



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0906104-5 B1



(22) Data do Depósito: 13/03/2009

(45) Data de Concessão: 30/03/2021

(54) Título: DERIVADO DE ÁCIDO PEPTONUCLEICO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO UMA QUANTIDADE TERAPEUTICAMENTE EFICAZ DO DERIVADO DE ÁCIDO PEPTONUCLEICO, MÉTODO DE UTILIZAÇÃO DO DERIVADO DE ÁCIDO PEPTONUCLEICO E COMPOSTO

(51) Int.Cl.: C07C 237/10.

(30) Prioridade Unionista: 11/11/2008 KR 10-2008-111459; 14/03/2008 KR 10-2008-23658.

(73) Titular(es): CTI BIO.

(72) Inventor(es): SHIN CHUNG; JONG- OOK; HEUI - YEON KIM; HYUN-JIN PARK; MI- CRAN KIM.

(86) Pedido PCT: PCT KR2009001256 de 13/03/2009

(87) Publicação PCT: WO 2009/113828 de 17/09/2009

(85) Data do Início da Fase Nacional: 13/09/2010

(57) Resumo: DERIVADO DE ÁCIDO NUCLÉICO PEPTÍDEO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO UMA QUANTIDADE TERAPEUTICAMENTE EFICAZ DO DERIVADO DE ÁCIDO NUCLÉICO PEPTÍDEO, MÉTODO DE UTILIZAÇÃO DO DERIVADO DE ÁCIDO NUCLÉICO PEPTÍDICO E COMPOSTO, a presente invenção provê uma nova classe de derivados de ácido nucléico peptídico que demonstram boa penetração celular e forte afinidade de ligação pelo ácido nucléico.

"DERIVADO DE ÁCIDO PEPTONUCLEICO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO UMA QUANTIDADE TERAPEUTICAMENTE EFICAZ DO DERIVADO DE ÁCIDO PEPTONUCLEICO, MÉTODO DE UTILIZAÇÃO DO DERIVADO DE ÁCIDO PEPTONUCLEICO E COMPOSTO"

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção refere-se a derivados de ácido peptonucleico quimicamente modificados para demonstrar boa penetração celular e forte afinidade pelo ácido nucleico.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A figura 1 mostra cromatogramas de HPLC antes e após a purificação de Oligo 17 por HPLC de fase reversa;

A figura 2 mostra um espectro de massa MALDI-TOF de um lote purificado de Oligo 17;

A figura 3 mostra gráficos de alterações de absorbância devido à temperatura para Oligo 17 contra DNA complementar ou de não correspondência;

As figuras 4(a) e 4(b) mostram imagens microscópicas confocais (em objetiva de 63x) 1, 2, 3 e 24 horas depois que as células HeLa foram tratadas com Oligo 1 e Oligo 2 a 5µM, respectivamente;

As figuras 5(a) e 5(b) mostram imagens microscópicas confocais (em objetiva de 63x) 0,5 e 1 hora depois que as células MCF-7 foram tratadas com Oligo 6 e Oligo 7 a 2,5µM, respectivamente;

As figuras 6(a) e 6(b) mostram fotos microscópicas confocais (em objetiva de 40x) 6 ou 24 horas depois que as células HeLa foram tratadas com Oligo 1 e Oligo 6 a 1µM, respectivamente;

As figuras 7(a) e 7(b) mostram fotos

microscópicas confocais (objetiva de 40x) 24 horas depois que as células JAR foram tratadas com Oligo 21 e Oligo 28 a 2µM, respectivamente;

As figuras 7(c) e 7(d) mostram fotos microscópicas confocais (em objetiva de 40x) 24 horas depois que as células A549 foram tratadas com Oligo 21 e Oligo 28 a 2µM, respectivamente;

As figuras 7(e) e 7(f) mostram fotos microscópicas confocais (em objetiva de 40x) 12 horas depois que as células HeLa foram tratadas com Oligo 21 e Oligo 28 a 2µM, respectivamente;

A figura 7(g) mostra fotos microscópicas confocais (em objetiva de 40x) 24 horas depois que as células HeLa foram tratadas com Oligo 21 a 2µM;

As figuras 8(a), 8(b) e 8(c) mostram imagens microscópicas confocais (objetiva de 40x) 24 horas depois que as células HeLa, A549 e JAR foram tratadas com Oligo 22 a 2µM, respectivamente;

A figura 9 é a estrutura representativa dos oligômeros de PNA da presente invenção; e

A tabela A mostra resultados de western blotting de células JAR tratadas com Oligo 9 a 5µM ou 10µM, Oligo 10 a 5µM ou 10µM, co-tratamento com os oligômeros a 5µM ou 10µM cada, e combranco (sem tratamento com oligômeros).

HISTÓRICO DA INVENÇÃO

[002] Os oligonucleotídeos têm sido utilizados para diversos fins biológicos, incluindo a inibição anti-sentido da expressão de genes, PCR (reação de cadeia de polimerase), análise diagnóstica por chips genéticos, e outros. Uma vez que interagem de uma forma específica da

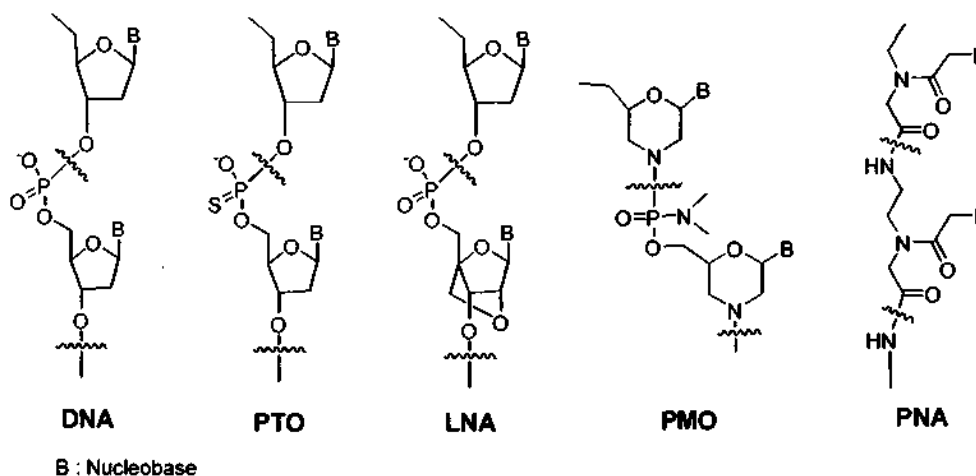
sequência com ácidos nucleicos, tais como DNA e RNA, os oligonucleotídeos são relativamente úteis para modular de forma previsível os processos biológicos que envolvem o DNA ou o RNA dentro da célula. Ao contrário das drogas contendo pequenas moléculas, no entanto, os oligonucleotídeos não penetram facilmente a membrana celular dos mamíferos e, portanto, dificilmente afetam os processos biológicos dentro da célula a menos que devidamente modificados ou formulados para penetrar facilmente a membrana plasmática.

[003] Proteínas como Alvos da Droga: As proteínas fazem a mediação de diversas funções celulares. Não seria surpreendente descobrir que a maioria das drogas atualmente comercializada demonstra atividade terapêutica por funções de modulação de proteína(s). Por exemplo, a aspirina, uma droga anti-inflamatória não-esteróide, inibe a atividade anti-inflamatória das enzimas chamadas ciclooxygenases. O losartan se liga e antagoniza a função anti-hipertensiva de um receptor de trans-membrana denominado receptor de angiotensina II. A rosiglitazona ativa seletivamente um receptor intracelular chamado receptor γ ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR γ) para estimular sua atividade contra o diabetes. O etanercept é uma proteína de fusão que se liga a uma citosina denominada fator- α de necrose de tumor (TNF- α) e neutraliza a atividade biológica anti-reumática do TNF- α . A herceptina é um anticorpo monoclonal para o tratamento do câncer de mama por meio da ligação seletiva ao erbB2 super-expresso em certos tipos de células do câncer de mama.

[004] Inibição Anti-Sentido da Síntese de Proteína: As proteínas são codificadas pelo DNA (ácido 2-

deoxirribose nucleico). Em resposta à estimulação celular, o DNA é transcrito para produzir o pre-mRNA (ácido ribonucleico pré-mensageiro) no núcleo. A porção (ou porções) de íntron do pre-mRNA sofre um splicing enzimático, dando origem ao mRNA (ácido ribonucleico mensageiro), que é então translocado para o compartimento citosólico. No citosol, um complexo de mecanismos de translação denominado ribossomo se liga ao mRNA e realiza a síntese protéica, pois faz uma varredura das informações genéticas codificadas com o mRNA. (Biochemistry vol 41, 4503-4510, 2002; Cancer Res. vol 48, 2659-2668, 1988).

[005] Um oligonucleotídeo que se liga ao mRNA ou ao pre-mRNA de uma forma específica da sequência é denominado oligonucleotídeo anti-sentido (AO). O AO pode ligar-se fortemente a um mRNA e inibir a síntese protéica pelo ribossomo com o mRNA no citosol. O AO precisa estar presente dentro da célula para inibir a síntese de sua proteína-alvo. O AO pode ligar-se fortemente a um pre-mRNA no núcleo e afetar o splicing do pre-mRNA, gerando um mRNA de sequência alterada e, conseqüentemente, uma proteína alterada.



[006] Oligonucleotídeos Não Naturais: Os oligonucleotídeos de DNA ou RNA são suscetíveis à degradação por nucleases endógenas, limitando sua utilidade terapêutica. Até o momento, muitos tipos de oligonucleotídeos não naturais foram desenvolvidos extensivamente estudados. (Clin. Exp. Pharmacol. Physiol, vol 33, 533-540, 2006). Alguns deles demonstram estabilidade metabólica estendida em comparação ao DNA e RNA. São providas acima as estruturas químicas de alguns dos oligonucleotídeos não naturais representativos. Esses oligonucleotídeos ligam-se, de forma previsível, a um ácido nucleico complementar assim como o DNA ou o RNA faz.

[007] O oligonucleotídeo fosforotioata (PTO) é um análogo de DNA com um dos átomos oxigênio de fosfato da backbone substituído pelo átomo de enxofre por monômero. Essa pequena alteração estrutural tornou o PTO comparativamente resistente à degradação por nucleases. (Ann. Rev Biochem. vol 54, 367-402, 1985).

[008] Refletindo a similaridade estrutural do PTO e do DNA, ambos penetram pouco a membrana celular na maioria dos tipos de células de mamíferos. Para alguns tipos de células que expressam abundantemente o(s) transportador(es) do DNA, no entanto, o DNA e o PTO demonstram boa penetração celular. Os PTOs administrados sistematicamente são conhecidos por se distribuir facilmente ao fígado e rins. (Nucleic Acids Res. vol 25, 3290-3296, 1997).

[009] A fim de facilitar a penetração celular do PTO in vitro, a lipofecção tem sido comumente praticada. Entretanto, a lipofecção altera fisicamente a membrana

celular, provoca citotoxicidade e, portanto, não seria ideal para uso terapêutico prolongado.

[0010] Nos últimos 20 anos, os PTOs anti-sentido e as variantes de PTOs têm sido clinicamente avaliados para o tratamento de cânceres, distúrbios imunológicos, doenças metabólicas, entre outras. (Biochemistry vol 41, 4503-4510, 2002; Clin. Exp. Pharmacol. Physiol, vol 33, 533-540, 2006). Muitos dessas drogas anti-sentido candidatas não foram bem sucedidas em partes devido à fraca penetração celular do PTO. Para resolver o problema da fraca penetração celular, o PTO precisa ser administrado em alta dose para atividade terapêutica. Entretanto, os PTOs são conhecidos por estarem associados a toxicidades dose-dependentes, por exemplo, o aumento do tempo de coagulação, ativação complementar, nefropatia tubular, ativação de célula de Kupffer e estimulação imune, incluindo a esplenomegalia, hiperplasia linfóide, infiltração celular mononuclear. (Clin. Exp. Pharmacol. Physiol, vol 33, 533-540, 2006).

[0011] Descobriu-se que muitos PTOs anti-sentido demonstram devida atividade clínica contra doenças com uma contribuição significativa do fígado ou rim. O ISIS-301012 (mipomersen) é um análogo de PTO que inibe a síntese de apoB-100, uma proteína envolvida no transporte de LDL-colesterol. O mipomersen manifestou devida atividade clínica em uma determinada população de pacientes com aterosclerose mais provavelmente devido à sua distribuição preferencial ao fígado. (www.medscape.com/viewarticle/556073: Acessado em 19 de fevereiro de 2009). O ISIS-113715 é um análogo de PTO anti-sentido que inibe a síntese protéica de tirosina

fosfatase 1B (PTP1B) e descobriu-se que ele apresenta atividade terapêutica em pacientes com diabetes tipo II. (Curr. Opin. Mol. Ther. vol 6, 331-336, 2004).

[0012] No oligonucleotídeo fosforamidite morfolino (PMO), o fosfate backbone e a 2-deoxirribose do DNA são substituídos por fosforamidita e morfolina, respectivamente. (Appl. Microbiol. Biotechnol. vol 71, 575-586, 2006). Enquanto o backbone do DNA é carregado negativamente, a backbone do PMO não é carregada. Assim, a ligação entre o PMO e o mRNA é livre de repulsão eletrostática entre as backbones e tende a ser mais forte do que entre o DNA e o mRNA. Uma vez que o PMO é estruturalmente muito diferente do DNA, o PMO não seria reconhecido pelo(s) transportador(es) hepáticos que reconhecem o DNA. No entanto, o PMO não penetra facilmente a membrana celular.

[0013] O ácido peptonucleico (PNA) é um polipeptídeo com N-(2-aminoetil)glicina como a backbone da unidade e foi descoberto por Nielsen e colaboradores. (Science vol 254, 1497-1500, 1991). Assim como o DNA e o RNA, o PNA também liga-se seletivamente ao ácido nucleico complementar [Nature (London) vol 365, 566-568, 1992] Assim como o PMO, a backbone do PNA não é carregada. Assim, a ligação entre o PNA e o RNA tende a ser mais forte do que a ligação entre o DNA e o RNA. Uma vez que o PNA é notavelmente diferente do DNA em termos estruturais, o PNA não seria reconhecido pelo(s) transportador(es) hepáticos que reconhecem o DNA e mostraria um perfil de distribuição tecidual muito diferente daquele do DNA ou do PTO. No entanto, o PNA também penetra pouco a membrana celular de

mamíferos. (Adv. Drug Delivery Rev. vol 55, 267-280, 2003).

[0014] No ácido nucleico bloqueado (LNA), o anel de RNA da ribose da backbone é estruturalmente restringido para aumentar a afinidade de ligação pelo RNA ou pelo DNA. Assim, os LNAs podem ser considerados como derivados de DNA ou RNA de alta afinidade. (Biochemistry vol 45, 7347-7355, 2006).

[0015] Mecanismos Anti-Sentido: Um mecanismo anti-sentido difere dependendo dos tipos de AOs. A RNase H reconhece um duplex de mRNA com DNA, RNA ou PTO, e degrada a porção de duplex do mRNA. Assim, a atividade anti-sentido do PTO é significativamente amplificada pela RNase H. Ao mesmo tempo, a RNase H não reconhece um duplex de mRNA com PMO, PNA ou LNA. Em outras palavras, PMO, PNA e LNA devem se basear puramente no bloqueio estérico do mRNA para sua atividade anti-sentido. (Biochemistry vol 41, 4501-4510, 2002).

[0016] Para oligonucleotídeos com a mesma afinidade de ligação pelo mRNA, o PTO deve, portanto, demonstrar atividade anti-sentido mais forte que o PMO, PNA e LNA. Para o bloqueio estérico de AOs, tais como PMO, PNA e LNA, a forte afinidade pelo mRNA é desejada para a atividade anti-sentido.

[0017] Atividade Anti-Sentido do PNA: A afinidade de ligação do PNA pelo mRNA aumentaria conforme o aumento do comprimento do PNA até um determinado ponto. No entanto, a atividade anti-sentido do PNA não parece sempre aumentar em relação ao seu comprimento. Houve casos em que a atividade anti-sentido do PNA atingiu a atividade máxima em 12 a 13-mer e diminuiu depois disso. (Nucleic Acids Res. vol

32, 4893-4902, 2004). Por outro lado, a atividade anti-sentido ideal foi atingida com PNAs de 15 a 18-mer contra um determinado mRNA, refletindo que a acessibilidade estrutural do sítio de ligação alvo do mRNA seria importante. (Biochemistry vol 40, 53-64, 2001).

[0018] Em muitos casos, relatou-se que os PNAs inibem a síntese protéica pelo ribossomo em nível micromolar sob boas condições de penetração celular. (Science vol 258, 1481-85, 1992; Biochemistry vol 40, 7853-7859, 2001; Nucleic Acids Res. vol 32, 4893-4902, 2004). No entanto, descobriu-se que os PNAs que visam uma posição altamente acessível do mRNA demonstram atividade anti-sentido ao nível sub-micromolar (Neuropeptides vol 38, 316-324, 2004; Biochemistry vol 40, 53-64, 2001) ou mesmo em nível sub-nanomolar (Nucleic Acids Res. vol 36, 4424-4432, 2008) sob boas condições de transfecção.

[0019] Além disso, para visar um sítio altamente acessível no mRNA, a forte afinidade de ligação do PNA pelo mRNA seria muito exigida para a boa atividade anti-sentido. Ao contrário do DNA, PTO e LNA, a backbone do PNA não é carregada. O PNA tende a se agregar e se tornar menos adequado para ligação ao mRNA conforme seu tamanho aumenta. É desejável melhorar a afinidade de ligação do PNA pelo mRNA sem aumentar o comprimento do PNA. A incorporação de monômeros de PNA com um ponto de carga seria benéfico na prevenção da agregação do PNA.

[0020] Estratégias de Penetração Celular para o PNA: Os PNAs não penetram facilmente a membrana celular e tendem a demonstrar fraca atividade anti-sentido, a menos que devidamente transfectados. Há alguns anos, a atividade

anti-sentido do PNA era avaliada por microinjeção (Science vol 258, 1481-85, 1992) ou eletroporação (Biochemistry vol 40, 7853-7859, 2001). A microinjeção e a eletroporação são invasivas e inadequadas para aplicações com finalidades terapêuticas. Para melhorar a penetração celular, várias estratégias foram desenvolvidas. (Adv. Drug Delivery Rev. vol 55, 267-280, 2003; Curr. Top. Med.Chem. vol 7, 727-737, 2007).

[0021] Os PNAs foram eficientemente aplicados na célula por incorporação covalente de peptídeos que penetram na célula (Neuropeptides vol 38, 316-324, 2004), lipofecção após a formação do duplex com um DNA complementar (Biochemistry vol 40, 53-64, 2001), lipofecção de PNAs com uma 9-aminoacridina ligada covalentemente (Nucleic Acids Res. vol 32, 2695-2706, 2004), lipofecção de PNAs com ânions fosfonato ligados covalentemente (Nucleic Acids Res. vol 36, 4424-4432, 2008), entre outras. Também, a penetração celular foi aprimorada pela fixação de uma parcela lipofílica ao PNA, por exemplo, adamantano (Bioconjugate Chem. vol 10, 965-972, 1999) ou de um grupo amfifílico, por exemplo, tetrafenil fosfônio (Nucleic Acids Res. vol 29, 1852-1863, 2001) No entanto, é improvável que essa modificação covalente aumente a afinidade de ligação ao mRNA, apesar da notável melhora na penetração celular.

[0022] PNAs com um CPP Ligado Covalentemente: Os peptídeos de penetração celular (CPPs) são polipeptídeos que demonstram boa penetração celular e possuem múltiplas cargas positivas dos resíduos de arginina ou lisina. Até o momento, muitos CPPs, tais como transportan, penetratin, NLS (sinal de localização nuclear) e Tat foram descobertos. Os

CPPs são conhecidos por portar eficientemente uma carga ligada covalentemente na célula. Os PNAs com um CPP ligado covalentemente também demonstraram boa penetração celular.

[0023] Embora alguns PNAs com um CPP ligado covalentemente demonstraram IC₅₀s anti-sentido em torno de 100nM (Neuropeptides vol 38, 316-324, 2004), os IC₅₀s anti-sentido micromolares são prevalentes para esses PNAs.

[0024] Os PNAs com um CPP ligado covalentemente são compostos por duas porções, o domínio PNA hidrofóbico e o domínio CPP carregado positivamente. Esse PNA tende a se agregar e ser capturado em endossomos dentro da célula, e não estaria disponível para a inibição anti-sentido da síntese protéica. (Curr. Top. Med. Chem. vol 7, 727-737, 2007; Nucleic Acids Res. vol 33, 6837-6849, 2005). Além disso, esse CPP ligado covalentemente dificilmente aumenta a afinidade de ligação do PNA pelo mRNA.

[0025] PNAs com uma Backbone Quiral: Houve tentativas de introduzir um substituinte quiral na backbone do PNA da 2-aminoetil-glicina (Aeg). Por exemplo, a solubilidade aquosa do PNA foi significativamente melhorada pela incorporação do(s) monômero(s) de PNA com uma backbone de 2-aminoetil-lisina no lugar da Aeg. (Angew. Chem. Int. Ed. Engl, vol 35, 1939-1941, 1996).

[0026] Introduzindo a backbone de L-(2-amino-2-metil)etil-glicina no lugar de Aeg, a afinidade de ligação do PNA pelo DNA e RNA foi significativamente melhorada. Um PNA de 10-mer com toda a backbone de L-(2-amino-2-metil)etil-glicina no lugar de 2-aminoetil-glicina demonstrou um aumento de 19°C e 10°C na T_m contra o DNA complementar e o RNA, respectivamente. No entanto, esse

aumento não parece ser proporcional ao número de substituição por L-(2-amino-2-metil)etil-glicina. (J. Am. Chem. Soc. vol 128, 10258-10267, 2006).

[0027] GPNA: Relatou-se que a penetração celular do PNA melhorou notavelmente por meio da incorporação de monômeros de PNA com uma backbone de 2-aminoetil-arginina no lugar da Aeg. (J. Am. Chem. Soc. vol 125, 6878-6879, 2003). Esses PNAs foram denominados 'GPNA', pois possuem parcela guanidínio na backbone.

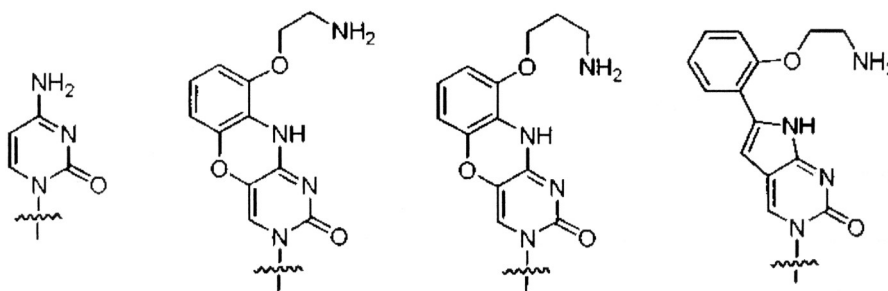
[0028] Relatou-se que os GPNAs com a backbone de 2-aminoetil-D-arginina possuem afinidade mais forte pelo DNA e RNA do que os GPNAs correspondentes com a 2-aminoetil-1-arginina. (Chem. Commun. 244-246, 2005). Para um GPNA de 10-mer com 5 monômeros de GPNA com a backbone de 2-aminoetil-D-arginina, houve um aumento de 7°C na T_m (temperatura de fusão) contra o DNA complementar em comparação ao PNA correspondente não modificado. (Bioorg. Med. Chem. Lett, vol 16, 4931-4935, 2006).

[0029] Relatou-se que um GPNA anti-sentido de 16-mer contra o EGFR-TK humano demonstra atividade antitumor mediante administração ip (intraperitoneal) em camundongos atímicos nude, embora a atividade anti-sentido in vitro não tenha sido documentada para o GPNA anti-sentido na técnica anterior (WO 2008/061091).

[0030] PNAs com Nucleobase Modificada: Assim como os casos com DNA, modificações de nucleobase foram realizadas para melhorar a afinidade do PNA por ácidos nucleicos.

[0031] Os PNAs com adenina substituída por 2,6-diaminopurina foram avaliados quanto à sua afinidade pelo

DNA complementar ou RNA. Descobriu-se que a substituição por 2,6-diaminopurina levou a um aumento de 2,5 ~ 6°C na T_m por substituição. (Nucleic Acids Res. vol 25, 4639-4643, 1997).



Citosina e Citosinas Modificadas

[0032] Os PNAs com citosina substituída por 9-(2-aminoetoxi)fenoxazina foram avaliados quanto à sua afinidade pelo DNA complementar ou RNA. Uma única substituição por 9-(2-aminoetoxi)fenoxazina causou um aumento de 10,7 ~ 23,7°C na T_m , embora esse aumento tenha sido notavelmente dependente da sequência de nucleotídeo. A nucleobase 9-(2-aminopropoxi)fenoxazina também induziu um grande aumento na T_m . Devido a um grande aumento da T_m , o monômero de PNA com 9-(2-aminoetoxi)-fenoxazina ou 9-(2-aminopropoxi)fenoxazina como uma substituição de citosina foi denominado 'G-clamp'. (Org. Lett, vol 4, 4395-4398, 2002). No entanto, os dados de penetração celular não foram relatados para PNAs com G-clamp(s).

[0033] Os PNAs com citosina substituída por 6-(2-(2-aminoetoxi)fenil)-pirrolocitosina ou por 6-(2,6-di(2-aminoetoxi)fenil)pirrolocitosina foram avaliados quanto à sua afinidade pelo DNA complementar ou RNA. Uma única substituição por 6-(2-(2-aminoetoxi)fenil)pirrolocitosina ou por 6-(2,6-di(2-aminoetoxi)-fenil)pirrolocitosina aumentou a

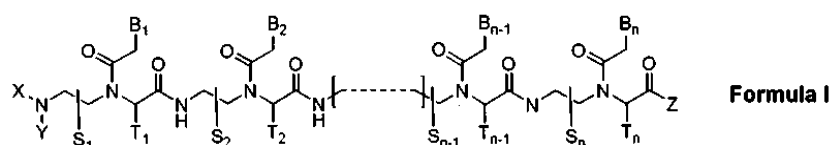
T_m em 3 ~ 11,5°C. (J. Am. Chem. Soc. vol 130, 12574-12575, 2008). No entanto, esses PNAs não foram avaliados quanto à penetração celular.

[0034] Outros Usos dos PNAs: Pelo fato de se ligar fortemente a um microRNA, o PNA pode inibir a função regulatória do microRNA, levando a um aumento no nível de expressão da(s) proteína(s) diretamente regulada(s) pelo microRNA. (RNA vol 14, 336-346, 2008). Pelo fato de se ligar fortemente a uma ribonucleoproteína, por exemplo, telomerase, o PNA pode modular a função celular da ribonucleoproteína. (Bioorg. Med. Chem. Lett, vol 9, 1273-78, 1999). Pelo fato de se ligar fortemente a uma determinada porção de um gene no núcleo, o PNA pode modular o nível de transcrição do gene. (Biochemistry vol 46, 7581-89, 2007).

[0035] Pelo fato de o PNA se ligar fortemente ao DNA e ao RNA, e discriminar sensivelmente um único par de base de não correspondência, o PNA seria adequado para detecção de alta fidelidade de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP). Uma vez que o PNA se liga fortemente ao DNA e ao RNA com alta especificidade à sequência, o PNA pode ter diversas outras aplicações terapêuticas e diagnósticas envolvendo o DNA ou o RNA (FASEB vol 14, 1041-1060, 2000).

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0036] A presente invenção provê uma nova classe de oligômeros de PNA representados pela Fórmula I, ou um sal farmaceuticamente aceitável destes:



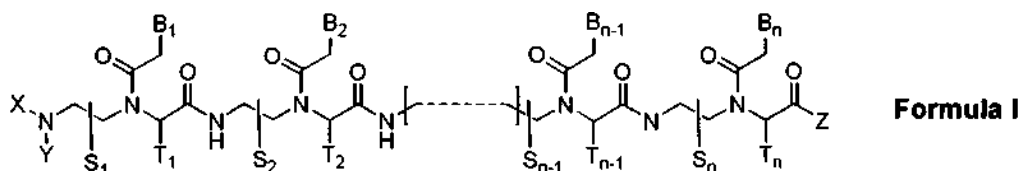
onde, n é um número inteiro igual ou maior que 5; $S_1, S_2, \dots, S_{n-1}, S_n, T_1, T_2, \dots, T_{n-1}$, e T_n representam, independentemente, "hidrido" [hydrido], "deutérico" [deuterido], alquila substituída ou não-substituída, ou radical arila substituído ou não-substituído; X e Y representam, independentemente, "hidrido", "deutérico", hidroxil, alquiloil substituído ou não-substituído, ariloil substituído ou não-substituído, amino substituído ou não-substituído, alquila substituída ou não-substituída, acila substituída ou não-substituída, sulfonila substituída ou não-substituída, ou radical arila substituído ou não-substituído; Z representa "hidrido", "deutérico", hidroxil, alquiloil substituído ou não-substituído, ariloil substituído ou não-substituído, amino substituído ou não-substituído, alquila substituída ou não-substituída, ou radical arila substituído ou não-substituído; $B_1, B_2, \dots, B_{n-1}$, e B_n são independentemente selecionados dentre nucleobases naturais, incluindo adenina, timina, guanina, citosina e uracila, e nucleobases não naturais; e, pelo menos um dentre $B_1, B_2, \dots, B_{n-1}$, e B_n representa, independentemente, uma nucleobase não natural com um radical amino substituído ou não-substituído ligado covalentemente à parcela responsável por suas devidas propriedades de pareamento de nucleobase.

[0037] Um oligômero de PNA da Fórmula I demonstra melhor afinidade de ligação pelo ácido nucleico e penetração celular em comparação ao seu oligômero de PNA correspondente 'não modificado'. Os oligômeros de PNA da presente invenção são úteis para inibir especificamente a sequência ou modular funções celulares e fisiológicas

mediadas por ácidos nucleicos ou moléculas fisiologicamente ativas tendo um domínio de ácido nucleico, por exemplo, ribonucleoproteínas. Também, os oligômeros de PNA da presente invenção são úteis para fins diagnósticos devido à sua capacidade de ligação específica da sequência a ácidos nucleicos.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

[0038] A presente invenção provê uma nova classe de oligômeros de PNA representados pela Fórmula I, ou um sal farmaceuticamente aceitável destes:



onde, n é um número inteiro igual ou maior que 5; S_1 , S_2 , ..., S_{n-1} , S_n , T_1 , T_2 , ..., T_{n-1} e T_n representam, independentemente, "hidrido", "deutérido", alquila substituída ou não-substituída, ou radical arila substituído ou não-substituído; X e Y representam, independentemente, "hidrido", "deutérido", hidroxil, alquiloxi substituído ou não-substituído, ariloxi substituído ou não-substituído, amino substituído ou não-substituído, alquila substituída ou não-substituída, acila substituída ou não-substituída, sulfonila substituída ou não-substituída, ou radical arila substituído ou não-substituído; Z representa "hidrido", "deutérido", hidroxil, alquiloxi substituído ou não-substituído, ariloxi substituído ou não-substituído, amino substituído ou não-substituído, alquila substituída ou não-substituída, ou radical arila substituído ou não-substituído; B_1 , B_2 , ..., B_{n-1} , e B_n são independentemente

selecionados dentre nucleobases naturais, incluindo adenina, timina, guanina, citosina e uracila, e nucleobases não naturais; e, pelo menos um dentre B_1 , B_2 , ..., B_{n-1} , e B_n representam, independentemente, uma nucleobase não natural com um radical amino substituído ou não-substituído ligado covalentemente à parcela responsável por suas devidas propriedades de pareamento de nucleobase.

[0039] Um oligômero de PNA da presente invenção demonstra melhor penetração celular e ligação ao ácido nucleico em comparação ao seu oligômero de PNA correspondente 'não modificado'. Na presente invenção, o termo oligômero de PNA 'não modificado' refere-se a um oligômero de PNA da Fórmula I, onde S_1 , S_2 , ..., S_{n-1} , S_n , T_1 , T_2 , ..., T_{n-1} , e T_n são radical "hidrido"; e B_1 , B_2 , ..., B_{n-1} , e B_n são independentemente selecionados dentre nucleobases naturais compreendendo adenina, timina, guanina, e citosina.

[0040] Um oligômero de PNA da presente invenção penetra facilmente a membrana celular dos mamíferos e pode afetar ou alterar as funções celulares por ligação especificamente à sequência a um ácido nucleico ou a uma nucleoproteína dentro da célula.

[0041] Um oligômero de PNA da Fórmula I pode inibir potencialmente a síntese de proteína ribossômica pela forte ligação ao mRNA. Um oligômero de PNA da presente invenção pode ligar-se fortemente a um pre-mRNA e alterar o splicing do pre-mRNA em mRNA. Além disso, um oligômero de PNA da presente invenção podem ligar-se fortemente a um microRNA e inibir a degradação do mRNA induzida pelo microRNA.

[0042] Um oligômero de PNA da Fórmula I pode

ligar-se, de forma previsível, ao domínio de ácido nucleico de uma ribonucleoproteína, por exemplo, telomerase, e modular suas função(ões) fisiológica(s). Um oligômero de PNA da presente invenção pode ligar-se a um gene e modular a transcrição do gene. Um oligômero de PNA da Fórmula I pode ligar-se a um gene viral ou sua transcrição e inibir a proliferação do vírus. Um oligômero de PNA da presente invenção pode afetar as funções celulares que não aquelas descritas acima por ligação especificamente à sequência a um ácido nucleico ou uma nucleoproteína dentro da célula do mamífero. Além disso, um oligômero de PNA da presente invenção pode ligar-se fortemente a um mRNA bacteriano, ácido nucleico ou gene, e inibir a proliferação bacteriana ou alterar os perfis de biossíntese bacteriana.

[0043] Um oligômero de PNA da presente invenção é altamente sensível a uma não correspondência de base na ligação à sua contraparte de DNA complementar, e seria apropriado para detecção de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) com alta fidelidade. Os oligômeros de PNA da presente invenção ligam-se fortemente a seus DNAs complementares com alta especificidade à sequência, e podem ser úteis para determinação do perfil gene. Um oligômero de PNA da Fórmula I pode ser útil para sondar ou localizar um ácido nucleico tendo uma molécula, por exemplo, telomere, dentro da célula se devidamente marcado com um cromóforo, por exemplo, fluoróforo. Os oligômeros de PNA da presente invenção podem ser úteis para diversos fins diagnósticos ou analíticos que não aqueles detalhados acima.

[0044] Um oligômero de PNA da presente invenção possui boa solubilidade aquosa em comparação ao oligômero de

PNA correspondente 'não modificado' e pode ser utilizado dissolvido em água, em solução fisiológica ou em uma solução tampão. Um oligômero de PNA da Fórmula I pode ser formulado com um lipídio catiônico, por exemplo, lipofectamina. Um oligômero de PNA da presente invenção pode ser submetido a duplexação com um DNA complementar e o duplex resultante pode ser formulado com um lipídio catiônico.

[0045] Um oligômero de PNA da presente invenção pode ser formulado em diversas formas farmacêuticas incluindo, entre outras, formulação injetável, spray nasal, comprimido, grânulos, cápsula dura, cápsula mole, formulação lipossômica, suspensão oral, formulação transdérmica, entre outras.

[0046] Um oligômero de PNA da presente invenção pode ser administrado a um indivíduo em doses terapeuticamente eficazes, o que pode variar dependendo da indicação, da via de administração, cronograma posológico, situação do indivíduo, entre outras.

[0047] Um oligômero de PNA da presente invenção pode ser administrado a um indivíduo por diversas de vias, incluindo, entre outras, injeção intravenosa, injeção subcutânea, injeção intraperitoneal, inalação nasal, administração oral, aplicação transdérmica, entre outras.

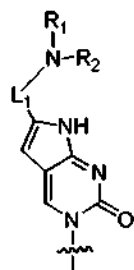
[0048] Um oligômero de PNA da Fórmula I pode ser administrado a um indivíduo em associação com um adjuvante farmacêuticamente aceitável incluindo, entre outros, ácido cítrico, ácido clorídrico, ácido tartárico, ácido esteárico, polietilenoglicol, polipropilenoglicol, etanol, bicarbonato de sódio, água destilada, ácido hialurônico, lipídio catiônico, por exemplo, lipofectamina,

amido, gelatina, talco, ácido ascórbico, azeite de oliva, óleo de palma, metilcelulose, óxido de titânio, carboximetilcelulose de sódio, edulcorante, preservante, entre outros.

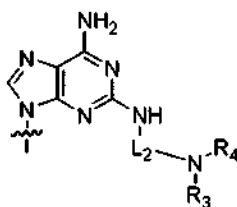
[0049] Um oligômero de PNA da presente invenção, dependendo da presença de grupo(s) funcional(ais) básico(s) ou ácido(s), pode ser utilizado como neutralizado com uma quantidade equivalente de um ácido ou base farmacologicamente aceitável incluindo, entre outras, hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, ácido clorídrico, ácido metanossulfônico, ácido cítrico, entre outros.

[0050] Os oligômeros de PNA preferidos abrangem os oligômeros de PNA da Fórmula I, ou um sal farmacologicamente aceitável deste: onde, n é um número inteiro igual ou maior que 5, porém menor ou igual a 30; $S_1, S_2, \dots, S_{n-1}, T_1, T_2, \dots, T_{n-1},$ e T_n são radical "hidrido"; X e Y são independentemente selecionados dentre "hidrido", alquila substituída ou não-substituída, acila substituída ou não-substituída, sulfonila substituída ou não-substituída, e radical arila substituído ou não-substituído; Z representa "hidrido", hidroxil, alquilo substituído ou não-substituído, amino substituído ou não-substituído, alquila substituída ou não-substituída, ou radical arila substituído ou não-substituído; $B_1, B_2, \dots, B_{n-1},$ e B_n são independentemente selecionados dentre nucleobases naturais, incluindo adenina, timina, guanina, citosina e uracila, e nucleobases não naturais; e, pelo menos um dentre $B_1, B_2, \dots, B_{n-1},$ e B_n são independentemente selecionados dentre nucleobases não naturais representadas pela Fórmula II, Fórmula III, ou

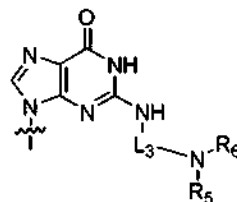
Fórmula IV:



Formula II

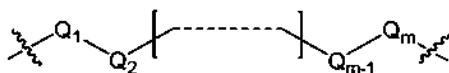


Formula III



Formula IV

onde, R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 e R_6 são independentemente selecionados dentre alquila substituída ou não-substituída, "hidrido", hidroxil, e radical alquilo substituído ou não-substituído; e, L_1 , L_2 e L_3 são um ligante covalente representado pela Fórmula V ligando um grupo amino básico à parcela responsável pelas propriedades de pareamento de nucleobase:



Formula V

onde, Q_1 e Q_m são radicais metileno substituídos ou não-substituídos ($-\text{CH}_2-$) radical, e Q_m está diretamente ligado ao grupo amino básico; Q_2 , Q_3 , ..., e Q_{m-1} são independentemente selecionados dentre radical metileno substituído ou não-substituído, oxigênio ($-\text{O}-$), enxofre ($-\text{S}-$), e radical amino substituído ou não-substituído [$-\text{N}(\text{H})-$, ou $-\text{N}(\text{substituinte})-$]; e, m é um número inteiro igual ou maior que 2, porém menor ou igual a 15.

[0051] Os oligômeros de PNA de interesse particular compreendem oligômeros de PNA da Fórmula I, ou um sal farmaceuticamente aceitável destes: onde, n é um número inteiro igual ou maior que 8, porém menor ou igual a 25; S_1 , S_2 , ..., S_{n-1} , S_n , T_1 , T_2 , ..., T_{n-1} , e T_n são radical "hidrido";

X e Y são independentemente selecionados dentre "hidrido", alquila substituída ou não-substituída, e radical acila substituído ou não-substituído;

[0052] Z representa hidroxí ou radical amino substituído ou não-substituído; $B_1, B_2, \dots, B_{n-1},$ e B_n são independentemente selecionados dentre nucleobases naturais, incluindo adenina, timina, guanina, citosina e uracila, e nucleobases não naturais; pelo menos dois dentre $B_1, B_2, \dots, B_{n-1},$ e B_n são independentemente selecionados dentre nucleobases não naturais representadas pela Fórmula II, Fórmula III, ou Fórmula IV; R_1, R_2, R_3, R_4 e R_5 são independentemente selecionados dentre alquila substituída ou não-substituída e radical "hidrido"; Q_1 e Q_m são radicais metileno substituídos ou não-substituídos e Q_m está diretamente ligado ao grupo amino básico; $Q_2, Q_3, \dots,$ e Q_{m-1} são independentemente selecionados dentre radical metileno substituído ou não-substituído, oxigênio e radical amino; e, m é um número inteiro igual ou maior que 2, porém menor ou igual a 12.

[0053] Os oligômeros de PNA de alto interesse compreendem oligômeros de PNA da Fórmula I, ou um sal farmaceuticamente aceitável destes: onde, n é um número inteiro igual ou maior que 10, porém menor ou igual a 25; $S_1, S_2, \dots, S_{n-1}, S_n, T_1, T_2, \dots, T_{n-1},$ e T_n são radical "hidrido"; X e Y são independentemente selecionados dentre "hidrido" e radical acila substituído ou não-substituído; Z representa hidroxí, alquiloxi, ou radical amino substituído ou não-substituído; e, $B_1, B_2, \dots, B_{n-1},$ e B_n são independentemente selecionados dentre nucleobases naturais, incluindo adenina, timina, guanina, citosina e uracila, e

nucleobases não naturais; pelo menos três dentre B_1 , B_2 , ..., B_{n-1} , e B_n são independentemente selecionados dentre nucleobases não naturais representadas pela Fórmula II, Fórmula III, ou Fórmula IV; R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 e R_6 são independentemente selecionados dentre alquila substituída ou não-substituída e radical "hidrido"; Q_1 e Q_m são radicais metileno, e Q_m está diretamente ligado ao grupo amino básico; Q_2 , Q_3 , ..., e Q_{m-1} são independentemente selecionados dentre metileno, oxigênio e radical amino; e, m é um número inteiro igual ou maior que 2, porém menor ou igual a 10.

[0054] Os oligômeros de PNA de maior interesse abrangem oligômeros de PNA da Fórmula I, ou um sal farmaceuticamente aceitável destes: onde, n é um número inteiro igual ou maior que 10, porém menor ou igual a 20; S_1 , S_2 , ..., S_{n-1} , S_n , T_1 , T_2 , ..., T_{n-1} , e T_n são radical "hidrido"; X e Y são independentemente selecionados dentre "hidrido" e radical acila substituído ou não-substituído; Z representa hidroxí ou radical amino substituído ou não-substituído; B_1 , B_2 , ..., B_{n-1} , e B_n são independentemente selecionados dentre nucleobases naturais, incluindo adenina, timina, guanina, citosina e uracila, e nucleobases não naturais; pelo menos três dentre B_1 , B_2 , ..., B_{n-1} , e B_n são independentemente selecionados dentre nucleobases não naturais representadas pela Fórmula II, Fórmula III, ou Fórmula IV; R_1 , R_3 , e R_5 são radical "hidrido" e R_2 , R_4 , e R_6 representam, independentemente, "hidrido" ou radical amidinila substituído ou não-substituído; Q_1 e Q_m são radicais metileno, e Q_m está diretamente ligado ao grupo amino básico; Q_2 , Q_3 , ..., e Q_{m-1} são independentemente selecionados dentre metileno, oxigênio e radical amino; e, m

é um número inteiro igual ou maior que 2, porém menor ou igual a 10.

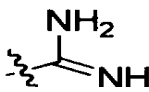
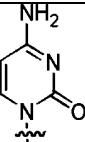
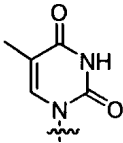
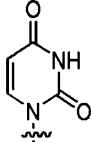
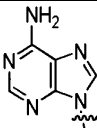
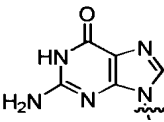
[0055] Os oligômeros de PNA de mais alto interesse compreendem oligômeros de PNA da Fórmula I, ou um sal farmaceuticamente aceitável destes: onde, n é um número inteiro igual ou maior que 10, porém menor ou igual a 20; $S_1, S_2, \dots, S_{n-1}, S_n, T_1, T_2, \dots, T_{n-1}$, e T_n são radical "hidrido"; X e Y são independentemente selecionados dentre "hidrido" e radical acila substituído ou não-substituído; Z representa hidroxí ou radical amino substituído ou não-substituído; $B_1, B_2, \dots, B_{n-1}$, e B_n são independentemente selecionados dentre adenina, timina, guanina, citosina, e nucleobases não naturais; pelo menos três dentre $B_1, B_2, \dots, B_{n-1}$, e B_n são independentemente selecionados dentre nucleobases não naturais representadas pela Fórmula II, Fórmula III, ou Fórmula IV; R_1, R_3 , e R_5 são radical "hidrido" e R_2, R_4 , e R_6 representam, independentemente, "hidrido" ou radical amidinila; Q_1 e Q_m são radicais metileno, e Q_m está diretamente ligado ao grupo amino básico; $Q_2, Q_3, \dots$, e Q_{m-1} são independentemente selecionados dentre metileno e radical oxigênio; e, m é um número inteiro igual ou maior que 2, porém menor ou igual a 8.

[0056] Oligômeros específicos de PNA de forte interesse compreendem oligômeros de PNA da Fórmula I, ou um sal farmaceuticamente aceitável destes: onde, n é um número inteiro igual ou maior que 8, porém menor ou igual a 20; $S_1, S_2, \dots, S_{n-1}, S_n, T_1, T_2, \dots, T_{n-1}$, e T_n são radical "hidrido"; X é radical "hidrido"; Y representa "hidrido", ou radical acila substituído ou não-substituído; Z representa hidroxí ou radical amino substituído ou não-substituído; $B_1, B_2,$

..., B_{n-1} , e B_n são independentemente selecionados dentre adenina, timina, guanina, citosina, e nucleobases não naturais; pelo menos três dentre B_1 , B_2 , ..., B_{n-1} , e B_n são independentemente selecionados dentre nucleobases não naturais representadas pela Fórmula II, Fórmula III, ou Fórmula IV; R_1 , R_3 , e R_5 são radical "hidrido" e R_2 , R_4 , e R_6 representam, independentemente, "hidrido" ou radical amidinila; L_1 representa $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-$, $-CH_2-O-(CH_2)_2-$, ou $-CH_2-O-(CH_2)_3-$, sendo que a extremidade direita está diretamente ligada ao grupo amino básico; e, L_2 e L_3 são independentemente selecionados dentre $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-$, $-(CH_2)_3-O-(CH_2)_2-$, $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_3-$, $-(CH_2)_2-$, $-(CH_2)_3-$, $-(CH_2)_4-$, $-(CH_2)_5-$, $-(CH_2)_6-$, $-(CH_2)_7-$, e $-(CH_2)_8-$, sendo que a extremidade direita está diretamente ligada ao grupo amino básico.

[0057] Os termos e abreviações acima utilizados para os oligômeros de PNA da presente invenção são ilustrados na tabela abaixo.

Termo/Abreviação	Ilustração ou definição
oligômero	oligonucleotídeo
"hidrido"	átomo de hidrogênio único (-H)
"deutério"	átomo de deutério único (-D)
alquila	radical alquila linear ou ramificada
arila	grupo aromático, por exemplo, fenila, piridila, furila, naftila, etc
metileno	$-(CH_2)-$
acila	'C(O)-' substituído por "hidrido", alquila, ou radical arila
Continuação da Tabela	
sulfonila	'S(O) ₂ -' substituído por alquila, ou radical arila
alquiloxi	R-O-' onde R é radical alquila substituído ou não-substituído
oxigênio	'O-'
enxofre	'S-'

amidinila	
citosina (C)	
timina (T)	
uracila (U)	
adenina (A)	
guanina (G)	

PROCEDIMENTOS DE SÍNTESE GERAL

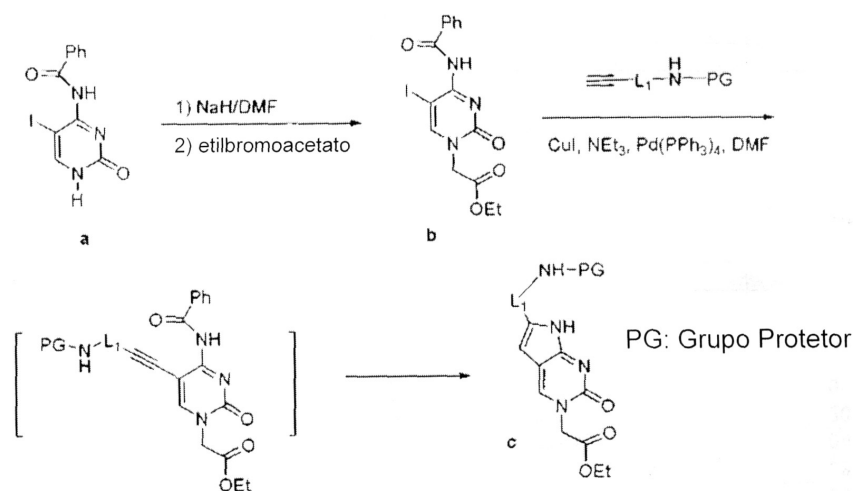
[0058] Para caracterização das moléculas da presente invenção, espectros de NMR foram registrados em um espectrômetro Varian Mercury 300MHz, Bruker Avance 400MHz, ou Varian Inova 500MHz NMR. Um Sistema de Captação Iônica Bruker Daltonics Ultraflex MALDI-TOF ou Agilent LC/MS foi empregado para determinação do peso molecular. Os oligômeros de PNA foram analisados e purificados por C₁₈-HPLC de fase reversa em um sistema de HPLC Hewlett Packard 1050 ou em um sistema de HPLC Shimadzu LC-6AD. Salvo se informado em contrário, sílica gel foi utilizada para a separação cromatográfica de pequenas moléculas preparadas na presente invenção. O ponto de fusão é relatado como não corrigido.

[0059] Os derivados de nucleobase não natural utilizados para a síntese de monômeros de PNA da presente invenção foram preparados de acordo com um dos métodos (Métodos A, B, e C) providos abaixo ou com pequena(s) modificação(ões) deste, salvo de detalhado de outra forma em exemplos de síntese real.

[0060] Método A: derivados de 6-alkila-pirollocitosina foram sintetizados como devidamente protegidos de acordo com o Esquema 1 ou com pequena(s) variação(ões) deste. Esses derivados de 6-alkila-pirollocitosina foram utilizados para sintetizar monômeros de PNA contendo uma nucleobase representada pela Fórmula II como um equivalente a citosina.

[0061] O primeiro composto a foi desprotonado com NaH e então alquilado com etilbromoacetato para obtenção do composto b. O composto b foi submetido a uma ligação catalisada com paládio com um derivado de acetileno terminal, que foi transformado em anel in situ no produto c de acordo com a literatura. (Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids vol 22, 1029-1033, 2003)

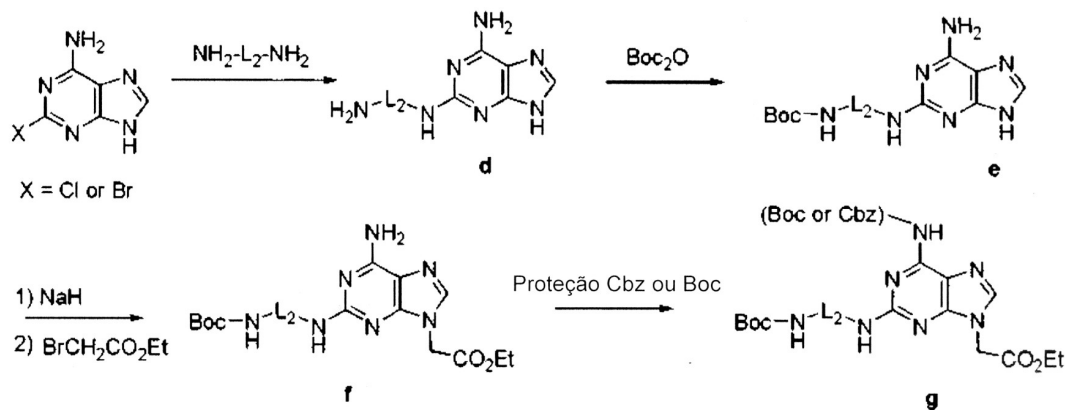
Esquema 1



[0062] Método B: derivados de 2,6-diaminopurina foram sintetizados como devidamente protegidos de acordo com o Esquema 2 ou com pequena(s) variação(ões) deste. Esses derivados de 2,6-diamino-purina foram utilizados para sintetizar monômeros de PNA contendo uma nucleobase representada pela Fórmula III como um equivalente de adenina.

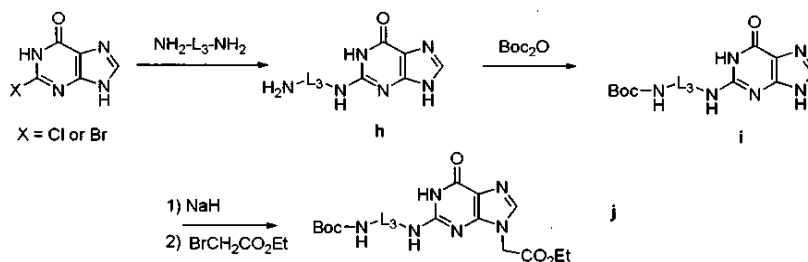
[0063] Primeiro, 2-haloadenina foi reagida com a diamina em alta temperatura para obtenção do composto d, que foi então reagido com Boc_2O para resultar no composto e. O composto e foi desprotonado com NaH e alquilado com etilbromoacetato para obtenção do composto f. O grupo amino aromático do composto f foi protegido com grupo Cbz ou Boc para resultar no composto g.

Esquema 2



[0064] Método C: derivados de guanina N-alquilada foram sintetizado como devidamente protegidos de acordo com o Esquema 3 ou com pequenas variações deste. Esses derivados de guanina foram utilizados para sintetizar monômeros de PNA contendo uma nucleobase representada pela Fórmula IV como um equivalente de guanina.

Esquema 3



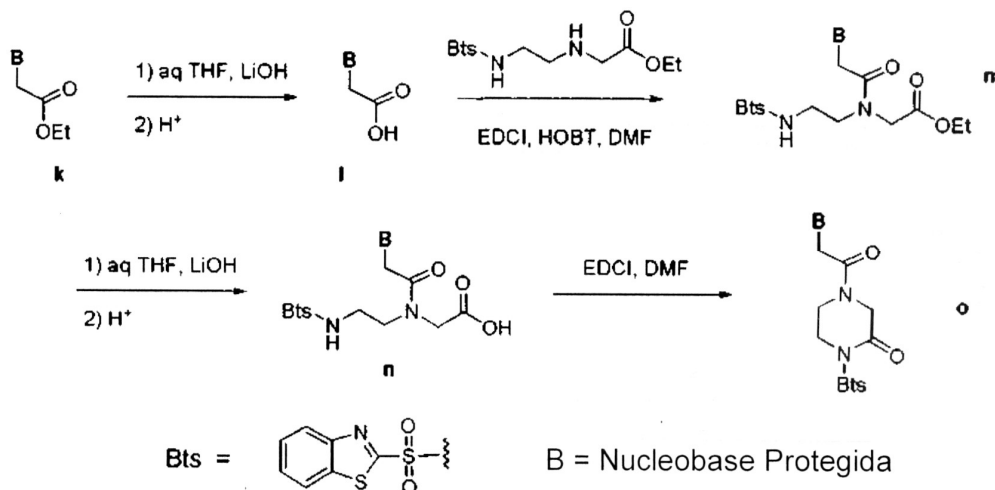
[0065] Primeiro, 2-halohipoxantina foi reagida com a diamina em alta temperatura para obtenção do composto h, que foi então reagido com Boc_2O para resultar no composto i. O composto i foi desprotonado com NaH e alquilado com etilbromoacetato para obtenção do composto j..

[0066] Dois tipos de monômeros de PNA foram sintetizados de acordo com o Método D ou com o Método E para a preparação de oligômeros de PNA da Fórmula I. Os oligômeros de PNA foram preparados pela Panagene, Inc. (www.panagene.com, Daejon, Coréia do Sul) utilizando monômeros de PNA do tipo o do Esquema 4 mediante solicitação da CTI Bio. Alternativamente, os monômeros de PNA do tipo q do Esquema 5 foram utilizado internamente para a síntese de oligômeros de PNA de acordo com o método descrito na técnica anterior ou com pequena(s) modificação(ões) deste. (USP 6,133,444)

[0067] Método D: monômeros de PNA com uma nucleobase modificada foram preparados de acordo com o Esquema 4 ou com pequena(s) variação(ões) deste como devidamente protegidos para o método de síntese de oligômero de PNA descrito na literatura. (Org. Lett, vol 9, 3291-3293, 2006). No Esquema 4, o composto k pode corresponder ao composto c do Esquema 1, ao composto g do Esquema 2 ou ao composto j do Esquema 3; no entanto, pode não ser

necessariamente limitado a um dos compostos de éster.

Esquema 4

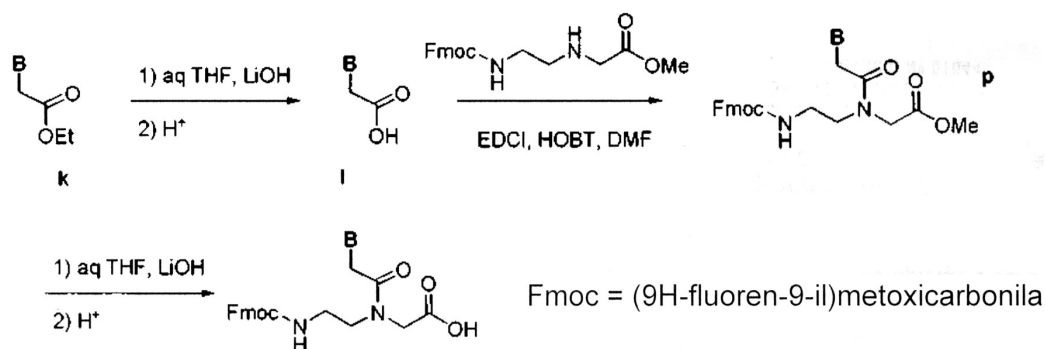


[0068] Primeiro, o éster k foi submetido a hidrólise alcalina para resultar no ácido I, que foi então ligado com N-[2-{N-(2-benzotiazolinil)sulfonilamino}etil]-glicinato de etila para obtenção do composto m. O composto m foi levemente hidrolisado com LiOH para resultar no ácido n, que foi ciclizado por uma reação de ligação EDCI para obtenção do monômero de PNA modificado o. A estrutura química do monômero de PNA o foi assumida como no Esquema 4 em toda a presente invenção, contanto que esses monômeros de PNA atribuídos tenham resultado, com sucesso, nos oligômeros de PNA na literatura. (Org. Lett, vol 9, 3291-3293, 2006)

[0069] Método E: Alternativamente, monômeros de PNA com uma nucleobase modificada foram preparados de acordo com o Esquema 5 ou com pequena(s) variação(ões) deste como devidamente protegidos para o método de síntese de oligômero de PNA provido na técnica anterior. (USP 6,133,444). No Esquema 5, o composto k pode corresponder ao composto c do Esquema 1, ao composto g do Esquema 2 ou ao composto j do Esquema 3; no entanto, pode não ser necessariamente limitado

a um dos compostos de éster.

Esquema 5



[0070] Primeiro, o ácido I foi ligado ao N-[2-{N-(9H-fluoren-9-il)amino}etil]-glicinato de etila para obtenção do composto p por uma reação de ligação EDCI. Então, o composto p foi levemente hidrolisado com LiOH para obtenção do monômero de PNA q com uma nucleobase modificada.

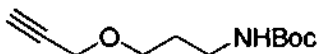
[0071] Os exemplos a seguir contêm descrições dos métodos de preparação dos compostos da presente invenção. As descrições detalhadas desses exemplos são apresentadas somente para fins ilustrativos e não devem ser interpretadas como uma restrição à presente invenção. A maioria dessas descrições detalhadas está dentro do escopo e serve para exemplificar os PROCEDIMENTOS DE SÍNTESE GERAL descritos acima que fazem parte da invenção. As abreviações utilizadas nos exemplos a seguir são definidas na tabela abaixo. □

Categoria	Denotação
¹ H NMR	Ressonância magnética nuclear de próton. Ao apresetnar os dados de NMR, abreviações amplamente aceitas foram utilizadas como segue: s para singleto, d para dubleto, t para tripleto, q para quarteto, m para multipeto, br para amplo, J para constante de acoplamento, CDCl ₃ para clorofórmio deuterado, DMSO-d ₆ para DMSO hexa-deuterado, entre outras.
MS	Espectroscopia de massa. Ao apresentar os dados da MS, abreviações popularmente aceitas foram utilizadas como segue: MALDI-TOF para ionização por dessorção a laser assistida por matriz-tempo de voo, ESI para ionização por eletrospray, PM para peso moleCular, (m+1) para pico iônico de MH ⁺ , (m+23) para pico iônico para MNa ⁺ etc.

Exemplo 2: Preparação de {(N-benzoil)-5-iodocitosina-1-il}acetato de etila (2).

[0073] A uma solução agitada de 8,3g de N-benzoil-5-iodocitosina dissolvidos em 60ml de DMF, adicionou-se a 0°C 1,06g de NaH a 55% em óleo mineral, e a solução foi agitada em temperatura ambiente por 2h. Após a adição de 2,7ml de bromoacetato de etila à mistura de reação, a solução de reação foi agitada por mais 24 horas em temperatura ambiente, o que foi seguido pela remoção do solvente sob pressão reduzida. O resíduo resultante foi dissolvido e o material insolúvel foi filtrado. O filtrado foi lavado duas vezes com cloreto de amônio aquoso saturado, seco em sulfato de magnésio anidro, e concentrado sob vácuo. O resíduo resultante foi purificado por cromatografia em coluna (1:1 hexano/EA) para resultar em 6,5g do composto 2 (composto b no Esquema 1) na forma de um sólido amarelo, pf 154-5°C. ¹H NMR (400MHz; CDCl₃) δ 13,31 (br s, 1H), 8,37 (d, J = 12 Hz, 2H), 7,69 (s, 1H), 7,55 (t, J = 7,4 Hz, 1H), 7,46 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 4,49 (s, 2H), 4,27 (q, J = 7,2 Hz, 2H), 1,32 (t, J = 7,2 Hz, 3H).

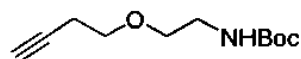
Exemplo 3: Preparação de 3-{3-(t-butoxicarbonilamino)propiloxi}-1-propino (3).



[0074] A 6,5g de NaH a 55% em óleo mineral disperso em 150ml de THF a 0°C, adicionou-se gota a gota, durante 15 min, 25g do composto 1, e a mistura foi agitada por 1 hora. Após a adição de 17,5ml brometo de propargila (solução de tolueno a 80%) gota a gota durante 30min, a mistura de reação foi agitada em temperatura ambiente por

20h. A reação foi resfriada pela adição lenta de 250ml de água e o THF foi removido sob pressão reduzida. Então, a mistura aquosa resultante foi extraída com 250ml de EA, que foi lavada 3 vezes com 250ml de água. A camada orgânica foi seca em sulfato de magnésio anidro, e o sulfato de magnésio foi filtrado. O filtrado resultante foi concentrado sob vácuo e submetido a cromatografia em coluna (5:1 Hexano/EA) para resultar em 22,7g do composto 3 na forma de um líquido amarelo. ^1H NMR (400 MHz; DMSO-d_6) δ 6,78 (t, J = 5,2 Hz, 1H), 4,09 (d, J = 2,4 Hz, 2H), 3,43-3,39 (m, 3H), 2,95 (q, J = 6,4 Hz, 2H), 1,60 (m, 2H), 1,37 (s, 9H).

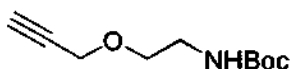
[0075] Exemplo 4: Preparação de 4-(2-(*t*-butoxicarbonilamino)etoxi)-1-butino (4)



[0076] A 3,8g de 4-(2-azidoetoxi)-1-butino dissolvido em 17ml de THF, adicionou-se 7,2g de trifenilfosfina e 0,7ml de água, e a mistura de reação foi agitada por 8h, o que foi seguido pela remoção do solvente sob pressão reduzida. Então, o resíduo resultante foi dissolvido em 20ml de EA e extraído duas vezes com 10ml de HCl aquoso 1M. Adicionou-se carbonato de sódio aquoso à camada aquosa para ajuste do pH em 9 ~ 10. Adicionou-se 5,96g de Boc_2O dissolvido em 15ml de THF à solução, e a mistura de reação foi agitada por 12 horas. Depois que o THF foi removido sob vácuo, a solução resultante foi extraída com EA. A camada orgânica foi lavada com ácido cítrico aquoso 0,5M, e seca em sulfato de magnésio anidro. A camada orgânica foi concentrada e purificada por cromatografia em coluna (9:1 Hexano/EA) para resultar em 3,4g do composto 4

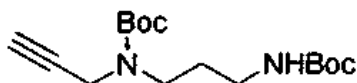
na forma de um óleo amarelo. ^1H NMR (400MHz; CDCl_3) δ 4,95 (s, 1H), 3,58 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H), 3,53 (t, $J = 5,0$ Hz, 2H), 3,32 (m, 2H), 2,46 (m, 2H), 2,00 (t, $J = 2,8$ Hz, 1H), 1,45 (s, 9H).

Exemplo 5: Preparação de 3-(2-(t-butoxicarbonilamino)etoxi)-1-propino (5).



[0077] 20g de 2-((t-butoxicarbonil)amino)-1-etanol foram reagidos e purificados seguindo-se similarmente o procedimento descrito no Exemplo 3 para resultar em 23,7g do composto 5 na forma de um óleo amarelo claro. ^1H NMR (400MHz; DMSO-d_6) δ 6,81 (t, 1H), 4,11 (d, $J = 2,4$ Hz, 2H), 3,41 (m, 3H), 3,07 (q, $J = 6,0$ Hz, 2H), 1,38 (s, 9H).

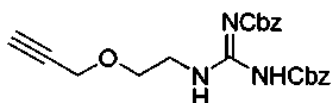
Exemplo 6: Preparação de 3-[N-(3-(t-butoxicarbonilamino)propil)-N-(t-butoxi-carbonil)amino]-1-propino (6)



[0078] A uma solução agitada de N-[3-(t-butoxicarbonilamino)propil]-N-(2-propinil)amina dissolvida em 83ml de THF e 95ml de água, adicionou-se gota a gota 42g de Boc_2O em temperatura ambiente. A solução de reação foi agitada por 1,5h e concentrada sob vácuo. A camada aquosa resultante foi extraída com EA. A camada de EA foi lavada em série com ácido cítrico aquoso 0,5M e salmoura, seca em sulfato de magnésio anidro, concentrada sob pressão reduzida, e purificada por cromatografia em coluna (1:1 Hexano/EA) para resultar em 19g do composto 6 na forma de um

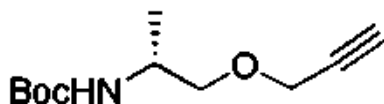
óleo amarelo. ^1H NMR (400MHz; CDCl_3) δ 5,26 (br s, 0,6H), 4,74 (br s, 0,4H), 4,07 (br s, 1H), 3,98 (br s, 1H), 3,40 (t, J = 6,4 Hz, 2H), 3,13 (m, 2H), 2,21 (t, 1H), 1,73 (m, 2H), 1,49 (s, 9H), 1,45 (s, 9H).

Exemplo 7: Preparação de 3-[2-{2,3-bis(benziloxicarbonil)guanidino}-etoxi]-1-propino (7)



[0079] A uma solução agitada de 10,9g do composto 5 dissolvida em 110ml de MC, adicionou-se 110ml de TFA a 0°C gota a gota durante 2h, e a mistura de reação foi agitada por mais 3h. A solução de reação foi concentrada sob pressão reduzida e o resíduo resultante foi dissolvido em 40ml de MC a 0°C , ao qual adicionou-se 12,3ml de TEA e então 8,8g de 1,3-bis(benziloxicarbonil)-2-(metiltio)pseudouréia em temperatura ambiente. A solução de reação foi agitada por 4h e lavada duas vezes com água. A camada orgânica foi seca em sulfato de magnésio anidro, concentrada sob vácuo e submetida a cromatografia em coluna (5:1 hexano/EA) para resultar em 9,8g do composto 7 na forma de um sólido branco. ^1H NMR (400MHz; DMSO-d_6) δ 11,72 (s, 1H), 8,58 (s, 1H), 7,40-7,35 (m, 10H), 5,18 (s, 2H), 5,12 (s, 2H), 4,18 (d, 2H), 3,67-3,66 (m, 4H), 2,43 (t, 1H).

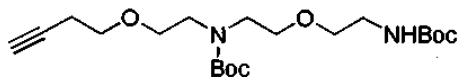
Exemplo 8: Preparação de 2-((t-butoxicarbonil)amino)-1-(2-propinil-1-oxi)}-(R)-propano (8).



[0080] 10,8g de t-butila-(R)-1-hidroxi-(propan-2-il) carbamato foram reagidos e purificados seguindo-se

similarmente o procedimento descrito no Exemplo 3 para resultar em 10,1 g do composto 8 na forma de um óleo amarelo. ^1H NMR (500MHz; DMSO-d_6) δ 6,63 (d, 1H), 4,11 (d, 2H), 3,60 (m, 1H), 3,37-3,33 (m, 2H), 3,26-3,23 (m, 1H), 1,38 (s, 9H), 1,05 (d, 3H).

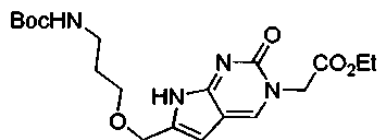
Exemplo 9: Preparação de N-[2-{2-(t-butoxicarbonil)aminoetoxi}etil]-N-[2-((3-butilil)-1-oxi}etil]-N-(t-butoxicarbonil)amina (9).



[0081] A uma solução agitada de 5g de metanossulfonato de 2-((3-butilil)-1-oxi)etila e 5,32g de 2-[2-{2-(t-butoxicarbonil)amino}etil-1-oxi]etilamina em 60ml de acetonitrila, adicionou-se gota a gota 3,6g de carbonato de potássio dissolvido em água a 0°C. A solução de reação foi deixada aquecer lentamente até a temperatura ambiente e agitada por mais 24 horas e então concentrada sob pressão reduzida. O resíduo resultante foi dissolvido em MC e lavado com água. A camada orgânica foi concentrada e dissolvida em 80ml de THF e 80ml de água, à qual adicionou-se 8,4g de Boc_2O dissolvido em 50ml de THF. A mistura de reação foi agitada em temperatura ambiente por 16h, o que foi seguido pela remoção de THF sob vácuo e extração com EA. A camada orgânica foi lavada em série com ácido cítrico aquoso 0,5M, água e salmoura. A camada orgânica foi seca em sulfato de sódio anidro, concentrada e purificada por cromatografia em coluna (hexano δ 1:4 EA/hexano) para obtenção de 2,45g do composto 9 na forma de um óleo amarelo claro. ^1H NMR (400MHz; CDCl_3) δ 5,08 (br s, 0,5H), 4,93 (br s, 0,5H), 3,61-3,46 (m, 12H), 3,31 (m, 2H), 2,48 (m, 2H), 1,99 (t, 1H), 1,48 (s, 9H), 1,46 (s, 9H).

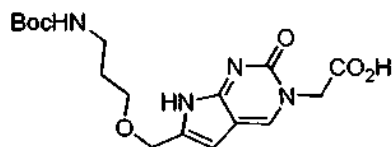
Exemplo 10: Preparação de 2-[6-(3-(t-

butoxicarbonilamino)propil-1-oxi)-metil-2-oxo-2H-pirrólo [2,3-d]pirimidin-3(7H)-il]acetato de etila (10).



[0082] A uma solução agitada de 6,5g do composto 2 dissolvida em 120ml de DMF, adicionou-se em série 580mg de CuI, 4,2ml de TEA, 9,74g do composto 3, e 1,76g de Pd(PPh₃)₄. Então, a mistura de reação foi agitada por 24 horas a 50°C com proteção contra a luz, e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo resultante foi dissolvido em 250ml de EtOH e agitado sob refluxo por 18h. Então, a solução foi concentrada sob vácuo e submetida a separação cromatográfica (95:5 EA/EtOH) para obtenção de 2,3g do composto 10 na forma de uma espuma/sólido vermelho escuro. ¹H NMR (400MHz; DMSO-d₆) δ 11,30 (br s, 1H), 8,37 (s, 1H), 6,78 (m, 1H), 6,19 (s, 1H), 4,70 (s, 2H), 4,37 (s, 2H), 4,14 (q, J = 7,2 Hz, 2H), 3,42 (t, J = 6,4 Hz, 2H), 2,98 (m, 2H), 1,63 (m, 2H), 1,36 (s, 9H), 1,20 (t, J = 7,2 Hz, 3H).

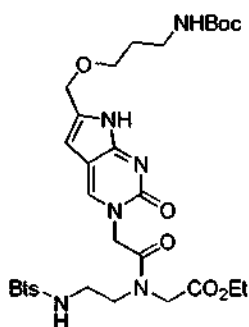
Exemplo 11: Preparação de ácido 2-[6-{3-(t-butoxicarbonilamino)propil-1-oxi}metil-2-oxo-2H-pirrólo-[2,3-d]pirimidin-3(7H)-il]acético (11).



[0083] A 3,3g do composto 10, adicionou-se 15ml de THF, 30ml de água e então 760mg de LiOH, e a mistura foi agitada em temperatura ambiente por 20 min. Depois que o THF foi removido sob pressão reduzida, a solução aquosa

resultante foi lavada com éter dietílico. A camada aquosa foi acidificada até pH 3 com HCl aquoso 1M e extraída com EA. A camada orgânica foi seca em sulfato de sódio anidro e concentrada sob vácuo para resultar em 2,46g do composto 11 na forma de um sólido branco. ^1H NMR (400MHz; DMSO $_d$ 6) δ 11,05 (s, 1H), 8,16 (s, 1H), 6,79 (t, 1H), 6,12 (s, 1H), 4,35 (s, 2H), 4,23 (s, 2H), 3,41 (t, 2H), 2,97 (q, J = 6,4 Hz, 2H), 1,64 (m, 2H), 1,36 (s, 9H).

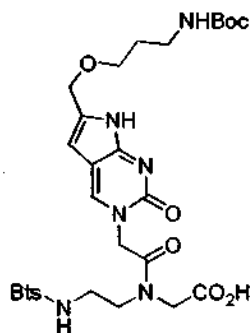
Exemplo 12: Preparação de N-[2-{(benzo[d]tiazol-2-sulfonil)amino}-etil]-N-[2-[6-{3-(t-butoxicarbonilamino)propil-1-oxi}metil-2-oxo-2H-pirrólo-[2,3-d]pirimidin-3(7H)-il]acetil]glicinato de etila (12).



[0084] A 4,0g do composto 11 e 3,6g de N-[2-{(benzo[d]tiazol-2-sulfonil)amino} etil]glicinato de etila dissolvido em 30ml de DMF, adicionou-se, em temperatura ambiente, 2,42g de EDCI e 1,70g de HOBt. A mistura de reação foi agitada por 8h. Depois que o solvente foi removido sob vácuo, o resíduo resultante foi dissolvido em MC e lavado com HCl aquoso 1M e então com água. A camada de MC foi concentrada sob pressão reduzida e purificada por cromatografia em coluna (95:5 MC/MeOH) para obtenção de 4,6g do composto 12 na forma de uma espuma/sólido amarelo. ^1H NMR (400MHz; DMSO $_d$ 6) δ

11,09 (br s, 1H), 8,74 (s, 0,6H), 8,58 (s, 0,4H), 8,27 (m, 1H), 8,20-8,14 (m, 2H), 7,66 (m, 2H), 6,56 (br s, 1H), 6,16 (m, 1H), 4,91 (s, 1,2H), 4,73 (s, 0,8H), 4,38 (s, 2,6H), 4,17 (m, 0,9H), 4,07 (m, 2,5H), 3,67 (m, 1,1H), 3,49-3,44 (m, 4H), 3,26 (m, 0,9H), 3,01 (m, 2H), 1,66 (m, 2H), 1,38 (s, 9H), 1,24 (t, J = 7,0 Hz, 1,2H), 1,17 (t, J = 7,0 Hz, 1,8H).

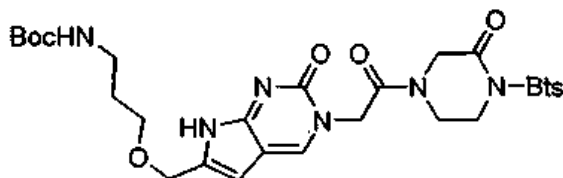
Exemplo 13: Preparação de N-[2-{(benzo[d]tiazol-2-sulfonil)amino)etil]-N-[2-[6-{3-(t-butoxicarbonilamino) propil-1-oxi}metil-2-oxo-2H-pirrólo-[2,3-d]-pirimidin-3(7H)-il] acetil]glicina (13)...



[0085] 4,5g do composto 12 e 670mg de LiOH foram dispersos em 20ml de THF e 20ml de água, e agitados em temperatura ambiente por 20min. O THF foi removido sob vácuo, e a solução aquosa resultante foi lavada com éter dietílico. A camada aquosa foi acidificada até pH 3 com HCl aquoso 1M, e extraída com EA. A camada de EA foi seca em sulfato de sódio anidro e concentrada sob pressão reduzida para resultar em 4,4g do composto 13 na forma de um sólido amarelo escuro. ^1H NMR (400MHz; DMSO-d_6) δ 11,32 (br s, 1H), 8,36 (m, 1H), 8,28 (m, 1,6H), 8,22 (s, 0,4H), 7,73 (m, 2H), 6,78 (m, 1H), 6,20 (s, 1H), 4,94 (s, 1,2H), 4,84 (s, 0,8H), 4,52 (s, 0,8H), 4,37 (s, 2H), 4,30 (s, 1,2H), 4,26 (m, 1,2H),

4,07 (m, 2H), 3,87 (m, 0,8H), 3,43 (m, 2H), 2,99 (m, 2H), 1,63 (m, 2H), 1,37 (s, 9H).

Exemplo 14: Preparação de 1-[(benzo[d]tiazol-2-sulfonyl)-2-oxo-4-[6-(3-(t-butoxycarbonylamino)propyl-1-oxi)metil-2-oxo-2H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-3(7H)-il]acetil] piperazina (14).

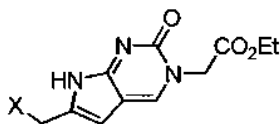


[0086] 4,4g do composto 13 e 1,49g de EDO em 50ml de DMF foram agitados em temperatura ambiente por 16h. Depois que a mistura de reação foi concentrada sob vácuo, o resíduo resultante foi dissolvido em 50ml de MC. A solução de MC foi lavada em série com HCl aquoso 1M e água, concentrada sob vácuo e então purificada por cromatografia em coluna (acetona) para obtenção de 1,5g do composto 14 na forma de uma espuma/sólido marrom. ^1H NMR (400MHz; DMSO-d_6) δ 11,25 (br s, 1H), 8,36 (m, 1H), 8,29 (m, 1H), 8,25 (s, 0,6H), 8,19 (0,4H), 7,72 (m, 2H), 6,78 (t, $J = 5,2$ Hz, 1H), 6,18 (s, 1H), 4,92 (s, 1,2H), 4,82 (s, 0,8H), 4,51 (s, 0,8H), 4,37 (s, 2H), 4,29 (s, 1,2H), 4,23 (m, 1,2H), 4,06 (m, 2H), 3,87 (m, 0,8H), 3,41 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H), 2,98 (q, $J = 6,8$ Hz, 2H), 1,62 (m, 2H), 1,36 (s, 9H), MS/ESI ($m+23/\text{MNa}^+$) = 682,2 (observado), PM = 659,8 ($\text{C}_{28}\text{H}_{33}\text{N}_7\text{O}_8\text{S}_2$).

[0087] A partir dos derivados de acetileno 4 ~ 9, os derivados de pirolocitosina 15 ~ 20 foram preparados seguindo-se similarmente o procedimento descrito no Exemplo 10. Os dados espectrais e físicos dos compostos 15 ~ 20 são

apresentadois na tabela abaixo.

Exemplos 15 ~ 20: Dados analíticos dos derivados de pirolocitosina 15 ~ 20.

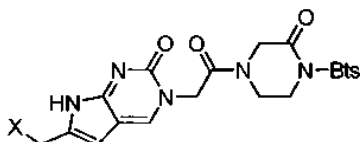


Co mposto	Mate rial de Partida	X	Dados Físicos e Espectrais
15	4		¹ H NMR (400MHz; DMSO _{d6}) δ 11,12 (s, 1H), 8,27 (s, 1H), 6,79 (t, J = 5,4 Hz, 1H), 6,00 (s, 1H), 4,68 (s, 2H), 4,14 (q, J = 7,2 Hz, 2H), 3,65 (t, J = 6,6, 2H), 3,39 (t, J = 6,2 Hz, 2H), 3,08 (m, 2H), 2,78 (t, J = 6,6 Hz, 2H), 1,37 (s, 9H), 1,20 (t, J = 7,2 Hz, 3H). Espuma/sólido verde claro.
16	5		¹ H NMR (400MHz; DMSO _{d6}) δ 11,35 (s, 1H), 8,39 (s, 1H), 6,87 (t, J = 5,2 Hz, 1H), 6,21 (s, 1H), 4,70 (s, 2H), 4,41 (s, 2H), 4,15 (q, J = 7,2 Hz, 2H), 3,43 (m, 2H), 3,12 (m, 2H), 1,38 (s, 9H), 1,21 (t, J = 7,2 Hz, 3H). Espuma/sólido amarelo claro.
17	6		¹ H NMR (400MHz; DMSO _{d6}) δ 11,20 (br s, 0,6H), 8,86 (br s, 0,4H), 8,57 (s, 0,2H), 8,35 (s, 0,8H), 6,83-6,76 (m, 1H), 6,00 (s, 0,8H), 5,76 (s, 0,2H), 4,75 (s, 0,3H), 4,70 (s, 1,7H), 4,55 (s, 0,3H), 4,30 (s, 1,7H), 4,14 (q, J = 7,2 Hz, 2H), 3,18 (m, 2H), 2,90-2,88 (m, 2H), 1,58 (m, 2H), 1,40-1,36 (m, 18H), 1,20 (t, 3H). Espuma/sólido marrom.
18	7		¹ H NMR (400MHz; DMSO _{d6}) δ 11,57 (s, 1H), 11,33 (s, 1H), 8,50 (m, 1H), 8,37 (s, 1H), 7,44-7,31 (m, 10H), 6,22 (s, 1H), 5,22 (s, 2H), 5,03 (s, 2H), 4,70 (s, 2H), 4,44 (s, 2H), 4,14 (q, 2H), 3,57-3,53 (m, 4H), 1,21 (t, 3H). Sólido marrom claro.
19	8		¹ H NMR (500MHz; DMSO _{d6}) δ 11,32 (s, 1H), 8,38 (s, 1H), 6,71 (d, 1H), 6,20 (s, 1H), 4,70 (s, 2H), 4,41 (m, 2H), 4,14 (q, 2H), 3,65 (m, 1H), 3,37-3,34 (m, 1H), 3,26-3,22 (m, 1H), 1,37 (s, 9H), 1,20 (t, 3H), 1,02 (d, 3H). Sólido marrom claro.
20	9		¹ H NMR (500MHz; DMSO _{d6}) δ 11,13 (s, 1H), 8,25 (s, 1H), 6,73 (s, 1H), 5,99 (s, 1H), 4,68 (s, 2H), 4,12 (q, 2H), 3,67 (t, 2H), 3,48-3,27 (m, 10H), 3,04 (q, 2H), 2,78 (t, 2H), 1,38 (s, 9H), 1,36 (s, 1H), 1,19 (t, 3H). Sólido marrom.

[0088] A partir dos derivados de pirolocitosina 15, 16, 17, e 20, os monômeros de PNA de citosina modificados 21 ~ 24 foram preparados seguindo-se similarmente os procedimentos descritos nos Exemplos 11 ~ 14. Os dados espectrais e físicos dos compostos 21 ~ 24 são

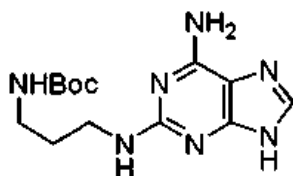
mostrados na tabela abaixo.

[001] Exemplos 21 ~ 24: Dados analíticos dos monômeros de PNA de citosina 21 ~ 24



Composto	Material de Partida	X	Dados Físicos e Espectrais
21	15		¹ H NMR (400MHz; DMSO _{d6}) δ 11,06 (s, 1H), 8,36 (m, 1H), 8,28 (m, 1H), 8,14 (s, 0,6H), 8,08 (2, 0,4H), 7,72 (m, 2H), 6,78 (t, 1H), 5,98 (s, 1H), 4,91 (s, 1,2H), 4,80 (s, 0,8H), 4,51 (s, 0,8H), 4,29 (s, 1,2H), 4,24 (m, 1,2H), 4,06 (m, 2H), 3,86 (m, 0,8H), 3,64 (t, J = 6,4 Hz, 2H), 3,38 (t, J = 6,0 Hz, 2H), 3,07 (m, 2H), 2,78 (m, 2H), 1,37 (s, 9H), MS/ESI (m+1) = 660,2 (observado), PM = 659,8 (C ₂₈ H ₃₃ N ₇ O ₈ S ₂). Espuma/sólido marrom.
22	16		¹ H NMR (400MHz; DMSO _{d6}) δ 11,31 (s, 1H), 8,36 (m, 1H), 8,30-8,27 (m, 1,6H), 8,22 (s, 0,4H), 7,73 (m, 2H), 6,87 (t, J = 5,6 Hz, 1H), 6,20 (m, 1H), 4,94 (s, 1,2H), 4,83 (s, 0,8H), 4,52 (s, 0,7H), 4,41 (s, 2,1H), 4,30 (s, 1,1 H), 4,25 (m, 1,2H), 4,06 (m, 2H), 3,87 (m, 0,8H), 3,42 (t, 2H), 3,12 (m, 2H), 1,38 (s, 9H), MS/ESI (m+1) = 646,2 (observado), PM = 645,7 (C ₂₇ H ₃₁ N ₇ O ₈ S ₂). Espuma/sólido vermelho..
23	17		¹ H NMR (400MHz; DMSO _{d6}) δ 11,16 (br s, 1H), 8,36 (m, 1H), 8,28 (m, 1H), 8,21 (s, 0,6H), 8,15 (s, 0,4H), 7,73 (m, 2H), 6,77 (br s, 1H), 6,00 (br s, 1H), 4,92 (s, 1,2H), 4,82 (s, 0,8H), 4,52 (s, 0,9H), 4,30 (s, 3,1H), 4,25 (m, 1,2H), 4,07 (m, 2H), 3,87 (m, 0,8H), 3,19 (m, 2H), 2,89 (m, 2H), 1,59 (m, 2H), 1,41-1,36 (m, 18H); MS/ESI (m+23/MNa ⁺) = 781,3 (observado), PM = 758,9 (C ₃₃ H ₄₂ N ₈ O ₉ S ₂). Espuma/sólido vermelho.
24	20		¹ H NMR (500MHz; DMSO _{d6}) δ 11,10 (m,1H), 8,35 (m, 1H), 8,28 (m, 1H), 8,14 (s, 0,6H), 8,08 (s, 0,4H), 7,72 (m, 2H), 6,76 (m, 1H), 5,97-5,96 (s, 1H), 4,90 (s, 1,2H), 4,80 (s, 0,8H), 4,51 (s, 0,8H), 4,29 (s, 1,2H), 4,25 (t, 1,2H), 4,08-4,04 (m, 2H), 3,86 (t, 0,8H), 3,66 (m, 2H), 3,47 (m, 2H), 3,41 (m, 2H), 3,32-3,30 (m, 4H), 3,27 (m, 2H), 3,04 (m, 2H), 2,77 (m, 2H), 1,37 (s, 9H), 1,35 (s, 9H), MS/ESI (m+23/MNa ⁺) = 869,3 (observado), PM = 847,0 (C ₃₇ H ₅₀ N ₈ O ₁₁ S ₂). Sólido amarelo.

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

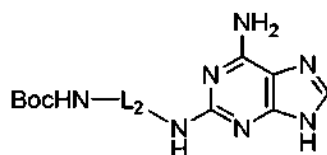


[0089] 6,8g de 2-cloroadenina dissolvidos em

68ml de 1,3-diaminopropano e 68ml de monometoxietanol foram agitados sob refluxo por 24 horas, e a mistura de reação foi concentrada sob vácuo. O resíduo resultante foi dissolvido em 100ml de THF e 100ml de água, ao qual adicionou-se lentamente 60g de Boc_2O dissolvidos em 70ml de THF. A mistura de reação foi agitada em temperatura ambiente por 6h e então o solvente orgânico foi removido sob pressão reduzida. A camada aquosa resultante foi extraída duas vezes com 100ml de EA. A camada orgânica foi lavada com ácido cítrico aquoso 0,5M e com salmoura, e seca em sulfato de magnésio anidro. A camada orgânica foi concentrada sob pressão reduzida e submetida a separação cromatográfica (1:10 MeOH/MC) para obtenção de 4,07g de um composto protegido com dois grupos Boc. Esse composto foi dissolvido em 100ml de MeOH, ao qual adicionou-se lentamente 45ml de carbonato de sódio aquoso saturado. A solução de reação foi agitada a 50°C por 1 hora e então concentrada sob vácuo. O resíduo resultante foi dissolvido em 50ml de MeOH e o material insolúvel foi filtrado. Então, o filtrado foi concentrado para resultar em 3,16g do composto 25 na forma de um sólido branco. ^1H NMR (400MHz; DMSO-d_6) δ 12,11 (br s, 1H), 7,63 (s, 1H), 6,78 (t, 1H), 6,55 (s, 2H), 6,07 (t, 1H), 3,20 (q, 2H), 2,96 (q, 2H), 1,60 (m, 2H), 1,37 (s, 9H).

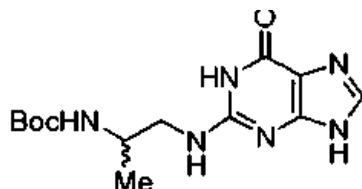
[0090] A partir de 2-cloroadenina e uma diamina adequada, os derivados de 2,6-diaminopurina 26 ~ 30 foram preparados seguindo-se similarmente o procedimento descrito no Exemplo 25. Os dados espectrais e físicos dos compostos 26 ~ 30 são mostrados na tabela abaixo.

Exemplos 26 ~ 30: Dados analíticos dos derivados de 2,6-diaminopurina 26 ~ 30.



Composto	Diamina de Partida	L ₂	Dados Físicos e Espectrais
26		(CH ₂) ₂ —	¹ H NMR (400MHz; DMSO _{d6}) δ 12,20 (br s, 1H), 7,66 (s, 1H), 6,84 (t, 1H), 6,62 (s, 2H), 6,10 (t, 1H), 3,25 (q, 2H), 3,08 (q, 2H), 1,36 (s, 9H). Sólido amarelo claro.
27		(CH ₂) ₄ —	¹ H NMR (500MHz; DMSO _{d6}) δ 12,07 (br s, 1H), 7,63 (s, 1H), 6,75 (s, 1H), 6,50 (s, 2H), 6,02 (s, 1H), 3,18 (q, 2H), 2,91 (q, 2H), 1,48-1,36 (m, 13H). Sólido verde amarelado.
28		(CH ₂) ₅ —	¹ H NMR (400MHz; DMSO _{d6}) δ 12,14 (br s, 1H), 7,65 (s, 1H), 6,77 (t, 1H), 6,55 (s, 2H), 6,01 (s, 1H), 3,17 (m, 2H), 2,89 (q, 2H), 1,48 (m, 2H), 1,41-1,36 (m, 11H), 1,26 (m, 2H). Sólido amarelo claro.
29		(CH ₂) ₇ —	¹ H NMR (500MHz; DMSO _{d6}) δ 12,11 (br s, 1H), 7,64 (s, 1H), 6,78 (t, J = 5,6 Hz, 1H), 6,56 (s, 2H), 6,04 (t, J = 5,5 Hz, 1H), 3,17 (td, J = 6,3, 6,3 Hz, 2H), 2,88 (td, J = 6,7, 6,7 Hz, 2H), 1,49-1,47 (m, 2H), 1,36-1,31 (m, 11H), 1,29-1,22 (m, 6H). Sólido verde amarelado.
30			¹ H NMR (500MHz; DMSO _{d6}) δ 12,15 (s, 1H), 7,64 (s, 1H), 6,84 (t, 1H), 6,56 (s, 2H), 6,05 (t, 1H), 3,48 (t, 2H), 3,39-3,34 (m, 4H), 3,07 (q, 2H), 1,37 (s, 9H). Espuma amarela..

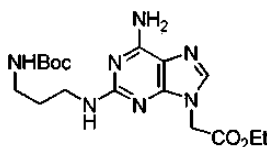
Exemplo 31: Preparação de 2-[2-{2-(t-butoxicarbonilamino)-2-metil}etil]-amino-1H-purin-6(9H)-ona (31).



[0091] 11g de 2-clorohipoxantina e 4,96ml de 1,2-diaminopropano (racêmica) foram dispersos em 33ml de

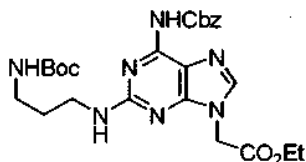
monometoxietanol, e agitados por 24 horas a 130°C. O solvente foi removido sob vácuo, e o resíduo resultante foi dissolvido em 97ml de THF e 97ml de água, ao qual adicionou-se lentamente 22,8g de Boc₂O dissolvidos em 64ml de THF. A mistura de reação foi agitada em temperatura ambiente por 6h, e EA foi adicionado à solução. O precipitado resultante foi coletado por filtração para obtenção do composto 31 na forma de um sólido cinza. ¹H NMR (500MHz; DMSO_{d6}) δ 12,42 (s, 1H), 10,44 (br s, 1H), 7,61 (s, 1H), 6,76 (d, 1H), 6,27 (m, 1H), 3,67 (m, 1H), 3,32 (m, 1H), 3,14 (m, 1H), 1,36 (s, 9H), 1,02 (d, 3H).

Exemplo 32: Preparação de 2-[6-amino-2-{3-(t-butoxicarbonilamino)-propil}amino-9H-purin-9-il]acetato de etila (32).



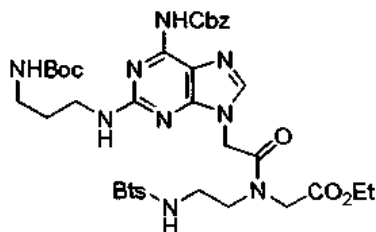
[0092] A uma solução agitada de 3,16g do composto 25 dissolvida em 100ml de DMF, adicionou-se 480mg de NaH a 55% em óleo mineral. A solução de reação foi agitada por 2h, e posteriormente adicionou-se lentamente 1,98ml de bromoacetato de etila. Duas horas depois, a mistura de reação foi concentrada sob vácuo e purificada por cromatografia em coluna (1:10 EtOH/EA) para resultar em 2,92g de análogo de diaminopurina 32 na forma de um sólido amarelo claro. ¹H NMR (400MHz; DMSO_{d6}) δ 7,67 (s, 1H), 6,80 (t, 1H), 6,71 (s, 2H), 6,28 (t, 1H), 4,85 (s, 2H), 4,15 (q, 2H), 3,20 (q, 2H), 2,94 (q, 2H), 1,57 (m, 2H), 1,37 (s, 9H), 1,21 (t, 3H).

Exemplo 33: Preparação de 2-[6-(benziloxycarbonil)amino-2-{3-(t-butoxi-carbonilamino)propil}amino-9H-purin-9-il]acetato de etila (33).



[0093] A uma solução agitada de 4,68g do composto 32 dissolvida em 100ml de DMF, adicionou-se, em temperatura ambiente, 13,2g de triflato de N-(benziloxycarbonil)-N'-metil-imidazólio. Doze horas depois, a mistura de reação foi concentrada sob pressão reduzida e submetida a cromatografia em coluna (5% MeOH em MC) para resultar em 5,4g do composto 33 na forma de um sólido branco. ^1H NMR (400MHz; DMSO-d_6) δ 10,19 (s, 1H), 7,92 (s, 1H), 7,45-7,33 (m, 5H), 6,88 (t, 1H), 6,77 (t, 1H), 5,18 (s, 2H), 4,94 (s, 2H), 4,16 (q, 2H), 3,25 (q, 2H), 2,95 (q, 2H), 1,60 (m, 2H), 1,36 (s, 9H), 1,21 (t, 3H).

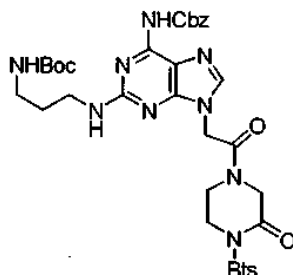
Exemplo 34: Preparação de N-[2-{2-(benzo[d]tiazol)sulfonila}amino-etil]-N-[2-[6-(benziloxycarbonil)amino-2-{3-(t-butoxicarbonilamino)-propil}amino-9H-purin-9-il]acetil]glicinato de etila (34).



[0094] 5,4g do composto 33 e 950mg de LiOH foram dissolvidos em 40ml de THF e 40ml de água, e agitados

em temperatura ambiente por 1 hora. O THF foi removido sob vácuo, e a solução aquosa resultante foi acidificada até pH 3 com HCl aquoso 1M e então extraída com EA. A camada orgânica foi seca em sulfato de sódio anidro e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo resultante e 2,92g de 2-N-[2-{(benzo[d]tiazol-2-sulfonyl)amino}etil]glicinato de etila foram dissolvidos em 240ml de DMF, ao qual adicionou-se, em temperatura ambiente, 1,95g de EDCI e 1,38g de HOBt. A mistura de reação foi agitada por 20h, concentrada sob pressão reduzida, e dissolvida em MC. A solução de MC foi lavada com HCl aquoso 1M, concentrada sob vácuo e então purificada por cromatografia em coluna (MeOH 5%/MC) para obtenção de 2,7g do composto 34 na forma de uma espuma amarela clara. ^1H NMR (400MHz; DMSO-d_6) δ 10,18 (m, 1H), 8,97 (br s, 0,6H), 8,80 (br s, 0,4H), 8,28 (d, 1H), 8,18 (m, 1H), 7,80 (s, 0,6H), 7,76 (s, 0,4H), 7,66 (m, 2H), 7,46-7,32 (m, 5H), 6,77 (m, 2H), 5,18 (s, 2H), 5,10 (s, 1,2H), 4,89 (s, 0,8H), 4,45 (s, 0,8H), 4,17 (q, 0,8H), 4,07-4,00 (m, 2,4H), 3,68 (m, 1,2H), 3,47 (m, 1,2H), 3,41 (m, 0,9H), 3,22 (m, 2,7H), 2,94 (m, 2H), 1,59 (m, 2H), 1,36 (s, 9H), 1,31-1,12 (m, 3H).

Exemplo 35: Preparação de 1-(benzo[d]tiazol-2-sulfonyl)-2-oxo-4-[[6-(benzil-oxycarbonil) amino-2-{3-(t-butoxi-carbonila-mino)propilamino}-9H-purin-9-il]-acetil] piperazina (35).

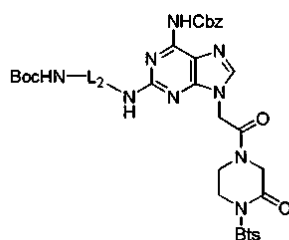


[0095] 2,7g do composto 34 e 340mg de LiOH

foram dispersos em 15ml de THF e 20ml de água, e agitados por 30 min em temperatura ambiente. O THF foi removido sob pressão reduzida. Então, a camada aquosa resultante foi acidificada até pH 3 com HCl aquoso 1M, e extraída com EA. A camada de EA foi seca em sulfato de sódio anidro e concentrada sob vácuo para obtenção de 2,48g de um produto bruto. O produto bruto e 716mg de EDCI dissolvido em 70ml de DMF foram agitados em temperatura ambiente por 20h. O solvente foi removido sob pressão reduzida e o resíduo resultante foi dissolvido em MC e lavado com HCl aquoso 1M e então com água. A camada orgânica foi concentrada sob vácuo e purificada por cromatografia em coluna (acetona) para obtenção de 1,4g do composto 35 na forma de uma espuma branca. ^1H NMR (400MHz; DMSO-d_6) δ 10,16 (s, 1H), 8,35 (m, 1H), 8,26 (m, 1H), 7,81 (s, 0,6H), 7,77 (s, 0,4H), 7,72 (m, 2H), 7,45-7,31 (m, 5H), 6,78 (m, 2H), 5,18 (s, 2H), 5,12 (s, 1,2H), 5,01 (s, 0,8H), 4,55 (s, 0,8H), 4,29-4,27 (m, 2,4H), 4,09 (m, 2H), 3,88 (m, 0,8H), 3,26 (m, 2H), 2,95 (m, 2H), 1,61 (m, 2H), 1,36 (s, 9H); MS/ESI (m+1) = 779,2 (observado), PM = 778,9 ($\text{C}_{34}\text{H}_{38}\text{N}_{10}\text{O}_8\text{S}_2$).

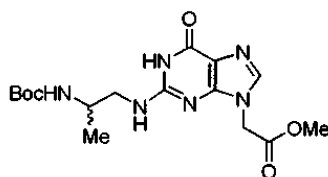
[0096] A partir dos derivados de 2,6-diaminopurina 26 ~ 30, os monômeros de PNA de adenina modificados 36 ~ 40 foram preparados seguindo-se similarmente os procedimentos descritos nos Exemplos 32 ~ 35. Os dados espectrais e físicos dos compostos 36 ~ 40 são mostrados na tabela abaixo.

Exemplos 36 ~ 40: Dados analíticos dos monômeros de PNA de adenina 36 ~ 40.



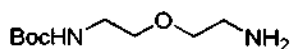
Composto	Material de Partida	L ₂	Dados Físicos e Espectrais
36	26	—(CH ₂) ₂ —	¹ H NMR (400MHz; DMSO _{d6}) δ 10,17 (s, 1H), 8,36 (m, 1H), 8,26 (m, 1H), 7,82 (s, 0,6H), 7,78 (s, 0,4H), 7,72 (m, 2H), 7,45-7,31 (m, 5H), 6,79 (2H), 5,18 (s, 2H), 5,12 (s, 1,2H), 5,01 (s, 0,8H), 4,55 (s, 0,8H), 4,29-4,25 (m, 2,4H), 4,09 (m, 2H), 3,87 (m, 0,8H), 3,29 (m, 2H), 3,11 (m, 2H), 1,33 (d, 9H), MS/ESI (m+1) = 765,2 (observado), PM = 764,8 (C ₃₃ H ₃₆ N ₁₀ O ₈ S ₂). Espuma branca.
37	27	—(CH ₂) ₄ —	¹ H NMR (400MHz; DMSO _{d6}) δ 10,10 (s, 1H), 8,36 (m, 1H), 8,26 (m, 1H), 7,80 (s, 0,6H), 7,76-7,71 (m, 2,4H), 7,46-7,31 (m, 5H), 6,81-6,73 (m, 2H), 5,18 (s, 2H), 5,12 (s, 1,2H), 5,01 (s, 0,8H), 4,55 (s, 0,8H), 4,30-4,25 (m, 2,4H), 4,09 (m, 2H), 3,88 (m, 0,8H), 3,26 (m, 2H), 2,90 (m, 2H), 1,50-1,36 (m, 13H); MS/ESI (m+1) = 793,3 (observado), PM = 792,9 (C ₃₅ H ₄₀ N ₁₀ O ₈ S ₂). Espuma/sólido vermelho amarelado..
38	28	—(CH ₂) ₅ —	¹ H NMR (400MHz; DMSO _{d6}) δ 10,09 (s, 1H), 8,35 (m, 1H), 8,26 (m, 1H), 7,80 (s, 0,6H), 7,76 (s, 0,4H), 7,74-7,72 (m, 2,0H), 7,46-7,31 (m, 5H), 6,79-6,72 (m, 2H), 5,18 (s, 2H), 5,12 (s, 1,2H), 5,01 (s, 0,8H), 4,56 (s, 0,8H), 4,30-4,27 (m, 2,4H), 4,09 (m, 2H), 3,88 (m, 0,8H), 3,25 (m, 2H), 2,89 (m, 2H), 1,49 (m, 2H), 1,36 (m, 11H), 1,25 (m, 2H); MS/ESI (m+1) = 807,3 (observado), PM = 806,9 (C ₃₆ H ₄₂ N ₁₀ O ₈ S ₂). Espuma/sólido amarelo.
39	29	—(CH ₂) ₇ —	¹ H NMR (500MHz; DMSO _{d6}) δ 10,11 (d, J = 3,1 Hz, 1H), 8,37-8,34 (m, 1H), 8,28-8,24 (m, 1H), 7,80 (s, 0,6H), 7,76 (s, 0,4 Hz), 7,75-7,70 (m, 2H), 7,75-7,31 (m, 5H), 6,82-6,74 (m, 2H), 5,18 (s, 2H), 5,12 (s, 1,2H), 5,01 (s, 0,8H), 4,58 (s, 0,8H), 4,29 (m, 1,2H), 4,27 (q, J = 4,9 Hz, 1H), 4,06-4,03 (m, 2H), 3,88 (t, J = 5,2 Hz, 1H), 3,26-3,20 (m, 2H), 2,88-2,85 (m, 2H), 1,51-1,45 (m, 2H), 1,39-1,32 (m, 11H), 1,28-1,15 (m, 6H), MS/ESI (m+1) = 834,8 (observado), PM = 835,0 (C ₃₈ H ₄₆ N ₁₀ O ₈ S ₂). Espuma/sólido amarelo avermelhado.
40	30		¹ H NMR (400MHz; DMSO _{d6}) δ 10,14 (s, 1H), 8,35 (m, 1H), 8,26 (m, 1H), 7,82 (s, 0,6H), 7,78 (s, 0,4H), 7,73 (m, 2H), 7,46-7,31 (m, 5H), 6,81-6,74 (m, 2H), 5,18 (s, 2H), 5,13 (s, 1,2H), 5,02 (s, 0,8H), 4,55 (s, 0,8H), 4,30-4,26 (m, 2,4H), 4,09 (m, 2H), 3,88 (m, 0,8H), 3,50 (m, 2H), 3,43-3,38 (m, 4H), 3,07 (m, 2H), 1,36 (s, 9H); MS/ESI (m+1) = 809,3 (observado), PM = 808,9 (C ₃₅ H ₄₀ N ₁₀ O ₉ S ₂). Espuma amarela clara.

Exemplo 41: Preparação de 2-[2-[2-{2-(t-butoxicarboniamino)-2-metil}etil]amino-6-oxo-6,9-diidro-1H-purin-2-il]acetato de etila (41).



[0097] A uma solução agitada de 4,69g do composto 31 em 47ml de DMF, adicionou-se 790mg de NaH a 55% em óleo mineral e a solução de reação foi agitada por 2h. A seguir, 1,85ml de bromoacetato de etila foram lentamente adicionados, a solução de reação foi agitada por mais 2h. A mistura de reação foi concentrada sob vácuo e purificada por cromatografia em coluna (5:95 MeOH/MC) para obtenção de 5,04g do composto 41 na forma de um sólido amarelo claro. ^1H NMR (500MHz; DMSO-d_6) δ 10,55 (s, 1H), 7,67 (s, 1H), 6,74 (d, 1H), 6,40 (m, 1H), 4,87 (s, 2H), 4,17 (q, 2H), 3,65 (m, 1H), 3,28 (m, 1H), 3,16 (m, 1H), 1,36 (s, 9H), 1,21 (t, 3H), 1,01 (d, 3H).

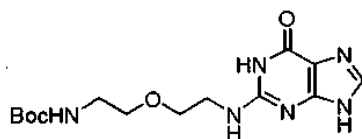
Exemplo 42: Preparação de 2-{2-(t-butoxicarbonilamino)etoxi}etilamina (42).



[0098] A 146g de [2-{2-(t-butoxicarbonilamino)etoxi}etil]metano sulfonato dissolvidos em 500ml de DMF, adicionou-se 134g de azida de sódio. A mistura de reação foi agitada a 70°C por 20h e então concentrada sob pressão reduzida. O resíduo resultante foi dissolvido em 1.200ml de água e extraído com EA. A camada orgânica foi seca em sulfato de sódio anidro e concentrada sob vácuo. O resíduo resultante foi dissolvido em 2.000ml de THF, ao qual adicionou-se 162g de trifenilfosfina. A mistura de reação foi agitada em temperatura ambiente por 2h e em seguida adicionou-se 200ml de água. A mistura de reação foi agitada em temperatura ambiente por 18h e concentrada até 500ml sob pressão reduzida. Então, o precipitado resultante foi filtrado. O filtrado foi ainda concentrado sob pressão

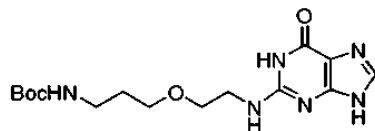
reduzida para remoção do THF e lavado com MC. A camada aquosa foi concentrada para obtenção de 86,2g do composto 42 na forma de um líquido. ^1H NMR (400MHz; CDCl_3) δ 4,96 (br s, 1H), 3,54-3,48 (m, 4H), 3,34 (q, 2H), 2,88 (t, 2H), 1,48-1,46 (m, 11H).

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



[0099] 6,3g do composto 42 e 2,0g de 2-bromohipoxantina foram dispersos em 55ml de monometoxietanol e 17,5ml de água. A mistura de reação foi agitada sob refluxo por 16h, e o solvente foi removido sob pressão reduzida. Então, o concentrado foi agitado em 20ml de MC e 10ml de água por 30 min, e o precipitado resultante foi coletado por filtração para obtenção de 2,1g do composto 43 na forma de um sólido amarelo claro. ^1H NMR (500MHz; DMSO-d_6) δ 12,43 (br s, 1H), 10,45 (br s, 1H), 7,89 (s, 0,2H), 7,61 (s, 0,8H), 6,77 (m, 1H), 6,34 (s, 0,8H), 6,12 (s, 0,2H), 3,52 (t, 2H), 3,41 (m, 4H), 3,09 (q, 2H), 1,36 (s, 9H).

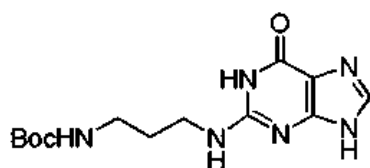
Exemplo 44: Preparação de 2-[2-[3-(t-butoxicarbonilamino)propiloxi]-etil]-amino-1H-purin-6(9H)-ona (44).



[00100] 2-{3-(t-butoxicarbonilamino)propiloxi}etilamina e 2-bromohipoxantina foram reagidos seguindo-se similarmente o procedimento descrito no Exemplo 43 para resultar no composto 44 na forma de um sólido

branco. ^1H NMR (500MHz; DMSO_{d6}) δ 12,43 (br s, 1H), 10,45 (br s 1H), 7,61 (m, 1H), 6,80 (t, 1H), 6,30 (s, 0,7H), 6,08 (s, 0,3H), 3,49 (t, 2H), 3,41 (t, 4H), 2,99 (q, 2H), 1,61 (m, 2H), 1,37 (s, 9H).

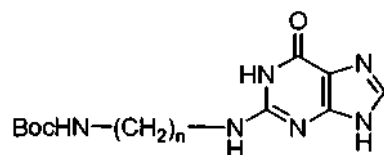
Exemplo 45: Preparação de 2-{3-(t-butoxicarbonilamino)propil}amino-1H-purin-6(9H)-ona (45).



[00101] Uma mistura de 10g de clorohipoxantina e 19,6ml de 1,3-diaminopropano disperso em 40ml de monometoxietanol, foi agitada a 130°C por 10h. Então, o solvente foi removido sob pressão reduzida e o resíduo resultante foi dissolvido em 150ml de THF e 150ml de água, ao qual adicionou-se lentamente 19,2g de Boc_2O dissolvido em 100ml de THF. A mistura foi agitada em temperatura ambiente por 6h. Após a adição de EA, o precipitado resultante foi coletado por filtração para obtenção de 6,31g do composto 45 na forma de um sólido verde escuro. ^1H NMR (400MHz; DMSO_{d6}) δ 11,13 (br s, 1H), 7,64 (s, 1H), 6,87 (s, 1H), 6,31 (s, 1H), 3,23 (q, 2H), 2,98 (m, 2H), 1,62 (m, 2H), 1,38 (s, 9H).

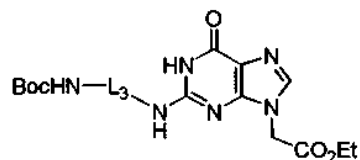
[00102] Os derivados de guanina 46 ~ 47 foram preparado utilizando uma diamina adequada seguindo-se similarmente o procedimento descrito no Exemplo 45. Os dados espectrais e físicos dos compostos 46 ~ 47 são mostrados na tabela abaixo.

Exemplos 46 ~ 47: Dados analíticos dos derivados de guanina 46 ~ 47.



Composto	Diamina utilizada	n	Dados Físicos e Espectrais
46	Etileno diamina	2	¹ H NMR (500MHz; DMSO- _d 6) δ 12,43 (br s, 1H), 10,61 (br, 1H), 7,62 (s, 1H), 6,93 (t, 1H), 6,32 (s, 1H), 3,29 (q, 2H), 3,10 (q, 2H), 1,37 (s, 9H). Sólido cinza.
47	Pentileno diamina	5	¹ H NMR (500MHz; DMSO- _d 6) δ 12,44 (s, 1H), 10,35 (s, 1H), 7,60 (s, 1H), 6,80 (m, 1H), 6,29 (m, 1H), 3,21 (m, 2H), 2,90 (m, 2H), 1,49 (m, 2H), 1,39-1,35 (m, 11H), 1,27-1,23 (m, 2H). Sólido marrom claro.

[00103] Os compostos 43 ~ 46 foram transformados nos compostos 48 ~ 51 seguindo-se similarmente o procedimento descrito no Exemplo 32. Os dados espectrais e físicos dos compostos 48 ~ 51 são mostrados na tabela abaixo. Exemplos 48 ~ 51: Dados analíticos dos derivados de guanina 48 ~ 51.

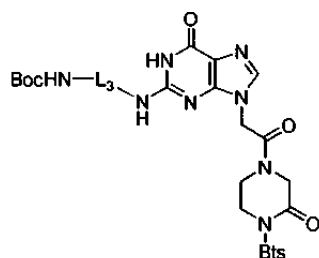


Composto	Material de Partida	L ₃	Dados Físicos e Espectrais
48	43		¹ H NMR (500MHz; DMSO- _d 6) δ 10,67 (s, 1H), 7,69 (s, 1H), 6,78 (m, 1H), 6,15 (t, 1H), 4,87 (s, 2H), 4,15 (q, 2H), 3,51 (m, 2H), 3,41 (m, 4H), 3,10 (m, 2H), 1,37 (s, 9H), 1,20 (t, 3H). Espuma/sólido branco.
49	44		¹ H NMR (500MHz; DMSO- _d 6) δ 10,57 (s, 1H), 7,69 (s, 1H), 6,79 (m, 1H), 6,44 (m, 1H), 4,87 (s, 2H), 4,16 (q, 2H), 3,48 (t, 2H), 3,40 (m, 4H), 2,99 (q, 2H), 1,61 (m, 2H), 1,37 (s, 9H), 1,21 (t, 3H). Espuma/sólido amarelo.
50	45		¹ H NMR (500MHz; DMSO- _d 6) δ 10,64 (s, 1H), 7,68 (s, 1H), 6,91 (t, 1H), 6,47 (s, 1H), 4,88 (s, 2H), 4,16 (q, 2H), 3,28 (q, 2H), 3,08 (q, 2H), 1,36 (s, 9H), 1,21 (t, 3H). Sólido vermelho escuro.

continuação da Tabela			
51	46		¹ H NMR (400MHz; DMSO-d ₆) δ 10,44 (br s, 1H), 7,66 (s, 1H), 6,77 (m, 1H), 6,41 (m, 1H), 4,6 (s, 2H), 4,16 (q, 2H), 3,21 (q, 2H), 2,89 (q, 2H), 1,48 (m, 2H), 1,41-1,36 (m, 11H), 1,28-1,19 (m, 5H). Sólido cinza escuro.

[00104] A partir dos derivados de guanina 48, 49 e 51, os monômeros de PNA de guanina modificados 52 ~ 54 foram preparados seguindo-se similarmente os procedimentos descritos nos Exemplos 34 ~ 35. Os dados espectrais e físicos dos compostos 52 ~ 54 são mostrados na tabela abaixo.

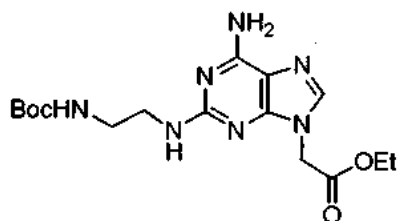
Exemplos 52 ~ 54: Dados analíticos dos monômeros de PNA de guanina 52 ~ 54.



Composto	Material de Partida	L ₃	Dados Físicos e Espectrais
52	48		¹ H NMR (400MHz; DMSO-d ₆) δ 10,61 (m, 1H), 8,36 (m, 1H), 8,25 (m, 1H), 7,76-7,65 (m, 3H), 6,78 (t, 1H), 6,54 (m, 1H), 5,07 (s, 1,2H), 4,96 (s, 0,8H), 4,54 (s, 0,8H), 4,30 (s, 1,2H), 4,25 (m, 1,2H), 4,07 (m, 2H), 3,88 (m, 0,8H), 3,49 (m, 2,4H), 3,40 (m, 3,6H), 3,09 (m, 2H), 1,36 (s, 9H); MS/ESI (m+1) = 676,1 (observado), PM = 675,8 (C ₂₇ H ₃₃ N ₉ O ₈ S ₂). Espuma/sólido marrom escuro.
53	49		¹ H NMR (400MHz; DMSO-d ₆) δ 10,69 (s, 1H), 8,36 (m, 1H), 8,25 (m, 1H), 7,73 (m, 2H), 7,64-7,60 (m, 1H), 6,80 (t, 1H), 6,65 (br s, 1H), 5,05 (s, 1,2H), 4,94 (s, 0,8H), 4,54 (s, 0,8H), 4,29 (s, 1,2H), 4,24 (m, 1,2H), 4,07 (m, 2H), 3,87 (m, 0,8H), 3,46-3,39 (m, 6H), 2,97 (m, 2H), 1,60 (m, 2H), 1,36 (s, 9H); MS/ESI (m+1) = 689,8 (observado), PM = 689,8 (C ₂₈ H ₃₅ N ₉ O ₈ S ₂). Espuma/sólido amarelo.
54	51		¹ H NMR (400MHz; DMSO-d ₆) δ 10,42-10,40 (m, 1H), 8,37-8,32 (m, 1H), 8,28-8,25 (m, 1H), 7,73-7,70 (m, 2H), 7,58-7,54 (m, 1H), 6,76 (t, 1H), 6,39-6,38 (m, 1H), 5,03 (s, 1,2H), 4,92 (s, 0,8H), 4,54 (s, 0,8H), 4,29 (s, 1,2H), 4,25 (m, 1,2H), 4,08-4,07 (m, 2H), 3,87 (m, 0,8H), 3,18 (m, 2H), 2,89 (m, 2H), 1,47 (m, 2H), 1,40-1,30 (m, 11H), 1,24 (m, 2H), MS/ESI (m+23/MNa ⁺) = 696,2 (observado), PM = 673,8 (C ₂₈ H ₃₅ N ₉ O ₇ S ₂). Espuma/sólido vermelho.

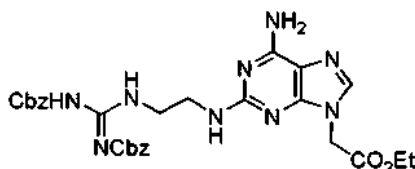
Exemplo 55: Preparação de 2-[6-amino-2-{2-(t-

butoxicarbonilamino)etil}-amino-9H-purin-9-il]acetato de etila (55)..



[00105] O composto 55 foi preparado a partir do composto 26 seguindo-se similarmente o procedimento do Exemplo 32. Sólido amarelo claro. ^1H NMR (400MHz; DMSO-d_6) δ 7,70 (s, 1H), 6,84 (t, 1H), 6,79 (s, 2H), 6,30 (t, 1H), 4,87 (s, 2H), 4,16 (q, 2H), 3,25 (q, 2H), 3,08 (q, 2H), 1,37 (s, 9H), 1,22 (t, 3H).

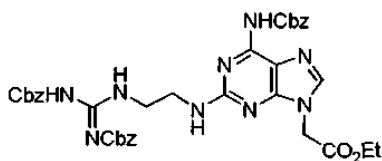
Exemplo 56: Preparação de 2-[6-amino-2-[2-{2,3-bis(benzyloxycarbonyl)guanidino}etil]amino-9H-purin-9-il]acetato de etila (56).



[00106] A 4,42g do composto 55 dissolvido em 22ml de MC, adicionou-se lentamente 22ml de TFA a 0°C, e a solução foi agitada por 2,5h. A solução de reação foi concentrada sob pressão reduzida, à qual adicionou-se 100ml de éter dietílico. O precipitado resultante foi coletado por filtração para obtenção de 5,79g de um produto intermediário sólido marrom claro. 3,9g do intermediário foram dissolvidos em 39ml de MC, ao qual adicionou-se lentamente 6,9ml de TEA a 0°C. A solução foi agitada por 15min em temperatura ambiente, à qual adicionou-se 2,48g de 1,3-

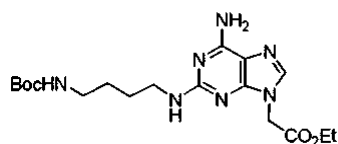
bis(benziloxicarbonil)-2-(metiltio) pseudouréia. Então, a mistura de reação foi agitada por mais 24 horas e lavada com HCl aquoso 0,5M. A camada orgânica foi seca em sulfato de magnésio anidro e concentrada sob pressão reduzida para resultar em 4,58g do composto 56 na forma de um sólido amarelo claro. ^1H NMR (500MHz; DMSO-d_6) δ 11,59 (s, 1H), 8,56 (t, 1H), 7,69 (s, 1H), 7,39-7,29 (m, 10H), 6,75 (s, 2H), 6,53 (s, 1H), 5,15 (s, 2H), 5,02 (s, 2H), 4,86 (s, 2H), 4,13 (q, 2H), 3,50 (q, 2H), 3,37 (m, 2H), 1,19 (t, 3H).

Exemplo 57: Preparação de 2-[6-(benziloxicarbonilamino)-2-[2-{2,3-bis-(benziloxicarbonil) guanidino}etil]amino-9H-purin-9-il]acetato de etila (57).



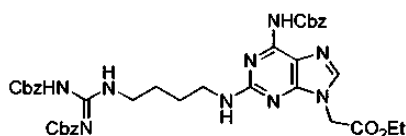
[00107] 4,54g do composto 56 e 8,22g de triflato de N-(benziloxicarbonil)-N'-metil-imidazólio foram dissolvidos em 90ml de DMF e agitados por 29h em temperatura ambiente. O solvente foi removido sob pressão reduzida, e o resíduo resultante foi purificado por cromatografia em coluna (1:3 hexano/EA) para resultar em 3,06g do composto 57 na forma de uma espuma/sólido branco. ^1H NMR (500MHz; DMSO-d_6) δ 11,60 (s, 1H), 10,25 (s, 1H), 8,57 (t, 1H), 7,95 (s, 1H), 7,45-7,29 (m, 15H), 7,14 (t, 1H), 5,18 (s, 2H), 5,14 (s, 2H), 5,02 (s, 2H), 4,95 (s, 2H), 4,15 (q, 2H), 3,54 (q, 2H), 3,42 (q, 2H), 1,19 (t, 3H).

Exemplo 58: Preparação de 2-[6-amino-2-(4-(t-butoxicarbonilamino)butil)-amino-9H-purin-9-il]acetato de etila (58).



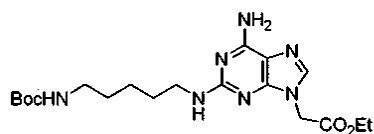
[00108] O composto 58 foi preparado a partir do composto 27 na forma de uma espuma/sólido amarelo avermelhado seguindo-se similarmente o procedimento descrito no Exemplo 32. ^1H NMR (500MHz; DMSO-d_6) δ 7,67 (s, 1H), 6,79 (t, 1H), 6,69 (s, 2H), 6,30 (m, 1H), 4,85 (s, 2H), 4,15 (q, 2H), 3,22-3,17 (m, 2H), 2,93-2,89 (m, 2H), 1,45 (m, 2H), 1,40-1,36 (m, 11H), 1,21 (t, 3H).

Exemplo 59: Preparação de 2-[6-(benziloxycarbonilamino)-2-[4-{2,3-bis-(benziloxycarbonil) guanidino}butil]amino-9H-purin-9-il]acetato de etila (59).



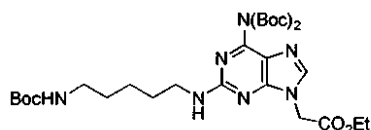
[00109] O composto 59 foi preparado a partir do composto 58 na forma de uma espuma/sólido amarela claro seguindo-se similarmente os procedimentos descritos nos Exemplos 56 ~ 57. ^1H NMR (500MHz; DMSO-d_6) δ 11,49 (s, 1H), 10,12 (s, 1H), 8,28 (t, 1H), 7,91 (s, 1H), 7,45-7,31 (m, 5H), 6,95 (t, 1H), 5,17 (s, 2H), 4,93 (s, 2H), 4,16 (q, 2H), 3,28 (m, 4H), 1,51 (m, 4H), 1,46 (s, 9H), 1,38 (s, 9H), 1,21 (t, 3H).

Exemplo 60: Preparação de 2-[6-amino-2-{5-(t-butoxycarbonilamino)-pentil}amino-9H-purin-9-il]acetato de etila (60).



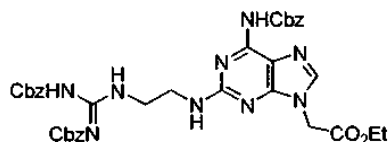
[00110] O composto 60 foi preparado a partir do composto 28 como um espuma/sólido amarelo avermelhado seguindo-se similarmente o procedimento descrito no Exemplo 32. ^1H NMR (500MHz; DMSO-d_6) δ 7,67 (s, 1H), 6,78 (t, 1H), 6,69 (s, 2H), 6,28 (m, 1H), 4,85 (s, 2H), 4,15 (q, 2H), 3,18 (q, 2H), 2,89 (q, 2H), 1,47 (m, 2H), 1,40-1,34 (m, 11H), 1,25 (m, 2H), 1,21 (t, 3H).

Exemplo 61: Preparação de 2-[6-{di-(t-butoxicarbonil)amino-2-[5-{(t-butoxicarbonil)amino}pentil] amino-9H-purin-9-il] acetato de etila (61).



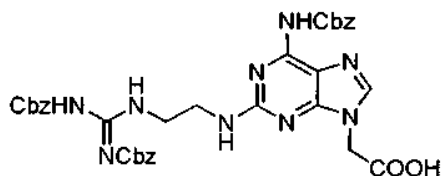
[00111] A 6,98g do composto 60 dissolvido em 100ml de THF, adicionou-se 7,95g de Boc_2O e 186mg de 4-(N,N-dimetilamino)piridina, e a solução foi agitada por 10min. Então, a solução foi misturada com 4,62ml de TEA, agitada por 30min, lentamente aquecida até 50°C e então agitada por mais 24 horas na temperatura. A solução de reação foi concentrada sob vácuo e o resíduo resultante foi dissolvido em 170ml de EA e lavado em série com HCl aquoso 0,5M e água. A camada orgânica foi seca em sulfato de sódio anidro, concentrada e submetida a separação cromatográfica (1:1 hexano/MC $\rightarrow$ MC) para obtenção do composto 61 na forma de uma espuma/sólido amarelo. ^1H NMR (500MHz; DMSO-d_6) δ 8,05 (s, 1H), 7,23 (t, 1H), 6,77 (t, 1H), 5,00 (s, 2H), 4,19 (q, 2H), 3,25 (q, 2H), 2,91 (q, 2H), 1,53 (m, 2H), 1,40-1,39 (m, 29H), 1,28 (m, 2H), 1,22 (t, 3H).

[00112] Exemplo 62: Preparação de 2-[2-[2-{2,3-bis-(benziloxicarbonil)-guanidino}etil]amino-6-oxo-6,9-diidro-1H-purin-2-il]acetato de etila (62).

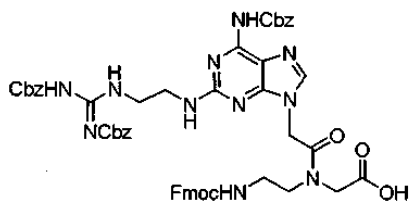


[00113] O composto 50 foi convertido no composto 62 na forma de um sólido branco seguindo-se similarmente o procedimento descrito no Exemplo 57. ^1H NMR (500MHz; DMSO-d_6) δ 11,59 (s, 1H), 10,68 (s, 1H), 8,50 (t, 1H), 7,68 (s, 1H), 7,42-7,29 (m, 10H), 6,58 (m, 1H), 5,13 (s, 2H), 5,02 (s, 2H), 4,86 (s, 2H), 4,12 (q, 2H), 3,50 (m, 2H), 3,46 (m, 2H), 1,18 (t, 3H)...

[00114] Exemplo 63: Preparação de ácido 2-[6-(benziloxicarbonilamino)-2-[2-{2,3-bis-(benziloxicarbonil)guanidino}etil]amino-9H-purin-9-il]acético (63).

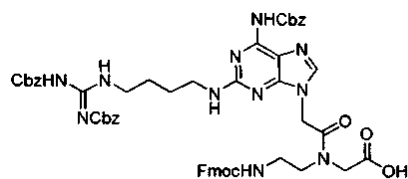


[00115] A 2,57g do composto 57 dissolvido em 7,1ml de THF e 7,1ml de água, adicionou-se 340mg de LiOH a 0°C, e a solução foi agitada em temperatura ambiente por 40min. A solução de reação foi acidificada até pH 5~6 com HCl aquoso 1N a 0°C, e o sólido resultante foi coletado por filtração para resultar em 2,33g do composto 63 na forma de um sólido branco. ^1H NMR (500MHz; DMSO-d_6) δ 11,59 (s, 1H), 10,21 (s, 1H), 8,57 (t, 1H), 7,93 (s, 1H), 7,45-7,28 (m, 15H), 7,12 (t, 1H), 5,17 (s, 2H), 5,13 (s, 2H), 5,02 (s, 2H), 4,83 (s, 2H), 3,53 (q, 2H), 3,42 (q, 2H).



[00117] A 460mg do composto 64 dissolvido em 3,6ml de MC, foram lentamente adicionados 3,6ml de TFA a 0°C. A solução de reação foi agitada em temperatura ambiente por 3,5h e então 50ml de éter dietílico foram adicionados. O precipitado resultante foi coletado por filtração para resultar em 430mg do composto 65 na forma de um sólido branco. ^1H NMR (400MHz; DMSO-d_6) δ 11,57 (s, 1H), 10,77 (br s, 1H), 8,66 (s, 1H), 8,54 (s, 1H), 7,87 (m, 2H), 7,63 (m, 2H), 7,50-7,28 (m, 21H), 5,26-4,96 (m, 8H), 4,34-4,18 (m, 4H), 4,03 (s, 1H), 3,52-3,36 (m, 7H), 3,13 (m, 1H), MS/ESI (m+1) = 1019,4 (observado), PM = 1018,0 ($\text{C}_{53}\text{H}_{51}\text{N}_{11}\text{O}_{11}$).

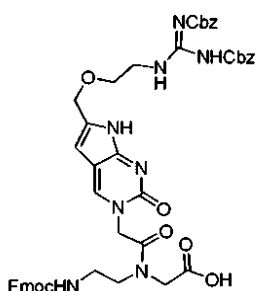
Exemplo 66: Preparação de N-[2-{(9H-fluoren-9-il)metoxycarbonilamino}-etil]-N-[2-{6-(benziloxycarbonilamino)-2-[4-{2,3-bis(benziloxycarbonil)-guanidino}-butil]amino-9H-purin-9-il}acetil]glicina (66).



[00118] O composto 59 foi convertido no composto 66 na forma de uma espuma/sólido branco seguindo-se similarmente os procedimentos descritos nos Exemplos 63 ~ 65. ^1H NMR (500MHz; DMSO-d_6) δ 12,84 (br s, 1H), 11,50 (s, 1H), 10,14-10,13 (m, 1H), 8,28 (m, 1H), 7,88 (m, 2H), 7,80-7,77 (m, 1H), 7,68-7,66 (m, 2H), 7,49 (t, 1H), 7,45-7,29 (m, 9H), 6,90 (m, 1H), 5,17 (s, 2H), 5,07 (s, 1,2H), 4,89 (s, 0,8H),

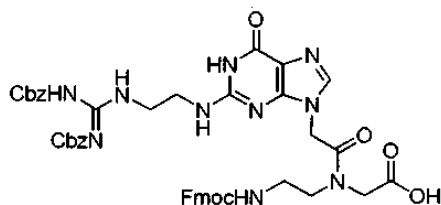
4,35-4,18 (m, 3H), 4,00 (s, 1H), 3,52 (m, 1H), 3,35-3,25 (m, 6H), 3,12 (m, 1H), 1,49 (m, 4H), 1,44 (d, 9H), 1,37 (d, 9H), MS/ESI (m + 1) = 978,4 (observado), PM = 978,1 (C₄₉H₅₉N₁₁O₁₁).

Exemplo 67: Preparação de N-[2-{(9H-fluoren-9-il)metoxi-carbonilamino}-etil)]-N-[2-[6-[2-{2,3-bis (benzilo-xicarbo-nil)guanidino}etoxi]metil-2-oxo-2H-pirrólo[2,3-d] pirimidin-3(7H)-il]acetil]glicina (67).



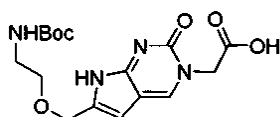
[00119] O composto 18 foi convertido no composto 67 na forma de um sólido amarelo claro seguindo-se similarmente os procedimentos descritos nos Exemplos 63 ~ 65. ¹H NMR (500MHz; DMSO_{d6}) δ 11,99 (br s, 1H), 11,57 (br, 1H), 8,56 (m, 1H), 8,48-8,45 (m, 1H), 7,89-7,87 (m, 2H), 7,70-7,65 (m, 2H), 7,49-7,26 (m, 15H), 6,36-6,33 (m, 1H), 5,20 (s, 2H), 5,03-5,01 (m, 3,3H), 4,83 (s, 0,7H), 4,49-4,17 (m, 5,7H), 4,01 (m, 1,3H), 3,57-3,11 (m, 8H); MS/ESI (m + 1) = 899,7 (observado), PM = 898,9 (C₄₇H₄₆N₈O₁₁).

Exemplo 68: Preparação de N-[2-{(9H-fluoren-9-il)metoxycarbonilamino}-etil)]-N-(2-[2-{2,3-bis- (benziloxi-carbonil)guanidino}etil] amino-6-oxo-6,9-diidro-1H-purin-2-il]acetil)glicina (68).



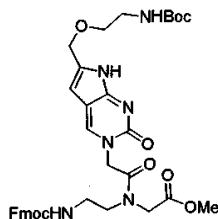
[00120] O composto 62 foi convertido no composto 68 na forma de uma espuma/sólido branco seguindo-se os procedimentos descritos nos Exemplos 63 ~ 65. ^1H NMR (500MHz; DMSO-d_6) δ 11,58 (s, 1H), 10,88 (s, 1H), 8,51 (m, 1H), 7,93 (m, 1H), 7,87 (m, 2H), 7,64 (m, 2H), 7,47 (t, 1H), 7,41-7,26 (m, 14H), 6,66 (br, 1H), 5,16-4,89 (m, 8H), 4,34-4,18 (m, 3,8H), 4,00 (m, 1,2H), 3,50-3,35 (m, 7H), 3,13 (m, 1H); MS/ESI ($m + 1$) = 885,3 (observado), PM = 884,9 ($\text{C}_{45}\text{H}_{44}\text{N}_{10}\text{O}_{10}$).

Exemplo 69: Preparação de ácido 2-[6-{2-(t-butoxicarbonilamino)etoxi}metil-2-oxo-2H-pirrólo-[2,3-d] pirimidin-3(7H)-il]acético (69).



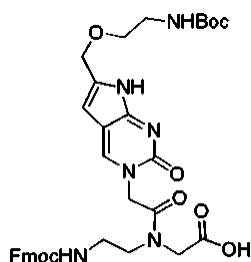
[00121] O composto 16 foi hidrolisado no composto 69 na forma de um sólido marrom claro seguindo-se similarmente o procedimento descrito no Exemplo 11. ^1H NMR (500MHz; DMSO-d_6) δ 13,03 (br s, 1H), 11,31 (s, 1H), 8,37 (s, 1H), 6,85 (t, 1H), 6,19 (s, 1H), 4,63 (s, 2H), 4,40 (s, 2H), 3,42 (t, 2H), 3,11 (q, 2H), 1,37 (s, 9H).

[00122] Exemplo 70: Preparação de metil N-[2-{(9H-fluoren-9-il)metoxycarbonilamino}etil]-N-(2-[6-{2-(t-butoxicarbonilamino)etoxi}metil-2-oxo-2H-pirrólo-[2,3-d]pirimidin-3(7H)-il]acetil)glicinato (70).



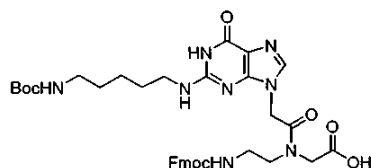
[00123] 3,6g do composto 69, 3,6g de Fmoc-Aeg-OMe, 2,5g de EDCI 1,73g de HOBT e 2,24ml de DIEA foram dissolvidos em 70ml de DMF e agitados em temperatura ambiente por 1,5h. O solvente da reação foi removido sob pressão reduzida e o resíduo resultante foi dissolvido em 100ml de MC e lavado em série com HCl aquoso 1M, água destilada e salmoura. A camada orgânica foi seca em sulfato de sódio anidro, concentrada sob vácuo e purificada por cromatografia em coluna (100:2 MC/MeOH) para resultar em 2,5g do composto 70 na forma de uma espuma/sólido amarelo. ^1H NMR (500MHz; DMSO-d_6) δ 11,30 (s, 1H), 8,24 (s, 0,65H), 8,21 (s, 0,35H), 7,89-7,87 (m, 2H), 7,71-7,67 (m, 2H), 7,48-7,25 (m, 5H), 6,87 (t, 1H), 6,17 (s, 0,7H), 6,15 (s, 0,3H), 4,93 (s, 1,3H), 4,74 (s, 0,7H), 4,40-4,39 (m, 2,7H), 4,35-4,21 (m, 3H), 4,08 (s, 1,3H), 3,73 (s, 0,8H), 3,62 (s, 2,2H), 3,51 (t, 1,4H), 3,43-3,30 (m, 3,6H), 3,13-3,10 (m, 3H), 1,37 (s, 9H).

Exemplo 71: Preparação de N-[2-((9H-fluoren-9-yl)metoxycarbonilamino)-etil]-N-(2-[6-{2-(tert-butoxycarbonilamino)etoxi)metil-2-oxo-2H-pirrólo-[2,3-d] pirimidin-3(7H)-il]acetil)glicina (71).



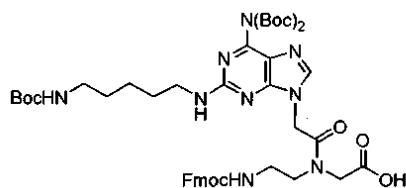
[00124] A 5,0g do composto 70 dissolvido em 75ml de 1:1:1 acetonitrila/acetona/água, foram lentamente adicionados, a 0°C, 28,5ml de LiOH aquoso 2,5N. A solução de reação foi agitada por 10min e neutralizada com ácido cítrico aquoso a 20%. Depois que o pH da solução foi ajustado em 8 com sódio bicarbonato aquoso saturado, adicionou-se 516mg de Fmoc-OSu à solução e a solução foi agitada por 2h em temperatura ambiente. Então, a solução foi acidificada até pH 3 com ácido cítrico aquoso a 20% e agitada por 90min a 0°C. O precipitado resultante foi coletado por filtração para resultar em 4,0g do composto 71 na forma de um sólido verde amarelado. ^1H NMR (500MHz; DMSO-d_6) δ 12,02 (br, 1H), 8,51-8,49 (m, 1H), 7,89-7,88 (d, 2H), 7,70-7,50 (m, 2H), 7,49 (t, 1H), 7,42-7,28 (m, 4H), 6,87 (t, 1H), 6,36 (s, 0,7H), 6,33 (s, 0,3H), 5,02 (s, 1,2H), 4,84 (0,8H), 4,43-4,42 (m, 2,4H), 4,34-4,19 (m, 3,2H), 4,01 (s, 1,4H), 3,48 (t, 1,2H), 3,44-3,41 (m, 2,1H), 3,37-3,29 (m, 2H), 3,12-3,10 (m, 2,7H), 1,37 (s, 9H); MS/ESI ($m+1$) = 689,3 (observado), PM = 688,7 ($\text{C}_{35}\text{H}_{40}\text{N}_6\text{O}_9$)..

Exemplo 72: Preparação de N-[2-{(9H-fluoren-9-il)metoxycarbonilamino}-etil]-N-(2-[5-{(t-butoxycarbonil)amino}pentil]amino-6-oxo-6,9-diidro-1H-purin-2-il]acetil)glicina (72).



[00125] O composto 51 foi convertido no composto 72 na forma de uma espuma/sólido branco seguindo-se similarmente os procedimentos descritos nos Exemplos 69 ~ 71. ^1H NMR (500MHz; DMSO-d_6) δ 13,01 (br, 1H), 10,52-10,46 (m, 1H), 7,88 (d, 2H), 7,65 (d, 2H), 7,54 (s, 0,5H), 7,50 (s, 0,5H), 7,48 (m, 1H), 7,40 (t, 2H), 7,31 (m, 2H), 6,81 (t, 0,5H), 6,72 (t, 0,5H), 6,52-6,48 (m, 1H), 4,98 (s, 1H), 4,77 (s, 1H), 4,33 (d, 1H), 4,23-4,21 (m, 2H), 4,05 (m, 1H), 3,96 (s, 1H), 3,50 (m, 1H), 3,35 (m, 2H), 3,21 (m, 2H), 3,14 (q, 1H), 2,88 (m, 2H), 1,46 (q, 2H), 1,39-1,35 (m, 11H), 1,23 (m, 2H); MS/ESI (m+1) = 717,4 (observado), PM = 716,8 ($\text{C}_{36}\text{H}_{44}\text{N}_8\text{O}_8$).

[00126] Exemplo 73: Preparação de N-[2-[(9H-fluoren-9-il)metoxycarbonilamino]-etil]-N-[2-[6-{bis(t-butoxicarbonil)amino}-2-{5-(t-butoxicarbonilamino)-pentil}amino-9H-purin-9-il]acetil]glicina (73).



[00127] O composto 61 foi convertido no composto 73 na forma de uma espuma/sólido branco seguindo-se similarmente os procedimentos descritos nos Exemplos 69 ~ 71. ^1H NMR (500MHz; DMSO-d_6) δ 12,71 (br s, 1H), 7,90-7,87 (m, 3H), 7,67 (m, 2H), 7,44-7,39 (m, 3H), 7,31 (m, 2H), 7,07 (m, 1H), 6,69 (m, 1H), 5,11 (s, 1,2H), 4,93 (s, 0,8H), 4,37^,21

(m, 3,8H), 4,01 (s, 1,2H), 3,52 (m, 1H), 3,36 (m, 2H), 3,23 (m, 2H), 3,13 (m, 1H), 2,88 (m, 2H), 1,49 (m, 2H), 1,38-1,35 (m, 27H), 1,27-1,25 (m, 4H); MS/ESI (m+1) = 916,5 (observado), PM = 916,0 (C₄₆H₆₁N₉O₁₁).

[00128] Preparação de oligômeros PNA: os monômeros de PNA o, que foram sintetizados de acordo com o Esquema 4, foram enviados à Panagene, Inc (www.panagene.com, Daejeon, Coréia do Sul) para a preparação dos oligômeros de PNA da Fórmula I pela Panagene de acordo com o método descrito na literatura ou com pequena(s) modificação(ões) deste. (Org. Lett, vol 9, 3291-3293, 2006). Os oligômeros de PNA foram recebidos da Panagene como caracterizados por MALDI-TOF e analisados por C₁₈-HPLC de fase reversa. Os oligômeros de PNA recebidos da Panagene foram utilizados sem qualquer purificação adicional.

[00129] Os monômeros de PNA q do Esquema 5 foram utilizados para sintetizar os oligômeros de PNA da Fórmula I de acordo com o método revelado na técnica anterior ou com pequena(s) modificação(ões) deste. (USP 6.133.444). Esses oligômeros de PNA foram purificados por C₁₈-HPLC de fase reversa (acetonitrila aquosa com TFA 0,1%) e caracterizados por MALDI-TOF. A Figura 1 provê cromatogramas de HPLC antes e depois da purificação de Oligo 17 por HPLC de fase reversa. A Figura 2 provê um espectro de massa MALDI-TOF de um lote purificado de Oligo 17. As Figuras 1 e 2 são providas somente para fins ilustrativos e não devem ser interpretadas como uma restrição à presente invenção.

[00130] Os oligômeros de PNA sintetizados para a presente invenção são mostrados na Tabela 1 com seus dados de peso molecular por MALDI-TOF. Das abreviações utilizadas

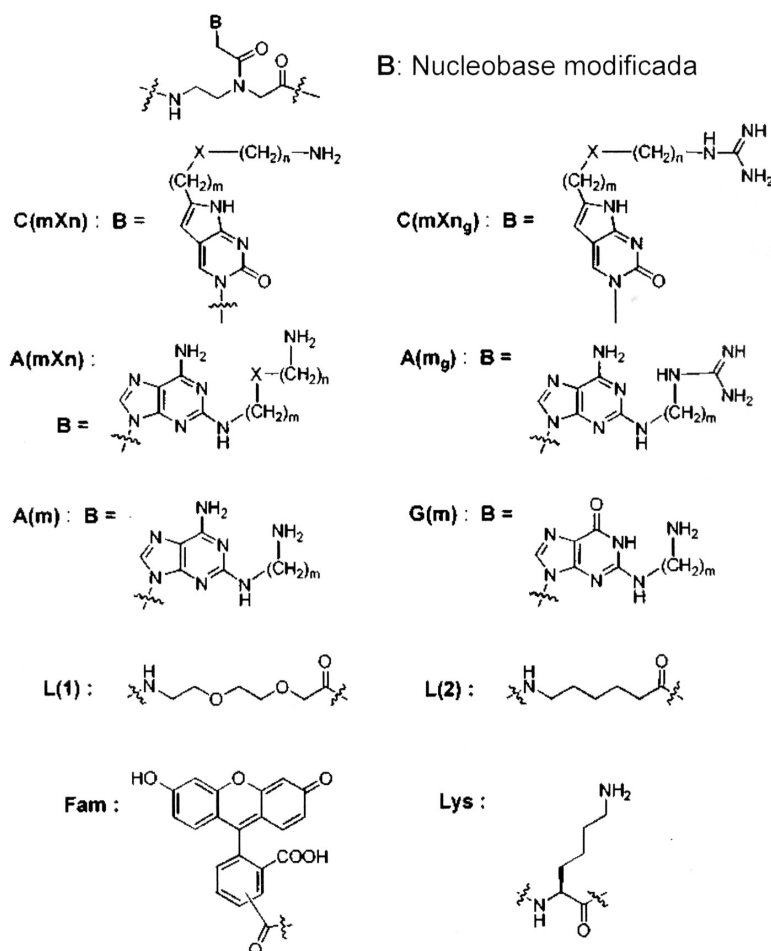
na Tabela 1, A, T, G e C referem-se a adenina, timina, guanina e citosina de nucleobase não modificada, respectivamente. As nucleobases modificadas C(mXn), C(mXn_g), A(mXn), A(m), A(mg) e G(m) são conforme definidas abaixo na Tabela 1 com Lys, Fam, L(1) e L(2). Esses oligômeros de PNA são apresentados somente para fins ilustrativos e não devem ser interpretados como uma restrição da presente invenção. □

Tabela 1. Oligômeros de PNA da presente invenção e seus dados espectrais de massa.³

Entrada	Sequência (N→C)	PM	(m+1) ^b
Oligo 1	Fam-L(1)L(1)-TGC(103)-TAC(103)-TAC(103)-TG-Lys-NH ₂	4079,0	4078,3
Oligo 2	Fam-L(1)L(1)-TGC-TAC-TAC-TG-Lys-NH ₂	3745,6	3745,5
Oligo 3	TGC(103)-TAC-TAC(103)-TG-Lys-NH ₂	3319,4	3318,5
Oligo 4	TGC-TAC(103)-TAC-TG-Lys-NH ₂	3208,3	3208,3
Oligo 5	TGC-TAC-TAC-TG-Lys-NH ₂	3097,2	3097,8
Oligo 6	Fam-L(1)L(1)-TC(103)T-CC(103)C-AGC(103)-GTG-C(103)GC-C(103)AT-Lys-NH ₂	6140,1	6141,8
Oligo 7	Fam-L(1)L(1)-TCT-CCC-AGC-GTG-CGC-CAT-Lys-NH ₂	5584,4	5583,1
Oligo 8	TGC(202)-TAC-TAC(202)-TG-Lys-NH ₂	3319,4	3318,9
Oligo 9	GC(202)A-C(202)AT-TTG-C(202)CT-NH ₂	3553,7	3552,7
Oligo 10	GC(102)A-C(102)AT-TTG-C(102)CT-NH ₂	3511,6	3511,1
Oligo 11	GCA-CAT-TTG-CCT-Lys-NH ₂	3348,3	3345,8
Oligo 12	CA(3)T-A(3)GT-A(3)TA-A(3)GT-NH ₂	3580,8	3580,9
Oligo 13	CA(4)T-A(4)GT-A(4)TA-A(4)GT-NH ₂	3636,9	3634,9
Oligo 14	CA(5)T-A(5)GT-A(5)TA-A(5)GT-NH ₂	3693,0	3691,5
Oligo 15	CA(7)T-A(7)GT-A(7)TA-A(7)GT-NH ₂	3805,0	3803,4
Oligo 16	CAT-AGT-ATA-AGT-Lys-NH ₂	3420,3	3418,3
Oligo 17	CA(5)T-A(5)GT-A(5)TA-A(5)GT-Lys-NH ₂	3820,9	3819,8
Oligo 18	CA(202)T-A(202)GT-A(202)TA-A(202)GT-NH ₂	3700,7	3701,4
Oligo 19	L(1)-TAG(203)-CTG(203)-CTG-ATT-Lys-NH ₂	3746,9	3748,9
Oligo 20	TG(5)G-C(102)AA-C(102)TG-A(5)T-Lys-NH ₂	3525,6	3523,8
Oligo 21	Fam-L(2)-TG(5)G-C(102)AA-C(102)TG-A(5)T-Lys-NH ₂	3997,0	3996,1
Oligo 22	Fam-L(2)-TT-C(102)AT-A(5)GT-A(5)TA-AG(5)T-Lys-NH ₂	4806,9	4806,7
Oligo 23	Fam-L(2)L(2)-TC(102)A-GA(5)A-C(102)TT-A(5)T-Lys-NH ₂	4084,2	4083,8
Oligo 24	Fam-L(2)-CA(5)T-A(4g)GT-A(4g)temperatura ambiente(5)-AGT-Lys-NH ₂	4348,5	4347,4
Oligo 25	TT-C(102g)AT-A(5)GT-A(5)TA-AG(5)T-Lys-NH ₂	4377,4	4375,6
Oligo 26	GC(1N3)A-C(1N3)AT-TTG-C(1N3)CT-NH ₂	3550,8	3550,9
Oligo 27	CAT-AGT-ATA-AGT-NH ₂	3292,3	3292,5
Oligo 28	Fam-L(2)-TGG-CAA-CTG-AT-Lys-NH ₂	3617,5	3616,3

a. As abreviações empregadas para os monômeros são conforme definidas abaixo.

b. Pico iônico observado para MH⁺, salvo se informado em contrário.



[00131] Afinidade de Ligação ao DNA: Os oligômeros de PNA da presente invenção foram avaliados quanto à sua afinidade de ligação ao DNA medindo-se os valores de T_m como segue.

[00132] 4 μ M de oligômero de PNA e 4 μ M de DNA foram misturados em tampão aquoso (pH 7,16, fosfato de sódio 10mM, NaCl 100mM), e incubados a 90°C por alguns minutos e lentamente resfriado até a temperatura ambiente. Então, a solução foi transferida para uma cubeta de quartzo de 4ml e a cubeta foi hermeticamente vedada. A cubeta foi montada em um espectrofotômetro Agilent 8453 UV/Visible e as alterações de absorbância a 260nm foram registradas aumentado-se a

temperatura da cubeta em 0,5 ou 1,0°C por minuto. A partir da curva de absorbância vs temperatura, a temperatura que mostrou a maior taxa de aumento na absorbância foi lida como a temperatura de fusão T_m entre PNA e DNA. Os DNAs para medição da T_m foram adquiridos da Bioneer, Inc. (www.bioneer.com, Daejeon, Coréia do Sul) ou da Ahram Biosystems (www.ahrambio.com, Seul, Coréia do Sul) e utilizados sem purificação adicional..

[00133] A Figura 3 mostra gráficos de alterações de absorbância em relação à temperatura para o Oligo 17 contra o DNA complementar ou de não correspondência. Para sequências do DNA de não correspondências contra o Oligo 17, consulte a Tabela 2. Na Figura 3, há uma temperatura de transição em cada curva, que foi lida como o valor de T_m da curva.

[00134] Os valores de T_m são mostrados na Tabela 2 para oligômeros de PNA da presente invenção. Esses valores de T_m são apresentados somente para fins ilustrativos e não devem ser interpretados como uma limitação da presente invenção.

Tabela 2. Valores de T_m entre PNA e DNA complementar ou de não correspondência.

Entrada	Sequência de DNA (5'→3')	T_m °C	Observação
Oligo 5	CAG-TAG-TAG-CA	55	oligômero de PNA não modificado
Oligo 3		65	C(103) x 2
Oligo 4		61	C(103) x 1
Oligo 8		68	C(202) x 2
Oligo 10	AGG-CAA-TTG-TGC	> 85	C(102) x 3
Oligo 11		59	oligômero de PNA não modificado
Oligo 12	ACT-TAT-ACT-ATG	60	A(3) x 4
Oligo 13		64	A(4) x 4
Oligo 14		69	A(5) x 4
Oligo 15		71	A(7) x 4
Oligo 18		66	A(202) x 4

Oligo 27		55	oligômero de PNA não modificado
Oligo 16	ACT-TAT-ACT-ATG	56	oligômero de PNA não modificado
	ACT-TAT-ACT-ATG	72	complementar
	ACT-TAC-ACT-ATG	61	de não correspondência (T → C)
	ACT-TAA-ACT-ATG	59	de não correspondência (T → A)
	ACT-TAG-ACT-ATG	58	de não correspondência (T → G)
Oligo 24	ACT-TAT-ACT-ATG	70	A(5) x 2 plus A(4g) x 2
	ATC-AGT-TGC-CA	84	complementar
	ATC-ATT-TGC-CA	62	de não correspondência (G → T)
	ATC-AAT-TGC-CA	65	de não correspondência (G → A)

[00135] A substituição da citosina por um derivado de pirrolocitosina de nucleobase não natural da presente invenção aumentou notavelmente a afinidade do oligômero de PNA pelo DNA complementar. Por exemplo, Oligo 10 tendo três monômeros 'C(102)' de citosina 'modificados' apresentou uma T_m que excedeu 85°C, ao passo que o Oligo 11 'não modificado' correspondente apresentou uma T_m de 58°C. Outros monômeros de citosina modificados, tais como 'C(103)' ou 'C(202)' também aumentaram significativamente a afinidade do oligômero de PNA pelo DNA complementar, como exemplificado no Oligo 3 e no Oligo 8.

[00136] As nucleobases de adenina 'modificadas' da presente invenção também aumentaram significativamente a afinidade do oligômero de PNA pelo DNA complementar. Por exemplo, o Oligo 15 tendo quatro monômeros A(7) de adenina 'modificados' apresentou uma T_m de 71°C, que é significativamente maior que a T_m de 55°C observada com o Oligo 27 'não modificado'. Outros monômeros de adenina 'modificados', por exemplo, A(4) e A(5), também aumentaram notavelmente a afinidade pelo DNA complementar.

[00137] Os monômeros de PNA 'modificados' da presente invenção foram considerados relativamente sensíveis à não correspondência de base. Por exemplo, reduções de 11 ~ 14°C na T_m foram observadas com não correspondências de base

simples para um monômero A(5) no Oligo 17. As não correspondências de base simples para um monômero C(102) no Oligo 20 resultou em reduções de 19 ~ 22°C na T_m.

[00138] Penetração Celular: Para avaliar a capacidade de penetração celular dos oligômeros de PNA da presente invenção, células de câncer de origem humana foram tratadas com oligômeros de PNA covalentemente marcados com fluoresceína. O método aplicado é apresentado resumidamente a seguir.

[00139] Em cada cubeta de vidro (autoclavada) colocada em cada poço de uma placa de 24 poços, são semeadas 20.000 ~ 100.000 células dependendo da taxa de crescimento da linhagem celular utilizada, e as células foram cultivadas a 37°C e CO₂ a 5% por 16 a 24 horas. Então, o meio foi substituído por 500µl de meio Opti-MEM fresco (com ou sem FBS a 1%), ao qual adicionou-se uma alíquota de solução aquosa estoque de um oligômero de PNA covalentemente marcado com fluoresceína. Depois que as células foram cultivadas por um intervalo designado, as células foram lavadas com PBS e fixadas por incubação em paraformaldeído a 3,7% ou 4%. As células foram bem lavadas várias vezes com PBS ou PBS contendo Tween-20 a 0,1%. Então, a cubeta de vidro foi montada em um vidro deslizante utilizando uma gota de solução de montagem e selada com esmalte de unha para realização da microscopia confocal por fluorescência. As imagens fluorescentes foram feitas em um microscópio confocal Zeiss LSM 510 (Alemanha) em objetiva de 63x ou em um microscópio confocal Nikon C1Si em objetiva de 40x.

[00140] As imagens de penetração celular nas Figuras 4 ~ 8 são mostradas somente para fins ilustrativos

e não devem ser interpretadas como uma limitação da presente invenção.

[00141] Nas Figuras 4(a) e 4(b), são mostradas imagens microscópicas confocais (em objetiva de 63x) 1, 2, 3 e 24 horas depois que as células HeLa foram tratadas com Oliqo 1 e Oliqo 2 a 5 μ M, respectivamente (sem FBS). Embora a intensidade da fluorescência seja clara e fica intensa por 24 horas na Figura 4(a), a intensidade da fluorescência é fraca na Figura 4(b), indicando que o Oliqo 1 penetra as células HeLa de forma significativamente mais rápida que o Oliqo 2 'não modificado'.

[00142] Nas Figuras 5(a) e 5(b), são mostradas imagens microscópicas confocais (em objetiva de 63x) 0,5 e 1 hora depois que as células MCF-7 foram tratadas com Oliqo 6 e Oliqo 7 a 2,5 μ M, respectivamente (sem FBS). Embora a intensidade da fluorescência seja clara e fica intensa por 1 hora na Figura 5(a), a intensidade da fluorescência é fraca na Figura 5(b), indicando que o Oliqo 6 penetra as células MCF-7 de forma significativamente mais rápida que o Oliqo 7 'não modificado'.

[00143] Nas Figuras 6(a) e 6(b), são mostradas fotos microscópicas confocais (em objetiva de 40x) 6 ou 24 horas depois que as células HeLa foram tratadas com Oliqo 1 e Oliqo 6 a 1 μ M, respectivamente (com FBS a 1%). Embora a intensidade da fluorescência seja fraca mesmo em 24 horas na Figura 6(a), a intensidade da fluorescência é clara e fica intensa por 24 horas na Figura 6(b), sugerindo que o Oliqo 6 penetra as células HeLa de forma significativamente mais rápida que o Oliqo 1.

[00144] Nas Figuras 7(a) e 7(b), são mostradas

fotos microscópicas confocais (objetiva de 40x) 24 horas depois que as células JAR foram tratadas com Oliqo 21 e Oliqo 28 a 2 μ M, respectivamente (sem FBS). Embora a intensidade da fluorescência seja forte na Figura 7(a), não há intensidade de fluorescência significativa na Figura 7(b), sugerindo que o Oliqo 21 penetra as células JAR de forma significativamente mais rápida que o Oliqo 28 'não modificado'.

[00145] Nas Figuras 7(c) e 7(d), são mostradas fotos microscópicas confocais (em objetiva de 40x) 24 horas depois que as células A549 foram tratadas com Oliqo 21 e Oliqo 28 a 2 μ M, respectivamente (sem FBS). Embora a intensidade da fluorescência seja forte na Figura 7(c), não há intensidade de fluorescência significativa na Figura 7(d), sugerindo que o Oliqo 21 penetra as células A549 de forma significativamente mais rápida que o Oliqo 28 'não modificado'.

[00146] Nas Figuras 7(e) e 7(f), são mostradas fotos microscópicas confocais (em objetiva de 40x) 12 horas depois que as células HeLa foram tratadas com Oliqo 21 e Oliqo 28 a 2 μ M, respectivamente (sem FBS). Embora a intensidade da fluorescência seja aparente na Figura 7(e), não há intensidade de fluorescência significativa na Figura 7(f), sugerindo que o Oliqo 21 penetra as células HeLa de forma significativamente mais rápida que o Oliqo 28 'não modificado'.

[00147] Na Figura 7(g), são mostradas fotos microscópicas confocais (em objetiva de 40x) 24 horas depois que as células HeLa foram tratadas com Oliqo 21 a 2 μ M (sem FBS). Uma vez que a fluorescência celular na Figura 7(g) é

significativamente mais forte que na Figura 7(e), o Oligo 21 parece penetrar em 24 horas em vez de 12 horas.

[00148] A Figura 8(a), 8(b) e 8(c) mostra imagens microscópicas confocais (objetiva de 40x) 24 horas depois que as células HeLa, A549 e JAR foram tratadas com Oligo 22 2 μ M, respectivamente (sem FBS). Todas as imagens estão associadas à fluorescência dentro da célula, indicando que o Oligo 22 possui boa penetração celular nas células testadas.

[00149] Exemplo Anti-Sentido: Oligo 9 e Oligo 12 possuem as mesmas sequências de base de T1-12 e T5-12, respectivamente, o que foi relatado por inibir a síntese ribossômica de mdm2 na literatura. (Nucleic Acids Res. vol 32, 4893-4902, 2004). O Oligo 9 e o Oligo 12 foram avaliados qto à sua capacidade de inibir a síntese ribossômica de mdm2 em células JAR como segue. O exemplo anti-sentido a seguir é apresentado somente para fins ilustrativos e não deve ser interpretado como uma limitação da presente invenção.

[00150] As células JAR (catálogo ATCC # HTB-144) foram cultivadas em meio RPMI-1640 suplementado com FBS 10% e penicilina-estreptomicina 1% a 37°C e CO₂ a 5%. As células foram então semeadas em cada poço de uma placa de 12 poços contendo 1ml do mesmo meio, e tratadas com uma alíquota de uma solução aquosa estoque de Oligo 9 ou de Oligo 12 com uma determinada concentração. Então, as células foram incubadas a 37°C e CO₂ a 5% por 15h.

[00151] As células em cada poço foram lavadas com PBS gelado e tratadas com 80 μ l de tampão RIPA contendo coquetel de inibidores de protease a 1%, e a placa foi incubada a 4°C e agitada lentamente por 15min. O conteúdo de

cada poço foi raspado em um microtubo. O microtubo foi incubado em gelo por 10min e centrifugado a 10.000g. O sobrenadante resultante foi coletado e submetido a quantificação de proteína por ensaio de Bradford e análise western blot. Para eletroforese, 20 µg de proteína foram carregados em cada faixa do gel em um equipamento de minigel, separados e transferidos para uma membrana PVDF (0,45µ, Millipore). O anticorpo mdm2 primário utilizado para o western blotting era SC-965 (Santa Cruz Biotechnology).

[00152] A Tabela 9 mostra os resultados do western blotting das células JAR tratadas com 5µM ou 10µM de Oligo 9, 5µM ou 10µM de Oligo 10, co-tratamento com os oligômeros a 5µM ou 10µM cada, e com branco (sem tratamento com oligômeros). Na Figura 9, o tratamento com Oligo 9 ou Oligo 10, ou o co-tratamento com Oligo 9 e Oligo 10 inibiu significativamente a síntese ribossômica de mdm2 nas células JAR tanto a 5µM como a 10µM.

Legenda da Figura

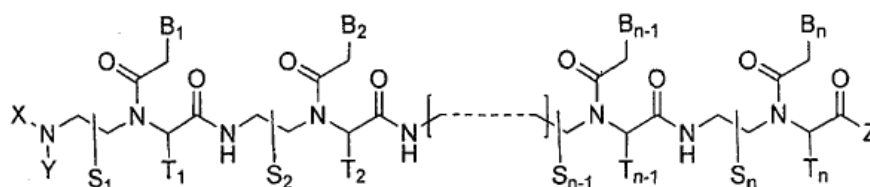
Figura 1

A) Oligo 17 (antes da purificação)

B) Oligo 17 (após a purificação)

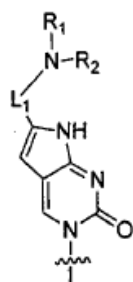
REIVINDICAÇÕES

1. "DERIVADO DE ÁCIDO PEPTONUCLEICO", da Fórmula I ou um sal farmaceuticamente aceitável respectivo:

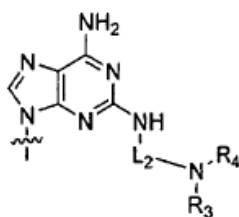


Fórmula I

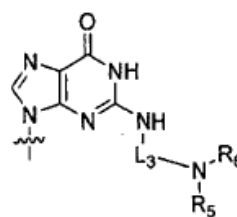
caracterizado por: n ser um número inteiro igual ou maior que 5; S1, S2, ..., Sn-1, Sn, T1, T2, ..., Tn-1 e Tn representarem um radical hidrogênio, X e Y representarem independentemente um radical hidrogênio, substituído ou não substituído C1-C5 alquila acila; Z representar um radical amino substituído ou não substituído; B1, B2, ..., Bn-1 e Bn serem independentemente selecionados de nucleobases naturais, incluindo adenina, timina, guanina, citosina e uracila, e nucleobases não naturais; e pelo menos, um dentre B1, B2, ..., Bn-1 e Bn ser independentemente selecionado de nucleobases não naturais representadas pela Fórmula II, Fórmula III ou Fórmula IV:



Fórmula II



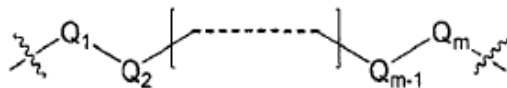
Fórmula III



Fórmula IV

em que: R1, R2, R3, R4, R5 e R6 são independentemente selecionados de um radical alquila substituído ou não substituído e hidrogênio; e L1, L2 e L3 são um ligante

covalente representado pela Fórmula V, ligando um grupo amino básico à fração responsável pelas propriedades de pareamento de nucleobase:



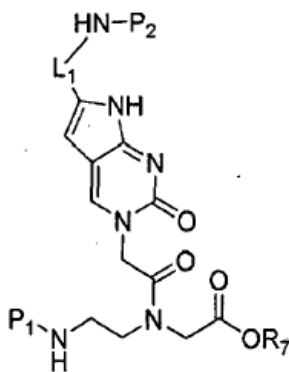
Fórmula V

em que: Q1 e Qm são um radical metileno (-CH2-) substituído ou não substituído e Qm é diretamente ligado ao grupo amino básico; Q2, Q3, ... e Qm-1 são independentemente selecionados de um radical metileno substituído ou não substituído, oxigênio (-O-) e amino substituído ou não substituído [-N(H)- ou -N(substituente)-]; e m é um número inteiro de 2 a 15.

2. "COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO UMA QUANTIDADE TERAPEUTICAMENTE EFICAZ DO DERIVADO DE ÁCIDO PEPTONUCLEICO", de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por apresentar um sal farmaceuticamente aceitável respectivo para fins terapêuticos.

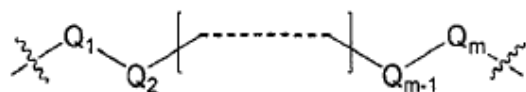
3. "MÉTODO DE UTILIZAÇÃO DO DERIVADO DE ÁCIDO PEPTONUCLEICO", de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por apresentar um sal respectivo para modulação in vitro da expressão de proteína celular.

4. "COMPOSTO" da Fórmula VI:



Fórmula VI

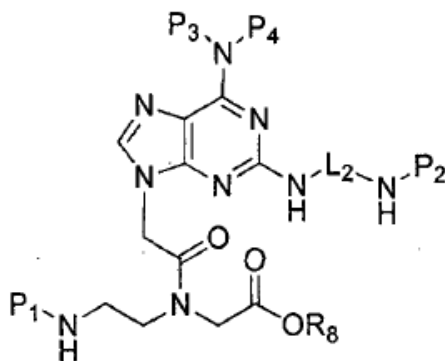
caracterizado por: R7 ser um radical hidrogênio, ou alquila substituído ou não substituído; P1 ser selecionado de (9H-fluoren-9-il) metoxycarbonila ou arilsulfonila substituído ou não substituído; P2 ser selecionado de t-butoxicarbonila e 1,3-bis-(benziloxicarbonil)amidinila; e L1 ser um ligante representado pela Fórmula V:



Fórmula V

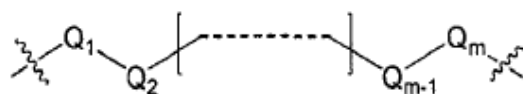
em que: Q1 e Qm são um radical metileno substituído ou não substituído e Qm é diretamente ligado ao radical amino; Q2, Q3, ... e Qm-1 são independentemente selecionados de um radical metileno substituído ou não substituído, e oxigênio e m é um número inteiro de 2 a 15.

5. "COMPOSTO" da Fórmula VII:



Fórmula VII

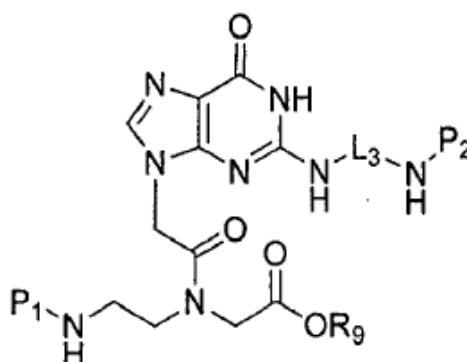
caracterizado por: R8 ser um radical hidrogênio, ou alquila substituído ou não substituído; P1 ser selecionado de (9H-fluoren-9-il) metoxycarbonila ou arilsulfonila substituído ou não substituído; P2 ser selecionado de t-butoxicarbonila, e 1,3-bis-(benziloxicarbonil)amidinila; P3 e P4 são independentemente selecionados de um radical hidrogênio, t-butoxicarbonila e benziloxicarbonila; e L2 ser um ligante representado pela Fórmula V:



Fórmula V

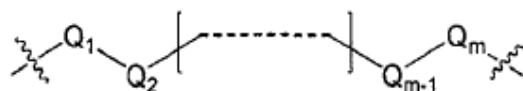
em que: Q1 e Qm são um radical metileno substituído ou não substituído e Qm é diretamente ligado ao radical amino; Q2, Q3, ... e Qm-1 representam um radical metileno substituído ou não substituído; e m é um número inteiro de 2 a 15.

6. "COMPOSTO" da Fórmula VIII:



Fórmula VIII

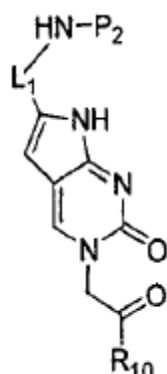
caracterizado por: R9 ser um radical hidrogênio; P1 ser selecionado de (9H-fluoren-9-il)metoxycarbonila; P2 ser selecionado de t-butoxycarbonila e 1,3-bis-(benziloxycarbonil)amidinila; e L3 ser um ligante representado pela Fórmula V:



Fórmula V

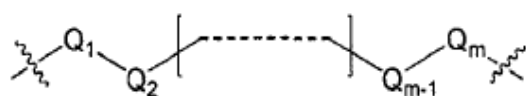
em que: Q1 e Qm são um radical metileno substituído ou não substituído e Qm é diretamente ligado ao radical amino; Q2, Q3, ... e Qm-1 representam um radical metileno substituído ou não substituído; e m é um número inteiro de 2 a 15.

7. "COMPOSTO" da Fórmula IX:



Fórmula IX

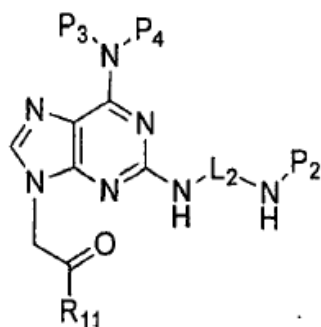
caracterizado por: R_{10} ser um radical hidróxi, alquilóxi substituído ou não substituído ou amino substituído ou não substituído; P_2 ser selecionado de t-butoxicarbonila, 1,3-bis-(benziloxicarbonil)amidinila; e L_1 ser um ligante representado pela Fórmula V:



Fórmula V

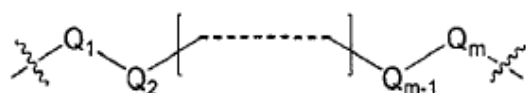
em que: Q_1 e Q_m são um radical metileno substituído ou não substituído e Q_m é diretamente ligado ao radical amino; Q_2 , Q_3 , ... e Q_{m-1} são independentemente selecionados de um radical metileno substituído ou não substituído, oxigênio e amino substituído ou não substituído; e m é um número inteiro de 2 a 15.

8. "COMPOSTO" da Fórmula X:



Fórmula X

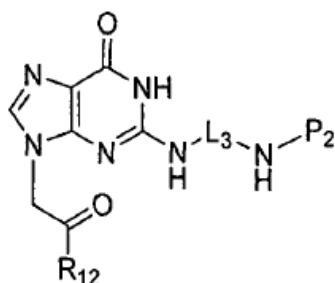
caracterizado por: R_{11} ser um radical hidróxi, alquilóxi substituído ou não substituído ou amino substituído ou não substituído; P_2 ser selecionado de t-butoxicarbonila, e 1,3-bis-(benziloxycarbonil)amidinila; P_3 e P_4 serem independentemente selecionados de um radical hidrogênio, t-butoxicarbonila e benziloxycarbonila; e L_2 ser um ligante representado pela Fórmula V:



Fórmula V

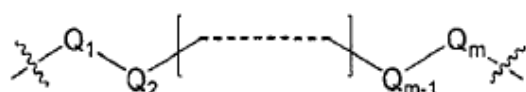
em que: Q_1 e Q_m são um radical metileno substituído ou não substituído e Q_m é diretamente ligado ao radical amino; Q_2 , Q_3 , ... e Q_{m-1} são independentemente selecionados de um radical metileno substituído ou não substituído e oxigênio; e m é um número inteiro de 2 a 15.

9. "COMPOSTO" da Fórmula XI:



Fórmula XI

caracterizado por: R_{12} ser um radical hidróxi, alquilóxi substituído ou não substituído ou amino substituído ou não substituído; P_2 representa t-butoxicarbonila; e L_3 ser um ligante representado pela Fórmula V:



Fórmula V

em que: Q_1 e Q_m são um radical metileno substituído ou não substituído e Q_m é diretamente ligado ao radical amino; Q_2 ,

$Q_3, \dots$ e Q_{m-1} são independentemente selecionados de um radical metileno substituído ou não substituído e oxigênio; e m é um número inteiro de 2 a 15.

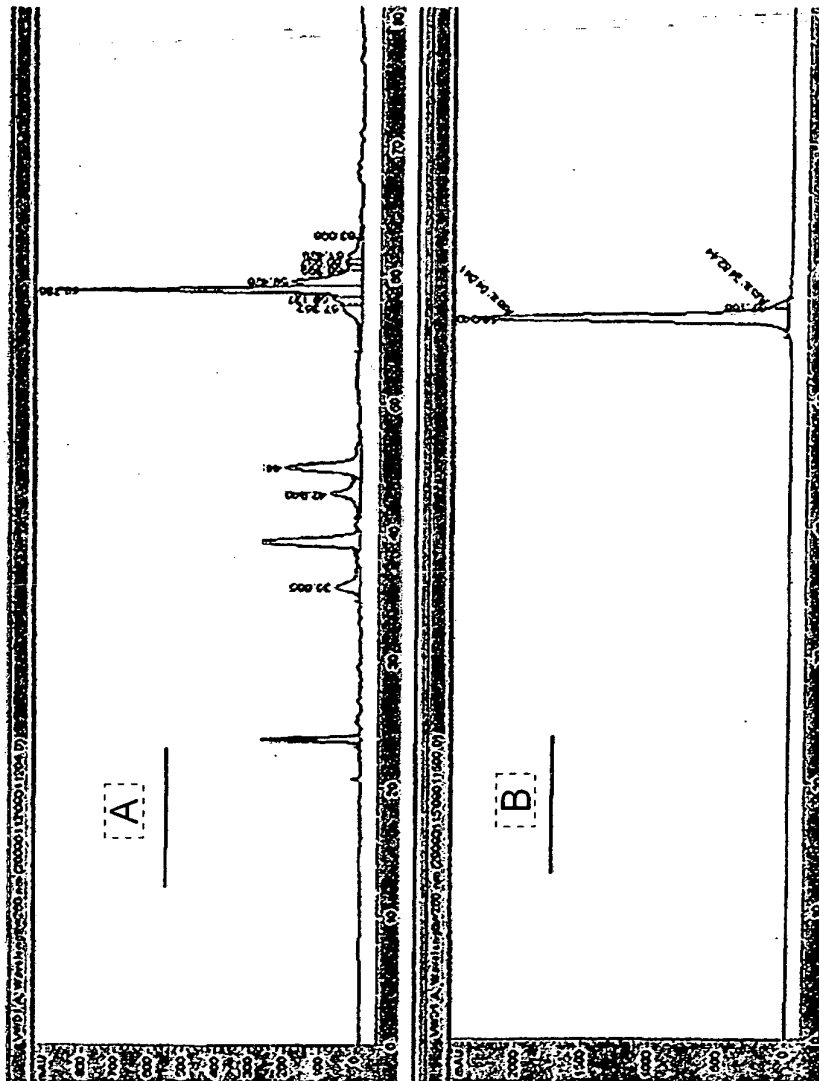


FIG. 1

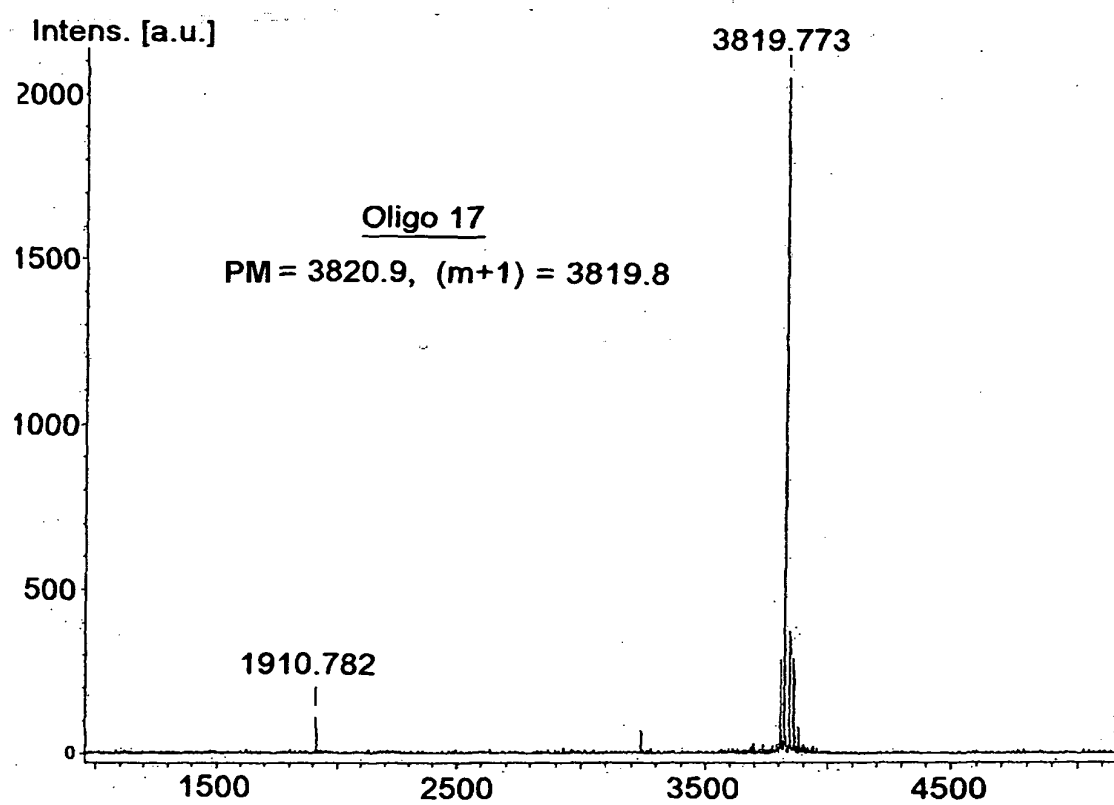


FIG.2

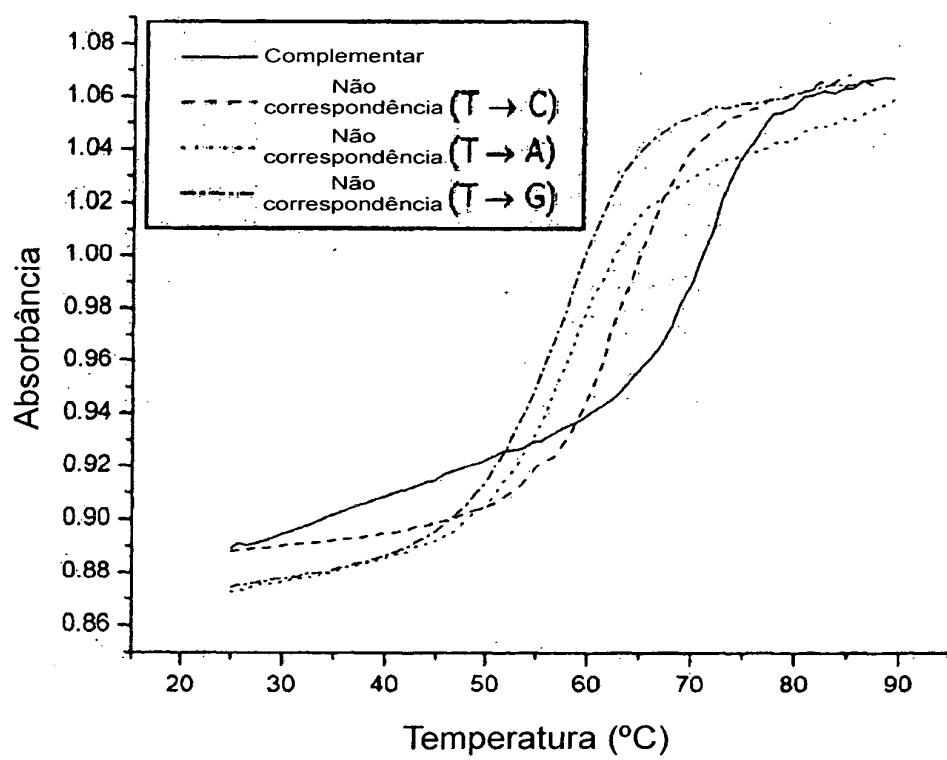


FIG.3

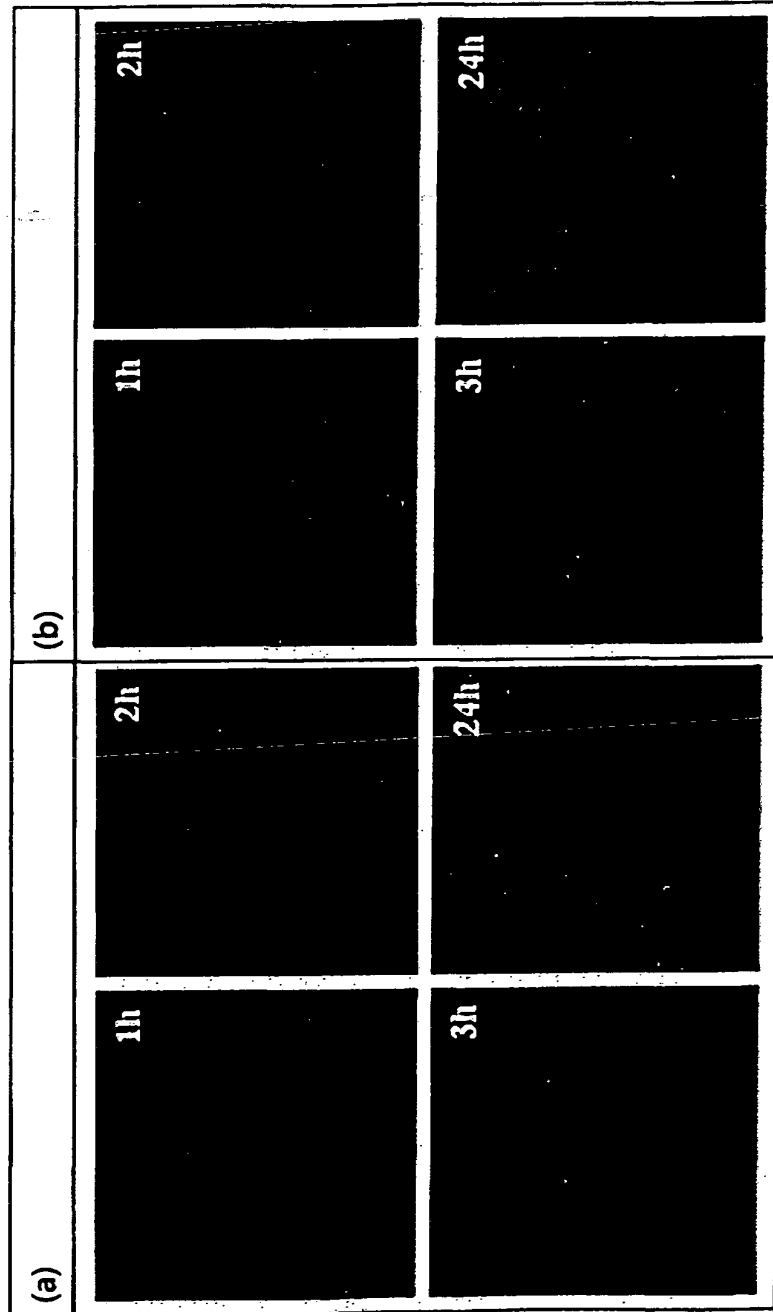


FIG.4

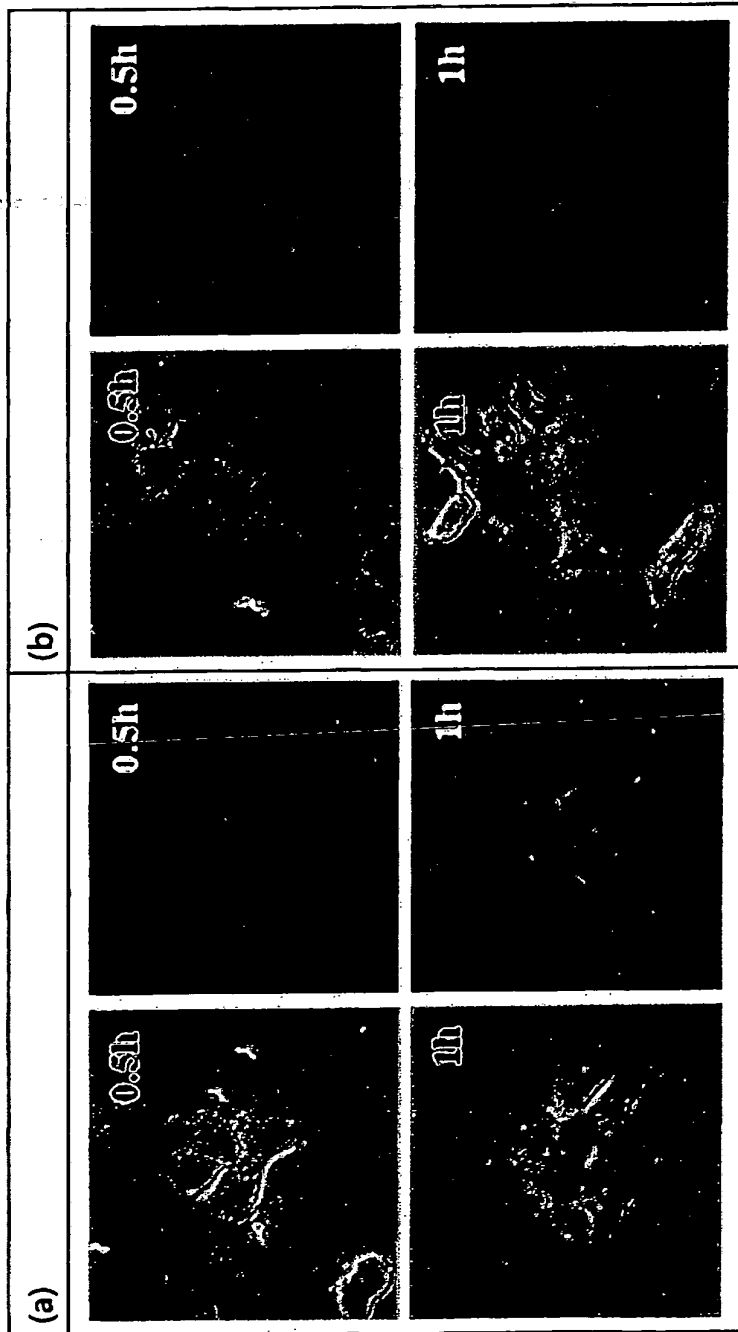


FIG.5

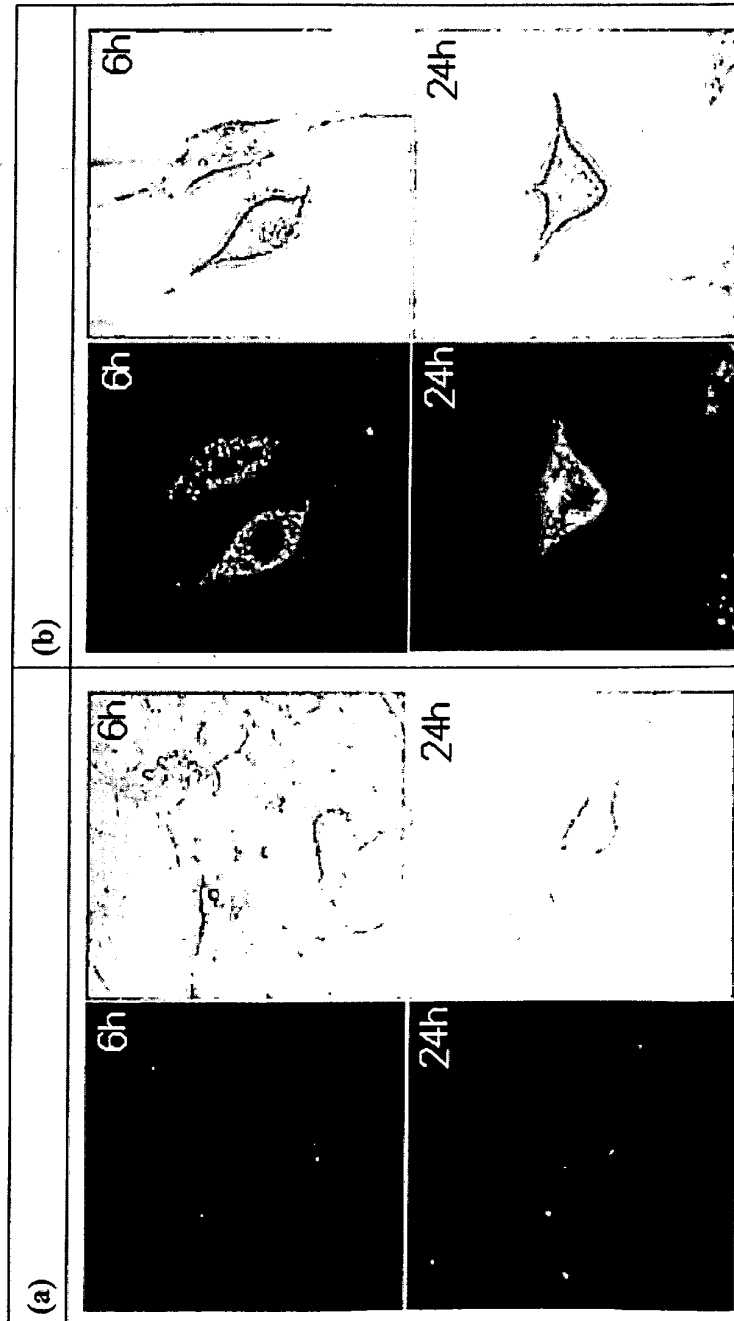


FIG.6

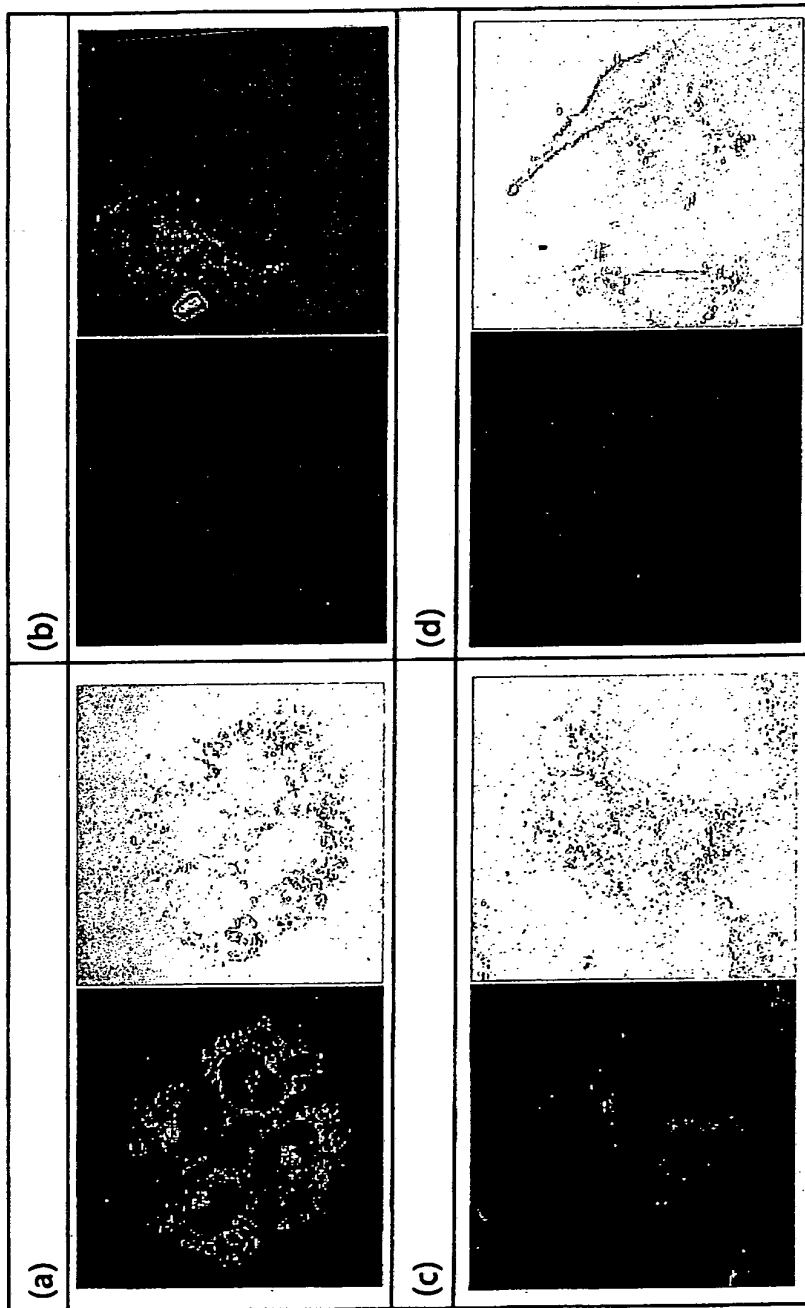


FIG.7

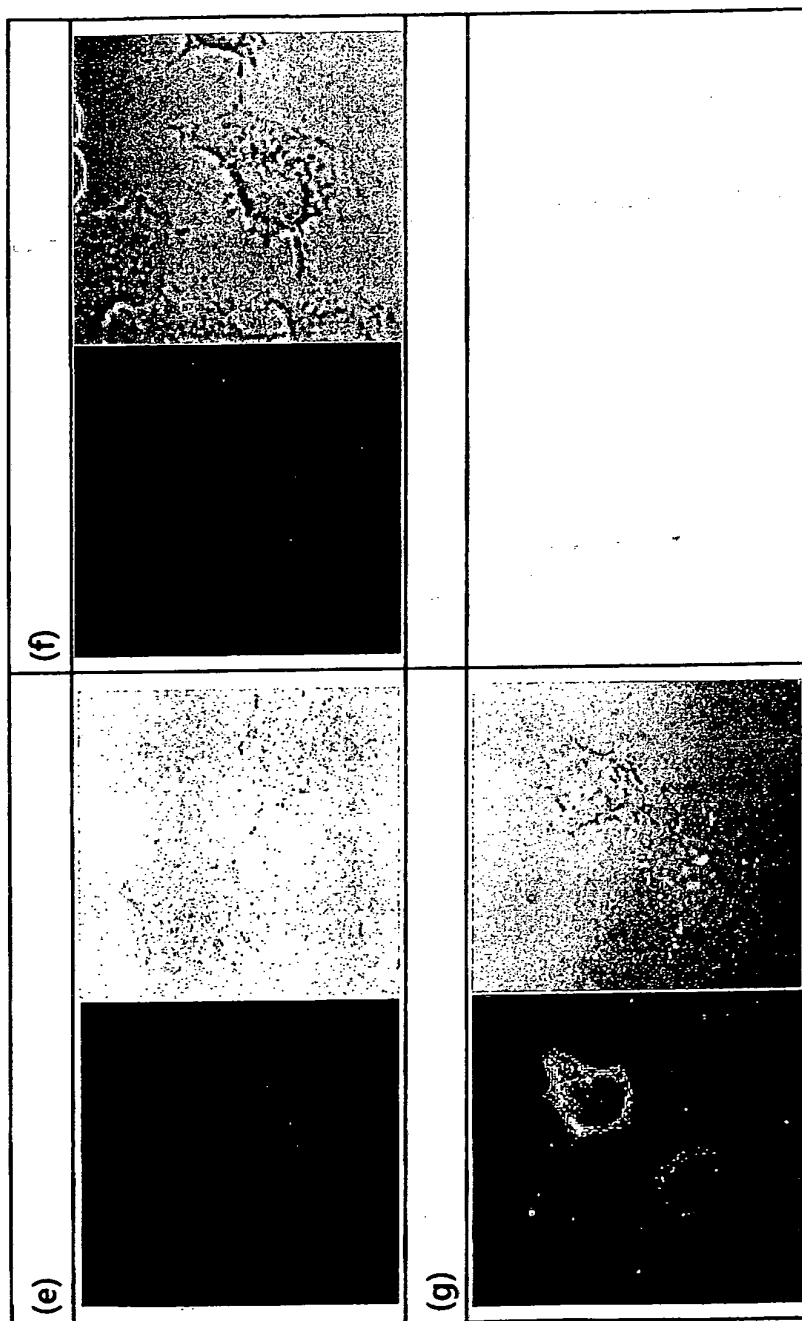


FIG.7
(Continuação da pagina anterior)

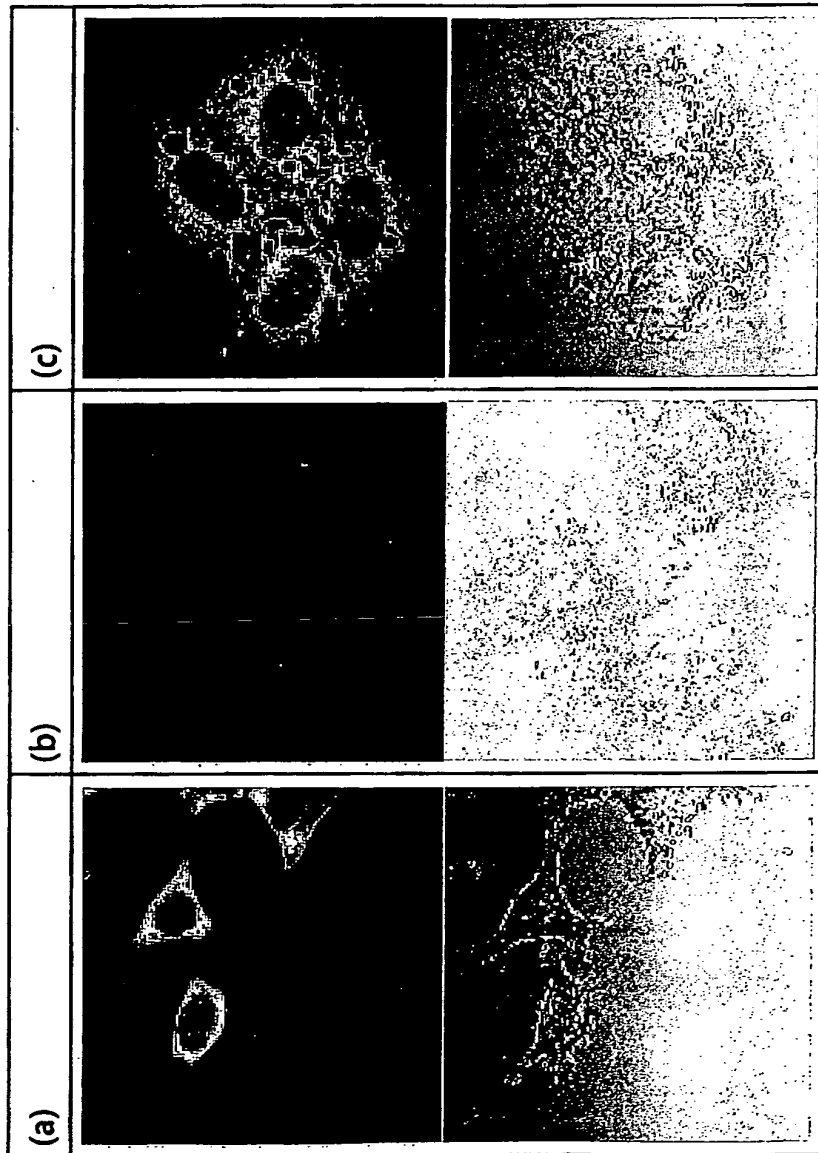


FIG.8

	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
mdm2									
Faixa	Oligo 12, μ M			Oligo 9, μ M			Observação		
1	0			0			Controle		
2	5			0					
3	0			5					
4	5			5					
5	Proteínas Marcadoras								
6	0			0			Controle		
7	10			0					
8	0			10					
9	10			10					

TABELA A

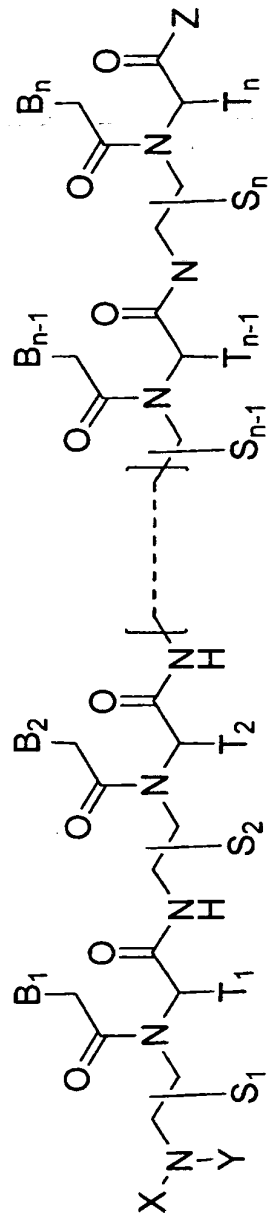


FIG.9