> 841.43.

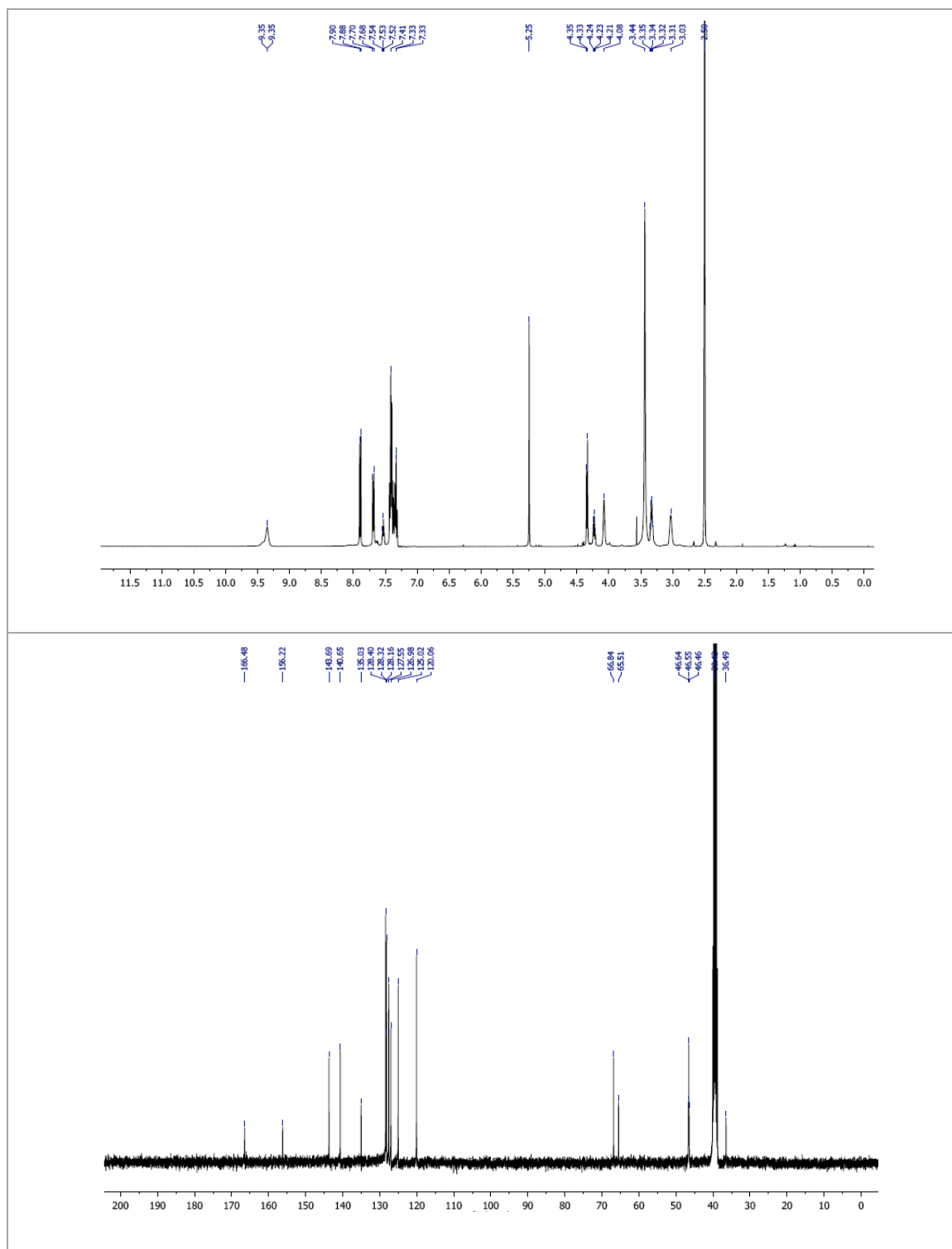


Figure E.2.  $^1\text{H-NMR}$  (top) and  $^{13}\text{C-NMR}$  (bottom) spectra of compound FmocNH-AEG-NH<sub>2</sub> (**8**).

*Benzyl 2-(2-(2,4,6-tris(bis(tert-butoxycarbonyl)amino)pyrimidin-5-yl)ethoxy)acetate* (**26**). A solution of **6** (1.2 g, 1.55 mmol) in anh. DME (20 mL) was cooled in an ice-bath. Then, a suspension of 60% NaH (81 mg, 2.02 mmol) in anh. DME (2 mL) was added dropwise under an Ar atmosphere. After 10 min, a solution of benzyl bromoacetate (344  $\mu\text{L}$ , 2.17 mmol) in anh. DME (2 mL) was added dropwise and the reaction mixture was warmed up to room temperature and stirred overnight. The reaction was quenched by addition of 10% aq  $\text{NH}_4\text{Cl}$  to

pH $\approx$  8. The reaction mixture was diluted with AcOEt (16 mL) and washed with H<sub>2</sub>O (3  $\times$  16 mL) and brine (10 mL). The organic layer was dried over anh. MgSO<sub>4</sub>, filtered, and solvents were evaporated under reduced pressure. The crude was purified by silica gel flash column chromatography (elution with hexanes/AcOEt mixtures, from 95:5 to 80:20) to yield **26** as a colorless foam (1.42 g, 80%); R<sub>f</sub> (hexanes/AcOEt 70:30)= 0.69; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz):  $\delta$  7.38 (m, 5H), 5.18 (s, 2H), 4.48 (s, 2H), 4.18 (t, *J*= 7.4 Hz, 2H), 2.97 (t, *J*= 7.4 Hz, 2H), 1.46 (s, 9H), 1.44 (s, 18H), 1.41 (s, 18H), 1.40 (s, 9H) ppm; MS (ESI, positive mode): *m/z* 918.35 [M+H]<sup>+</sup>, 940.32 [M+Na]<sup>+</sup>, 956.29 [M+K]<sup>+</sup>, M calcd for C<sub>45</sub>H<sub>67</sub>N<sub>5</sub>O<sub>15</sub> 917.46.

*2-{2-[2,4,6-Tris(bis(tert-butoxycarbonyl)amino)pyrimidin-5-yl]ethoxy}acetic acid (27)*. Two methodologies were tuned up to obtain compound (**27**):

From **25**: Compound **25** (130 mg, 0.15 mmol) and LiOH $\cdot$ 2H<sub>2</sub>O (7.2 mg, 0.17 mmol) were dissolved in a mixture of H<sub>2</sub>O and THF (1.4 mL and 5 mL, respectively). The reaction mixture was stirred at room temperature for 1 day. Then, the solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was dissolved in water (10 mL). The solution was acidified with 10% aq HCl with constant stirring to pH=3, and a precipitate was formed. The aqueous layer was extracted with AcOEt (3  $\times$  10 mL) and the combined organic layers were washed with brine (5 mL), dried over anh. MgSO<sub>4</sub>, filtered, and the solvent was removed under reduced pressure to yield **27** as a white foam (96.3 mg, 78%).

From **26**: Compound **26** (1g, 1.09 mmol) was dissolved in MeOH and purged with Ar<sub>(g)</sub>. Then, Pd/C (160 mg) was added and the solution was saturated with H<sub>2(g)</sub> by slow bubbling over 30 min. The reaction was filtered through a short pad of Celite<sup>®</sup> and the solvent was removed under vacuum to give the title compound as a white foam (900 mg, quantitative).

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  12.9 (s, 1H), 4.42 (s, 2H), 4.13 (t, *J*= 6.2 Hz, 2H), 2.82 (t, *J*= 6.2 Hz, 2H), 1.45 (s, 18H), 1.44 (s, 36H) ppm; <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  170.4, 163.8, 162.1, 153.0, 149.9, 149.6, 123.2, 113.3, 84.5, 83.1, 83.7, 64.1, 27.7, 27.6, 26.4 ppm; MALDI-TOF MS: *m/z* 829.29 [M+H]<sup>+</sup>, 851.28 [M+Na]<sup>+</sup>, 867.26 [M+K]<sup>+</sup>; MS (ESI, positive mode): *m/z* 828.35 [M+H]<sup>+</sup>, 850.33 [M+Na]<sup>+</sup>, 866.31 [M+K]<sup>+</sup>, M calcd for C<sub>38</sub>H<sub>61</sub>N<sub>5</sub>O<sub>15</sub> 827.42

*Benzyl 2-(N-(2-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonylamino)ethyl)-2-(2-(2,4,6-tris(bis(tert-butoxycarbonyl)amino)pyrimidin-5-yl)ethoxy)acetamido)acetate (28)*. To an ice-cooled solution of **27** (450 mg, 0.54 mmol), EDC (177 mg, 0.61 mmol) and HOBt (47 mg, 0.30 mmol) in DCM (2 mL), compound **8** (282 mg, 0.61 mmol) dissolved in DCM (2 mL) was added. The reaction mixture was stirred in an ice bath for 15 min and at room temperature for 15 h. The reaction mixture was diluted in DCM (50 mL) and 5% aq NaHCO<sub>3</sub> (50 mL) was added. The two phases were separated. The organic layer was washed with 5% aq NaHCO<sub>3</sub> (2  $\times$  50 mL) and water (25 mL) and dried over anh. MgSO<sub>4</sub>, filtered, and the solvent was evaporated under reduced pressure. The crude was purified by silica gel flash column chromatography (elution with hexanes/AcOEt mixtures, from 90:10 to 50:50) to yield **28** as a colorless foam (458 mg, 68%); R<sub>f</sub> (hexanes/AcOEt 60:40)= 0.34; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  7.74 (d, *J*= 7.2 Hz, 2H), 7.59 (d, *J*= 7.2 Hz, 2H), 7.35 (m, 9H), 5.51 (br t, 1H), 5.16 (s, 2H), 5.10 (s, 2H), 4.52 (d, *J*= 5.6 Hz, 2H), 4.38 (br t, 1H), 4.22 (s, 2H), 3.48-2.98 (m, 8H), 1.43 (bs, 54H) ppm; MS (ESI, positive mode): *m/z* 1240.52 [M+H]<sup>+</sup>, 1262.48 [M+Na]<sup>+</sup>, M calcd for C<sub>64</sub>H<sub>85</sub>N<sub>7</sub>O<sub>18</sub> 1239.59.

### 1.1.5. Janus J<sub>T</sub> PNA monomer with two methylene groups: Synthesis of J<sub>T</sub>-PNA<sup>[11]</sup>

**2-(3-Bromopropoxy)tetrahydro-2H-pyran (31).** 3-bromo-1-propanol (3 g, 21.6 mmol) was chilled in an ice bath and DHP (2.3 mL, 23.7 mmol) was added dropwise. 12 M HCl (1 drop) was added, and the reaction mixture was stirred at room temperature for 4 h. The reaction was quenched with solid Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (300 mg), and the solid was filtered and washed with DCM (10 mL). The filtrate was evaporated under reduced pressure, affording **31** as a colorless oil (3.6 g, 75%); R<sub>f</sub> (hexanes/AcOEt 90:10) = 0.47; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 4.61 (t, *J* = 3.5 Hz, 1H), 3.86 (m, 2H), 3.54 (m, 4H), 2.14 (m, 2H), 1.90-1.55 (m, 6H) ppm; <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ 98.91, 64.89, 62.27, 32.91, 30.67, 30.60, 25.41, 19.49 ppm; MS (ESI, negative mode): *m/z* 222.8 [M-H]<sup>-</sup>, 143.1 [M-Br]<sup>-</sup>, M calcd for C<sub>8</sub>H<sub>15</sub>BrO<sub>2</sub> 222.03.

**2-[3-(Tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)propyl]malononitrile (32).** A solution of malononitrile (1.35 g, 20.3 mmol) in anh. DME (9.5 mL) was added dropwise to a suspension of 60% NaH (810 mg, 20.3 mmol) in anh. DME (7.5 mL) under an Ar atmosphere. After 10 min, a solution of **31** (3 g, 13.5 mmol) in anh. DME (3 mL) was added dropwise and the reaction mixture was stirred at room temperature overnight under an Ar atmosphere. The reaction was quenched with 5% aq NH<sub>4</sub>Cl to pH ≈ 8. The reaction mixture was diluted with AcOEt (40 mL) and washed with H<sub>2</sub>O (3 × 40 mL) and brine (40 mL). The organic layer was dried over anh. MgSO<sub>4</sub>, filtered, and solvents were removed under reduced pressure. The crude was purified by silica gel flash column eluting with hexanes/AcOEt mixtures (from 90:10 to 80:20) to yield a colorless oil **32** (1.86 g, 66%); R<sub>f</sub> (hexanes/AcOEt 70:30) = 0.48; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 4.55 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H), 4.03 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 3.83 (m, 2H), 3.53 (m, 2H), 2.21 (m, 2H), 1.93-1.55 (m, 8H) ppm; <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ 112.8, 99.3, 65.9, 62.9, 35.1, 29.0, 26.3, 25.3, 22.3, 19.6 ppm; MS (ESI, positive mode): *m/z* 209.1 [M+H]<sup>+</sup>, M calcd for C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 208.12.

**5-[3-(Tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)propyl]pyrimidine-2,4,6-triamine (33).** Distilled EtOH (30 mL) and sodium (333 mg, 14.5 mmol) were stirred under an Ar atmosphere until sodium was consumed. The solution was transferred to a flask containing compound **32** (1.5 g, 7.20 mmol) and guanidinium hydrochloride (825 mg, 8.7 mmol), and the reaction mixture was refluxed for 5 h under an Ar atmosphere with constant stirring. The reaction was allowed to cool down to room temperature and quenched with 1 M aq HCl to pH ≈ 8. Solvents were evaporated under reduced pressure and the resulting crude was purified by silica gel flash column chromatography, eluting with DCM and increasing amounts of MeOH (from 0 to 10%), in the presence of 2% TEA. Finally, **33** was obtained as a light yellow solid (1.33 g, 69%); R<sub>f</sub> (DMC/MeOH 90:10 + 2%TEA) = 0.54; mp = 164-167°C; <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ 5.88 (s, 4H), 5.76 (s, 2H), 4.52 (t, *J* = 4.4 Hz, 1H), 3.68 (m, 2H), 3.39 (m, 2H), 2.23 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.70-1.45 (m, 8H) ppm; <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz): δ 160.1, 157.2, 98.2, 84.3, 66.2, 61.5, 30.4, 27.7, 24.9, 19.3, 18.6 ppm; MS (ESI, positive mode): *m/z* 268.18 [M+H]<sup>+</sup>, 184.12 [M-THP+H]<sup>+</sup>, M calcd for C<sub>12</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub> 267.17.

**5-[2-(Tetrahydro-2H-pyran-2-yloxi)propyl]-2,4,6-hexakis(tert-butoxycarbonyl)triaminopyrimidine (34).** A mixture of compound **33** (2.5 g, 9.36 mmol), Boc<sub>2</sub>O (24.5 g, 112.3 mmol), DMAP (800 mg, 6.55 mmol), TEA (10.5 mL, 74.9 mmol) and anh. THF (200 mL) was stirred under an Ar atmosphere for 20-25 h. The reaction was quenched with 5% aq NaHCO<sub>3</sub> (6.5 mL) and THF was



evaporated under reduced pressure. The resulting material was dissolved in Et<sub>2</sub>O (150 mL) and washed with 5% aq NaHCO<sub>3</sub> (2 × 100 mL), H<sub>2</sub>O (1 × 100 mL) and brine (50 mL). The organic layer was dried over anh. MgSO<sub>4</sub>, filtered and taken to dryness. Silica gel flash column chromatography eluting with hexanes, and increasing the polarity with AcOEt (0 to 20%), afforded **34** as a white foam (4.87 g, 60%); R<sub>f</sub> (hexanes/AcOEt 80:20)= 0.60; mp= 102-104°C; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 4.60 (t, *J*= 3.6 Hz, 1H), 3.78 (m, 2H), 3.46 (m, 2H), 2.57 (m, 2H), 1.84-1.50 (m, 8H), 1.44 (s, 18H), 1.43 (s, 36H) ppm; <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ 161.7, 155.9, 150.5, 149.9, 128.1, 98.4, 83.9, 83.3, 66.4, 60.4, 30.6, 27.9, 27.8, 27.7, 25.5, 23.5, 19.3 ppm; MS (CI, NH<sub>3</sub>, positive mode): *m/z* 868.6 [M+H]<sup>+</sup>, 768.7 [M-Boc+H]<sup>+</sup>, M calcd for C<sub>42</sub>H<sub>69</sub>N<sub>5</sub>O<sub>14</sub> 867.48.

**5-(3-Hydroxyprop-1-yl)-2,4,6-hexakis(tert-butoxycarbonyl)triaminopyrimidine (35)**. A suspension of compound **34** (1.6 g, 1.84 mmol) and pTsoH (30 mg, 0.16 mmol) in MeOH (60 mL) was stirred for 6 h under an Ar atmosphere at room temperature. The reaction was quenched with 5% aq NaHCO<sub>3</sub> (1.7 mL) and the solvents were evaporated under reduced pressure. The resulting solid material was dissolved in Et<sub>2</sub>O (60 mL) and washed with 5% aq NaHCO<sub>3</sub> (5 × 60 mL), H<sub>2</sub>O (1 × 60 mL) and brine (60 mL). The organic layer was dried over anh. MgSO<sub>4</sub>, filtered, and the solvent was removed in vacuo to yield **35** as a white foam (1.4 g, 98%); R<sub>f</sub> (hexanes/AcOEt 70:30)= 0.23; mp= 140-143°C; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 3.57 (t, *J*= 6.0 Hz, 2H), 2.61 (t, *J*= 7.6 Hz, 2H), 1.85 (m, 2H), 1.45 (s, 18H), 1.43 (s, 36H) ppm; <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ 161.8, 156.1, 150.6, 150.3, 127.6, 84.3, 83.5, 61.6, 30.4, 27.9, 27.8, 22.8 ppm; MS (ESI, positive mode): *m/z* 784.4 [M+H]<sup>+</sup>, 806.4 [M+Na]<sup>+</sup>, M calcd for C<sub>37</sub>H<sub>61</sub>N<sub>5</sub>O<sub>13</sub> 783.43.

**3-{2,4,6-Tris[bis(tert-butoxycarbonyl)amino]pyrimidin-5-yl}propanoic acid (36)**. Compound **35** (500 mg, 0.63 mmol), TEMPO (12.8 mg, 0.08 mmol), 15 mL of ACN and 10 mL of sodium phosphate buffer (pH 5.8-6.0)<sup>1</sup> were introduced in a 50 mL round-bottom flask. A 2 M solution of NaClO<sub>2</sub> (500 μL, 1.26 mmol) was added followed by a solution of NaClO (500 μL)<sup>2</sup>. The resulting mixture was stirred at 35°C for 70 h. When the reaction was completed, as assessed by TLC analysis, the mixture was cooled down to 25°C and 25 mL of water was added. The pH was adjusted to 8.0 by addition of 2 M NaOH. The resulting solution was poured onto an ice-cold 0.48 M sodium sulfite solution (16 mL) and stirred for 30 min keeping the temperature below 20°C with an ice-water bath. After this, Et<sub>2</sub>O (16 mL) was added and stirring was continued for an additional 15 min. The organic layer was separated and the aqueous layer was extracted with Et<sub>2</sub>O (2 × 20 mL). The combined organic phases were washed with brine (15 mL), dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated under reduced pressure to yield **36** as a white foam (448 mg, 88%); R<sub>f</sub> (hexanes/AcOEt 70:30 + 2%AcOH)= 0.16; mp > 300°C; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 2.85 (t, *J*= 9.2 Hz, 2H), 2.34 (t, *J*= 9.2 Hz, 2H), 1.46 (s, 18H), 1.42 (s, 36H) ppm; <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100MHz): δ 161.0, 155.5, 150.7, 150.6, 150.4, 129.8, 84.5, 83.2, 28.1, 27.8, 27.7, 27.6 ppm; MS (ESI, positive mode): *m/z* 798.42 [M+H]<sup>+</sup>, 820.40 [M+Na]<sup>+</sup>; HR MS (ESI, negative mode): *m/z* 796.3974 [M-H]<sup>-</sup>, 696.3444 [M-Boc-H]<sup>-</sup>, 1593.8018 [2M-H]<sup>-</sup>, M calcd for C<sub>37</sub>H<sub>59</sub>N<sub>5</sub>O<sub>14</sub> 797.4059.

<sup>1</sup>The buffer was a 2:1 mixture of 0.67 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 0.67 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; <sup>2</sup>solution prepared by dissolving 2 mL of bleach in 18 mL of water.

*Benzyl 2-(N-(2-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonylamino)ethyl)-3-(2,4,6-tris(bis(tert-butoxy-carbonyl)amino)pyrimidin-5-yl)propanamido)acetate (37)*. To an ice-cooled solution of **36** (563 mg, 0.71 mmol), EDC (209 mg, 1.07 mmol) and HOBt (56 mg, 0.36 mmol) in DCM (3 mL), a solution of compound **8** (331mg, 0.71 mmol) in DCM (3 mL) was added. The reaction was stirred in an ice bath for 15 min and at room temperature for 15 h. The mixture was diluted in DCM (25 mL), 5% aq NaHCO<sub>3</sub> (25mL) was added, and the two phases were separated. The organic layer was washed with 5% aq NaHCO<sub>3</sub> (2 × 25mL) and water (25 mL), dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, filtered, and the solvent was evaporated under reduced pressure. The crude was purified by silica gel flash column chromatography (elution with DCM/MeOH mixtures from 100:0 to 98:2) to yield **37** as a colorless foam (475 mg, 55%); R<sub>f</sub> (hexanes/AcOEt 60:40)= 0.36; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ (two rotamers) 7.75 (d, *J*= 7.2 Hz, 2H), 7.61 (d, *J*= 7.2 Hz, 2H), 7.40-7.26 (m, 9H), 5.89 and 5.44 (rotamers, t, *J*= 5.6 Hz, 1H), 5.18 and 5.16 (rotamers, s, 2H), 4.35 (d, *J*= 6.8 Hz, 2H), 4.19 (m, 1H), 4.08 and 4.04 (rotamers, s, 2H), 3.53-3.37 (m, 4H), 2.89-2.50 (m, 4H), 1.45 and 1.42 (s, 54H) ppm; <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ 169.6, 161.7, 160.1, 156.4, 156.1, 148.7, 148.6, 143.6, 141.2, 128.6, 128.3, 127.7, 127.2, 124.7, 124.5, 119.8, 109.9, 84.2, 83.6, 67.8, 67.2, 50.4, 48.9, 47.2, 39.5, 29.7, 27.9, 27.8, 19.1 ppm; MS (ESI, positive mode): *m/z* 1210.62 [M+H]<sup>+</sup>, 1232.51 [M+Na]<sup>+</sup>, M calcd for C<sub>63</sub>H<sub>83</sub>N<sub>7</sub>O<sub>17</sub> 1209.58.

*Benzyl N-(2-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)ethyl)-N-(3-(2,4,6-tris(bis(tert-butoxy-carbonyl)amino)pyrimidin-5-yl)propanoyl)glycinate (38)*. Compound **37** (518 mg, 0.43 mmol) was dissolved in MeOH and purged with Ar<sub>(g)</sub>. Pd/C (10%, 100 mg) was added and the reaction vessel was saturated with H<sub>2(g)</sub> by slow bubbling over 40 min. When the reaction was finished, as assessed by TLC, the suspension was filtered through a short pad of Celite® and the solvent was removed in vacuum to give the title compound as a white foam (480 mg, quantitative); <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ (two rotamers) 7.74 (d, *J*= 7.2 Hz, 2H), 7.59 (d, *J*= 7.2 Hz, 2H), 7.49-7.29 (m, 4H), 5.89 and 5.44 (rotamers, bt, 1H), 4.35 (d, *J*= 6.8 Hz, 2H), 4.19 (m, 1H), 4.08 and 4.02 (rotamers, s, 2H), 3.55-3.37 (m, 4H), 2.87-2.50 (m, 4H), 1.45 and 1.43 (s, 54H) ppm; <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ 172.7, 161.9, 156.7, 156.1, 150.7, 150.3, 144.1, 141.2, 127.6, 127.1, 125.3, 119.9, 84.7, 83.5, 66.7, 53.4, 48.6, 47.2, 39.6 and 38.2 (rotamers), 31.9 and 30.9 (rotamers), 30.3 and 29.7 (rotamers), 27.8, 27.7 ppm; MS (ESI, negative mode): *m/z* 1118.25 [M-H]<sup>-</sup>, 1154.28 [M+Cl-H]<sup>-</sup>, 561.01 [2M-2H]<sup>2-</sup>/2, MS (ESI, positive mode): *m/z* 1142.26 [M+Na]<sup>+</sup>; HR MS (ESI, negative mode): *m/z* 1118.5275 [M-H]<sup>-</sup>, 2239.0652 [2M-H]<sup>-</sup>, M calcd for C<sub>56</sub>H<sub>77</sub>N<sub>7</sub>O<sub>17</sub> 1119.5376.

## 1.2. Janus J<sub>b</sub> PNA monomer<sup>[12]</sup>

*Methyl 2-(2,4-diamino-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-5-yl)acetate (39a)*. Methyl bromoacetate (4.7 mL, 49.4 mmol) was added to a suspension of 2,6-diaminopyrimidine-4(3H)-one (5 g, 38 mmol) and sodium bicarbonate (4.15 g, 49.4 mmol) in 60 mL of DMF. The mixture was stirred at room temperature for 5 days, and then taken to dryness on a rotary evaporator. The residue was poured onto 60 mL of hot water (90°C) and chilled for 2 h at 0°C. The precipitate was filtered to yield **39a** as a yellow solid (6 g, 81%). If the NMR spectrum still showed DMF signals, DMF was eliminated by washing the solid with MeOH or water and filtering again the suspension. R<sub>f</sub> (DCM/MeOH 90:10 + 2% TEA)= 0.19; analytical HPLC (A: 0.05M TEAAc buffer, B: ACN, Kromasil 100 C18 column, 1 mL/min, linear gradient from 0 to 20% of B in 30 min): t<sub>R</sub>= 8.3

min; mp= 267-269°C;  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ , 400 MHz):  $\delta$  9.93 (1s, H), 6.08 (s, 2H), 5.82 (s, 2H), 3.53 (s, 3H), 3.19 (s, 2H) ppm;  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ , 100 MHz):  $\delta$  172.3, 162.3, 162.2, 153.4, 51.1, 23.4 ppm; MS (ESI, positive mode)=  $m/z$  199.1  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 221.1  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 419.1  $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ , M calcd for  $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_3$  198.08.

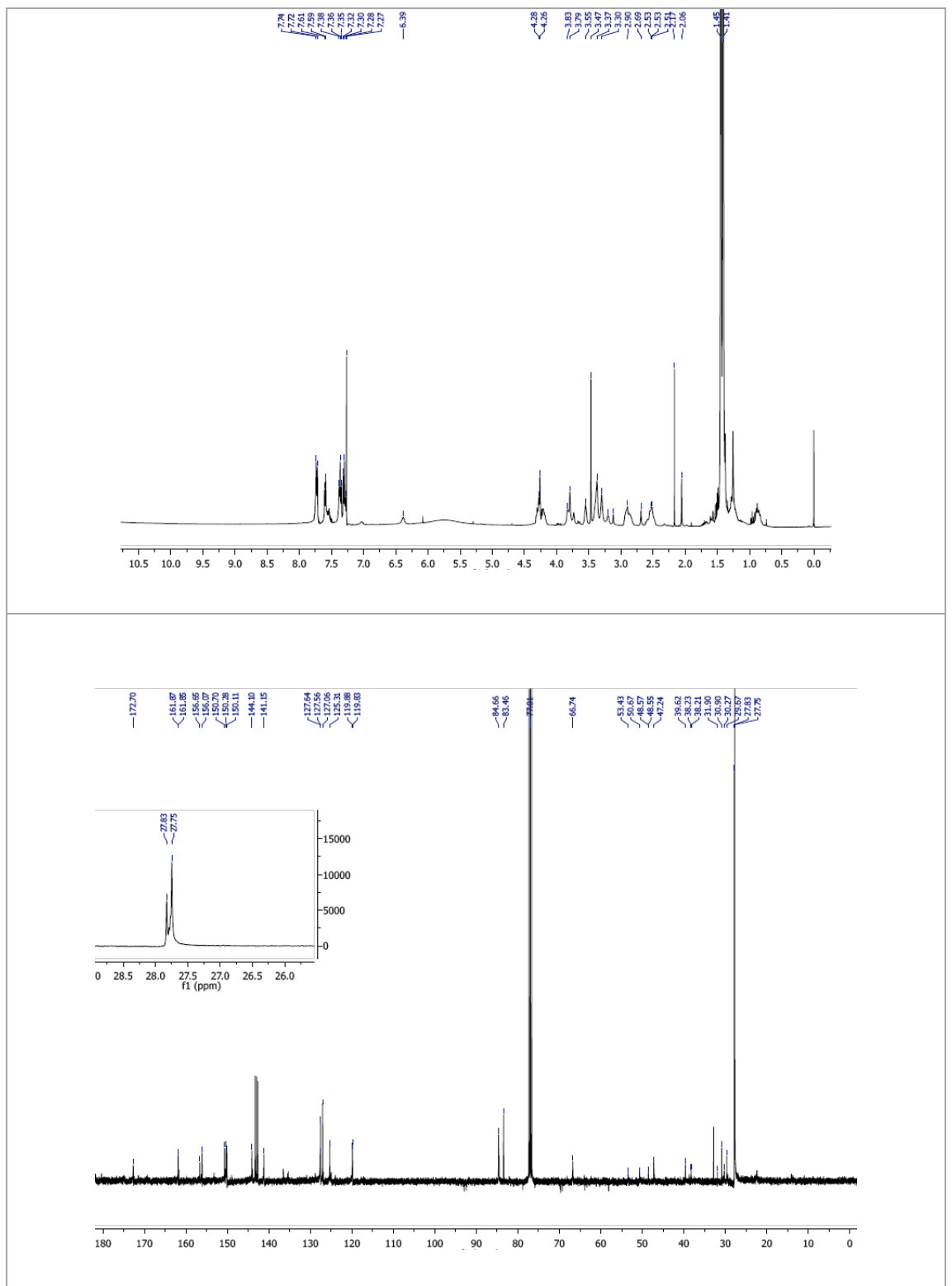


Figure E.3.  $^1\text{H-NMR}$  (top) and  $^{13}\text{C-NMR}$  (bottom) spectra of J<sub>7</sub> PNA monomer 38.

*Methyl 2-(2,4-bis[bis(tert-butoxycarbonyl)amino]-6-tert-butoxypyrimidin-5-yl)acetate (41a)*. A mixture of compound **39a** (1.5 g, 7.6 mmol), Boc<sub>2</sub>O (17 g, 76 mmol), DMAP (278 mg, 2.3 mmol), pyridine (4 mL) and DMF<sub>anh</sub> (24 mL) was stirred under an Ar atmosphere for 24 h. After this time, the mixture was evaporated under reduced pressure. The resulting material was dissolved in DCM (80 mL) and washed with water (2 x 80 mL) and brine (50 mL). The organic layer was dried over anh. MgSO<sub>4</sub>, filtered, and DCM was evaporated under reduced pressure. Silica gel flash column chromatography eluting with hexanes and increasing the polarity with AcOEt (5 to 20%) afforded **41a** as white foam (2.19 g, 44%); R<sub>f</sub> (hexanes/AcOEt 70:30)= 0.54; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 3.64 (s, 3H), 3.44 (s, 2H), 1.56 (s, 9H), 1.41 (s, 18H), 1.40 (s, 18H) ppm; <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ 169.9, 169.5, 158.4, 155.1, 150.3, 149.9, 112.3, 83.8, 83.6, 83.0, 51.8, 30.74, 28.0, 27.8, 27.7 ppm; MS (ESI, positive mode)= *m/z* 655.4 [M+H]<sup>+</sup>, 677.3 [M+Na]<sup>+</sup>, 1331.7 [2M+Na]<sup>+</sup>, M calcd for C<sub>31</sub>H<sub>50</sub>N<sub>4</sub>O<sub>11</sub> 654.35.

*Benzyl 2-(2,4-diamino-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-5-yl)acetate (39b)*. Benzyl bromoacetate (18.7 mL, 118.9 mmol) was added to a suspension of 2,6-diaminopyrimidine-4(3H)-one (10 g, 79.3 mmol) and sodium bicarbonate (8.7 g, 103.1 mmol) in DMF (125 mL). The mixture was stirred at room temperature for 4 days, and then evaporated to dryness in a rotary evaporator. The residue was poured onto 90 mL of MeOH and the precipitate was filtered to yield **39b** as a pale yellow solid (16.9 g, 78%). If the NMR spectrum showed DMF signals, DMF was eliminated by washing the solid with MeOH or water and filtering again the suspension. R<sub>f</sub> (DCM/MeOH 90:10 + 2% TEA)= 0.48; <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ 9.89 (s, 1H), 7.36-7.35 (m, 5H), 6.03 (s, 2H), 5.86 (s, 2H), 5.05 (s, 2H), 3.27 (s, 2H) ppm; <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz): δ 172.5, 163.2, 163.0, 154.2, 137.2, 129.0, 128.4, 128.3, 82.1, 65.8, 29.3 ppm; MS (ESI, positive mode)= *m/z* 275.2 [M+H]<sup>+</sup>, 296.7 [M+Na]<sup>+</sup>, 570.9 [2M+Na]<sup>+</sup>, M calcd for C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub> 274.10.

*Benzyl 2-(2,4-bis[bis(tert-butoxycarbonyl)amino]-6-tert-butoxypyrimidin-5-yl)acetate (43b)*. A mixture of compound **39b** (4.0 g, 14.6 mmol), Boc<sub>2</sub>O (26 g, 116.8 mmol), DMAP (532 mg, 4.4 mmol), pyridine (11.2 mL) and anh. DMF (65 mL) was stirred under an Ar atmosphere for 24 h. After this, solvents were evaporated under reduced pressure. The resulting material was dissolved in DCM (200 mL) and washed with H<sub>2</sub>O (2 x 150 mL) and brine (100 mL). The organic layer was dried over anh. MgSO<sub>4</sub>, filtered and DCM was evaporated under reduced pressure. Silica gel flash column chromatography eluting with hexanes and increasing the polarity with AcOEt (5 to 20%) afforded **43b** as a yellow foam (5.68 g, 54%); R<sub>f</sub> (hexanes/AcOEt 70:30)= 0.76; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 7.32 (m, 5H), 5.11 (s, 2H), 3.50 (s, 2H), 1.52 (s, 9H), 1.42 (s, 18H), 1.40 (s, 18H) ppm; <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ 169.9, 168.8, 158.5, 155.1, 150.3, 149.9, 135.6, 128.5, 128.3, 112.2, 83.9, 83.6, 83.0, 66.6, 31.0, 28.0, 27.9, 27.8 ppm; MS (ESI, positive mode)= *m/z* 731.20 [M+H]<sup>+</sup>, 753.20 [M+Na]<sup>+</sup>, 1483.5 [2M+Na]<sup>+</sup>, M calcd for C<sub>37</sub>H<sub>54</sub>N<sub>4</sub>O<sub>11</sub> 730.38.

*2-(2,4-Bis[bis(tert-butoxycarbonyl)amino]-6-tert-butoxypyrimidin-5-yl)acetic acid (45)*. Compound **43b** (1.7g, 2.33 mmol) was dissolved in MeOH (100mL) and purged with Ar<sub>(g)</sub>. Then, Pd/C (370 mg) was added and the reaction vessel saturated with H<sub>2(g)</sub> by slow bubbling over 8 h. The reaction mixture was filtered through a short pad of Celite® and the solvent was removed in vacuo. The residue was dissolved in AcOEt (50 mL), washed with 10% aq ammonium acetate (2

× 70 mL), water (1 × 100 mL) and brine (50 mL), dried over anh. MgSO<sub>4</sub> and filtered. The solvent was evaporated to give the title compound as a white foam (1.41 g, quantitative yield); <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 3.47 (s, 2H), 1.58 (s, 9H), 1.42 (s, 18H), 1.41 (s, 18H) ppm; <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ 173.7, 170.4, 157.9, 154.9, 150.8, 150.7, 83.3, 84.3, 84.0, 114.2, 32.2, 27.9, 28.0, 28.2 ppm; MS (ESI, positive mode): *m/z* 641.07 [M+H]<sup>+</sup>, 663.11 [M+Na]<sup>+</sup>, 1303.37 [2M+Na]<sup>+</sup>; HR MS (ESI, negative mode): *m/z* 639.3215 [M-H]<sup>-</sup>, 595.333 [M-COOH-H]<sup>-</sup>, 753.3161 [M+TFA-H]<sup>-</sup>, 1279.6560 [2M-H]<sup>-</sup>, M calcd for C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>N<sub>4</sub>O<sub>11</sub> 640.3320, [M+TFA-H]<sup>-</sup> calcd for C<sub>32</sub>H<sub>48</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>13</sub> 753.3175.

*Benzyl 2-(N-(2-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)ethyl)-2-(2,4-bis(bis(tert-butoxycarbonyl)amino)-6-(tert-butoxy)pyrimidin-5-yl)acetamido)acetate (47)*. To an ice-cooled solution of **45** (765 mg, 1.20 mmol), EDC (365 mg, 1.88 mmol) and HOBt (98 mg, 0.63 mmol) in DCM (3 mL), compound **(8)** (536 mg, 1.25 mmol) in DCM (3 mL) was added. The mixture was stirred in an ice bath for 15 min and at room temperature for 24 h. The mixture was diluted in DCM (35 mL) and 5% aq NaHCO<sub>3</sub> (35 mL), and the two phases were separated. The organic layer was washed with 5% aq NaHCO<sub>3</sub> (2 × 35 mL) and water (30 mL), dried over anh. MgSO<sub>4</sub>, filtered, and the solvent was evaporated under reduced pressure. The crude was purified by silica gel flash column chromatography (elution with hexanes/AcOEt mixtures, from 90:10 to 60:40) to yield **47** as a colorless foam (567 mg, 45%); R<sub>f</sub> (hexanes/AcOEt 70:30) = 0.22; analytical HPLC (A: 0.05 M TEAAc buffer, B: ACN, Kromasil 100 C18 column, 1 mL/min, linear gradient from 70 to 100% of B in 30 min): t<sub>R</sub> = 27.9 min; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ (two rotamers) 7.75 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.59 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.38-7.27 (m, 9H), 5.89 and 5.44 (rotamers, br t, 1H), 5.21 and 5.18 (rotamers, s, 2H), 4.38 and 4.34 (rotamers, d, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.21 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H), 4.05 (s, 2H), 3.58 (s, 2H), 3.47-3.29 (m, 4H), 1.56 (s, 9H), 1.44 and 1.42 (s, 36H) ppm; <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ 170.3, 169.5, 168.8, 158.7, 156.7, 155.3, 150.5, 150.4, 144.1, 141.5, 128.7, 128.6, 128.4, 128.2, 127.7, 127.0, 125.1, 83.9, 83.7, 83.0, 67.7, 67.1, 49.44, 49.1, 47.2, 39.6, 28.1, 28.0, 27.8, 27.7 ppm; MS (ESI, positive mode) = *m/z* 1053.32 [M+H]<sup>+</sup>, 1075.34 [M+Na]<sup>+</sup>, M calcd for C<sub>37</sub>H<sub>54</sub>N<sub>4</sub>O<sub>11</sub> 1052.51.

*2-(N-(2-(((9H-Fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)ethyl)-2-(2,4-bis(bis(tert-butoxycarbonyl)amino)-6-(tert-butoxy)pyrimidin-5-yl)acetamido)acetic acid (49)*. Compound **47** (350 mg, 0.30 mmol) was dissolved in MeOH (21 mL) and purged with Ar<sub>(g)</sub>. Then, Pd/C (60 mg) was added and the reaction vessel was saturated with H<sub>2(g)</sub> by slow bubbling over 30 min. The mixture was filtered through a short pad of Celite® and the solvent was removed in vacuo to give the title compound as a white foam (290 mg, 90%); analytical HPLC (A: 0.05 M TEAAc buffer, B: ACN, Kromasil 100 C18 column, 1 mL/min, linear gradient from 30 to 100% of B in 30 min): t<sub>R</sub> = 24.4 min <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ (two rotamers) 7.75 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.57 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.38 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.29 (m, 2H), 5.75 and 5.69 (rotamers, br t, 1H), 4.36 and 4.32 (rotamers, d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 4.19 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 4.10 (s, 2H), 3.60 (s, 2H), 3.49-3.28 (m, 4H), 1.56 (s, 9H), 1.45 and 1.42 (s, 36H) ppm; <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ 170.3, 169.8, 169.0, 158.5, 156.6, 155.1, 150.6, 150.4, 150.3, 143.8, 141.2, 127.7, 127.1, 125.1, 84.1, 83.1, 83.0, 66.9, 49.5, 49.4, 47.2, 39.4, 28.1, 28.0, 27.9, 27.8, 27.7 ppm; MS (ESI, positive mode) = *m/z* 963.27 [M+H]<sup>+</sup>, 985.25 [M+Na]<sup>+</sup>; MS (ESI, negative mode) = *m/z* 961.35 [M-H]<sup>-</sup>, HR MS (ESI, negative mode) 961.4537 [M-H]<sup>-</sup>, 1924.9241 [2M-H]<sup>-</sup>, M calcd for C<sub>49</sub>H<sub>66</sub>N<sub>6</sub>O<sub>14</sub> 962.4637.

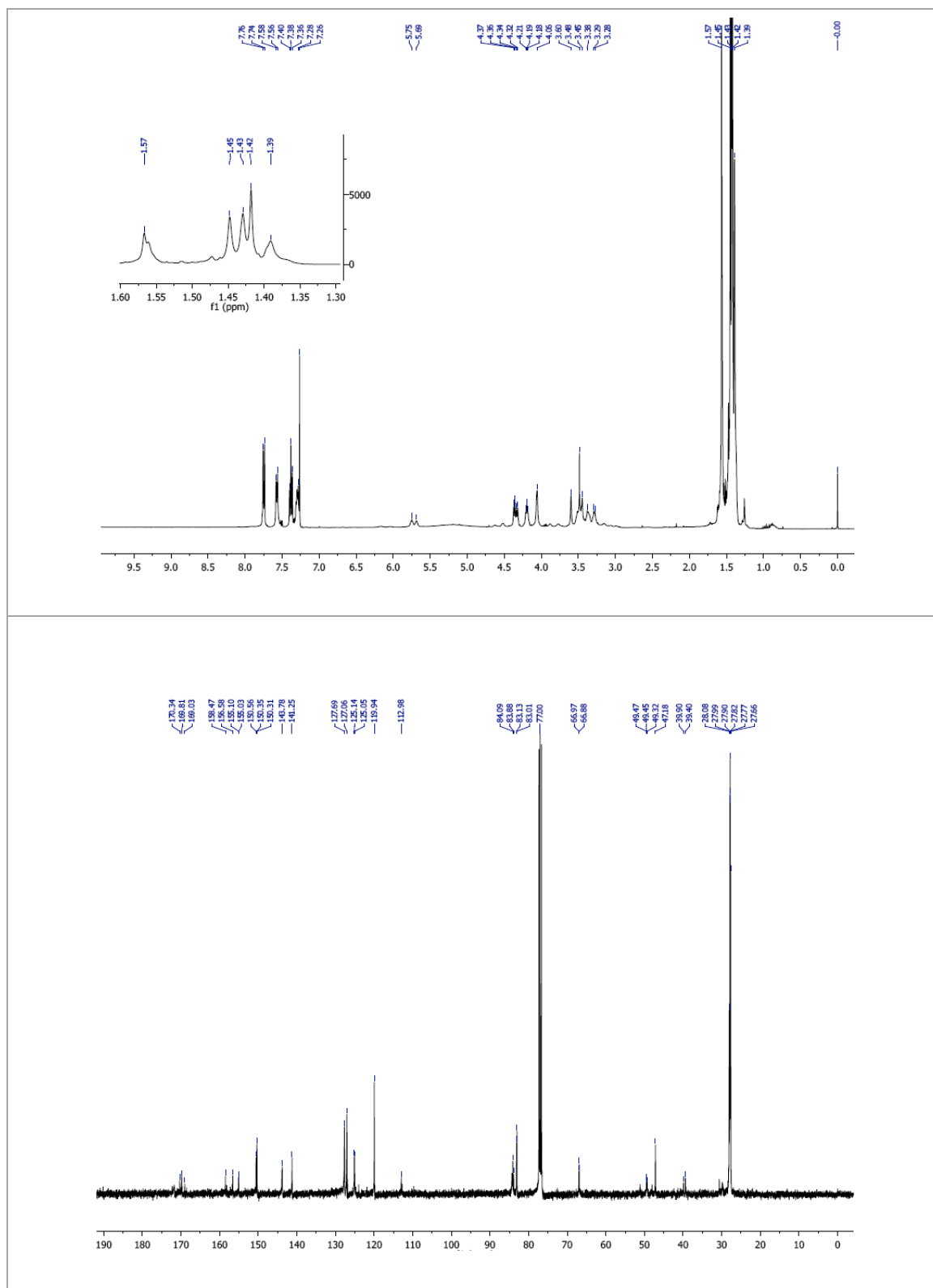


Figure E.4.  $^1\text{H-NMR}$  (top) and  $^{13}\text{C-NMR}$  (bottom) spectra of  $J_D$  PNA monomer 49.

**1.3. Janus J<sub>w</sub> PNA monomer**<sup>[13]</sup>

*6-Amino-1,3,5-triazine-2,4(1H,3H)-dione (50)*.<sup>[14]</sup> Biuret (2.5 g, 24.2 mmol), guanidine hydrochloride (2.3 g, 24.2 mmol) and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (500 mg, 3.6 mmol) were suspended in DMF (8 mL). The mixture was heated up to 155 °C, while the reactants dissolved, for 8 h with constant stirring and under an Ar atmosphere. When the reaction was finished a large amount of precipitate had been formed. The mixture was allowed to cool down to room temperature and kept in the freezer overnight. The precipitate was filtered and washed with cold water to obtain ammelide (**50**) (1.2 g, 40%); <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub> +HCl, 100 MHz): δ 153.9, 150.3, 147.7 ppm; MS (ESI, positive mode): *m/z* 128.1 [M+H]<sup>+</sup>, 113.0 [M-NH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, 256.1 [2M+H]<sup>+</sup>; CI-DEPCI MS (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, positive mode): *m/z* 128.3 [M+H]<sup>+</sup>, 113.3 [M-NH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, 146.4 [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, M calcd for C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> 128.03.

*1-(2-((Tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)ethyl)guanidine (52)*. Guanidine hydrochloride (276 mg, 2.88 mmol) was added to a suspension of <sup>t</sup>BuOK (340 mg, 2.88 mmol) in DMF (9 mL). The reaction mixture was heated to 50 °C for 20 min and subsequently filtered. The clear solution obtained was added to a mixture of **2** (300 mg, 1.44 mmol) and DIPEA (510 μL, 2.88 mmol) in DMF (2 mL), and was heated to 50 °C overnight. The solvent was removed in vacuo and the crude product was dissolved in DCM (15 mL), washed with 5% aq NaHCO<sub>3</sub> (3 x 10 mL) and water (15 mL), dried over anh. MgSO<sub>4</sub>, filtered, and the solvent was evaporated under reduced pressure to yield **52** as a colourless oil (270 mg, quantitative); <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 4.60 (t, 1H), 3.85-3.36 (m, 6H), 1.78-1.54 (m, 6H) ppm; MS (ESI, positive mode): *m/z* 188.07 [M+H]<sup>+</sup>, M calcd for C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> 187.13.

*Methyl N'-mesitylenesulfonylcarbimido-S-methylthioate (54)*. A solution of 2-mesitylene-sulfonyl chloride (10.5 g, 47.4 mmol) in DCM (18 mL) was slowly added to the mixture of S-methylisothorium (6 g, 43.1 mmol) and 2 M aq NaOH solution (32.4 mL) at 0 °C. The mixture was warmed up to ambient temperature, where it remained for 2 h. After this time, the solvent was evaporated and the residue was extracted with DCM (4 x 60 mL). The product was purified by flash column chromatography eluting with hexanes/AcOEt (from 3:1 to 1:1), which yielded **54** as a white solid (4.31 g, 40%); R<sub>f</sub> (hexanes/AcOEt 75:25)= 0.30; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ 6.93 (s, 2H), 2.68 (s, 6H), 2.34 (s, 3H), 2.29 (s, 3H) ppm; <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ 167.8, 141.7, 138.6, 136.4, 131.5, 22.7, 20.9, 14.0 ppm; MS (ESI, positive mode)= *m/z* 272.86 [M+H]<sup>+</sup>, M calcd for C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub> 272.07.

*Benzyl carbonisocyanatidate (55)*.<sup>[15]</sup> To a suspension of dry, finely ground benzyl carbamate (10 g, 66.2 mmol) in anh. DCM (100 mL) under Ar was added dropwise, with efficient stirring and ice cooling, a solution of oxalyl chloride (8.75 mL, 99.3 mmol) in anh. DCM (50 mL) over a period of 1 h. The initial clear mixture gradually became turbid. Stirring was continued for 4 h at room temperature and overnight under reflux. The mixture was then concentrated to about 2/3 of its original volume and the fine-grained precipitate was filtered off and washed with cold and anh. DCM. The combined pale yellow filtrate and washings were evaporated to dryness with the minimum exposure to atmospheric moisture, and the residual yellowish turbid oil was distilled at reduced pressure. Thereafter, product **55** was collected (10 g, 50%);

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.38 (m, 5H), 5.20 (s, 2H) ppm;  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  136.2, 134.1, 129.0, 128.7, 128.6, 128.5, 128.2, 128.1, 70.5 ppm.

*N*-(Benzyloxycarbonyl)ureido-*N'*-mesitylenesulfonyl-*S*-methylisothiourea (**56**). To a solution of **55** (1.5 g, 8.5 mmol) in anh. THF (10 mL) was added a solution of compound **54** (2 g, 7.36 mmol) in anh. THF (12 mL) under Ar at 0°C. The mixture was warmed up to room temperature and stirred for 24 h. The reaction became turbid after 4 h stirring. Once the reaction was finished, the precipitate was collected by filtration and washed with cold THF. The product was dried under vacuum. **61** Was obtained as a white solid (3.0 g, 90%);  $R_f$  (hexanes/AcOEt 6:4)= 0.56;  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.51 (s, 1H), 7.38 (m, 5H), 6.94 (s, 2H), 5.29 (s, 2H), 2.69 (s, 6H), 2.30 (s, 3H), 2.23 (s, 3H) ppm;  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  165.0, 152.3, 148.9, 142.2, 139.0, 135.4, 134.1, 131.6, 129.0, 128.7, 128.7, 69.1, 22.7, 21.0, 15.7 ppm; MS (ESI, positive mode)=  $m/z$  450.12  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 472.10  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 921.21  $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ , M calcd for  $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_2$  449.11.

*Tert-butyl 2-(2,4-dioxo-6-(2,4,6-trimethylphenylsulfonamido)-3,4-dihydro-1,3,5-triazin-1(2H-yl)acetate* (**57**). To a solution of compound **56** (1.8 g, 4.01 mmol) and glycine *t*-butyl ester hydrochloride (739 mg, 4.41 mmol) in anh. THF (24 mL) was added TEA (8.4 mL, 60 mmol) dropwise at 0°C. After stirring for an additional 15 min at 0°C, the mixture was warmed up to 45°C and stirred for 24 h, and then quenched with water (30 mL). The solvent was removed under reduced pressure and the residue was extracted with AcOEt (5 x 30 mL). Purification of the crude residue by chromatography (MeOH/DCM from 0:10 to 4:6) resulted in product **57** (1.7 g, 98%);  $R_f$  (DCM/MeOH 9:1)= 0.56;  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  6.93 (s, 2H), 4.47 (s, 2H), 2.64 (s, 6H), 2.28 (s, 3H), 1.28 (s, 9H) ppm;  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  165.3, 147.7, 146.1, 144.8, 142.8, 139.0, 134.7, 131.8, 83.3, 43.9, 27.7, 22.6, 20.9 ppm; MS (ESI, positive mode)=  $m/z$  424.99  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 446.9  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 368.92  $[\text{M}-\text{tBu}+\text{H}]^+$ , 871.13  $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ , M calcd for  $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_4$  276.09.

*2-(2,4-Dioxo-6-(2,4,6-trimethylphenylsulfonamido)-3,4-dihydro-1,3,5-triazin-1(2H-yl)acetic acid* (**58**). To a solution of compound **57** (1 g, 2.36 mmol) in DCM (23 mL) was added TFA (23 mL) at 0°C. The mixture was stirred for 6 h at room temperature, concentrated and dried *in vacuo*. Trituration with dry diethyl ether and filtration of the resulting solid provided compound **58** (805 mg, 93%);  $R_f$  (DCM/MeOH 9:1)= 0.54;  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  12.12 (s, 1H), 7.04 (s, 2H), 4.35 (s, 2H), 2.56 (s, 6H), 2.26 (s, 3H) ppm;  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  168.1, 148.3, 147.4, 145.9, 142.0, 137.9, 135.6, 131.5, 42.9, 22.0, 20.3 ppm; MS (ESI, positive mode)=  $m/z$  368.95  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 390.93  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 737.02  $[2\text{M}+\text{H}]^+$ , 758.99  $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ , 1127.00  $[3\text{M}+\text{Na}]^+$ , M calcd for  $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}$  368.08.

*Tert-butyl 2-(N-(2-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)ethyl)-2-(2,4-dioxo-6-(2,4,6-trimethylphenylsulfonamido)-3,4-dihydro-1,3,5-triazin-1(2H-yl)acetamido)acetate* (**59**). To a solution of **58** (600 mg, 1.63 mmol) and [2-(9H-fluoren-9-ylmethoxy carbonylamino)-ethylamino] acetic acid *t*-butyl ester hydrochloride (724 mg, 1.63 mmol) in DMF (30 mL) was added EDC (384 mg, 1.96 mmol), followed by DIEA (604  $\mu\text{L}$ , 3.42 mmol) at 0°C. The mixture was slowly warmed up to ambient temperature where it remained overnight. DMF was removed under reduced pressure and the residue was dissolved in AcOEt (20 mL). The resulting solution was washed with 5% aq  $\text{NaHCO}_3$  (2 x 20 mL) and water (20 mL), and the



organic layer was dried over anhydrous  $\text{MgSO}_4$ , filtered, and solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by flash column chromatography eluting with MeOH/DCM (from 0:10 to 1:9) to yield **59** as a bright yellow foam (1.0 g, 84%);  $R_f$  (DCM/MeOH 9:1) = 0.52;  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  (two rotamers) 7.75 (d,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 7.59 (d,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 7.41 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 7.32 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 6.86 and 6.88 (rotamers, s, 2H), 5.75 and 5.69 (rotamers, br t, 1H), 4.66 and 4.50 (rotamers, s, 2H), 4.40 (br t, 1H), 4.19 (br d, 2H), 3.84 and 3.72 (rotamers, s, 2H), 3.30-3.07 (m, 4H), 2.58 (s, 6H), 2.21 (s, 3H), 1.42 (s, 9H) ppm;  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  (two rotamers) 168.3 and 167.5 (rotamers), 166.9 and 166.2 (rotamers), 165.6, 156.6, 148.6, 143.9, 143.8, 142.3 and 142.2 (rotamers), 141.1, 138.7, 131.5, 127.6, 127.0, 125.0, 119.8, 83.3, 66.7, 53.4, 51.2, 47.0, 39.4 and 38.6 (rotamers), 27.8 and 27.7 (rotamers), 22.5, 20.8 ppm; MS (ESI, positive mode) =  $m/z$  747.19  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 769.04  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , M calcd for  $\text{C}_{37}\text{H}_{42}\text{N}_6\text{O}_9\text{S}$  746.27.

2-(*N*-(2-(((9*H*-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)ethyl)-2-(2,4-dioxo-6-(2,4,6-trimethylphenylsulfonamido)-3,4-dihydro-1,3,5-triazin-1(2*H*)-yl)acetamido)acetic acid (**60**). To a suspension of compound **59** (580 mg, 0.78 mmol) in DCM (11.5 mL) was added TFA (11.5 mL) at 0°C. The mixture was stirred for 3 h at room temperature, concentrated and dried *in vacuo*. Trituration with dry diethyl ether (10 mL) provided compound **60** (440 mg, 82 %) as an amorphous powder;  $R_f$  (DCM/MeOH 9:1) = 0.52;  $^1\text{H-NMR}$  ( $d^6$ -acetone, 400 MHz):  $\delta$  (two rotamers) 7.87 (d,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 7.69 (d,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 7.41 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 7.33 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 6.99 (s, 2H), 6.56 and 6.31 (rotamers, br t, 1H), 4.85 and 4.72 (rotamers, s, 2H), 4.25 and 4.34 (m, 3H), 3.93 and 4.28 (rotamers, s, 2H), 3.35 and 3.50 (rotamers, m, 2H), 3.05 and 3.25 (rotamers, m, 2H), 2.62 and 2.60 (rotamers, s, 6H), 2.24 and 2.25 (rotamers, s, 3H) ppm;  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  (two rotamers) 173.70 and 173.23, 168.75 and 169.18 (rotamers), 159.10 and 159.53 (rotamers), 150.97, 150.33, 148.10, 146.92, 145.16, 143.92, 141.37, 138.50, 134.28, 130.32, 129.75, 127.92, 122.60, 68.82 and 68.92 (rotamers), 50.26, 50.05, 49.86, 45.69, 41.43, 24.71, 22.71 ppm; MS (ESI, negative mode) =  $m/z$  688.94  $[\text{M}-\text{H}]^-$ , 1379.02  $[2\text{M}-\text{H}]^-$ , M calcd for  $\text{C}_{33}\text{H}_{34}\text{N}_6\text{O}_9\text{S}$  690.21.

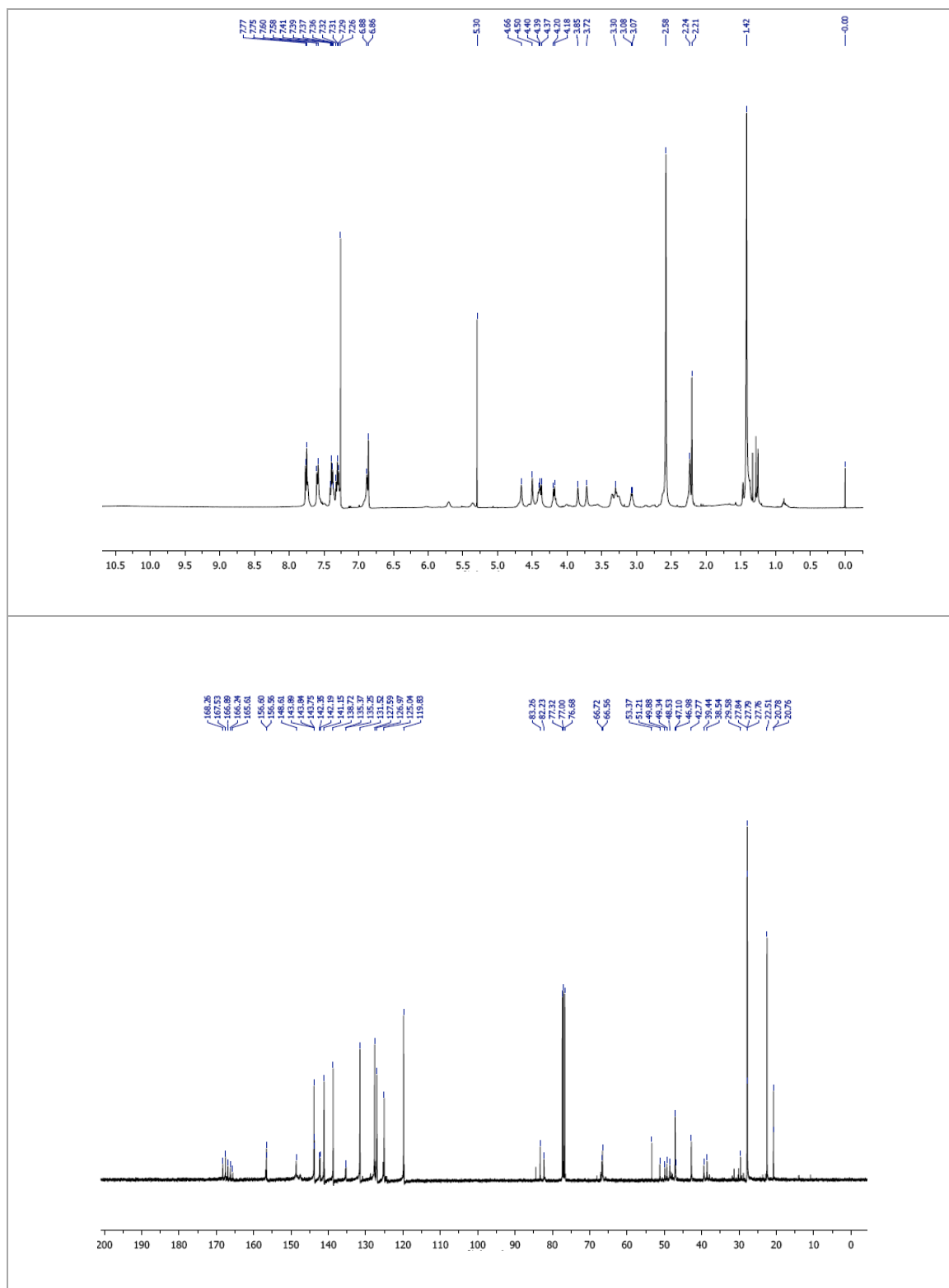


Figure E.5.  $^1\text{H-NMR}$  (top) and  $^{13}\text{C-NMR}$  (bottom) spectra of  $J_W$  PNA monomer 60.

## 2. Spectrophotometric determination of the $pK_a$ of **12** <sup>[16]</sup>

The  $pK_a$  of compound **12** was determined measuring its UV-Vis absorption at different pH values, for which different buffer solutions were used. A 0.1 M mother buffer solution of  $KH_2PO_4$  was prepared in a volumetric flask by dissolving 2.7g of  $KH_2PO_4$  in 200mL of Milli-Q water. Twelve different pH solutions were prepared diluting the 0.1 M mother buffer solution to 0.01 M and adjusting the pH with either a 0.01 M KOH solution (56 mg KOH in 100 mL Milli-Q water) or a 0.01 M HCl solution (82.8  $\mu$ L conc HCl in 100 mL) as required. A stock solution of **12** (in Milli-Q water) with a perfectly known concentration (0.5 mM) was prepared in a 100 mL volumetric flask .

A 0.1 M  $NH_3$  solution (120  $\mu$ L of concentrated aq  $NH_3$  diluted with in Milli-Q water) and a 0.1 M HCOOH solution (77  $\mu$ L of HCOOH dissolved in Milli-Q water) were prepared as extreme pH solutions to assess the wavelength at which ionized and neutral species differ more in UV-Vis absorption ( $\lambda_{anal}$ ). For this purpose the UV-Vis absorption of **12** was recorded (320-200 nm range) in both extreme pH solutions (pH= 2.75 and 11.06), to conclude that  $\lambda_{anal}$ = 285 nm. With these experiments the absorption of protonated **12** ( $A_I$ ) and deprotonated **12** ( $A_M$ ) at the analytical wavelength ( $\lambda_{anal}$ ) were also determined.

Analytical samples were prepared by diluting 200  $\mu$ L of the stock Janus **12** solution (0.5 mM) in 800  $\mu$ L of the  $KH_2PO_4$  buffer solutions, to reach a final 100  $\mu$ M concentration of **12** of. UV-Vis Spectra (between 320 and 200 nm) were performed for each sample and the data obtained (Table E.5) were adjusted to equation (6) and graphically represented (Fig.E.6).

$$pK_a = pH + \log \frac{A - A_M}{A_I - A} \quad (6)$$

A is the absorbance at the chosen analytical wavelength ( $\lambda_{anal}$ ) and at given pH,  $A_M$  is the absorbance of the neutral species at the same wavelength, and  $A_I$  is the absorbance of the charged species also at the analytical wavelength.

pH	A	pH	A
2.75	0.74930 ( $A_I$ )	6.71	0.59186
5.09	0.72749	6.78	0.55634
5.55	0.61331	6.90	0.56461
5.97	0.70747	7.10	0.52456
6.30	0.66788	7.31	0.47605
6.49	0.63110	7.54	0.43341
6.60	0.62244	11.06	0.30175 ( $A_M$ )

**Table E.5.** Values found and used to determine the  $pK_a$  of **12**. A is the average of two different measurements.

Adjusting the plotted data to a lineal regression, the intercept with the Y-axis corresponds to the  $pK_a$ . In this case, the obtained value was:  $pK_{a,25^\circ C, (12)} = 7.07 \pm 0.02$ , with a  $r^2$  (Pearson product-moment correlation coefficient) = 0.995.

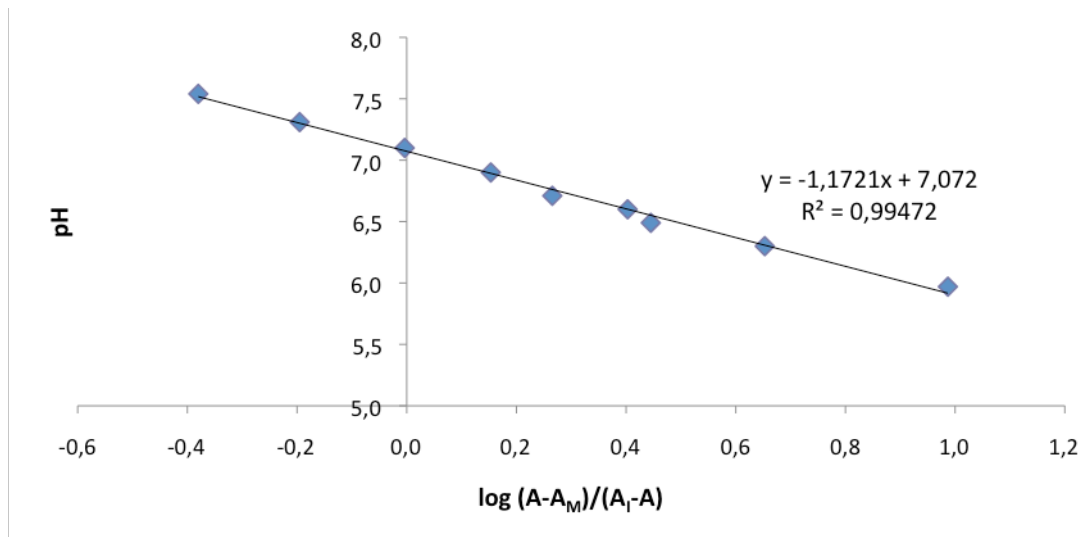


Fig.E.6. Determination of the  $pK_a$  of compound **12**.

### 3. Determination of the $\epsilon$ Janus bases.

There is some information on the UV-Vis absorption of the three bases in the literature; however, we weren't able to find the  $\epsilon$  values of  $J_T$ ,  $J_D$  and  $J_W$  in the conditions that we required. For this reason, we decided to determinate  $\epsilon$  values for the three bases at pH 5.5 and 7.0. The wavelengths chosen were 230 nm, absorption maximum of ammelide, and 280 nm, absorption maximum of  $J_T$ .

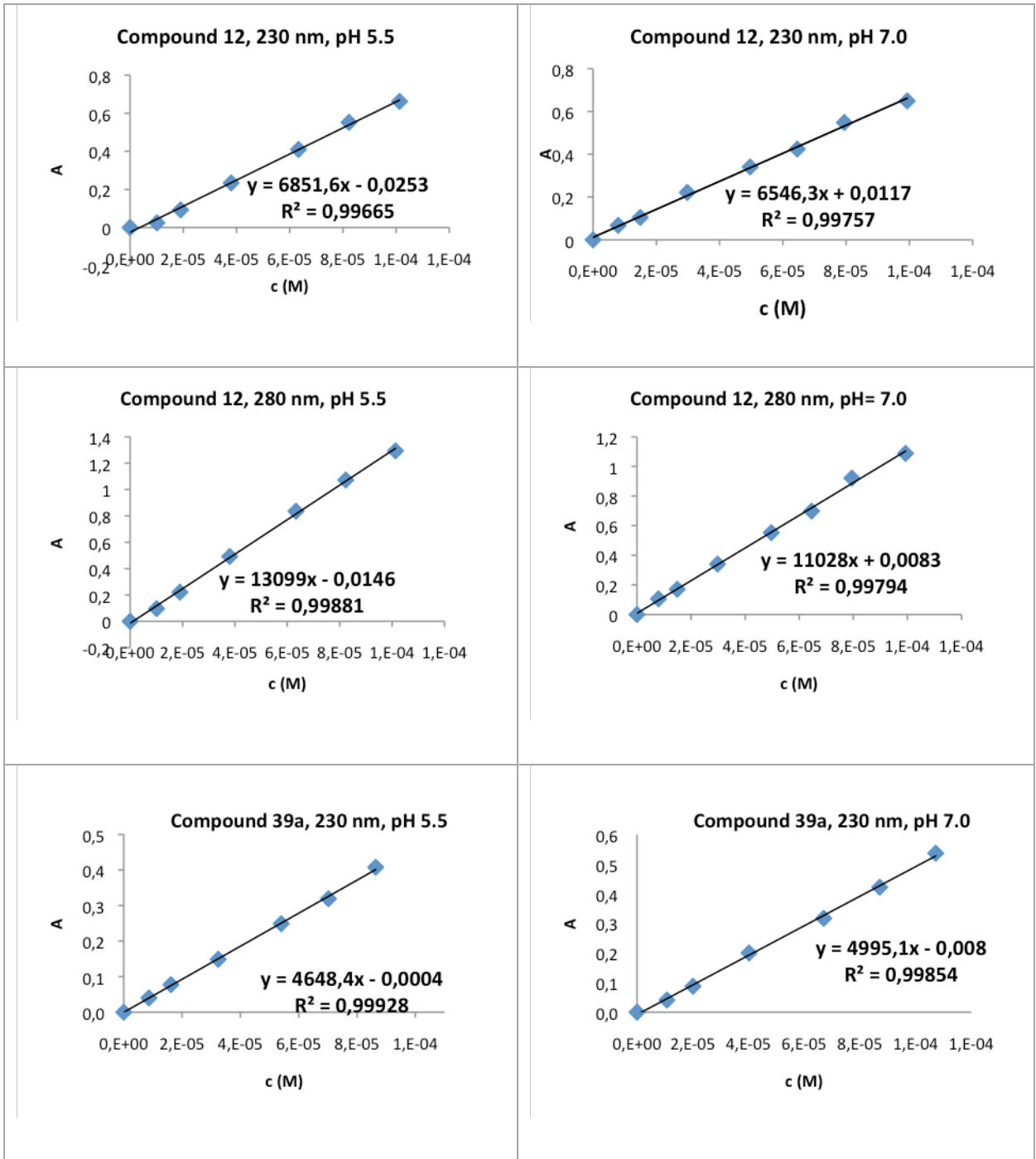
Two mother solutions of each base were prepared in a 25 mL volumetric flask of perfectly known concentration (around 1 mM) in 10 mM  $\text{AcONH}_4$  buffer. One of them was adjusted to pH 5.5 and the other to pH 7.0. The absorbance of both buffer solutions (pH 5.50 and 7.00) was recorded over the 200-300 nm range as a blank. Diluted solutions of the mother solution of the analyte (between 10  $\mu\text{M}$  and 100  $\mu\text{M}$  approximately) were prepared using the convenient buffers, and their UV-Vis absorption was measured within the same range as the blank (200-300 nm).

With all the data in hand (Table E.6), a graphic absorbance vs [analyte] can be plotted (Figure E.7). This graphic was a straight line where, using the Lambert-Beer law, the slope corresponds to the molar extinction coefficient.

Compound 12- J <sub>T</sub> model							
λ = 230 nm				λ = 280 nm			
pH= 5.5		pH= 7.0		pH= 5.5		pH= 7.0	
c (μM)	A	c (μM)	A	c (μM)	A	c (μM)	A
0	0	0	0	0	0	0	0
10.1	0.02439	7.94	0.06747	10.1	0.0964	7.94	0.10579
19.0	0.09263	14.9	0.10436	19.0	0.22115	14.9	0.17047
38.0	0.23407	29.79	0.22171	38.0	0.49245	29.79	0.34055
63.3	0.40955	49.65	0.34055	63.3	0.8356	49.65	0.55288
82.3	0.55194	64.55	0.42415	82.3	1.0722	64.55	0.69825
101.0	0.6619	79.44	0.54807	101.0	1.29322	79.44	0.92121
Compound 39- J <sub>D</sub> model							
λ = 230 nm				λ = 280 nm			
pH= 5.5		pH= 7.0		pH= 5.5		pH= 7.0	
c (μM)	A	c (μM)	A	c (μM)	A	c (μM)	A
0	0	0	0	0	0	0	0
8.64	0.03004	10.7	0.04443	8.64	0.0759	10.7	0.1065
16.2	0.07707	20.1	0.09661	16.2	0.16823	20.1	0.21421
32.4	0.15775	40.2	0.21029	32.4	0.33944	40.2	0.48477
54.0	0.24722	67.0	0.30203	54.0	0.54053	67.0	0.71553
70.2	0.33254	87.1	0.43355	70.2	0.71804	87.1	0.92104
86.4	0.41984	107.0	0.57109	86.4	0.88726	107.0	1.18463
108.0	0.51367	134.0	0.66496	108.0	1.082	134.0	-

2,6-diamino-4(3H)-pyrimidone (J <sub>D</sub> )							
λ = 230 nm				λ = 280 nm			
pH= 5.5		pH= 7.0		pH= 5.5		pH= 7.0	
c (μM)	A	c (μM)	A	c (μM)	A	c (μM)	A
0	0	0	0	0	0	0	0
2.17	0.00798	7.74	0.02031	2.17	0.01486	7.74	0.03662
8.69	0.01943	14.5	0.04765	8.69	0.04217	14.5	0.07539
16.3	0.04663	29.0	0.09001	16.3	0.0868	29.0	0.15184
32.6	0.10485	48.4	0.15721	32.6	0.17653	48.4	0.25111
54.3	0.17379	62.9	0.19678	54.3	0.28424	62.9	0.31401
70.6	0.22914	77.4	0.25373	70.6	0.37726	77.4	0.40632
86.9	0.28178	-	-	86.9	0.46771	-	-
2-amino-1,3,5-triazine-4,6-dione (J <sub>W</sub> )							
λ = 230 nm				λ = 280 nm			
pH= 5.5		pH= 7.0		pH= 5.5		pH= 7.0	
c (μM)	A	c (μM)	A	c (μM)	A	c (μM)	A
0	0	0	0	ND	ND	ND	ND
20.7	0.02071	8.10	0.0232	ND	ND	ND	ND
41.5	0.07583	15.2	0.04517	ND	ND	ND	ND
69.2	0.13552	30.5	0.07555	ND	ND	ND	ND
89.9	0.18395	50.8	0.12449	ND	ND	ND	ND
111.0	0.21893	66.0	0.17138	ND	ND	ND	ND
138.0	0.30246	81.3	0.19807	ND	ND	ND	ND
-	-	102.0	0.26534	ND	ND	ND	ND

**Table E.6.** Absorbance values of the different models of Janus bases used to determine the ε coefficients. A is the average of two measured values. ND= not determined.



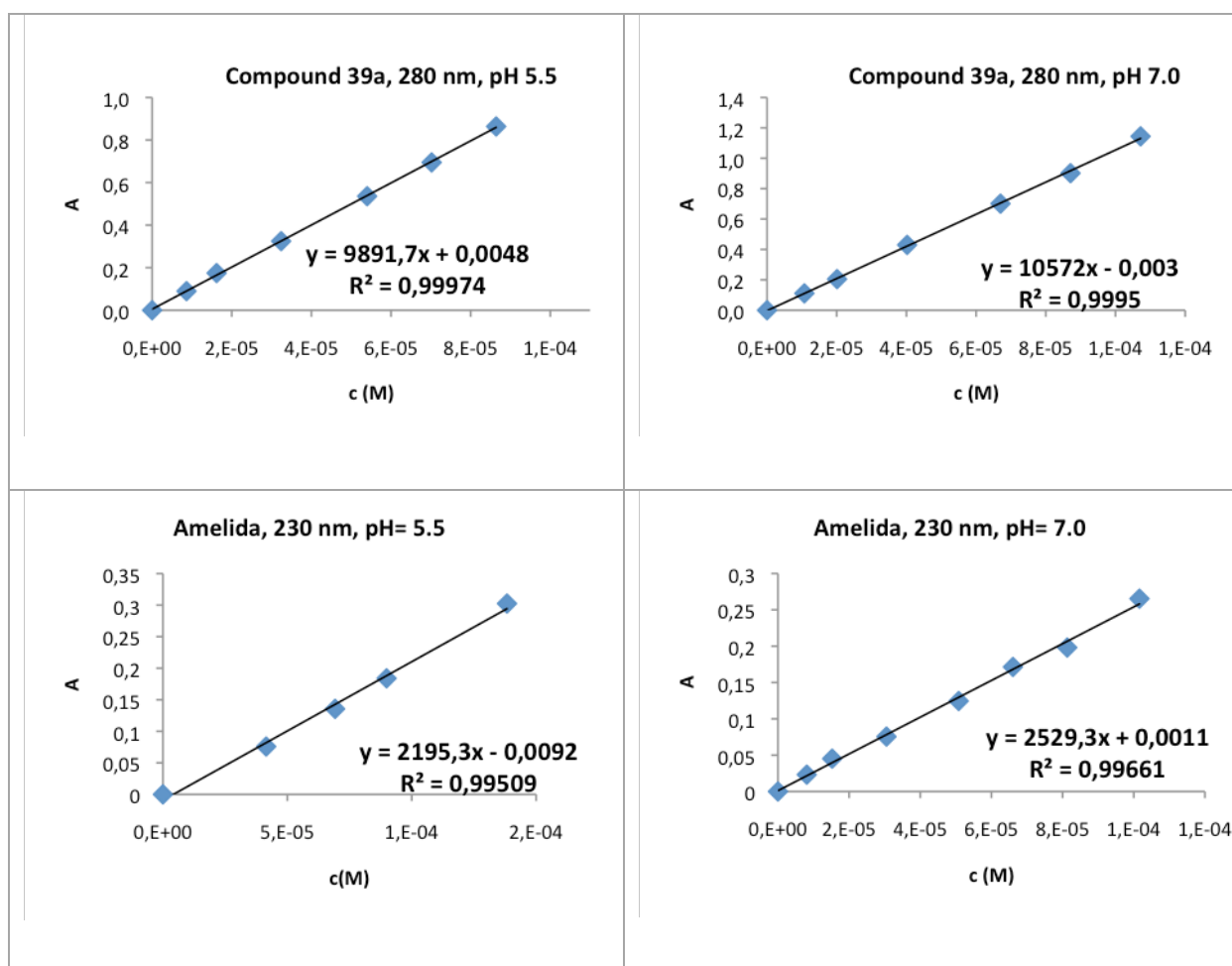


Figure E.7. Graphics plotted for the determination of the  $\epsilon$  coefficients of the synthesized Janus bases..

To sum up, the determined  $\epsilon$  values are:

Janus base	$\epsilon_{280}(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1})$		$\epsilon_{230}(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1})$	
	pH= 5.50	pH= 7.00	pH= 5.50	pH= 7.00
$J_T$	$13099 \pm 202$	$11028 \pm 204$	$6852 \pm 178$	$6546 \pm 132$
$J_D$	$9892 \pm 71$	$10572 \pm 106$	$4648 \pm 56$	$4995 \pm 86$
$J_W$	0	0	$2195 \pm 89$	$2529 \pm 60$

Table E.7. Determinated  $\epsilon$  values for  $J_T$ ,  $J_D$  and  $J_W$  at 230 and 280 nm, and pH 5.50 and 7.00.

Using these values, the PNA's  $\epsilon$  could be calculated assuming:

$$\epsilon_{PNA} = \sum n_i \cdot \epsilon_{Janus_i} \quad (7)$$

where  $n_i$  is the number of Janus bases  $i$  present in the PNA and  $\epsilon_{Janus,i}$  is its molar extinction coefficient.

Table E.8 lists the molar extinction coefficients of the synthesized PNAs.



PNA	$\epsilon_{\text{PNA}} (\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1})$	PNA	$\epsilon_{\text{PNA}} (\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1})$
J <sub>T</sub> K	11028	J <sub>T</sub> G <sub>5</sub> J <sub>T</sub> K	22056
J <sub>D</sub> K	10572	J <sub>T</sub> J <sub>W</sub> K	11028
J <sub>W</sub> K	2529 <sup>a</sup>	J <sub>W</sub> J <sub>T</sub> K	11028
J <sub>T</sub> J <sub>T</sub> K	22056	J <sub>D</sub> J <sub>W</sub> K	10572
J <sub>D</sub> J <sub>D</sub> K	21144	J <sub>W</sub> J <sub>D</sub> K	10572
J <sub>W</sub> J <sub>W</sub> K	5058 <sup>a</sup>	J <sub>W</sub> J <sub>T</sub> J <sub>W</sub> K	11028
J <sub>T</sub> G <sub>3</sub> J <sub>T</sub> K	22056	J <sub>T</sub> J <sub>W</sub> J <sub>W</sub> J <sub>T</sub> K	22056
J <sub>T</sub> G <sub>4</sub> J <sub>T</sub> K	22056	J <sub>D</sub> J <sub>W</sub> J <sub>W</sub> J <sub>D</sub> K	21144

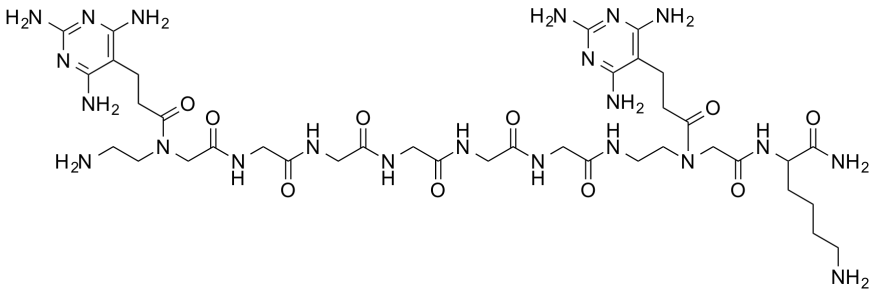
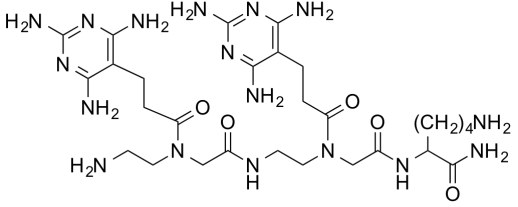
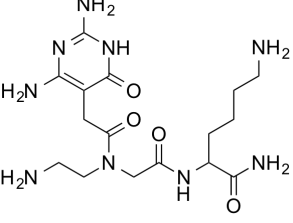
**Table E.8.** Molar extinction coefficients of the synthesized PNAs measured at 25°C, pH 7.0 and 280 nm. <sup>a</sup>  $\epsilon$  measured at 230 nm.

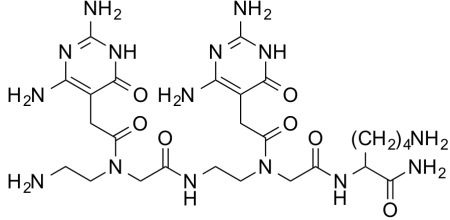
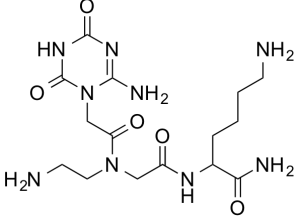
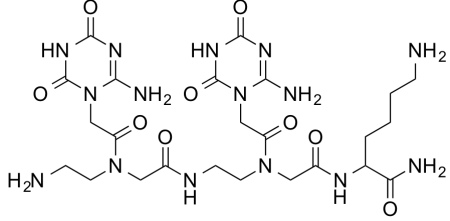
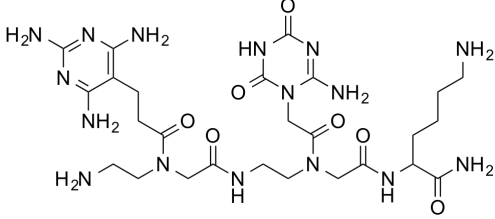
#### 4. PNA synthesis and characterization

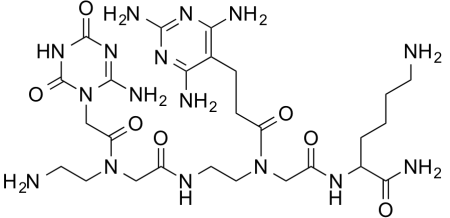
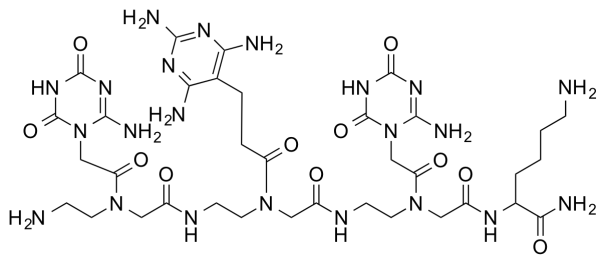
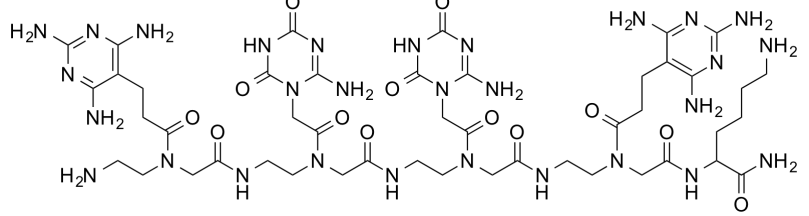
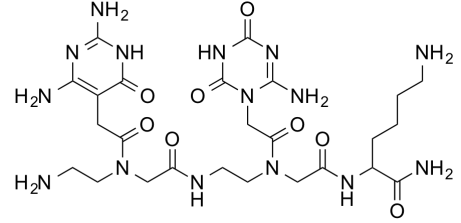
The detailed procedure used to synthesize the PNAs is described at the *Materials and Methods* section. All PNAs were characterized by HPLC and mass spectrometry (MALDI-TOF or ESI), and these data are summarized in Table E.9. Analytical HPLC of the crude and pure PNAs are shown in Figure E.8.

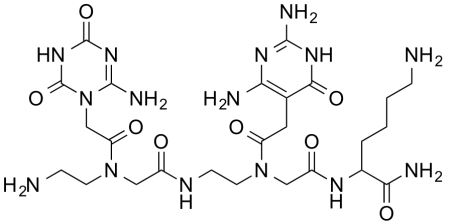
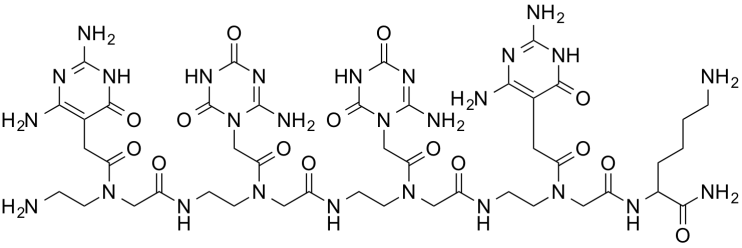
**Table E.9.** Characterization of the synthesized PNAs. Analytical HPLC (A: H<sub>2</sub>O (0.045 % TFA), B: ACN (0.036 % TFA)), Jupiter C18 Proteo from Phenomenex, gradient from 0 to 30% of B in 30 min, 1 mL/min. MALDI-TOF MS in THAP matrix.

PNA Structure	Yield	Name	Calcd Mass	t <sub>R</sub> <sup>*</sup>	Found m/z
	60%	<b>J<sub>1</sub>K</b>	424.2659	11.6	<b>ESI (+)</b> 424.84 [M+H] <sup>+</sup> 212.93 [(M+2H)/2] <sup>2+</sup> <b>HR ESI (+)</b> 425.2730 [M+H] <sup>+</sup>
	20%	<b>J<sub>1</sub>G<sub>3</sub>J<sub>1</sub>K</b>	874.4746	15.8	<b>ESI (+)</b> 875.23 [M+H] <sup>+</sup> 438.23 [(M+2H)/2] <sup>2+</sup> <b>HR ESI (+)</b> 875.4913 [M+H] <sup>+</sup> 438.2442 [(M+2H)/2] <sup>2+</sup>
	30%	<b>J<sub>1</sub>G<sub>4</sub>J<sub>1</sub>K</b>	931.4961	15.5	<b>ESI (+)</b> 932.26 [M+H] <sup>+</sup> 466.45 [(M+2H)/2] <sup>2+</sup> 311.25 [(M+3H)/3] <sup>3+</sup> <b>HR ESI (+)</b> 932.5049 [M+H] <sup>+</sup> 466.7557 [(M+2H)/2] <sup>2+</sup> 311.5062 [(M+3H)/3] <sup>3+</sup>

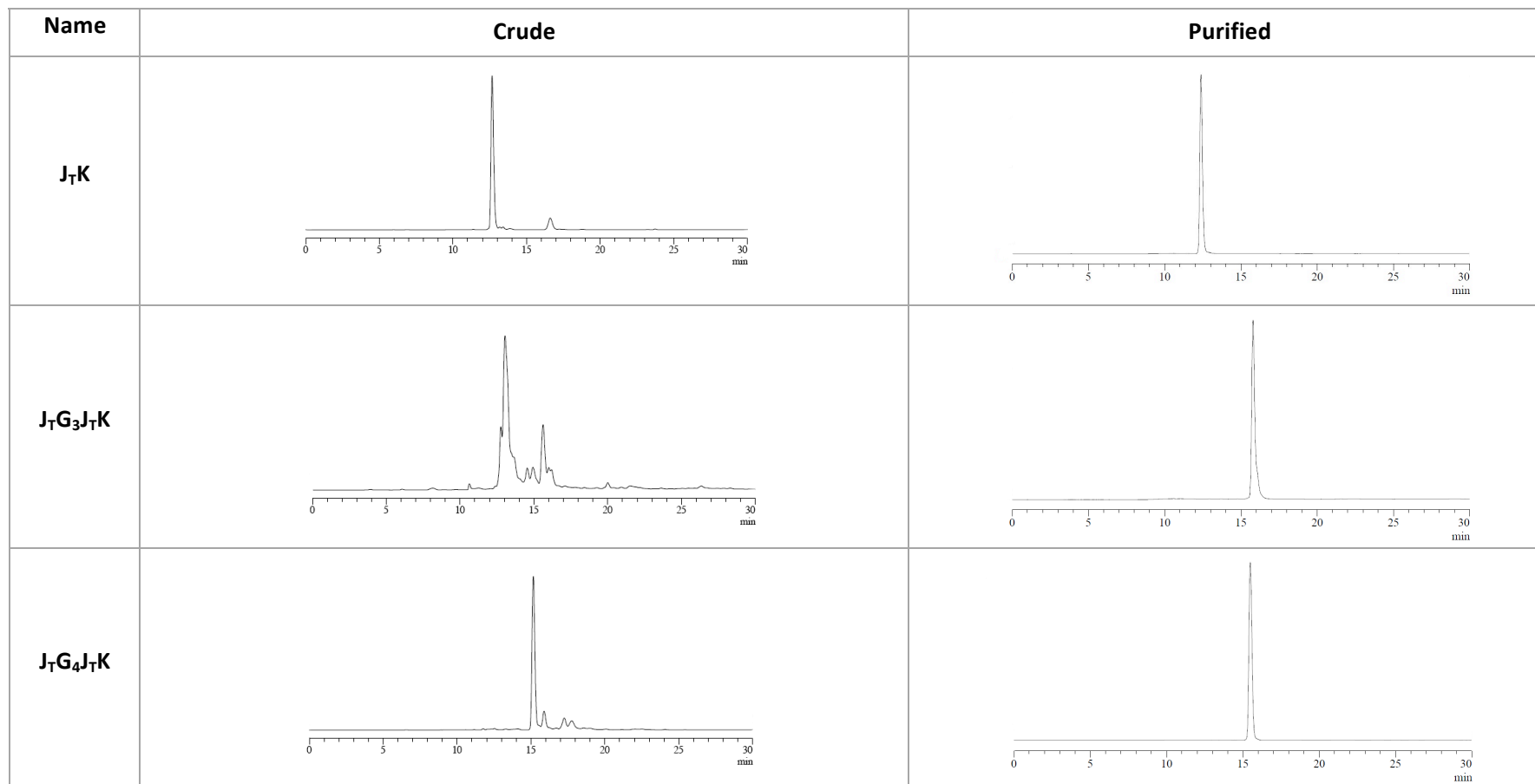
	20%	<b>J<sub>7</sub>G<sub>5</sub>J<sub>7</sub>K</b>	988.5176	15.5	<p><b>ESI (+)</b> 495.22 [(M+H)/2]<sup>2+</sup> <b>MALDI-TOF (+)</b> 989.8 [M+H]<sup>+</sup> <b>HR ESI (+)</b> 989.5222 [M+H]<sup>+</sup> 495.2660 [(M+2H)/2]<sup>2+</sup> 330.5143 [(M+3H)/3]<sup>3+</sup></p>
	41%	<b>J<sub>7</sub>J<sub>7</sub>K</b>	703.4103	16.6	<p><b>ESI (+)</b> 704.08 [M+H]<sup>+</sup> 352.46 [(M+H)/2]<sup>2+</sup> 235.18 [(M+H)/3]<sup>3+</sup> <b>MALDI-TOF (+)</b> 704.6 [M+H]<sup>+</sup> 726.7 [M+Na]<sup>+</sup> 742.6 [M+K]<sup>+</sup> <b>HR ESI (+)</b> 704.4155 [M+H]<sup>+</sup> 352.7128 [(M+2H)/2]<sup>2+</sup></p>
	59%	<b>J<sub>D</sub>K</b>	411.2343	6.4	<p><b>ESI (+)</b> 411.93 [M+H]<sup>+</sup> <b>HR ESI (+)</b> 411.2411 [M+H]<sup>+</sup></p>

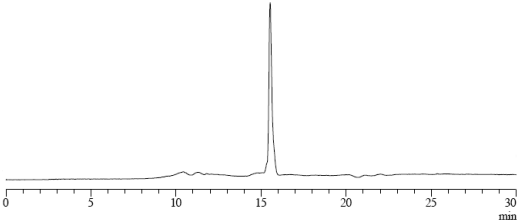
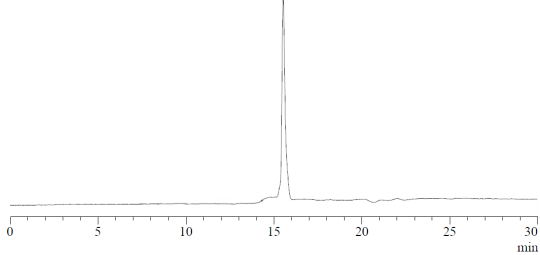
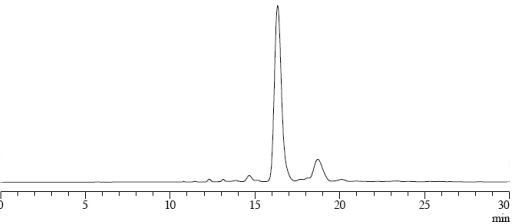
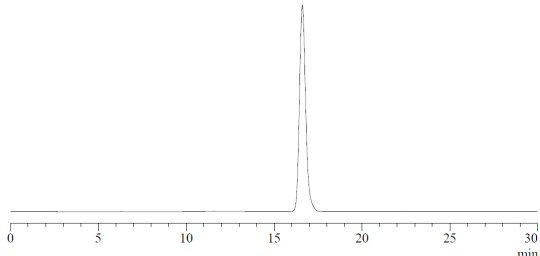
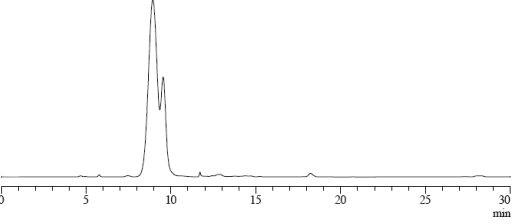
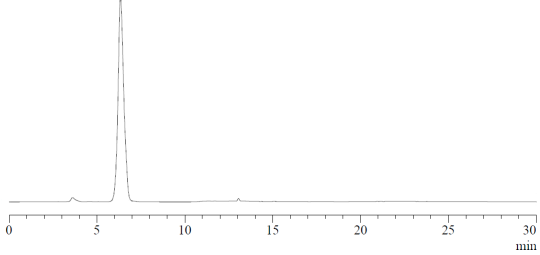
	42%	<b>J<sub>D</sub>J<sub>D</sub>K</b>	677.3470	12.6	<b>ESI (+)</b> 678.08 [M+H] <sup>+</sup> 339.54 [(M+2H)/2] <sup>2+</sup> <b>HR ESI (+)</b> 678.3536 [M+H] <sup>+</sup> 339.6813 [(M+2H)/2] <sup>2+</sup>
	61%	<b>J<sub>w</sub>K</b>	413.21	6.5	<b>ESI (+)</b> 413.83 [M+H] <sup>+</sup>
	79%	<b>J<sub>w</sub>J<sub>w</sub>K</b>	681.31	10.8	<b>ESI (+)</b> 682.06 [M+H] <sup>+</sup>
	59%	<b>J<sub>T</sub>J<sub>w</sub>K</b>	692.36	13.3	<b>ESI (+)</b> 693.12 [M+H] <sup>+</sup> 347.14 [(M+2H)/2] <sup>2+</sup>

	43%	<b>J<sub>W</sub>J<sub>T</sub>K</b>	692.36	12.4	<b>ESI(+)</b> 693.02 [M+H] <sup>+</sup> 346.97 [(M+2H)/2] <sup>2+</sup>
	63%	<b>J<sub>W</sub>J<sub>T</sub>J<sub>W</sub>K</b>	960.45	13.2	<b>ESI (+)</b> 961.30 [M+H] <sup>+</sup> 481.22 [(M+2H)/2] <sup>2+</sup> <b>MALDI-TOF (+)</b> 961.7 [M+H] <sup>+</sup> 983.7 [M+Na] <sup>+</sup> 999.7 [M+K] <sup>+</sup>
	60%	<b>J<sub>T</sub>J<sub>W</sub>J<sub>W</sub>J<sub>T</sub>K</b>	1238.63	16.1	<b>ESI (+)</b> 1240.41 [M+H] <sup>+</sup> 620.49 [(M+2H)/2] <sup>2+</sup> <b>MALDI-TOF (+)</b> 1241.0 [M+H] <sup>+</sup>
	42%	<b>J<sub>D</sub>J<sub>W</sub>K</b>	679.33	11.8	<b>ESI (+)</b> 680.08 [M+H] <sup>+</sup> 340.62 [(M+2H)/2] <sup>2+</sup>

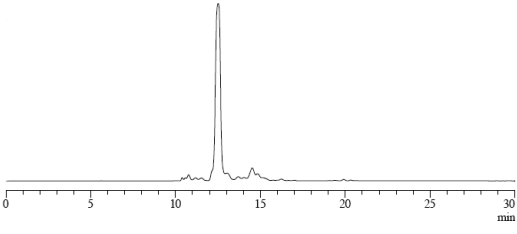
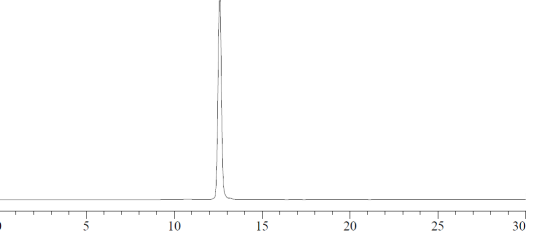
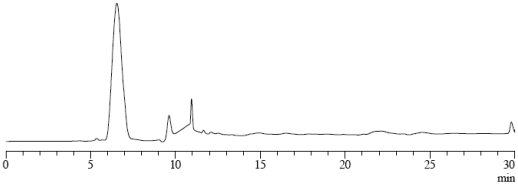
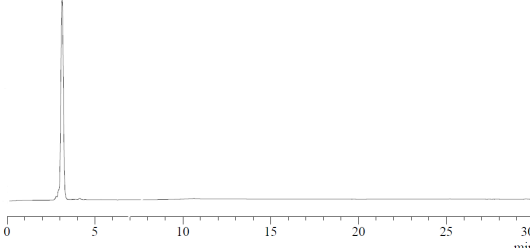
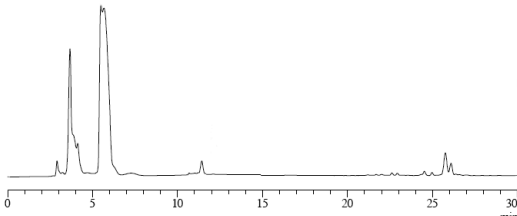
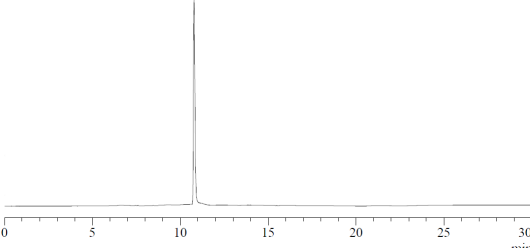
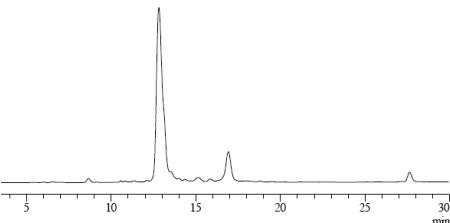
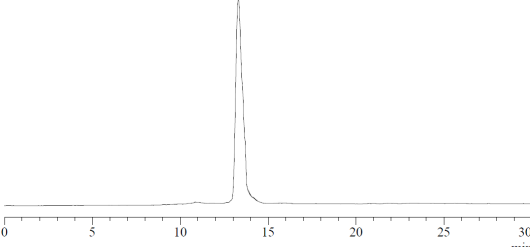
	58%	J <sub>w</sub> J <sub>D</sub> K	679.33	11.3	<p><b>ESI (+)</b>  680.03 [M+H]<sup>+</sup>  340.59 [(M+2H)/2]<sup>2+</sup></p>
	42%	J <sub>D</sub> J <sub>w</sub> J <sub>w</sub> J <sub>D</sub> K	1213.53	15.7	<p><b>ESI (+)</b>  1214.20 [M+H]<sup>+</sup>  607.82 [(M+2H)/2]<sup>2+</sup></p> <p><b>MALDI-TOF (+)</b>  1214.4 [M+H]<sup>+</sup></p>

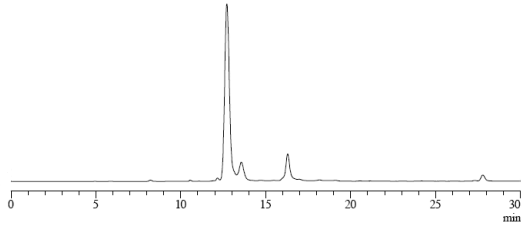
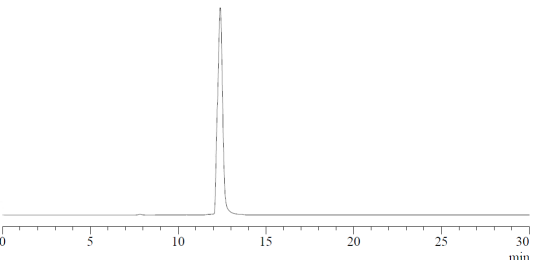
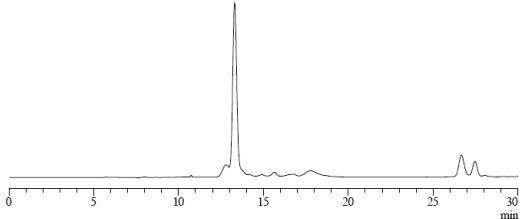
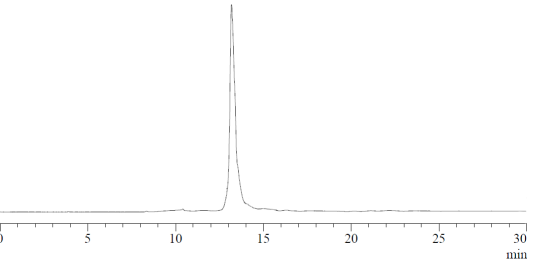
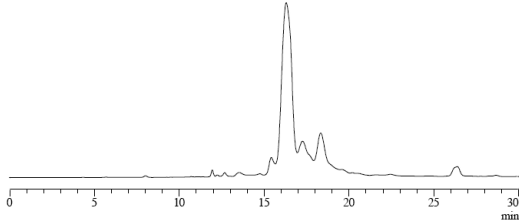
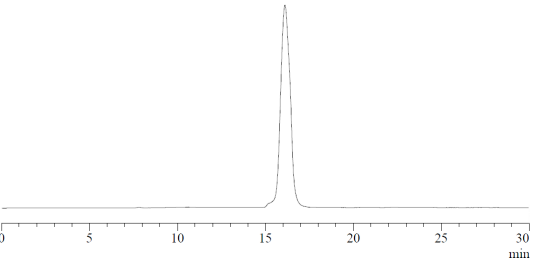
**Figure E.8.** HPLC profiles of crude and pure PNAs. Analytical HPLC (A: H<sub>2</sub>O (0.045 % TFA), B: ACN (0.036 % TFA)), Jupiter C18 Proteo from Phenomenex, gradient from 0 to 30% of B in 30 min, 1 mL/min. All chromatograms were recorded at 260 nm except for PNAs **J<sub>W</sub>K** and **J<sub>W</sub>J<sub>W</sub>K**, which were recorded at 220 nm.

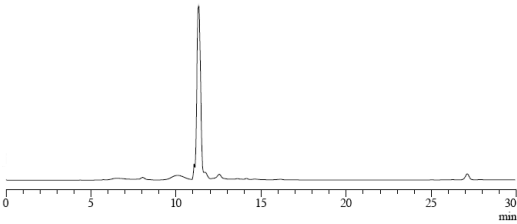
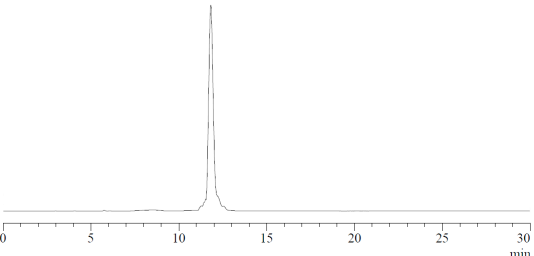
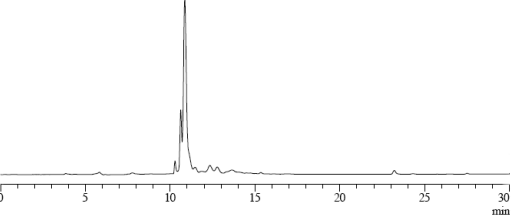
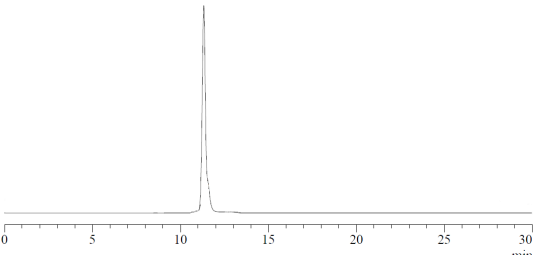
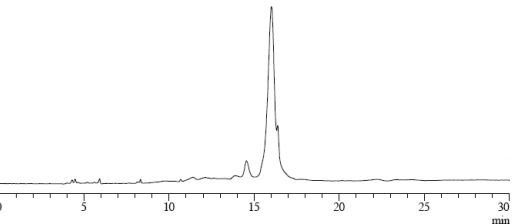
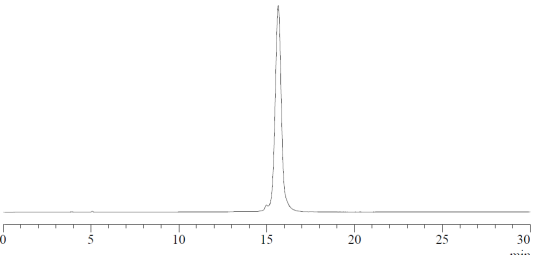


<b>J<sub>1</sub>G<sub>5</sub>J<sub>1</sub>K</b>	 <p>Chromatogram showing a single sharp peak at approximately 16 minutes. The x-axis is labeled 'min' and ranges from 0 to 30.</p>	 <p>Chromatogram showing a single sharp peak at approximately 16 minutes. The x-axis is labeled 'min' and ranges from 0 to 30.</p>
<b>J<sub>1</sub>J<sub>1</sub>K</b>	 <p>Chromatogram showing a main peak at approximately 16 minutes and a smaller peak at approximately 18 minutes. The x-axis is labeled 'min' and ranges from 0 to 30.</p>	 <p>Chromatogram showing a single sharp peak at approximately 16 minutes. The x-axis is labeled 'min' and ranges from 0 to 30.</p>
<b>J<sub>D</sub>K</b>	 <p>Chromatogram showing a complex peak structure between 8 and 12 minutes. The x-axis is labeled 'min' and ranges from 0 to 30.</p>	 <p>Chromatogram showing a single sharp peak at approximately 6 minutes. The x-axis is labeled 'min' and ranges from 0 to 30.</p>



<b>J<sub>D</sub>J<sub>D</sub>K</b>		
<b>J<sub>W</sub>K</b>		
<b>J<sub>W</sub>J<sub>W</sub>K</b>		
<b>J<sub>T</sub>J<sub>W</sub>K</b>		

<b>J<sub>W</sub>J<sub>T</sub>K</b>		
<b>J<sub>W</sub>J<sub>T</sub>J<sub>W</sub>K</b>		
<b>J<sub>T</sub>J<sub>W</sub>J<sub>W</sub>J<sub>T</sub>K</b>		

<b>J<sub>D</sub>J<sub>W</sub>K</b>		
<b>J<sub>W</sub>J<sub>D</sub>K</b>		
<b>J<sub>D</sub>J<sub>W</sub>J<sub>D</sub>K</b>		

## EXPERIMENTAL SECTION: Chapter 2

### 1. Synthesis and characterization of oligonucleotide models

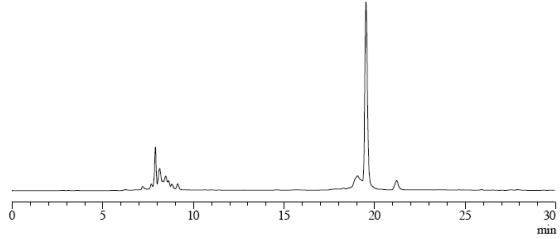
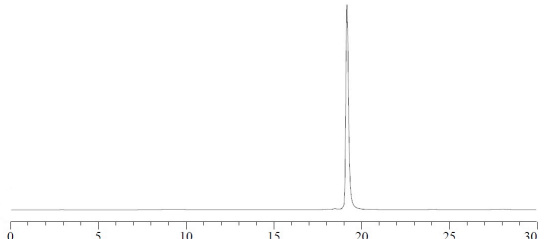
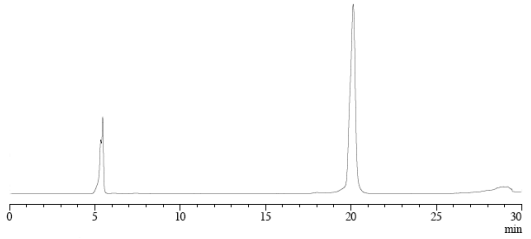
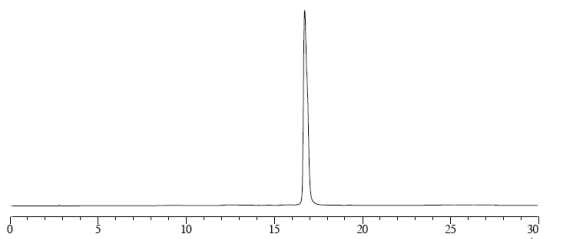
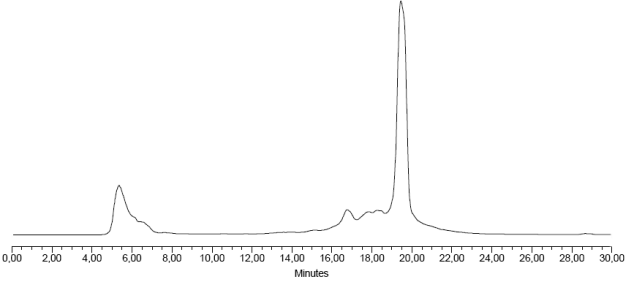
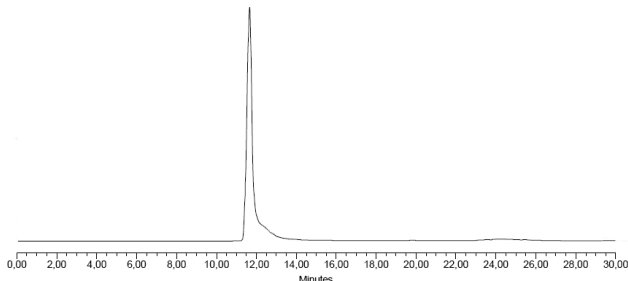
The synthesis of oligoribonucleotides G(CUG)<sub>4</sub>C, hCUG, F-hCUG, F<sub>2</sub>-hCUG and hCCUG was carried out following the standard methodology explained at the *Materials and Methods* section (Section 3.2). After chain assembly (DMT-ON) and reaction with ammonia, the RNA crude was purified by reversed-phase HPLC at the semipreparative scale (A: H<sub>2</sub>O/TEAA or AcONH<sub>4</sub> 0.1M; B: ACN, Phenomenex Jupiter C18 column, 10 μm, 250 x 10 mm, 3 mL/min, linear gradient from 10 to 50 % of B in 30 min). The DMT-oligoribonucleotide was deprotected by an acidic treatment and repurified using the same eluents (linear gradient from 0 to 40 % of B in 30 min). Final compounds were quantified by UV spectroscopy and characterized and analyzed by MS-MALDI-TOF (Table E.10.) and HPLC (Table E.11.), respectively.

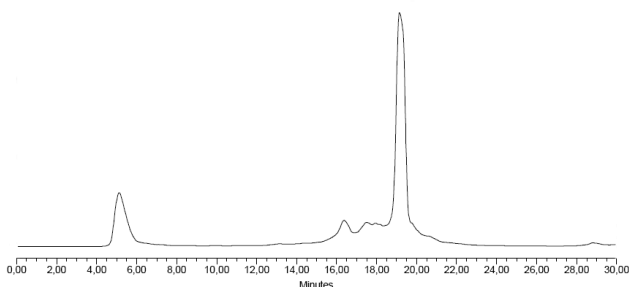
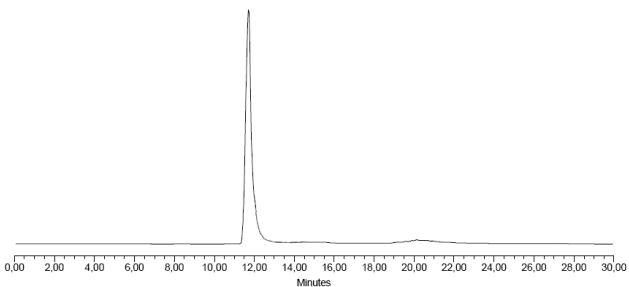
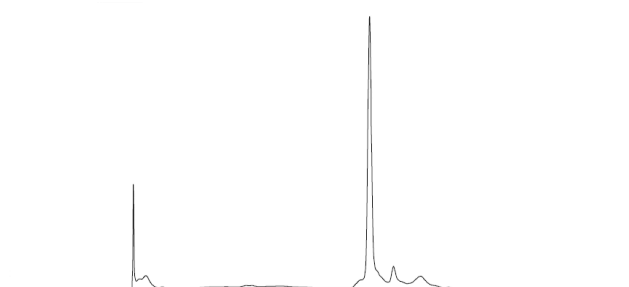
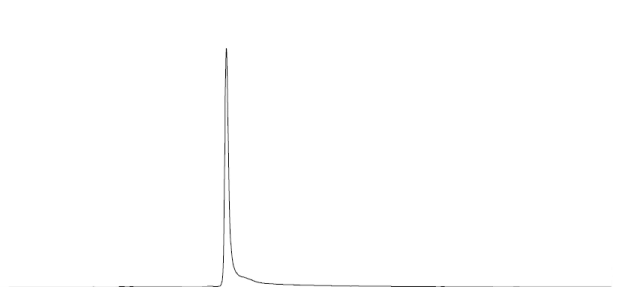
<sup>t</sup>RNA<sup>Phe</sup> and *Hairpin Control* were purchased from commercial sources, Sigma-Aldrich and IDT (Integrated DNA Technologies), respectively. The RNA 34-mer IRES was synthesized in the research group by Alejandro Trapote.

Secuence	Name	Molecular Formula	Calcd mass	Mass found
rG(CUG) <sub>4</sub> C	G(CUG) <sub>4</sub> C	C <sub>152</sub> H <sub>183</sub> N <sub>48</sub> O <sub>102</sub> P <sub>13</sub>	4414.63	[M-H] <sup>-</sup> 4415.3 [M-2H] <sup>2-</sup> /2 2207.0
rGG(CUG) <sub>2</sub> CGCAAG(CUG) <sub>2</sub> CC	hCUG	C <sub>206</sub> H <sub>261</sub> N <sub>82</sub> O <sub>154</sub> P <sub>21</sub>	7024.25	[M-H] <sup>-</sup> 7024.4
rGGCUGCU <sup>2F</sup> GCGCAAG(CUG) <sub>2</sub> CC	F-hCUG	C <sub>208</sub> H <sub>260</sub> FN <sub>82</sub> O <sub>153</sub> P <sub>21</sub>	7026.24	[M-H] <sup>-</sup> 7023.9
rGG(CU <sup>2F</sup> G) <sub>2</sub> CGCAAG(CUG) <sub>2</sub> CC	F <sub>2</sub> -hCUG	C <sub>208</sub> H <sub>259</sub> F <sub>2</sub> N <sub>82</sub> O <sub>152</sub> P <sub>21</sub>	7028.23	[M-H] <sup>-</sup> 7025.8
rGG(CCUG) <sub>2</sub> CGCAAG(CCUG) <sub>2</sub> CC	hCCUG	C <sub>244</sub> H <sub>309</sub> N <sub>94</sub> O <sub>182</sub> P <sub>25</sub>	8244.98	[M-H] <sup>-</sup> 8246.0 [M+K] 8284.2

**Table.E.10.** Mass spectrometric characterization of the synthesized RNAs.

**Table E.11.** HPLC Traces of crude and purified RNAs (quantified by UV-Vis). Crude analysis conditions: A: H<sub>2</sub>O/TEAA or H<sub>2</sub>O/ NH<sub>4</sub>Ac 0.05 M; B: ACN, linear gradient from 10 to 50 % of B in 30 min; Purified analysis conditions: A: H<sub>2</sub>O/TEAA or H<sub>2</sub>O/ NH<sub>4</sub>Ac 0.05 M; B: ACN, linear gradient from 0 to 40 % of B in 30 min .

RNA	Crude	Purified	Yield
G(CUG) <sub>4</sub> C		 $t_R = 19.2 \text{ min}$	14%
hCUG		 $t_R = 15.2 \text{ min}$	26%
F-hCUG		 $t_R = 11.6 \text{ min}$	25%

<p>F<sub>2</sub>-hCUG</p>		 <p><math>t_R = 11.6 \text{ min}</math></p>	<p>26%</p>
<p>hCCUG</p>		 <p><math>t_R = 11.2 \text{ min.}</math></p>	<p>20%</p>

## 2. Biophysical Assays

### 2.1. Thermal denaturation experiments monitored by UV spectroscopy

#### 2.1.1. 14-mer G(CUG)<sub>4</sub>C target

Thermal denaturation experiments were carried out in a high ionic strength buffer made up of sodium cacodylate (10 mM), NaCl (100 mM) and Na<sub>2</sub>EDTA (0.1 mM), pH 7.0. The experimental procedure is explained at the *Materials and Methods* section (Section 4.1). Absorbance changes were monitored at 260 nm, and the temperature gradient was 0.5°C/min, both upon heating (which provides a "melting T<sub>m</sub>" and upon cooling down "annealing T<sub>m</sub>") the sample. The inflection point of the sigmoid was considered the T<sub>m</sub>. Data are summarized in Table E.12., and two examples of melting curves are plotted in Figure 2.6 in Chapter 2.

Determined T <sub>m</sub> values for G(CUG) <sub>4</sub> C and G(CUG) <sub>4</sub> C-ligand complexes						
T <sub>m</sub> (G(CUG) <sub>4</sub> C) = 51.1 ± 0.8						
Compound 12						
Equivalents	Melting T <sub>m</sub> (°C)		Annealing T <sub>m</sub> (°C)		T <sub>m</sub> average ± SD	ΔT <sub>m</sub>
1 eq	50.3	-	50.9	52.6	51.3 ± 1.2	0.2
2 eq	49.7	-	50.1	52.8	50.9 ± 1.7	-0.2
3 eq	50.4	50.6	52.4	41.9	48.8 ± 4.7	-2.3
4 eq	52.8	50.6	40.3	-	47.9 ± 6.7	-3.2
J <sub>7</sub> K						
1 eq	49.4	-	50.2	48.1	49.2 ± 1.1	-1.9
2 eq	49.4	-	49.6	-	49.5 ± 0.1	-1.6
3 eq	50.5	-	49.2	-	49.9 ± 0.9	-1.2
4 eq	46.7	-	53.3	54.8	51.6 ± 4.3	0.5
J <sub>7</sub> G <sub>4</sub> J <sub>7</sub> K						
1 eq	44.7	53.7	50.8	53.8	50.8 ± 4.3	-0.3
2 eq	52.3	-	54.2	-	53.3 ± 1.3	2.2

**Table E.12.** Determined T<sub>m</sub> values of 14-mer G(CUG)<sub>4</sub>C in the presence of compound **12**, and ligands J<sub>7</sub>K and J<sub>7</sub>G<sub>4</sub>J<sub>7</sub>K. SD= standard deviation.

#### 2.1.2. hCUG in high ionic strength buffer

The melting curves of hCUG were first recorded in the same conditions described above (2.1.1) adjusting the pH to the required value (5.5 or 7.0).

In melting curves with only one transition (annealings), the inflection point of the sigmoid was

considered the  $T_m$  value, whereas in curves with two transitions (meltings), the derivative method was employed and  $T_m$  was the temperature corresponding to the maximum of the first derivate. Data are summarized in Tables E.13. (hCUG), E.14. (hCUG with  $J_T$  ligands) and E.15. (hCUG with ligands containing  $J_W$ ). Since none of them can be strictly considered the actual  $T_m$  value, they are referred to as "pseudo  $T_m$ " in the tables.

<b>2-mer hCUG <math>T_m</math> (°C)</b>	
<b>pH 5.50</b>	$70.2 \pm 0.6$ °C
<b>pH 7.00</b>	$69.8 \pm 1.2$ °C

**Table E.13.** hCUG  $T_m$  values in 10mM sodium cacodylate buffer with 100 mM NaCl and 0.1 mM EDTA at different pHs. .



**Table E.14.** Pseudo $T_m$  values of hCUG in the presence of the corresponding ligand, number of equivalents of ligand and pH. The values are the average of a minimum of two curves.  $c_{\text{oligo}} = 2 \mu\text{M}$ . ND= not determined

Pseudo $T_m$ values for hCUG in the presence of $J_T$ ligands. $\Delta T_m$ values are indicated inside parenthesis									
pH 5.50									
	Melting $T_m$ ( $^{\circ}\text{C}$ )						Annealing $T_m$ ( $^{\circ}\text{C}$ )		
	First transition			Second transition					
Ligand	1 eq	2 eq	4 eq	1 eq	2 eq	4 eq	1 eq	2 eq	4 eq
<b>12</b>	ND	$23.7 \pm 0.4$	$35.9 \pm 0.1$	ND	$68.6 \pm 0.8$ (-1.6)	$72.8 \pm 0.5$ (+2.6)	ND	$71.3 \pm 0.2$ (+1.1)	$74.0 \pm 0.4$ (+3.8)
<b><math>J_T</math>K</b>	ND	$33.6 \pm 0.6$	ND	ND	$70.6 \pm 0.1$ (+0.4)	ND	ND	$71.7 \pm 0.4$ (+1.5)	ND
<b><math>J_T</math>G<sub>4</sub><math>J_T</math>K</b>	$32.6 \pm 0.1$	ND	ND	$69.5 \pm 0.8$ (-0.7)	ND	ND	$71.9 \pm 0.1$ (+1.7)	ND	ND
pH 7.00									
	Melting $T_m$ ( $^{\circ}\text{C}$ )						Annealing $T_m$ ( $^{\circ}\text{C}$ )		
	First transition			Second transition					
Ligand	1 eq	2 eq	4 eq	1 eq	2 eq	4 eq	1 eq	2 eq	4 eq
<b>12</b>	$37.5 \pm 0.1$	$36.7 \pm 0.0$	$34.7 \pm 0.6$	$71.1 \pm 0.4$ (+1.3)	$73.3 \pm 0.2$ (+3.5)	$71.8 \pm 0.6$ (+2.0)	$71.8 \pm 0.3$ (+2.0)	$69.1 \pm 0.7$ (-0.7)	$71.7 \pm 1.0$ (+1.9)
<b><math>J_T</math>K</b>	$68.7 \pm 0.9$	$35.9 \pm 0.0$	ND	$70.9 \pm 0.1$ (+1.1)	$72.3 \pm 0.0$ (+2.5)	ND	$71.5 \pm 0.0$ (+1.7)	$68.0 \pm 0.3$ (-1.8)	ND
<b><math>J_T</math>G<sub>4</sub><math>J_T</math>K</b>	$36.8 \pm 0.0$	ND	ND	$72.2 \pm 0.0$ (+2.4)	ND	ND	$69.8 \pm 1.0$ (+0.0)	ND	ND

**Table E.15.** Pseudo $T_m$  values of hCUG in the presence of the corresponding ligand, number of equivalents of ligand and pH. The values are the average of a minimum of two curves.  $c_{oligo} = 2 \mu\text{M}$ . ND= not determined.

Pseudo $T_m$ values for hCUG in the presence of $J_w$ ligands. $\Delta T_m$ values are indicated inside parenthesis									
pH 5.50									
	Melting $T_m$ ( $^{\circ}\text{C}$ )						Annealing $T_m$ ( $^{\circ}\text{C}$ )		
	First transition			Second transition			1 eq	2 eq	4 eq
Ligand	1 eq	2 eq	4 eq	1 eq	2 eq	4 eq	1 eq	2 eq	4 eq
$J_wK$	ND	ND	$33.8 \pm 4.8$	ND	ND	$72.7 \pm 0.6$ (+2.5)	ND	ND	$71.8 \pm 0.5$ (+1.6)
$J_{\uparrow}J_wK$	ND	ND	ND	$71.7 \pm 0.8$ (+1.5)	$72.0 \pm 1.2$ (+1.8)	ND	$71.6 \pm 0.9$ (+1.4)	$72.2 \pm 1.6$ (+2.0)	ND
$J_wJ_{\uparrow}K$	ND	ND	ND	$72.4 \pm 1.1$ (+2.2)	$71.8 \pm 0.8$ (+1.6)	ND	$72.2 \pm 1.0$ (+2.0)	$72.1 \pm 0.5$ (+1.9)	ND
$J_wJ_{\uparrow}J_wK$	$33.0 \pm 2.9$	$31.2 \pm 5.4$	ND	$72.7 \pm 0.6$ (+2.5)	$71.4 \pm 2.4$ (+1.2)	ND	$72.0 \pm 0.4$ (+1.8)	$72.0 \pm 0.6$ (+1.8)	ND
$J_{\uparrow}J_wJ_wJ_{\uparrow}K$	ND	ND	ND	$71.6 \pm 0.7$ (+1.4)	ND	ND	$71.6 \pm 0.9$ (+1.4)	-	ND

Tabla E.15. (Continuation)

pH 7.00									
	Melting $T_m$ (°C)						Annealing $T_m$ (°C)		
	First transition			Second transition			1 eq	2 eq	4 eq
Ligand	1 eq	2 eq	4 eq	1 eq	2 eq	4 eq	1 eq	2 eq	4 eq
J <sub>W</sub> K	ND	ND	35.0 ± 0.0	ND	ND	71.6 ± 0.0 (+1.8)	ND	ND	69.1 ± 0.1 (-0.7)
J <sub>T</sub> J <sub>W</sub> K	ND	ND	ND	71.9 ± 0.9 (+2.1)	72.0 ± 1.3 (+2.2)	ND	72.1 ± 0.6 (+2.3)	71.9 ± 0.1 (+2.1)	ND
J <sub>W</sub> J <sub>T</sub> K	ND	ND	ND	72.0 ± 0.9 (+2.2)	73.0 ± 1.3 (+3.2)	ND	71.9 ± 0.7 (+2.1)	73.5 ± 1.5 (+3.7)	ND
J <sub>W</sub> J <sub>T</sub> J <sub>W</sub> K	35.3 ± 0.0	36.9 ± 2.2	ND	73.1 ± 0.0 (+3.3)	72.4 ± 0.0 (+2.6)	ND	72.7 ± 1.5 (+2.9)	72.7 ± 1.7 (+2.9)	ND
J <sub>T</sub> J <sub>W</sub> J <sub>W</sub> J <sub>T</sub> K	ND	ND	ND	72.3 ± 0.8 (+2.5)	ND	ND	72.1 ± 0.4 (+2.3)	ND	ND

### 2.1.3. hCUG in low ionic strength buffer

Thermal denaturation experiments of hCUG were also carried out using a low ionic strength buffer made up of sodium phosphates ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM) at pH 7.0. The experimental procedure is explained at the *Materials and Methods* section (Section 4.1). Absorbance changes were monitored at 260 nm, and the temperature gradient was  $0.5^\circ\text{C}/\text{min}$ . The median method was employed to determine  $T_m$  values. Data are summarized in Table E.16.

T <sub>m</sub> values for hCUG-ligand complexes						
T <sub>m</sub> (hCUG,pH 7.00)= 63.2 ± 0.2°C						
Ligand	1 eq		2 eq		4 eq	
	T <sub>m</sub> (°C)	ΔT <sub>m</sub> (°C)	T <sub>m</sub> (°C)	ΔT <sub>m</sub> (°C)	T <sub>m</sub> (°C)	ΔT <sub>m</sub> (°C)
<b>12</b>	62.7 ± 0.8	-0.5	63.2 ± 0.1	0.0	63.1 ± 0.4	-0.1
J <sub>T</sub> K	62.9 ± 0.6	-0.3	63.0 ± 0.1	-0.2	-	-
J <sub>T</sub> G <sub>3</sub> J <sub>T</sub> K	62.8 ± 0.1	-0.5	-	-	-	-
J <sub>T</sub> G <sub>4</sub> J <sub>T</sub> K	63.2 ± 0.3	0.0	-	-	-	-
J <sub>T</sub> G <sub>5</sub> J <sub>T</sub> K	63.6 ± 0.2	+0.4	-	-	-	-
J <sub>W</sub> K	63.2 ± 0.0	0.0	62.9 ± 0.7	-0.3	62.4 ± 0.4	-0.8
J <sub>T</sub> J <sub>W</sub> K	62.9 ± 0.5	-0.3	62.9 ± 0.9	-0.3	62.8 ± 1.0	-0.4

Table E2.16. T<sub>m</sub> values of target hCUG in the presence of different ligands at pH 7.0.

### 2.1.4. Fluorinated hCUG

The melting curves of F-hCUG and F<sub>2</sub>-hCUG (40 μM) were recorded in the same conditions described above (2.1.3). Data are summarized in Tables E.17.

T <sub>m</sub> (°C)	F-hCUG	F <sub>2</sub> -hCUG
		62.7 ± 0.1 °C

Table E.17. T<sub>m</sub> values of the fluorinated hCUG at c= 40 μM at pH 7.0.

### 2.1.5. hCCUG

Melting curves with hCCUG were carried out in a low ionic strength buffer of sodium phosphates ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) (10 mM) at pH 5.5 and 7.0. The experimental procedure is explained in *Materials and Methods* (Section 4.1). Measurements were done at 260 nm with a temperature gradient of  $0.5^\circ\text{C}/\text{min}$ . Median method was employed to determine T<sub>m</sub> value. Data are resumed in Table E.18.

T <sub>m</sub> values for hCCUG-ligand complexes. ΔT <sub>m</sub> values are indicated inside parenthesis						
T <sub>m</sub> (hCCUG, pH 5.50)= 74.2 ± 0.4 °C T <sub>m</sub> (hCCUG, pH 7.00)= 68.4 ± 0.8 °C						
T <sub>m</sub> (ΔT <sub>m</sub> ) °C						
Ligand	pH 5.50			pH 7.00		
	1 eq	2 eq	4 eq	1 eq	2 eq	4 eq
J <sub>D</sub> K	ND	ND	ND	67.9 ± 0.45 (-0.5)	67.8 ± 0.2 (-0.6)	67.9 ± 0.0 (-0.5)
J <sub>D</sub> J <sub>D</sub> K	ND	ND	ND	68.0 ± 0.3 (-0.4)	68.0 ± 0.4 (-0.4)	ND
J <sub>T</sub> K	74.3 ± 0.8 (+0.1)	73.8 ± 0.4 (-0.4)	73.5 ± 0.4 (-0.7)	ND	ND	ND
J <sub>T</sub> J <sub>T</sub> K	74.2 ± 0.1 (0.0)	73.7 ± 1.2 (-0.5)	ND	68.5 ± 1.1 (+0.1)	68.9 ± 0.6 (+0.5)	ND

**Tabla E.18.** Determined T<sub>m</sub> values of hCCUG in the presence of the corresponding ligand, number of equivalents of ligand and pH. Values are the average of a minimum of two experiments. c<sub>oligo</sub> = 2 μM. ND= not determined.

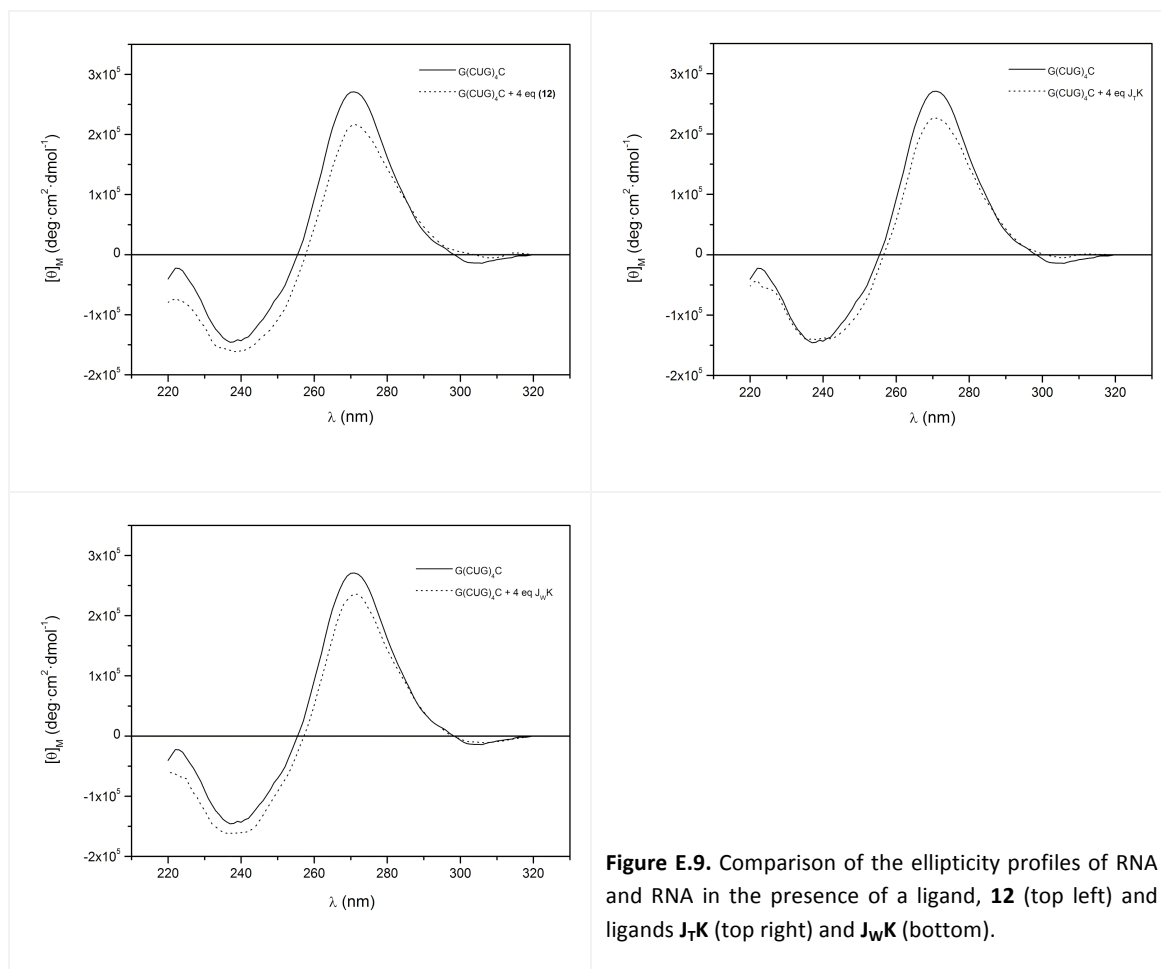
## 2.2. Circular dichroism experiments

### 2.2.1. 14-mer G(CUG)<sub>4</sub>C

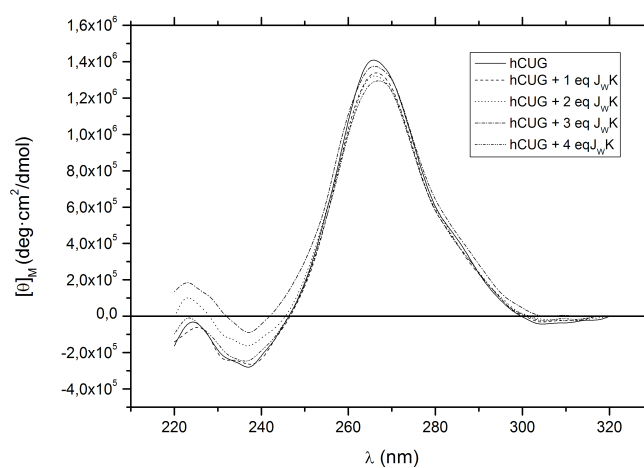
Circular dichroism (CD) spectra were recorded as explained at the *Materials and Methods* section (Section 4.2). In this case high ionic strength conditions were used: sodium cacodylate (10 mM) buffer with NaCl (100 mM) and Na<sub>2</sub>EDTA (0.1 mM) at pH 7.0. The RNA concentration was 2 μM. Molar ellipticity was plotted against wavelength (Figure E.9). Usually, a smoothing process was required.

### 2.2.2. hCCUG in high ionic strength buffer

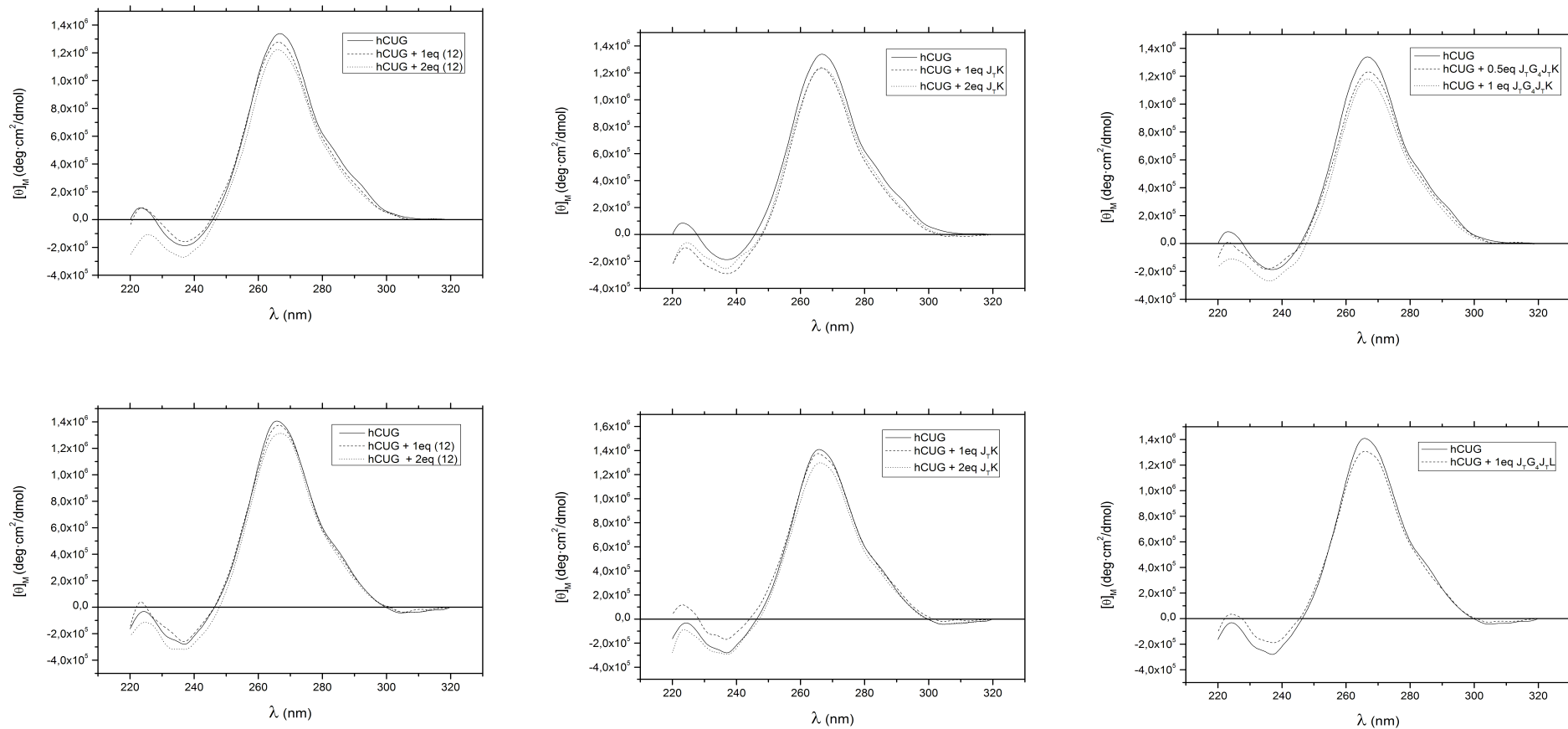
The buffer used was the same as above (2.2.1), adjusting the pH to either 5.5 or 7.0. The RNA concentration was 2 μM. Results are assembled in Figures E.10 and E.11.



**Figure E.9.** Comparison of the ellipticity profiles of RNA and RNA in the presence of a ligand, **12** (top left) and ligands **J7K** (top right) and **JW7K** (bottom).



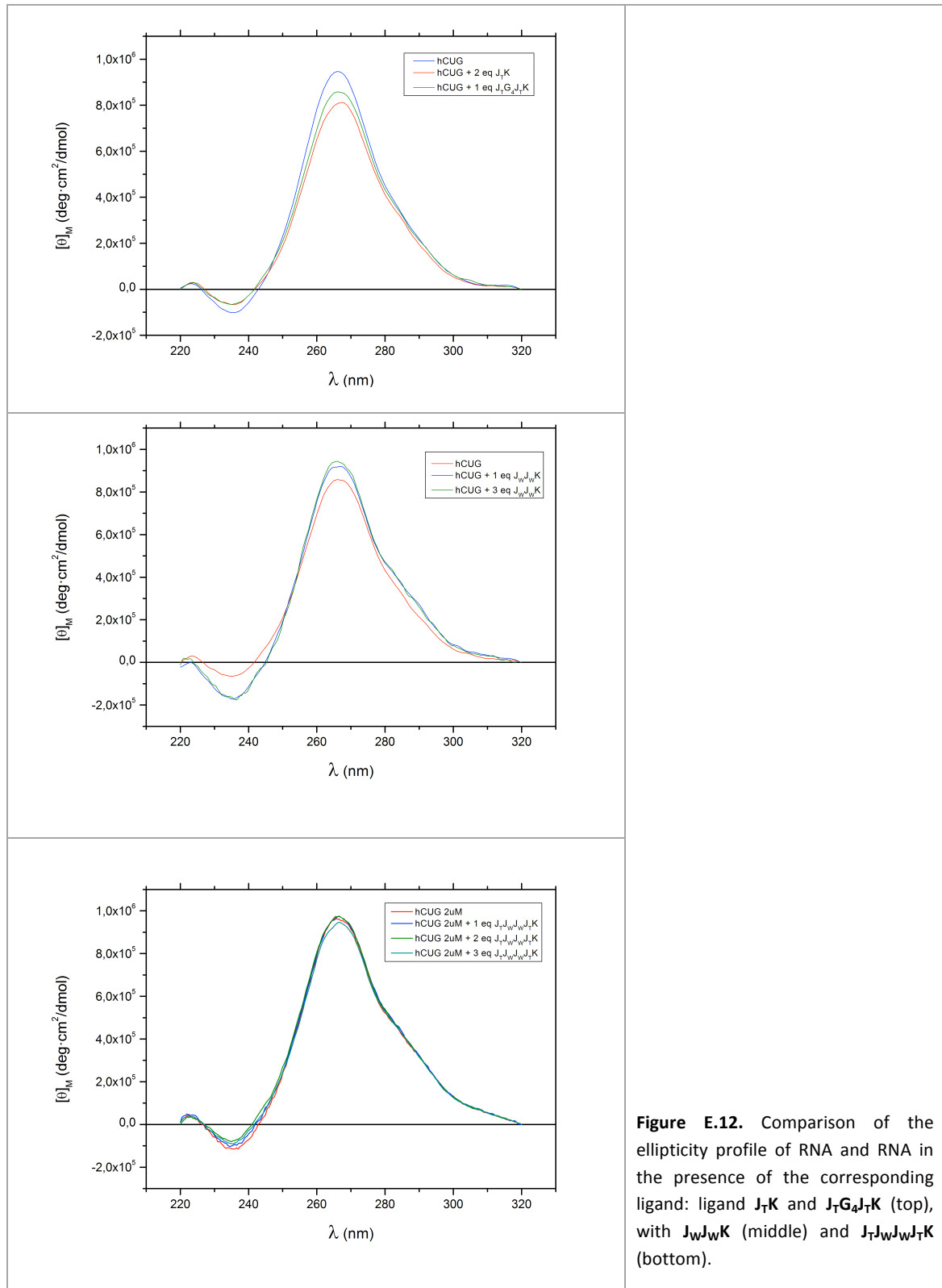
**Fig.E.10.** CD Titration of hCUG (2  $\mu\text{M}$ ) with increasing amounts of ligand **JW7K** recorded at pH 7.0.



**Fig.E.11.** Comparison of the ellipticity profiles of RNA and RNA in the presence of the corresponding ligand, **12** (left), ligand J<sub>1</sub>K (middle) and J<sub>1</sub>G<sub>4</sub>J<sub>1</sub>K (right) recorded at pH 5.50 (top) and 7.0 (bottom).

### 2.2.3. hCUG in low ionic strength

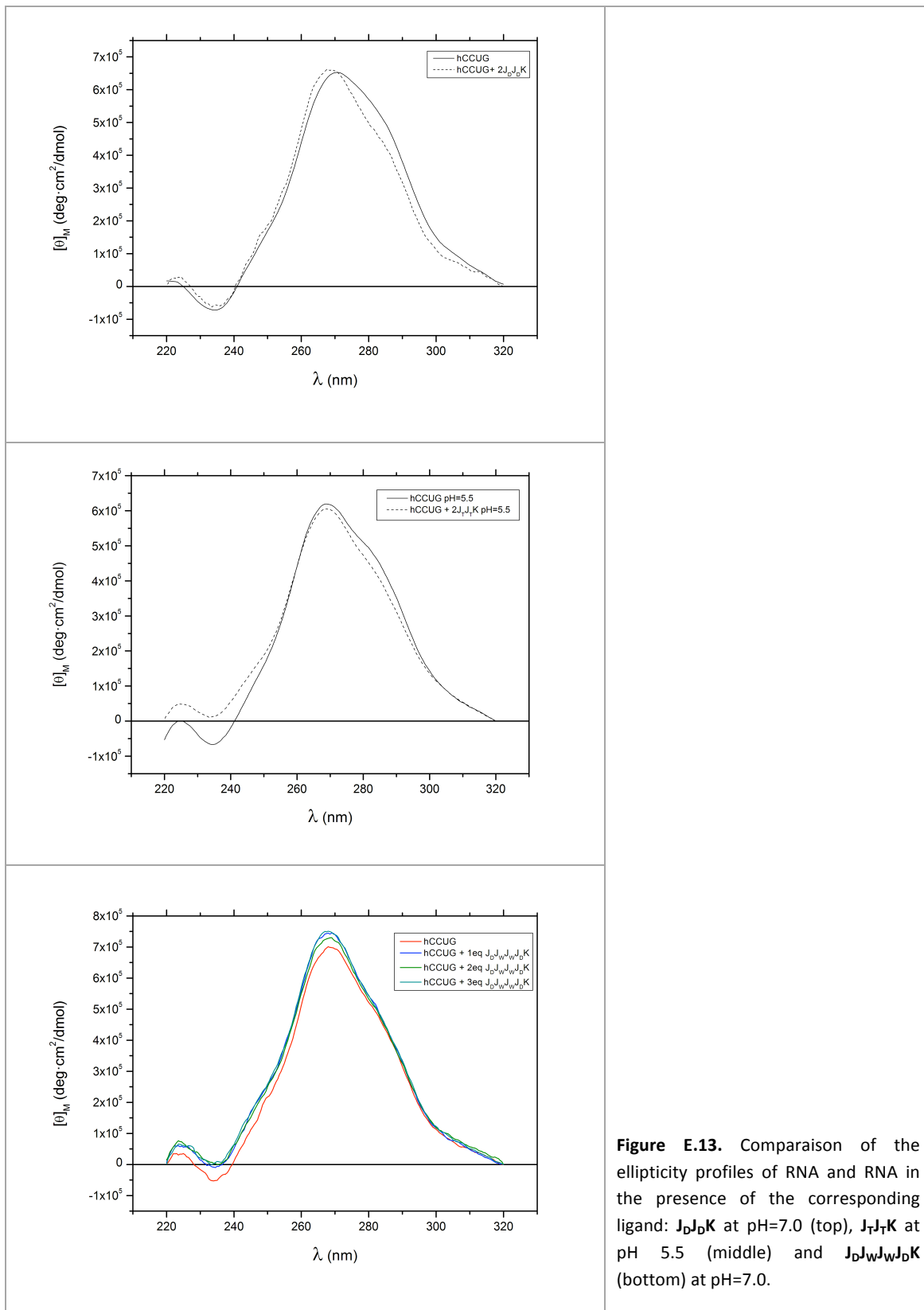
CD measurements were recorded as explained in *Materials and Methods* (Section 4.2). In this case, low ionic strength conditions were used: 10 mM phosphate buffer ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) at pH 7.0. The RNA concentration used was 2  $\mu\text{M}$ . Results are assembled in Figure E.12.





### 2.2.4. hCCUG

The experiments were carried out in the same conditions described above (2.2.3) adjusting the pH to either 5.5 or 7.0. Results are assembled in Figure E.13.



**Figure E.13.** Comparison of the ellipticity profiles of RNA and RNA in the presence of the corresponding ligand: J<sub>D</sub>J<sub>D</sub>K at pH=7.0 (top), J<sub>T</sub>J<sub>T</sub>K at pH 5.5 (middle) and J<sub>D</sub>J<sub>W</sub>J<sub>W</sub>J<sub>D</sub>K (bottom) at pH=7.0.

### 2.3. Isothermal titration calorimetry (ITC)

An ITC experiment provides all the thermodynamic parameters of a ligand-target interaction. The area of the obtained peaks correlates with the binding enthalpy. By adjusting the curve from the peak areas to a binding model equation, stoichiometry and binding constant values can be also determined. Finally, if the binding constant is converted to a  $\Delta G$  value, the entropy variation of the interaction event can also be disclosed.

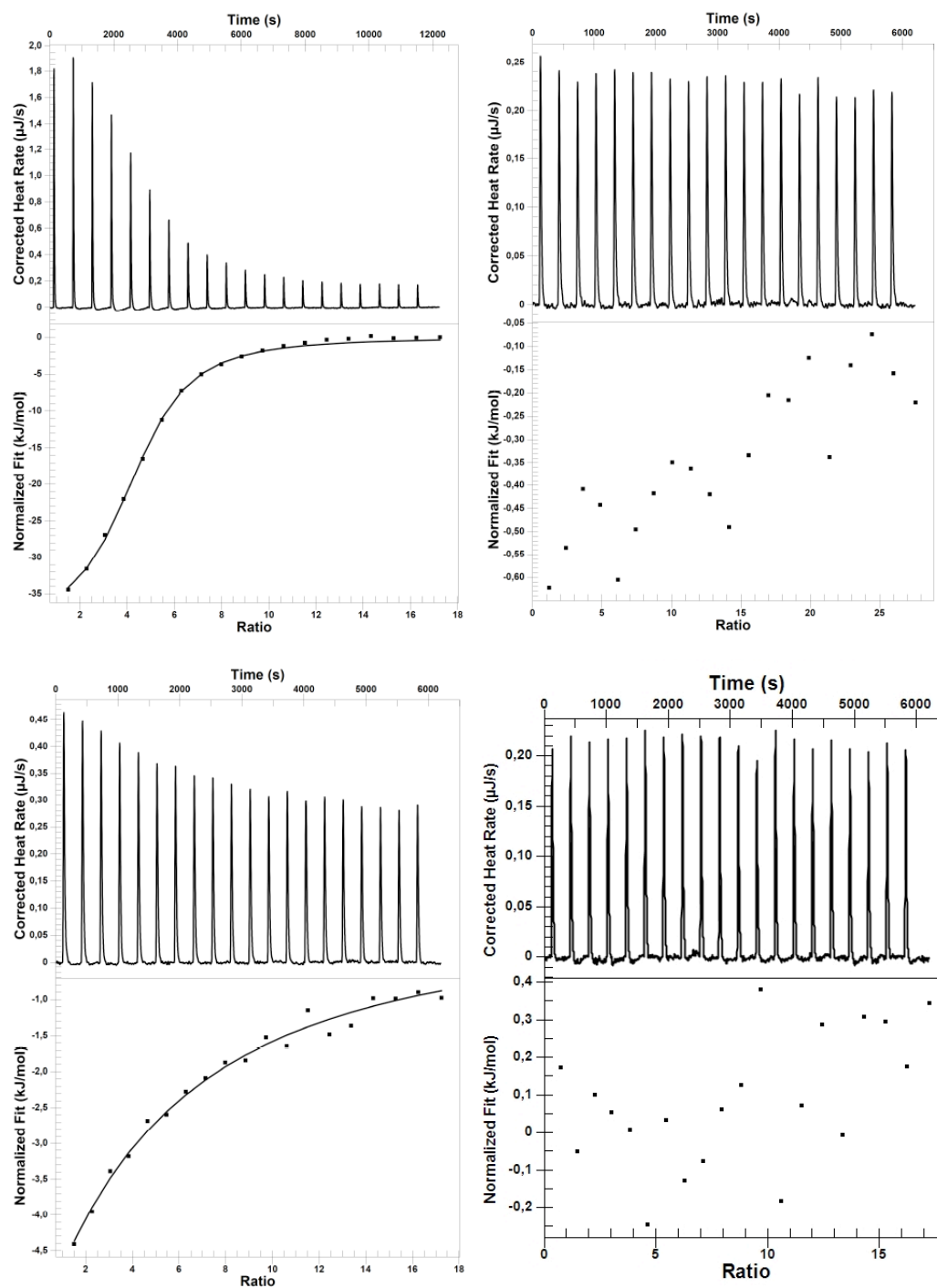
#### 2.3.1. hCUG in high ionic strength buffer

ITC Assays were performed using 10 mM sodium cacodylate buffer with NaCl (100 mM) and Na<sub>2</sub>EDTA (0.1 mM) at pH 7.0. The temperature was set up at 25 °C and stirring was constant at 250 rpm. Many attempts were made to find good conditions to carry out the experiments. In these assays different RNA concentrations were used (1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M and 10 $\mu$ M), and it was observed that 10  $\mu$ M was enough to obtain perceptible heats. Different ligand concentrations were also tested (100  $\mu$ M, 200  $\mu$ M, 400  $\mu$ M and 500  $\mu$ M), the higher concentrations providing best results. Some of the experiments using the synthesized ligands are shown, and also experiments with neomicine and Ac-Lys-CONH<sub>2</sub>. All of them were adjusted to an *Independent model* which resulted in the best fit (Table E.19, Figures E.14 and E.15).

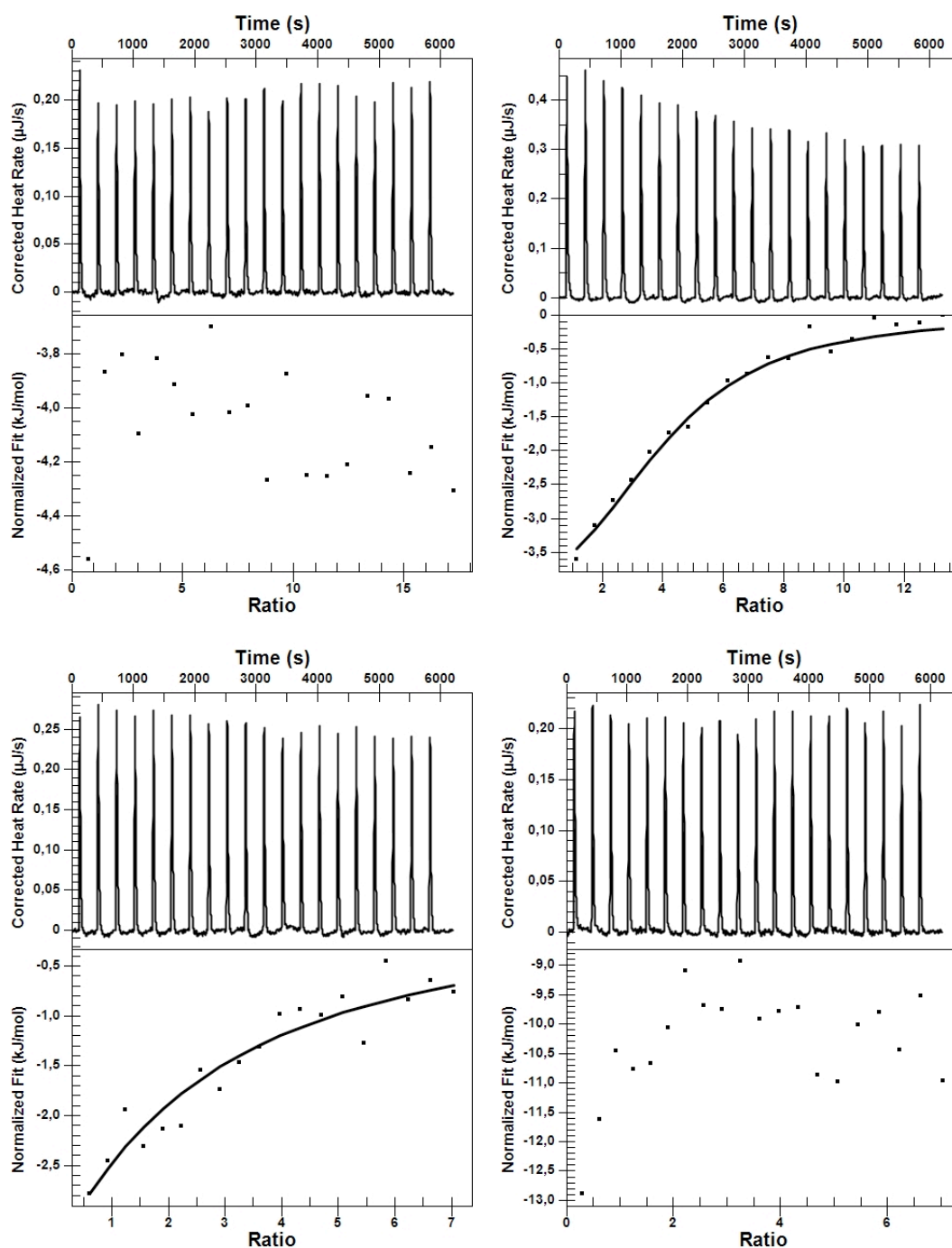
Thermodynamic parameter	Neomicine	Ac-Lys-NH <sub>2</sub>	12	J <sub>T</sub> K
K <sub>d</sub> ( $\mu$ M)	3.2 $\pm$ 0.2	No heat detected	No heat detected	128.0 $\pm$ 16.3
n	4.33 $\pm$ 0.05			0.37 $\pm$ 0.81
$\Delta H$ (KJ/mol)	-39.0 $\pm$ 0.7			-217.1 $\pm$ 56.4
$\Delta S$ (J/mol·K)	-25.5			-653.7 $\pm$ 346.3
-T· $\Delta S$ (KJ/mol)	7.6			194.9 $\pm$ 103.2
$\Delta G$ (KJ/mol)	-31.4			-22.2

Thermodynamic parameter	J <sub>W</sub> K	J <sub>T</sub> J <sub>W</sub> K	J <sub>W</sub> J <sub>T</sub> K	J <sub>W</sub> J <sub>T</sub> J <sub>W</sub> K
K <sub>d</sub> ( $\mu$ M)	No heat detected	174.6 $\pm$ 31.6	265.9 $\pm$ 118.0	No heat detected
n		2.14 $\pm$ 1.48	2.13 $\pm$ 1.43	
$\Delta H$ (KJ/mol)		-54.2 $\pm$ 30.4	-60.3 $\pm$ 38.8	
$\Delta S$ (J/mol·K)		-109.9	-133.7	
-T· $\Delta S$ (KJ/mol)		32.8	39.9	
$\Delta G$ (KJ/mol)		-21.4	-20.4	

**Table E.19.** Thermodynamic parameters of the interaction between hCUG (10  $\mu$ M) and neomicine (500 $\mu$ M), Ac-Lys-NH<sub>2</sub> (500 $\mu$ M), compound **12** (800  $\mu$ M), J<sub>T</sub>K (500  $\mu$ M), J<sub>W</sub>K (500  $\mu$ M), J<sub>T</sub>J<sub>W</sub>K (500  $\mu$ M), J<sub>W</sub>J<sub>T</sub>K (200  $\mu$ M) and J<sub>W</sub>J<sub>T</sub>J<sub>W</sub>K (200  $\mu$ M). 10 mM sodium cacodylate buffer with NaCl (100 mM) and Na<sub>2</sub>EDTA (0.1 mM) at pH 7.0 and 25°C. Values are the average of two experiments.



**Figure E.14.** ITC Experiments with hCUG and neomicine (500  $\mu\text{M}$ , top left), compound **12** (800  $\mu\text{M}$ , top right), **J-K** (500  $\mu\text{M}$ , bottom left) and Ac-Lys-CONH<sub>2</sub> (500  $\mu\text{M}$ , bottom right).

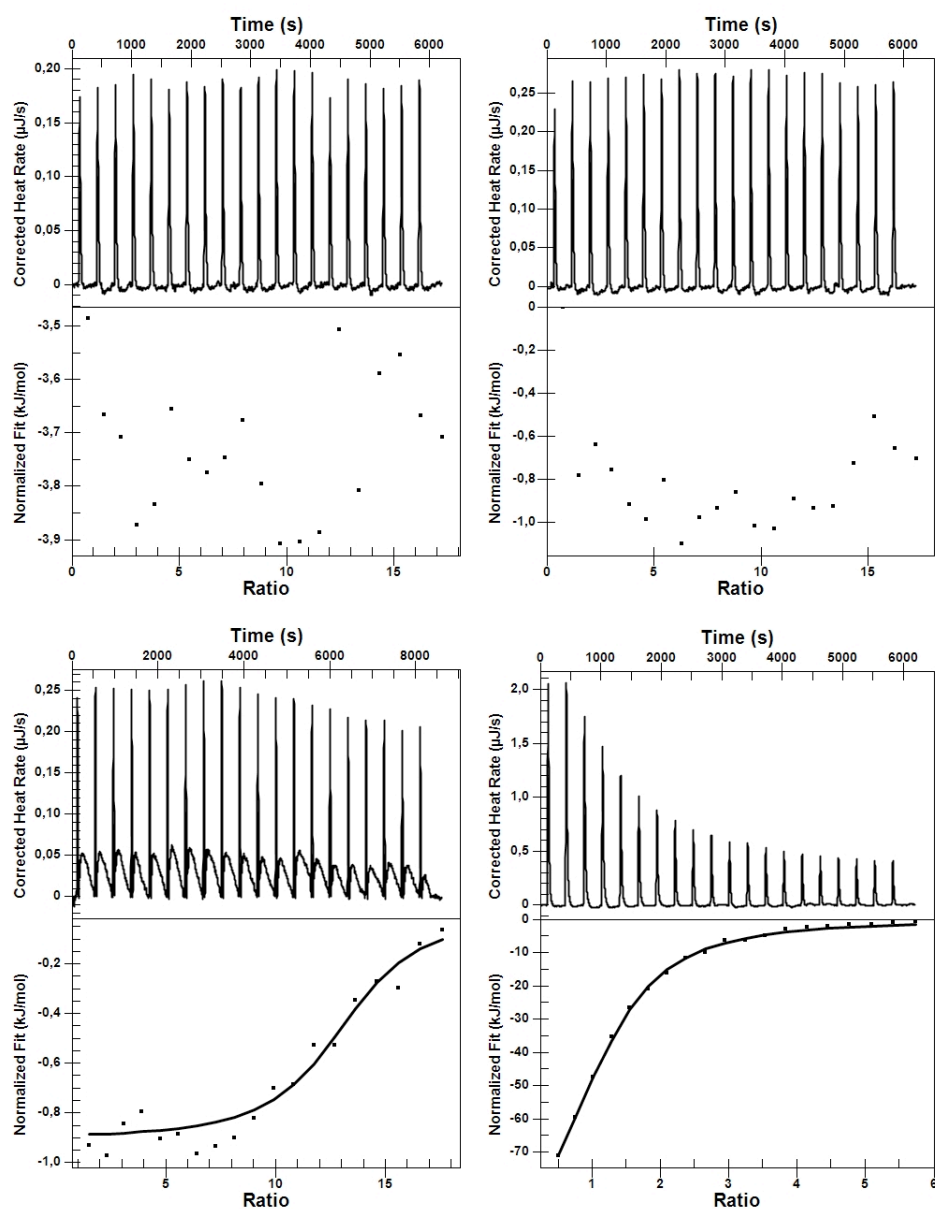


**Figure E.15.** ITC Experiments with hCUG and  $J_WK$  (500 μM, top left),  $J_TJ_WK$  (500 μM, top right),  $J_WJ_TK$  (200 μM, bottom left) and  $J_WJ_TJ_WK$  (200 μM, bottom right).

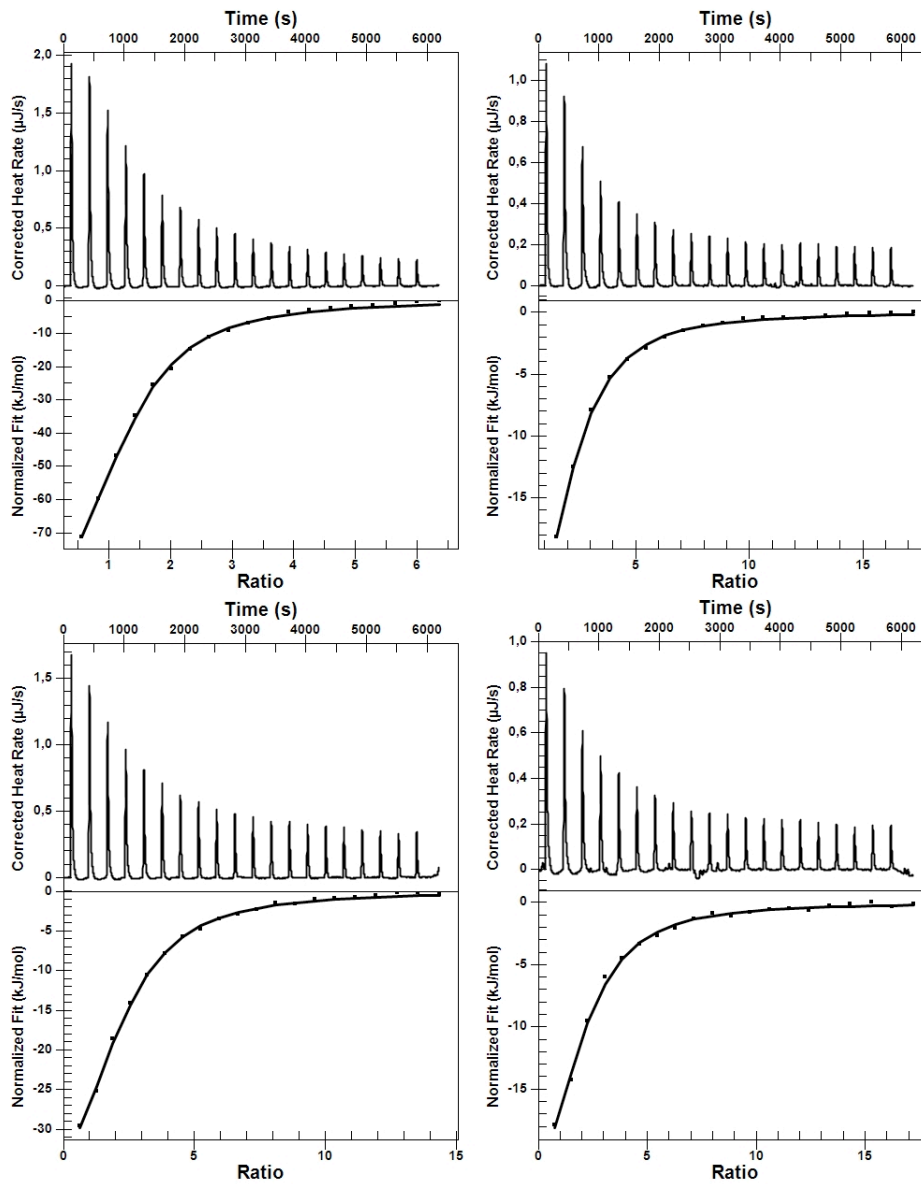
### 2.3.2. hCUG in low ionic strength

ITC Assays were performed using 10 mM sodium phosphate generally at pH 7.0 (pH 5.50 and 8.0 were used in one pH dependence study). Temperature was set up at 25 °C and stirring was constant at 250 rpm. The RNA concentration was always 10 μM, and ligand concentration depended on the stoichiometry of the complex. In the case of monomeric ligands a 500 μM was used, whereas for dimeric ligands 250 μM was enough to obtain adjustable heats and good slopes. In figures E.16 - E.18 some of the experiments are shown. All of them were adjusted to an *Independent model* which resulted in the best fit. Values of thermodynamic

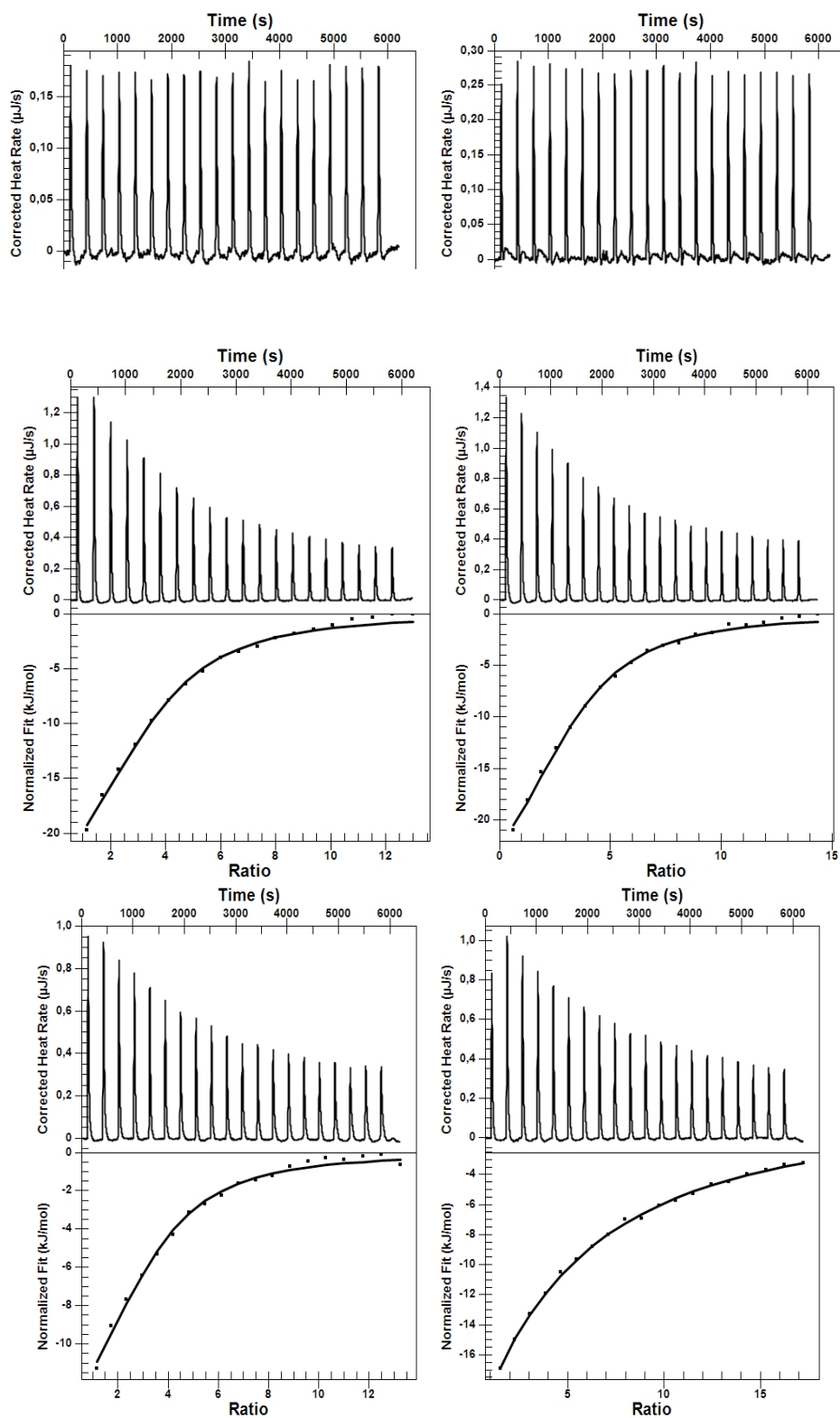
parameters, which are the average of a minimum of two experiments, are shown in Chapter 2.



**Figure E.16.** ITC Experiments with hCUG and Ac-Lys-CONH<sub>2</sub> (500 μM, top left), compound **12** (500 μM, top right), compound **12** at 50°C (500 μM, bottom left), J<sub>7</sub>G<sub>4</sub>J<sub>7</sub>K (250 μM, bottom right).



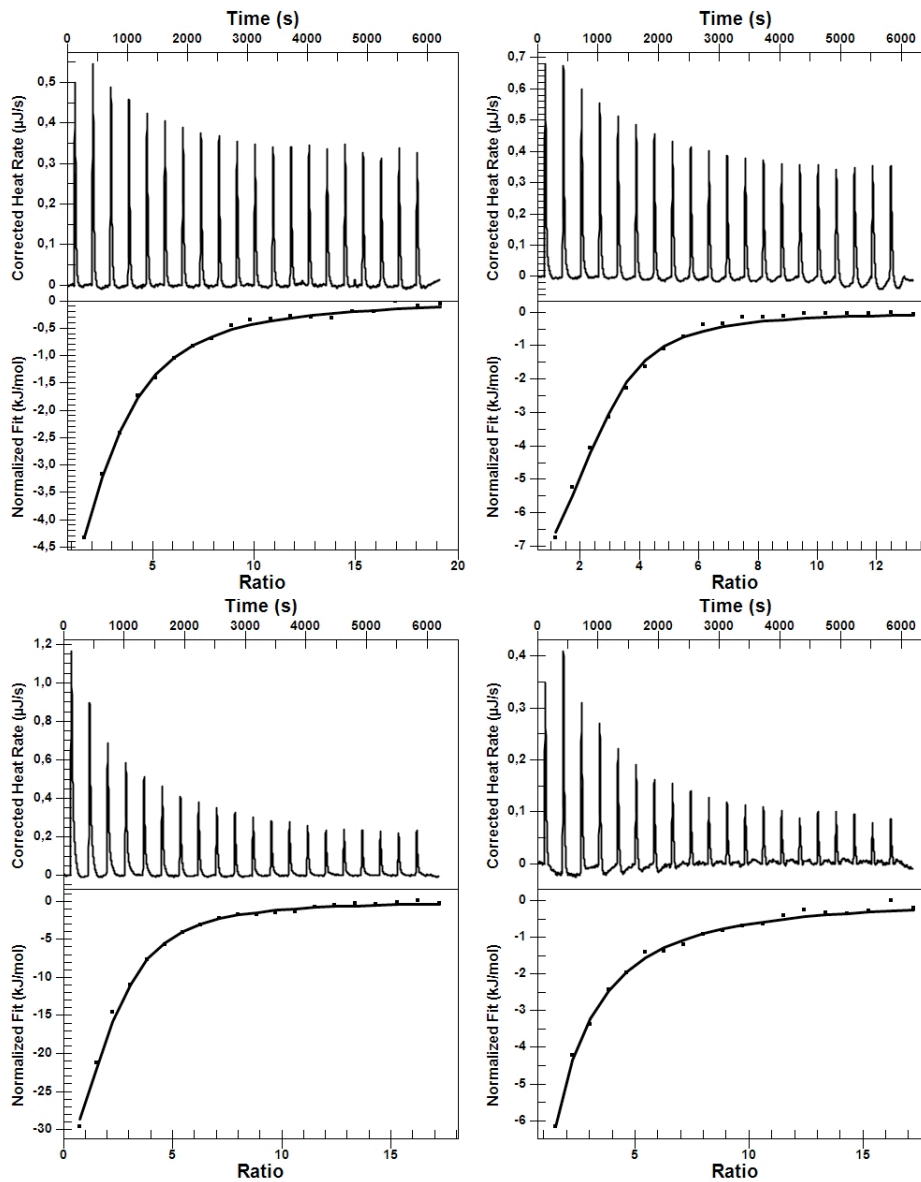
**Figure E.17.** ITC experiments with hCUG and J<sub>7</sub>G<sub>5</sub>J<sub>7</sub>K (250 μM, top left) and J<sub>7</sub>K pH 5.50 (500 μM, top right), J<sub>7</sub>K pH 7.0 (500 μM, bottom left), J<sub>7</sub>K pH 8.0 (500 μM, bottom right).



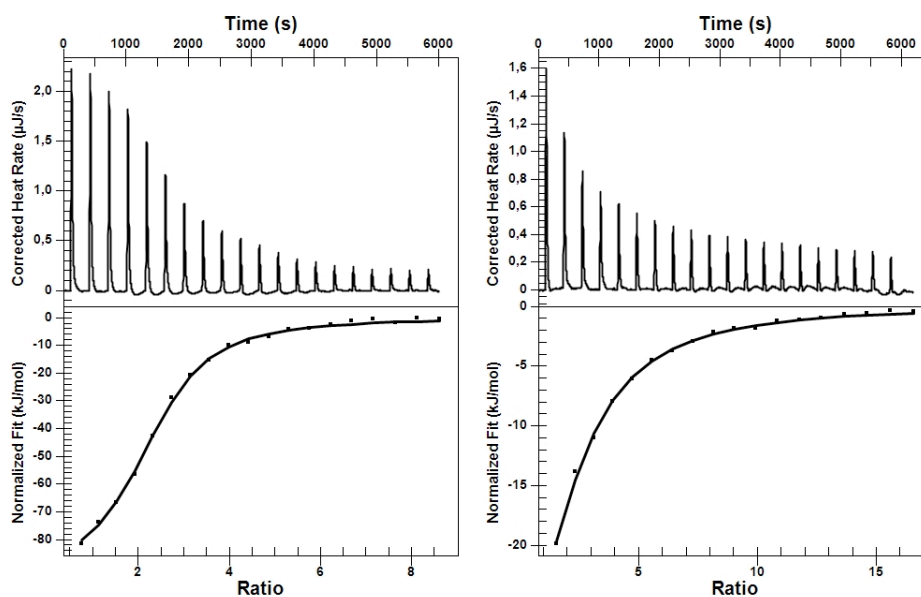
**Figure E.18.** ITC Experiments with hCUG and  $J_WK$  (500  $\mu\text{M}$ , top left),  $J_WJ_WK$  (500  $\mu\text{M}$ , top right),  $J_{\tau}J_WK$  (500  $\mu\text{M}$ , middle left),  $J_WJ_{\tau}K$  (500  $\mu\text{M}$ , middle right),  $J_WJ_{\tau}J_WK$  (500  $\mu\text{M}$ , bottom left) and  $J_{\tau}J_WJ_WJ_{\tau}K$  (250  $\mu\text{M}$ , bottom right).

### 2.3.3. hCCUG

ITC Assays were performed using 10 mM sodium phosphate, generally at pH 7.0, but pH 5.50 was employed for ligands containing J<sub>T</sub> Janus base. The temperature was set up at 25 °C and stirring was constant at 250 rpm. The RNA concentration was always 10 μM, and ligand concentration 500 μM. In figure E.19 some of the experiments using synthesized ligands are shown, all of them were adjusted to an *Independent Model* which resulted in the best fit. Values of thermodynamic parameters, which are the average of a minimum of two experiments, are shown in Chapter 2.



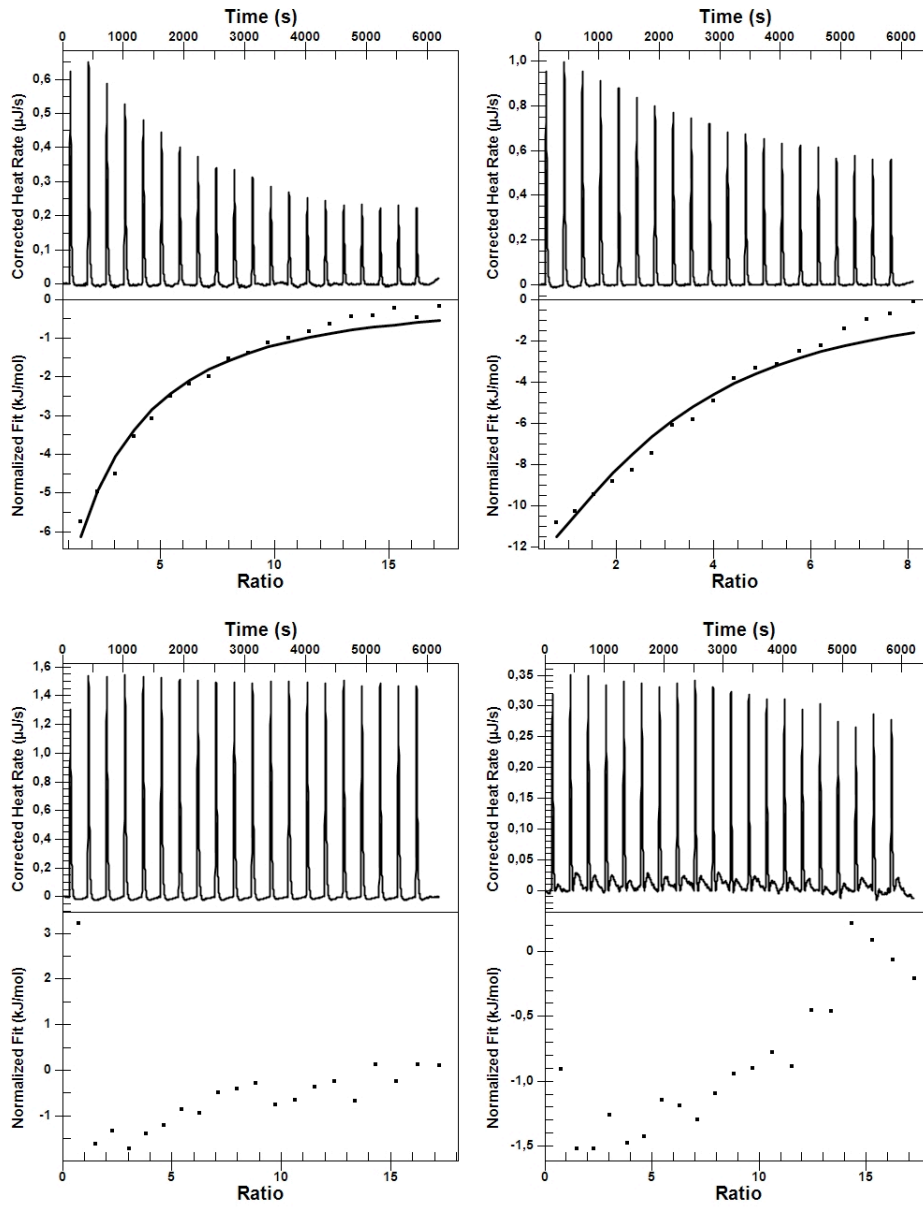




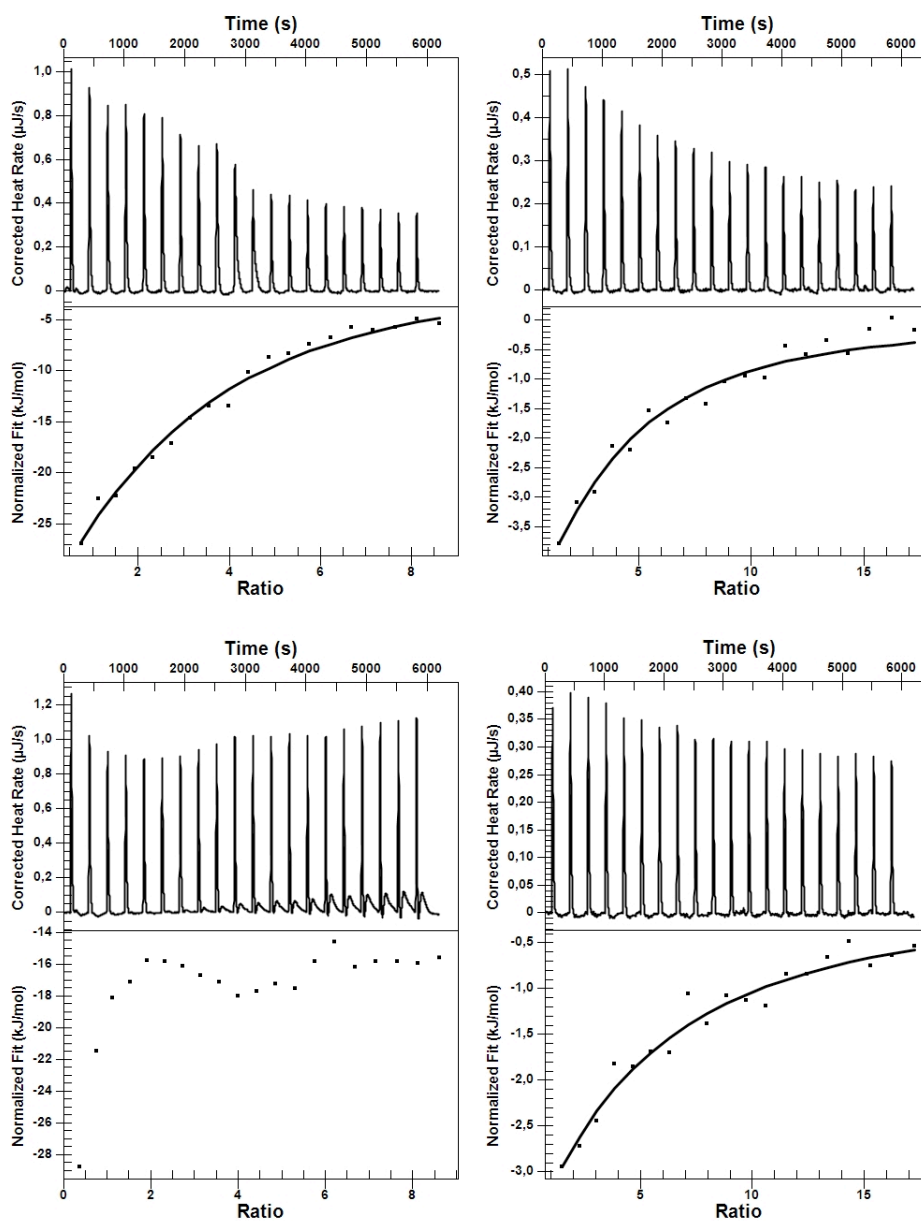
**Figure E.19.** ITC Experiments with hCCUG and J<sub>D</sub>K (500 μM, top left), J<sub>D</sub>J<sub>D</sub>K (500 μM, top right), J<sub>T</sub>K pH 5.5 (500 μM, middle left), J<sub>T</sub>K pH 7.0 (500 μM, middle right), J<sub>T</sub>J<sub>T</sub>K pH 5.5 (500 μM, bottom left) and J<sub>T</sub>J<sub>T</sub>K pH= 7.0 (500 μM, bottom right).

### 2.3.4. Selectivity experiments

ITC Experiments were performed with the best ligands and different control RNA models in order to quantify their selectivity for DM RNA models. Assays were performed using 10 mM sodium phosphate buffer at pH 7.0. The temperature was set up at 25 °C and stirring was constant at 250 rpm. The RNA concentration was always 10 μM, and ligand concentration ranged between 250-500 μM. In figures E.20 and E.21 the results of these experiments are shown. All of them were adjusted to an *Independent Model*. Selectivity values are shown in Chapter 2 (section 6).



**Figure E.20.** Selectivity ITC experiments. Hairpin Control with  $\text{J}_7\text{K}$  ( $500 \mu\text{M}$ , top left),  $\text{J}_7\text{G}_4\text{J}_7\text{K}$  ( $250 \mu\text{M}$ , top right) and  $\text{J}_\text{D}\text{J}_\text{D}\text{K}$  ( $500 \mu\text{M}$ , bottom left). hCUG with  $\text{J}_\text{D}\text{K}$  ( $500 \mu\text{M}$ , bottom right).

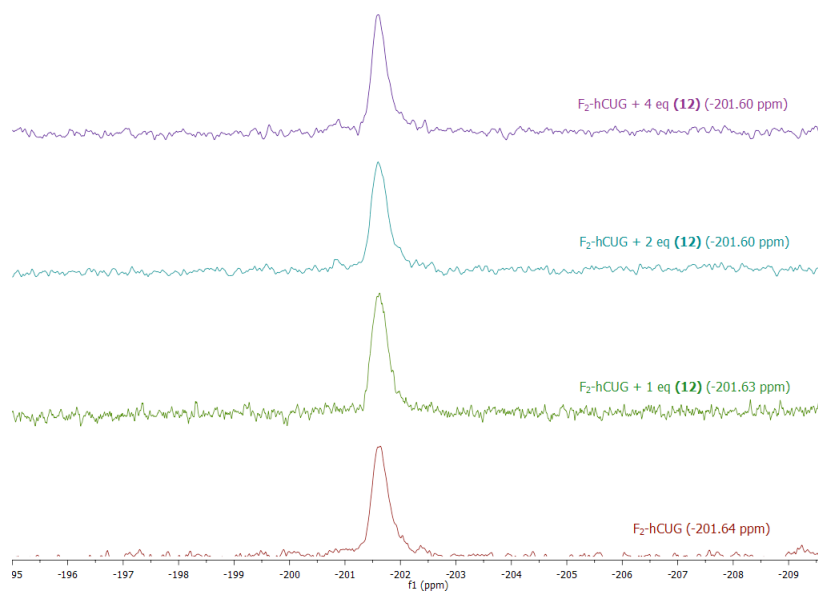


**Figure E.21.** Selectivity ITC experiments. IRES34 with J<sub>7</sub>G<sub>4</sub>J<sub>7</sub>K (250 μM, top left) and J<sub>D</sub>J<sub>D</sub>K (500 μM, top right). tRNA<sup>Phe</sup> with J<sub>7</sub>G<sub>4</sub>J<sub>7</sub>K (250 μM, bottom left) and J<sub>D</sub>J<sub>D</sub>K (500 μM, bottom right).

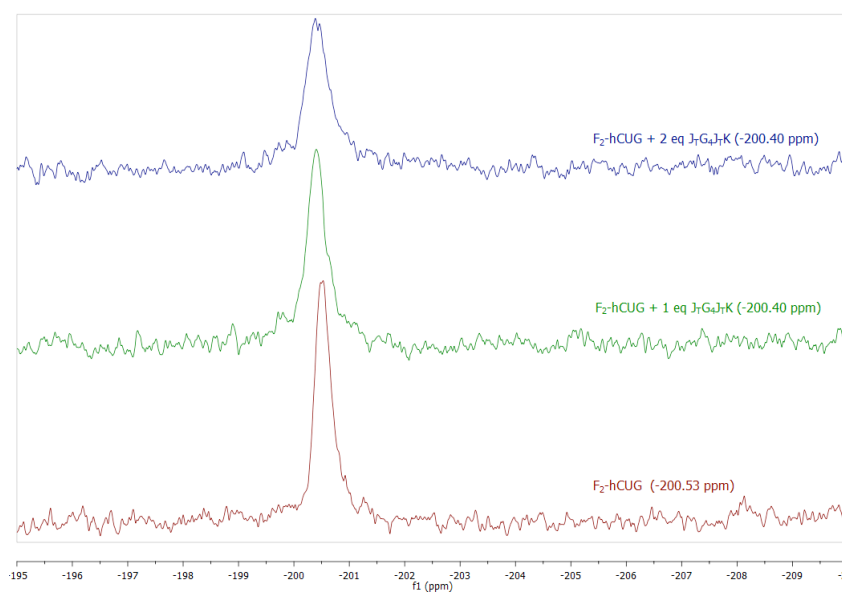
## 2.4. NMR Experiments

### 2.4.1. $^{19}\text{F}$ -NMR

$^{19}\text{F}$ -NMR experiments were carried out following the procedure explained at the *Materials and Methods* section (section 4.4). Herein are spectra not shown in Chapter 2.



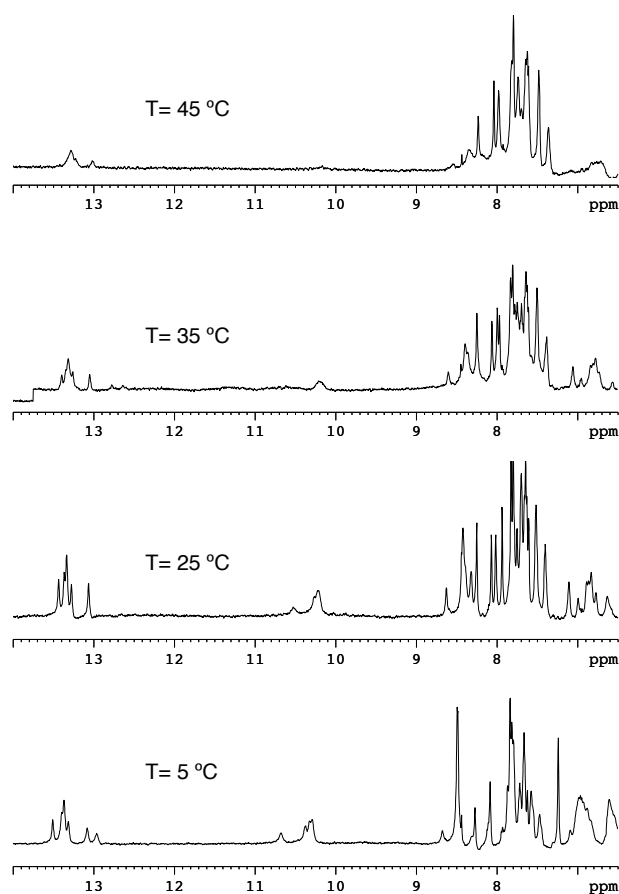
**Figure E.22.**  $^{19}\text{F}$ -NMR Titration of hCUG with compound **12**. 10 mM phosphate buffer,  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (9:1),  $25^\circ\text{C}$ . Reference: trifluorotoluene.



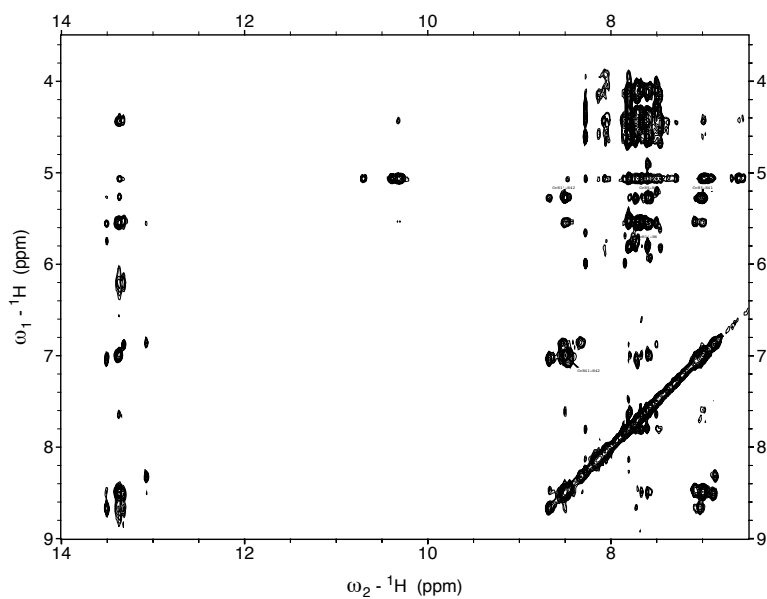
**Figure E.23.**  $^{19}\text{F}$ -NMR Titration of hCUG with  $\text{J}_7\text{G}_4\text{J}_7\text{K}$ . 10 mM phosphate buffer,  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (9:1),  $25^\circ\text{C}$ . Reference: trifluorotoluene.

### 2.4.2. $^1\text{H-NMR}$

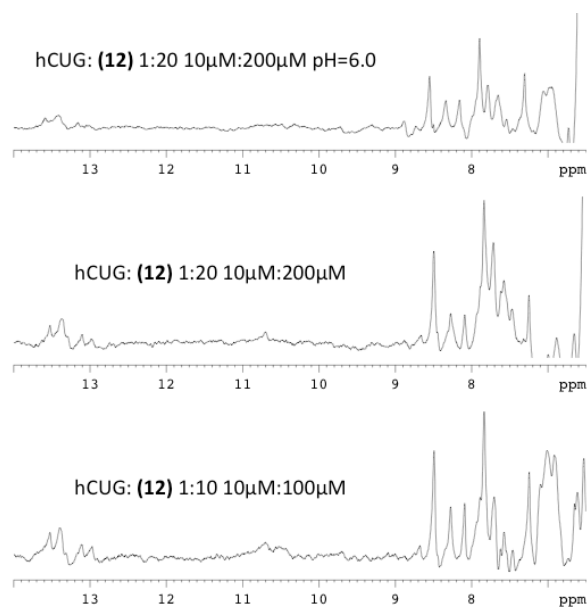
$^1\text{H-NMR}$  experiments were carried out following the protocol explained at the *Materials and Methods* section (section 4.4) in collaboration with the group “Nucleic Acids NMR” from the *Instituto de Química Física Rocasolano del CSIC* (Madrid). Herein are all spectra not shown in Chapter 2.



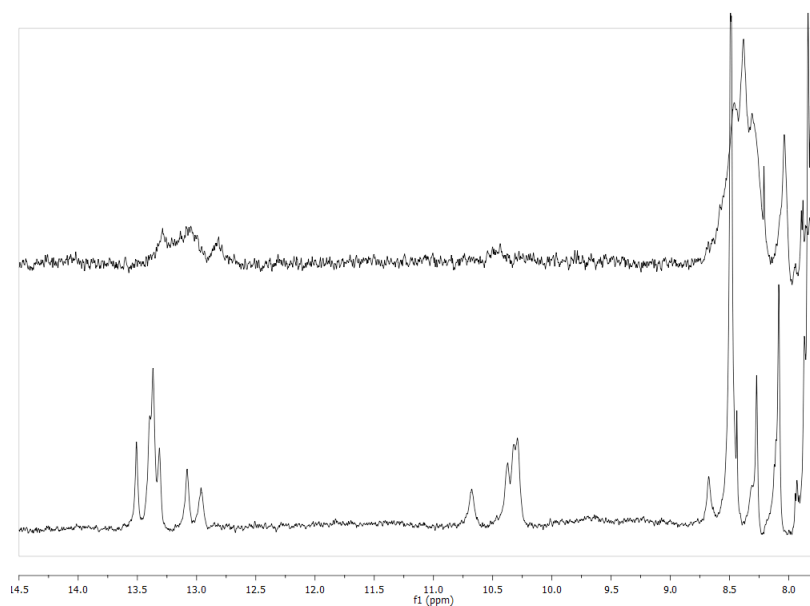
**Figure E.24.** NMR Melting experiments of hCUG: NMR spectra of isolated hCUG at different temperatures.  $C_{\text{hCUG}} = 100 \mu\text{M}$ . 10 mM phosphate buffer,  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (9:1) and pH 7.0.



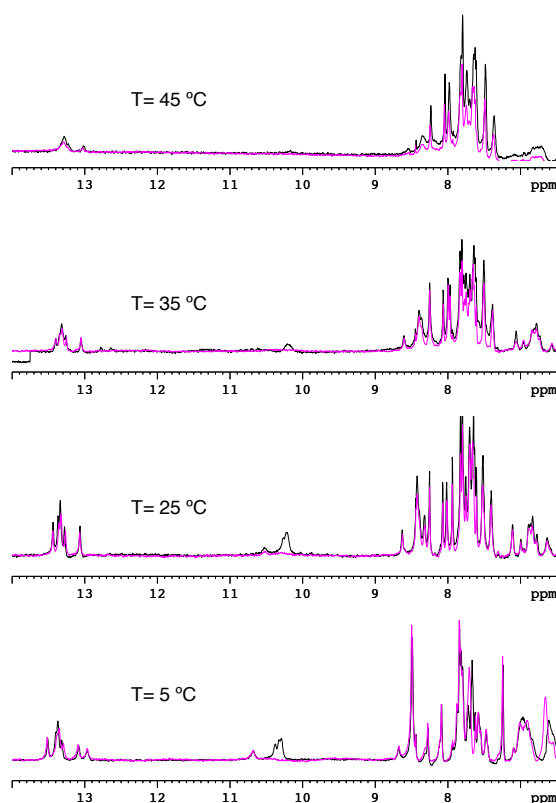
**Figure E.25.** NOESY Spectrum of isolated hCUG.  $C_{\text{hCUG}} = 200 \mu\text{M}$ . 10 mM phosphate buffer,  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (9:1), pH 7.0 and 5°C, mixing time = 250 ms.



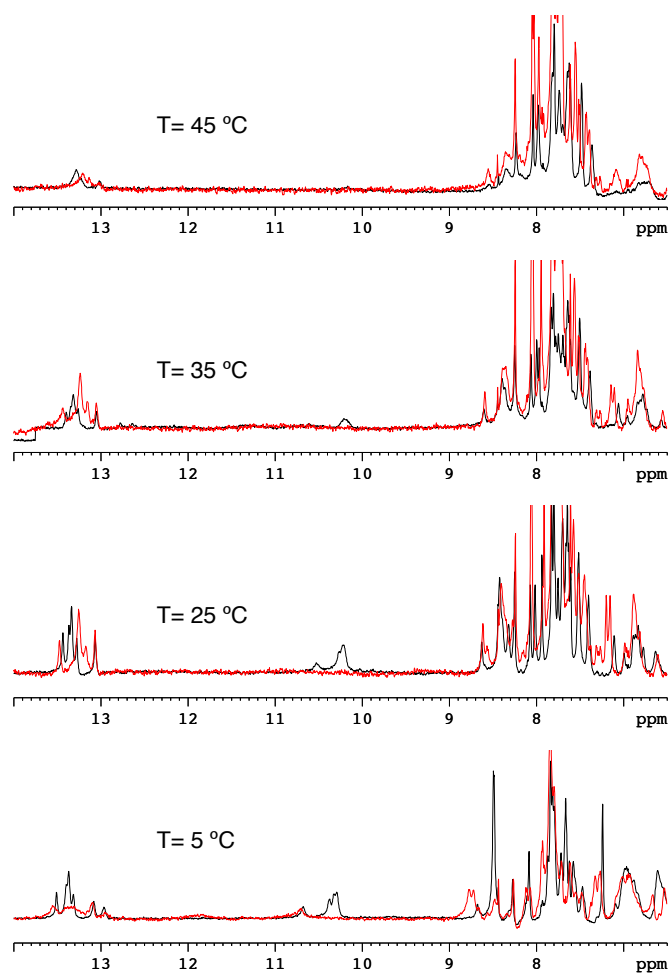
**Figure E.26.** NMR Titration experiments compound **12** to hCUG, from 1:10 to 1:20 hCUG-**12** ratio.  $C_{\text{hCUG}} = 10 \mu\text{M}$ . 10 mM phosphate buffer,  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (9:1), pH 7.0 and 5°C (except for top spectrum which was recorded at pH 6).



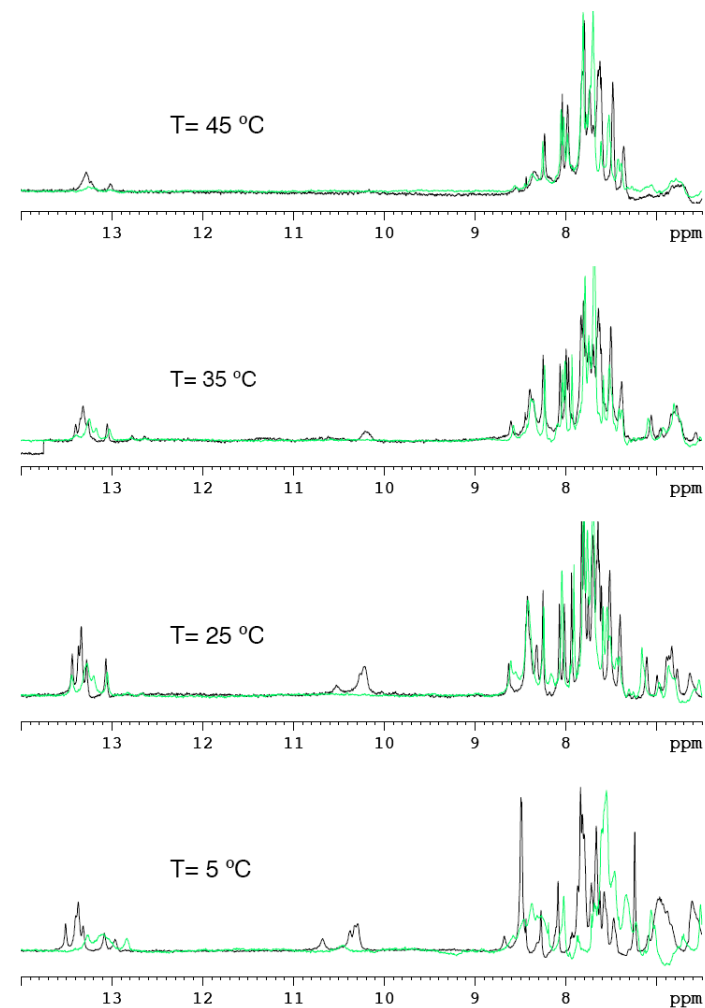
**Figure E.27.**  $^1\text{H}$ -NMR Titration experiments  $\text{J}_7\text{G}_4\text{J}_7\text{K}$  to hCUG (down) (1:2 hCUG- $\text{J}_7\text{G}_4\text{J}_7\text{K}$  ratio, top),  $C_{\text{hCUG}} = 100 \mu\text{M}$ . 10 mM phosphate buffer,  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (9:1) at pH 7.0, 5°C.



**Figure E.28.** NMR Melting experiments of the 1:4 hCUG-12 complex. NMR Spectra of isolated hCUG (black) and the 1:4 hCUG-12 complex (violet) are shown at different temperatures.  $C_{\text{hCUG}} = 100 \mu\text{M}$ . 10 mM phosphate buffer,  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (9:1) and pH 7.0.

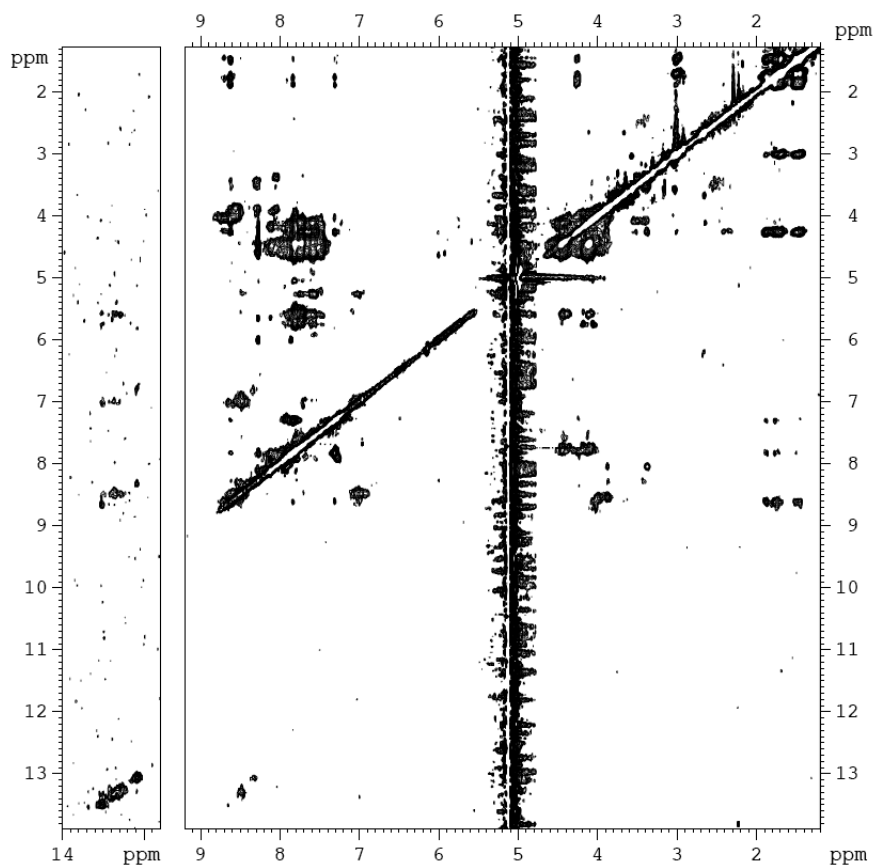


**Figure E.29.** NMR Melting experiments of the 1:2 hCUG-J<sub>7</sub>K complex. NMR Spectra of isolated hCUG (black) and the 1:2 hCUG-J<sub>7</sub>K complex (red) are shown at different temperatures.  $c_{\text{hCUG}} = 100 \mu\text{M}$ . 10 mM phosphate buffer, H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (9:1) and pH 7.0.



**Figure E.30.** NMR Melting experiments of the 1:2 hCUG-J<sub>7</sub>G<sub>4</sub>J<sub>7</sub>K complex. NMR Spectra of isolated hCUG (black) and the 1:2 hCUG-J<sub>7</sub>G<sub>4</sub>J<sub>7</sub>K complex (green) are shown at different temperatures.  $c_{\text{hCUG}} = 100 \mu\text{M}$ . 10 mM phosphate buffer, H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (9:1) and pH 7.0.





**Figure E.31.** NOESY Spectrum of the 1:1 hCUG-J<sub>7</sub>G<sub>4</sub>J<sub>7</sub>K complex at 250 ms mixing time.  $c_{\text{hCUG}} = 200 \mu\text{M}$ . 10 mM phosphate buffer, H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (9:1), pH 7.0 and 5°C.

## 2.5. Stoichiometry determination by ESI MS

To determine the stoichiometry of the complex mass spectrometry was employed. The experimental procedure is described at the *Materials and Methods* section (section 4.5). All the spectra obtained are shown one after the other (Figure E.32-E.36). Calculated and found  $m/z$  values are summarized in Tables E.20- E.24.

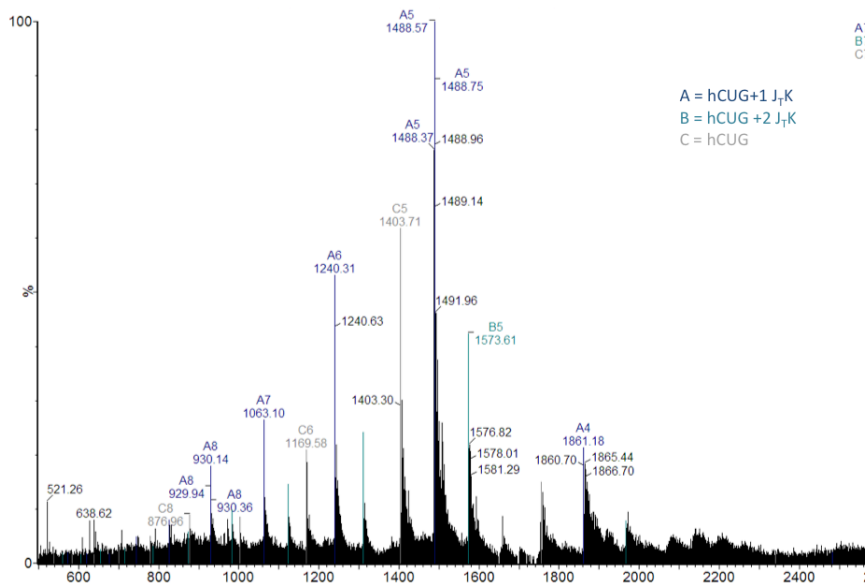


Figure E.32. ESI MS spectrum of hCUG-J<sub>7</sub>K complexes. Negative mode

z	m/z					
	hCUG		hCUG - J <sub>7</sub> K 1:1		hCUG - J <sub>7</sub> K 1:2	
	Calcd	Exp	Calcd	Exp	Calcd	Exp
4	1755.05	-	1860.80	1861.18	1967.12	-
5	1403.84	1403.71	1488.44	1488.57	1573.49	1573.61
6	1169.70	1169.58	1240.20	1240.31	1311.08	1311.24
7	1002.45	-	1062.88	1063.10	1123.63	1123.81
8	877.02	876.96	929.90	930.14	983.05	-

Table E.20. Mass/charge values calculated and obtained for the complex hCUG-J<sub>7</sub>K.

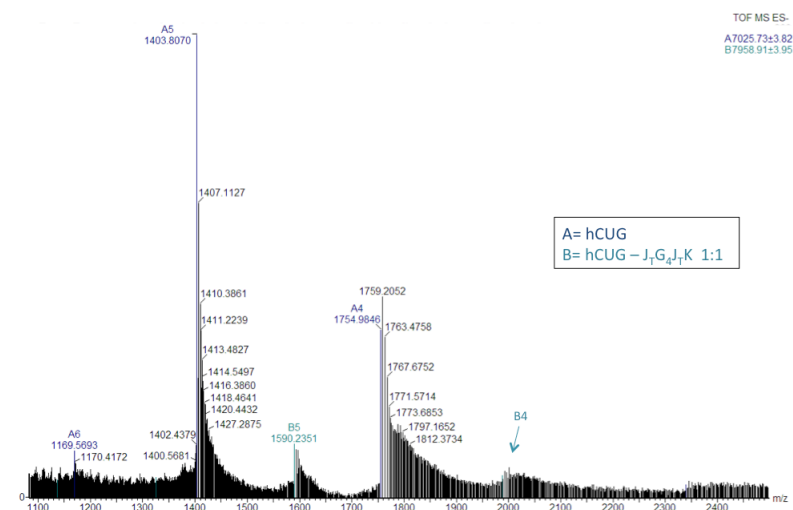


Figure E.33. ESI MS Spectrum of hCUG-J<sub>7</sub>G<sub>4</sub>J<sub>7</sub>K complexes. Negative mode.

z	m/z			
	hCUG		hCUG - J <sub>7</sub> G <sub>4</sub> J <sub>7</sub> K 1:1	
	Calcd	Exp	Calcd	Exp
4	1755.05	1754.98	1989.12	-
5	1403.84	1403.81	1591.50	1590.24
6	1169.70	1169.57	1326.41	-

Table E.21. Mass/charge values calculated and obtained for the complex hCUG-J<sub>7</sub>G<sub>4</sub>J<sub>7</sub>K.

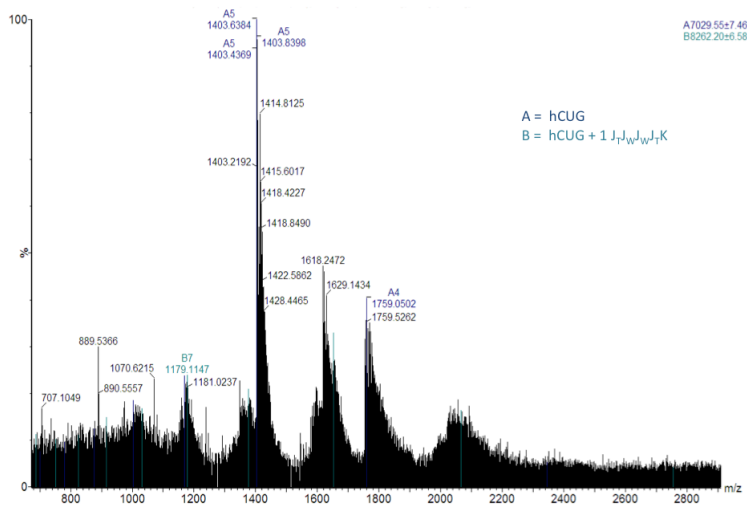


Figure E.34. ESI MS Spectrum of hCUG-J<sub>T</sub>J<sub>W</sub>J<sub>W</sub>J<sub>T</sub>K complexes. Negative mode.

z	m/z			
	hCUG		hCUG - J <sub>T</sub> J <sub>W</sub> J <sub>W</sub> J <sub>T</sub> K 1:1	
	Calcd	Exp	Calcd	Exp
4	1755.05	1759.05	2064.88	-
5	1403.84	1403.84	1651.70	-
6	1169.70	-	1376.25	-
7	1002.45	-	1179.50	1179.11

Table E.22. Mass/charge values calculated and obtained for complex hCUG- J<sub>T</sub>J<sub>W</sub>J<sub>W</sub>J<sub>T</sub>K.

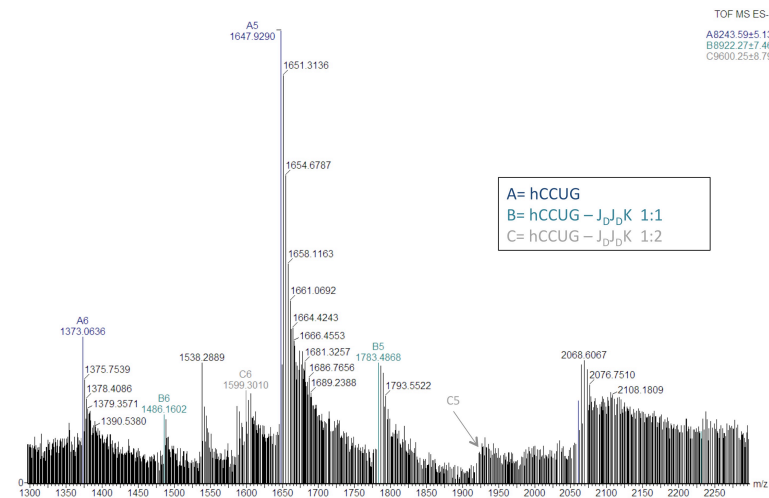


Figure E.35. ESI MS Spectrum of hCCUG-J<sub>D</sub>J<sub>D</sub>K complexes. Negative mode.

z	m/z					
	hCCUG		hCCUG - J <sub>D</sub> J <sub>D</sub> K 1:1		hCCUG - J <sub>D</sub> J <sub>D</sub> K 1:2	
	Calcd	Exp	Calcd	Exp	Calcd	Exp
5	1649.23	1647.93	1784.70	1783.49	1920.17	-
6	1374.53	1373.06	1487.42	1486.16	1600.31	1599.30

Table E.23. Mass/charge values calculated and obtained for the complex hCCUG- J<sub>D</sub>J<sub>D</sub>K.

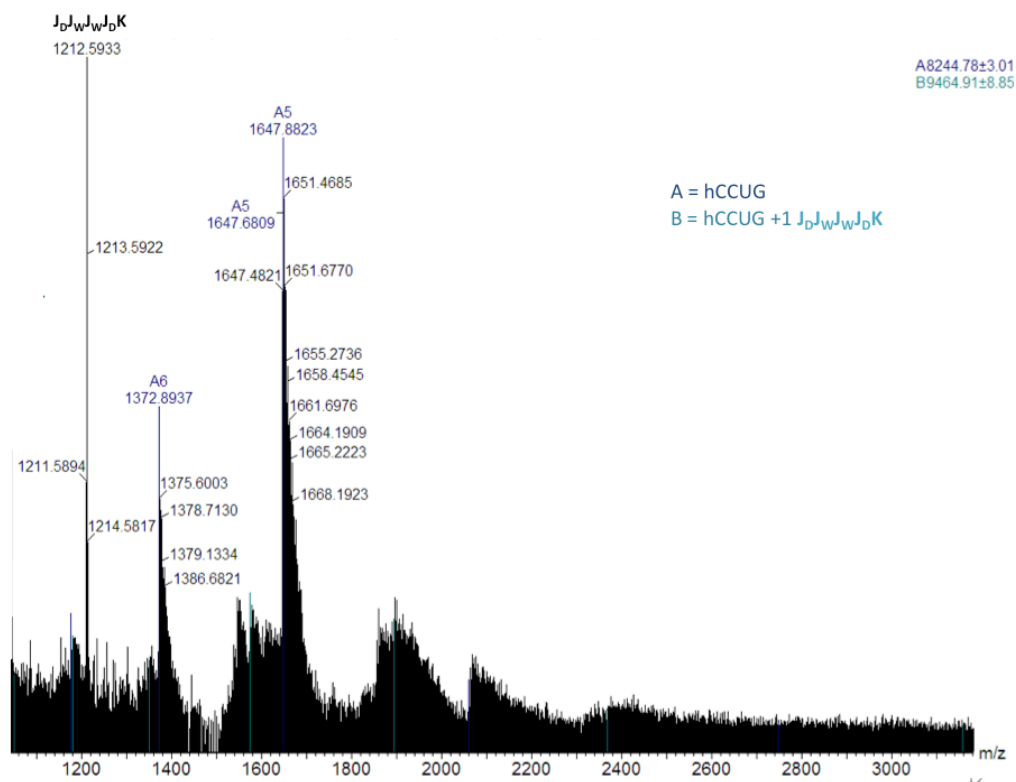


Figure E.36. ESI MS Spectrum of hCCUG-JDJWJDK complexes. Negative mode.

z	m/z			
	hCCUG		hCCUG - JDJWJDK 1:1	
	Calcd	Exp	Calcd	Exp
5	1647.22	1647.68	1890.53	1890.65
6	1372.51	1372.89	1575.27	-

Table E.24. Mass/charge values calculated and obtained for the complex hCCUG-JDJWJDK.

## REFERENCES

- [1] E. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger, P. I. Cook, *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595–598.
- [2] B. S. Sproat, in *Oligonucleotide Synth. Methods Appl.*, Humana Press, **2005**, pp. 17–31.
- [3] T. Brown, D. J. S. Brown, in *Oligonucleotides Analog. Pract. Approach Ed. Eckstein*, IRL Press, Practical Approach Series 83, **1991**, p. 20.
- [4] D. M. Gray, I. Tinoco, *Biopolymers* **1970**, *9*, 223–244.
- [5] F. Fasiolo, P. Remy, J. Pouyet, J.P. Ebel, *Eur. J. Biochem.* **1974**, *50*, 227–236.
- [6] G. Krauss, A. Pingoud, D. Boehme, D. Riesner, F. Peters, G. Maass, *Eur. J. Biochem.* **1975**, *55*, 517–529.
- [7] G. E. Plum, in *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.*, John Wiley & Sons, Inc., **2001**.
- [8] G. R. Bishop, J. B. Chaires, in *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.*, John Wiley & Sons, Inc., **2001**.
- [9] G. Byk, C. Gilon, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 5687–5692.
- [10] F. Wojciechowski, R. H. E. Hudson, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 3807–3816.
- [11] H. Fenniri, *Method and Associated Compounds for Forming Nanotubes*, WO 02/066482 A1.
- [12] D. Chen, Meena, S. K. Sharma, L. W. McLaughlin, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 70–71.
- [13] H. Chen, Meena, L. W. McLaughlin, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13190–13191.
- [14] R. L. Diebner, L. Jackson, *Preparation of Ammelides*, **1975**, 260/249.5.
- [15] L. Grehn, M. Lurdes, S. Almeida, U. Ragnarsson, *Synthesis* **1988**, *1988*, 992–994.
- [16] A. Albert, E. P. Serjeant, *Ionization Constants of Acids and Bases: A Laboratory Manual*, Methuen, **1962**.

