



(12) PATENT

(19) NO

(11) 333193

(13) B1

NORGE

(51) Int Cl.

G01N 33/53 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 11/06 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61P 17/06 (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)
C08G 69/48 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 21/78 (2006.01)
G01N 33/58 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20024959	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2001.04.07 PCT/EP2001/04030
(22)	Inng.dag	2002.10.15	(85)	Videreføringsdag	2002.10.15
(24)	Løpedag	2001.04.07	(30)	Prioritet	2000.04.18, DE, 10019135
(41)	Alm.tilgj	2002.10.15			
(45)	Meddelt	2013.04.02			
(73)	Innehaver	Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Brüningstrasse 50, DE-65926 FRANKFURT AM MAIN, Tyskland			
(72)	Oppfinner	Eugen Uhlmann, Zum Talblick 31, DE-61479 GLASHÜTTEN, Tyskland Gerhard Breipohl, Geisenheimer Strasse 95, D-60529 Frankfurt am Main, Tyskland David William Will, Kirchstrasse 21, DE-65830 KRIFTEL, Tyskland			
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge			
(54)	Benevnelse	Polyamidnukleinsyrederivater, anvendelse derav, midler inneholdende PNAderivatet og fremgangsmåter for deres fremstilling.			
(56)	Anførte publikasjoner	WO 9933867 A EP 0672677 A2 US 5874553 A			
(57)	Sammendrag				

Gjenstand for oppfinnelsen er PNA-derivater som på C-terminalen eller C- og N-terminalen av PNA-skjelettet bærer en eller flere fosforylrester, som eventuelt bærer en eller flere markørgrupper eller grupper for tverrbinding, eller grupper som begunstiger det intracellulære opptaket, eller grupper som øker bindingsaffiniteten av PNA-derivatet til nukleinsyrer. Gjenstand for oppfinnelsen er videre en fremgangsmåte for fremstilling av de ovenfor nevnte PNA-derivatene og, deres anvendelse som legemiddel eller diagnostikum.

Foreliggende oppfinnelse vedrører karboksyterminalt og karboksy-/aminoterminalt fosforylerte polyamidnukleinsyre-(PNA)-derivater med forbedrede egenskaper, deres anvendelse, samt midler inneholdende PNA-derivatene og fremgangsmåter for deres fremstilling.

Polyamidnukleinsyrer, også betegnet peptidnukleinsyrer (PNA) binder med høy affinitet naturlige oligonukleotider til komplementære målsekvenser (DNA eller RNA) og har, sammenlignet med naturlig DNA, i tillegg den fordelen at de er meget stabile i serum. PNA ble opprinnelig beskrevet som unaturlige nukleinsyreanaloger, hvori den samlede sukker-fosfat-ryggraden er erstattet med N-(2-aminoetyl)-glysinenheter (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). Som baser benyttes de innenfor nukleotidkjemien vanlige naturlig forekommende, eller også ikke-naturlig forekommende, nukleobasene eller deres promedikamentformer, dvs forstadier som først i organismen overføres til den frie basen ved biotransformasjon. Dessuten er det beskrevet PNA'er hvori ikke alle posisjonene på ryggraden bærer baserester (Greiner et al. (1999) *Helv. Chim. Acta* 82, 2151), og hvori aminoetylglutamin er erstattet med mer komplekse enheter (Uhlmann et al. (1998) *Angewandte Chem. Int. Ed.* 37, 2796; Falkiewicz (1999) *Biochem. Pol.*, 46, 509-529).

WO A 9933867 beskriver modifiserte PNA-derivater hvori individuelle PNA monomerer er modifisert for å bære en sur gruppe, for eksempel en fosfatgruppe. Det beskrives oligomerer omfattende slike modifiserte PNA monomerer. Det angis videre at enhver monomerenhet av oligomeren kan være en modifisert monomerenhet, men det er spesielt foretrukket at den modifiserte monomere enheten er plassert i den indre tredjedelen av den samlede lengden av det oligomere molekylet.

EP A2 0672677 beskriver blandede DNA-PNA oligomerer. Disse oligomerene kan omfatte fosfatgrupper på grunn av nærværet av DNA-baserte nukleosider. DNA-delen av oligomeren kan også være til stede ved 3'-enden av oligomeren som tilsvarer C-terminalen av oligomeren, når orienteringen av oligomeren er definert med hensyn til PNA delen. Det skal imidlertid bemerkes at det bare beskrives fosfatgrupper som er kovalent forbundet til ribose eller desoksyribose.

US A 5874553 beskriver oligonukleotidanaloger hvori hver monomer enhet er modifisert ved en negativt ladet fosfonatgruppe og ikke en fosforylgruppe.

Den ladningsnøytrale karakteren av PNA-ryggraden er et viktig trekk for denne stoffklassen, med vidtgående konsekvenser. Det tilskrives den nøytrale karakteren for PNA og den dermed forbundede reduserte ladningsavstøtningen, at PNA selv ved lav saltkonsentrasjon bindes til komplementært DNA og RNA (f.eks. *Peptide Nucleic Acids: Protocols and Applications*; Peter E. Nielsen og Michael Egholm (red.) Horizon Scientific Press, 1999, 3), hvorved Watson-Crick-baseparingsreglene følges. Følgelig kan PNA i prinsippet anvendes for tallrike anvendelser, hvori ellers naturlige oligonukleotider hhv. oligonukleotidderivater anvendes. Dessuten foreligger på grunn av de spesielle bindingsegenskapene også tallrike anvendelser som ikke er mulige med naturlige oligonukleotider (se for eksempel: *Peptide Nucleic Acids: Protocols and Applications*; Peter E. Nielsen og Michael Egholm (red.) Horizon Scientific Press, 1999). Eksempelvis er det med PNA observert en strenginvasjon på dobbelkjedet DNA.

Typiske eksempler på anvendelse av PNA omfatter deres anvendelse for inhibering av genekspresjon ved sekvensspesifikk binding til cellulært DNA eller RNA.

“Antisensmidler” er korte, enkeltkjedede nukleinsyrederivater, som via Watson-Crick baseparing bindes til et komplementær mRNA, hvis translasjonen i det tilsvarende proteinet skal hemmes (Uhlmann og Peyman (1990) *Chem. Rev.* 90, 543; Larsen et al. (1999) *Biochem. Biophys. Acta* 1489, 159). “Anti-gen-agenser” binder over Hoogsteen-baseparing i den store furen av DNA-dobbeltheliksen under dannelse av en trippelheliks, hvorved transkripsjonen av genene hemmes sekvensspesifikt (Praseuth et al. (1999) *Biochem. Biophys. Acta* 1489, 181). Genekspresjonen kan også hemmes spesifikt ved hjelp av såkalte “lokke” (“Decoy”)-oligomerer som etterligner bindingsregionene for transkripsjonsfaktorer. Ved behandlingen med lokkeagenser lar bestemte transkripsjonsfaktorer seg oppfange sekvensspesifikt og derved forhindres aktivering av transkripsjonen (Mischiati et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 33114). En ytterligere gruppe av intracellulært virkende oligonukleotidderivater, “kimeraplastene”, anvendes for målrettet genkorrektur (Cole-Strauss et al. (1996) *Science* 273, 1386-1389).

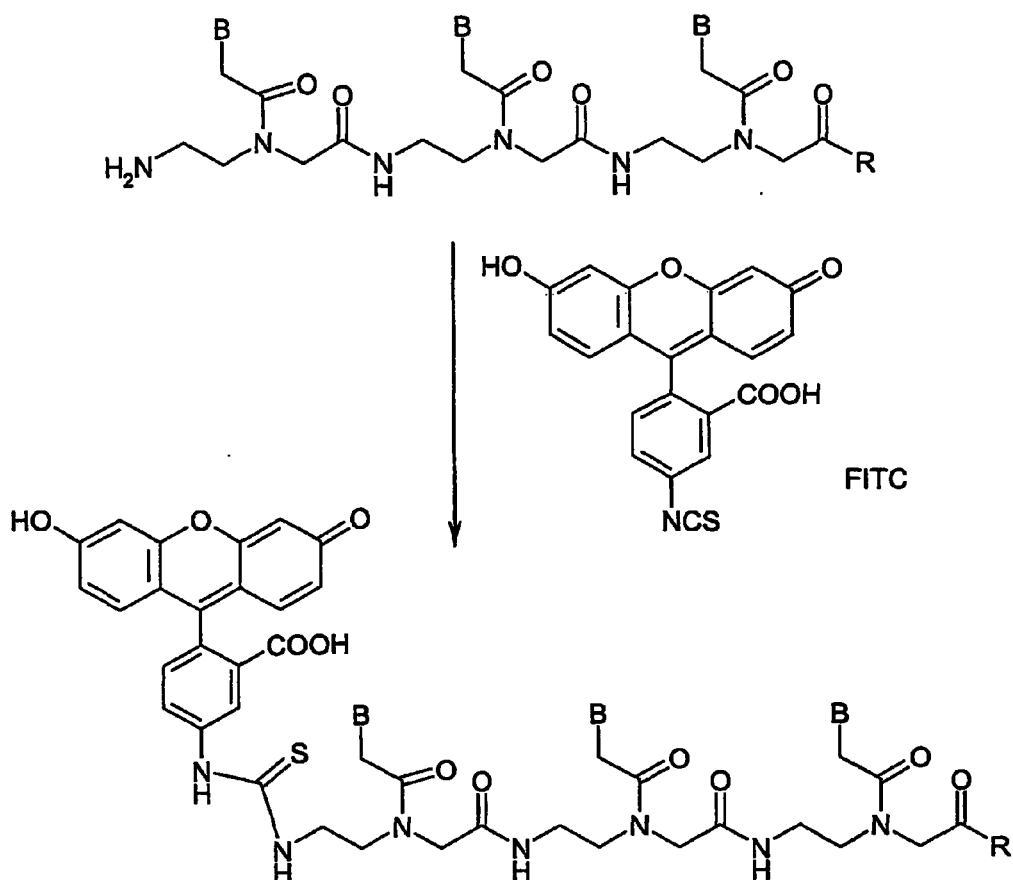
PNA kan følgelig anvendes som legemiddel og/eller diagnostikum hhv. for fremstilling av legemidler og/eller diagnostika.

For diagnostiske formål og innenfor molekylærbiologien kan PNA eksempelvis anvendes etter merking med biotin, fluorescein eller andre merker som spesifikk hybridiseringssonde. For innføringen av merkegruppene er det i litteraturen hittil beskrevet fire metoder (Oerum et al. (1999), i *Peptide Nucleic Acids: Protocols and*

Applications, sidene 81-86; Lohse et al. (1997) *Bioconjugate Chem.* 8, 503). Den første metoden bygger på merkingen av det frie (avbeskyttede) PNA etter dets syntese i oppløsning. Derved omsettes aminoterminalen av PNA med en aktivert karboksylsyre eller et isotiocyanat. Ofte innføres i tillegg lysinrester i PNA, som deretter omsettes med fluoresceinisotiocyanat (FITC).

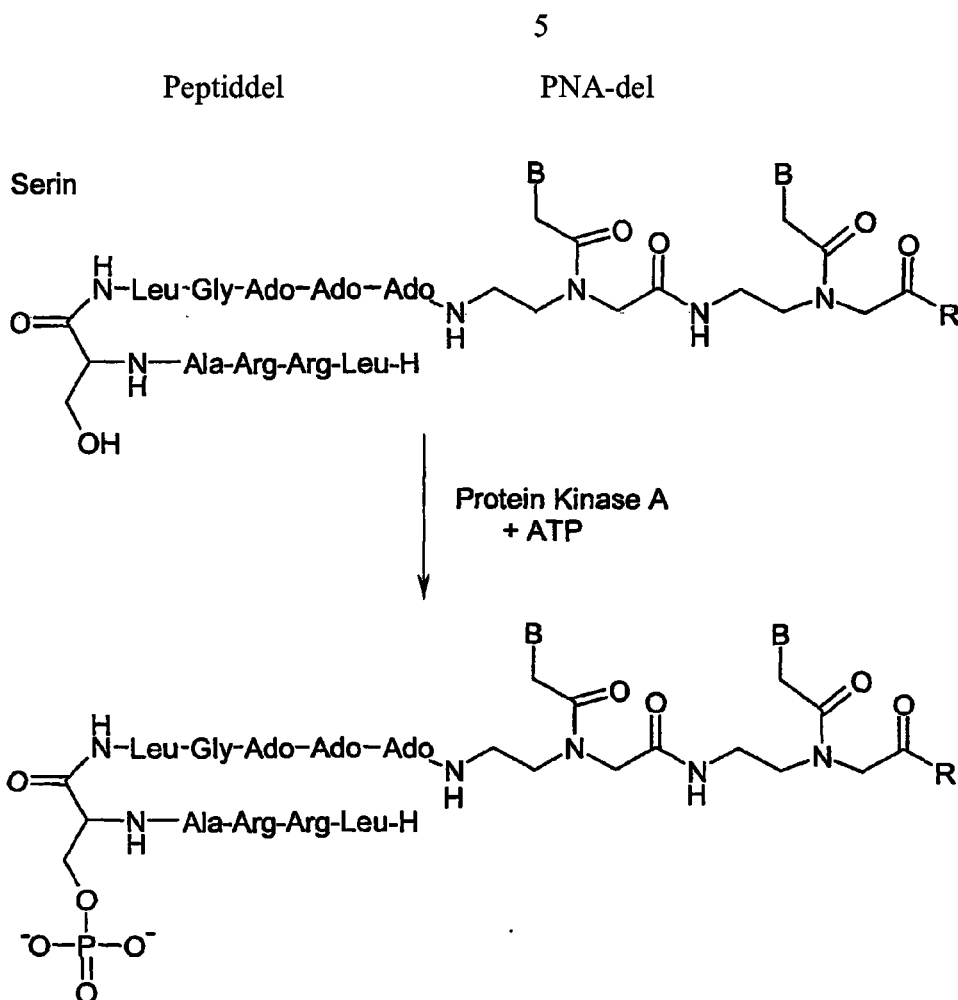
Ved den andre metoden modifiseres det beskyttede PNA på fastfasen på aminoterminalen med aktiverte karboksylsyrederivater eller isotiocyanater. Denne metoden egner seg bare for merkegrupper som er stabile under betingelsene for avbeskyttelsen av PNA og under avspaltningen fra bærer. Som reaktive reagenser anvendes i begge tilfeller fortrinnsvis isotiocyanater (P. Wittung et al., (1995) *FEBS Lett.* 375, 27) eller aktiverte karboksylsyrer, som eksempelvis N-hydroksysuksinimid-ester (NHS), (Oerum et al., 1999). En ulempe av reaksjonen med NHS-derivatene er at den ofte bare lykkes i dårlige utbytter. Derfor kondenseres ofte 8-amino-3,6-dioksaoktansyre som linker hhv. avstandsgiver mellom PNA og merkegruppe (Oerum et al., 1999). Begge sammenføyningene foregår imidlertid over amidbindinger hhv. tioureabindinger, som, som sådanne, imidlertid heller fører til uoppløselighet. Alternativt bringes karboksylsyrene til reaksjon ved hjelp av innen peptidkjemien vanlige aktivatorer, som eksempelvis HBTU, TBTU eller HATU.

4



Ved en tredje metode anvendes fluoresceinkonjugerte monomerer ved fastfasesyntesen av PNA, hvorved fluorescensmerkingen foregår via en amidbinding (Lohse et al. (1997) Bioconjugate Chem. 8, 503), som igjen fører til relativt tungt oppløselige konjugater.

En fjerde metode anvender PNA-peptidkonjugater, hvori peptiddelen danner et substrat for en proteinkinase (Koch et al. (1995) Tetrahedron Lett. 36, 6933). På denne måten modifiseres altså ikke PNA-delen, men derimot fosforyleres serinresten av peptidsegmentet enzymatisk. Med denne metoden kan følgelig bare radioaktivt fosfat, men eksempelvis intet fluorescein eller biotin innføres i peptidsegmentet av PNA-peptidkonjugatet.



Det er kjent at PNA i vandig oppløsning, dvs også under fysiologiske betingelser, viser tendens til aggregering. PNA er følgelig dårlig oppløselig i vandig buffer og står da ikke til disposisjon for hybridiseringen til komplementære sekvenser. PNA viser i tillegg en høy affinitet til forskjellige materialer som Sephadex® (Fa. Pharmacia), Bond Elut® (Fa. Varian), eller forskjellige HPLC-kromatografimaterialer, som finner anvendelse ved rensingen av oligomerer, slik at PNA ofte bare isoleres med dårlige utbytter. Følgelig er det nødvendig å konjugere PNA med lysin eller andre positivt ladede aminosyrer (over C-terminalen) (Egholm et al (1992) J. Am. Chem. Soc. 114, 1895). Guaninrike PNA-sekvenser viser spesielt tendens til aggregering, anvendelsen av slikt PNA frarådes derfor (se "Guidelines for sequence design of PNA oligomers" i *Peptide Nucleic Acids: Protocols and Applications* (1999) sidene 253-255). Spesielt tungt oppløselige er eksempelvis lengre fluoresceinmerkede PNA-oligomerer, hvorved tilsatsen av et organisk oppløsningsmiddel og oppvarming til 50°C anbefales.

Rensingen av de tungt oppløselige lipofile PNA-derivatene er spesielt vanskelig. Ved HPLC detekteres ofte flere topper, som kan tilbakeføres til PNA-aggregater. Den for

rensing og adskillelse av nukleinsyrer ofte anvendte teknikken med polyakrylamid (PAA)-gelelektroforese er ikke mulig for disse PNA-derivatene.

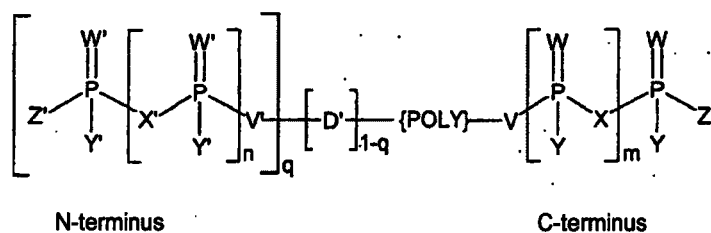
Ved de ovenfor omtalte metodene for derivatisering av PNA innføres merkegruppen stadig ved tilknytning av en amidbinding eller tioamidbinding, hvorved det dannes relativt tungt oppløselige PNA-derivater. Spesielt ved innføring av lipofile rester, som eksempelvis fluorescein, oppstår tungt oppløselige PNA-derivater. Innføringen av merkere ved begge endene av PNA er teknisk enda vanskeligere og fører generelt til en enda dårligere oppløselighet. Dessuten er det ikke beskrevet effektive metoder for en samtidig amino- og karboksyterminal derivatisering av PNA, spesielt ved fastfasesyntese. Idet merkingsreaksjonene i tillegg ofte forløper i dårlige utbytter består en oppgave som må løses i å tilveiebringe nye PNA-derivater som skal kunne fremstilles i høye utbytter og oppvise fordelaktige egenskaper, som forbedret oppløselighet, forbedret bindingsoppførsel, de skal oppvise forbedret cellulært opptak og i tillegg muliggjøre anvendelsen av effektive rensemetoder for PNA-oligomerene.

Oppgaven løses ifølge oppfinnelsen ved tilveiebringelsen av PNA-derivater som på C-terminalen eller på C- og N-terminalen av PNA-skjelettet bærer en eller flere fosforylrester, hvorved ved siden av okso- også tio- og iminofosforylrester er omfattet, og hvorved minst en av fosforylrestene bærer en eller flere deprotonerbare grupper, fortrinnsvis hydroksy- eller merkaptogrupper. Fosforylrestene er via en oksygen-fosfor, svovel-fosfor eller en nitrogen-fosforbinding enten tilknyttet direkte eller over en avstandsgiver med PNA-skjelettet, hvorved avstandsgiveren eksempelvis kan være et alkanoylamid, et poly(alkoksy)karboksamid eller en aminosyre. Eksempler på fosforylrester er fosfat, fosfonat, tiofosfat, fosfoamidat eller substituerte fosforylrester, hvorved substituerte fosforylrester eventuelt bærer en eller flere merkegrupper, eller grupper for tverrbinding, eller grupper som begunstiger det intracellulære opptaket eller grupper som øker bindingsaffiniteten av PNA-derivatet til nukleinsyrer.

Under merkegrupper forstår man derved grupper som muliggjør en kvalitativ eller kvantitativ bedømmelse av den kjemiske eller biologiske aktiviteten av PNA-derivatene, eksempelvis biotin eller fluorescein. Under kryssbinding forstår man dannelsen av intra- hhv. intermolekylære bindinger mellom romlig nabostilte funksjonaliteter. En gruppe for tverrbinding er eksempelvis psoralengruppen.

Oppfinnelsen vedrører fortrinnsvis PNA-derivater med formel I

7



hvorved

q er lik 0 eller 1,

D' er lik hydroksy, merkpto, amino, alkylamino eller acylamino,

V er uavhengig av hverandre lik oksygen, svovel, NR₁,

V' er uavhengig av hverandre lik oksygen, svovel, NR₁, en gruppe U-(CR₃R₄)_{u'}-C(O)-NH eller en gruppe U-(CH₂CH₂O)_{u'}-CH₂-C(O)-NH,

U er uavhengig av hverandre lik oksygen, svovel eller NH,

u' er uavhengig av hverandre lik 1 til 10, fortrinnsvis 1 til 4, spesielt foretrukket 1,

W og W' er uavhengig av hverandre lik oksygen, svovel eller NR₁,

Y og Y' er uavhengig av hverandre lik hydroksy, merkpto, oksyanion, tioat eller NR₁R₂,

X og X' er uavhengig av hverandre lik en gruppe U-(C₂-C₂₂-alkandiyl)-U eller en gruppe U-(CH₂CH₂-O)_{u'}, eller lik en merkegruppe, eller en gruppe for tverrbinding, eller en gruppe som begunstiger det intracellulære opptaket, eller gruppe som øker bindingsaffiniteten av PNA-derivatet til nukleinsyrer, eksempelvis en bifunksjonell fluorescein-, rodamin-, TAMRA-, biotin-, pyren-, dinitrofenyl-, kolesteryl-, akridin, adamantyl-, vitamin E-, cyaninfargestoff-, dabcy-, edans-, leksitropsin-, psoralen-, BODIPY-, ROX-, R6G- eller digoksigeninrest,

Z og Z' er uavhengig av hverandre lik hydroksy, merkapt, oksyanion, tioat eller NR_1R_2 , $\text{C}_1\text{-C}_{22}$ -alkyl, $\text{C}_1\text{-C}_8$ -arylalkyl, $\text{C}_1\text{-C}_{22}$ -alkyl-U, $\text{C}_1\text{-C}_8$ -arylalkyl-U, hydroksy- $\text{C}_1\text{-C}_{18}$ -U, aminoalkyl-U, merkaptalkyl-U, eller en gruppe med formelen $\text{R}_7(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-O})_m$, hvorved R_7 er lik hydroksy, amino eller $\text{C}_1\text{-C}_{22}$ -alkoksy og m er lik 1 til 100, fortrinnsvis 2 til 10, eller er lik en merkegruppe, eller en gruppe for tverrbinding, eller en gruppe som begunstiger det intracellulære opptaket, eller en gruppe som øker bindingsaffiniteten av PNA-derivatet til nukleinsyrer, eksempelvis en monofunksjonell eller bifunksjonell fluorescein-, rodamin-, TAMRA-, biotin-, pyren-, dinitrofenyl-, kolesteryl-, akridin-, adamantyl-, vitamin E-, cyaninfargestoff-, dabcy-, edans-, leksitropsin-, psoralen-, BODIPY-, ROX-, R6G- eller digoksigeninrest.

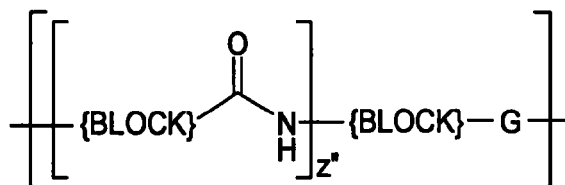
R₁ og R₂ betyr uavhengig av hverandre en rest bestående av hydrogen eller $\text{C}_1\text{-C}_6$ -alkyl, fortrinnsvis hydrogen,

R₃ og R₄ betyr uavhengig av hverandre en rest bestående av hydrogen eller $\text{C}_1\text{-C}_6$ -alkyl eller resten av en aminosyre-sidekjede, fortrinnsvis hydrogen, hvorved nabostilte rester R_3 og R_4 i V' også kan danne en $\text{C}_5\text{-C}_8$ -cykloalkylring,

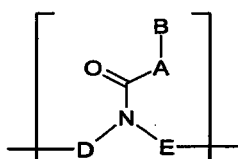
n er lik 0 til 10, fortrinnsvis 0 til 3,

m er lik 0 til 10, fortrinnsvis 0 til 3,

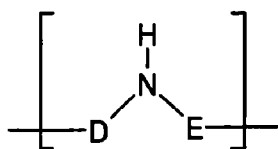
og hvorved {POLY} beskrives ved formel II



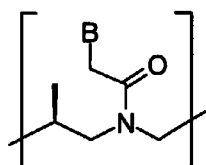
hvorved videre {BLOKK} uavhengig av hverandre er en gruppe valgt fra formel IIIA



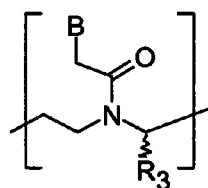
eller fra formel IIIB



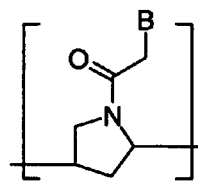
eller fra formlene IV A til IV G



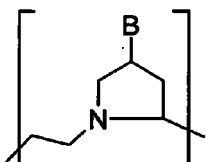
Formula IV A



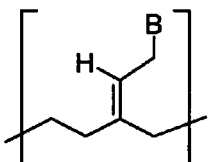
Formula IV B



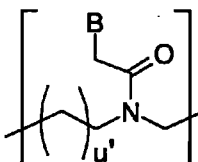
Formula IV C



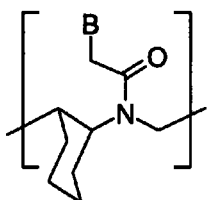
Formula IV D



Formula IV E



Formula IV F



Formula IV G

hvorved hver byggestein {BLOKK} kan være forskjellig,

og videre gjelder at

Z'' er lik 0 til 100, fortrinnsvis 1-20, spesielt foretrukket 4-15,

G er valgt fra gruppene $(CR_5R_6)_u'$, $C(O)NH-(CR_1R_2)_{t'}$ eller $C(O)NH-(CH_2CH_2O)_u'-CH_2CH_2$, hvorved t' er lik 2 til 10, fortrinnsvis 6,

A er uavhengig hverandre en gruppe $(CR_1R_2)_s$, hvorved s er lik 1 til 3, fortrinnsvis 1,

- B er uavhengig av hverandre enten en aromatisk rest, som også kan ha heteroaromatisk karakter, eller hydrogen eller hydroksy eller C₁-C₁₈-alkyl, eller en innenfor nukleotidkjemien vanligvis naturlig forekommende eller en ikke naturlig forekommende nukleobase eller deres promedikament,
- D er uavhengig av hverandre en gruppe (CR₃R₄)_t, hvorved t er lik 2 til 10, fortrinnsvis 2 til 4, spesielt foretrukket 2,
- E er uavhengig av hverandre en gruppe (CR₅R₆)_u, hvorved nabostilte rester R₅ og R₆ også kan danne en C₅-C₈-cykloalkylring eller en spiroforbindelse,
- R₅ og R₆ betyr uavhengig av hverandre en rest bestående av hydrogen eller C₁-C₆-alkyl eller resten av en aminosyresidekjede, fortrinnsvis hydrogen,

og hvorved u', R₁, R₂, R₃ og R₄ har samme betydning som beskrevet ovenfor,

samt fysiologisk godtagbare salter av PNA-derivatet med formel I, under den forutsetning at minst en rest Y, Y', Z eller Z' er lik hydroksy, merkpto, oksyanion eller tioat, og at minst en rest B er en nukleobase.

Fysiologisk godtagbare salter er blant annet beskrevet i Remingtons Pharmaceutical Science (1985) Mack Publishing Company, Easton, PA, USA, side 1418. Foretrukket er ammoniumsalter, trialkylammoniumsalter, alkalimetallsalter (som natrium- og kaliumsalter) og jordalkalisalter (som magnesium og kalsiumsalter). Spesielt foretrukket er natriumsalter.

Som overraskende positiv effekt viste det seg at innføringen av en fosforylrest eksempelvis som fosfat eller også i form av en lipofilderivatisering (f.eks. som heksadecylfosfodiester) forhøyer av affiniteten PNA til komplementært DNA eller RNA. Denne effekten kunne ikke ventes, idet den sterke bindingen av PNA til komplementært DNA eller RNA tilskrives den nøytrale karakteren av PNA og den dermed forbundede reduserte ladningsfrastøtningen (f.eks. Peptide Nucleic Acids: Protocols and Applications; Peter E. Nielsen og Michael Egholm (red.) Horizon Scientific Press, 1999, 3).

Spesielt effektivt foregikk innføringen av biotinet over en fosforylrest. Det biotinylerede PNA med formel I (X, X', Z og/eller Z' = biotinrest) viste som hybridiseringssonder

bedre bindingsegenskaper og mindre forstyrrende spesifikke bakgrunnseffekter enn tilsvarende biotinylerte DNA-sonder.

I motsetning til uladet PNA kan PNA-derivatene med formel I ifølge oppfinnelsen også vandre i elektrisk felt, hvorved en mikrolokalisering og en konsentrering på immobiliserte komplementære nukleinsyrederivater er mulig. For de polyanioniske oligonukleotidene er denne fremgangsmåten allerede beskrevet for rask bestemmelse av feilparing av baser ved hjelp av det elektriske feltet (Sosnowski et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94, 1119).

Hydroksy- hhv. merkaptosubstituentene på fosforylrestene av DNA-derivatene ifølge oppfinnelsen kan deprotoneres i et pH-område fra 4,5 til 14, fortrinnsvis 6,5 til 12, spesielt foretrukket 6,5 til 9. Egenskapen med ioniserbarhet av fosforylrestene kan fordelaktige utnyttes for rensing av forbindelsene med formel I. På den ene side kan forbindelsene med formel I renses ved elektroforese, eksempelvis polyakrylamid-gelelektroforese. På den annen side er en rensing ved hjelp av anionbyttere mulig. Derved elueres de ønskede produktene fortrinnsvis ved anvendelse av en saltgradient, eksempelvis en koksaltgradient, eller en pH-gradient.

Spesielt enkelt og effektivt kan PNA-derivatene med formel I ifølge oppfinnelsen renses over anionbyttere. Det har vist seg at de uladete biproduktene ikke retarderes på anionbytteren, mens det ladede produktet heftes på søylen. Etter vasking med vann kunne det ønskede produktet isoleres med eddiksyre eller en koksaltoppløsning i ren form. Som anionbytter anvendes fortrinnsvis sterke anionbyttere, eller Mixed-Mode-faser, som eksempelvis ®Oasis MAX (Waters GmbH, Eschborn).

Videre viste det seg at forbindelsene med formel I ifølge oppfinnelsen generelt er bedre oppløselige i vandig medium enn de tilsvarende PNA-oligomerene uten fosforylresten. Dette gjør seg spesielt merkbart ved de lipofile derivatene, som eksempelvis fluoresceinderivatene eller heksadecylderivatene, i form av sterkt forbedret oppløselighet i vandig medium.

Oppfinnelsen vedrører spesielt PNA-derivater hvori A og E er lik CH_2 . Videre vedrører oppfinnelsen spesielt PNA-derivater, hvori D er lik $(\text{CH}_2)_2$. Foretrukket er videre PNA-derivater med formel I, hvori W og W' er lik okso, videre slike hvori Y og Y' er lik hydroksy eller oksyanion, og slike hvori V og V' er lik oksy.

Eksempel på naturlige baser er adenin, cytosin, 5-metylcytosin, guanin, thymin og uracil. Eksempler på unaturlige baser er purin, 2,6-diaminopurin, N^4N^4 -etanocytosin, N^6N^6 -etano-2,6-diaminopurin, 5-(C_3 - C_6)-alkinyl-uracil, 5-(C_3C_6)-alkinyl-cytosin, 5-(1-propargylamino-uracil, 5-(1-propargylamino)-cytosin, fenoksazin, 9-aminoetoksyfenoksazin, 5-fluor-uracil eller pseudoisocytosin, 5-(hydroksymetyl)uracil, 5-aminouracil, pseudouracil, dihydrouracil, 5-(C_1 - C_6)-alkyl-uracil, 5-(C_1 - C_6)-alkyl-cytosin, 5-(C_2C_6)-alkenyl-cytosin, 5-fluorcytosin, 5-kloruracil, 5-klorcytosin, 5-bromuracil, 5-bromcytosin, 7-deazaadenin, 7-deazaguanin, 8-azapurin eller 7-deaza-7-substituerte puriner.

For PNA-derivater som bare C-terminalt bærer en fosforylrest (for hvilke q er lik 0) kan N-terminalen være forbundet med en peptidsekvens. Som peptidsekvenser kommer foretrukket slike i betraktning som optimaliserer organfordelingen eller den cellulære lokaliseringen av PNA, som eksempelvis transportan, insulinlignende vekstfaktor, kjernelokaliseringssignaler eller andre bæresekvenser (Larsen et al. (1999) Biochim. Biophys. Acta 159-166). Peptidet kan også tjene som affinitetstag, som for eksempel en His)₆-kjede.

Foreliggende oppfinnelse muliggjør en bred variasjon av restene X, X', Z og Z' (eksempler er angitt i figurene 1a, 1b, 2a, 2b, 3a og 3b) og muliggjør således innføringen av forskjellige spesifikke funksjonstrekk i PNA.

En foretrukket utførelsesform av Z hhv. Z' er en C_1 - til C_{22} -alkylrest. Foretrukket er også C_1 - til C_{22} -alkoksyrester, spesielt C_{16} -alkoksyrester. Andre foretrukne rester er hydroksy-(C_1 - C_{18} -alkoksy)-rester, spesielt $HO(CH_2)_{3-12}O$. Foretrukket er videre aminoalkoksyrester, spesielt 6-aminoheksoksy- og 5-aminopentoksyrester. Foretrukket er videre rester av formelen $R_7-(CH_2CH_2O)_m$, hvorved R_7 er lik hydroksy, amino eller C_1 - C_{22} -alkoksy, men fortrinnsvis hydroksy, og m er lik 1 til 100, fortrinnsvis 2 til 10. Spesielt foretrukket er $HO(CH_2CH_2-O)_2$, $HO(CH_2CH_2-O)_6$ og $H_2N-(CH_2CH_2-O)_2$. Ytterligere foretrukne eksempler på Z hhv. Z' omfatter merkaptoksyrester, spesielt 6-merkaptoksyloksy.

I en ytterligere foretrukket utførelsesform omfatter Z hhv. Z' en fluorescerende gruppe som fluorescein, rodamin, TAMRA eller et cyanin-fargestoff. Foretrukne fluorescerende grupper er å finne i figurene 1a til 3b. Helt spesielt foretrukket er også biotin for Z. Andre foretrukne grupper for Z omfatter dabcy, psoralen, akridin, DNP og kolesterol (figurer 1b og 2b), BODIPY-, ROX- eller R6G-rester (Su-Chun Hung et al. (1998)

Analytical Biochemistry 255, 32-38) og digoksigenin (Tarrason et al., Methods in Enzymology (1999) Vol. 313, 257-268).

Videre kan Z hhv. Z' være lik en gruppe bestående av en monofunksjonell eller en bifunksjonell fluorescein-, rodamin-, TAMRA-, biotin-, pyren-, dinitrofenyl-, kolesteryl-, akridin-, adamantyl-, vitamin-E-, cyaninfargestoff-, dabcy-, edans-, leksitropsin- eller psoralenrest. Monofunksjonelle endegrupper er eksempelvis oppført i figurene 1a, 1b, 2a og 3a, bifunksjonelle, brodannende grupper er oppført i figurene 2b og 3b. I en annen foretrukket utførelsesform er n og/eller m uavhengig av hverandre lik 0, dvs PNA-delen bærer på N- og/eller på C-terminalen i hvert tilfelle bare en fosforylrest.

En foretrukket utførelsesform av X hhv. X' er U-(C₂-C₂₂-alkandiyl)-U, spesielt O-(C₂-C₂₂-alkandiyl)-O, spesielt foretrukket O-(CH₂)₂₋₆-O. En annen foretrukket utførelsesform av X hhv. X' er en gruppe med formel U-(CH₂CH₂-O)_u', hvorved u' er lik 1 til 10, fortrinnsvis 1 til 6 og hvorved U fortrinnsvis er oksy. I en ytterligere foretrukket utførelsesform omfatter X hhv. X' en fluorescerende gruppe som fluorescein, rodamin, TAMRA eller et cyaninfargestoff, eksempelvis Cy3® (Fa. Amersham Pharmacia Biotech). Foretrukne bifunksjonelle grupper er finne i figurene 2a og 3a. Helt spesielt foretrukket er også biotin for X hhv. X'. Andre foretrukne grupper er dabcy-, psoralen-, akridin-, DNP-, kolesterol-, BODIPY-, leksitropsin-, digoksigenin-, ROX- og R6G-rester.

De forskjellige restene for X, X', Z og Z' i formel I kan oppfylle forskjellige funksjoner. Fluoresceinrestene har vidtrekkende anvendelse ved DNA-sekvensering, signalforsterkning eller som markør for bestemmelse av det cellulære opptaket av PNA. Cyaninfargestoffrestene (Cy3® og Cy5®) gir et vesentlig mer intenst og lengre varig fluorescenssignal enn fluorescein selv. Psoralenresten anvendes for tverrbinding (Cross-Linking) med komplementære nukleinsyrer. Akridinresten er en effektiv interkalator og kan dermed forsterke bindingsaffiniteten av PNA. Biotin-, akridin- og psoralenderivater kan også anvendes for antisens-forsøk. Videre kan heksadecyloksy- og kolesterol-derivater anvendes for forhøyelse av membranandeligheten av PNA. DNP-merkede forbindelser med formel I lar seg påvise med anti-DNP-antistoffer. Aminoalkoksyrester lar seg utnytte for kopling av ytterligere grupper, som eksempelvis leksitropsin (kfr. Eksempel 17; PNA-16). På lignende måte lar også merkptoalkoksygrupper seg anvende for ytterligere derivatisering.

Oppfinnelsen vedrører videre anvendelsen av PNA-derivater med formel I for fremstilling av legemidler. Disse legemidlene kan anvendes for forebyggelse og/eller behandling av sykdommer som starter med ekspresjon hhv. en overekspresjon av bestemte gener. Videre vedrører oppfinnelsen anvendelsen av PNA-derivater som diagnostikum. Disse diagnostika kan anvendes for tidlig erkjennelse av de ovenfor nevnte sykdommene.

Som legemidler hhv. diagnostikum lar PNA-derivatene med formel I ifølge oppfinnelsen seg utnytte avhengig av deres sekvens som antisens-, antigen-, "Decoy"-, og "kimeraplast"-agenser.

PNA-derivatene ifølge oppfinnelsen anvendes spesielt for fremstilling av legemidler for behandling av sykdommer hvorved definerte gener er årsak hhv. medvirker ved overekspresjon.

Disse legemidlene kan eksempelvis anvendes for behandling av sykdommer som fremkalles av vira, eksempelvis ved CMV, HIV, HSV-1, HSV-2, influensa, VSV, hepatitt b eller papilloma vira, hvorved den tilsvarende virussekvensen er målet.

Antisens-PNA-derivater ifølge oppfinnelsen, som er virksomme mot slike mål har eksempelvis følgende basesekvens.

a) mot CMV, f.eks.

SEQ ID NO: 1 5'-G C G T T T G C T C T T C T T C T T G C G-3'

b) mot HIV, f.eks.

SEQ ID NO: 2 5'-A C A C C C A A T T C T G A A A A T G G-3'

SEQ ID NO: 3 5'-A G G T C C C T G T T C G G G C G C C A-3'

c) mot HSV-1, f.eks.

SEQ ID NO: 4 5'-G C G G G G C T C C A T G G G G G T C G-3'

Slike legemidler egner seg eksempelvis også for behandling av kreft. Fortrinnsvis kan derved sekvenser komme til anvendelse som er rettet mot mål som er ansvarlige for at

kreft oppstår hhv. vokser, spesielt ved inhiberingen av telomerase (E. Matthes et al. (1999) *Nucleic Acids Res.* 27, 1152). Slike mål er videre:

- 1) Nukleære onkoproteiner, som eksempelvis c-myc, N-myc, c-myb, c-fos, c-fos/jun, PCNA, p120m
- 2) Cytoplasmiske/membranassosierte onkoproteiner som eksempelvis EJ-ras, c-Ha-ras, N-ras, rrg, bcl-2, cdc-2, c-raf-1, c-mos, c-src, c-abl, c-ets,
- 3) Cellulære reseptorer som eksempelvis EGF-reseptor, Her-2, c-erbA, VEGE-reseptor (KDR-1), retinoid-reseptorer, protein-kinase regulatorisk underenhet, c-fms, Tie-2, c-raf-1 kinase, PKC-alfa, protein kinase A (R1-alfa),
- 4) Cytokiner, vektfaktorer, ekstracellulær matriks som eksempelvis CSF-1, IL-6, IL-1a, IL-1b, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, bFGF, VEGF, myeloblastin, fibronectin.

Antisens-PNA-derivater som er virksomme mot slike mål har eksempelvis følgende basesekvens:

a) mot c-Ha-ras, f.eks.

SEQ ID NO: 5	5'-C A G C T G C A A C C C A G C-3'
SEQ ID NO: 6	5'-T A T T C C G T C A T-3'
SEQ ID NO: 7	5'-T T C C G T C A T C G C T C C T C A G G G G -3'

b) bFGF, f.eks.

SEQ ID NO: 8	5'-G G C T G C C A T G G T C C C -3'
--------------	--------------------------------------

c) c-myc, f.eks.

SEQ ID NO: 9	5'-G G C T G C T G G A G C G G G G C A C A C-3'
SEQ ID NO: 10	5'-A A C G T T G A G G G G C A T-3'

d) c-myb, f.eks.

SEQ ID NO: 11	5'-G T G C C G G G G T C T T C G G G C-3'
---------------	---

e) c-fos, f.eks.

SEQ ID NO: 12	5'-C G A G A A C A T C A T C G T G G-3'
SEQ ID NO: 13	5'-G G A G A A C A T C A T G G T C G A A A G-3'
SEQ ID NO: 14	5'-C C C G A G A A C A T C A T G G T C G A A G-3'
SEQ ID NO: 14	5'-C C C G A G A A C A T C A T G G T C G A A G-3'
SEQ ID NO: 15	5'-G G G G A A A G C C C G G C A A G G G G-3'

f) p120, f.eks.

SEQ ID NO: 16	5'-C A C C C G C C T T G G C C T C C C A C-3'
---------------	---

g) EGF-reseptor, f.eks.

SEQ ID NO: 17	5'-G G G A C T C C G G C G C A G C G C-3'
SEQ ID NO: 18	5'-G G C A A A C T T T C T T T T C C T C C-3'

h) p53 tumorsuppressor, f.eks.

SEQ ID NO: 19	5'-G G G A A G G A G G A G G A T G A G G-3'
SEQ ID NO: 20	5'-G G C A G T C A T C C A G C T T C G G A G-3'

i) bcl-2, f.eks.

SEQ ID NO: 21	5'-T C T C C C A G C G T G C G C C A T-3'
---------------	---

k) VEGF, f.eks.

SEQ ID NO: 22	5'-G C G C T G A T A G A C A T C C A T G-3'
SEQ ID NO: 23	5'-G G A G G C C C G A C C-3'
SEQ ID NO: 24	5'-G G T T T C G G A G G C-3'
SEQ ID NO: 25	5'-T G G T G G A G G T A G-3'
SEQ ID NO: 26	5'-G C A T G G T G G A G G-3'
SEQ ID NO: 27	5'-T T G G C A T G G T G G-3'
SEQ ID NO: 28	5'-G C C T G G G A C C A C-3'
SEQ ID NO: 29	5'-C A G C C T G G G A C C-3'
SEQ ID NO: 30	5'-T G C A G C C T G G G A-3'

SEQ ID NO: 31 5'-G T G C A G C C T G G G-3'
 SEQ ID NO: 32 5'-G G T G C A G C C T G G-3'
 SEQ ID NO: 33 5'-A T G G G T G C A G C C-3'
 SEQ ID NO: 34 5'-G G C T T G A A G A T G-3'
 SEQ ID NO: 35 5'-G C A G C C C C C G C A-3'
 SEQ ID NO: 36 5'-G C A G C A G C C C C C-3'

l) c-raf Kinase, f.eks.

SEQ ID NO: 37 5'-T C C C G C C T G T G A C A T G C A T T-3'

m) PKC-alfa, f.eks.

SEQ ID NO: 38 5'-G T T C T C G C T G G T G A G T T T C A-3'

n) proteinkinase A, f.eks.

SEQ ID NO: 39 5'-G C G T G C C T C C T C A C T G G C-3'

Legemidler inneholdende PNA-derivater med formel I egner seg eksempelvis videre for behandling av sykdommer som påvirkes ved integriner eller celle-celle-adhesjonsreseptorer, eksempelvis ved VLA-4, VLA-2, ICAM, VCAM eller ELAM.

Antisens-PNA-derivater som er virksomme mot slike mål har eksempelvis følgende basesekvens:

a) VLA-4, f.eks.

SEQ ID NO: 40 5'-G C A G T A A G C A T C C A T A T C-3'

b) ICAM-1, f.eks.

SEQ ID NO: 41 5'-G C C C A A G C T G G C A T C C G T C A-3'
 SEQ ID NO: 42 5'-C C C C C A C T T C C C C T C T C-3'
 SEQ ID NO: 43 5'-C T C C C C C A C C A C T T C C C C C T C-3'
 SEQ ID NO: 44 5'-G C T G G G A G C C A T A G C G A G G-3'

c) ELAM-1, f.eks.

SEQ ID NO: 45 5'-A C T G C T G C C T C T T G T C T C A G G-3'

SEQ ID NO: 46 5'-C A A T C A A T G A C T T C A A G A G T T C-3'

d) Integrin alfa(V), f.eks.

SEQ ID NO: 47 5'-G C G G C G G A A A G C C A T C G-3'

Legemidler inneholdende PNA-derivater med formel I egner seg eksempelvis også for forebygging av restenose. Derved kan PNA-sekvenser komme til anvendelse som er rettet mot mål (targets) som er ansvarlige for proliferasjonen eller migreringen. Slike mål er eksempelvis:

- 1) nukleære transaktivatorproteiner og cykliner, som eksempelvis c-myc, c-myb, c-fos, c-fos/jun, cykliner og cdc-2-kinase.
- 2) mitogener eller vekstfaktorer, som eksempelvis PDGF, bFGF, VEGF, EGF, HB-EGF og TGF- β .
- 3) cellulære reseptorer, som eksempelvis bFGF-reseptorer, EGF-reseptor og PDGF-reseptor.

Antisense-PNA-derivater, som er virksomme mot slike mål, har eksempelvis følgende basesekvens:

a) c-myb, f.eks.

SEQ ID NO: 48 5'-G T G T C G G G G T C T C C G G G C-3'

b) c-myk f.eks.

SEQ ID NO: 49 5'-C A C G T T G A G G G G C A T-3'

c) cdc2-kinase, f.eks.

SEQ ID NO: 50 5'-G T C T T C C A T A G T T A C T C A-3'

d) PCNA (prolifererende cellekjerneantigen av rotte), f.eks.

SEQ ID NO: 51 5'-G A T C A G G C G T G C C T C A A A -3'

PNA-derivater kan likeledes anvendes for behandling av vitiligo og andre depigmenteringssykdommer hhv. depigmenteringsforstyrrelser (f.eks. huden, håret, øynene) som eksempelvis albinisme og psoriasis, eller for behandling av astma, hvorved ekspresjonen av adenosin-A1-reseptoren, adenosin-A3-reseptoren, bradikinin-reseptoren eller av IL-13 inhiberes ved hjelp av egnede antisensmidler. En slik basesekvens er eksempelvis:

SEQ ID NO: 52 5'-G A T G G A G G G C G G C A T G G C G G G -3'

Legemidler inneholdende et PNA-derivat med formel 1 kan f.eks. anvendes i form av farmasøytiske preparater som man kan administreres oralt, f.eks. i form av tabletter, drageer, hård- eller mykgelatinkapsler, oppløsninger, emulsjoner eller suspensjoner. De kan også administreres rektalt, f.eks. i form av suppositorier eller parenteralt, f.eks. i form av injeksjonsoppløsninger. For fremstillingen av farmasøytiske preparater kan disse forbindelsene bearbeides i terapeutisk inerte organiske og uorganiske bærere. Eksempler på slike bærere for tabletter, drageer og hårdgelatinkapsler er laktose, maisstivelse eller derivater derav, talg og stearinsyre eller salter derav. Egnede bærere for fremstillingen av oppløsninger er vann, polyoler, sakkarose, invertsukker og glukose. Egnede bærere for injeksjonsoppløsninger er vann, alkoholer, polyoler, glyserol og vegetabiliske oljer. Egnede bærere for suppositorier er vegetabiliske og herdede oljer, vokstyper, fett og halvflytende polyoler. De farmasøytiske preparatene kan også inneholde konserveringsmidler, oppløsningsmidler, stabiliseringsmidler, fuktemidler, emulgatorer, søtningsstoffer, fargestoffer, smaksmidler, salter for forandring av det osmotiske trykket, buffere, overtrekksmidler, antioksidanter, samt eventuelt andre terapeutiske virkestoffer.

Foretrukne administreringsformer er topiske anvendelser, lokale anvendelser som eksempelvis ved hjelp av et kateter eller ved inhalering, injeksjoner hhv. infusjoner og den orale administreringen. For injeksjon formuleres PNA-derivatene med formel I i en flytende oppløsning, fortrinnsvis i en fysiologisk godtagbar buffer, som f.eks. Hank's oppløsning eller Ringer's oppløsning. Oligonukleotidene kan imidlertid også formuleres

i fast form og før bruk oppløses eller suspenderes. De for systematisk administrering foretrukne doseringene utgjør ca 0,01 mg/kg til ca 50 mg/kg kroppsvekt og dag.

Oppfinnelsen vedrører videre legemidler som inneholder PNA-derivater med formel I og/eller deres fysiologisk godtagbare salter ved siden av farmasøytisk godtagbare bære- og/eller tilsatsstoffer. PNA-derivatene med formel I og/eller deres fysiologisk godtagbare salter kan administreres til dyr, fortrinnsvis til pattedyr, og spesielt til mennesker som legemiddel alene, i blanding med hverandre eller i form av farmasøytiske preparater, som tillater en topisk, perkutan, parenteral eller enteral anvendelse og som aktiv bestanddel inneholder en virksom dose av minst ett PNA-derivat ved siden av vanlige farmasøytisk godtagbare bære- og tilsatsstoffer. Preparatene inneholder normalt ca 0,1 til 90 vekt% av den terapeutisk virksomme forbindelsen. For behandling av hudsykdommer foretrekkes en topisk anvendelse, f.eks. i form av salter, lotions eller tinkturer, emulsjoner, suspensjoner.

Fremstillingen av de farmasøytiske preparatene foregår på i og for seg kjent måte (f.eks. Remingtons Pharmaceutical Sciences, Mack Publ. Co., Easton, PA), hvorved farmasøytisk inerte, uorganiske og/eller organiske bærestoffer anvendes. For fremstillingen av piller, tabletter, drageer og hårdgelatinkapsler kan man f.eks. anvende laktose, maisstivelse og/eller derivater av disse, talk, stearinsyre og/eller deres salter. Bærestoffer for mykgelatinkapsler og/eller suppositorier er f.eks. fett, vokser, halvfast og flytende polyoler, naturlige og/eller herdede oljer osv., som bærestoffer for fremstillingen av oppløsninger og/eller siruper egner seg f.eks. vann, sakkarose, invertsukker, glukose, polyoler osv., som bærestoffer for fremstillingen av injeksjonsoppløsninger egner seg vann, alkoholer, glyserol, polyoler, vegetabiliske oljer osv., som bærestoffer for mikrokapsler, implantater og/eller "Rods" egner blandepolymerisater av glykolsyre og melkesyre. Dessuten er liposomformuleringer som er kjente for fagmannen egnede (N. Weiner, Drug Develop Ind Pharm 15 (1989) 1523; "Liposome Dermatics, Springer Verlag 1992), eksempelvis HVJ-liposomer (Hayashi, Gene Therapy 3 (1996) 878). Den dermale anvendelsen kan eksempelvis også foregå ved hjelp av ionoforetiske metoder og/eller ved hjelp av elektroporering.

Et farmasøytisk preparat kan ved siden av virke- og bærerstoffene også inneholde tilsatsstoffer, som f.eks. fyllstoffer, drøye-, spreng-, binde-, glide-, fukte-, stabilings-, emulgerings-, konserverings-, søtnings-, farge-, smaks- eller aromatiserings-, fortyknings-, fortynningsmidler, bufferstoffer, videre oppløsningsmidler og/eller oppløsningsformidlere og/eller midler for å oppnå en depoteffekt, samt salter for

forandring av det osmotiske trykket, overtrekksmidler og/eller antioksidanter. De kan også inneholde to eller flere forskjellige PNA-derivater med formel I og/eller deres fysiologisk godtagbare salter samt videre ved siden av minst ett PNA-derivat med formel I ett eller flere andre, terapeutisk virksomme stoffer. Dosen kan varieres innenfor for vide grenser og tilpasses i hvert enkelt tilfelle de individuelle forholdene.

Videre vedrører oppfinnelsen anvendelsen av PNA-derivater med formel I som diagnostikum, spesielt som hjelpemiddel innenfor DNA-diagnostikk og innenfor molekylærbiologi (se for eksempel: *Peptide Nucleic Acids: Protocols and Applications*; Peter E. Nielsen og Michael Egholm (red.) Horizon Scientific Press, 1999). Innenfor DNA-diagnostikken spiller gensonder, også betegnet DNA-sonder eller hybridiseringssonder, en stor rolle for genspesifikk påvirkning av bestemte gener. En gensonde består generelt av en gjenkjenningssekvens og en, henholdsvis flere, egnede merkegrupper. Spesifisiteten av bestemmelsen av en målsekvens i en analyseprobe ved hjelp av hybridisering med en komplementær gensonde bestemmes ved gjenkjenningssekvensen og dens kjemiske struktur. Denne teknikken kan overføres på PNA. PNA har sammenlignet med oligonukleotidene av naturlig struktur den fordel at den oppviser en høyere affinitet til målsekvens og en høyere evne til basediskriminering.

Anvendelsen av forbindelsene med formel I vedrører følgelig også in-situ-hybridisering og fluorescens-in-situ-hybridisering (FISH). In-situ-hybridiseringen kan eksempelvis også tjene til påvirkning av mikroorganismer og vira (Just et al. (1998) *J. Vir. Method.* 73, 163-174). En ytterligere anvendelse av forbindelsen ifølge oppfinnelsen vedrører påvirkning og kvantifisering av nukleinsyrer. Hertil betjener man seg fortrinnsvis også av Array-teknologien (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), som oppviser en høy probegjennomgang og høy følsomhet. Derved fikseres PNA-sonden på en egnet bærer eller PNA-chip. For dette formålet kan PNA syntetiseres som beskrevet i eksemplene og deretter fikseres på bæreren eller PNA-chipen. Alternativt kan PNA fremstilles direkte på bæreren. En ytterligere anvendelse er anvendelsen av forbindelsene med formel I som biosensorer for deteksjon av nukleinsyrer (Wang et al (1996) *J. Am. Chem. Soc.* 118, 7667). Anvendelsen av PNA med formel I med et affinitetsmerke, som eksempelvis histidyl-PNA, er en ytterligere anvendelse for rensing av nukleinsyrer (Oerum et al. (1999), i *Peptide Nucleic Acids: Protocols and Applications*).

De to fosforylrestene på amino- og karboksyterminal kan oppfylle forskjellige funksjoner. Eksempelvis kan aminoterminalen være lipofilt substituert for forhøyelse av det cellulære opptaket, mens det på karboksyterminalen befinner seg en fluoresceinrest for påvisning av det forbedrede celleopptaket (kfr. PNA-6 i eksempel 7).

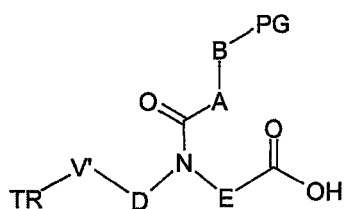
De to ganger derivatiserte forbindelsene med formel I egner seg også som såkalte "Molecular Beacons" (Li et al. (2000) *Angew. Chemie* 112, 1091-1094), som først ved bindingen til en komplementær nukleinsyre avgir et fluorescenssignal. I disse "Beacons" er en ende av PNA, eksempelvis aminoterminalen, utstyrt med et fluorescensmerke, mens den andre enden, eksempelvis karboksyterminalen, er utstyrt med en slukker (Quencher). Også det omvendte tilfellet, hvori N-terminalen bærer en slukker og C-terminalen et fluorescensmerke er mulig. Derved kommer det til undertrykkelse av fluorescenssignalet, så lenge dobbeltmerket PNA-derivat ikke binder til en komplementær nukleinsyre. Først ved bindingen blir fluorescensresten (f.eks. edaner) og slukkeren (f.eks. dabcy1) romlig adskilt fra hverandre, slik at det sendes ut et fluorescenssignal (Sokol et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 11538).

Syntesen av PNA-skjelettet foregår ved metoder som er beskrevet i litteraturen, for eksempel ifølge tert-butyloksykarbonyl- (BOC), 9-fluorenylmetoksykarbonyl- (Fmoc) eller monometoksytrityl- (Mmt) beskyttelsesgruppestrategi (*Peptide Nucleic Acids: Protocols and Applications*; Peter E. Nielsen og Michael Egholm (red.) Horizon Scientific Press, 1999). Fortrinnsvis anvendes Mmt-beskyttelsesgruppen for temporær beskyttelse av aminofunksjonen av aminoetylglisinet og baselabile beskyttelsesgrupper på de heterocykliske nukleobasene (D. Will et al. (1995) *Tetrahedron* 51, 12069; Breipohl et al. (1997) *Tetrahedron* 53, 14671-14686). Eksempler på monomerbyggesteiner er forbindelser med formler V til V D, hvorved A, B, D, E, u' og V' har betydningen ovenfor, PG betyr en aminosyrebeskyttelsesgruppe som eksempelvis benzoyl, anisoyl-, isobutyroyl-, acetyl-, tert-buty1benzoyl (Breipohl et al. (1997) *Tetrahedron* 53, 14671-14686), TR er en syrelabil beskyttelsesgruppe som dimetoksytrityl (Dmt) (for V' = O og S) eller Mmt (for V' = NH).

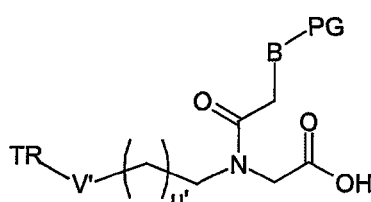
Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer også en fremgangsmåte for fremstilling av et PNA-derivat med formel I, hvorved

- a) C-terminalen av en amidnukleinsyre sammenknyttes med en fastfasebundet fosforyleringsreagens, eller en med C-terminalfosforylert amidnukleinsyre bindes til en fast bærer,

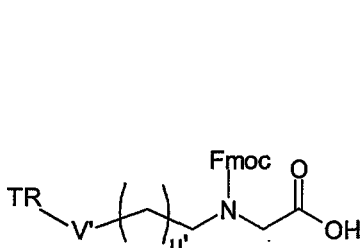
- b) skjelettet av PNA-oligomeren forlenges sekvensielt ved kopling med amidonukleinsyremonomerer,
- c) eventuelt omsettes på N-terminalen med en fosforyleringsreagens.



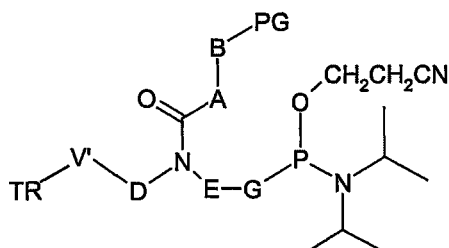
Formel V



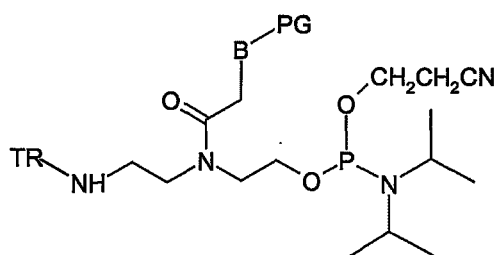
Formel V A



Formel V B



Formel V C



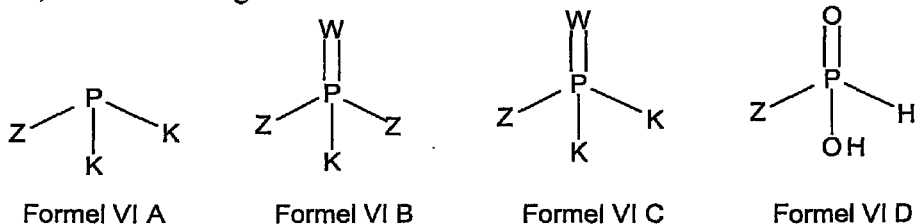
Formel V D

Etter oppbygning av PNA-skjelettet kan den frie aminofunksjonen av N-terminalen omsettes direkte med en tilsvarende fosforyleringsreagens, eksempelvis til et fosforamidat ($V' = NR_1$ i formel I).

Fosforylrestene kan innføres ved hjelp av innenfor nukleotidkjemien vanligvis anvendte reagenser. Det er tilgjengelig tallrike fosforyleringsreagenser som kan anvendes for fremstilling av forbindelser med formel I. Et utvalg av reagensene er vist i figurene 4a til 4 d. For den karboksyterminale modifikasjonen kommer tilsvarende modifiserte bærere, spesielt for CPG-bærere til anvendelse for fastfasesyntesen. Eksempler på slike bærere er oppført i figur 6.

Som fosforyleringsreagenser kan de innenfor nukleotidkjemien vanlige reagensene anvendes (Glen Research Corporation, Sterling, VA 20164, U.S.A.; figur 4a til 4d), som eksempelvis reagerer ifølge fosforamiditmetoden, H-fosfonatmetoden eller fosfotriestermetoden (E. Sonveaux (1986) *Bioorganic Chemistry* 14, 274; S. L. Beaucage og R. P. Iyer (1993) *Tetrahedron* 49, 1925; E. Uhlmann og A. Peyman (1990) *Chem. Rev.* 90, 543). Det store antallet mulige modifikasjonene bestemmes ved det store antallet kjente fosforyleringsreagenser og tilsvarende derivatiserte bærere, spesielt av kontrollerte poreglass (CPG) bærere. Som faste bærere benyttes dessuten fortrinnsvis tentagel® (Fa. Rapp Polymers GmbH, Tübingen) og aminometylpolystyren.

For innføring av fosforylfunksjonen kommer i prinsippet alle innenfor nukleotidkjemien kjente reagenser i betraktning, men spesielt følgende reagenser med formel VI A, formel VI B, formel VI C og formel VI D.



hvorved K er lik halogen, fortrinnsvis Cl, triazolyl, imidazolyl eller dialkylamino, W kan ha den ovenfor nevnte betydningen eller betydningen av W', og Z kan ha den ovenfor nevnte betydningen eller betydningen av X, X' eller Z', hvorved reaktive grupper er tilsvarende beskyttet.

Eksempelvis er hydroksygruppene av fluorescein-fosforamidit 3 (figur 4a) beskyttet ved forestring med pivalinsyre.

Forbindelsene med formel VI er å anse bare som eksempler på slike reagenser som eventuelt reagerer under tilsats av ytterligere hjelpereagenser som baser, syrer eller kondensasjonsreagenser. Spesielt foretrukket er reagensene med formel IV A, som reagerer etter fosforamiditmetoden (Beaucage og Iyer, 1993). Disse bringes til reaksjon som fosfor-(III)-forbindelser og oksideres deretter. Dersom oksidasjonen eksempelvis gjennomføres med jod/vann/pyridin eller tert-betylhydroperoksid oppnår man fosforylderivatene (W = O). Foregår oksidasjonen derimot med elementært svovel eller Baucage-reagens så oppnår man den tilsvarende tiofosforylforbindelsen (W = S).

Blant reagensene (figur 4a til 4d) befinner det seg også “bifunksjonelle reagenser”, som på grunn av en andre funksjon, som først er beskyttet, kan bringes til reaksjon en gang. Eksempler på slike binfunksjonelle reagenser er fosforamiditene 4, 6, 8 til 13. Derved kan det dreie seg om den multiple konjugeringen av en reagens eller også om den suksessive reaksjonen med forskjellige reagenser. Følgelig kan eksemplevis fluorescein-fosforamidit 3 bare bringes til reaksjon en gang. Derimot har fluorescein-fosforamidit 4 en med en Dmt-gruppe beskyttet hydroksyfunksjon, som etter avspaltning av Dmt-gruppen igjen kan bringes til reaksjon med en fosforyleringsreagens. På denne måten kan en og samme gruppe eller også forskjellige grupper innføres flere ganger. PNA-6 er et eksempel på en flerkonjugering på karboksyterminal og en ytterligere modifikasjon på aminoterminal. Først ble på karboksyterminalen suksessivt fluoresceinet og aminolinkerene oppbygget. Etter syntesen av PNA-delen ble det i siste syklus koplet en hydroksyetylglutamin-t-byggestein som ble brakt til reaksjon med C16-fosforyleringsreagens 7. PNA-1- og PNA-2 er forbindelser med formel I som bare er modifisert karboksyterminalt med en fosforylrest ($q = 0$). Denne stoffklassen er likeledes ny og gjenstand for oppfinnelsen. I figur 5a og 5b er det vist noen eksempler på forbindelsestyper for hvilke N-terminalmodifikasjon viser forbindelser med formel I. Forbindelsestype A oppnår man ved reaksjon av den endestående hydroksygruppen med PNA med fosforyleringsreagens 1. Forbindelsestype B oppnår man ved reaksjon av den endestående aminogruppen av PNA med biotin-fosforamidit 5. Forbindelsestype C oppnår man ved suksessiv omsetning av PNA med en endestående hydroksygruppe med Spacer-18 fosforamidit 9, aminomodifiseringsmiddel-5 fosforamidit 12 og leksitropsin. Forbindelsestype D oppnår man ved suksessiv omsetning av PNA med en endestående hydroksygruppe med Spacer-9 fosforamidit 8 og cyanin-3 fosforamidit 10. Forbindelsestype E oppnår man ved suksessiv omsetning av PNA med en endestående hydroksygruppe med det bifunksjonelle fluorescein-fosforamidit 4, Spacer-9 fosforamidit 8 og C16-fosforyleringsreagens 7. De ytterligere trinnene som skal gjennomføres, som oksidasjon og beskyttelsesgruppeavspaltning, er beskrevet i eksemplene.

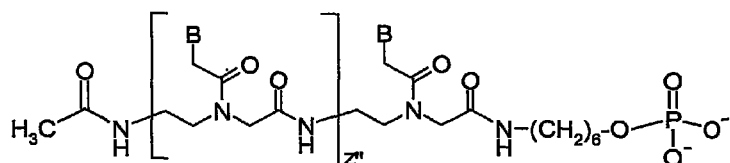
Et eksempel på en karboksyterminal modifikasjon av PNA ved hjelp av et fosforamidit med formel V D er angitt i figur 7. Derved går man ut fra en bishydroksyetylsulfonbærer 1 (figur 6), som etter avspaltning av Dmt-gruppen med 3% trikloreddiksyre omsettes med fosforamidit med formel V D under tetrazolkatalyse. Etter oksidasjon med jodvann avspalter man den aminoterminalen Mmt-gruppen med 3% trikloreddiksyre og syntetiserer så PNA-delen ved fremgangsmåter kjente fra litteraturen, eksemplvis ved den nedenfor omtalte Mmt-metoden. En alternativ metode for karboksyterminal

modifikasjon gjør bruk av CPG-bærere, som er modifisert tilsvarende resten som skal innføres, altså eksempelvis inneholder fluorescein-resten (figur 8). Denne metoden skal belyses ved eksempel med ett PNA-derivat som aminoterminalt er modifisert med en heksadecylfosfatrest og karboksyterminal med fluoresceinfosfat. Først detrityleres fluorescein-bæreren 3 (figur 6) med trikloreddiksyre og kondenseres deretter med aminomodifiseringsmiddelet-C6 fosforamidit 13 (figur 4d) ved hjelp av tetrazol. Etter oksidasjonen med jodvann og avspaltning av Mmt-gruppen kan PNA-delen syntetiseres ved vanlige fremgangsmåter. I den siste syklusen koples en på hydroksyetylglisin basert PNA-byggestein (formel V A, $u' = 2$, $V' = \text{oksygen}$), som etter avspaltning av Dmt-beskyttelsesgruppen ved hjelp av C16-fosforyleringsreagensen 7 omsettes som vist i figur 9. Etter avspaltning av alle beskyttelsesgrupper og spaltning fra CPG-bæreren oppnår man det dobbeltmodifiserte PNA-derivatet.

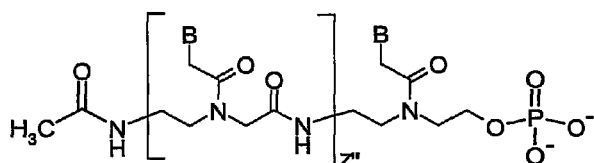
Eksempler:

Fremstillingen av følgende forbindelser er beskrevet som eksempler:

PNA-1:

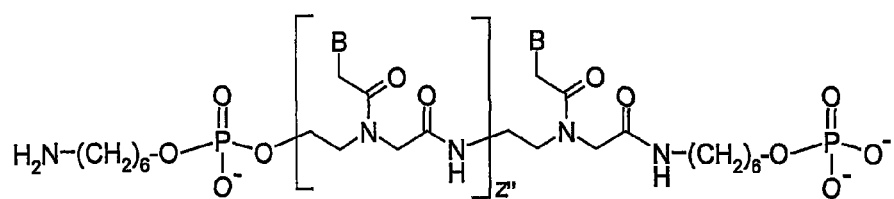


PNA-2:

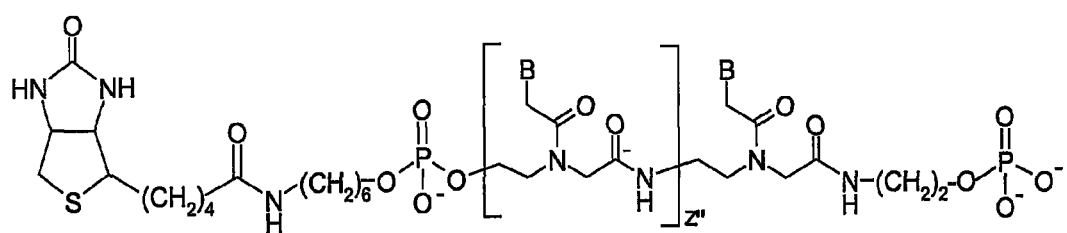


PNA-3:

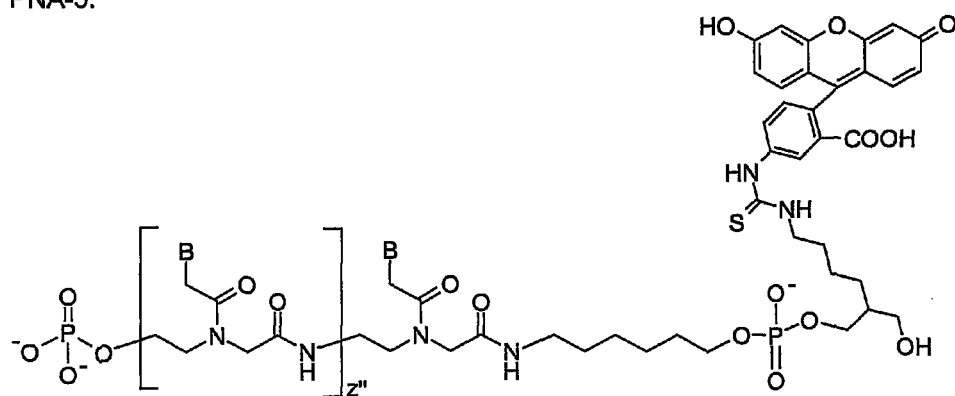
27



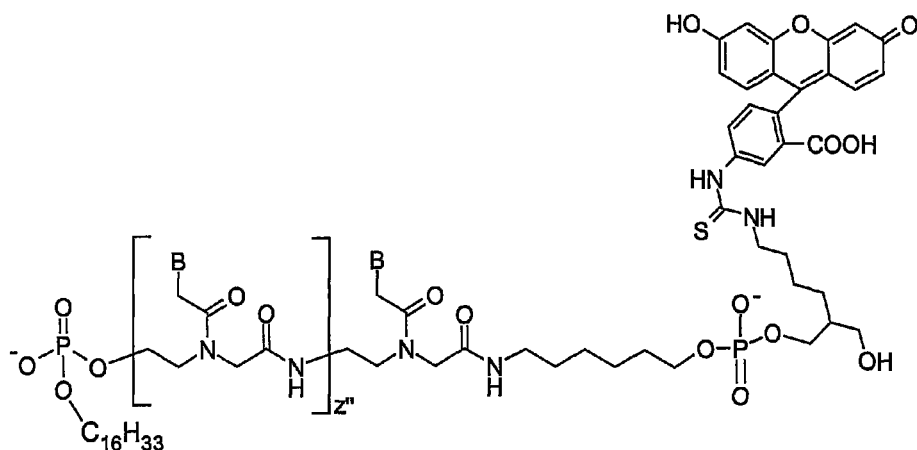
PNA-4:



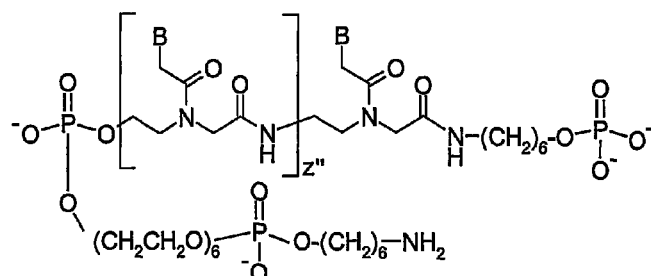
PNA-5:



PNA-6:



PNA-7:



hvorved rekkefølgen av basen B i hvert tilfelle er beskrevet ved SEQ ID NO: 53 hvor Z'' i hvert tilfelle er lik 10:

SEQ ID NO: 53 5'-T A T T C C G T A T-3' (PNA-1 til PNA-7)

Eksempel 1: Syntese av PNA-kjeden

For fremstilling av PNA-delen ble det anvendt følgende reagenser:

1. Fosforamiditreagens (0,1 M i acetonitril (ACN))
2. Mmt-PNA-monomer hhv. Dmt-oeg-PNA-monomer (0,2 M i DMF:ACN (1:1; v:v))
3. Vannfritt ACN (≤ 30 ppm vann)
4. Triklorediksyre (3 %) i diklormetan (DCM)
5. Acetanhydrid, 2,6-lutidin i THF (1:1:8M; v:v:v); (Cap A)
6. N-metylimidazol (16 %) i THF; (Cap B)
7. Jodoppløsning (0,05 M) i THF, vann, pyridin, (7:2:1; v:v:v)
8. Vaskeoppløsning (THF, vann, pyridin (7:2:1, v:v:v))
9. Tetrazol (0,3 M) i ACN
10. HBTU; 0,2 M i DMF:ACN (1:1; v:v)

11. DIPEA; 0,2 M i DMF:ACN (1:1; v:v)
12. DMF (> 99,5 %)
13. Fastfasebærer: aminopropyl-CPG (550 Å) belagt med Mmt-aminoheks-1-yl hemisuccinat (for PNA-heksylamider).

Mmt/acyl-beskyttede hhv. Dmt/acyl-beskyttede oeg-monomerer ble fremstilt som allerede beskrevet (Breipohl et al. (1997) Tetrahedron 53, 14671-14686). Beleggingen av aminopropyl-CPG med Mmt-aminoheks-1-yl-hemisuccinat er likeledes allerede beskrevet (Will et al. (1995) Tetrahedron 51, 12069-12082). De derivatisert CPG-bærene er kommersielt tilgjengelige (Flen Research Corporation, Sterling, VA 20164, U.S.A.). PNA-syntesen ble generelt gjennomført i målestokk 2 til 5 μmol .

Følgende syklus ble anvendt for PNA-syntese:

1. Vasketrinn med ACN
2. Avbeskyttelse av Mmt-gruppen hhv. Dmt-gruppen ved behandling med 3% TCA i DCM; 110 sek.
3. Vasketrinn med DMF/ACB (1:1)
4. Nøytralisering med DIPEA i DMF/ACN (1:1)
5. Kopling av monomer-byggesteinene ved foraktivering (15 min) med HBTU/DIPEA/PNA-monomer (forhold 1:1:1; samlet volum 450 μl) belegging av fastfasen og kopling (45 min)
6. Vasketrinn med ACN
7. Kappedannelse med acetanhydrid/N-metylimidazol
8. Vasketrinn med ACN
9. Ny syklus

Eksempel 2: Syntese av acetyl-tat tcc gtc at-aminoheksyl-p (PNA-1)

Først avspaltes Dmt-beskyttelsesgruppen fra bishydroksyetylsulfonyl-bærer 1 (1 μmol , figur 6) ved behandling med 3% trikloreddiksyre. Deretter bringes den frie hydroksyfunksjonen til reaksjon med aminomodifiseringsmiddelet-C6 fosforamidit 13 (figur 4d) under tetrazolkatalyse. Derved anvendes fosforyleringsreagensen 13 i overskudd (ca. 25 ganger) som 0,3 M oppløsning i acetonitril/tetrahydrofuran (1:1; v:v) og tetrazol (ca. 50 ganger; 0,5 M i acetonitril). Etter foregått kondensasjon oksideres det med en jodoppløsning (0,05 M i tetrahydrofuran/vann, pyridin (7:2:1; v:v:v)). Deretter fremstilles PNA-delen som beskrevet i eksempel 1 ved fastfasesyntese. I den siste syklusen acetyleres den frie aminofunksjonen ved behandling med kappereagensen.

Dette forhindrer ved avbeskyttelsen med konsentrert ammoniakk den aminoterminalen nedbyggingen av PNA. Endelig spaltes PNA ved behandling med konsentrert ammoniakk ved 50°C over natten fra bæreren og samtidig fjernes beskyttelsesgruppen. Man oppnår 103 OD (260) av det ønskede råproduktet, som renses ved preparativ polyakrylamid (PAA)-gelelektroforese. De ønskede produktbåndene elueres med 0,2 M trietylammoniumbikarbonatbuffer og avsaltes over en Bond-Elut C18-søyle (1 g). Man oppnår 23,3 OD. Produktet analyseres ved hjelp av negativ ionemassespektrometri, hvilket bekrefter den beregnede massen (beregnet 3166,2; funnet 3166,8).

Eksempel 3: Syntese av acetyl-tat tcc gtc at(eo)-p (PNA-2)

Fremstillingen foregår analogt det som er beskrevet i eksempel 2 i en 1 µmol syntese. Etter avspaltning av Dmt-beskyttelsesgruppen fra bæreren 1 (figur 6) bringes den frie hydroksyfunksjonen til reaksjon med fosforamidit med formel V D under tetrazolkatalyse. Derved anvendes fosforamiditet i overskudd (ca. 20 ganger) som 0,1 M oppløsning i acetonitril/tetrahydrofuran (1:1; v:v) og tetrazol (ca. 60 ganger; 0,5 M i acetonitril). Etter foregått kondensasjon oksideres med en jodoppløsning (0,05 M i tetrahydrofuran/vann, pyridin (7:2:1; v:v:v)). Etter spaltningen med ammoniakk får man 50 OD råprodukt. Derav ble 45 OD renses over en 15% PAA gel ved elektroforese. Man oppnår 13,2 OD produkt med molekylvekt 3052,9 (beregnet 3052,9).

Eksempel 4: Syntese av aminoheksyl-p-t(oeg) at tcc gtc at-aminoheksyl-p (PNA-3)

Syntesen foregår analogt det som er beskrevet i eksempel 2 i en 1 µmol syntese. Etter oppbygning av karboksyterminalen og syntese av PNA-delen koples i siste syklus riktignok en byggestein basert på hydroksyetylglisin med tymin som nukleobase (oegT). Etter spaltning av Dmt-gruppen koples den frie hydroksyfunksjonen med aminomodifiseringsmiddelet-C6 fosforamidit 13 (figur 4d) under tetrazolkatalyse og oksideres deretter med jodvann. Ved behandling med konsentrert ammoniakk ved 50°C spaltes oligomeren fra bæreren og samtidig fjernes alle baselabile beskyttelsesgrupper. Deretter fjernes den terminale Mmt-beskyttelsesgruppen ved behandling med 80% eddiksyre. Man oppnår 130 OD av råproduktet som ble renses ved gelelektroforese. Det oppnås 22,5 OD produkt med molekylvekt 3303,8 (beregnet 3305,0).

Eksempel 5: Syntese av biotin-p-t(oeg) at tcc gtc at-aminoheksyl-p (PNA-4)

Fremstillingen foregår analogt det som er beskrevet i eksempel 2 i en 0,5 µmol syntese. Etter oppbygning av karboksyterminalen og syntese av PNA-delen koples i siste syklus riktignok en byggestein basert på hydroksyetylglisin med tymin som nukleobase (oegT). Etter spaltning av Dmt-gruppen koples den frie hydroksyfunksjonen med biotin-

fosforamidit 6 (figur 4b) under tetrazolkatalyse og oksideres deretter med jodvann og detrityleres med trikloreddiksyre. Ved behandling med kons. ammoniakk ved 50°C spaltes oligomeren fra bæreren og samtidig fjernes alle beskyttelsesgrupper. Man oppnår 37 OD av råproduktet som renses ved gelelektroforese. Man oppnår 22,5 OD.

Eksempel 6: Syntese av p-t(oeg) at tcc gtc at-aminoheksyl-p-fluorescein (PNA-5)

Syntesen foregår analogt eksempel 2 med utgangspunkt fra fluorescein-bærer 3 (figurer 6a og 8). Fra fluorescein-bærer 3 spaltes ved behandling med 3% trikloreddiksyre Dmt-beskyttelsesgruppen. Deretter bringes den frie hydroksyfunksjonen til reaksjon med aminomodifiseringsmiddelet-C6 fosforamidit 13 (figur 4d) under tetrazolkatalyse. Etter forløpt kondensasjon oksideres med en jodoppløsning (0,05 M i tetrahydrofuran/vann, pyridin (7:2:1; v:v:v)). Deretter fremstilles PNA-delen som beskrevet i eksempel 1 ved fastfasesyntese. I siste syklus koples en byggestein basert på hydroksyetylglisin med tymin som nukleobase ((t)oeg)). Etter spaltning av Dmt-gruppen koples den frie hydroksyfunksjonen med fosforyleringsreagensen 1 (figur 4a) under tetrazolkatalyse og oksideres deretter med jodvann. Endelig spaltes PNA ved behandling med kons. ammoniakk ved 50°C over natten fra bærer og samtidig fjernes beskyttelsesgruppene. Man oppnår 61 OD (260) av råproduktet, som ble renses ved preparativ polyakrylamid (PAA)-gelelektroforese. De ønskede produktbåndene ble eluert med 0,2M trietylammoniumbikarbonatbuffer og avsaltet over Bond-Elut C18-søyle (1 g). Man oppnår 5,6 OD. Produktet ble analysert ved negativion-massespektrometri som viste den beregnede massen (beregnet 3709,5; funnet 3706,3).

Eksempel 7: Syntese av C16-p-t(oeg) at tcc gtc at-aminoheksyl-p-fluorescein (PNA-6)

Syntesen foregår analogt eksempel 6 med utgangspunkt fra 1 µmol fluoresceinbærer 3 (figurer 6a og 8). I den siste syklusen ble en byggestein basert på hydroksyetylglisin koplet med tymin som nukleobase ((t)oeg)). Etter spaltning av Dmt-gruppen koples den frie hydroksyfunksjonen riktignok med C16-fosforyleringsreagensen 7 (figur 4c) under tetrazolkatalyse og oksideres deretter med jodvann. Endelig blir PNA spaltet fra bæreren ved behandling med kons. ammoniakk ved 50°C over natten og samtidig fjernes beskyttelsesgruppene. Man oppnår 61 OD (260) av det ønskede råproduktet, som renses ved preparativ polyakrylamid (PAA)-gelelektroforese. De ønskede produktbåndene elueres med 0,2M trietylammoniumkarbonatbuffer og avsaltet over en Bond-Elut C18-søyle (1 g). Man oppnår 4,6 OD. Prdoduktet ble analysert ved negativion-massespektrometri som viste den beregnede massen (beregnet 3934, funnet 3931).

Eksempel 8: Bestemmelse av smeltetemperaturer

Bestemmelsen av smeltetemperaturer foregår ved hjelp av et HP 8452A dioderekke-spektrofotometer, et HP 89090A Peltier-element og HP temperaturkontroll software rev. B5.1 (Fa. Hewlett Packard). Det måles i 0,5°C/min trinn i 140 mM Cl, 10 mM natriumdihydrogenfosfat, 0,1 mM EDTA (pH 7,4) som buffer. Oligomerkonsentrasjonen utgjør 0,5 til 1 OD₂₆₀ pr ml.

Overraskende viste de dobbelt fosforylmodifiserte PNA-5 og PNA-6 derivatene med to hhv. tre negative ladninger en like god eller bedre binding sammenlignet med komplementært DNA og RNA som det uladete PNA (referansestoff).

PNA-derivat		T _m (DNA)	T _m (RNA)
Referanse	Ac-HN-tat tcc gtc at-hex	41,9°C	56,6°C
PNA-5	p-t(oeg) at tcc gtc at-aminoheksyl-p-fluorescein	41,8°C	56,9°C
PNA-6	C16-p-t(oeg) at tcc gtc at-aminoheksyl-p-fluorescein	44,1°C	56,9°C

Eksempel 9: Bestemmelse av celleopptaket etter fluorescensmerking

Man lar COS-celler vokse inntil sammenflytning i Dulbecco's MEM som er supplert med 10% FCS i 5 cm Petriskåler. Cellen vaskes to ganger med serumfritt DMEM. Ved hjelp av en steril nål skrapes det en flate på ca 1 cm² i midten av Petriskålen. I denne flaten påføres PNA-oppløsningen (10 µM) som skal undersøkes. Det inkuberes ved 37°C under CO₂-atmosfære. Etter 2, 4 og 16 timer undersøkes cellene ved fluorescensmikroskopi. For dette formålet vaskes cellene fire ganger med serumfritt DMEM, dekkes med en glassbærer og bedømmes under fluorescensmikroskop hhv. ved fasekontrast. PNA-5 og PNA-6 ble undersøkt fluorescensmikroskopisk.

Det viste seg derved at heksadecyl-PNA-derivatet (PNA-6) opptas mer effektivt i cellen enn PNA uten heksadecylresten.

Eksempel 10: Hemning av celleproliferasjonen ved hjelp av PNA-6

Sekvensen av PNA-6 er rettet mot translasjonsstarten av Ha-ras mRNA. REH-cellerne (humane pre-B leukemiceller, DMS ACC 22) eller A549 tumorceller ble dyrket i OptiMEM (Gibco BRL) med 10% fetalt kalveserum (FCS, GIBCO-BRK) ved 37°C og 5% CO₂. Celletettheten for analysen var ca. 1 x 10⁶ / ml. PNA-6 (10 µM) ble inkubert med cellene i 24-brønns plater. Etter 96 inkubering ved 37°C under 5% CO₂ ble

celletettheten bestemt. Middelverdi for celletettheten ble bestemt fra en PNA-konsentrasjon fra 3 individuelle hull. Det viste seg at PNA-13 hemmer proliferasjonen av REH-cellene. Etter > 4 dager inkubasjonstid er hemningen ved hjelp av PNA-6 sterkere enn ved et tilsvarende fosfortioatoligonukleotid.

Eksempel 11: Syntese av aminoheksyl-p-spacer18-p-t(oeg) at tcc gtc at-aminoheksyl-p (PNA-7)

Fremstillingen foregår analogt med det som er beskrevet i eksempel 2 i en 1 µmol syntese. Etter oppbygning av karboksyterminalen og syntese av PNA-delen koples i siste syklus riktignok en byggestein basert på hydroksyetylglisin med tymin som nukleobase (oegT). Etter spaltning av Dmt-gruppen koples den frie hydroksyfunksjonen med Spacer18 fosforamidit (figur 4c) og etter nok en gangs detritylering med aminomodifiseringsmiddelet-C6 fosforamidit 13 (figur 4d) under tetrazolkatalyse og oksideres deretter med jodvann. Ved behandling med kons. ammoniakk ved 50°C spaltes oligomeren fra bæreren og samtidig fjernes alle baselabile beskyttelsesgrupper. Deretter fjernes den terminale Mmt-beskyttelsesgruppen ved behandling med 80% eddiksyre. Man oppnår 57 OD av råproduktet som renses ved gelelektroforese. Man oppnår 7,4 OD produkt som i massespektrum viser den ventede molekylvekten 3647,5 (beregnet 3648,5).

Forkortelsesoversikt:

ACN	Acetonitril
BOC.	tert-butyloksykarbonyl
C, c	pseudo-iso-cytosin
COS	CV1 Origin SV 49
CPG	Porekontrollert glass
DCM	Diklormetan
DIPEA	Diisopropyletylamin
DMEM	Dulbecco's MEM
DMF	Dimetylformamid
Dmt	Dimetoksytrityl
DNA	Desoksyribonukleinsyre
DNP	Dinitroaryl
FITC	Fluoresceinisotiocyanat
Fmoc	Fluorenylmetoksykarbonyl
HATU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametyluronium-heksafluorofosfat
hex	-NH-(CH ₂) ₆ OH

MEM	“Modified Eagle’s minimal essential medium”
Mmt	Monometoksytrityl
OD	Optisk tetthet
oeg	N-(2-hydroksyetyl)glysin
PAA	Polyakrylamid
PG	Beskyttelsesgruppe
PNA	Polyamidnukleinsyre
RNA	Ribonukleinsyre
TBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametyluronium-tetrafluorborat
TCA	Triklorediksyre
THF	Tetrahydrofuran
TR	Syrelabil beskyttelsesgruppe

Figurene 1a, 1b, 2b og 3b viser eksempler på endestående rester Z og Z’.

Figurene 2a og 3a viser eksempler på brodannende rester X og X’

Figurene 4a, 4b, 4c og 4d viser eksempler på fosforyleringsreagenser.

Figurene 5a og 5b viser eksempler på den enkel (A, B) og multippel (C til E) derivatisering på N-terminal PNA.

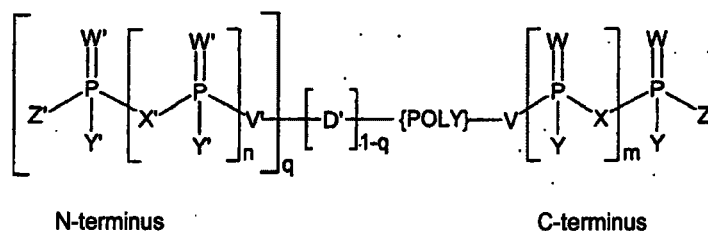
Figur 6 viser eksempler på bærerbundede reagenser for fastfasesyntese.

Figurene 7, 8 og 9 viser eksempler på syntesen av C- og N-terminalt modifisert PNA.

P a t e n t k r a v

1.

PNA-derivat med formel I



hvorved

q er lik 0 eller 1,

D' er lik hydroksy, merkpto, amino, alkylamino eller acylamino,

V er uavhengig av hverandre lik oksygen, svovel, NR₁,V' er uavhengig av hverandre lik oksygen, svovel, NR₁, en gruppe U-(CR₃R₄)_u'-C(O)-NH eller en gruppe U-(CH₂CH₂O)_u'-CH₂-C(O)-NH,

U er uavhengig av hverandre lik oksygen, svovel eller NH,

u' er uavhengig av hverandre lik 1 til 10, fortrinnsvis 1 til 4, spesielt foretrukket 1,

W og W' er uavhengig av hverandre lik oksygen, svovel eller NR₁,Y og Y' er uavhengig av hverandre lik hydroksy, merkpto, oksyanion, tioat eller NR₁R₂,

X og X' er uavhengig av hverandre lik en gruppe U-(C₂-C₂₂-alkandiyl)-U eller en gruppe U-(CH₂CH₂-O)_u', eller lik en merkegruppe, eller en gruppe for tverrbinding, eller en gruppe som begunstiger det intracellulære opptaket, eller gruppe som øker bindingsaffiniteten av PNA-derivatet til nukleinsyrer, eksempelvis en bifunksjonell fluorescein-, rodamin-, TAMRA-, biotin-, pyren-, dinitrofenyl-, kolesteryl-, akridin, adamantyl-, vitamin E-,

cyaninfargestoff-, dabcyl-, edans-, leksitropsin-, psoralen-, BODIPY-, ROX-, R6G- eller digoksigeninrest,

Z og Z' er uavhengig av hverandre lik hydroksy, merkapt, oksyanion, tioat eller NR₁R₂, C₁-C₂₂-alkyl, C₁-C₈-arylalkyl, C₁-C₂₂-alkyl-U, C₁-C₈-arylalkyl-U, hydroksy-C₁-C₁₈-U, aminoalkyl-U, merkaptalkyl-U, eller en gruppe med formelen R₇(CH₂CH₂-O)_m, hvorved R₇ er lik hydroksy, amino eller C₁-C₂₂-alkoksy og m er lik 1 til 100, fortrinnsvis 2 til 10, eller er lik en merkegruppe, eller en gruppe for tverrbinding, eller en gruppe som begunstiger det intracellulære opptaket, eller en gruppe som øker bindingsaffiniteten av PNA-derivatet til nukleinsyrer, eksempelvis en monofunksjonell eller bifunksjonell fluorescein-, rodamin-, TAMRA-, biotin-, pyren-, dinitrofenyl-, kolesteryl-, akridin-, adamantyl-, vitamin E-, cyaninfargestoff-, dabcyl-, edans-, leksitropsin-, psoralen-, BODIPY-, ROX-, R6G- eller digoksigeninrest.

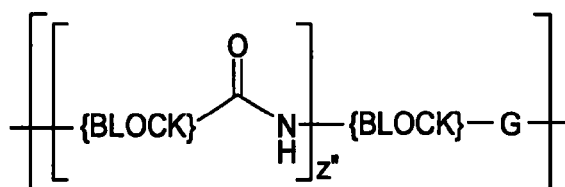
R₁ og R₂ betyr uavhengig av hverandre en rest bestående av hydrogen eller C₁-C₆-alkyl, fortrinnsvis hydrogen,

R₃ og R₄ betyr uavhengig av hverandre en rest bestående av hydrogen eller C₁-C₆-alkyl eller resten av en aminosyre-sidekjede, fortrinnsvis hydrogen, hvorved nabostilte rester R₃ og R₄ i V' også kan danne en C₅-C₈-cykloalkylring,

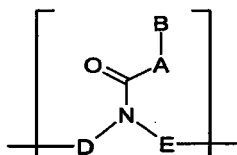
n er lik 0 til 10, fortrinnsvis 0 til 3,

m er lik 0 til 10, fortrinnsvis 0 til 3,

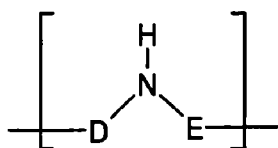
og hvorved {POLY} beskrives ved formel II



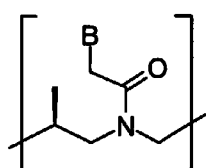
hvorved videre {BLOKK} uavhengig av hverandre er en gruppe valgt fra formel IIIA



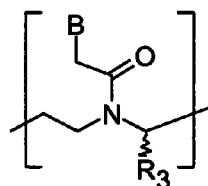
eller fra formel IIIB



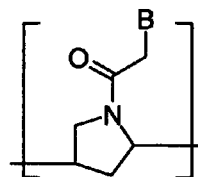
eller fra formlene IV A til IV G



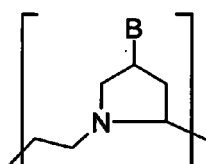
Formula IV A



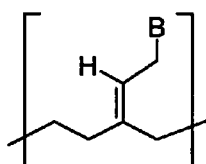
Formula IV B



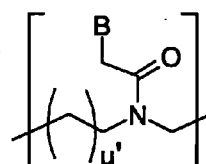
Formula IV C



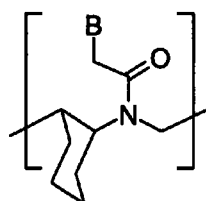
Formula IV D



Formula IV E



Formula IV F



Formula IV G

hvorved hver byggestein {BLOKK} kan være forskjellig,

og videre gjelder at

Z'' er lik 0 til 100, fortrinnsvis 1-20, spesielt foretrukket 4-15,

G er valgt fra gruppene $(\text{CR}_5\text{R}_6)_{u'}$, $\text{C}(\text{O})\text{NH}-(\text{CR}_1\text{R}_2)_{t'}$ eller $\text{C}(\text{O})\text{NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{u'}$ - CH_2CH_2 , hvorved t' er lik 2 til 10, fortrinnsvis 6,

A er uavhengig hverandre en gruppe $(\text{CR}_1\text{R}_2)_s$, hvorved s er lik 1 til 3, fortrinnsvis 1,

- B er uavhengig av hverandre enten en aromatisk rest, som også kan ha heteroaromatisk karakter, eller hydrogen eller hydroksy eller C_1 - C_{18} -alkyl, eller en innenfor nukleotidkjemien vanligvis naturlig forekommende eller en ikke naturlig forekommende nukleobase eller deres promedikament,
- D er uavhengig av hverandre en gruppe $(CR_3R_4)_t$, hvorved t er lik 2 til 10, fortrinnsvis 2 til 4, spesielt foretrukket 2,
- E er uavhengig av hverandre en gruppe $(CR_5R_6)_u$, hvorved nabostilte rester R_5 og R_6 også kan danne en C_5 - C_8 -cykloalkylring eller en spiroforbindelse,
- R_5 og R_6 betyr uavhengig av hverandre en rest bestående av hydrogen eller C_1 - C_6 -alkyl eller resten av en aminosyresidekjede, fortrinnsvis hydrogen,

og hvorved u' , R_1 , R_2 , R_3 og R_4 har samme betydning som beskrevet ovenfor,

samt fysiologisk godtagbare salter av PNA-derivatet med formel I, under den forutsetning at minst en rest Y , Y' , Z eller Z' er lik hydroksy, merkpto, oksyanion eller tioat, og at minst en rest B er en nukleobase.

2.

PNA-derivat ifølge krav 1, hvorved minst en rest Y , Y' , Z eller Z' i formel I i et pH-område på 4,5 til 15, fortrinnsvis 6,5 til 12, spesielt foretrukket 6,5 til 9 er lik oksyanion eller tioat.

3.

PNA-derivat ifølge ett av kravene 1 til 2, hvorved n og m uavhengig av hverandre er lik 0.

4.

PNA-derivat ifølge ett av kravene 1 til 3, hvorved q er lik 1.

5.

PNA-derivat ifølge ett av kravene 1 til 6, hvorved W og W' er lik okso.

6.

PNA-derivat ifølge ett av kravene 1 til 5, hvorved Y og Y' er lik hydroksy eller oksyanion.

7.

PNA-derivat ifølge ett av kravene 1 til 6, hvorved V og V' er lik oksy.

8.

PNA-derivat ifølge ett av kravene 1 til 7, hvorved X og X' uavhengig av hverandre er lik en gruppe U-(C₂-C₂₂-alkandiyl)-U, foretrukket O-(C₂-C₂₂-alkandiyl)-O, spesielt foretrukket O-(CH₂)₂₋₆O, eller lik en gruppe U-(CH₂CH₂-O)_u', foretrukket O(CH₂CH₂-O)_u', hvorved u' er 1 til 6.

9.

PNA-derivat ifølge ett av kravene 1 til 8, hvorved X, X', Z og Z' uavhengig av hverandre velges fra gruppen fluorescein, rodamin, TAMRA eller cyanin-fargestoff, biotin, dabcy, psoralen, akridin, DNP, kolesterol vitamin E-, dabcy-, edans-, leksitropsin-, psoralen-, BODIPY-, ROX-, R6G- eller digoksigenin.

10.

PNA-derivat ifølge ett av kravene 1 til 9, hvorved X, X', Z og Z' uavhengig av hverandre velges fra gruppen monofosfat, biotinderivat eller floresceinderivat.

11.

PNA-derivat ifølge ett av kravene 1 til 9, hvorved Z er en fluorescensmarkør og Z' er en slukker (quencher).

12.

PNA-derivat ifølge ett av kravene 1 til 9, hvorved Z er en slukker og Z' er en fluorescensmarkør.

13.

PNA-derivat ifølge ett av kravene 1 til 9, hvorved Z og Z' uavhengig av hverandre er en C₁-C₂₂-alkylrest, eller en C₁-C₂₂-U-rest, fortrinnsvis en C₁-C₂₂-alkoksyrest, spesielt foretrukket C₁₆-alkoksy, eller hydroksy-C₁-C₁₈-U, fortrinnsvis hydroksy-C₁-C₁₈-O, spesielt foretrukket HO-(CH₂)₃₋₁₂ O,

eller en aminoalkyl-U-rest, fortrinnsvis en aminoalkoksyrest, spesielt foretrukket 6-aminoheksoksy eller 5-aminopentoksy,
 eller en gruppe med formelen $R_7-(CH_2CH_2-O)_m$, hvorved R_7 fortrinnsvis er OH eller NH_2 og m er lik 1 til 6, spesielt foretrukket $HO(CH_2CH_2-O)_2$, $HO(CH_2CH_2-O)_6$ og $H_2N-(CH_2CH_2-O)_2$,
 eller en merkaptalkyl-V-rest, fortrinnsvis en merkaptalkoksyrest, spesielt foretrukket 6-merkaptuheksyloksy.

14.

PNA-derivat ifølge ett av kravene 1 til 3, hvorved q er lik 0.

15.

PNA-derivat ifølge krav 14, hvorved D' er lik acylamino, fortrinnsvis acetylamino.

16.

PNA-derivat ifølge ett av kravene 1 til 15, hvorved D er lik $(CH_2)_t$, fortrinnsvis $(CH_2)_2$.

17.

PNA-derivat ifølge ett av kravene 1 til 16, hvorved A, E og G er lik CH_2 .

18.

PNA-derivat ifølge ett av kravene 1 til 17, hvorved B er lik adenin, cytosin, 5-metylcytosin, guanin, tymin og uracil eller lik purin, 2,6-diaminopurin, N^4N^4 -etanocytosin, N^6N^6 -etano-2,6-diaminopurin, 5-(C_3 - C_6)-alkinyl-uracil, 5-(C_3 - C_6)-alkinyl-cytosin, 5-(1-propargylamino)-uracil, 5-(1-propargylamino)-cytosin, fenoksazin, 9-aminoetoksyfenoksazin, 5-fluor-uracil eller pseudoisocytosin, 5-(hydroksymetyl)uracil, 5-aminouracil, pseudouracil, dihydrouracil, 5-(C_1 - C_6)-alkyl-uracil, 5-(C_1 - C_6)-alkylcytosin, 5-(C_2 - C_6)-alkenyl-cytosin, 5-fluorcytosin, 5-kloruracil, 5-klorcytosin, 5-bromuracil, 5-bromcytosin, 7-deazaadenin, 7-deazaguanin, 8-azapurin, eller en 7-deaza-7-substituert purin.

19.

PNA-derivat ifølge ett av kravene 1 til 18, hvorved basesekvensen er rettet mot deler av tumorsuppressorgener, onkogener eller telomeraser eller deres transkripsjonsprodukter.

20.

PNA-derivat ifølge krav 19, hvorved basesekvensen av PNA-delen er rettet mot translasjonsstarten av HA-ras mRNA.

21.

PNA-derivat ifølge ett av kravene 1-10 eller 13-20 for anvendelse som legemiddel.

22.

Anvendelse av et PNA-derivat ifølge ett av kravene 1-10 eller 13-20 for fremstilling av et legemiddel for tumorterapi.

23.

PNA-derivat ifølge ett av kravene 1 til 21 for anvendelse som diagnostikum.

24.

Anvendelse av et PNA-derivat ifølge ett av kravene 1 til 20 for påvisning av mikroorganismer og/eller vira.

25.

Anvendelse av et PNA-derivat ifølge ett av kravene 1 til 20 for påvisning og/eller kvantifisering av nukleinsyrer.

26.

Anvendelse av et PNA-derivat ifølge ett av kravene 1 til 20 som påvisningsreagens for in-situ- eller fluorescens-in-situ-hybridisering.

27.

Anvendelse av et PNA-derivat ifølge ett av kravene 1 til 20 som antisens-, anti-gen-, lokke-, (Decoy) eller "Chimperaplast"-middel.

28.

Anvendelse av et PNA-derivat ifølge ett av kravene 11 eller 12 som "Molecular Beacon".

29.

Påvisningsreagens inneholdende et PNA-derivat ifølge ett av kravene 1 til 20.

30.

PNA-chip, inneholdende et PNA-derivat ifølge ett av kravene 1 til 20.

31.

Biosensor inneholdende et PNA-derivat ifølge ett av kravene 1 til 20.

32.

Legemiddel, inneholdende et PNA-derivat ifølge ett av kravene 1-10 eller 13-20 og eventuelt ytterligere farmakologisk godtagbare tilsats- og/eller bærestoffer.

33.

Antisens-, anti-gen, lokke-, (Decoy) eller "Chimperaplast"-middel, inneholdende et PNA-derivat ifølge ett av kravene 1 til 20.

34.

Fremgangsmåte for fremstilling av et PNA-derivat med formel I, hvorved

- a) C-terminalen av en amidnukleinsyre sammenknyttes med en fastfasebundet fosforyleringsreagens, eller en med C-terminalfosforylert amidnukleinsyre bindes til en fast bærer,
- b) skjelettet av PNA-oligomeren forlenges sekvensielt ved kopling med amidonukleinsyremonomerer,
- c) eventuelt omsettes på N-terminalen med en fosforyleringsreagens.

35.

Fremgangsmåte ifølge krav 34, hvorved PNA fremstilles under anvendelse av beskyttelsesgruppene t-butyloksykarbonyl (BOC), 9-fluorenylmetoksykarbonyl (Fmoc) eller monometoksytrityl (mmT).

36.

Fremgangsmåte ifølge ett av kravene 34 eller 35, hvorved PNA fremstilles under anvendelse av faste bærere.

37.

Fremgangsmåte ifølge krav 36, hvorved det som fast bærer anvendes CPG, tentagel eller aminometylpolystyren.

38.

Anvendelse av et PNA-derivat ifølge ett av kravene 1-10 eller 13-20 for fremstilling av et legemiddel, hvorved PNA-derivatet eventuelt blandes med ytterligere farmakologisk godtagbare tilsats- og/eller bærestoffer.

39.

Anvendelse av et PNA-derivat ifølge ett av kravene 1 til 20 for fremstilling av en PNA-chips, hvorved PNA-derivatet enten først fremstilles og så fikseres på en fast bærer, eller PNA-derivatet fremstilles direkte på bæreren.

40.

Fremgangsmåte ifølge et av kravene 34 til 37, videre kjennetegnet ved at PNA renses under utnyttelse av den sure karakteren av fosforresten ved hjelp av kromatografi eller elektroforese.

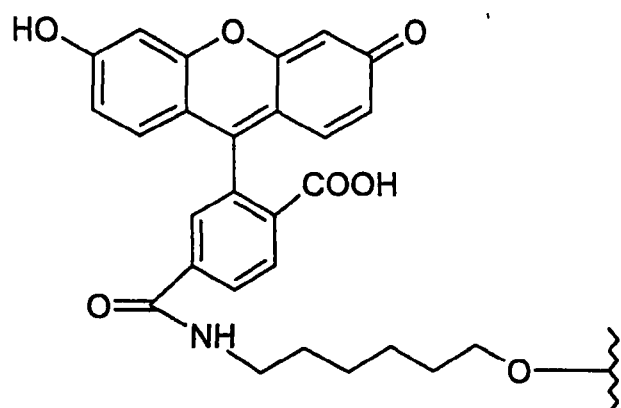
41.

Fremgangsmåte ifølge krav 40, hvorved PNA-derivatet renses ved kromatografi ved hjelp av en basisk, stasjonær fase og en gradient av en sur eller saltholdig eluent.

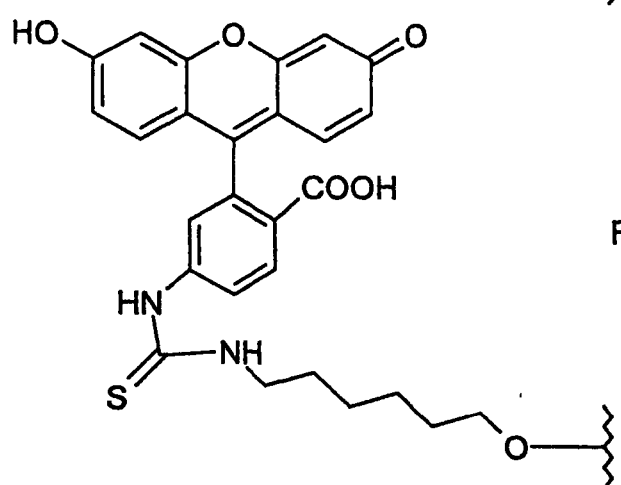
42.

Fremgangsmåte ifølge krav 41, hvorved den stasjonære fasen er en ionebytter eller en blandet-modus-fase.

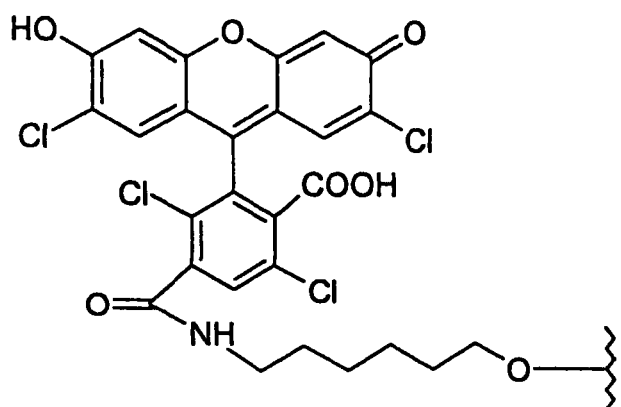
Fig. 1a:



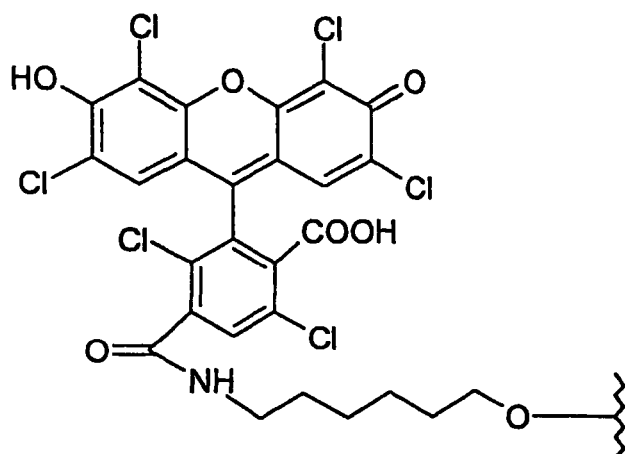
Fluorescein (Amid)



Fluorescein (Tiourea)



Tetraklorfluorescein



Heksaklorfluorescein

Fig. 1b:

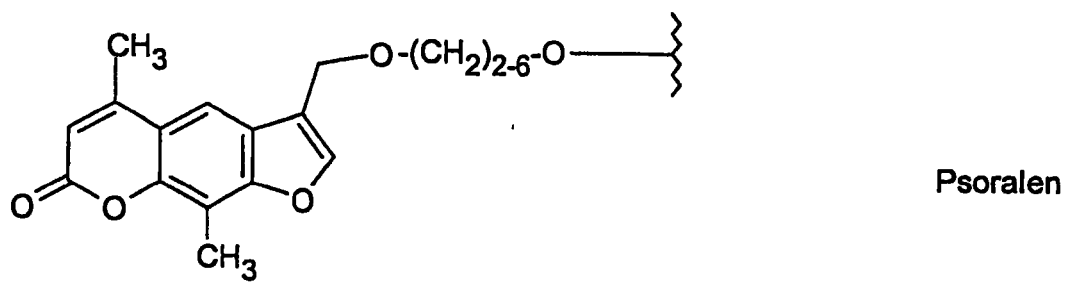
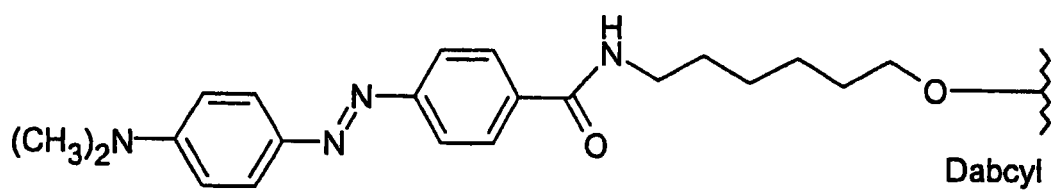
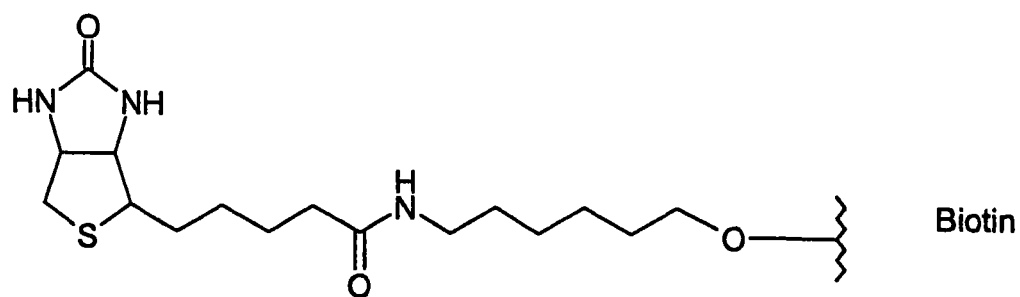


Fig. 2a:

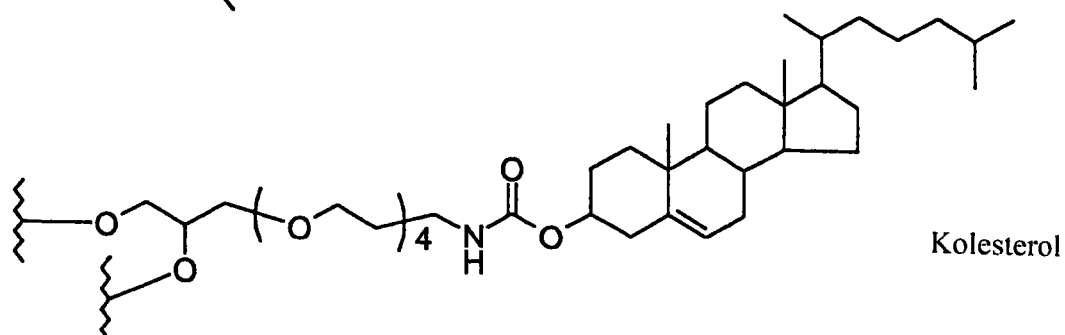
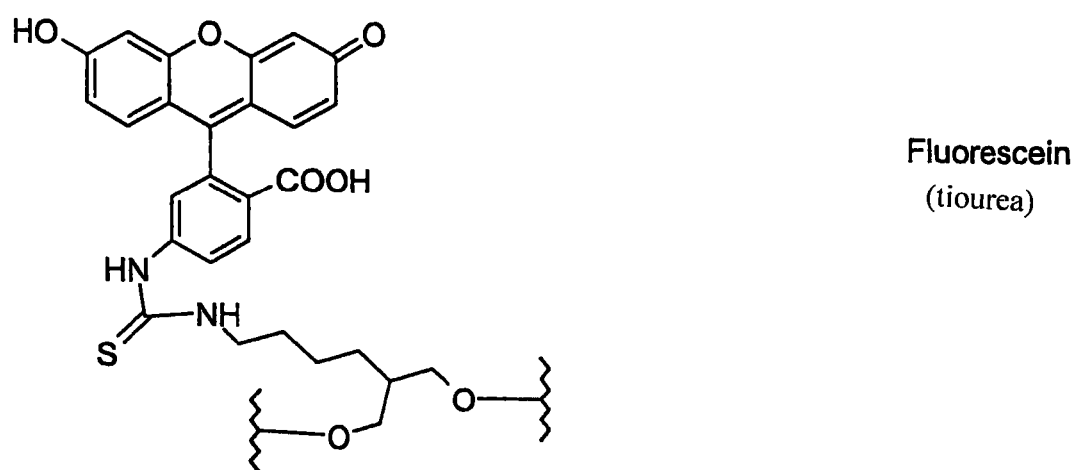
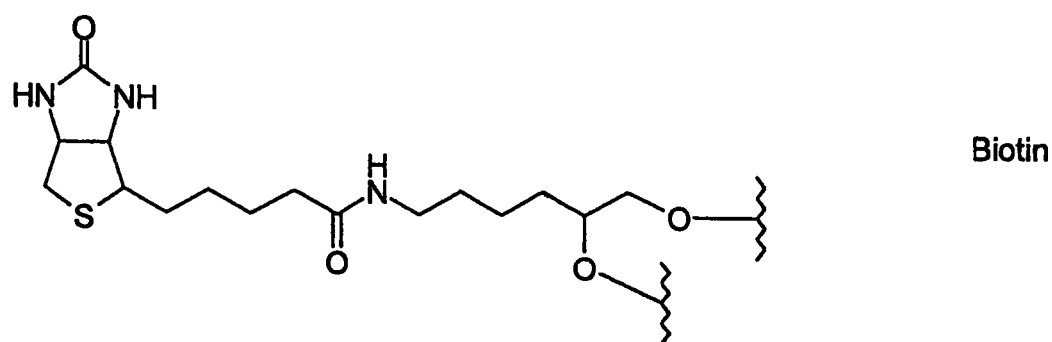
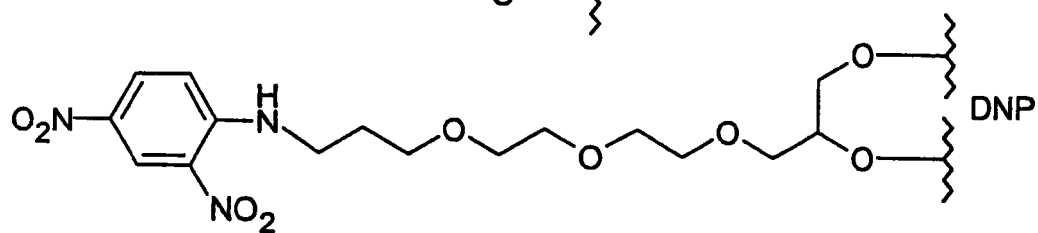
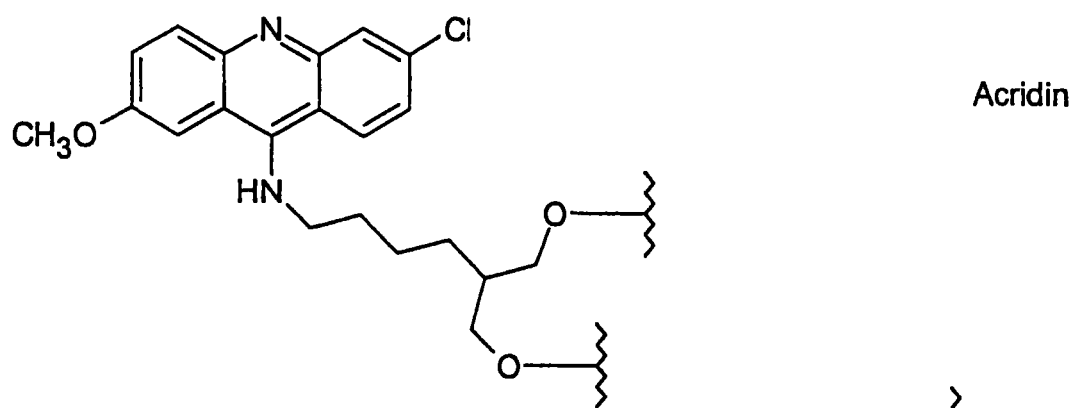


Fig. 2b:

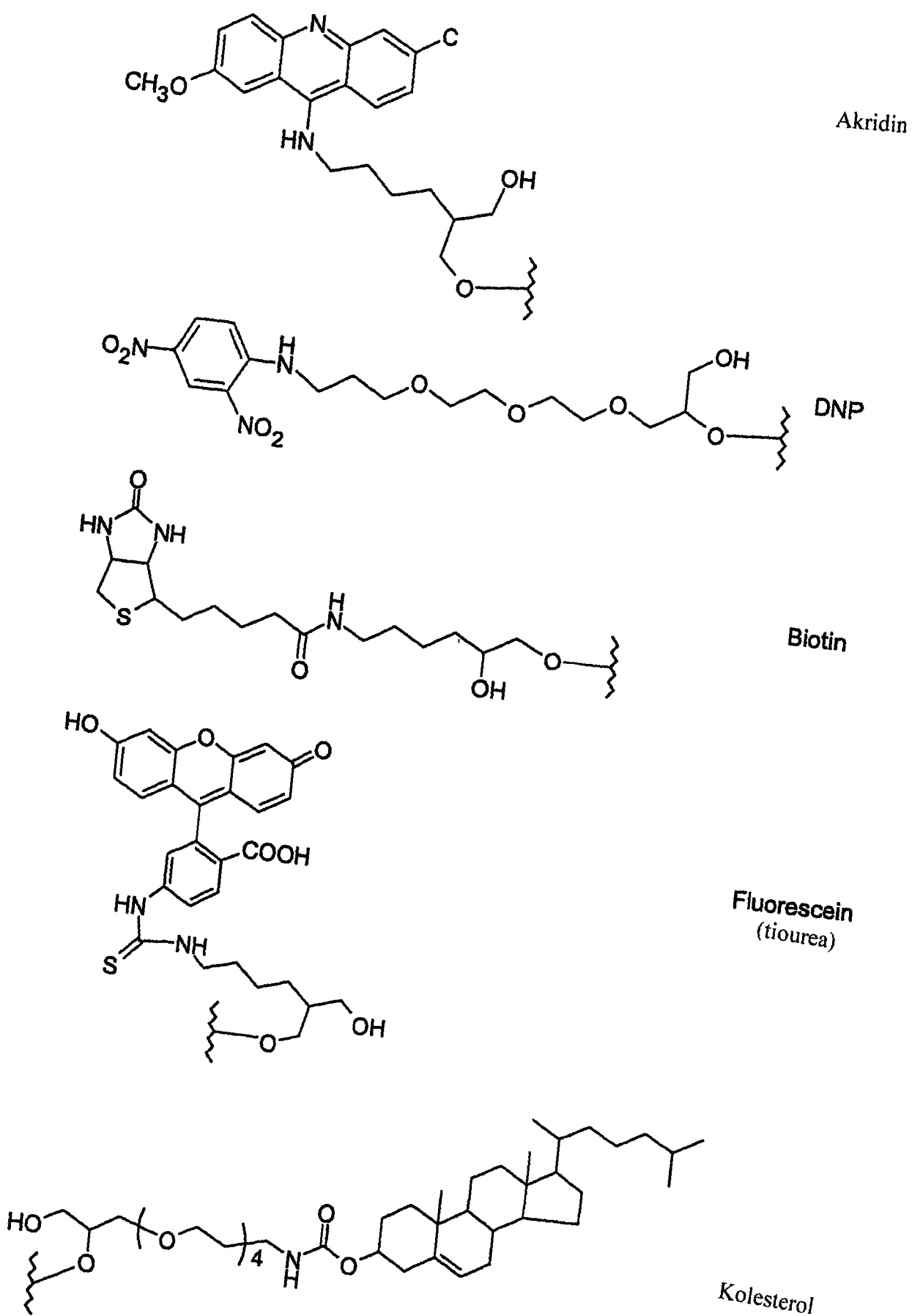


Fig. 3a:

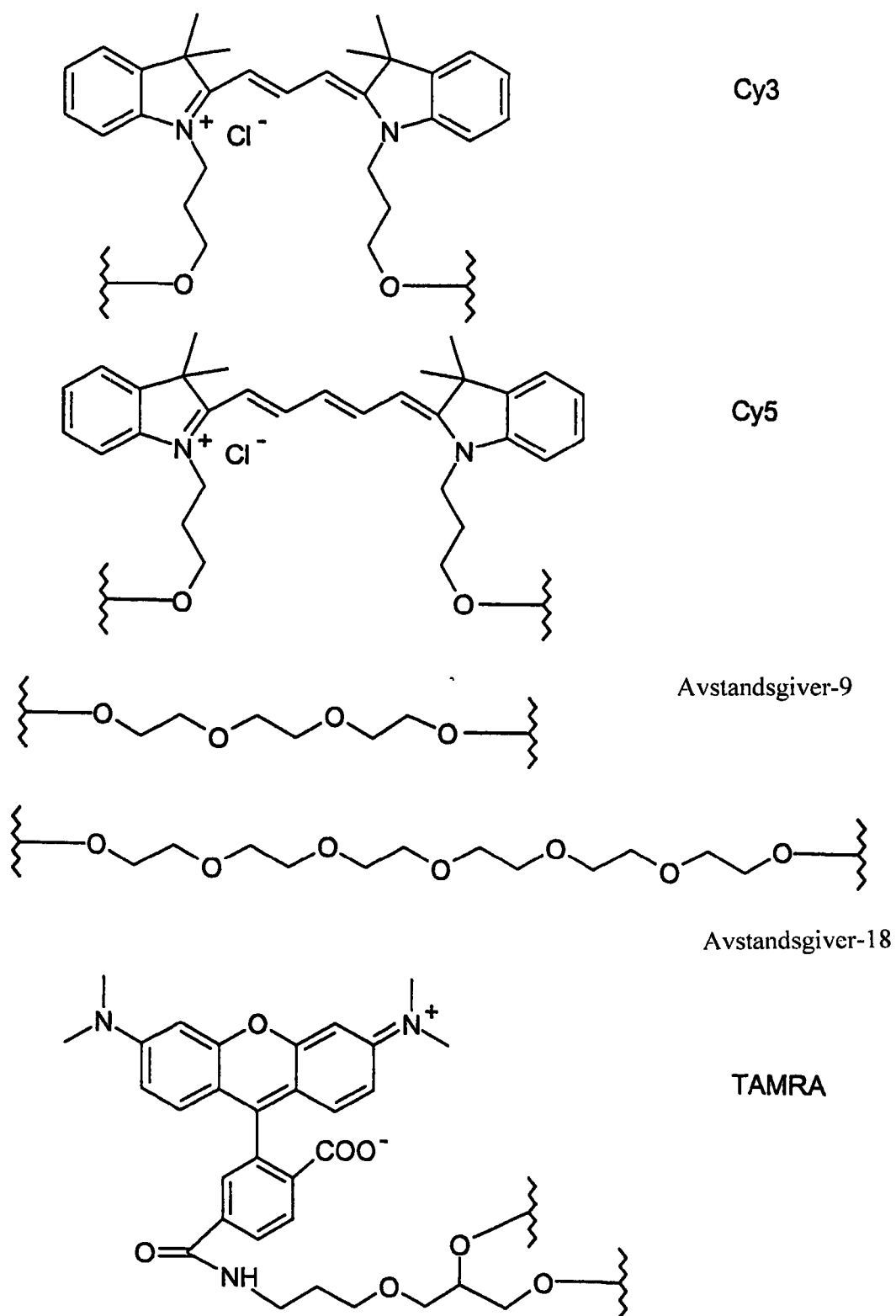


Fig. 3b:

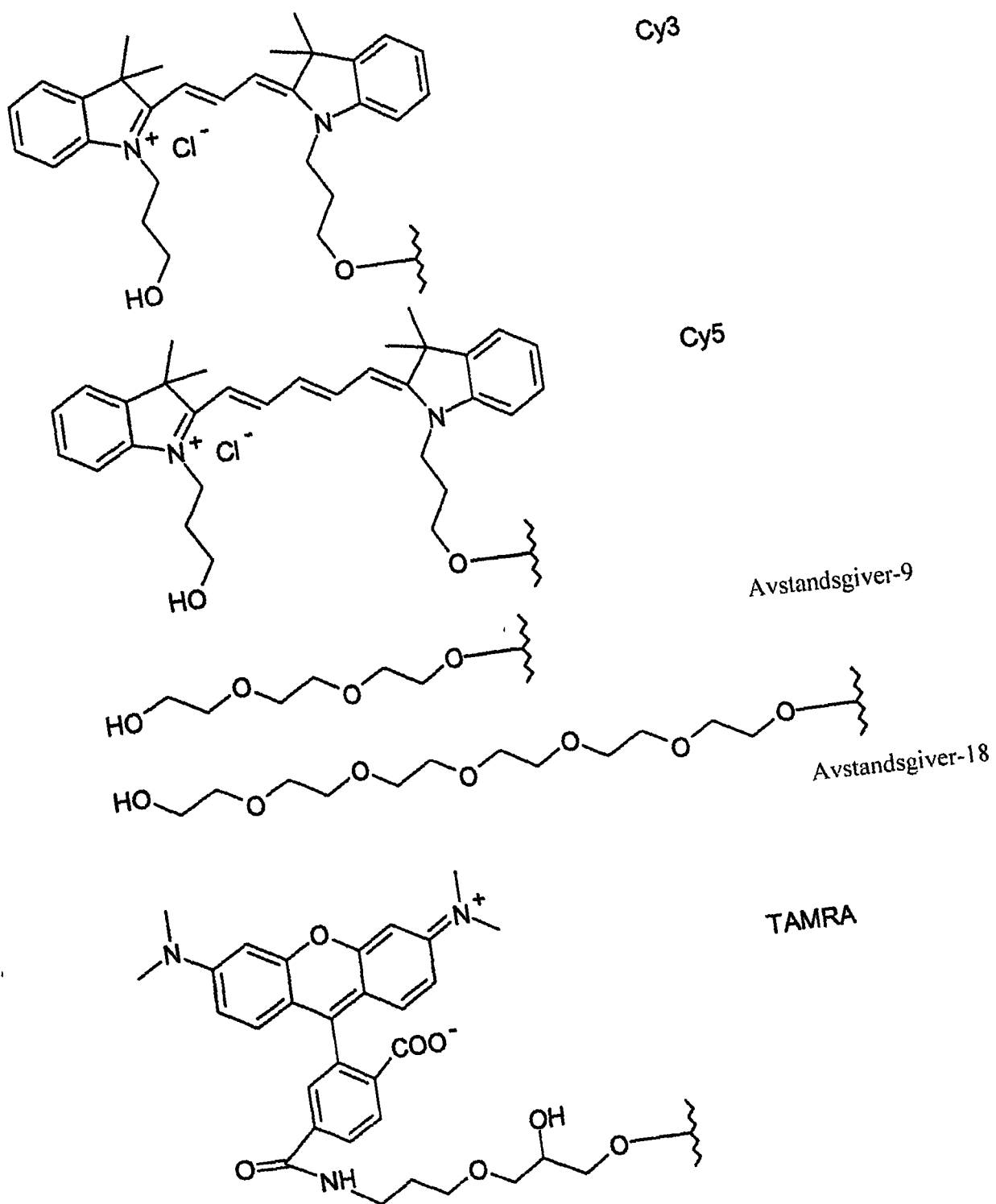
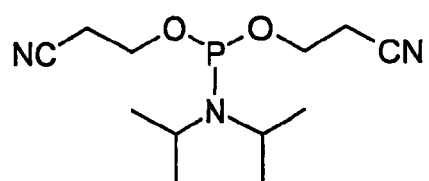
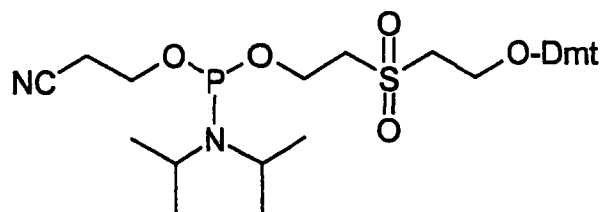


Fig. 4a:



Fosforyleringsreagens 1



Fosforyleringsreagens 2

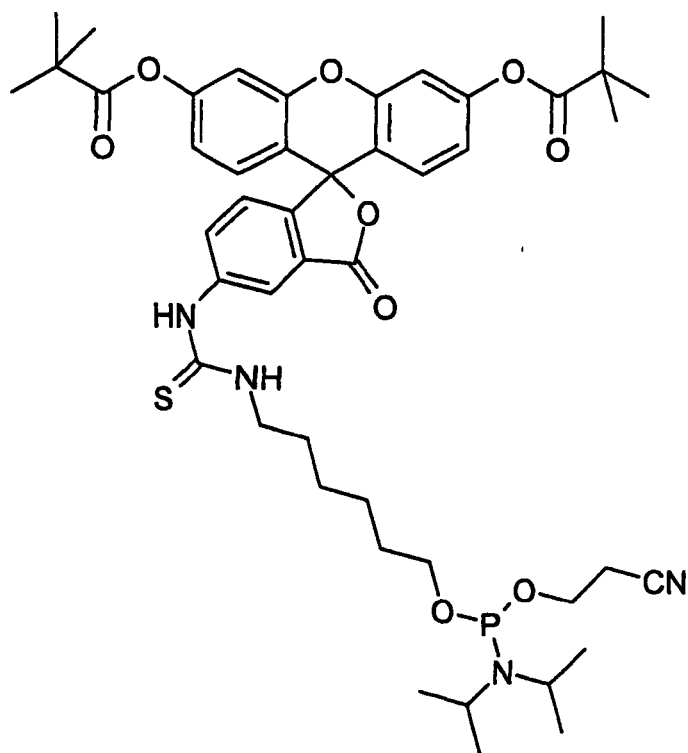
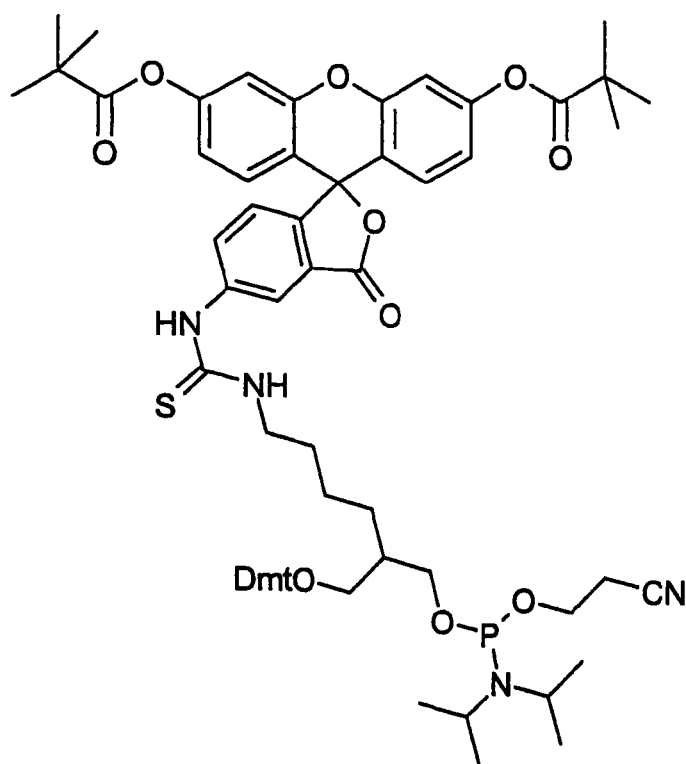
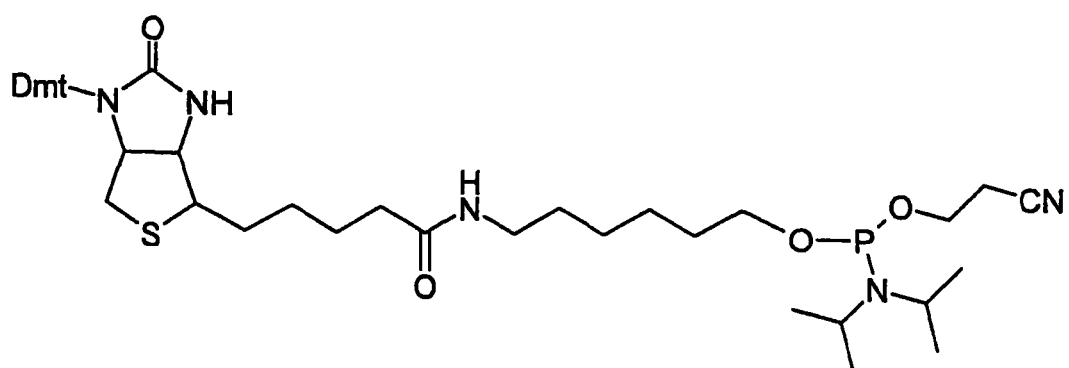
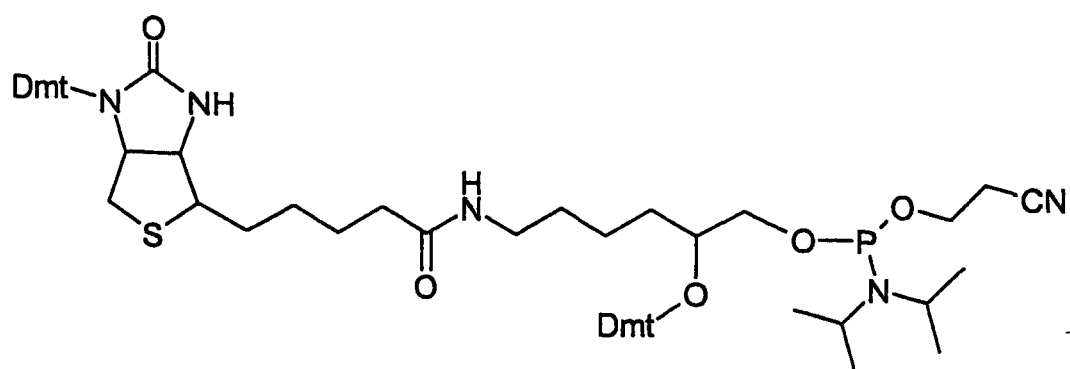
Fluorescein-fosforamidit 3
(monofunksjonell)

Fig. 4b:

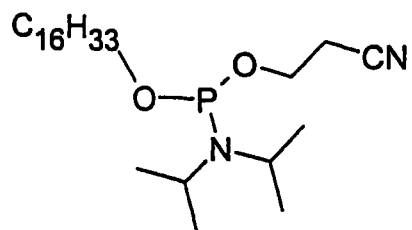
Fluorescein-fosforamidit 4
(bifunksjonell)

Biotin-fosforamidit 5 (monofunksjonell)

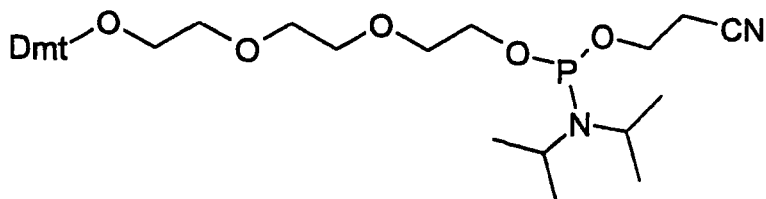


Biotin-fosforamidit 6 (bifunksjonell)

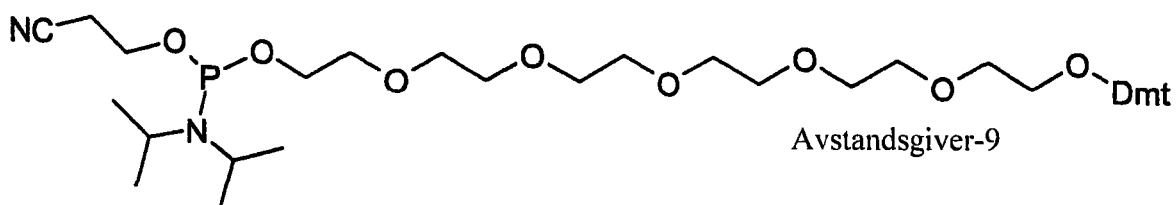
Fig. 4c:



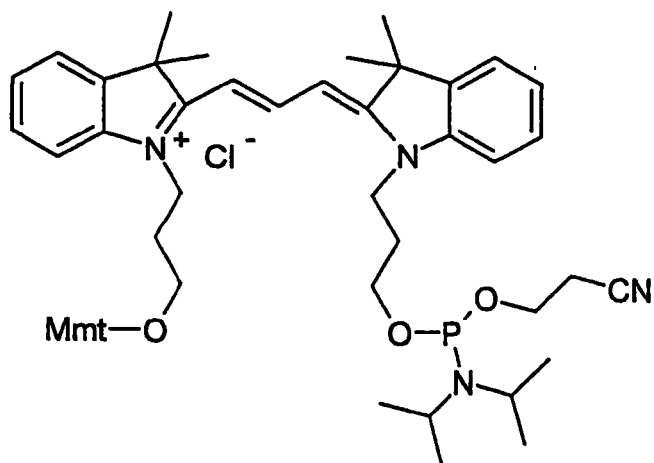
C16-Fosforyleringsreagens 7



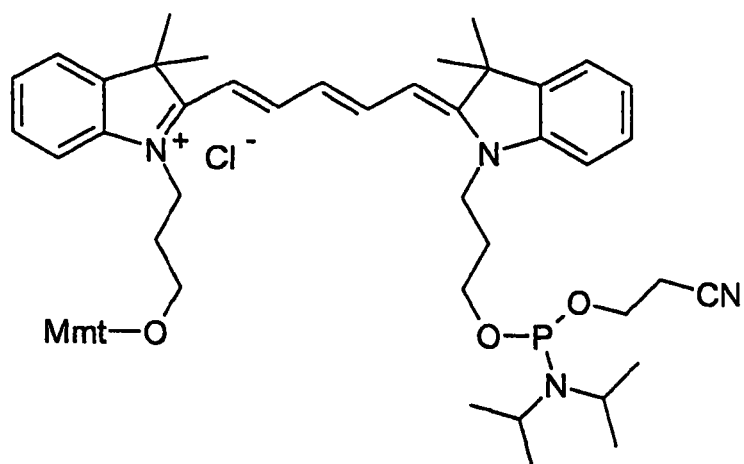
Avstandsgiver-9 fosforamidit 8



Avstandsgiver-9

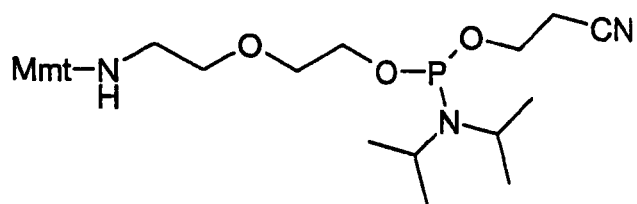
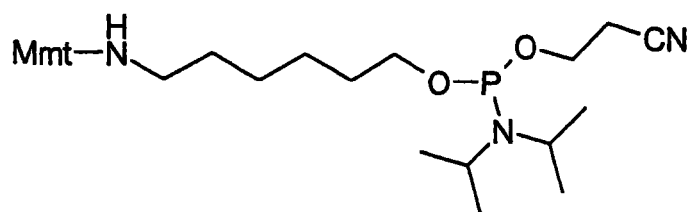


Cyanin-3 fosforamidit 10



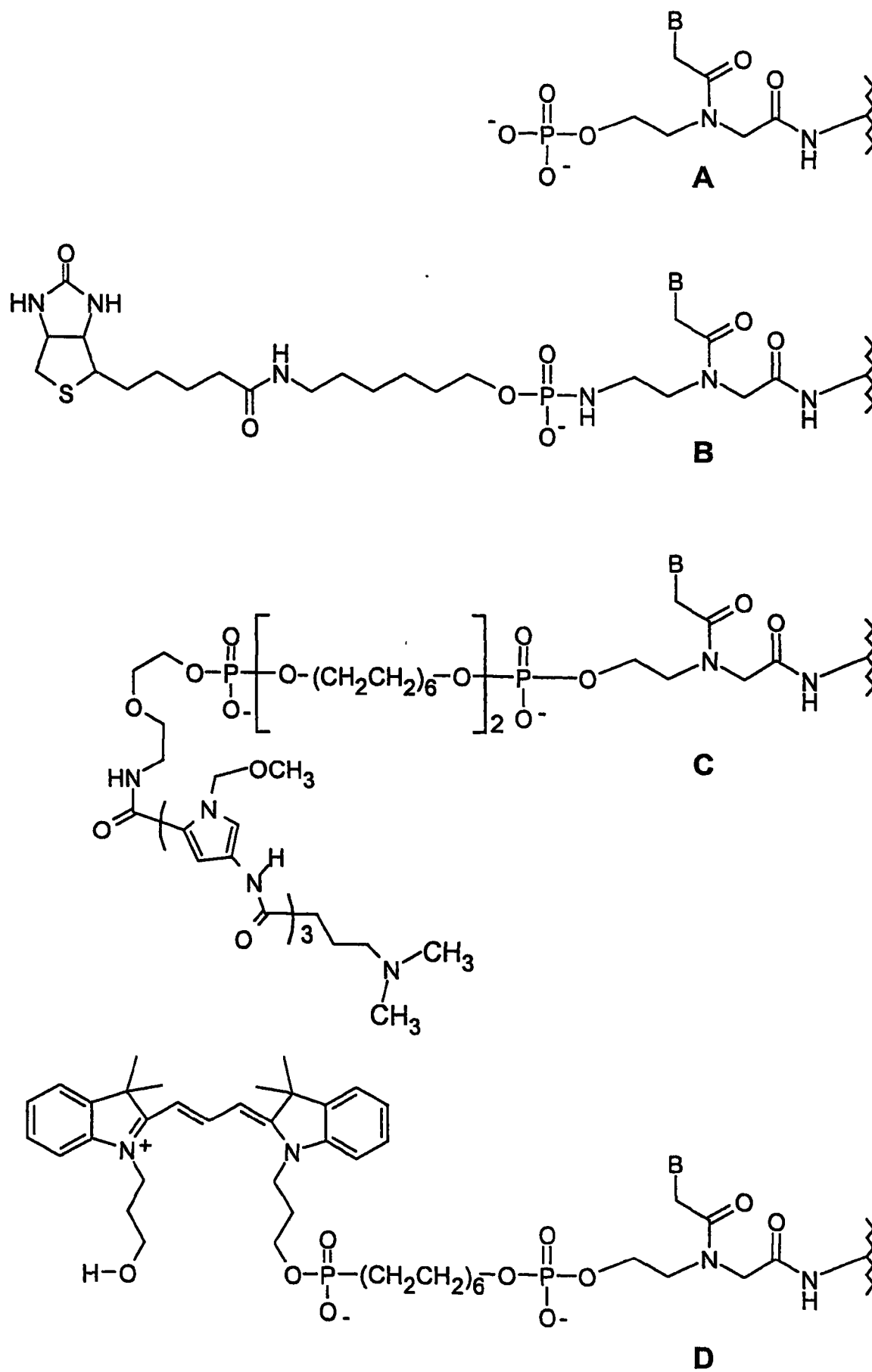
Cyanin-5 fosforamidit 11

Fig. 4d:

Aminomodifieringsmiddel-5
fosforamidit 12Aminomodifieringsmiddel-C6
fosforamidit 13

11/16

Fig. 5a:



12/16

Fig. 5b:

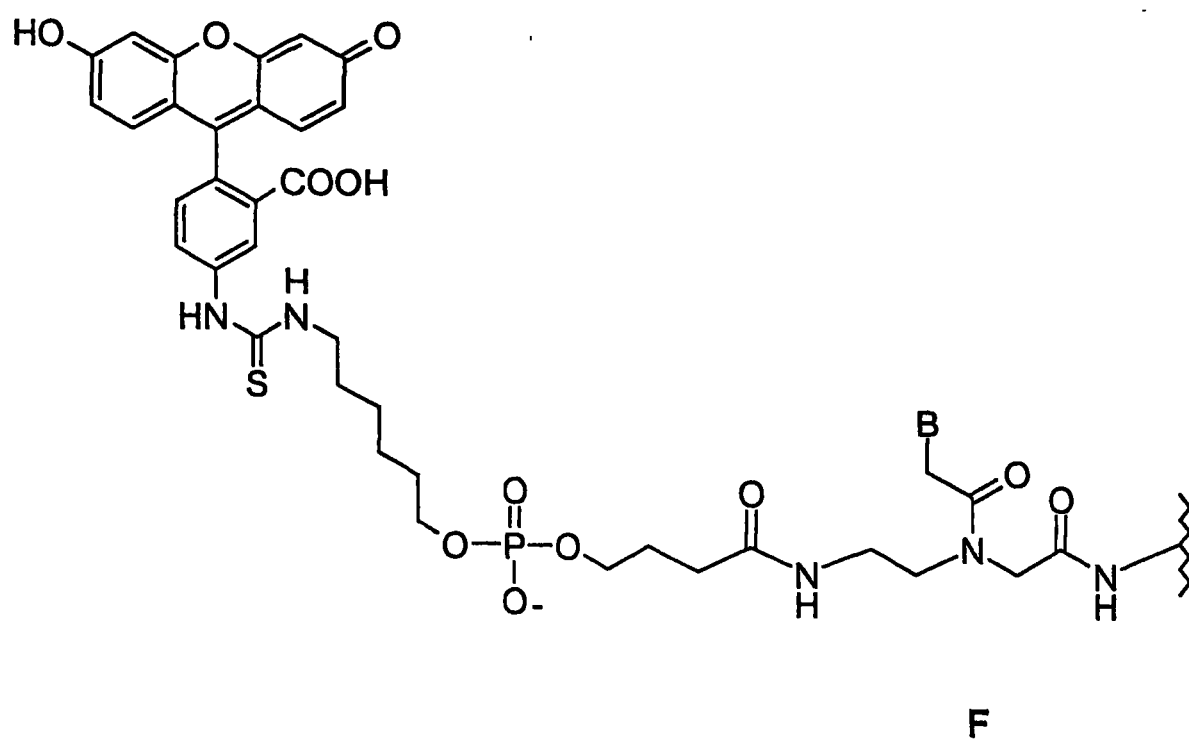
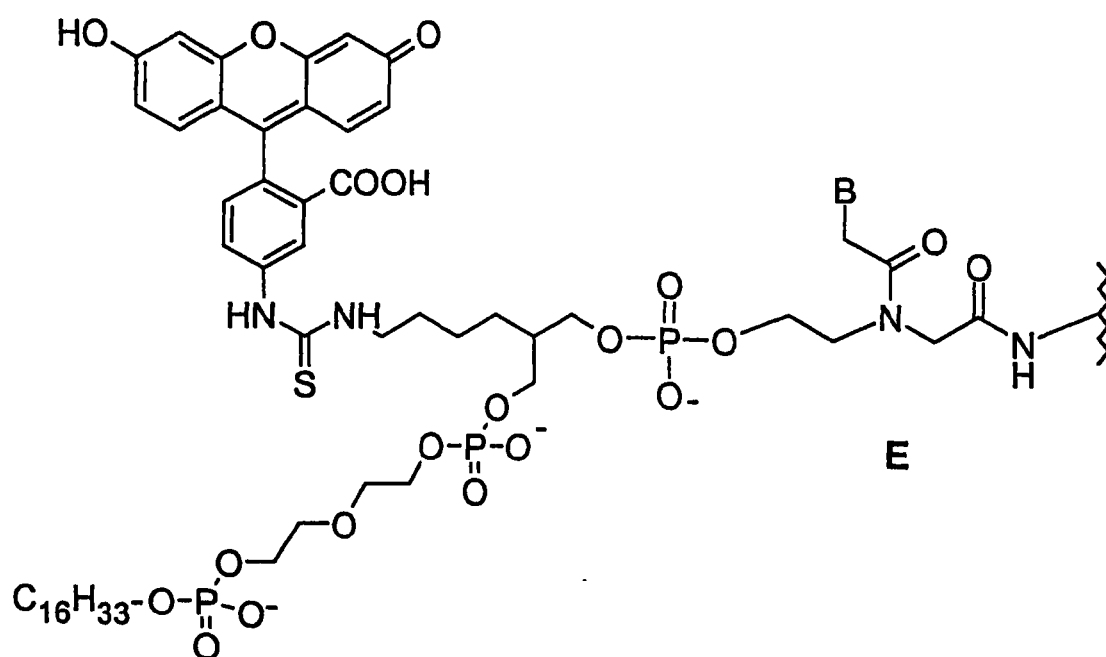
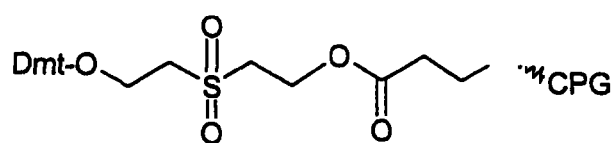
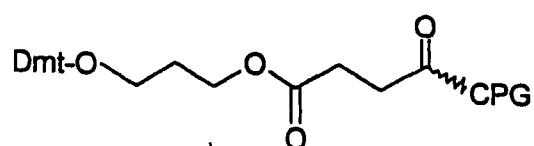


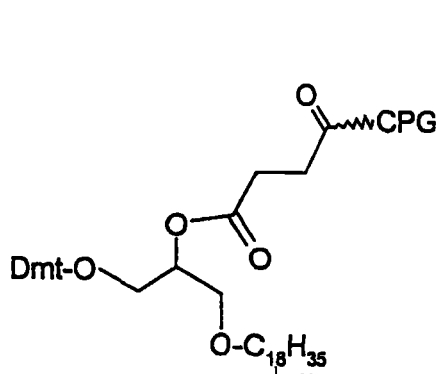
Fig. 6:



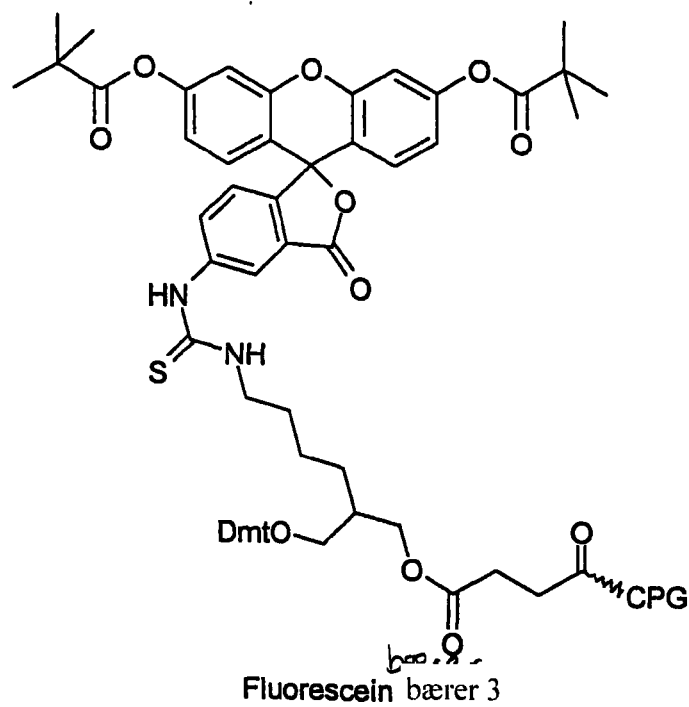
Bishydroksyetylsulfonylbærer 2



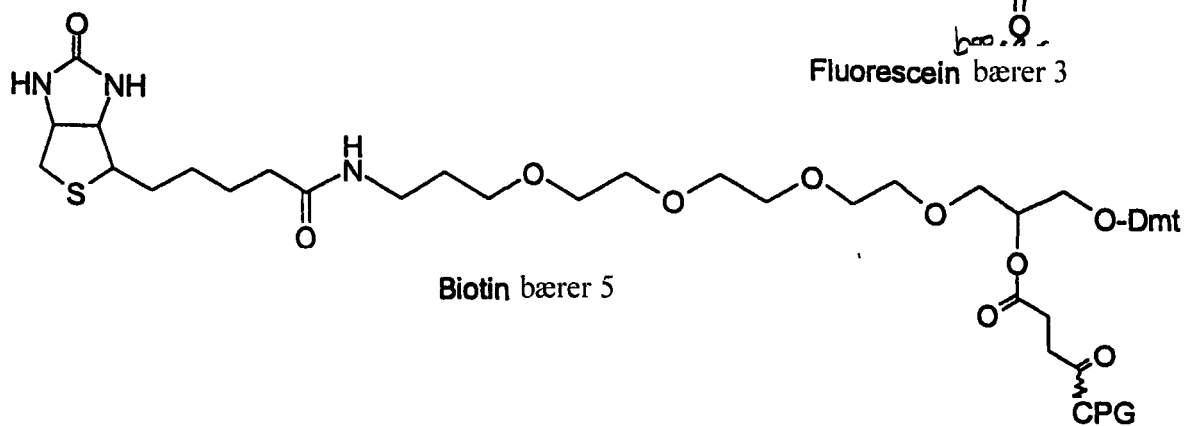
3'-spacer-C3 bærer 2



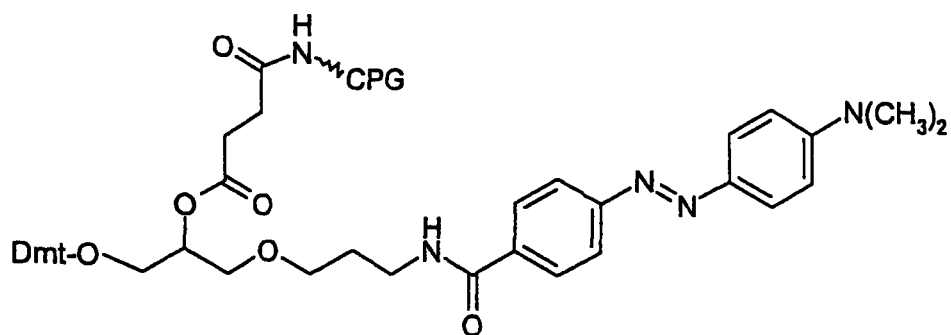
3'-BatyI bærer 4



Fluorescein bærer 3



Biotin bærer 5



DABCYL bærer 6

14/16

Fig. 7:

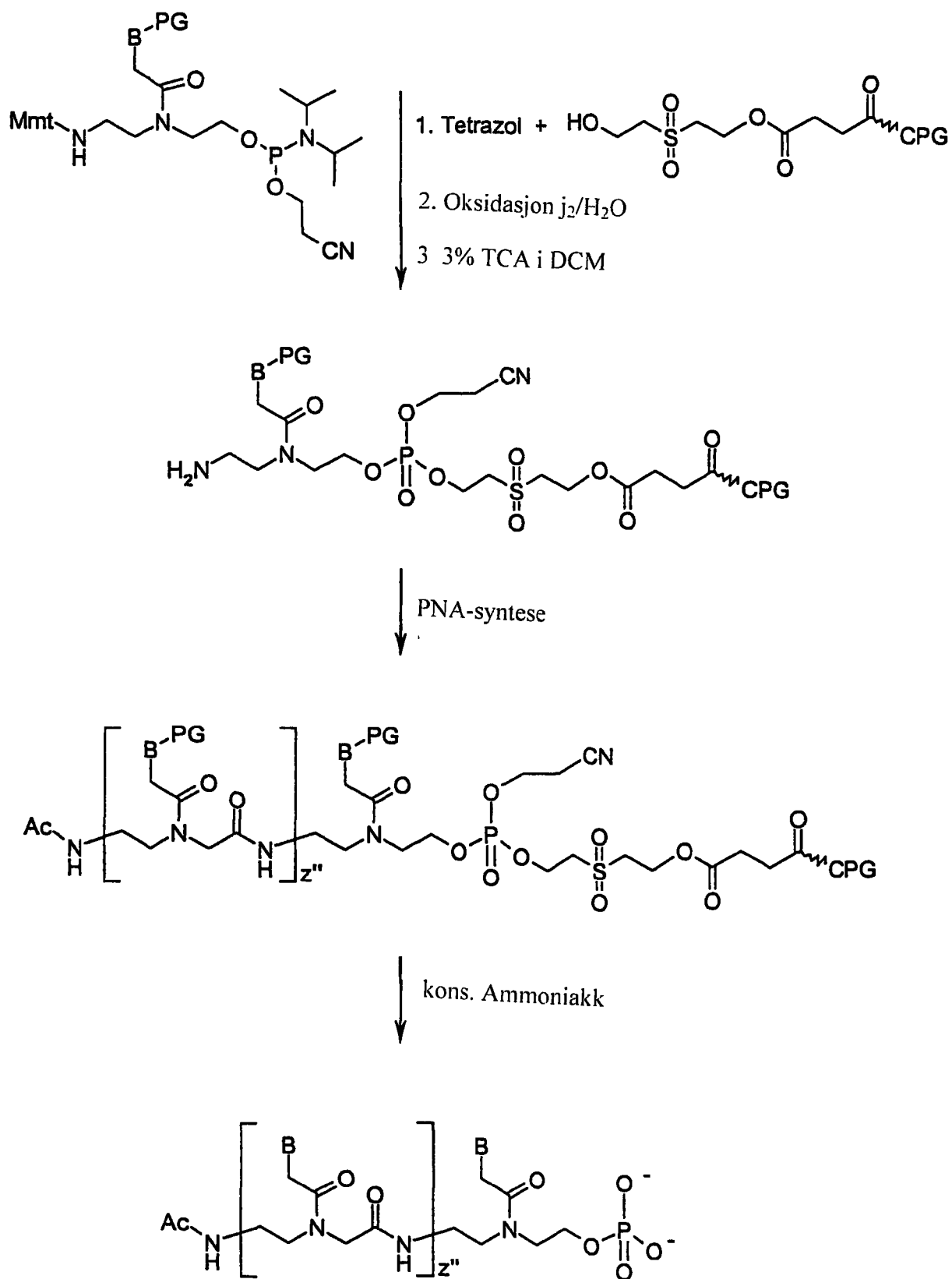


Fig. 8:

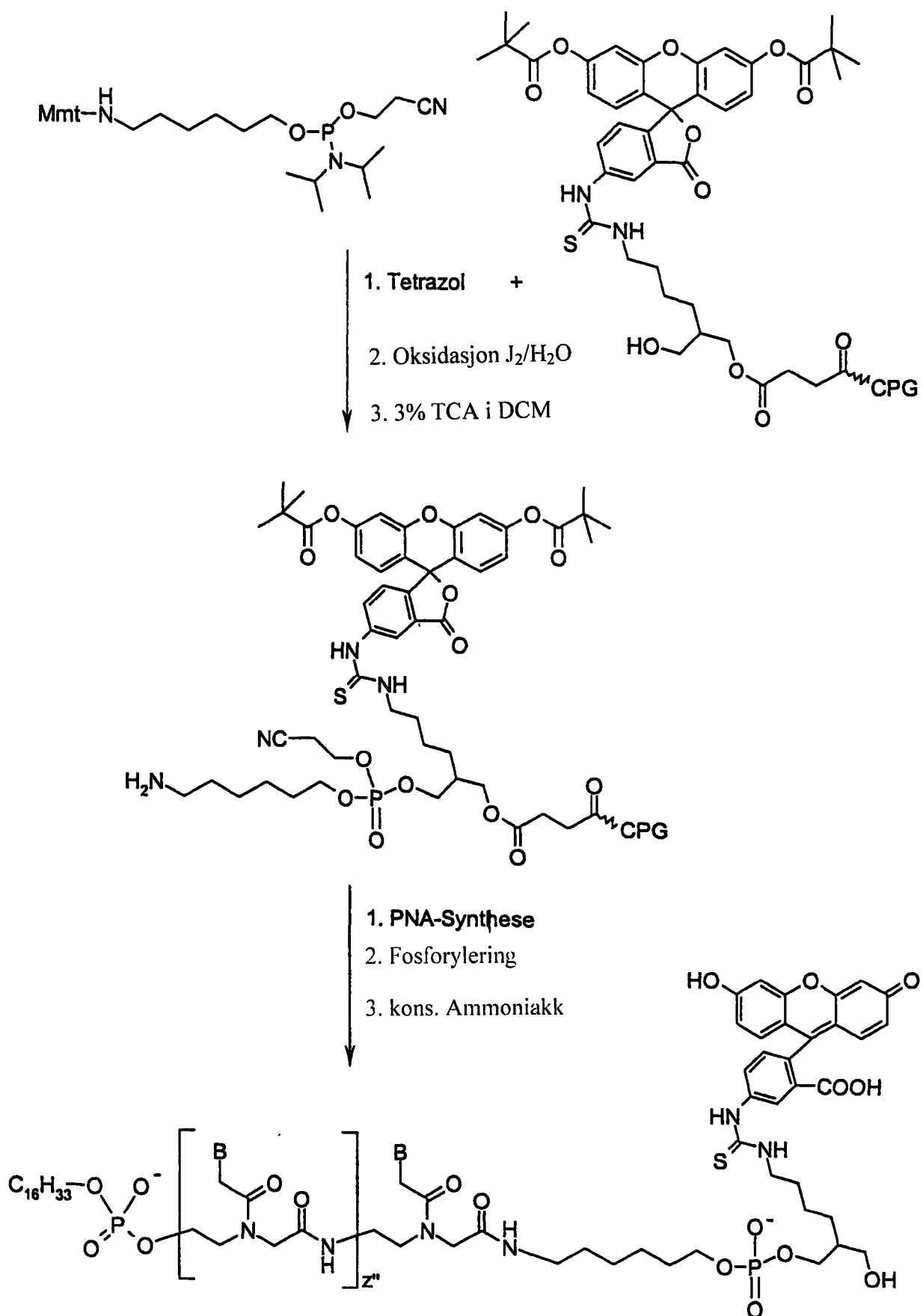


Fig. 9:

