

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大類：
IPC分類：

A6
B6

本案已向：

德國(地區) 申請專利，申請日期：

西元二〇〇〇年四月十八日

案號：

10019135.5

，☒有 ☐無主張優先權

有關微生物已寄存於：

，寄存日期：

，寄存號碼：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

五、發明說明(1)

本發明係關於具有改進性質之羧基端及羧基/胺基端地磷酸化聚醯胺核酸(PNA)衍生物，其用途及製造彼之試劑與方法。

聚醯胺核酸亦稱為肽核酸(PNA)，相較於天然的寡核苷酸，彼可以較高的親和性結合至互補的目標序列(DNA 或 RNA)，此外，彼在血清中相較於天然的 DNA 非常穩定。PNA 最初被認為是非天然的核酸類似物，所有糖磷酸鹽骨幹均被 N-(2-胺基乙基)甘胺酸單位取代(M, Egholm et al, (1991) Science 254 1497-1500; WO 92/20702; M, Egholm et al, Nature ;1993) 365 566-568; P, Nielsen (1994) Bioconjugate Chem, 5, 3-7; E, Uhlmann et al,, (1998).Angewandte Chemie Int, Ed, Engl. 37, 2796-2823)。彼使用之鹼基為一般核苷酸化學的天然核鹼或非天然核鹼或前驅物僅能在體內經生物轉換途徑轉換成自由鹼基之前藥物形式。此外，另一種 PNAs 之骨幹上並非所有位置均帶有鹼基殘基(Greiner et al, ; 1999) Helv, Chim Acta 82'2151)，且其胺基乙基甘胺酸被更複雜的單位取代(Uhlmann et al, (1998) Angewandte Chem. Int, Ed, 37 2796; Falkiewicz (1999) Biochim, Pol, ' 46' 509-529)。

事實上，PNA 骨幹並不具任何淨電價是此類物質重要的特色，並有深遠的影響。事實上，PNA 可遵循 Watson-Crick 鹼基配對原則在低鹽濃度下結合至互補 DNA 及 RNA(例如參見 Peptide Nucleic Acids: Protocols and Applications; Peter E. Nielsen and Michael Egholm (Edit.) Horizon

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(2)

Scientific Press, 1999,3), 其係歸因於 PNA 的中性特性及降低相關於此之電價排斥作用。為此緣故, 使用天然的寡核苷酸或寡核苷酸衍生物之 PNA 在原則上可作許多應用。除了此之外, 因為獨特的結合性質, 彼可用於無法使用天然寡核苷酸的大量用途(參見, 例如: Peptide Nucleic Acids: Protocols and Applications; Peter E. Nielsen and Michael Egholm (Edit.) Horizon Scientific Press 1999)。例如可使用 PNA 股侵入雙股的 DNA。

PNA 的典型用途之實例包括經序列專一之方法結合至細胞的 DNA 或 RNA 以抑制基因表現。"反股試劑"為一種短而單股的核酸衍生物, 其可經 Watson-Crick 鹼基配對結合至互補的傳訊 RNA, 並抑制彼轉譯成對應的蛋白質(Uhlmann and Peyman (1990) Chem.Rev. 90, 543; Larsen et al. (1999) Biochem. Biophys. Acta 1489 159)。"抗-基因試劑"以 Hoogsteen 鹼基配對之方法結合至 DNA 雙螺旋主要的溝槽形成三螺旋, 以序列專一的方法抑制基因轉錄(Praseuth et al. (1999) Biochem. Biophys. Acta 1489 181)。基因表現亦可用模仿結合轉錄因子區域的誘餌寡聚物專一地抑制。用誘餌試劑處理, 可用序列專一的方法捕獲特定的轉錄因子並及抑制其轉錄之活化(Mischiati et al. (1999) J. Biol. Chem. 274 33114)。另一群作用在細胞(即嵌合原生質)內的寡核苷酸衍生物則可用於特定基因的校對(Cole-Strauss et al.(1996) Science 273 1386-1389)。

因此 PNAs 可作為藥劑及/或診斷劑或生產藥劑及/或診

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(3)

斷劑。

例如標記生物素、螢光素或其它標記之後，PNA 可用於診斷的目的並在分子生物學上作專一的雜交探針。目前在文獻上已記載四種引入標記基團之方法(Oerum et al.

5 (1999) in Peptide Nucleic Acids: Protocols and Applications, pages 81-86; Lohse et al. (1997) Bioconjugate Chem. 8

503)。第一種方法是合成自由(去除保護基)PNA 之後於溶液中進行標記。此方法中，將 PNA 之胺基端與活化的羧酸或異硫氰酸反應。此方法一般係在 PNA 中引入額外的離胺
10 酸殘基，然後此類殘基可與螢光素異硫氰酸(FITC)反應。

第二種方法是在固體相上將經保護的 PNA 在其胺基端上用活化的羧酸衍生物或異硫氰酸修飾。此方法僅適用於在 PNA 去保護及自支持物切除反應條件下穩定的標記基團。此二案例中宜使用的反應試劑均為異硫氰酸(P.

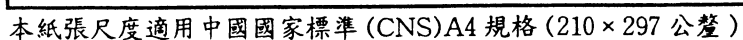
15 Wittung et al. (1995) FEBS Lett. 375, 27)及活化的羧酸，例如 N-羥基琥珀醯亞胺酯類(NHS)(Oerum et al. 1999)。反應中使用 NHS 衍生物的缺點是產率低。為此緣故，經常縮合 8-胺基-3,6-二氧雜辛酸作為介於 PNA 及標記基團之間的連結子或間隔(Oerum et al., 1999)。此二聯結之方法為醯胺
20 鍵結或硫脲鍵結，然而該鍵結易導致不溶解。此外，反應可使用一般肽化學的羧酸作為活化劑，例如 HBTU、TBTU 或 HATU。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

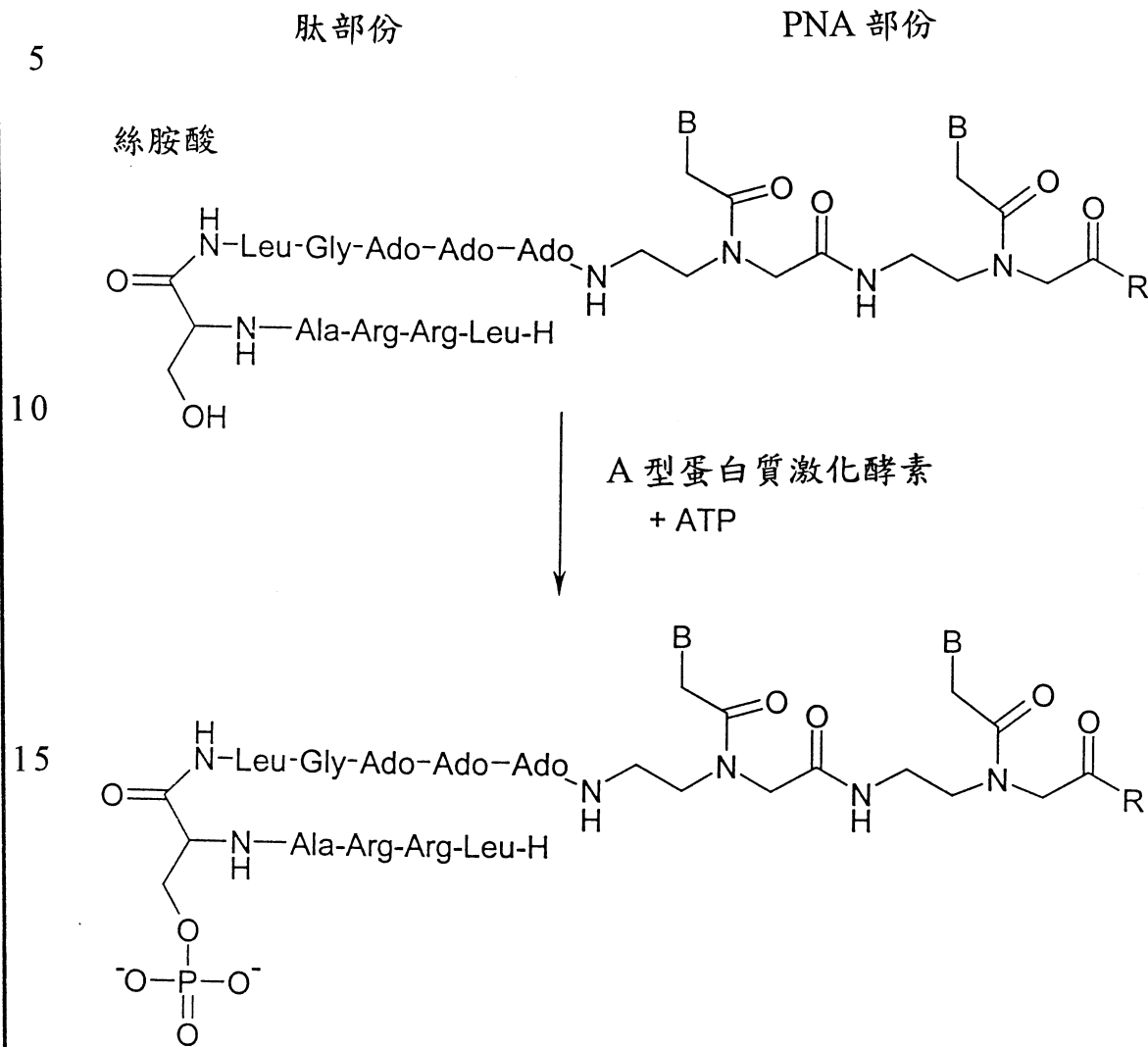
訂

5



五、發明說明(5)

殘基則被酵素磷酸化。當使用此方法時，僅可能引進放射性的磷酸鹽，而無法引入例如任何螢光素或生物素至 PNA-肽共軛聯結物之肽斷片。



目前已知在水溶液以及生理的條件中，PNA 有聚集之傾向。因此 PNA 在水溶性緩衝溶液中之溶解度低，因此無法與互補的序列雜交。此外，PNA 對用於純化寡聚物之各種材料，例如®Sephadex(產自 Pharmacia)、®Bond Elut(產

五、發明說明(6)

自 Varian)或各種 HPLC 色層分析材料具有高親和性，意即 PNA 分離之產率往往很低。因此 PNA 必須與離胺酸或其它正電價的胺基酸(經 C 端)共軛聯結(Egholm et al(1992) J. Am. Chem. Soc. 114, 1895)。富含鳥糞嘌呤之 PNA 序列有

- 5 特別的聚集傾向，因此最好不要使用該 PNA(參見 "Guidelines for sequence design of PNA oligomers" in Peptide Nucleic Acids: Protocols and Applications (1999) pages 253-255)。例如，相對長地標記螢光素的 PNA 寡聚物尤其是難於溶解，必須加入有機溶劑及加熱至 50℃ 才可
- 10 溶解。

難於溶解的親脂性 PNA 衍生物尤其是難於純化。由於 PNA 之聚集在 HPLC 中往往可偵測到數個吸收峰。一般用於純化及分離核酸之聚丙稀鹽胺(PAA)膠體電泳技藝往往不能分離此類 PNA 衍生物。

- 15 上述之 PNA 衍生方法中，標記基團均係與 PNA 衍生物形成鹽胺鍵結或硫鹽胺鍵結，並相對地難於溶解。尤其是當引入親脂的殘基(例如螢光素)，往往會形成難於溶解的 PNA 衍生物。在 PNA 二端插入標識之技藝則更困難且一般而言會導至更低之溶解度。此外在固相合成時，無高效率的方法同時的在胺基及羧基端衍生化 PNA。進一步的，
- 20 由於標記反應往往產率低，故須要一種高產率製作新穎的 PNA 衍生物之方法，並應展現有利的性質，例如改良溶解度、改良結合行為及較佳細胞的攝入，此外並可能的使用高效率的方法純化 PNA 寡聚物。依據本發明即可達成此目

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

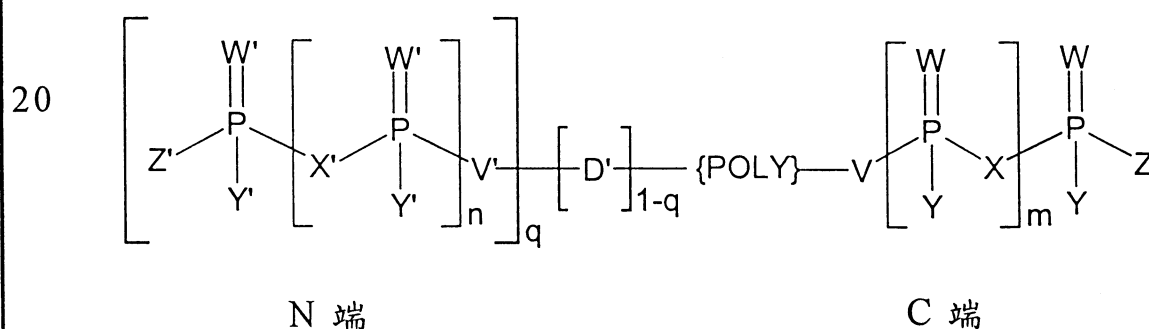
五、發明說明(7)

的，其製作的 PNA 衍生物在 PNA 骨幹之 C 端或 C 及 N 端帶有一個或多個磷醯基自由基，以及除了酮基磷醯基自由基之外亦可包括硫磷醯基自由基及亞胺基磷醯基自由基，及至少一個攜帶一個或多個可去質子基團(較佳者為羥基

5 基團或氫硫基基團)之磷醯基自由基。磷醯基自由基係聯結至 PNA 骨幹，其可經直接的氧磷鍵結、硫-磷鍵結或氮-磷鍵結或經間隔，例如：烷醯基醯胺、聚(烷氧基)羧醯胺或胺基酸。磷醯基自由基之實施例為磷酸鹽、磷酸鹽、硫磷酸鹽、二氧磷基醯胺及經取代的磷醯基自由基、經取代的磷醯基自由
10 基可攜帶適當的一個或多個標記基團、或交聯基團、或促進攝入細胞內的基團、或增加 PNA 衍生物對核酸結合親和性之基團。

因此，據瞭解標記基團其係為可定性的或定量的評估 PNA 衍生物化學或生物活性的基團，例如生物素或螢光
15 素。據瞭解交聯係為空間性的相鄰官能基形成分子內或分子間鍵結。交聯基團之實施例為補骨脂內酯基團。

本發明較佳者係關於式 I 之 PNA 衍生物



式 I

五、發明說明(8)

其中

q 為 0 或 1，

D' 為羥基、氫硫基、胺基、烷胺基或醯胺基，較佳者為乙醯胺基，

5 V 係相互獨立為：氧、硫、NR₁，

V' 係相互獨立為：氧、硫、NR₁，U-(CR₃R₄)_u-C(O)-NH 基團或 U-(CH₂CH₂O)_u-CH₂-C(O)-NH 基團，

U 係相互獨立為：氧、硫或 NH，

u' 係相互獨立為 1 至 10，較佳者為 1 至 4，尤佳者為 1，

10 W 及 W' 係相互獨立為：氧、硫或 NR₁，

Y 及 Y' 係相互獨立為：羥基、氫硫基、氧基陰離子、硫代酸酯或 NR₁R₂，

X 及 X' 係相互獨立為：U-(C₂-C₂₂-鏈烷二基)-U 基團或 U-(CH₂CH₂-O)_u 基團，

15 或為標記基團或交聯基團，或為促進細胞內的攝入之基團，或為增加 PNA 衍生物對核酸之結合親和力之基團，例如雙官能基螢光素、玫瑰紅、TAMRA、生物素、芘、二硝基苯基、膽固醇基、吡啶、金剛烷基、維生素 E、青色素染料、大西基(dabcyl)、伊登(edans)、理西多辛(lexitropsin)、補
20 骨脂內酯、BODIPY、ROX、R₆G 或狄氧寧(digoxigenin)自由基，

Z 及 Z' 係相互獨立為：羥基、氫硫基、氧基陰離子、硫代酸酯或 NR₁R₂、C₁-C₂₂-烷基、C₁-C₈-芳基烷基、

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(9)

C_1-C_{22} -烷基-U、 C_1-C_8 -芳基烷基-U、羥基- C_1-C_{18} -U、胺烷基-U 或氫硫基烷基-U，

或式 $R_7(CH_2CH_2-O)_m$ 基團，其中 R_7 為羥基、胺基或 C_1-C_{22} -烷氧基，及 m 為 1 至 100，較佳者為 2 至 10，

或為標記基團，或為交聯基團，或為促進攝入細胞內的基團，或為增加 PNA 衍生物對核酸結合親和性之基團，例如單官能的或雙官能的螢光素、玫瑰紅、TAMRA、生物素、芘、二硝基苯基、膽固醇基、吡啶、金剛烷基、維生素 E、青色素染料、大西基(dabcyl)、伊登(edans)、理西多辛(lexitropsin)、補骨脂內酯、BODIPY、ROX、 R_6G 或狄氧寧(digoxigenin)自由基，

R_1 及 R_2 係相互獨立，其係由氫或 C_1-C_6 -烷基組成，較佳者為氫，

R_3 及 R_4 係相互獨立，其係由氫、或 C_1-C_6 -烷基、或胺基酸側鏈之自由基組成，較佳者為氫，其可能與相鄰的 V' 之自由基 R_3 及 R_4 形成 C_5-C_8 -環烷基環，

n 為 0 至 10，較佳者為 0 至 3，

m 為 0 至 10，較佳者為 0 至 3，

其限制條件為至少一個 Y 、 Y' 或 Z 、 Z' 自由基為羥基、氫硫基、氧基陰離子或硫代酸酯。

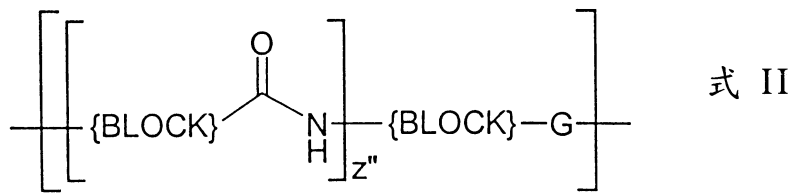
{聚}係如式 II 所述。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

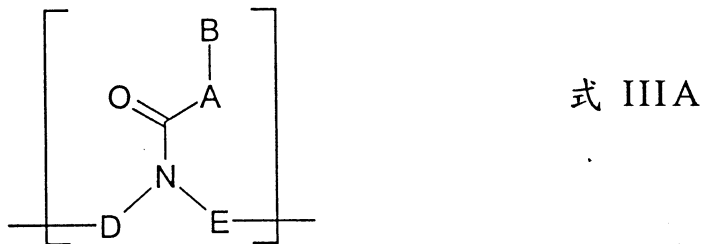
裝

訂

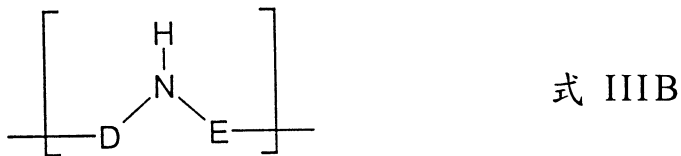
五、發明說明 (10)



5 其中 {嵌段} 係為相互獨立之基團，其係選自式 IIIA，

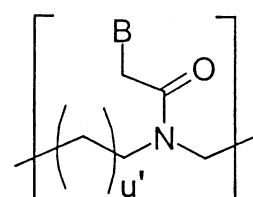
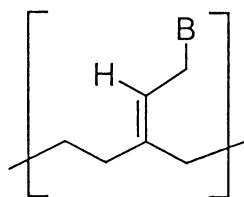
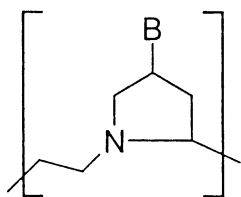
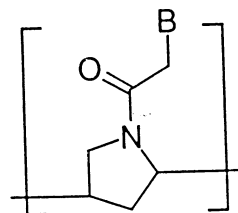
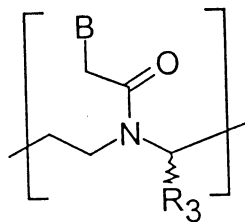
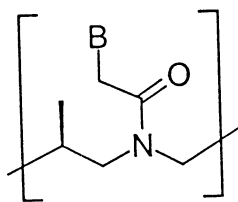


10 或式 IIIB (Greiner et al. (1999) Helv. Chim Acta 82'2151)，



或式 IV A 至 IV G (Uhlmann et al. (1998) Angewandte Chem.

15 Int. Ed. 37, 2796; Falkiewicz (1999) Biochim. Pol., 46, 509-529)，



20

式 IVA

式 IVB

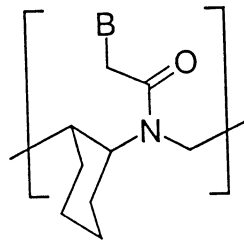
式 IVC

式 IVD

式 IVE

式 IVF

五、發明說明(11)



式 IVG

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

5

其中各{嵌段}之建構嵌段可不同，且

Z" 為 0 至 100，較佳者為 1-20，尤佳者為 4-15，

G 係選自 $(CR_5R_6)_{u'}$ 、 $C(O)NH-(CR_1R_2)_{t'}$ 或 $C(O)NH-$

$(CH_2CH_2O)_u$ 、 $-CH_2CH_2-$ ，其中 u' 之定義如上，且 t' 為 2

10 至 10，較佳者為 6，

A 係相互獨立為 $(CR_1R_2)_s$ ，其中 s 為 1 至 3，較佳者為 1，

B 係相互獨立為芳香族自由基，其可為雜芳香族，或氫，或羥基或 C_1-C_{18} -烷基，

或天然的核酸鹼基及一般化學的核苷酸，或非天然的核苷酸或其前藥物形式，

15

其限制條件為至少一個 B 自由基為核酸鹼基，

D 係相互獨立為 $(CR_3R_4)_t$ ，其中 t 為 2 至 10，較佳者為 2 至 4，尤佳者為 2，

E 係相互獨立為 $(CR_5R_6)_{u'}$ ，其中相鄰的 R_5 及 R_6 自由基亦可形成 C_5 -至 C_8 -環烷基環或螺化合物，

20

R_5 及 R_6 係相互獨立為氫或 C_1-C_6 -烷基，或胺基酸側鏈自由基，較佳者為氫，

及式 IPNA 衍生物在生理上耐受的鹽類。生理上耐受的鹽類描述於 Remingtons Pharmaceutical Science (1985) Mack

五、發明說明 (12)

Publishing Company, Easton, PA, USA, page 1418。較佳者為銨鹽、三烷基銨鹽類、鹼金屬鹽類(例如鈉鹽類及鉀鹽)及鹼土金屬鹽類(例如鎂鹽及鈣鹽類)。特佳者為鈉鹽類。

- 令人驚異的，引入磷醯基自由基，例如磷酸鹽或其它親脂性衍生化反應的形式(例如十六碳烷基二氧磷基二酯)可正性增加 PNA 對互補 DNA 或 RNA 之親和性效應。此效應可使 PNA 強烈的結合至互補 DNA 或 RNA，其係歸因於 PNA 之中性的特性，因此降低相關的電價排斥(例如 Peptide Nucleic Acids: Protocols and Applications; Peter E. Nielsen and Michael Egholm (Edit.) Horizon Scientific Press, 1999, 3)。

- 相較於對應的生物素化的 DNA 探針，經磷醯基自由基引入生物素尤其是有效的方法。當彼作為雜交探針時，生物素化的 PNA 式 I(X、X'、Z 及/或 Z' = 生物素自由基)具有較佳之結合性質及較少之假的、非專一的背景效應。

- 與未具電價的 PNA 相反，依據本發明式 I 之 PNA 衍生物亦可在電場中遷移，從而可能在固定化互補的核酸衍生物上將彼微定位及濃縮。針對多元陰離子的寡核苷酸使用此電場之方法已可快速地決定鹼基配對錯誤(Sosnowski et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94, 1119)。

依據本發明 DNA 衍生物上磷醯基自由基之羥基或氫硫基取代基可在酸鹼度 4.5 至 14，較佳者為 6.5 至 12，尤佳者為 6.5 至 9 之間去質子化。磷醯基自由基離子化能力的性質可有利地用於純化式 I 之化合物。式 I 之化合物可用

五、發明說明 (13)

電泳(例如聚丙烯醯胺凝膠電泳)純化。另一方面，亦可能使用陰離子交換器純化。在此案例中，所欲求之產物較佳者係使用鹽梯度溶析，例如氯化鈉梯度，或酸鹼度梯度。依據本發明式 I 之 PNA 衍生物可簡單地及有效地使用陰離子交換器純化。據發現無電價之副產品不會吸附在陰離子交換器上，而帶電價的產物會黏附在管柱上。於水清洗之後，使用乙酸或氯化鈉溶液可分離所欲求之純化產物。較佳之陰離子交換器為強烈的陰離子交換器或混合-模式相，例如®Oasis MAX(Waters GmbH, Eschborn)。

10 此外並發現依據本發明之式 I 化合物，一般而言較之不具有磷醯基自由基的對應之 PNA 寡聚物更易溶於水溶性介質。因此可明顯的大幅地改良親脂的衍生物，例如螢光素衍生物或十六碳烷基衍生物在水溶性介質中之溶解度。

本發明尤其係關於 PNA 衍生物，其 A 及 E 為 CH_2 。本發明進一步的更關於 PNA 衍生物，其取代基為 $(\text{CH}_2)_2$ 。較佳之 PNA 衍生物式 I，其 W 及 W' 為酮基，且 Y 及 Y' 為羥基或氧基陰離子，V 及 V' 為氧基自由基。

天然鹼的實施例為：腺嘌呤、胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、鳥糞嘌呤、胸腺嘧啶及尿嘧啶。非天然鹼的實施例為：嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、 N^4N^4 -乙橋胞嘧啶、 N^6N^6 -乙橋-2,6-二氨基嘌呤、5- $(\text{C}_3\text{-C}_6)$ -炔基尿嘧啶、5- $(\text{C}_3\text{-C}_6)$ -炔基胞嘧啶、5-(1-炔丙基胺基)尿嘧啶、5-(1-炔丙基胺基)胞嘧啶、啡啶、9-胺基乙氧基啡啶、5-氟尿嘧啶或假異胞嘧啶、5-(羥甲基)尿嘧啶、5-胺基尿嘧啶、假尿嘧啶、二氫尿嘧啶、

五、發明說明 (14)

5-(C₁-C₆)-烷基尿嘧啶、5-(C₁-C₆)-烷基胞嘧啶、5-(C₂-C₆)-烯基胞嘧啶、5-氟胞嘧啶、5-氟尿嘧啶、5-氟胞嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-溴胞嘧啶、7-去氮腺嘌呤、7-去氮鳥糞嘌呤、8-重氮嘌呤、及 7-去氮-7-經取代的嘌呤。

- 5 當 PNA 衍生物僅在 C 端(q 為 0)帶有磷醯基自由基時，其 N 端可聯結至肽序列。適當較佳的肽序列其可最適化 PNA 在器官或細胞的分佈，例如：傳導素(transportan)、類胰島素生長因子、細胞核的定位信號或其它載體序列 (Larsen et al. (1999) Biochim. Biophys. Acta 159-166)。肽
- 10 亦可為親和性標籤，例如(His)₆鏈。

本發明之 X、X'、Z 及 Z'自由基範圍寬廣(實施例如圖 1a、1b、2a、2b、3a 及 3b)，從而可對 PNA 引進不同特定的功能特色。

- 15 Z 或 Z'較佳的具體實施例為 C₁-至 C₂₂-烷基自由基。較佳者為 C₁-至 C₂₂-烷氧基自由基，尤其是 C₁₆-烷氧基自由基。其它較佳的自由基為羥基-(C₁-C₁₈-烷氧基)自由基，尤其是 HO(CH₂)₃₋₁₂O。較佳者為胺基烷氧基自由基，尤其是 6-胺基己氧基及 5-胺基戊氧基自由基。較佳者為式
- 20 R₇(CH₂CH₂-O)_m，其中 R₇ 為羥基、胺基或 C₁-C₂₂-烷氧基，較佳者為羥基，且 m 為 0 至 100，較佳者為 2 至 10。特佳者為 HO(CH₂CH₂-O)₂、HO(CH₂CH₂-O)₆ 及 H₂N-(CH₂CH₂-O)₂。其它 Z 或 Z'較佳的實施例包括氫硫基烷氧基自由基，尤其是 6-氫硫基己氧基。

另一個 Z 或 Z'較佳的實施例包含螢光基團，例如螢光

五、發明說明 (15)

素、玫瑰紅、TAMRA 或青色素染料。較佳的螢光基團可參見圖 1a 至 3b。特佳的 Z 為生物素。其它 Z 較佳的基團包括：大西基(dabcyl)、補骨脂內酯、吖啶、DNP 及膽固醇(圖 1b 及 2b)、BODIPY、ROX 或 R6G 自由基(Su-Chun Hung et al. (1998) Analytical Biochemistry 255, 32-38)及狄氧寧(digoxigenin)(Tarrason et al.' Methods in Enzyology (1999) Vol. 313, 257-268)。

除此之外，Z 或 Z'基團可為：單官能的或雙官能的螢光素、玫瑰紅、TAMRA、生物素、芑、二硝基苯基、膽固醇基、吖啶、金剛烷基、維生素 E、青色素染料、大西基(dabcyl)、伊登(edans)、理西多辛(lexitropsin)、或補骨脂內酯自由基。單官能的終端基團列於例如圖 1a、1b、2a 及 3a，而雙官能的橋聯基團列於圖 2b 及 3b。另一較佳的具體實施例中，n 及/或 m 係相互獨立為 0，即 PNA 部份在 N 及/或 C 端上各自僅帶有一個磷醯基自由基。

X 或 X'較佳的具體實施例為 $U-(C_2-C_{22}\text{-鏈烷二基})-U$ 。尤其是 $O(C_2-C_{22}\text{-鏈烷二基})-O$ ，尤佳者為 $O-(CH_2)_{2-6}-O$ 。X 或 X'另一較佳的具體實施例為式 $U-(CH_2CH_2-O)_u$ ，其中 u 為 1 至 10，較佳者為 1 至 6，及其中 U 較佳者為氧基。X 或 X'進一步的較佳的具體實施例包含螢光基團，例如螢光素、玫瑰紅、TAMRA 或青色素染料，例如®Cy3(產自 Amersham Pharmacia Biotech)。較佳的雙官能基可參見圖 2a 及 3a。特佳的 X 或 X'其係為生物素。其它較佳的基團為大西基(dabcyl)、補骨脂內酯、吖啶、DNP、膽固醇、

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(16)

BODIPY、理西多辛(lexitropsin)、狄氧寧(digoxigenin)、ROX 及 R6G 自由基。

式 I 中不同自由基 X、X'、Z 及 Z'可滿足不同之功能。長久以來螢光素自由基已用於 DNA 定序及信號放大或作為決定細胞攝入 PNA 的標識。青色素染料自由基(®Cy3 及®Cy5)實質上較之螢光素具有更強烈及持久的螢光信號。可使用補骨脂內酯自由基與互補的核酸交聯。吡啶自由基是有效的 intercalator 並可增強 PNA 之結合親和性。生物素、吡啶及補骨脂內酯衍生物亦可用於反股實驗。此外，十六碳烷基氧基及膽固醇衍生物可增加 PNA 穿越細胞膜之能力。DNP-標記的式 I 化合物可用抗-DNP 抗體偵測。胺基烷氧基自由基可偶合至其它基團，例如：理西多辛(lexitropsin)(參見實施例 17; PNA-16)。於相似的方法中，氫硫基烷氧基基團亦可進一步的用於衍生化反應。

本發明進一步的係關於使用式 I 之 PNA 衍生物作為藥品。此類藥品可預防及/或治療伴隨著特定基因表現或過度表現的疾病。本發明進一步的更關於使用 PNA 衍生物作為診斷劑。此類診斷劑可在早期階段診斷上述的疾病。當其作為藥品或診斷劑時，取決於其序列，式 I 之 PNA 衍生物可為反股試劑、抗-基因試劑、誘餌試劑及嵌合試劑。

依據本發明 PNA 衍生物尤其可用於生產藥品治療基因過度表現引起或造成之疾病。

此類藥品可以對應的病毒序列為目標，治療病毒(例如：CMV、人類免疫不全病毒、HSV-1、HSV-2、流行性感

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (17)

冒、VSV、B 型肝炎或乳頭狀瘤病毒)引起之疾病。

依據本發明具有對抗此類目標活性之反股 PNA 衍生物，其具有例如下列之鹼基序列：

a) 對抗 CMV，例如

5 序列認證號碼 1 5'-GCGTTTGCTCTTCTTCTTGCG-3'

b) 對抗人類免疫不全病毒，例如

序列認證號碼 2 5'-ACACCCAATTCTGAAAATGG-3'

序列認證號碼 3 5'-AGGTCCCTGTTTCGGGCGCCA-3'

10

c) 對抗 HSV-1，例如

序列認證號碼 4 5'-GCGGGGCTCCATGGGGGTCG-3'

該醫藥亦適用於例如治療癌症。此目的之下，較佳之序列係標定以及抑制關於致癌作用或癌症生長之端粒酵素(E. Matthes et al. (1999) Nucleic Acids Res. 27, 1152)。此特性之下，其他的目標為：

15

1) 細胞核的致癌蛋白質，例如：c-myc、N-myc、c-myb、c-fos、c-fos/jun、PCNA、p120，

20

2) 細胞質/細胞膜相關的於致癌蛋白質，例如：EJ-ras、c-Ha-ras、N-ras、rrg、bcl-2、cdc-2、c-raf-1、c-mos、c-src、c-abl、c-ets，

五、發明說明 (18)

3) 細胞受體，例如：EGF 受體、Her-2、c-erbA、VEGFc 受體(KDR-1)、類視黃素受體、蛋白質激酶調控的次單體、c-fms、Tie-2、craf-1 磷激酶、PKC- α 、及 A 型蛋白質激化酵素($R_1\alpha$)，

5

4) 細胞分裂素、生長因子及胞外基質，例如：CSF-1, IL-6、IL-1a、IL-1b、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、BFGF、VEGF、myeloblastin 及纖維結合素。

具有對抗此類目標活性之反股 PNA 衍生物，其具有例

10 如下列之鹼基序列：

a) 對抗 c-Ha-ras，例如

序列認證號碼 5 5'-CAGCTGCAACCCAGC-3'

序列認證號碼 6 5'-TATTCCGTCAT-3'

序列認證號碼 7 5'-TTCCGTCATCGCTCCTCAGGGG-3'

15

b) bFGF，例如

序列認證號碼 8 5'-GGCTGCCATGGTCCC-3'

c) c-myc，例如

20 序列認證號碼 9 5'-GGCTGCTGGAGCGGGGCACAC-3'

序列認證號碼 10 5'-AACGTTGAGGGGCAT-3'

d) c-myb，例如

序列認證號碼 11 5'-GTGCCGGGGTCTTCGGGC-3'

五、發明說明 (19)

e) c-fos, 例如

序列認證號碼 12 5'-CGAGAACATCATCGTGG-3'

序列認證號碼 13 5'-GGAGAACATCATGGTCGAAAG-3'

序列認證號碼 14 5'-CCCGAGAACATCATGGTCGAAAG-3'

5 序列認證號碼 15 5'-GGGGAAAGCCCGGCAAGGGG-3'

f) p120, 例如

序列認證號碼 16 5'-CACCCGCCTTGGCCTCCCAC-3'

10 g) EGF 受體, 例如

序列認證號碼 17 5'-GGGACTCCGGCGCAGCGC-3'

序列認證號碼 18 5'-GGCAAACCTTTCTTTTCCTCC-3'

h) p53 腫瘤抑制物, 例如

15 序列認證號碼 19 5'-GGGAAGGAGGAGGATGAGG-3'

序列認證號碼 20 5'-GGCAGTCATCCAGCTTCGGAG-3'

i) bc1-2, 例如

序列認證號碼 21 5'-TCTCCCAGCGTGCGCCAT-3'

20

k) VEGF, 例如

序列認證號碼 22 5'-GCGCTGATAGACATCCATG-3'

序列認證號碼 23 5'-GGAGGCCCGACC-3'

序列認證號碼 24 5'-GGTTTCGGAGGC-3'

五、發明說明 (20)

序列認證號碼 25	5'-TGGTGGAGGTAG-3'
序列認證號碼 26	5'-GCATGGTGGAGG-3'
序列認證號碼 27	5'-TTGGCATGGTGG-3'
序列認證號碼 28	5'-GCCTGGGACCAC-3'
5 序列認證號碼 29	5'-CAGCCTGGGACC-3'
序列認證號碼 30	5'-TGCAGCCTGGGA-3'
序列認證號碼 31	5'-GTGCAGCCTGGG-3'
序列認證號碼 32	5'-GGTGCAGCCTGG-3'
序列認證號碼 33	5'-ATGGGTGCAGCC-3'
10 序列認證號碼 34	5'-GGCTTGAAGATG-3'
序列認證號碼 35	5'-GCAGCCCCCGCA-3'
序列認證號碼 36	5'-GCAGCAGCCCCC-3'

I) c-raf 磷激酶，例如

15 序列認證號碼 37	5'-TCCCGCCTGTGACATGCATT-3'
--------------	----------------------------

m) PKC- α ，例如

序列確認號碼 38	5'-GTTCTCGCTGGTGAGTTTCA-3'
-----------	----------------------------

20 n) A 型蛋白質激化酵素，例如

序列認證號碼 39	5'-GCGTGCCTCCTCACTGGC-3'
-----------	--------------------------

包含式 I PNA 衍生物之藥品可進一步的適用於治療經整合蛋白或細胞-細胞黏著受體，例如：VLA-4、VLA-2、ICAM、VCAM 或 ELAM 引起的疾病。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (21)

具有對抗此類目標活性之反股 PNA 衍生物，其具有例如下列之鹼基序列：

a) VLA-4，例如

序列認證號碼 40 5'-GCAGTAAGCATCCATATC-3'

5

b) ICAM-1，例如

序列認證號碼 41 5'-GCCCAAGCTGGCATCCGTCA-3'

序列認證號碼 42 5'-CCCCCACCCTTCCCCTCTC-3'

序列認證號碼 43 5'-CTCCCCCACCCTTCCCCTCTC-3'

10 序列認證號碼 44 5'-GCTGGGAGCCATAGCGAGG-3'

c) ELAM-1，例如

序列認證號碼 45 5'-ACTGCTGCCTCTTGTCTCAGG-3'

序列認證號碼 46 5'-CAATCAATGACTTCAAGAGTTC-3'

15

d) 整合蛋白 α (V)，例如

序列認證號碼 47 5'-GCGGCGGAAAAGCCATCG-3'

包含式 I 之 PNA 衍生物的藥品並適用於預防(例如)再狹窄症。此目的下，可使用對抗增殖或遷移目標之 PNA 序列。該目標之實施例為：

20

1) 細胞核的反式活化蛋白及周期素，例如：c-myc、c-myb、c-fos、c-fos/jun、周期素及 cdc2 磷激酶。

2) 有絲分裂原或生長因子，例如：PDGF、BFGF、VEGF、EGF、HB-EGF 及 TGF-R。

五、發明說明 (2)

3) 細胞受體，例如：bFGF 受體、EGF 受體及 PDGF 受體。

具有對抗此類目標活性之反股 PNA 衍生物，其具有例如下列之鹼基序列：

a) c-myb，例如

5 序列認證號碼 48 5'-GTGTCGGGGTCTCCGGGC-3'

b) c-myc，例如

序列認證號碼 49 5'-CACGTTGAGGGGCAT-3'

10 c) cdc2 磷激酶，例如

序列認證號碼 50 5'-GTCTTCCATAGTTACTCA-3'

d) PCNA(老鼠增殖細胞細胞核的抗原)，例如

序列認證號碼 51 5'-GATCAGGCGTGCCTCAAA-3'

15

PNA 衍生物可同樣地用於治療白斑及其它去色素的疾病或去色素的功能障礙(例如皮膚、毛髮及眼睛)，例如：白化病及牛皮癬，或治療氣喘，其係使用適當的反股試劑抑制腺嘌呤核苷 A1 受體、腺嘌呤核苷 A3 受體或緩動素受體、或 IL-13 之表現。

20

該鹼基序列之實施例為：

序列認證號碼 52 5'-GATGGAGGGCGGCATGGCGGG-3'

包含式 I 之 PNA 衍生物的藥品可為醫藥學製劑的形式，其可口服投用，例如為：藥片、塗覆藥片、硬或柔軟

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (23)

明膠膠囊、溶液、乳狀液或懸浮液形式。彼亦可直腸投用，例如為栓劑形式，或經腸投用，例如為注射溶液形式。為了產生醫藥學的製劑，此類化合物可含治療上惰性之有機及無機賦形劑。該藥片、塗覆的藥片及硬明膠膠囊賦形劑之實施例為乳糖、玉米澱粉或其衍生物、獸脂及硬脂酸或其鹽類。製備溶液時適當的賦形劑為水、多元醇、蔗糖、左旋糖及葡萄糖。注射溶液中適當的賦形劑為水、醇類、多元醇、甘油及植物油。栓劑中適當的賦形劑為植物油及氫化油、蠟、脂肪及半液體多元醇。醫藥學的製劑亦可包含防腐劑、溶劑、穩定劑、溼化劑、乳化劑、甜劑、染料、風味劑、改變滲透壓及之鹽類、緩衝溶液、塗覆試劑、抗氧化劑及適當的其它治療上活性之化合物。較佳的投藥形式為塗覆的施用、局部的施用，例如使用導管或經吸入方式投用之注射劑或注入物及口服之投藥。注射時，式 I 之 PNA 衍生物可調製成液體溶液，較佳者為生理上可接受的緩衝溶液，例如 Hank's 溶液或林格氏溶液。然而寡核苷酸亦可調製成固體形式並在使用之前溶解或懸浮。全身投藥較佳的劑量每天約 0.01 毫克/公斤至約 50 毫克/公斤體重。

除了醫藥學上相容之賦形劑及/或添加劑之外，本發明進一步的係關於包含式 I 之 PNA 衍生物及/或其生理上耐受的鹽類醫藥學的製劑。式 I 之 PNA 衍生物及/或其生理上耐受的鹽類可投用至動物，較佳者投用至哺乳動物，及尤其是人類，藥品可相互混合，或以醫藥學製劑的形式經由皮膚的、非經腸的或經腸的路徑塗覆的使用，醫藥學製

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (24)

劑可包含活化的組份、至少一種 PNA 衍生物之有效的劑量與一般醫藥學上相容的賦形劑及添加劑。製劑通常包含約 0.1 至 90% 治療上之活性化合物(以重量計)。治療皮膚疾病時，塗覆的施用途，例如以藥膏、塗劑或酊劑、乳狀液或

5 懸浮液的形式為較佳。

醫藥學製劑可用本身習知的方法(例如 Remingtons Pharmaceutical Sciences, Mack Publ. Co., Easton, PA.)與醫藥學上惰性無機及/或有機的賦形劑共同製作。可能例如使用乳糖、玉米澱粉及/或其衍生物、獸脂、硬脂酸及/或其鹽類等產生藥丸、藥片、塗覆的藥片及硬明膠膠囊。柔軟明膠膠囊及/或栓劑中賦形劑之實施例為脂肪、蠟、半固體及液體多元醇、天然的及/或氫化油等。產生溶液及/或糖漿時適當的賦形劑為，例如水、蔗糖、左旋糖、葡萄糖、多元醇等。產生注射溶液時適當的賦形劑為水、醇類、甘油、多元醇、植物油等。產生微膠囊植入物及/或棒狀物時適當的賦形劑為乙醇及乳酸組成之共聚物。

10

15

熟悉此技藝的專業人士所習知脂球體製劑(N. Weiner, Drug Develop Ind Pharm 15 (1989) 1523; "Liposome Dermatics' Springer Verlag 1992)，例如 HVJ 微脂粒 (Hayashi, Gene Therapy 3 (1996) 878)亦為適當之製劑。亦可使用真皮施用，例如使用離子載體的方法及/或使用電穿透作用。

20

除了活性化合物及賦形劑之外，醫藥學的製備亦可含有添加劑，例如填充劑、增量劑、崩解劑、結合劑、滑動劑、

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (25)

溼化劑、穩定劑、乳化劑、防腐劑、甜劑、染料、風味劑或香味劑、黏稠劑、稀釋劑及緩衝物質，及其它溶劑及/或溶解劑及/或試劑達成延釋之效應，塗覆試劑及/或抗氧化劑中亦可使用改變滲透壓之鹽類。彼亦可包含兩種或多

- 5 種不同之式 I 的 PNA 衍生物及/或其生理上耐受的鹽類，除了至少一個式 I 之 PNA 衍生物之外，亦可使用一個或多個不同的治療活性物質。劑量變化範圍寬廣，可視個別地情況各別地調整。

- 本發明進一步更係關於使用式 I 之 PNA 衍生物作為診
10 斷劑，尤其是進行愛滋病之 DNA 及分子生物學診斷(參見，例如：Peptide Nucleic Acids: Protocols and Applications; Peter E. Nielsen and Michael Egholm (Edit.) Horizon Scientific Press, 1999)。在 DNA 診斷中，基因探針(亦稱為 DNA 探針或雜交探針)在序列專一的偵測特定的基因上扮
15 演一個重要的角色。一般而言，基因探針由辨視序列及一個或多個適當的標記基團組成。目標序列對分析樣品的專一性係經互補的基因探針雜交測定辨視序列及化學結構而加以確認。此技藝亦可施用至 PNA。相較於具有天然的結構之寡核苷酸，PNA 之優點是對目標序列具有較高的親和
20 性，並有較大之能力區別鹼基。

因此使用式 I 之化合物亦關於原位雜交及螢光原位雜交。原位雜交亦可用於例如偵測微生物及病毒(Just et al. (1998) J. Vir. Method. 73, 163-174)。本發明化合物之另一用途係關於偵測及定量核酸。在此用途之下，較佳者亦可

五、發明說明 (26)

應用排列技藝 (Strother et al. J. Am. Chem. Soc. (2000) 122, 1205-1209; Niemeyer et al., Angew. Chem. (1999) 111, 3039-3043; Pirrung (1997) Chem. Rev. 97, 473-488), 提供高樣品單位時間完成量及高敏感度。在此案例', 可將 PNA 探針固定在適當的支持物或 PNA 晶片上。因此可將 PNA 依據描述於實施例之方式合成及接著固定在支持物或 PNA 晶片上。此外, PNA 可直接的製備在支持物上。另一用途係使用式 I 之化合物作為生物感應器偵測核酸 (Wang et al (1996) J. Am. Chem. Soc. 118' 7667)。另一用途係使用具有親和性標的記式 I 之 PNA (例如組胺鹽基-PNA) 純化核酸 (Oerum et al. (1999), in Peptide Nucleic Acids: Protocols and Applications)。

胺基端及羧基端上二種磷鹽基自由基可滿足不同功能。例如胺基端可經親脂性基團取代以增加細胞攝入, 羧基端可為螢光素殘基進行改良細胞攝入後之偵測 (參見實施例 7 之 PNA-6)。

式 I 之雙重衍生的化合物亦適用於作為所謂的 "molecular beacons" (Li et al. (2000) Angew. Chemie 112, 10911094), 彼係僅於相關聯的結合至互補的核酸後發出螢光信號。在此類 燈標 s 中 PNA 之一端, 例如胺基端, 可提供螢光標記而另一端, 例如羧基端, 可提供淬熄劑。在相反的例子中, N 端可帶有淬熄劑, C 端可帶有螢光標記。只要雙重標記的 PNA 衍生物不結合至互補的核酸即無螢光信號。僅在相關聯的結合螢光殘基 (例如伊登 (edans)) 及

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

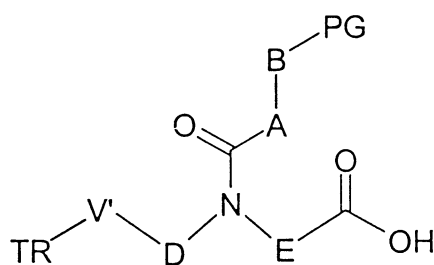
訂

五、發明說明 (27)

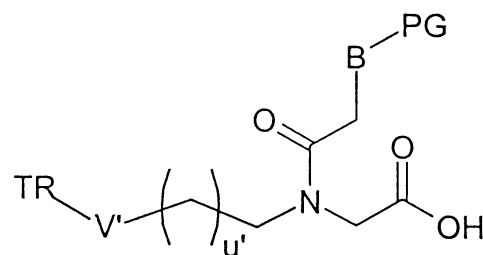
淬熄劑(例如 dabcyl)時才可因空間性的相互分離而造成發出之螢光信號(Sokol et al.(1998) Proc. Natl. Acad. Sci. 95, 11538)。

合成 PNA 骨幹使用之方法已描述於文獻，例如使用第三丁基氧基羰基(BOC)、9-芴基甲氧羰基(Fmoc)或單甲氧基三苯甲基(Mmt)保護基團之策略(Peptide Nucleic Acids: Protocols and Applications; Peter E. Nielsen and Michael Egholm (Edit.) Horizon Scientific Press, 1999)。較佳者係使用 Mmt 保護基團暫時保護胺基乙基甘胺酸之胺基功能基以及鹼不穩定的保護基團保護雜環基的核鹼(D. Will et al. (1995) Tetrahedron 51, 12069; Breipohl et al. (1997) Tetrahedron 53, 14671-14686)。建構嵌塊單體的實施例為式 V 至 V D 之化合物，其中 A、B、D、E、u' 及 V' 之定義如上。PG 是胺基-保護基團，例如苯甲醯基、大茴香甲醯基-、異丙醯基-、乙醯基-或第三丁基苯甲醯基(Breipohl et al.(1997) Tetrahedron 53, 14671-14686)。TR 是酸不穩定的保護基團，例如二甲氧基三苯甲基(Dmt)(V' = O 及 S)或 Mmt(V' = NH)。

20



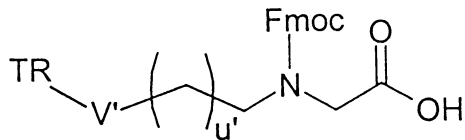
式 V



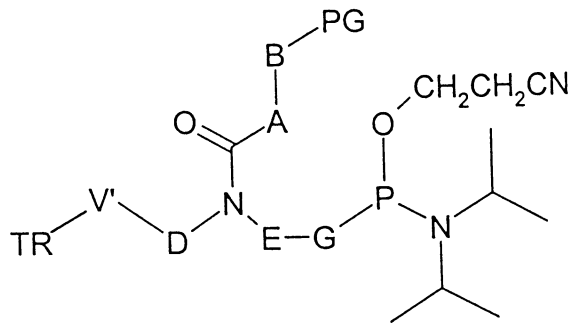
式 VA

五、發明說明 (²⁸)

5

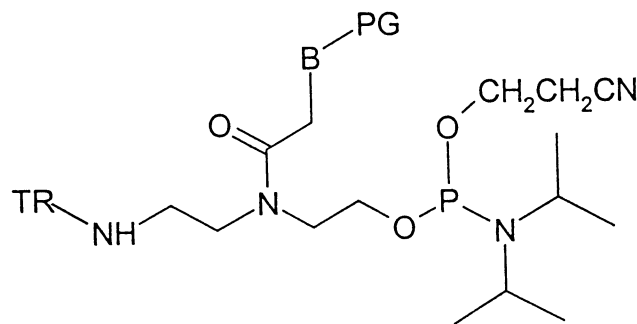


式 VB



式 VC

10



式 VD

於構築 PNA 骨幹之後，N 端之自由胺基官能基可直接的與
 15 適當的磷醯化試劑反應，例如以生成對應的磷光劑醯胺 ($V' = NR_1$ ，式 I)。

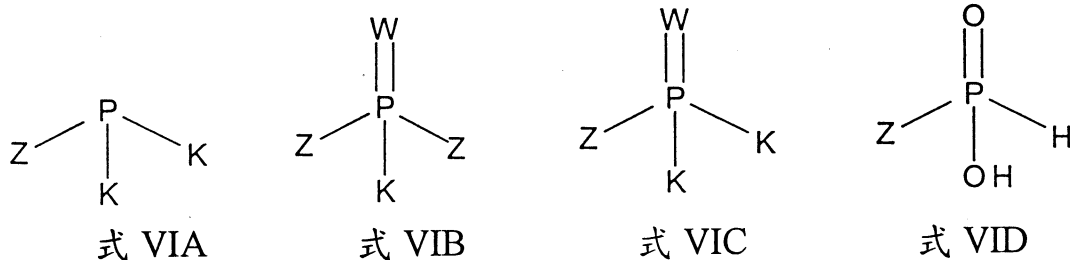
可使用核苷酸化學慣常使用地試劑引入磷醯基自由
 基。許多磷醯化試劑可用於製備式 I 之化合物。試劑之選
 擇如圖 4a 至 4d，然而本發明並不受限制於此類特別的衍
 20 生物。適當地經修飾的支持物，尤其是 CPG 支持物可用於
 固相合成時羧基端之修飾。該支持物之實施例列於圖 6。

可使用一般核苷酸化學的磷醯化試劑 (Glen Research
 Corporation, Sterling, VA 20164, U.S.A.; Figures 4a to 4d)
 進行反應，例如依據胺磷酸方法、H-膦酸鹽方法或二氧磷

五、發明說明 (29)

基三酯方法(E. Sonveaux (1986) Bioorganic Chemistry 14, 274; S.L. Beaucage and R.P. Iyer (1993) Tetrahedron 49, 1925; E. Uhlmann and A. Peyman (1990) Chem. Rev. 90, 543)。許多可能的修飾可用許多習知的磷醯基化試劑及適當地衍生的支持物測定，尤其是控制孔隙玻璃(CPG)支持物。®TentaGel(產自 Rapp Polymer GmbH, Tübingen)，胺基甲基聚苯乙烯亦為較佳之固體支持物。

基本上核苷酸化學上習知的試劑均適用於引入磷醯基官能基，尤其是下列適當的式 VIA、VIB、VIC 及 VID 試劑



其中 K 為鹵素，較佳者為 Cl、三唑基、咪唑基或二烷胺基，W 之定義如上或如同 W'，Z 之定義如上或如同 X、X' 或 Z'，反應性的基團可經適當保護。

例如，螢光素-胺磷酸 3 之羥基基團(圖 4a)可經叔戊酸酯化加以保護。

式 VI 之化合物僅為該試劑之實施例，視須要可加入適當的其它輔助試劑例如鹼、酸或縮合試劑反應。較佳之試劑為式 VIA，其可依據胺磷酸方法(Beaucage and Iyer, 1993)反應。此類試劑可如同磷(III)化合物般進行反應，接著氧化。若例如氧化反應係使用碘/水/吡啶或第三丁基過氧化

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (30)

物進行，則得到磷醯基衍生物($W = O$)。另一方面若氧化反應係使用元素硫或 Beaucage 試劑進行，則得到對應的硫磷醯基化合物($W = S$)。

在試劑(圖 4a 至 4d)之中，亦可發現"雙官能基試劑"，

- 5 因為具有最初經保護的第二官能基，故可反應數次。胺磷酸 4、6 及 8 至 13 為該雙官能基試劑的實施例。因此試劑可與物質進行多重結合作用或與不同試劑進行其它後續的反應。如此，螢光素胺磷酸 3 只能反應一次。但螢光素-胺磷酸 4 因具有經保護的羥基官能基之 Dmt 基團故可於
- 10 Dmt 基團消除之後再次與磷醯化試劑反應。此方法之下，可能引進一個相同的基團或其它不同基團數次。PNA-6 是在羧基端進行多重結合作用之實施例並可額外的修飾胺基端。螢光素及胺基連結子可先在羧基端依序合成。PNA 部份合成之後，將羥基乙基甘胺酸-t 建構嵌段在最後週期進行
- 15 行耦合，此建構嵌段其係與 C_{16} -磷醯化試劑 7 反應。PNA-1 及 PNA-2 為式 I 之化合物，其在羧基端僅用磷醯基自由基修飾($q = 0$)。此類物質同樣地為新穎的物質且為本發明之一部分。圖 5a 及 5b 顯示一些此類 N-端修飾後之式 I 化合物之實施例。A 型化合物係將本文 PNA 之羥基基團與磷酸
- 20 化試劑(試藥) 1 反應後得之。B 型化合物係將本文 PNA 之胺基基團與生物素-胺磷酸 5 反應後得之。C 型化合物係將本文 PNA 之末端的羥基基團依序與間隔 18、胺磷酸 9、胺基修改劑-5、胺磷酸 12 及理西多辛(lexitropsin)反應後得之。D 型化合物係將本文 PNA 之末端的羥基基團依序與間

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (³¹)

隔-9、胺磷酸 8 及青色素-3、胺磷酸 10 反應後得之。E 型化合物係將本文 PNA 之末端的羥基基團依序與雙官能基的螢光素胺磷酸 4、間隔-9、胺磷酸 8、及 C₁₆ 磷醯化試劑 7 反應後得之。必須額外地進行之步驟，例如氧化反應及
5 除去保護基團則描述於實施例。

經修飾 PNA 羧基端之實施例係使用胺磷酸(式 VD)，描述於圖 7。在此案例中，起始材料為雙羥基乙基砒支持物 I(圖 6)，用 3%三氯乙酸消除 Dmt 基團之後，使用四氮唑作為催化劑與胺磷酸式 VD 反應。於碘水氧化之後，用 3%
10 三氯乙酸消除胺基端 Mmt 基團，然後使用文獻中習知的方法合成 PNA 部份，例如使用說明於下之 Mmt 方法。另一修飾羧基端之方法係使用 CPG 支持物，其可依據引入之自由基進行修飾的為，因而含有螢光素自由基，例如(圖 8)。此方法將說明於 PNA 衍生物之實施例，其係用十六碳烷基
15 磷酸鹽自由基修飾胺基端，用螢光素磷酸鹽修飾羧基端。先將螢光素支持物 3(圖 6)全部用三氯乙酸去三苯甲基化，然後使用四氮唑以胺基修改劑 C₆ 胺磷酸 13(圖 4d)縮合。於碘水氧化之後排除 Mmt 基團，PNA 部份則可使用一般的方法合成。在最後週期，於排除 Dmt 保護基團之後，使
20 用 C₁₆ 磷醯化試劑 7 耦合羥基乙基甘胺酸為底質的 PNA 建構嵌段(式 VA，u' = 2，V' = 氧)，此建構嵌段之反應如展示於圖 9。得到雙重修飾的 PNA 衍生物之後，排除所有之保護基團並切斷 CPG 支持物。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

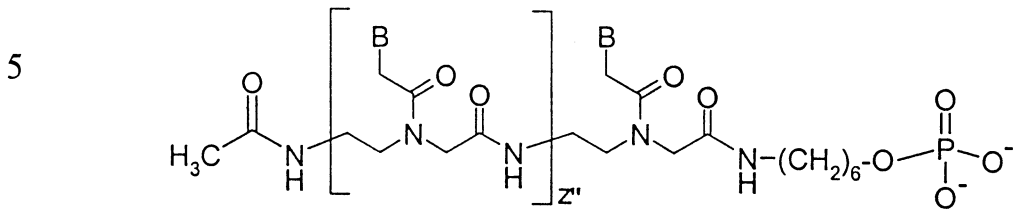
裝
訂

五、發明說明 (32)

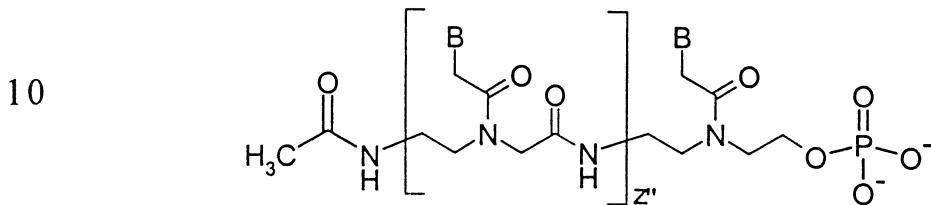
實施例：

製備下列之化合物：

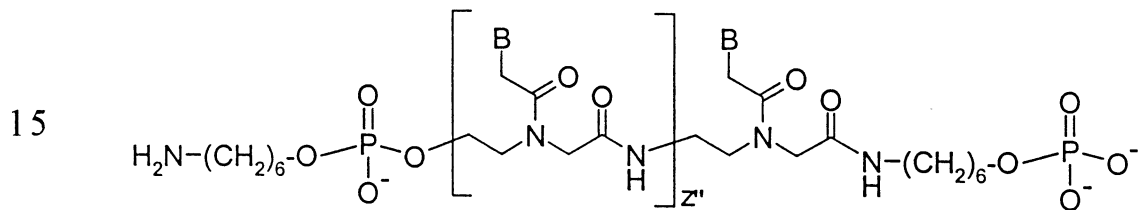
PNA-1:



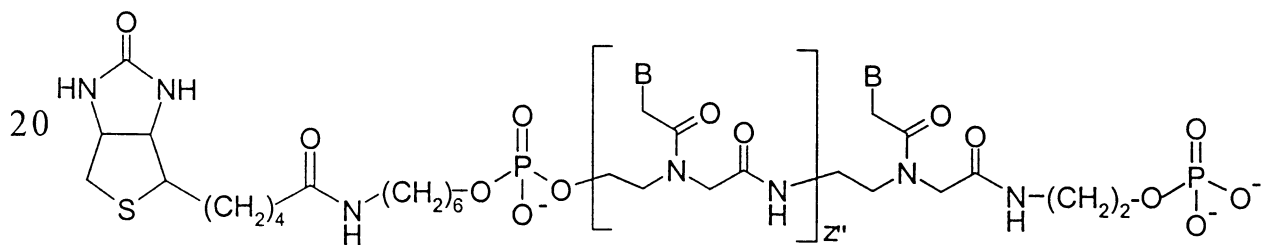
PNA-2:



PNA-3:



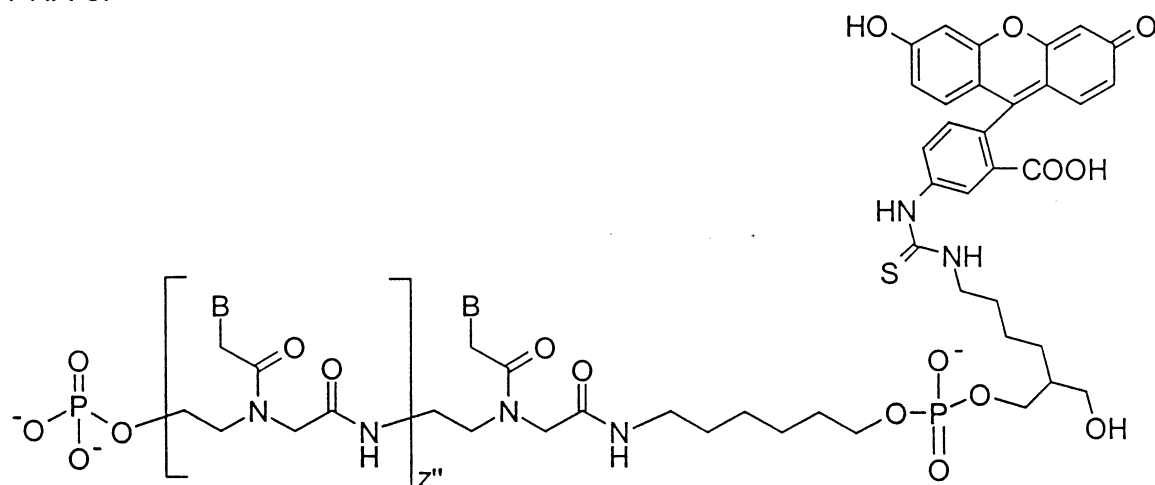
PNA-4:



五、發明說明 (33)

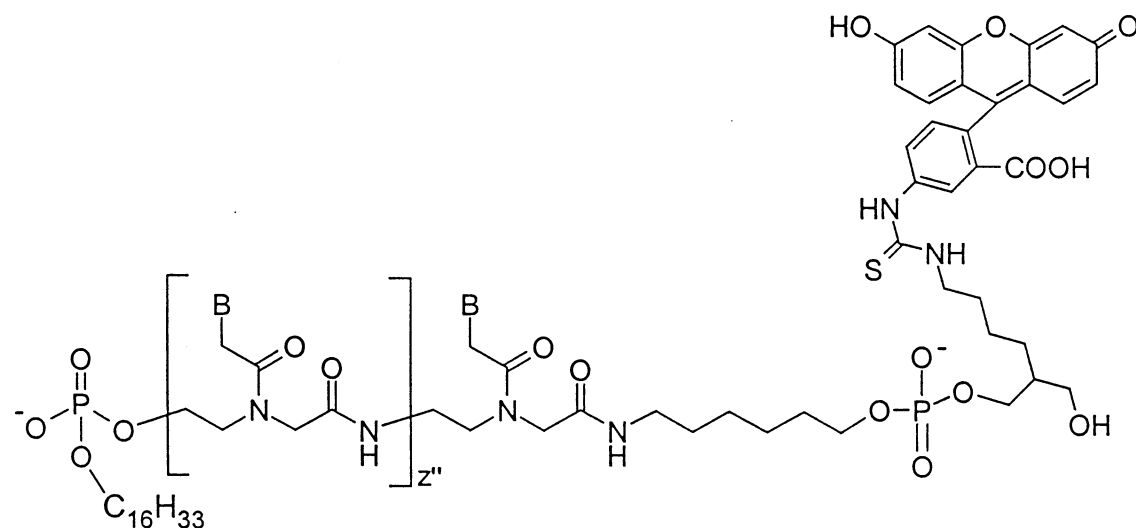
PNA-5:

5



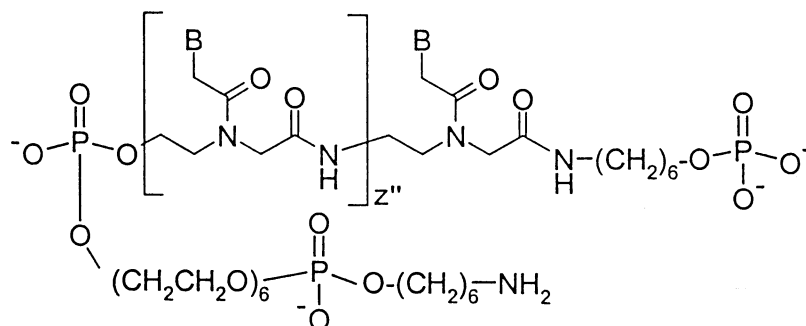
PNA-6:

10



PNA-7:

20



(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (34)

其中 13 個鹼基之序列各自描述於序列確認號碼 53，及 z'' 各自為 10：

序列確認號碼 53 5'-TATTCCGTCAT-3' (PNA-1 至 PNA-7)

5 實施例 1：合成 PNA 鏈

下列試劑係用於製備 PNA 部份：

1. 胺磷酸試劑(0.1 莫耳濃度之乙腈(ACN))
2. MmT-PNA 單體及/或 DmT-oeg-PNA 單體(0.2 M 之 DMF：ACN(1：1；v：v))
- 10 3. 無水 ACN(≤ 30 ppm 之水)
4. 三氯乙酸(3%)之二氯甲烷(DCM)
5. 乙酸酐、2,6-二甲基吡啶之 THF(1：1：8；v：v：v)；(Cap A)
6. N-甲基咪唑(16%)之 THF；(Cap B)
- 15 7. 碘溶液(0.05 莫耳濃度)之 THF、水、吡啶(7：2：1；v：v：v)
8. 清洗溶液(THF、水、吡啶(7：2：1；v：v：v))
9. 四氫唑(0.3 莫耳濃度)之 ACN
10. HBTU；0.2 莫耳濃度之 DMF：ACN(1：1；v：v)
- 20 11. DIPEA；0.2 莫耳濃度之 DMF：ACN(1：1；v：v)
12. DMF($> 99.5\%$)
13. 固相支持物：荷載 Mmt 胺基己-1-基半琥珀酸鹽之胺基丙基-CPG(550 A) (PNA-己基醯胺)。

經 Mmt/醯基保護的或經 Dmt/醯基保護的寡單體其製備

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (35)

已被描述(Breipohl et al.(1997) Tetrahedron 53, 14671-14686)。荷載 Mmt-胺基己-1-基半琥珀酸鹽之胺基丙基-CPG 同樣地已被描述(Will et al. (1995) Tetrahedron 51, 12069-12082)。衍生的 CPG 支持物可市售之(Glen Research Corporation' Sterling'VA 20164' U.S.A.)。一般而言 PNA 之合成其進行之量為 2 至 5 微莫耳。

合成 PNA 係使用下列週期：

1. ACN 清洗步驟
- 10 2. 用 3%TCA 之 DCM；處理 110 秒，去保護 Mmt 基團或 Dmt 基團。
3. DMF/ACN(1：1)清洗之步驟
4. 用 DIPEA 之 DMF/ACN(1：1)中和
5. 用 HBTU/DIPEA/PNA 單體(比例 1：1：1；總體積
- 15 450 微升)預活化(15 分鐘)偶合單體建構嵌段，加入固相及偶合(45 分鐘)
6. ACN 清洗之步驟
7. 用乙酸酐/N-甲基咪唑加帽
8. ACN 清洗之步驟
- 20 9. 新週期

實施例 2：合成乙醯基-tat tcc gtc aT-胺基己基-p(PNA-1)

從雙羥基乙基磺醯基支持物 1(1 微莫耳，圖 6)用 3%三氯乙酸消除所有之 Dmt 保護基團。然後將自由羥基功能基

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (36)

使用四氫唑作為催化劑與胺基修改劑 C₆ 胺磷酸 13(圖 4d) 反應。反應使用過量的磷醯化試劑 13(大約 25-倍), 0.3 莫耳濃度之乙腈/四氫呋喃(1:1; v:v)溶液, 及四氫唑(大約 50-倍; 0.5 莫耳濃度之乙腈)。於縮合之後, 使用碘溶液(0.05 莫耳濃度之四氫呋喃/水, 吡啶(7:2:1; v:v:v))進行氧化反應。之後用描述於實施例 1 之製備方法固相合成 PNA 部份。在最後週期中, 用加帽試劑將自由胺基官能基乙醯化。此方法可防止 PNA 於濃氨水去保護期間從胺基端降解。最後將 PNA 從支持物分解, 同時用濃氨水在 50°C 下反應過夜移除保護基團。得到所欲求之粗產物 103OD(260), 此粗產物可用製備的聚丙烯醯胺(PAA)膠體電泳純化。將所欲求之產物條帶用 0.2M 三乙基重碳酸銨緩衝溶液溶析, 經由 Bond-Elute C₁₈ 管柱(1 克)脫鹽。得到 23.3OD。產物用陰離子質譜分析法分析, 証實計算之質量(計算值 3166.2; 實際值 3166.8)。

實施例 3: 合成乙醯基-tat tcc gtc at(eo)-p(PNA-2)

製備合成 1 微莫耳, 其方法如描述於實施例 2。從支持物 1(圖 6)上消除 Dmt 保護基團之後, 使用四氫唑作為催化劑將自由羥基官能基與式 V D 胺磷酸反應。反應使用過量的胺磷酸(大約 20 倍), 0.1 莫耳濃度乙腈/四氫呋喃(1:1; v:v)溶液及四氫唑(大約 50 倍; 0.5 莫耳濃度之乙腈)。於縮合之後, 使用碘溶液(0.05 莫耳濃度之四氫呋喃/水/吡啶(7:2:1; v:v:v))進行氧化反應。得到 50OD 之粗產物,

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (37)

之後用氨水切斷。此粗產物 45OD 係用 15%PAA 凝膠電泳純化。得到產物 13.2OD，分子量 3052.9(計算值 3052.9)。

實施例 4：合成胺基己基-對-t(oeg) at tcc gtc at-胺基己基
5 -p(PNA-3)

製備合成 1 微莫耳，其方法如描述於實施例 2。然而於合成羧基端及 PNA 部份之後，在最後週期耦合具有硫胺素作為核酸鹼基(oegT)之羥基乙基甘胺酸為底質的建構嵌段。消除 Dmt 基團之後，使用四氫唑作為催化劑將自由羥基官能基耦合至胺基修改劑 C₆ 胺磷酸 13(圖 4d)及接著用
10 碘水氧化。從支持物分解寡聚物，同時在 50℃ 下用濃氨水處理移除所有的鹼不穩定的保護基團。然後用 80%乙酸處理移除終端 Mmt 保護基團。得到粗產物 130OD，此產物用膠體電泳純化。得到產物 22.5OD，分子量 3303.8(計算值
15 3305.0)。

實施例 5：合成生物素-p-t(oeg) at tcc gtc at-胺基己基-
p(PNA-4)

製備合成 0.5 微莫耳，其方法如描述於實施例 2。然而
20 於合成羧基端及 PNA 部份之後，在最後週期耦合具有硫胺素作為核酸鹼基(oegT)之羥基乙基甘胺酸為底質的建構嵌段。消除 Dmt 基團之後，使用四氫唑作為催化劑將自由羥基官能基耦合至生物素胺磷酸 5(圖 4b)及接著用碘水氧化及用三氯乙酸去三苯甲基化。從支持物分解寡聚物，同時

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (38)

在 50°C 下用濃氨水處理移除所有的保護基團。得到粗產物 37OD，此產物用膠體電泳純化。得到產物 22.5OD。

實施例 6：合成 p-t(oeg) at tcc gtc at-胺基己基-對-螢光素 5 (PNA-5)

從螢光素支持物 3(圖 6a 及 8)用類似實施例 2 之方法進行合成。用 3%三氯乙酸處理從螢光素支持物 3 消除 Dmt 保護基團。然後使用四氫唑作為催化劑將自由羥基官能基與胺基修改劑 C₆胺磷酸 3(4d)反應。於縮合之後，用碘溶
10 液(0.05 莫耳濃度之四氫呋喃/水、吡啶(7：2：1； v：v：v))進行氧化反應。之後用描述於實施例 1 之固相合成製備 PNA 部份。在最後週期耦合具有硫胺素作為核酸鹼基 ((t)oeg)之羥基乙基甘胺酸為底質的建構嵌段。於排除 Dmt 基團之後，使用四氫唑作為催化劑將自由羥基官能基耦合
15 至磷醯化試劑 1(圖 a)及接著用碘水氧化。最後從支持物分解 PNA，同時在 50°C 下用濃氨水處理過夜移除保護基團。得到粗產物 61OD(260)，此粗產物用製備的聚丙烯醯胺 (PAA)膠體電泳純化。所欲求之產物條帶用 0.2 莫耳濃度三乙基重碳酸銨緩衝溶液溶析並經由 Bond-Elut C₁₈管柱(1
20 克)脫鹽。得到 5.6OD。產物用陰離子質譜分析，顯示計算之質量(計算值 3709.5； 實際值 3706.3)。

實施例 7：合成 C16-p-t(oeg) at tcc gtc at-胺基己基-p-螢 光素(PNA-6)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝
訂

五、發明說明 (39)

類似實施例 6 從 1 微莫耳螢光素支持物 3(圖 6a 及 8)開始合成。在最後週期將具有硫胺素作為核酸鹼基((t)oeg)之羥基乙基甘胺酸為底質的建構嵌段耦合。於排除 Dmt 基團之後，使用四氫唑作為催化劑將自由羥基官能基耦合至
5 C₁₆ 磷醯化試劑 7(圖 4c)，接著用碘水氧化。最後從支持物消除 PNA，同時在 50℃ 下用濃氨水處理過夜移除保護基團。得到所欲求之粗產物 61OD(260)，此粗產物用製備的聚丙烯醯胺(PAA)膠體電泳純化。所欲求之產物條帶用 0.2 莫耳濃度三乙基重碳酸銨緩衝溶液溶析，經由 Bond-Elut
10 C₁₈ 管柱(1 克)脫鹽。得到 4.6OD。產物用陰離子質譜分析，顯示計算之質量(計算值 3934；實際值 3931)。

實施例 8：決定熔化溫度

熔化溫度之測定係使用 HP 8452A 兩極真空管-排列分
15 光光度計、HP 89090A Peltier 元素及 HP 溫度控制軟體 Rev. 85.1(來自 Hewlett Packard)。在 140 毫莫耳濃度 KCl、10 毫莫耳濃度二氫磷酸鈉、0.1 毫莫耳濃度 EDTA(酸鹼度 7.4)緩衝溶液中每 0.5℃/分鐘測量一次。寡聚物濃度為 0.5 至 1OD₂₆₀/毫升。

20 令人驚異的是具有二或三個陰性電價之雙重磷醯基-修飾的 PNA-5 及 PNA-6 衍生物較之無電價的 PNA(參考物質)，對互補 DNA 及 RNA 展示相等良好的或較佳之結合程度。

五、發明說明 (40)

PNA 衍生物		Tm(DNA)	Tm(RNA)
參考物質	Ac-HN-tat tcc gtc aT-hex	41.9°C	56.6°C
PNA-5	對-t(oeg) at tcc gtc at-胺基己基-對-螢光素	41.8 °C	56.9 °C
PNA-6	C16-對-t(oeg) at tcc gtc at-胺基己基-p-螢光素	44.1 °C	56.9 °C

實施例 9：於螢光標記之後決定細胞之攝入

將 COS 細胞在補充 10%FCS 之 Dulbecco's MEM 中於 5 公分培垂氏皿內長滿。細胞用不含血清的 DMEM 清洗兩次。在培垂氏皿中使用滅菌之針頭刮下大約 1 公分²之區域。將研究之 PNA 溶液(10 微莫耳濃度)施用至此區域。培養盤在 37°C、CO₂ 大氣下反應。於 2、4 及 16 小時之後，用螢光顯微鏡檢查細胞。細胞用不含血清的 DMEM 清洗四次，覆蓋上覆玻片在螢光顯微鏡或相位差顯微鏡下評估。

10 PNA-5 及 PNA-6 係用螢光顯微鏡檢查。

發現十六碳烷基-PNA 衍生物(PNA-6)較之無十六碳烷基自由基的 PNA 可更有效地被攝入細胞。

實施例 10：用 PNA-6 抑制細胞增殖

15 PNA-6 序列可直接的對抗 Ha-ras 傳訊 RNA 之轉譯起始作用。將 REH 細胞(人類前-B 白血病細胞，DSM ACC₂₂)或 A549 腫瘤細胞在 37°C、5%CO₂ 下培養於內含 10%胎牛血清(FCS，GIBCO-BRL)之 OptiMeM(Gibco BRL)中。測定之細胞密度大約 1 x 10⁶/毫升。將 PNA-6(10 uM)與細胞在

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (⁴¹)

24 孔測試盤中反應。在 37°C、5%CO₂ 下反應 96 小時之後，測定細胞密度。從 3 個別地 PNA 濃度孔洞中測定細胞密度平均值。發現 PNA-13 可抑制 REH 細胞之增殖。培育 >4 天之後，PNA-6 之抑制大於對應的偶磷基硫代酸酯寡核苷酸。

實施例 11：合成胺基己基-p-間隔 18-對-t(oeg) at tcc gtc at 胺基己基-p(PNA-7)

製備合成 1 微莫耳，其方法如描述於實施例 2。然而於合成羧基端及 PNA 部份之後，在最後週期耦合具有胸腺嘧啶作為核酸鹼基(oegT)之羥基乙基甘胺酸為底質的建構嵌段。消除 Dmt 基團之後，將自由羥基官能基耦合至間隔 18 胺磷酸(圖 4c)，於去三苯甲基化之後使用四氮唑作為催化劑再一次的耦合至胺基修改劑 C6 胺磷酸 13(圖 4d)，接著用碘水氧化。從支持物分解寡聚物，同時在 50°C 下用濃氨水處理移除所有的鹼不穩定的保護基團。然後用 80%乙酸處理移除終端 Mmt 保護基團。得到粗產物 57OD，此產物用膠體電泳純化。得到產物 7.4OD，質譜光譜分析顯示預期之分子量 3647.5(計算值為 3648.5)。

縮寫表：

ACN	乙腈
BOC	第三丁基氧基羰基
C, c	假-異-胞嘧啶
COS	CV1 起點 SV 40

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (42)

CPG	控制孔隙玻璃
DCM	二氯甲烷
DIPEA	二異丙基乙胺
DMEM	Dulbecco's MEM
DMF	二甲基甲醯胺
Dmt	二甲氧基三苯甲基
DNA	脫氧核糖核酸
DNP	二硝基芳基
FITC	螢光素異硫氰酸
Fmoc	苄基甲氧羰基
HATU	O-(7-重氮苯并三唑基-1-基)-1,1,3,3-四甲基糖醛 酸六氟磷酸鹽
HBTU	O-(苯并三唑基-1-基)-1,1,3,3-四甲基糖醛酸六氟 磷酸鹽
hex	-NH-(CH ₂) ₆ -OH
MEM	改良的最小基本 Eagle's 培養基
Mmt	單甲氧基三苯甲基
OD	光密度
oeg	N-(2-羥基乙基)甘胺酸
PAA	聚丙烯醯胺
PG	保護基團
PNA	聚醯胺核酸
RNA	核糖核酸
TBTU	O-(苯并三唑基-1-基)-1,1,3,3-四甲基糖醛酸陽離

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (43)

子四氯硼酸鹽

TCA 三氯乙酸

THF 四氫呋喃

TR 酸不穩定保護基團

(圖式簡單說明)

圖 1 a、1 b、2b 及 3b 顯示末端 Z 及 Z' 自由基的實施例。

圖 2a 及 3a 顯示橋聯 X 及 X' 自由基之實施例。

圖 4a、4b、4c 及 4d 顯示磷醯化試劑之實施例。

5 圖 5a 及 5b 顯示 PNA N 端單一的(A、B)及多重(C 至 E)衍
生化反應之實施例。

圖 6 顯示固相合成中支持物-結合試劑之實施例。

圖 7、8 及 9 顯示合成 C-及 N-端修飾的 PNA 之實施例。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

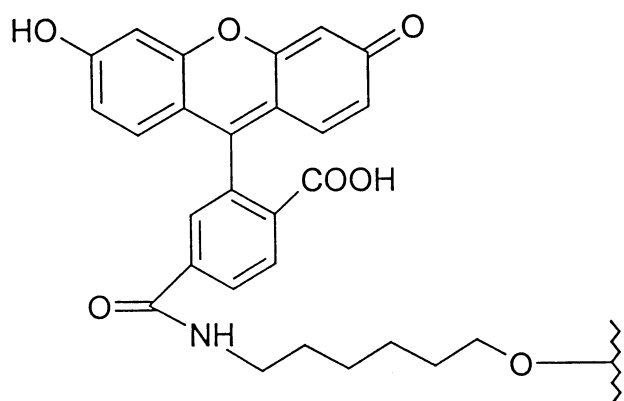
四、中文發明摘要 (發明之名稱：聚醯胺核酸衍生物，以及供製造其之試劑與方法)

本發明係關於 PNA 衍生物，其於 PNA 骨幹之 C 端或 C 及 N 端上帶有一個或多個磷醯基自由基，其可 (若適當時) 帶有一個或多個標記基團、或交聯基團、或促進攝入細胞內的基團、或增加 PNA 衍生物對核酸結合親和性之基團。本發明亦關於製備上述 PNA 衍生物的方法及其作為藥劑或診斷劑之用途。

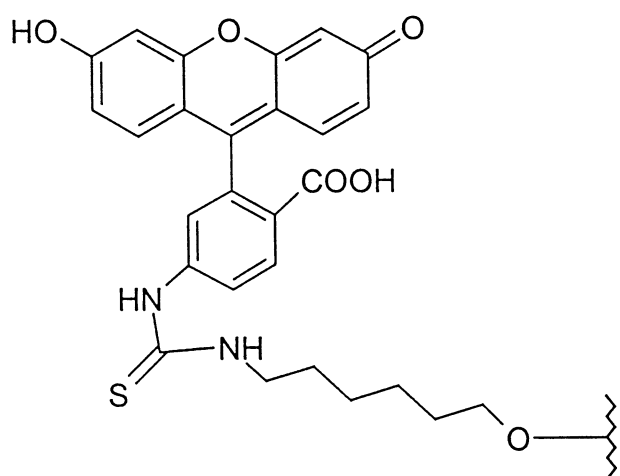
英文發明摘要 (發明之名稱：Polyamide nucleic acid derivatives, and agents and processes for preparing them)

The present invention relates to PNA derivatives which carry, at the C terminus or C and N termini of the PNA backbone, one or more phosphoryl radicals, which carry, where appropriate, one or more labeling groups, or groups for crosslinking, or groups which promote intracellular uptake, or groups which increase the binding affinity of the PNA derivative for nucleic acids. The invention furthermore relates to a process for preparing the abovementioned PNA derivatives and to their use as pharmaceuticals or diagnostic agents.

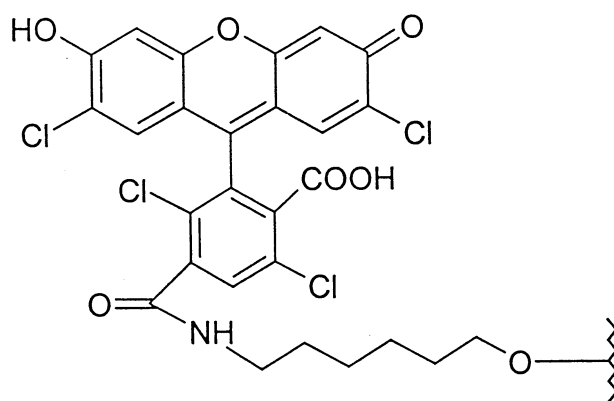
圖 1 a :



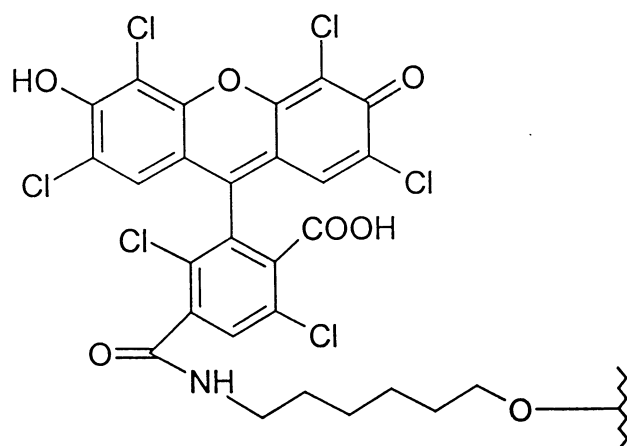
螢光素(醯胺)



螢光素(硫脲)



四氯螢光素



六氯螢光素

圖 1 b : .

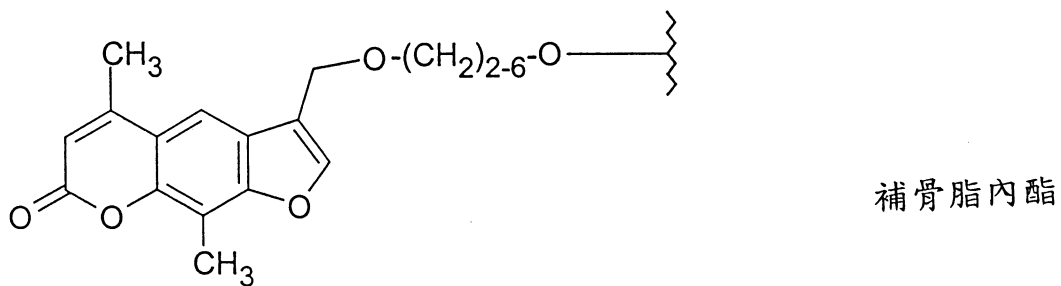
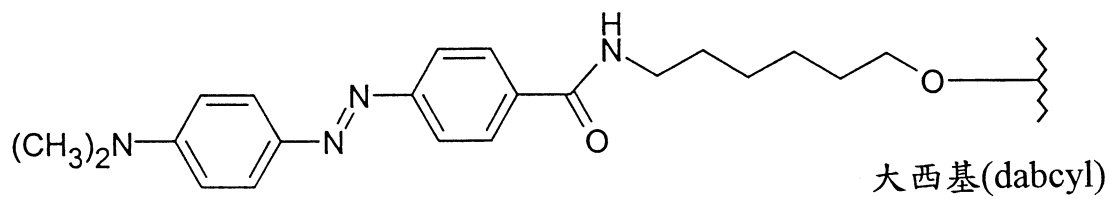
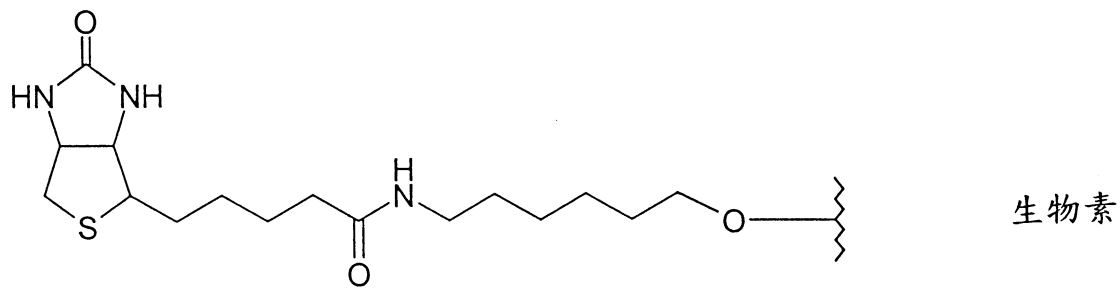
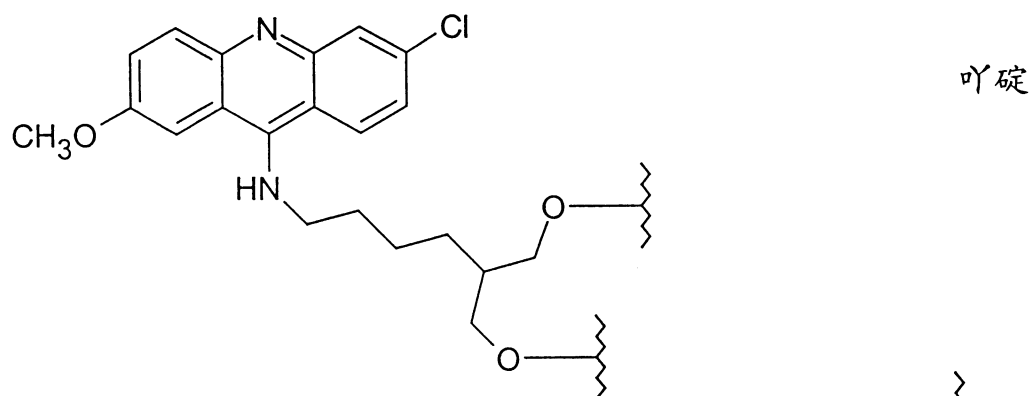
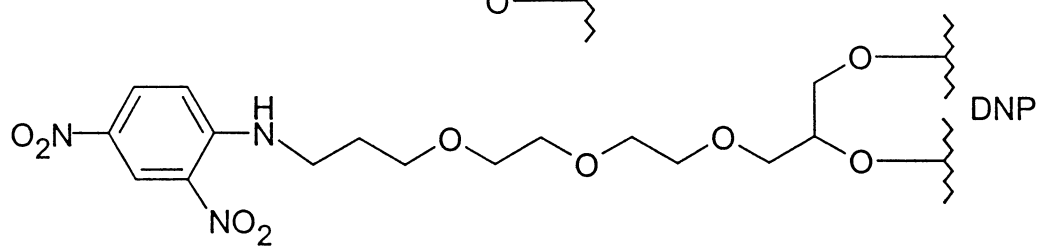


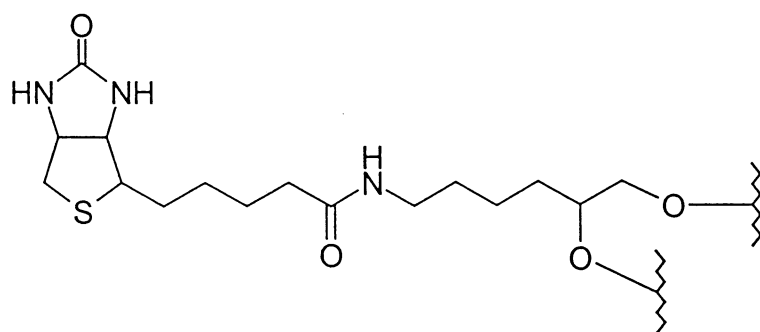
圖 2a :



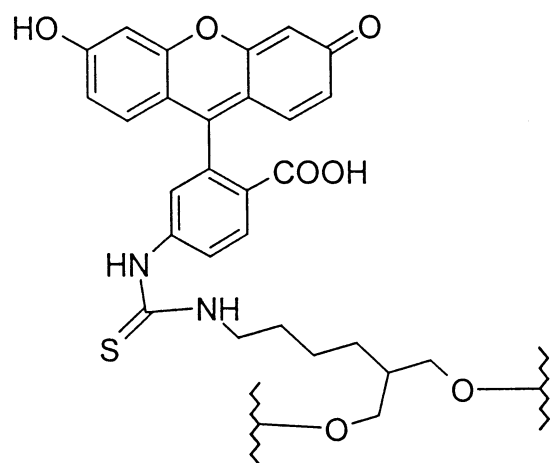
吖啶



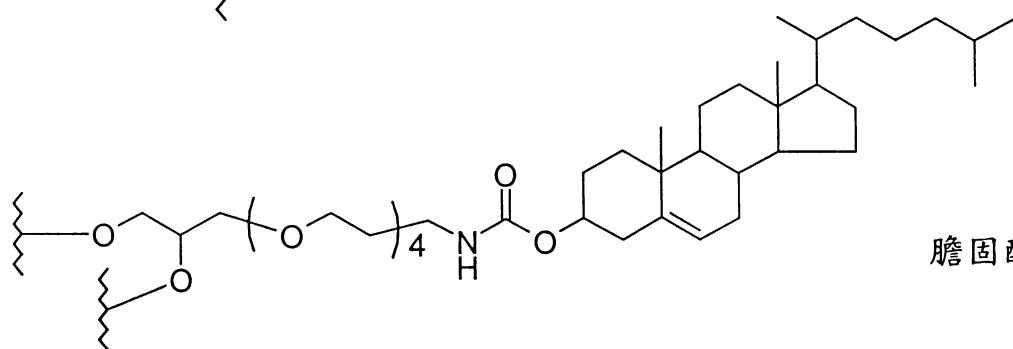
DNP



生物素

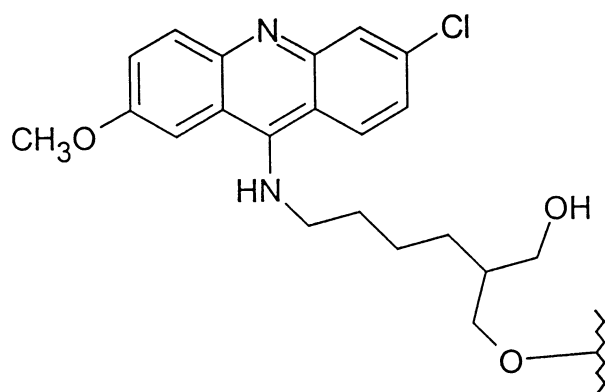


螢光素(硫脲)

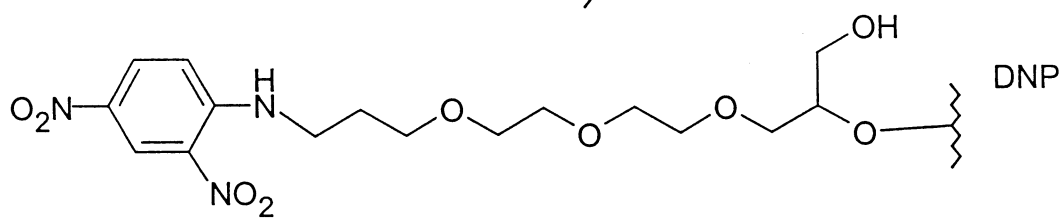


膽固醇

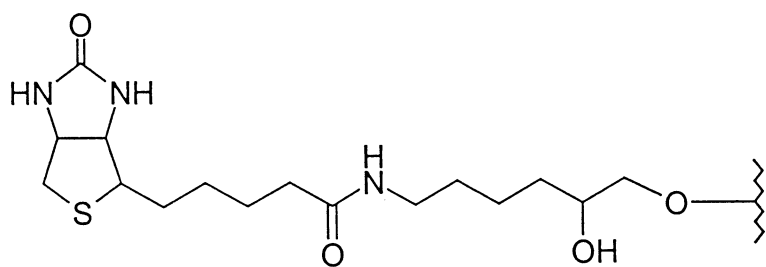
圖 2b :



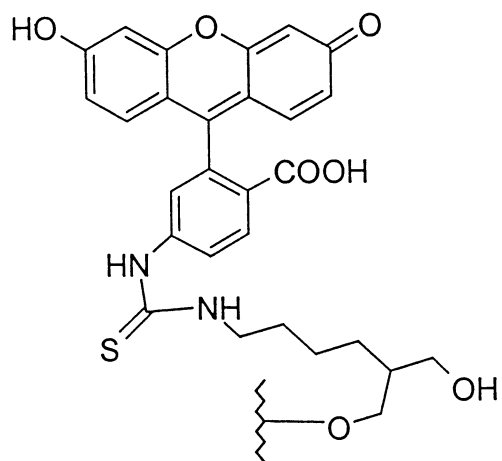
吡啶



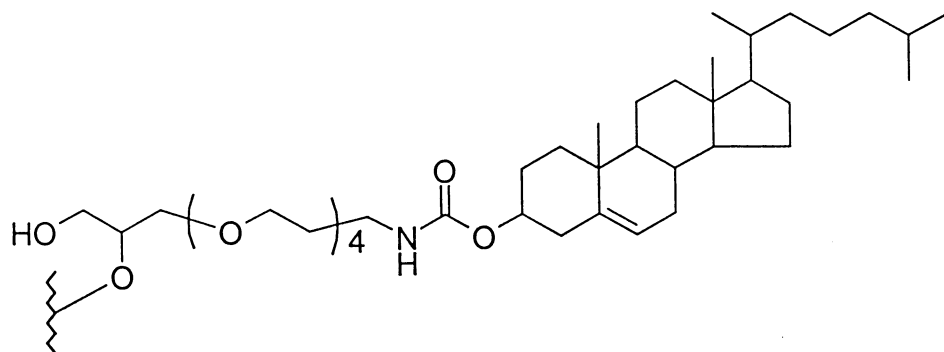
DNP



生物素



螢光素(硫脲)



膽固醇

圖 3a :

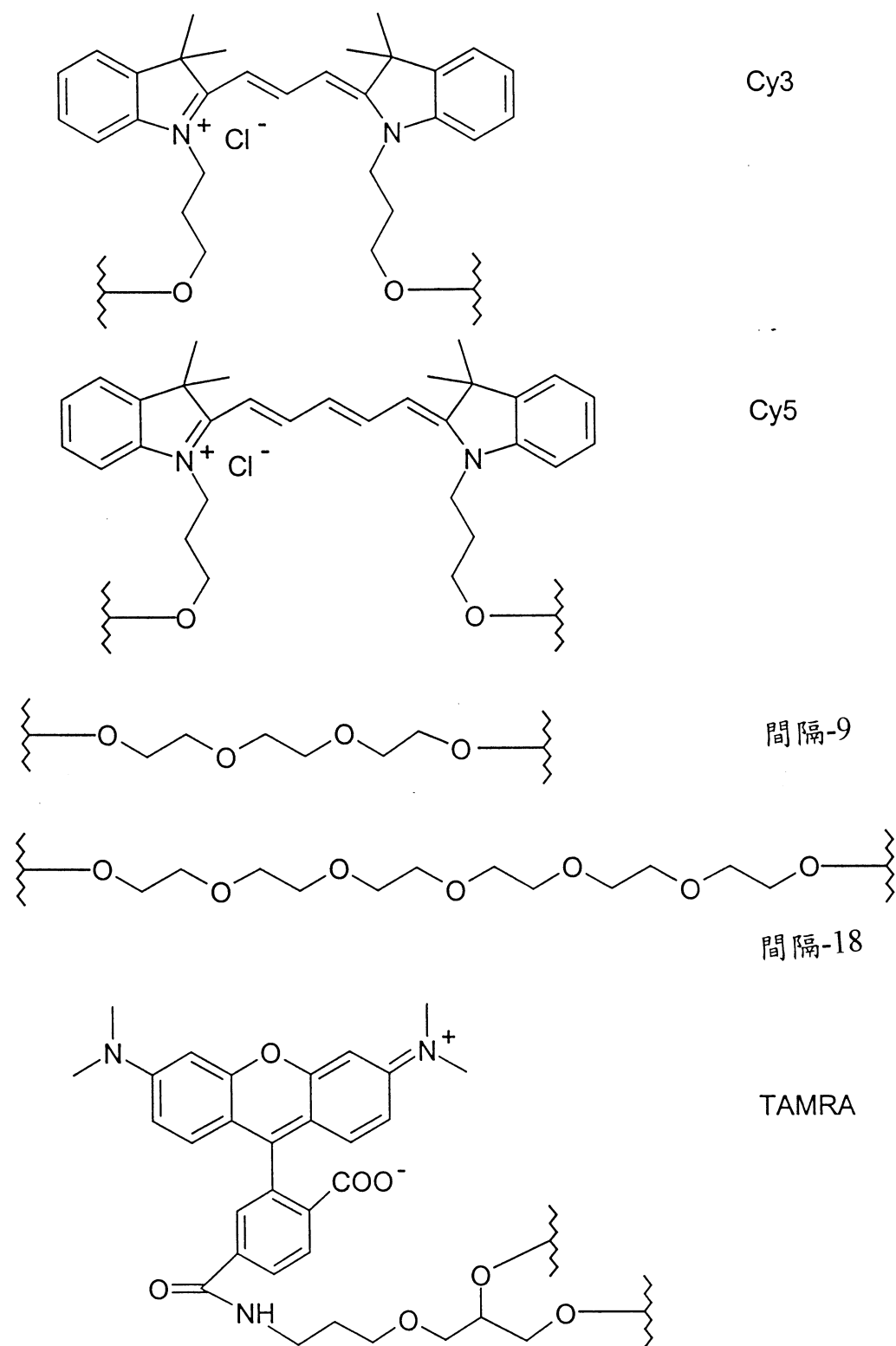
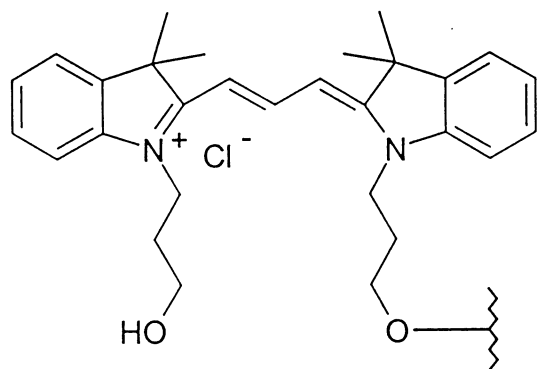
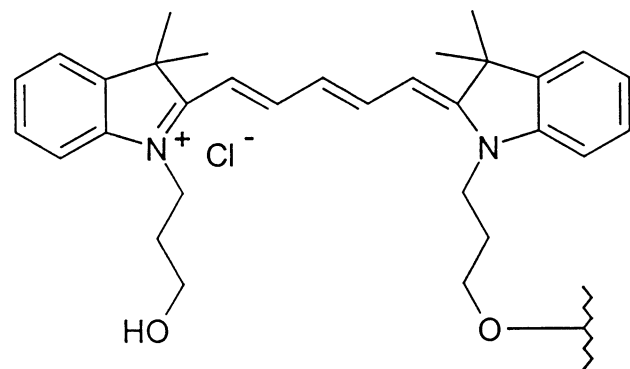


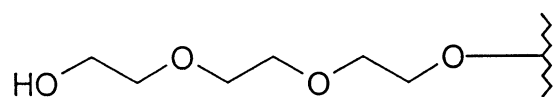
圖 3b :



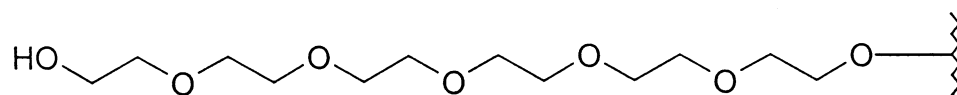
Cy3



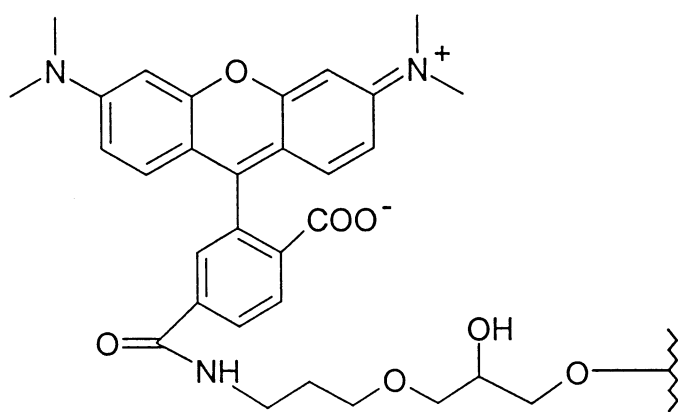
Cy5



間隔-9

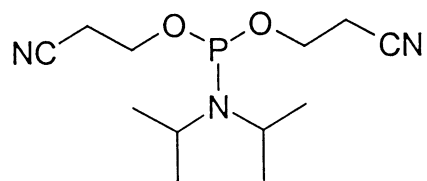


間隔-18

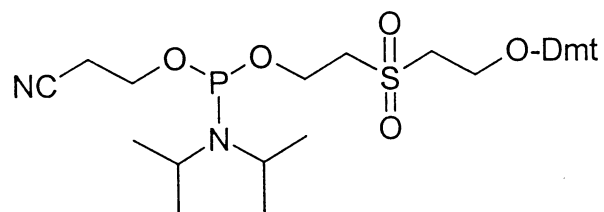


TAMRA

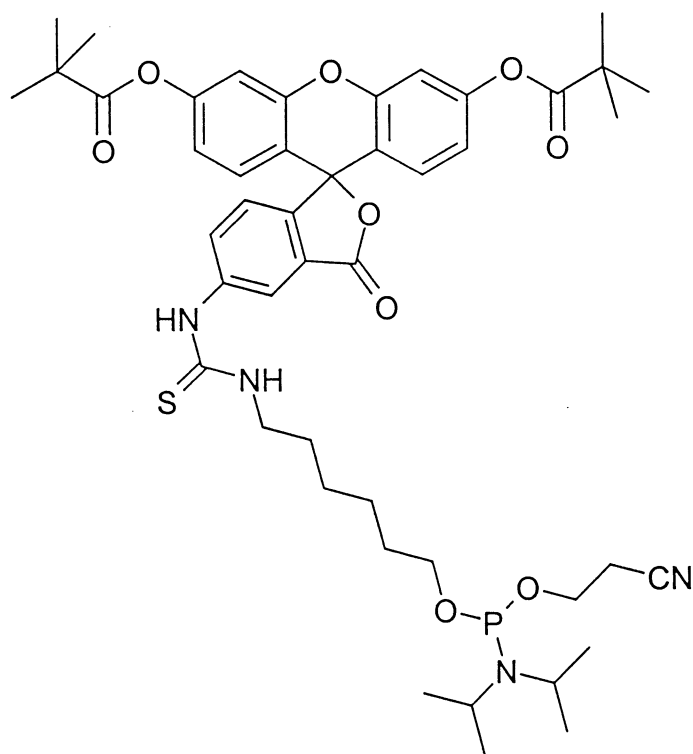
圖 4a :



磷醯化試劑(試藥) 1



磷醯化試劑(試藥) 2



螢光素胺磷酸 3 (單官能的)

圖 4b :

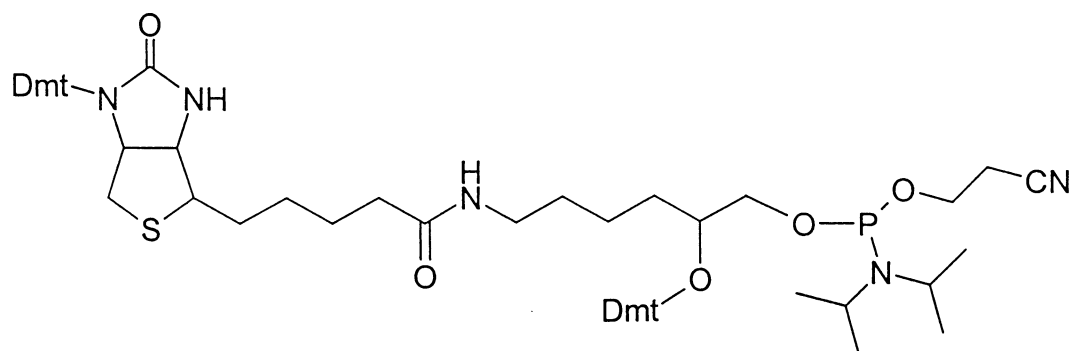
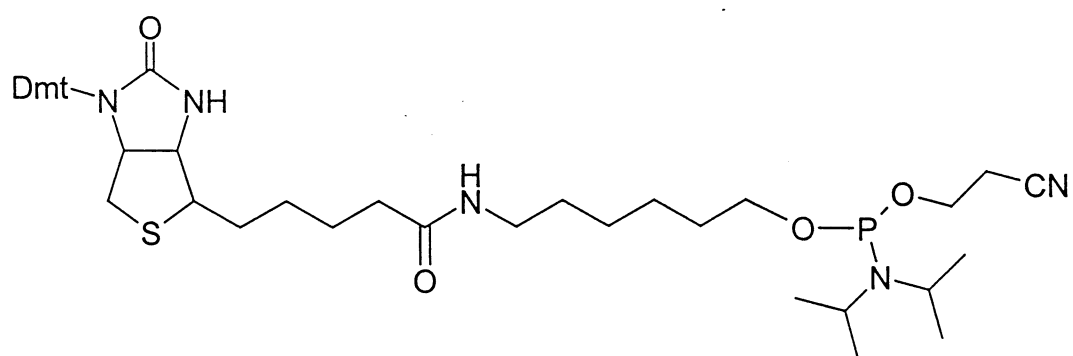
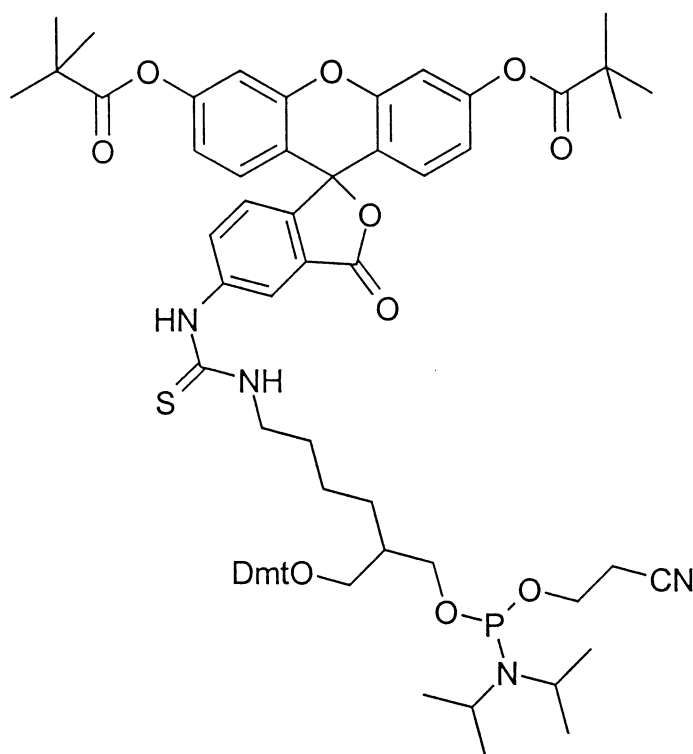
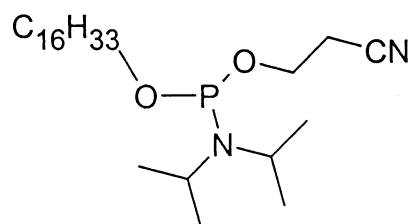
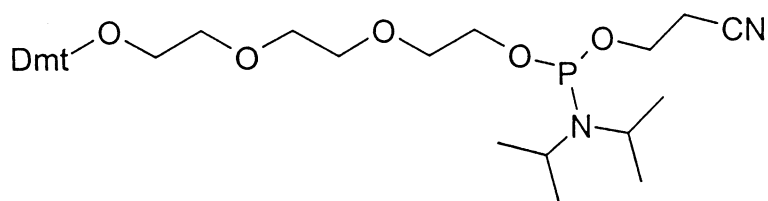


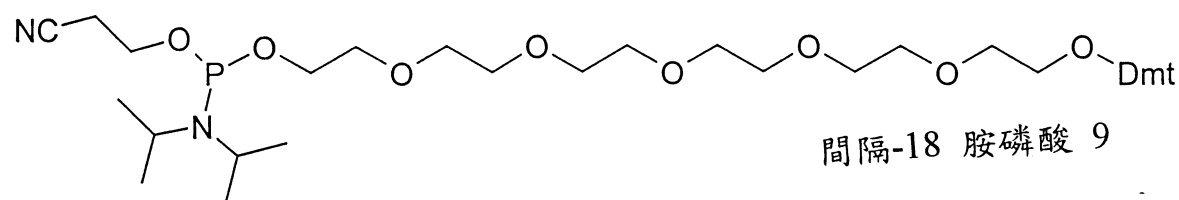
圖 4c :



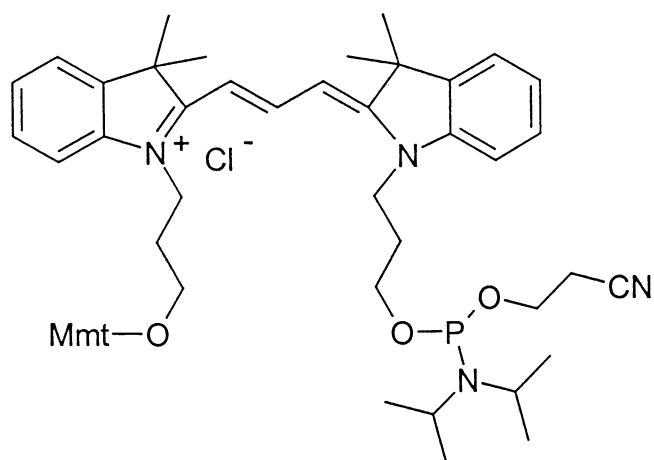
C₁₆-磷醯化試劑(試藥) 7



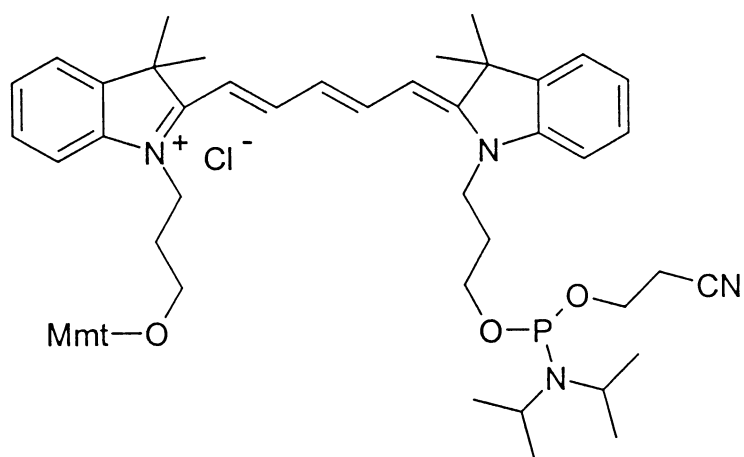
間隔-9 胺磷酸 8



間隔-18 胺磷酸 9

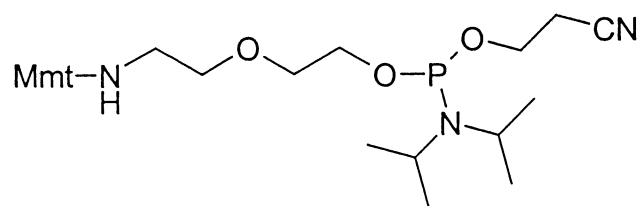


青色素-3 胺磷酸 10



青色素-5 胺磷酸 11

圖 4d：



胺基修改劑-5 胺磷酸 12

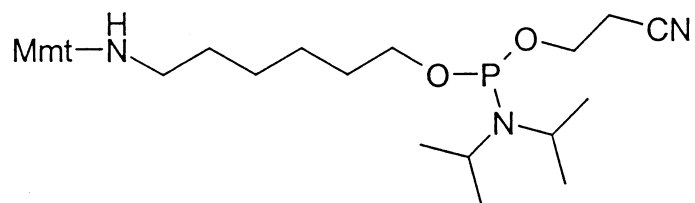
胺基修改劑-C₆ 胺磷酸 13

圖 5a :

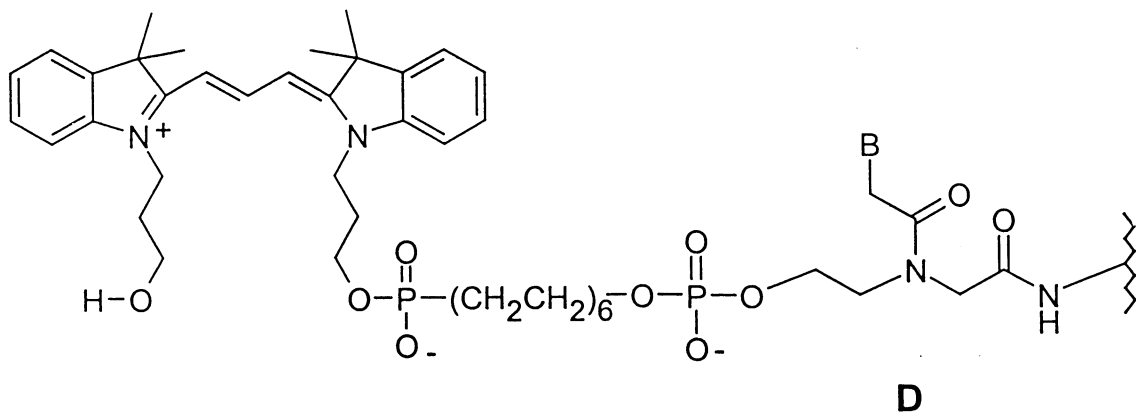
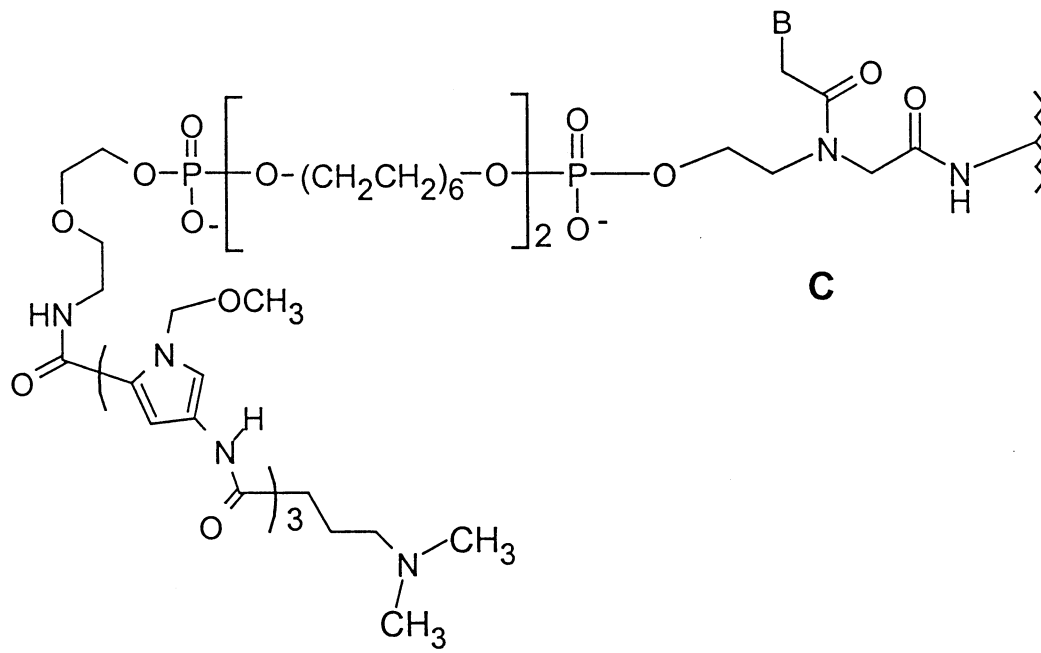
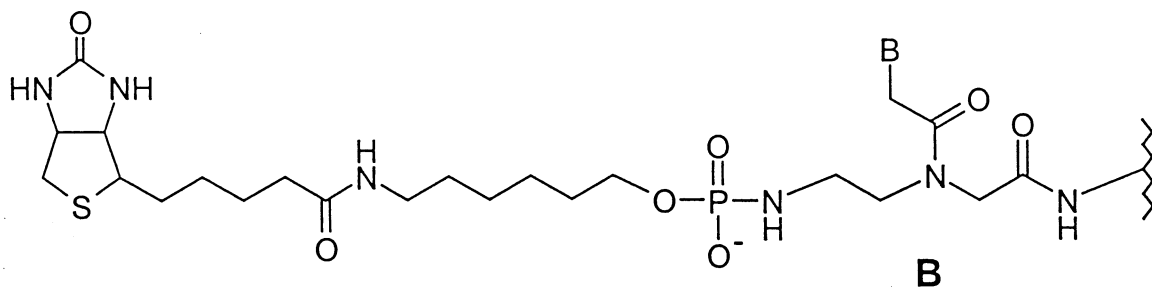
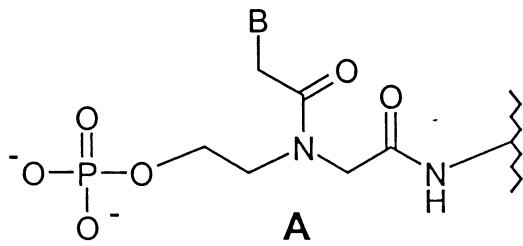


圖 5b :

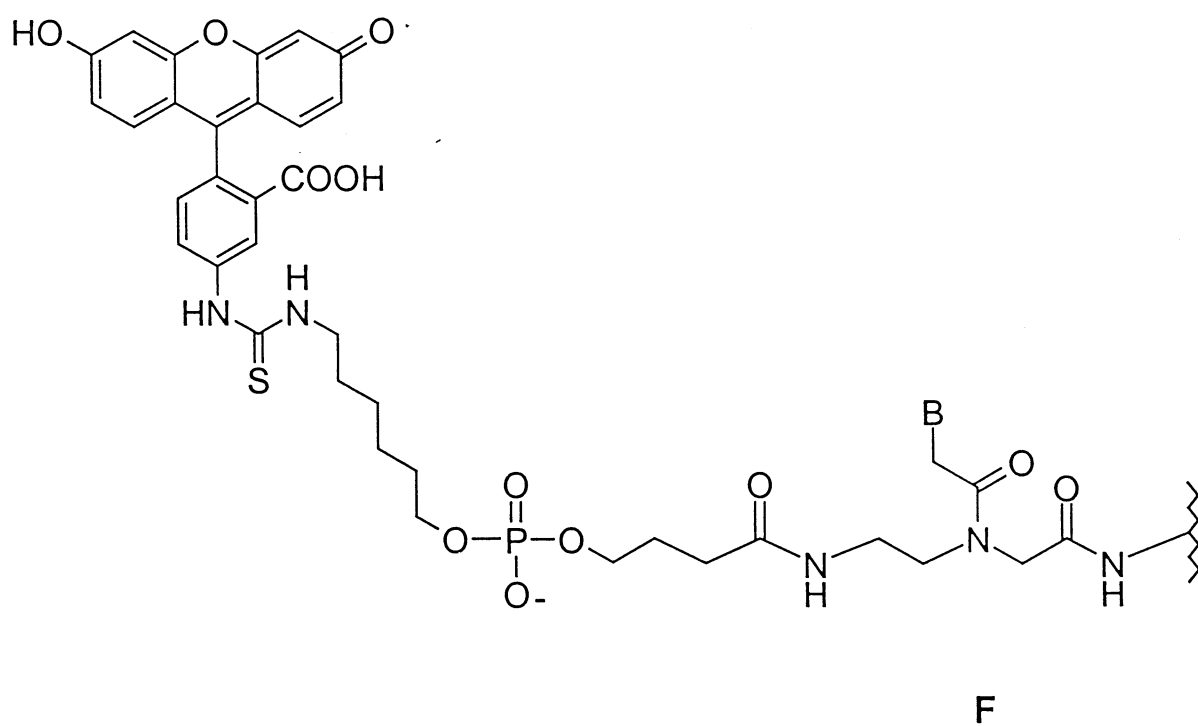
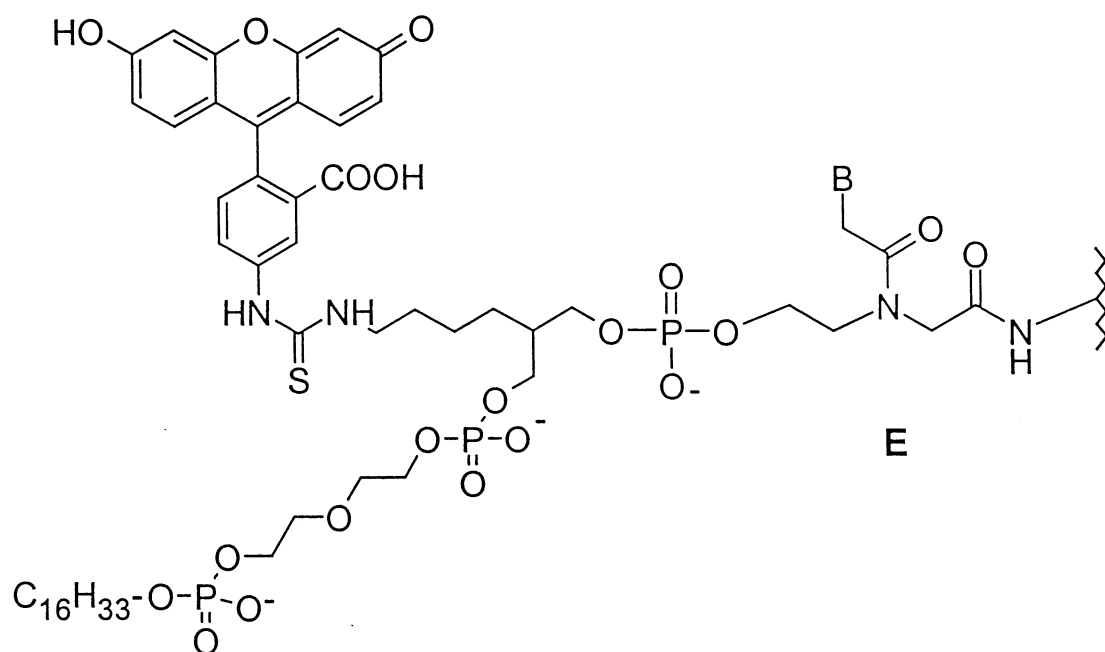
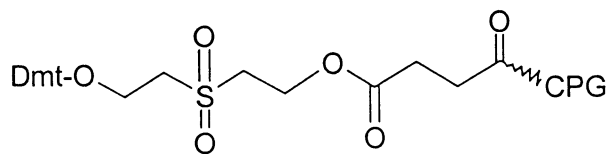
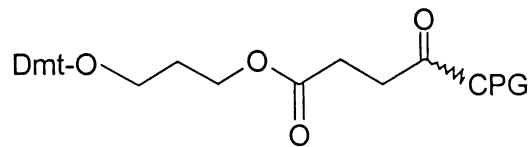


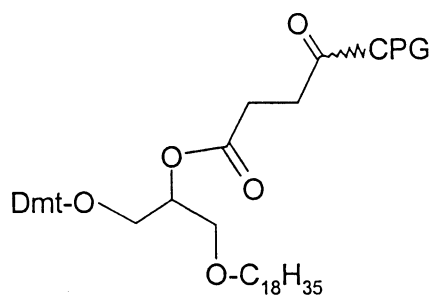
圖 6：



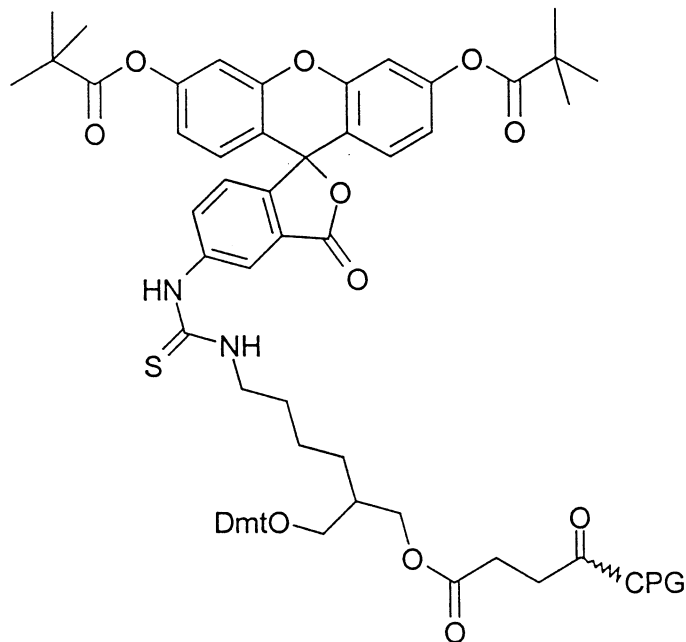
雙羥基乙基磺醯基支持物 1



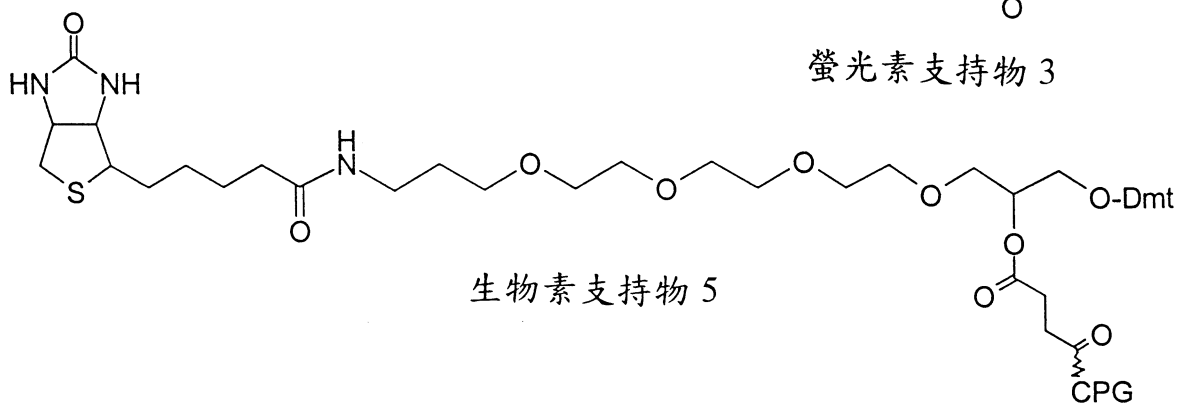
3'-間隔-C₃ 支持物 2



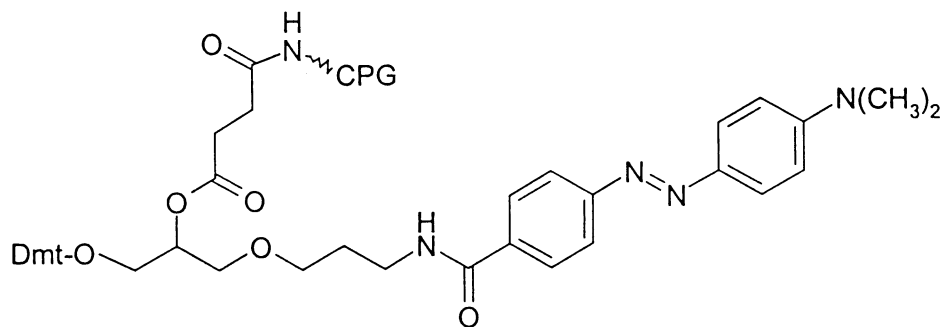
3'-Batyl 支持物 4



螢光素支持物 3



生物素支持物 5



大西基(DABCYL) 支持物 6

圖 7：

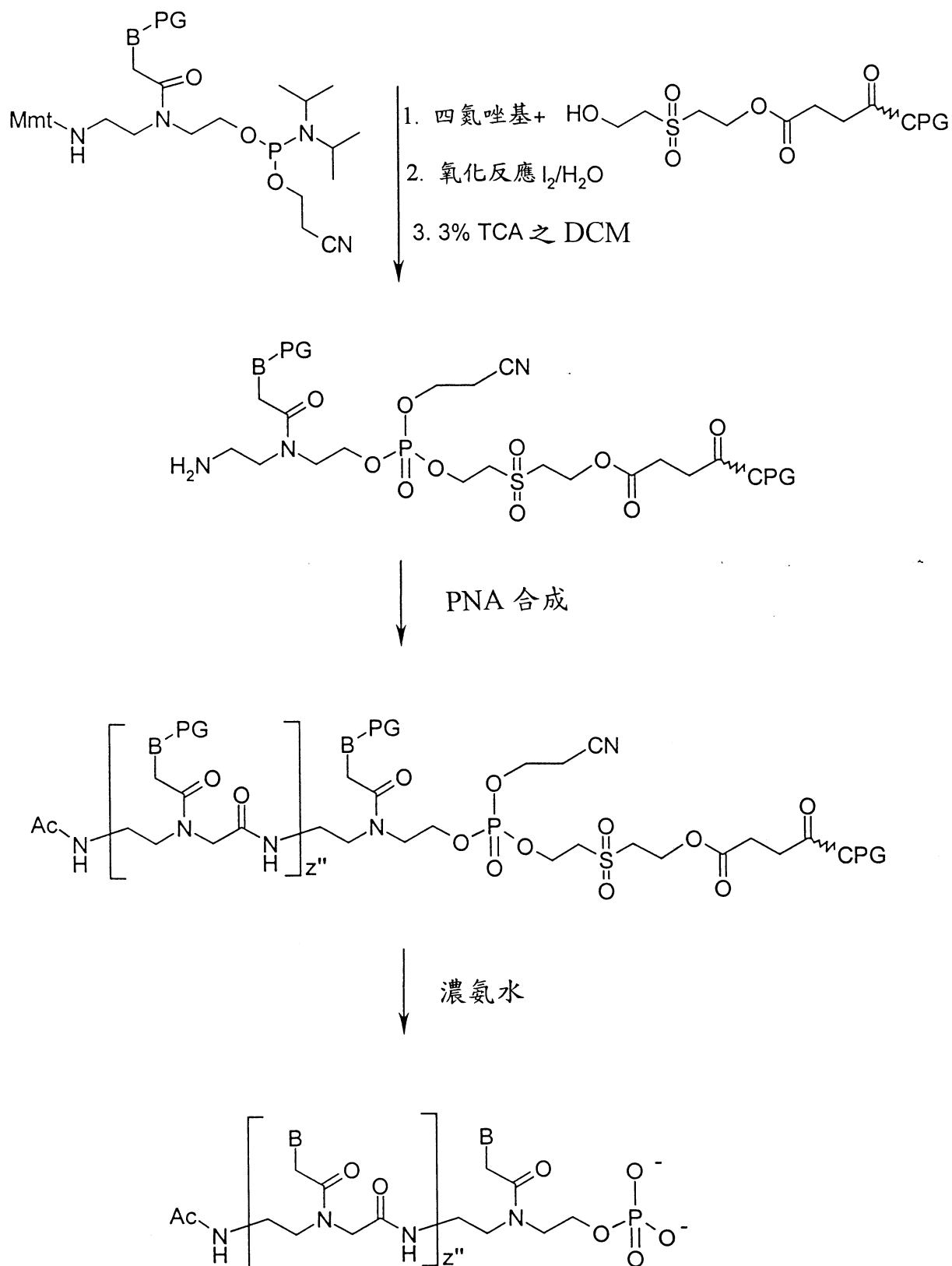


圖 8：

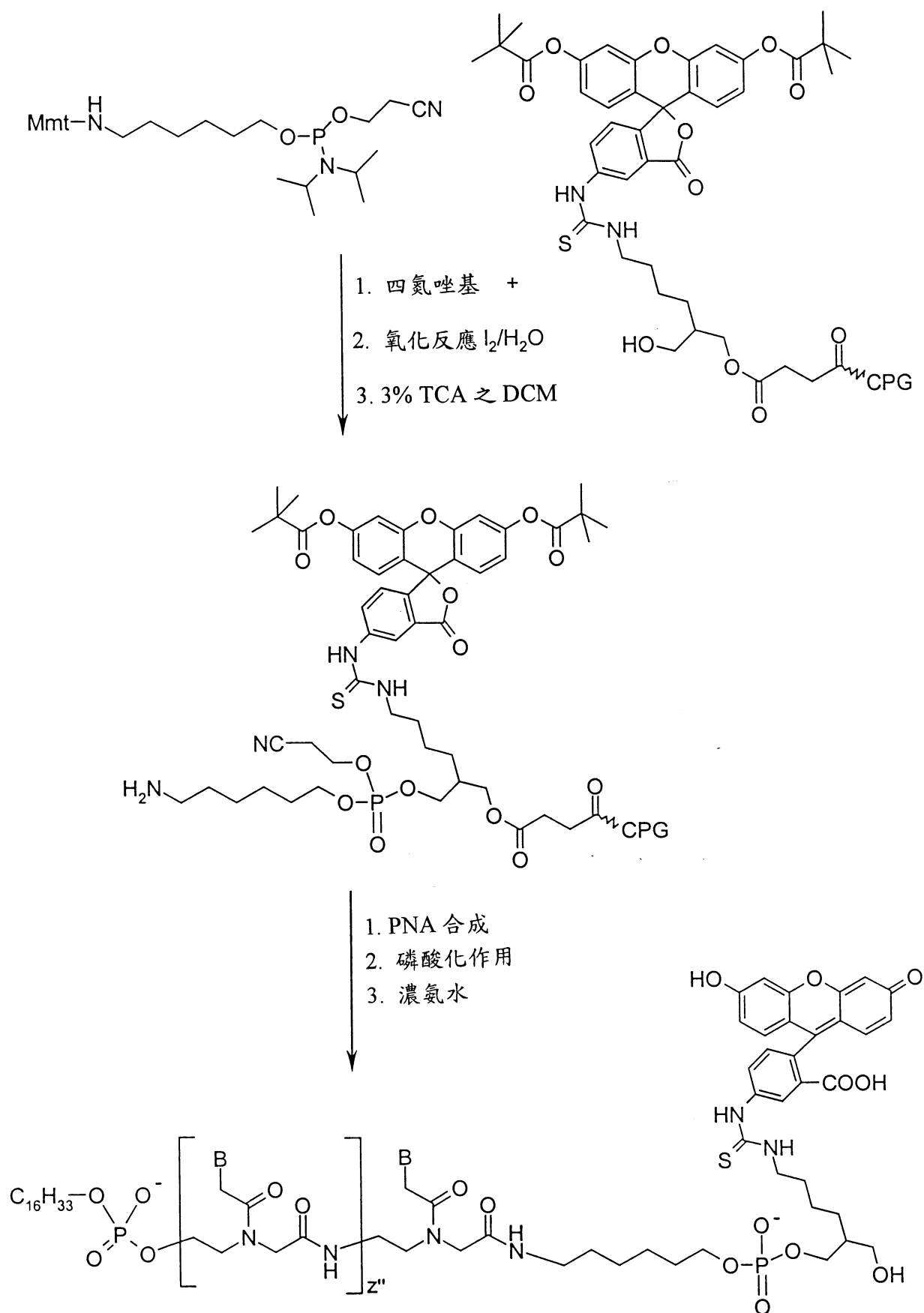
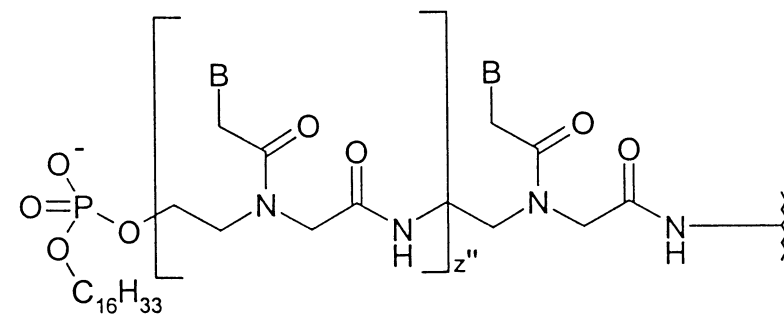
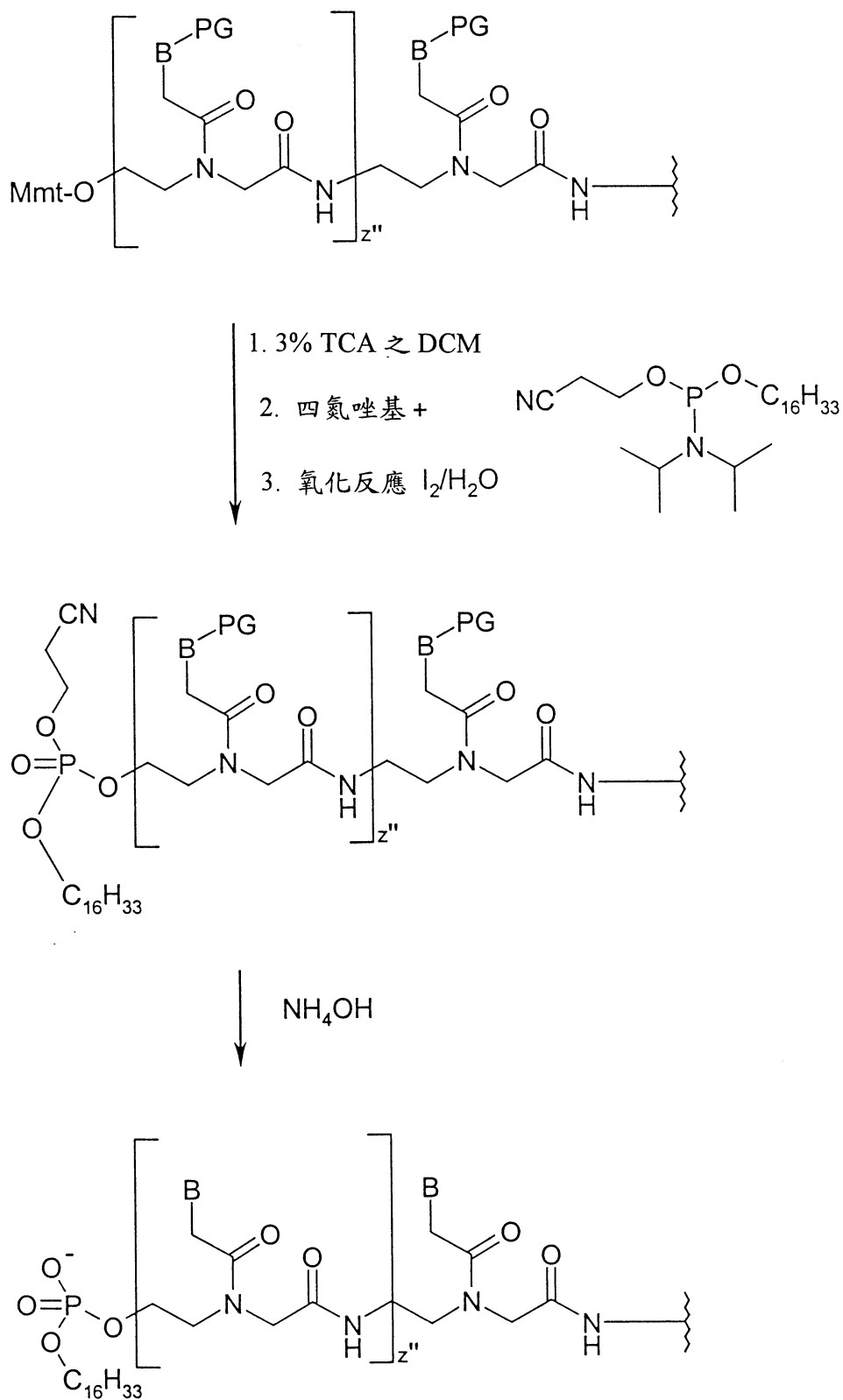


圖 9：



I298328 96.11.27

修正
年月日
補充

公告本

申請日期	90.5.16
案 號	90/08986
類 別	C07K14/60, C12Q 1/68.

A4

C4

專利申請案第 90108986 號
ROC Patent Appln. No.90108986
修正後無劃線之中文說明書首頁-附件(六)
Amended Pages of Specification in Chinese - Encl.(VI)
(民國 96 年 11 月 27 日送呈)
(Submitted on November 27, 2007)

(以上各欄由本局填註)

發明
新型專利說明書

發明 一、新型名稱	中文	聚醯胺核酸衍生物，以及供製造其之試劑與方法
	英文	Polyamide nucleic acid derivatives, and agents and processes for preparing them
發明 二、創作人	姓 名	1. 烏瑪 Eugen Uhlmann 2. 葛賀 Gerhard Breipohl 3. 威廉大衛 David William Will
	國 籍	1-2 德國籍 3 英國籍
發明 三、申請人	住居所	1. 德國格雷斯城如太必克街 31 號 Zum Talblick 31, 61479 Glashütten, Germany 2. 德國法蘭克福城蓋斯賀門街 95 號 Geisenheimer Straße 95, 60529 Frankfurt, Germany 3. 德國科利特城科斯街 21 號 Kirchstrasse 21, 65830 Kriftel, Germany
	姓 名 (名稱)	賽諾菲阿凡提斯德意志有限公司 Sanofi-Aventis Deutschland GmbH
發明 三、申請人	國 籍	德國
	住居所 事務所	德國法蘭克福城 D-65926 D-65926 Frankfurt am Main, Germany
發明 三、申請人	代表人 姓 名	魏麥可 (WEIN, ELMAR-MICHAEL) 魯波 (RUPP)

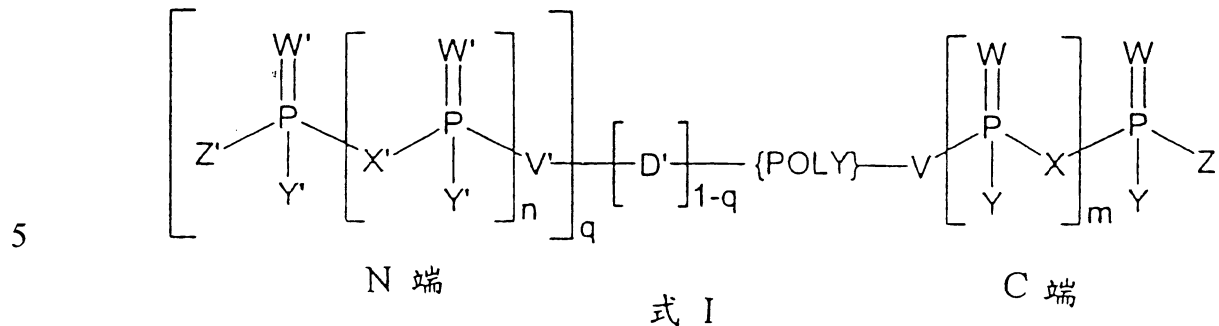
裝

訂

線

六、申請專利範圍

1. 一種式 I 之 PNA 衍生物



q 為 0 或 1，

D' 為羥基、氫硫基、胺基、烷胺基或醯胺基，

V 係相互獨立為氧、硫、NR₁，

10 V' 係相互獨立為氧、硫、NR₁、U-(CR₃R₄)_u 基團、-C(O)-NH 或 U-(CH₂CH₂O)_u 基團、-CH₂-C(O)-NH，

U 係相互獨立為氧、硫或 NH，

u' 係相互獨立為 1 至 10，

15 W 及 W' 係相互獨立為氧、硫或 NR₁，

Y 及 Y' 係相互獨立為羥基、氫硫基、氧基陰離子、
硫代酸酯或 NR₁R₂，

X 及 X' 係相互獨立為 U-(C₂-C₂₂-鏈烷二基)-U 基團
或 U-(CH₂CH₂-O)_{u'}基團，

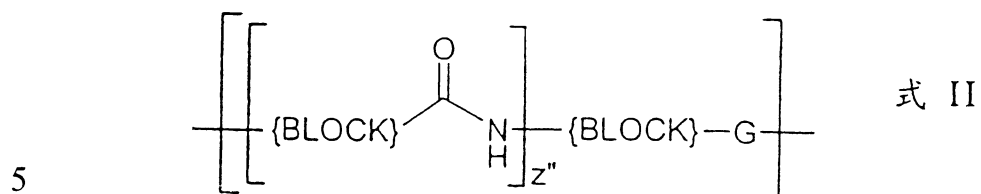
20 或為標記基團或交聯基團，或促進攝入細胞內的
基團，或增加 PNA 衍生物對核酸結合親和性之
基團，其係選自於由雙官能的螢光素、玫瑰紅、
TAMRA、生物素、芘、二硝基苯基、膽固醇
基、吡啶、金剛烷基、維生素 E、青色素染料、

六、申請專利範圍

- 大西基 (dabcyl)、伊登 (edans)、理西多辛 (lexitropsin)、補骨脂內酯、BODIPY、ROX、R6G 及狄氧寧 (digoxigenin) 基團所組成之群組，
- 5 Z 及 Z' 係相互獨立為羥基、氫硫基、氧基陰離子、硫代酸酯或 NR_1R_2 、 $\text{C}_1\text{-C}_{22}$ -烷基 $\text{C}_1\text{-C}_8$ -芳基烷基 $\text{C}_1\text{-C}_{22}$ -烷基- $\text{UC}_1\text{-C}_8$ 芳基烷基-U、羥基- $\text{C}_1\text{-C}_{18}$ -U' 胺烷基-U、氫硫基烷基-U、或式 $\text{R}_7(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-O})_m$ 基團，其中 R_7 羥基、胺基或 $\text{C}_1\text{-C}_{22}$ -烷氧基，及 m 為 1 至 100，
- 10 或一種標記基團、或一種交聯基團、或一種促進攝入細胞內的基團、或一種增加 PNA 衍生物對核酸結合親和性之基團，其係選自於由單官能的或雙官能的螢光素、玫瑰紅、TAMRA、生物素、芘、二硝基苯基、膽固醇基、吖啶、金剛烷基、維生素 E、青色素染料、大西基 (dabcyl)、伊登 (edans)、理西多辛 (lexitropsin)、補骨脂內酯、BODIPY、ROX、R6G 及狄氧寧 (digoxigenin) 基團所組成之群組，
- 15 R_1 及 R_2 係相互獨立為由氫或 $\text{C}_1\text{-C}_6$ -烷基組成之基團，
- 20 R_3 及 R_4 係相互獨立為由氫或 $\text{C}_1\text{-C}_6$ -烷基組成之基團，或胺基酸側鏈基，V' 中相鄰的基團 R_3 及 R_4 亦可形成 $\text{C}_5\text{-C}_8$ -環烷基環，
- n 為 0 至 10，
- m 為 0 至 10，

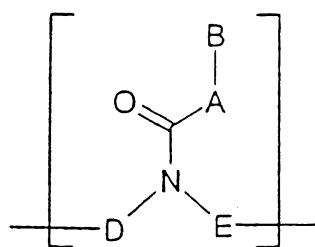
六、申請專利範圍

且其中{聚}描述於式 II



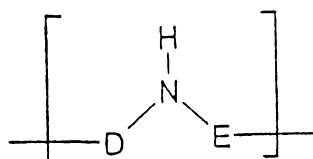
其中{嵌段}係相互獨立選自式 IIIA，

10



15

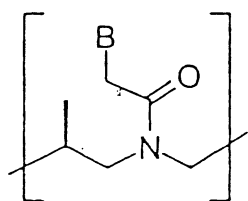
或式 III B，



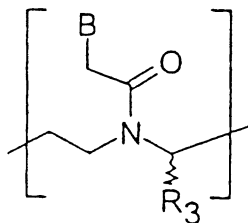
20

或式 IV A 至 IV G，

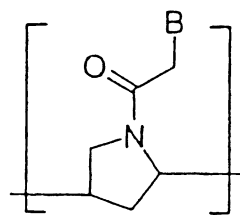
六、申請專利範圍



式 IVA

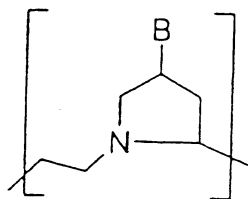


式 IVB

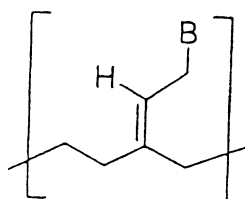


式 IVC

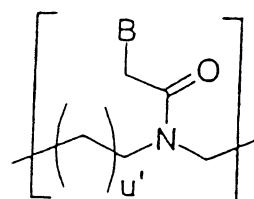
5



式 IVD

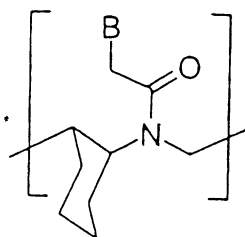


式 IVE



式 IVF

10



式 IVG

15 其中各{嵌段}建構嵌段可為不同，
且其中

z'' 為 0 至 100，

G 係選自基團 $(CR_5R_6)_{u'}$ 、 $C(O)NH-(CR_1R_2)_t$ 、或
 $C(O)NH-(CH_2CH_2O)_u$ 、 $-CH_2CH_2$ ，其中 t' 為 2 至
 20 10，

A 係相互獨立為基團 $(CR_1R_2)_s$ ，其中 s 為 1 至 3，

B 係相互獨立為芳香族基、雜芳香族基、或氫、
 或羥基或 C_1-C_{18} -烷基，

D 係相互獨立為基團 $(CR_3R_4)_t$ ，其中 t 為 2 至

六、申請專利範圍

10，

E 係相互獨立為基團 $(CR_5R_6)_u$ ，其中相鄰的 R_5 及 R_8 基亦可形成 C_5 - C_8 -環烷基環或螺化合物，

R_5 及 R_8 係相互獨立為氫或 C_1 - C_6 -烷基或胺基酸側鏈基，

以及式 I 之 PNA 衍生物的生理上耐受之鹽類，

其限制條件是至少一個 Y、Y'、Z 或 Z' 基為羥基、氫硫基、氧基陰離子或硫代酸酯，且至少一個 B 基為核酸鹼基。

- 10 2. 如申請專利範圍第 1 項之 PNA 衍生物，其中 u' 為 1 至 4。
3. 如申請專利範圍第 2 項之 PNA 衍生物，其中 u' 為 1。
4. 如申請專利範圍第 1 項之 PNA 衍生物，其中 R_1 及 R_2 為氫。
5. 如申請專利範圍第 1 項之 PNA 衍生物，其中 R_3 及 R_4 為氫。
- 15 6. 如申請專利範圍第 1 項之 PNA 衍生物，其中 m' 為 2 至 10。
7. 如申請專利範圍第 1 項之 PNA 衍生物，其中 n 為 0 至 3。
8. 如申請專利範圍第 1 項之 PNA 衍生物，其中 m 為 0 至 3。
- 20 9. 如申請專利範圍第 1 項之 PNA 衍生物，其中 z'' 為 1 至 20。
10. 如申請專利範圍第 9 項之 PNA 衍生物，其中 z'' 為 4 至 15。
11. 如申請專利範圍第 1 項之 PNA 衍生物，其中 t' 為 6。

六、申請專利範圍

12. 如申請專利範圍第 1 項之 PNA 衍生物，其中 s 為 1。
13. 如申請專利範圍第 1 項之 PNA 衍生物，其中 t 為 2 至 4。
14. 如申請專利範圍第 13 項之 PNA 衍生物，其中 t 為 2。
15. 如申請專利範圍第 1 項之 PNA 衍生物，其中 R_5 及
5 R_6 為氫。
16. 如申請專利範圍第 1 項之 PNA 衍生物，其中式 I 中
至少一個 Y、Y'、Z 或 Z' 基在 pH 介於 4.5 至 14 時，
為氧基陰離子或硫代酸酯。
17. 如申請專利範圍第 16 項之 PNA 衍生物，其中該 pH
10 介於 6.5 至 12。
18. 如申請專利範圍第 16 項之 PNA 衍生物，其中該 pH
介於 6.5 至 9。
19. 如申請專利範圍第 1 或 16 項之 PNA 衍生物，其中 n
及 m 係相互獨立為 0。
- 15 20. 如申請專利範圍第 1 或 16 項之 PNA 衍生物，其中 q
為 1。
21. 如申請專利範圍第 1 或 16 項之 PNA 衍生物，其中
 W 及 W' 為酮基。
22. 如申請專利範圍第 1 或 16 項之 PNA 衍生物，其中 Y
20 及 Y' 為羥基或氧基陰離子。
23. 如申請專利範圍第 1 或 16 項之 PNA 衍生物，其中 V
及 V' 為氧基。
24. 如申請專利範圍第 1 或 16 項之 PNA 衍生物，其中 X
及 X' 係相互獨立為基團 $U-(C_2-C_{22}\text{-鏈烷二基})-U$ 或基

六、申請專利範圍

團 $U-(CH_2CH_2-O)_{u'}$ ，其中 u' 為 1 至 6。

25. 如申請專利範圍第 24 項之 PNA 衍生物，其中該 $U-(C_2-C_{22}$ -鏈烷二基)-O 基團為 $O-(C_2-C_{22}$ -鏈烷二基)-O。
26. 如申請專利範圍第 25 項之 PNA 衍生物，其中該 $U-(C_2-C_{22}$ -鏈烷二基)-O 基團為 $O-(CH_2)_{2-6}-O$ 。
27. 如申請專利範圍第 24 項之 PNA 衍生物，其中該 $U-(CH_2CH_2-O)_{u'}$ 基團為 $O-(CH_2CH_2-O)_{u'}$ 。
28. 如申請專利範圍第 1 或 16 項之 PNA 衍生物，其中 X、X'、Z 及 Z' 係相互獨立的選自螢光素、玫瑰紅、TAMRA 或青色素染料、生物素、大西基(dabcyl)、補骨脂內酯、吖啶、DNP、膽固醇、維生素 E' 大西基(dabcyl)、伊登(edans)、理西多辛(lexitropsin)、補骨脂內酯、BODIPY'ROX、R6G 或狄氧寧(digoxigenin) 自由基。
29. 如申請專利範圍第 1 或 16 項之 PNA 衍生物，其中 X、X'、Z 及 Z' 係相互獨立的選自單磷酸鹽、生物素衍生物及螢光素衍生物。
30. 如申請專利範圍第 1 或 16 項之 PNA 衍生物，其中 Z 為螢光標記且 Z' 為淬熄劑。
31. 如申請專利範圍第 1 或 16 項之 PNA 衍生物，其中 Z 為淬熄劑及 Z' 為螢光標記。
32. 如申請專利範圍第 1 或 16 項之 PNA 衍生物，其中 Z 及 Z' 係相互獨立為 C_1-C_{22} -烷基，或 C_1-C_{22} -U 基，

六、申請專利範圍

或羥基- $C_1-C_{18}-U$ ，

或胺烷基-U 基，

或式 $R_7-(CH_2CH_2-O)_m$ 基團，或氫硫基烷基-V 基。

33. 如申請專利範圍第 32 項之 PNA 衍生物，其中該 C_1-
5 $C_{22}-U$ 基為 C_1-C_{22} -烷氧基。
34. 如申請專利範圍第 33 項之 PNA 衍生物，其中該 C_1-
 $C_{22}-U$ 基為 C_{16} -烷氧基。
35. 如申請專利範圍第 32 項之 PNA 衍生物，其中該羥基-
 $C_1-C_{18}-U$ 基為羥基- $C_1-C_{18}-O$ 。
- 10 36. 如申請專利範圍第 35 項之 PNA 衍生物，其中該羥基-
 $C_1-C_{18}-U$ 基為 $HO-(CH_2)_{3-12}-O$ 。
37. 如申請專利範圍第 32 項之 PNA 衍生物，其中該胺基
烷基-U 基為胺基烷氧基。
38. 如申請專利範圍第 37 項之 PNA 衍生物，其中該胺基
15 烷基-U 基為 6-胺基己氧基或 5-胺基戊氧基。
39. 如申請專利範圍第 32 項之 PNA 衍生物，其中 R_7 為
 OH 或 NH_2 且 m 為 1 至 6。
40. 如申請專利範圍第 39 項之 PNA 衍生物，其中該 R_7-
 $(CH_2CH_2-O)_m$ 基團為 $HO(CH_2CH_2-O)_2$ 。
- 20 41. 如申請專利範圍第 39 項之 PNA 衍生物，其中該 R_7-
 $(CH_2CH_2-O)_m$ 基團為 $HO(CH_2CH_2-O)_6$ 。
42. 如申請專利範圍第 39 項之 PNA 衍生物，其中該 R_7-
 $(CH_2CH_2-O)_m$ 基團為 $H_2N(CH_2CH_2-O)_2$ 。
43. 如申請專利範圍第 32 項之 PNA 衍生物，其中該氫硫

六、申請專利範圍

基烷基-V 基為氫硫基烷氧基。

44. 如申請專利範圍第 43 項之 PNA 衍生物，其中該氫硫基烷基-V 基為 6-氫硫基己氧基。

5 45. 如申請專利範圍第 1 或 16 項之 PNA 衍生物，其中 q 為 0。

46. 如申請專利範圍第 45 項之 PNA 衍生物，其中 D' 為醯胺基。

47. 如申請專利範圍第 46 項之 PNA 衍生物，其中 D' 為乙醯胺基。

10 48. 如申請專利範圍第 1 或 16 項之 PNA 衍生物，其中 D 為 $(CH_2)_t$ 。

49. 如申請專利範圍第 48 項之 PNA 衍生物，其中 D 為 $(CH_2)_2$ 。

15 50. 如申請專利範圍第 1 或 16 項之 PNA 衍生物，其中 A、E 及 G 為 CH_2 。

20 51. 如申請專利範圍第 1 或 16 項之 PNA 衍生物，其中 B 為腺嘌呤、胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、鳥糞嘌呤、胸腺嘧啶及尿嘧啶，或為嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、 N^4N^4 -乙橋胞嘧啶、 N^6N^6 -乙橋-2,6-二氨基嘌呤、5-(C_3 - C_6)-炔基尿嘧啶、5-(C_3 - C_6)-炔基-胞嘧啶、5-(1-炔丙基胺基)尿嘧啶、5-(1-炔丙基胺基)胞嘧啶、啡啶、9-胺基乙氧基啡啶、5-氟尿嘧啶或假異胞嘧啶、5-(羥甲基)尿嘧啶、5-胺基尿嘧啶、假尿嘧啶、二氫尿嘧啶、5-(C_1 - C_6)-烷基尿嘧啶、5-(C_1 - C_6)-烷基-胞嘧啶、5-(C_2 -

六、申請專利範圍

C₆)-烯基胞嘧啶、5-氟胞嘧啶、5-氟尿嘧啶、5-氯胞嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-溴胞嘧啶、7-去氮腺嘌呤、7-去氮鳥糞嘌呤、8-重氮嘌呤、或 7-去氮-7-經取代的嘌呤。

- 5 52. 如申請專利範圍第 1 或 16 項之 PNA 衍生物，其中鹼基序列係可直接的對抗腫瘤抑制基因、致癌基因或末端酵素、端粒酵素、或其轉錄產物之部分。
53. 如申請專利範圍第 52 項之 PNA 衍生物，其中 PNA 之鹼基序列係可直接的對抗 HA-ras 傳訊 RNA 轉譯作用之起始。
- 10 54. 如申請專利範圍第 1 項之 PNA 衍生物，其係作為藥品。
55. 如申請專利範圍第 1 項之 PNA 衍生物，其係用於生產藥品治療腫瘤。
- 15 56. 如申請專利範圍第 1 項之 PNA 衍生物，其係作為診斷劑。
57. 如申請專利範圍第 1 項之 PNA 衍生物，其係用於偵測微生物及/或病毒。
58. 如申請專利範圍第 1 項之 PNA 衍生物，其係用於偵測及/或定量核酸。
- 20 59. 如申請專利範圍第 1 項之 PNA 衍生物，其係作為原位雜交或螢光原位雜交之偵測試劑。
60. 如申請專利範圍第 1 項之 PNA 衍生物，其係作為反意義藥劑、抗-基因藥劑、誘餌藥劑或嵌合體藥劑上

六、申請專利範圍

之用途。

61. 如申請專利範圍第 30 項之 PNA 衍生物，其係作為分子燈標。
- 5 62. 如申請專利範圍第 31 項之 PNA 衍生物，其係作為分子燈標。
63. 一種偵測試劑，其係包含如申請專利範圍第 1 至 53 項之 PNA 衍生物。
64. 一種 PNA 晶片，其係包含如申請專利範圍第 1 項之 PNA 衍生物及一適於製造微陣列(microarray)之基板。
10
65. 一種生物感應器，其係包含如申請專利範圍第 1 項之 PNA 衍生物及一適於自 PNA 衍生物至偵測裝置傳導訊號之基板。
66. 一種供預防及/或治療伴隨特定基因表現或過度表現之疾病的醫藥組成物，其包含如申請專利範圍第 1-29
15 或 32-53 項中任何一項之 PNA 衍生物及其它醫藥學上耐受的適當添加劑及/或賦形劑。
67. 一種反股藥劑，其包含如申請專利範圍第 1 至 53 項中任何一項之 PNA 衍生物。
- 20 68. 一種抗-基因藥劑，其包含如申請專利範圍第 1 至 53 項中任何一項之 PNA 衍生物。
69. 一種誘餌藥劑，其包含如申請專利範圍第 1 至 53 項中任何一項之 PNA 衍生物。
70. 一種嵌合體藥劑，其包含如申請專利範圍第 1 至 53

六、申請專利範圍

項中任何一項之 PNA 衍生物。

71. 一種製備式 I 之 PNA 衍生物的方法，其中

a) 將醯胺基核酸之 C 端聯結至固相-結合的磷醯化試劑，或 C-端磷酸化的醯胺基核酸結合至固體支持物，

b) 將 PNA 寡聚物之骨幹用活化的單體延伸，

c) 視須要將 N-端與磷醯化試劑反應。

72. 如申請專利範圍第 71 項之方法，其中製備 PNA 係使用 t-丁氧基羰基(BOC)、9-苄基甲氧羰基(Fmoc)或單甲氧基三苯甲基(Mmt)保護基團。

73. 如申請專利範圍第 71 或 72 項之方法，其中製備 PNA 係使用固體支持物。

74. 如申請專利範圍第 73 項之方法，其中係使用 CPG、tentagel 或胺甲基聚苯乙烯作為固體支持物。

75. 一種生產如申請專利範圍第 66 項之醫藥組成物的方法，其中

a) 製備如申請專利範圍第 1-29 或 32-53 項之 PNA 衍生物，及

b) 再添加在醫藥學上耐受的適當添加劑及/或賦形劑。

76. 一種生產 PNA 晶片之方法，其中申請專利範圍第 1 至 53 項中任何一項之 PNA 衍生物，可先新鮮製備後固定在固體支持物上或 PNA 衍生物以直接製備在支持物上。

六、申請專利範圍

77. 如申請專利範圍第 71 項的方法，其中 PNA 再用色層分析法或電泳另行純化，以利用磷自由基之酸性特性。
- 5 78. 如申請專利範圍第 77 項之方法，其中 PNA 衍生物係用色層分析法純化，使用鹼性的固定相及其中內含酸或鹽梯度之溶析液。
79. 如申請專利範圍第 78 項之方法，其中固定相是陰離子交換器或混合-模式相。

裝
訂
線