

Foreliggende oppfinnelse vedrører nukleinsyreanaloger for
anvendelse innenfor feltet diagnostikk, blant annet for
5 oppfangning, gjenkjenning, deteksjon, identifikasjon eller
kvantifisering av en eller flere kjemiske eller mikrobiologi-
ske deler.

Oligodioksyribonukleotider (oligo-DNA) anvendes innen
10 diagnostiske prosedyrer. Det ble blant annet anvendt for
testing av tilstedeværelse av spesifikke mikroorganismer
eller for testing av tilstedeværelse av generiske predisposi-
sjoner, blant annet overfor sykdom, i rettsvitenskap og i
mikrobiologi generelt. Anvendelser av oligo-DNA i dette
15 området er selvfølgelig avhengig av evnen som slike oligo-DNA
har til å hybridisere til komplementære nukleinsyresekvenser.
Merkede oligo-DNA prober blir anvendt i hybridiserings-
analyser for å probe immobilisert moll DNA for tilstede-
værelse av spesifikke sekvenser. I amplifikasjonsprosedyrer
20 blir hybridiseringsegenskapen til oligo-DNA anvendt for å
hybridisere oligo-DNA primerene til templatmolekyler som skal
bli amplifisert.

Oligo-DNA som har lengder på 100 basepar blir nå rutinemessig
25 syntetisert ved anvendelse av en fasemetode og fullstendig
automatiske syntesemaskiner er konversielt tilgjengelige.
Muligheten av å konstruere syntetiske DNA-analoger som kan
hybridisere til naturlig DNA på en sekvensspesifikk måte og
som har kjemiske egenskaper som er fordelaktig forskjellig
30 fra selve DNA, er blitt vurdert. Dette arbeidet er blitt
motivert av den mulige anvendelsen av slike forbindelser
"anti-sens" terapeutiske midler hvor anvendelsen av konven-
sjonelle oligo-DNA møter vanskeligheter på grunn av at slike
umodifiserte oligonukleotider har en kort halveringstid in
35 vivo på grunn av den naturlige tilværelsen av nukleaser, er
vanskelig og dyrt å fremstille i en hvilken som helst mengde
og penetrerer cellemembraner dårlig.

PCT-søknad W086/05518 beskriver DNA-analoger som har et skjelett med en sekvens av ligander, vanligvis nukleotidbaser som har evne til sekvensspesifikk hybridisering til naturlig forekommende nukleinsyrer. Et antall forskjellige skjelett-strukturer er beskrevet. Ingen spesifikk eksemplifikasjon av forutsetningene til slike forbindelser er gitt og det eksisterer ingen data som viser affiniteten til de krevde analogene for DNA.

10

PCT-søknad W086/05519 beskriver diagnostiske reagenser og systemer omfattende DNA-analoger av samme type men igjen eksisterer det ingen eksemplifikasjon.

15 PCT-søknad W086/12060 beskriver oligonukleotidanaloger basert på forskjellige byggestener som de er syntetisert ut ifra. Byggestenene er eksemplifisert, men det er ingen eksempler for fremstilling av oligonukleotidanalog fra disse og dermed ingen indikasjon på ytelsen til analogene.

20

Det er videre kjent å modifisere DNA-skjelettet med det mål å øke resistensen overfor nuklease og generelt forbedre egnetheten til DNA for anvendelse i anti-sens terapeutiske metoder. Andre forsøk på å konstruere DNA-analoger er beskrevet i den innledende delen av W086/05518 nevnt ovenfor.

25

Den vanlig erfaringen har vært at modifikasjoner av skjelettet til naturlig DNA fører til en reduksjon i stabiliteten til hybridet dannet mellom det modifiserte oligonukleotidet og dets koplimentær normale oligonukleotid, analysert ved måling av T_m verdien. Den konvensjonelle viten innenfor dette området er at modifikasjoner av skjelettet alltid destabiliserer hybridet, dvs. resulterer i lave T_m verdier og derfor bør modifikasjon være så liten som mulig for å oppnå hybrider med bare en liten reduksjon i T_m verdien som det best oppnåelige resultat.

30
35

Foreliggende oppfinnelse vedrører anvendelse innen diagnostikk eller i analyse av nukleinsyreanaloger av ny struktur, fortrinnsvis med den tidligere ukjente egenskapen av å danne hybrider med komplementær sekvens konvensjonelle nukleinsyrer som er mere stabil med hensyn på T_m verdien enn det et lignende hybrid dannet av en konvensjonell nukleinsyre med tilsvarende sekvens og/eller som har større selektivitet for den komplementære sekvensen sammenlignet med sekvenser som involverer en grad av følparing enn det som vil fremkomme fra nevnte tilsvarende konvensjonelle nukleinsyre med tilsvarende sekvens.

Oppfinnelsen tilveiebringer en nukleinsyreanalog for anvendelse i oppfanging, gjenkjenning, deteksjon, isolering, identifisering eller kvantifisering av én eller flere kjemiske eller mikrobiologiske enheter, kjennetegnet ved at analogen er en peptidnukleinsyre (PNA) som omfatter et polyamidskjelett som bærer en mengde ligander respektivt i avstand beliggende langs skjelettet, nevnte ligander er hver uavhengig naturlig forekommende nukleobaser, ikke-naturlig forekommende nukleobaser eller nukleobasebindende grupper, hvor hver ligand er bundet direkte til, eller indirekte til, et nitrogenatom i nevnte skjelett, og nevnte ligand bærer nitrogenatomer som i hovedsak blir separert fra hverandre i nevnte skjelett ved fra 4 til 8 mellomliggende atomer, hvor nevnte analog blir inkorporert eller konjugert til et detekterbart merke.

Oppfinnelsen omfatter også en nukleinsyreanalog for anvendelse i oppfanging, gjenkjenning, deteksjon, isolering, identifisering eller kvantifisering av én eller flere kjemiske eller mikrobiologiske enheter, kjennetegnet ved at analogen er en nukleinsyreanalog istand til å hybridisere til en nukleinsyre av komplementær sekvens for å danne et hybrid som er mer stabilt mot denaturering ved varme enn et hybrid mellom det konvensjonelle deoksyribonukleotid som korresponderer til nevnte analog og nevnte nukleinsyre, hvor

nevnte analog er inkorporert eller blir konjugert til et detekterbart merke.

5 Videre omfatter oppfinnelsen nukleinsyreanalog for anvendelse i oppfangning, gjenkjenning, deteksjon, isolering, identifi-
sering eller kvantifisering av én eller flere kjemiske eller
mikrobiologiske enheter, kjennetegnet ved at analogen er en
nukleinsyreanalog istand til å hybridisere til en dobbelttrå-
det nukleinsyre hvori én tråd har en sekvens komplementær til
10 nevnte analog, for å erstatte den andre tråden fra nevnte ene
tråd, hvor nevnte analog blir inkorporert eller konjugert til
et detekterbart merke.

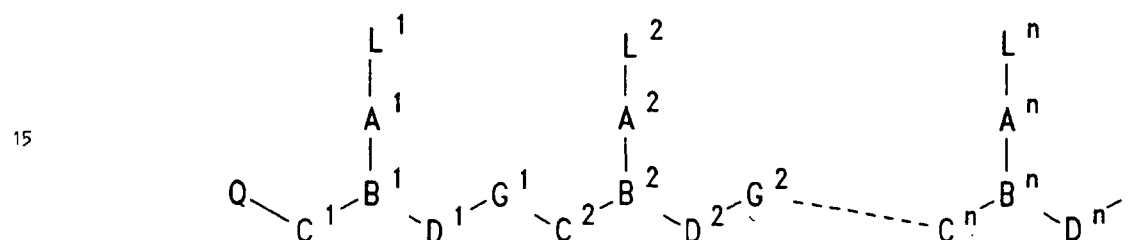
15 Separering av nitrogenbærende atomer i skjelettet til nukleinsyreanalogene definert ovenfor (PNA) er fortrinnsvis
med fem atomer. I nukleinsyreanalogene med formel I
(nedenfor) er dette blitt vist å gi den sterkeste affiniteten
for DNA. Det kan derimot i noen tilfelle være ønskelig å
redusere bindingsstyrken mellom PNA og DNA ved å plassere en
20 eller flere av ligandene ved en mindre enn optimal avstand,
f.eks. i en avstand på mer enn 5 atomer, f.eks. med opptil 14
atomer eller mer.

Det er foretrukket at ikke mer enn 25% av interligand
25 "spacingene" vil være på 6 atomer eller mer. Det er mer
foretrukket at ikke mer enn 10 til 15% av interligand
"spacingene" vil være på 6 atomer eller mer. Asanitrogen-
atomene vil være ligandene (direkte eller via linkergrupper
blir selv ikke telt i "spacingene" referert til ovenfor).

30 En alternativ eller ytterligere metode for å redusere styrken
til DNA-bindingen er å utelate visse av ligandene ved å
plassere en del som bidrar lite eller ikke noe til binding av
DNA, f.eks. hydrogen. Ikke mer enn 25% av lengandposisjonene
35 vil fortrinnsvis være okkupert av ikke-bindende deler, f.eks.
ikke mer enn 10 til 15%.

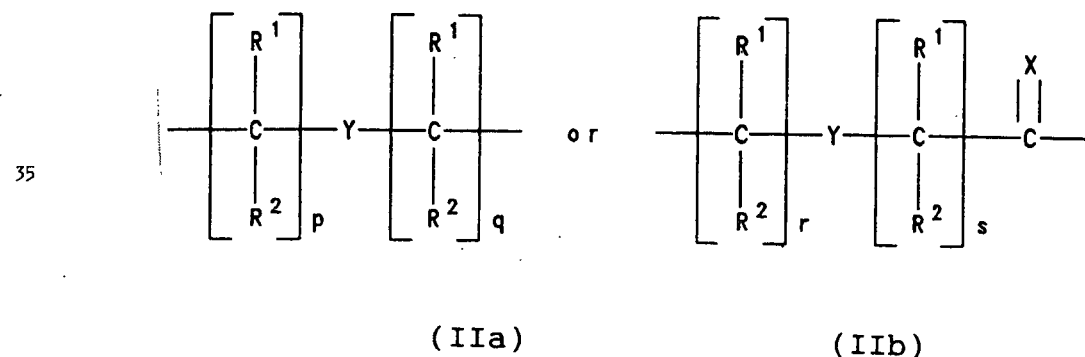
Representativ ligander omfatter enten de 4 viktigste naturlig forekommende DNA-basene (dvs. thymin, cytozin, adenin eller guanin) eller andre naturlige forekommende nukleobaser (f.eks. inosin, urasil, 5-metylcytosin eller tiourasil) eller kunstige baser (f.eks. bromurasil, asaadeniner eller asaguaniner osv.) koblet til et peptidskjelett gjennom en egnet linker.

I foretrukne utførelsesformer har nukleinsyreanalogene anvendt i oppfinnelsen den generelle formelen (I):



hvor:

n er minst 2,
 hver av L^1-L^n blir uavhengig valgt fra gruppen bestående av hydrogen, hydrokso, (C_1-C_4) alkanoyl, naturlige forekommende nukleobaser, ikke-naturlig forekommende nukleobaser, aromatiske deler, DNA interkalatorer. nukleobase-bindende grupper og reporter ligander, minst en av L^1-L^n er en naturlig forekommende nukleobase, en ikke-naturlig forekommende nukleobase, en DNA interkalator eller en nukleobase-bindende gruppe, hver av A^1-A^n er en enkelt binding, en metylengruppe eller en gruppe med formlene (IIa) eller (IIb):

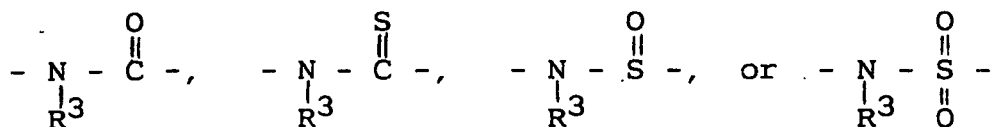


hvor:

X er O, S, Se, NR^3 , CH_2 eller $\text{C}(\text{CH}_3)_2$;

Y er en enkelt binding, O, S eller NR^4 ;

hver av p og q er et tall fra 1 til 5, summen p+q er ikke mer
 5 enn 10, hver av r og s er null eller et tall fra 1 til 5,
 summen r+s er ikke mer enn 10, hver R^1 og R^2 blir uavhengig
 valgt fra gruppen bestående av hydrogen ($\text{C}_1\text{-C}_4$)alkyl som kan
 være hydroksy- eller alkoksy- eller alkyltio-substituert,
 hydroksy, alkoksy, alkyltio, amino og halogen og
 10 hver R^3 og R^4 blir uavhengig valgt fra gruppen bestående av
 hydrogen, ($\text{C}_1\text{-C}_4$)alkyl, hydroksy- eller alkoksy- eller
 alkyltio-substituert ($\text{C}_1\text{-C}_4$)alkyl, hydroksy, alkoksy,
 alkyltio og amino,
 hver av $\text{B}^1\text{-B}^n$ er N eller R^3N^+ , hvor R^3 er som definert
 15 ovenfor, hver av $\text{C}^1\text{-C}^n$ er CR^6R^7 , CHR^6CHR^7 eller $\text{CR}^6\text{R}^7\text{CH}_2$,
 hvor R^6 er hydrogen og R^7 blir valgt fra gruppen bestående av
 sidekjeder av naturlig forekommende alfa aminosyrer, eller R^6
 og R^7 blir uavhengig valgt fra gruppen bestående av hydrogen,
 ($\text{C}_2\text{-C}_6$)alkyl, aryl, aralkyl, heteroaryl, hydroksy, ($\text{C}_1\text{-}$
 20 C_6)alkoksy, ($\text{C}_1\text{-C}_6$)alkoksy, ($\text{C}_1\text{-C}_6$)alkyltio, NR^3R^4 og SR^5 ,
 hvor R^3 og R^4 er som definert ovenfor og R^5 er hydrogen, ($\text{C}_1\text{-}$
 C_6)alkyl, hydroksy-, alkoksy-, eller alkyltio- substituert
 ($\text{C}_1\text{-C}_6$)alkyl, eller R^6 og R^7 fullfører sammen et alisyklisk
 eller heterosyklisk system, hver av $\text{D}^1\text{-D}^n$ er CR^6R^7 , $\text{CH}_2\text{CR}^6\text{R}^7$
 25 eller CHR^6CHR^7 , hvor R^6 og R^7 er som definert ovenfor, hver
 av $\text{G}^1\text{-G}^{n-1}$ er



30

i hvilken som helst orientering, hvor R^3 er som definert
 ovenfor, Q er $-\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{CONR}'\text{R}''$, $-\text{SO}_3\text{H}$ eller $-\text{SO}_2\text{NR}'\text{R}''$ eller
 et aktivert derivat og $-\text{CO}_2\text{H}$ eller $-\text{SO}_3\text{H}$, og

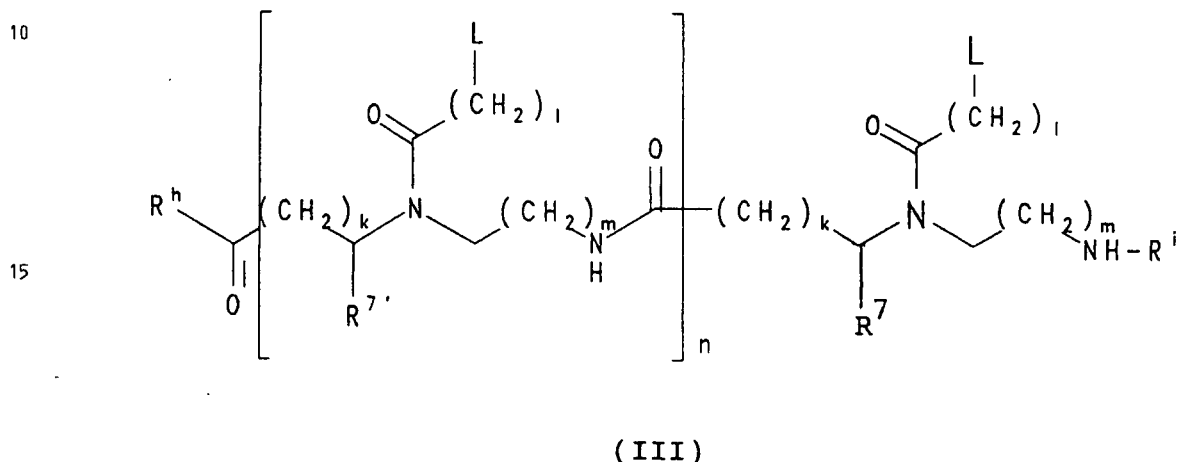
I er $-\text{NHR}'''\text{R}''''$ eller $-\text{NR}'''\text{C}(\text{O})\text{R}''''$,

35 hvor R' , R'' , R''' og R'''' blir uavhengig valgt fra gruppen
 bestående av hydrogen, alkyl, aminobeskyttende grupper,
 reporterligander, interkalatorer, chelatorer, peptider,

proteiner, karbohydrater, lipider, steroider, oligonukleotider og oppløselige og ikke-oppløselige polymerer. Alternativt kan C og D være $\text{CHR}^6(\text{CH}_2)_S\text{CHR}^7$ hvor S kan være fra 0 til 2.

5

Foretrukne peptidnukleinsyrer har generelt formel (III):



20

hvor:

hver L blir uavhengig valgt fra gruppen bestående av hydrogen, fenyl, heterosykler, f.eks. en, to eller tre ringer, naturlig forekommende nukleobaser og ikke-forekommende nukleobaser, hver R^7 blir uavhengig valgt fra gruppen bestående av hydrogen og sidekjedene til naturlig forekommende alfa aminosyrer, n er et tall fra 1 til 60, hver av k, l og m er uavhengig null eller et tall fra 1 til 5, fortrinnsvis er summen av k og m 1 eller 2, mest foretrukket 1,

R^h er OH, NH_2 eller $-NHLysNH_2$, og

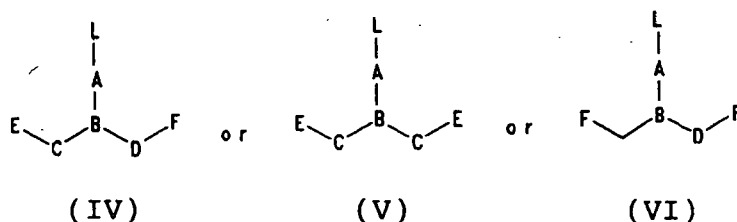
$$R^i \text{ er H eller } COCH_3$$

Spesielt foretrukket er forbindelser med formel (III) hvor
 35 hver L uavhengig blir valgt fra gruppen bestående av
 nukleobasene thymin (T), adenin (A), cytozin (C), guanin (G)
 og urasil (U), spesielt thymin, og n er et tall fra 1 til 30.

spesielt fra 4 til 20. Et eksempel på en slik forbindelse er gitt i fig. 1 som viser den strukturelle likheten mellom slike forbindelser og enkelt-trådete DNA.

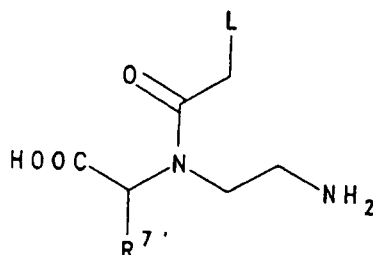
Peptidnukleinsyrene ifølge oppfinnelsen kan bli syntetisert ved tilpasning av standard peptidsynteseprosedyrer, enten i oppløsning eller på en fast fase. Syntonene som blir anvendt kan være spesielt konstruerte monomeraminosyrer eller deres aktiverte derivater, beskyttet med standard beskyttende grupper. Oligonukleotidanalogene kan også bli syntetisert ved anvendelse av de tilsvarende diasidene og diaminene.

Monomersyntonene anvendt for å produsere forbindelsene for anvendelse i oppfinnelsen kan bli valgt fra gruppen bestående av aminosyrer, diasider og diaminer med generelle formler:



hvor L, A, B, C og D er som definert ovenfor med unntagelse av at hvilke som helst aminogrupeer deri kan bli beskyttet med aminobeskyttende grupper, E er COOH, CSOH, SOOH, SO₂OH eller et aktivert derivat derav og F er NHR³ eller NPgR³, hvor R³ er som definert ovenfor og Pg er en aminobeskyttende gruppe.

Foretrukne monomersyntoner er aminosyrer med formelen (VII):



(VII)

eller amino-beskyttede og/eller syreterminaltaktiverte derivater derav, hvor L blir valgt fra gruppen bestående av hydrogen, fenyl, heterosykler, naturlig forekommende nukleobaser, ikke-naturlig forekommende nukleobaser og beskyttede derivater derav, og R^{7'} blir uavhengig valgt fra gruppen bestående av hydrogen og sidekjedene til naturlig forekommende alfaaminosyrer. Spesielt foretrukket er slike syntoner med formel (4) hvor R^{7'} er hydrogen og L blir valgt fra gruppen bestående av nukleobasene thymin (T), adenin (A), cytozin (C), guanin (G) og urasil (U) og beskyttede derivater derav.

I henhold til oppfinnelsen er det innbefattet anvendelse av nukleinsyreanaloger som definert ovenfor for oppfanging, gjenkjenning, deteksjon, identifikasjon eller kvantitering av en eller flere kjemiske eller mikro-biologiske deler. Vanligvis er den delen som blir detektert i første henseende en nukleinsyre og nevnte del vil bli detektert via dets karakteristiske sekvenser av nukleinsyrebaser ved hybridisering.

Nukleinsyreanalogene som definert ovenfor kan bli anvendt i en fremgangsmåte for oppfanging av en nukleinsyre omfattende å bringe i kontakt under hybriserende betingelser nevnte nukleinsyrer med en nukleinsyreanalog for anvendelse i oppfinnelsen immobilisert til en fast bærer, hvor den immobiliserte nukleinsyreanalogen har en sekvens av ligander egnet for å hybridisere til nevnte nukleinsyre eller nukleinsyreanalog som skal bli oppfanget.

Den faste bæreren kan ha mange forskjellige former som er kjent i sammenheng med imobilisering av konvensjonelle oligonukleotider for anvendelse ved affinitetsoppfanging. En fast bærer kan blant annet være en plate, et filter, en multi-brønn plate eller en "dipstick". Den kan ta form av individuelle partikler så som kuler og slike partikler kan bli holdt i en kolonne hvorgjennom nukleinsyreinnholdende

oppløsninger kan bli kjørt for å muliggjøre oppfangning av ønskede arter.

Den oppfangede nukleinsyren kan bli gjenkjent, detektert, 5 identifisert eller kvantifisert på forskjellige måter. Etter vasking kan den oppfangede nukleinsyren være den eneste nukleinsyren som er igjen i systemet og kan bli detektert ved hjelp av et hvilket som helst reagenssystem egnet for demonstrering av tilstedeværelse av nukleinsyre enten om den 10 er spesifikk for den oppfangede sekvensen eller ikke. Dersom f.eks. den oppfangede nukleinsyren er DNA og blir oppfanget i enkelttrådet form av et relativt kort PNA, kan overhengende enkelttrådet DNA bli spaltet av nuklease og spaltingsproduktene kan bli detektert ved hjelp av konvensjonelle 15 metoder. Dersom DNA er dobbelttrådet og PNA igjen er relativt kort, kan den delen av DNA som er igjen i dets opprinnelige dobbelttrådet form (dvs. som ikke blir erstattet av PNA) bli detektert ved hjelp av konvensjonelle DNA interkalatorer som ikke blir bundet til PNA-DNA dupleksen. 20 Antistoffer som gjenkjenner nukleinsyrer kan bli anvendt for å detektere nukleinsyrer (RNA, dsDNA eller ssDNA) bundet til den immobiliserte nukleinsyreanalogen.

Ved affinitetsoppfangning av nukleinsyreartene ved anvendelse 25 av konvensjonelle oligonukleotider immobilisert til en fast bærer er det nødvendig normalt å rense målnukleinsyren. Nukleasene som kan være tilstede i prøven angriper den immobiliserte nukleinsyren. Lite spesifikk binding blir oppnådd i praksis ved slik uspesifikk binding. Det er videre 30 nødvendig å denaturere DNA til enkelttrådet form før oppfangingen kan foregå.

Nukleinsyreanalogene med formel I angitt ovenfor er ikke mottagelige for angrep av nukleaser og gir vanligvis høyere 35 nivåer av spesifikk binding i kraft av deres høye affinitet for nukleinsyre av komplementær sekvens enn det som blir oppnådd ved anvendelse av konvensjonell oligonukleotider som

immobiliserte arter. Nukleinsyreanalogene anvendt i henhold til oppfinnelsen kan hybridisere til nukleinsyrer av komplementær sekvens uten at nukleinsyrene først blir denatureert til enkelttrådet form. Når målnukleinsyren er
5 blitt oppfanget kan den bli frigjort fra den immobiliserte nukleinsyreanalogen ved å utsette den immobiliserte nukleinsyreanalogen og oppfanget nukleinsyre for dehybridiserende betingelser så som varme og dimetylformamid.

10 Den immobiliserte nukleinsyreanalogen kan omfatte sekvensielle ligander så som thymin, hybridiserbar til poly A halene av mRNA for oppfangning av mRNA.

Oppfinnelsen omfatter en affinitetsoppfangingskolonne
15 omfattende immobiliserte nukleinsyreanaloger som beskrevet ovenfor.

Foreliggende oppfinnelse vedrører derfor også fordelene ved anvendelse av PNA molekyler i fast-fasekjemi (se f.eks.
20 "Solid-Phase Biochemistry - Analytical and Synthetic Aspects", W. H. Scouten, ed., John Wiley & Sons, New York, 1983), spesielt fast-fasebiosystemer, spesiell bioanalyse eller fast-faseteknikker som vedrører diagnostisk deteksjon/-kvantifisering eller affinitetsrensing av komplementære
25 nukleinsyrer (se f.eks. "Affinity Chromatography - A Practical Approach", P. D. G. Dean, W. S. Johnson og F. A. Middle, eds., IRL Press Ltd., Oxford 1987). Fremgangsmåtene av idag for utførelse av slike bioanalyser eller rensningsteknikker omfatter nesten bare "normale" eller delvis
30 modifiserte oligonukleotider som er enten fysisk absorbert eller bundet gjennom en vesentlig permanent kovalent forankringsbinding til kuleformige faste bærere så som cellulose, glasskuler, inkludert de med kontrollert porøsitet (Mizutani, et al., J. Chromatogr., 1986, 356, 202), "Sephadex", "Sephacrose", agarose, polyakrylamid, porøs partikkel-
35 formig aluminiumoksid, hydroksyalkyl, metakrylatgeler, diolbundet silika, porøse keramiske stoffer eller kontinuer-

lige materialer så som filterskiver av nylon og nitrocellulose. Et eksempel anvendte den kjemiske syntesen av oligo-dT på cellulosekuler for affinitetsisolering av poly A halen inneholdende mRNA (Gilham in "Methods i Enzymology", L. Grossmann og K. Moldave, eds., vol. 21, del D, side 191, Academic Press, New York og London, 1971). Alle ovennevnte metoder kan anvendes innenfor denne oppfinnelsen. Når mulig er kovalentlig binding foretrukket i forhold til fysisk adsorpsjon av molekylerne det gjelder p.g.a. at sistnevnte tilnærmelse har ulempen med at noen av de mobiliserte molekylerne kan bli vasket ut (desorbent) iløpet av hybridiserings- eller affinitetsprosessen. Det er derfor liten kontroll av i hvilken grad den art adsorbent på overflaten av bærematerialet går tapt iløpet av de forskjellige behandlingene som bæreren har blitt utsatt for iløpet av bioanalyse-/rensningsprosedyren. Alvorlighetsgraden av dette problemet vil selvfølgelig avhenge av raten hvorved likevekt mellom adsorbent og frie arter oppnås. I visse tilfeller kan det være omtrent umulig å utføre en kvantitativ analyse med akseptabel nøyaktighet og/eller reproduserbarhet. Tap av adsorbent arter iløpet av behandling av bæreren med kroppsvæsker, vandige reagenser eller vaskemedium vil generelt være ventet å være mest uttalt for arter med relativt lav molekylvekt. I kontrast med oligonukleotider er PNA molekylet lettere å få koblet på faste bærere p.g.a. at de inneholder sterke nukleofile og/eller elektrofile sentere. Den direkte oppstillingen av oligonukleotider på faste bærere lider av en ekstrem lav belastning av det immobiliserte molekylet p.g.a. den lave overflatekapasiteten til materialene som muliggjør vellykket anvendelse av kjent fosforamiditkjemi for konstruksjon av oligonukleotidene. (Beaucage og Caruthers, Tetrahedron Lett., 1981, 22, 1859; Caruthers, Science, 1985, 232, 281). Ved anvendelse av den alternative fosfittriestermetoden (Letsinger og Mahadevan, J. Am. Chem. Soc. 1976, 98, 3655), som er egnet for faste bærere med en høy overflate/belastningskapasitet, kan bare relativt kort oligonukleotider dessverre bli oppnådd. Når det gjelder

konvensjonell fast-fase peptidsyntese er derimot sistnevnte bærere gode materialer for oppbygging av immobiliserte PNA molekyler (side-kjede beskyttende grupper kan bli fjernet fra den syntetiserte PNA kjeden uten spaltning av forankringsbindingen som holder kjeden til den faste bæreren). PNA arter drar fordeler av ovennevnte fast-fase teknikker med hensyn på 5 mye høyere (og fortsatt sekvens-spesifikk) bindingsaffinitet for komplementære nukleinsyrer og fra den unike sekvens-spesifikke gjenkjenningen av (og sterke bindinger til) 10 nukleinsyrene som er tilstede i dobbelt-trådede strukturer. De kan også bli applisert på faste bærere i store mengder som dermed ytterligere øker sensitiviteten/kapasiteten til fast-fase teknikken. Visse typer av studier vedrørende anvendelse av PNA innen fast-fase kjemi kan videre bli anvendt og lettet 15 eller i stor grad akselerert ved anvendelse av den nylig rapporterte "light-directed, spatially addressable, parallell chemical synthesis" teknologi (Fodor, et al., Science, 1991, 251, 767), en teknikk som kombinerer fast-fase kjemi og fotolitografi for å produsere tusenvis av sterkt forskjellige, men identifiserbare, permanent immobiliserte forbindelser (også peptider) på en vesentlig simultan måte. 20

Det er blitt oppdaget at PNA ifølge formel I utviser en egenskap som aldri før er blitt observert og som omfatter at 25 en slik nukleinsyreanalog kan hybridisere til en konvensjonell nukleinsyre presentert i dobbel-trådet form og som under slike betingelser kan hybridisere til tråden som har en sekvens som er komplementær med analogen og kan forflytte den andre tråden fra den opprinnelige nukleinsyredupleksen. Slik 30 gjenkjenning kan foregå på dsDNA sekvenser som er 5-60 basepar i lengde. Sekvenser mellom 10 og 20 baser er av interesse på grunn av at dette er området hvor unike DNA sekvenser fra prokaryoter og eukaryoter finnes. Reagenser som gjenkjenner 17-18 baser er av spesiell interesse p.g.a. 35 at dette er lengden på unike sekvenser i det humane genomet.

Det er også blitt observert at når en slik hybridiseringsreaksjon blir utført i oppløsning hybridiserer en andre tråd av nukleinsyreanalogen som har samme sekvens som den første til nukleinsyretråden med komplementær sekvens for å danne en trippel heliks struktur hvor to lignende tråder av PNA blir hybridisert til en enkelt tråd av en konvensjonell nukleinsyre. Det antas at den første PNA tråden hybridiserer med inter-base hydrogenbindingen av vanlig type, mens den andre PNA tråden mottas i "major groove" av den opprinnelige duplekse ved Hoogsteen parring. Når PNA er immobilisert til en fast bærer blir hybridisering til dobbelttrådet nukleinsyre med forflytting av en tråd derifra observert, men dannelsen av trippel heliks strukturer kan bli forhindret ved immobilisering av PNA.

Oppfinnelsen omfatter en nukleinsyreanalog som definert ovenfor og som inkorporerer eller konjugerer til en detekterbar markør. Generelt kan alle metoder for merking av peptider, DNA og/eller RNA som for tiden er kjent bli anvendt også på PNA. Fremgangsmåte for merking vil derfor innbefatte anvendelse av radio-isotopmarkører, enzymmarkører, biotin, spinmarkører, fluoroforer, kjemiluminisensmarkører, antigenmarkører eller antistoffmarkører.

Merket PNA som beskrevet ovenfor kan bli anvendt i metoder for gjenkjenning, deteksjon eller kvantifisering av målnukleinsyrer omfattende hybridisering av nevnte mål til en merket nukleinsyreanalog som definert ovenfor med tilstrekkelig komplementær sekvens å hybridisere dermed under hybridiserende betingelser og detektering eller kvantifisering av nevnte markør av nukleinsyreanalogen som er på denne måte hybridisert til nevnte mål.

Eventuelt kan målene bli immobilisert på et substrat før hybridiseringen.

I en slik fremgangsmåte kan målet bli immobilisert på substratet ved hybridisering av den første region av målet til en oppfangingsnukleinsyre eller nukleinsyreanalog med en sekvens som er tilstrekkelig komplementær med nevnte første
5 region for å hybridisere den med og som selv blir immobilisert til nevnte substrat og den merkede nukleinsyreanalog kan bli hybridisert til en andre region av målet.

Evnen som i det minste foretrukne nukleinsyreanaloger ifølge
10 oppfinnelsen har til å hybridisere til en dobbel-trådet målnukleinsyre og erstatte en tråd derifra er blitt beskrevet ovenfor. Oppfinnelsen omfatter en fremgangsmåte for erstatning av en tråd fra en nukleinsyredupleks omfattende hybridisering til nevnte dupleks av en nukleinsyreanalog som
15 definert ovenfor som har en affinitet for den andre tråden av nevnte dupleks som er tilstrekkelig for å muliggjøre erstatning av nevnte ene tråd derifra.

Oppfinnelsen vedrører en in vitro-fremgangsmåte for opp-
20 fanging av en nukleinsyre, kjennetegnet ved å bringe nevnte nukleinsyre i kontakt under hybridiseringsbetingelser med en nukleinsyreanalog som definert i hvilket som helst av kravene 12 til 23 immobilisert på et fast støttemedium, hvis nukleinsyreanalog har en sekvens av ligander egnet til å
25 hybridisere til nevnte nukleinsyre.

Videre omfatter oppfinnelsen in vitro-fremgangsmåte for å gjenkjenne, detektere eller kvantifisere en målnukleinsyre, kjennetegnet ved at den omfatter å hybridisere nevnte
30 målnukleinsyre til en merket nukleinsyreanalog ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 11 for tilstrekkelig å komplementere sekvensen til derved å hybridisere under hybridiseringsbetingelser og detektere eller kvantifisere mere av nevnte nukleinsyreanalog som så blir hybridisert til nevnte
35 målnukleinsyre.

Omfattet av oppfinnelsen er også in vitro-fremgangsmåte for å erstatte én tråd fra nukleinsyredupleks, kjennetegnet ved at den omfatter å hybridisere til nevnte dupleks en nukleinsyreanalog som har en affinitet for den andre tråden av nevnte dupleks tilstrekkelig til å være istand til å erstatte
5 nevnte ene tråd derfra.

Oppfinnelsen omfatter også in vitro-fremgangsmåte for å detektere, identifisere eller kvantifisere en dobbelttrådet
10 målnukleinsyre, kjennetegnet ved at den omfatter å hybridisere dertil en erstatningsnukleinsyreanalog som tidligere nevnte, istand til å erstatte én tråd fra en dobbelttrådet målnukleinsyre hvori den andre tråden er av komplementær sekvens til nevnte erstattede nukleinsyreanalog, hvori nevnte
15 erstattede nukleinsyreanalog er av tilstrekkelig komplementær sekvens til nevnte andre tråd av nevnte dobbelttrådet målnukleinsyre for å hybridisere dertil for å erstatte nevnte ene tråd av nevnte målnukleinsyre i enkelttrådet form, og detektere eller kvantifisere tilstedeværelse av nevnte ene
20 erstattede tråd.

Den forflyttede tråden kan bli brutt ned til fragmenter og tilstedeværelse av nevnte fragmenter kan bli detektert. Den forflyttede tråden kan fortrinnsvis bli brutt ned med angrep
25 av en nuklease. Man kan derfor detektere tilstedeværelse av en spesifikk dobbelt-trådet målnukleinsyresekvens ved hybridisering dertil av et komplementært PNA for å produsere trådforflytting for å produsere enkelt-trådet DNA i reaksjonsblandingen og spalte enkelt-trådet DNA ved anvendelse av
30 en nuklease for å produsere nukleotider hvor tilstedeværelsen kan bli detektert som en indikator som spesifikt mål dobbelt-trådet DNA var opprinnelig tilstede.

Foreliggende oppfinnelse vedrører et kit for anvendelse i en
35 diagnostisk prosedyre, kjennetegnet ved at kittet omfatter minst én merket nukleinsyreanalog som tidligere nevnt, og

minst ett deteksjonsreagens for å detektere nevnte merkede nukleinsyreanalog.

5 Generelt vil nukleinsyreanalogene være i oppløsning i en hybridiseringsbuffer. Et slikt kit vil generelt også innbefatte minst en vaskebufferoppløsning.

10 Når nukleinsyreanalogen er indirekte merket, f.eks. med biotin, kan kitet innbefatte et konjugat mellom en enzym-markør og et materiale så som avidin som kan bli bundet til markøren av nukleinsyreanalogen.

15 Når nukleinsyreanalogen er enten direkte eller indirekte enzymmerket kan kittet omfatte et substrat for enzymet som er egnet til å gjennomgå en registrerbar reaksjon formidlet av enzymet.

20 Foreliggende oppfinnelse omfatter anvendelse in vitro ved oppfangning, gjenkjenning, deteksjon, isolering, identifisering eller kvantifisering av én eller flere kjemiske eller mikrobiologiske enheter av en nukleinsyreanalog som er en peptidnukleinsyre (PNA), som omfatter et polyamidskjelett som bærer en mengde ligander ved respektivt i avstand beliggende langs nevnte skjelett, hvor nevnte ligander hver er uavhengig naturlig forekommende nukleobaser, ikke-naturlig forekommende 25 nukleobaser eller nukleobasebindende grupper, hvor hver nevnte ligand blir bundet direkte eller indirekte til et nitrogenatom i nevnte skjelett, og nevnte ligand som bærer nitrogenatomer hovedsakelig blir separert fra hverandre i 30 nevnte skjelett ved fra 4 til 8 mellomliggende atomer.

Foreliggende oppfinnelse omfatter anvendelse in vitro ved oppfangning, gjenkjenning, deteksjon, isolering, identifisering eller kvantifisering av én eller flere kjemiske eller 35 mikrobiologiske enheter av en nukleinsyreanalog som er en peptidnukleinsyre (PNA), som omfatter et polyamidskjelett som bærer en mengde ligander ved respektivt i avstand beliggende

langs nevnte skjelett, hvor nevnte ligander hver er uavhengig naturlig forekommende nukleobaser, ikke-naturlig forekommende nukleobaser eller nukleobasebindende grupper, hvor hver nevnte ligand blir bundet direkte eller indirekte til et nitrogenatom i nevnte skjelett, og nevnte ligand som bærer nitrogenatomer hovedsakelig blir separert fra hverandre i nevnte skjelett ved fra 4 til 8 mellomliggende atomer.

Videre omfatter oppfinnelsen in vitro-anvendelse ved oppfangning, gjenkjenning, deteksjon, isolering, identifisering eller kvantifisering av én eller flere kjemiske eller mikrobiologiske enheter av en nukleinsyreanalog som er en nukleinsyreanalog istand til å hybridisere til en nukleinsyre eller komplementær sekvens for å danne et hybrid som er mer stabilt mot denaturering ved varme enn et hybrid mellom den konvensjonelle deoksyribonukleotid korresponderende til nevnte analog og nevnte nukleinsyre.

Oppfinnelsen omfatter også in vitro-anvendelse ved oppfangning, gjenkjenning, deteksjon, isolering, identifisering eller kvantifisering av én eller flere kjemiske eller mikrobiologiske enheter av en nukleinsyreanalog som er en nukleinsyreanalog som er istand til å hybridisere til en dobbelttrådet nukleinsyre hvori én tråd har en sekvens komplementær til nevnte analog, for å erstatte den andre tråden fra den nevnte ene tråden.

Videre omfatter oppfinnelsen anvendelse for in vitro-deteksjon eller isolering av en spesifikk nukleinsyre fra en oligonukleotidanalogue som binder mer sterkt til dens komplementære sDNA eller RNA-tråder enn det korresponderende DNA eller RNA, respektivt.

Oppfinnelsen vil bli beskrevet i ytterligere detalj og vil bli illustrert med referanse til de vedlagte figurene hvor:

Fig. 1 viser et naturlig forekommende deoksyribooligonukleotid (A) og en peptidnukleinsyre (PNA) ifølge oppfinnelsen (B).

5 Fig. 2 viser eksempler på naturlig forekommende og ikke naturlig forekommende nukleobaser for DNA gjenkjenning og reportergrupper.

10 Fig. 3 angir en skjematisk illustrasjon av (A) fotospaltning ved $\text{Acr}^1\text{-(Taeg)}_{10}\text{-Lys-NH}_2$ ($\text{Acr T}_{10}\text{Lys-NH}_2$), (b) fotoavtrykk ved diaso-koblet akridin av $\text{Acr}^1\text{-(Taeg)}_{10}\text{-Lys-NH}_2$ og foretrukket KMnO_4 -spaltning og (c) S_1 -nuklease forsterket spaltning og (d) mikrokokkusnuklease spaltning av $\text{Acr}^1\text{-(Taeg)}_{10}\text{-Lys-NH}_2$ bindingssete.

15

Fig. 4 angir eksempler på PNA monomer syntoner.

Fig. 5 viser Acr^1 liganden og en PNA, $\text{Acr}^1\text{-(Taeg)}_{10}\text{-Lys-NH}_2$.

20 Fig. 6 angir et generelt skjema for fremstilling av monomer syntoner.

Fig. 7 angir et generelt skjema for preparering av Acr^1 liganden.

25

Fig. 8 viser et generelt skjema for fast-fase PNA syntese som illustrerer preparering av lineære ubeskyttede PNA amider.

30 Fig. 9 viser analytiske HPLC kromatogrammer av: (A) rå $\text{H-[Taeg]}_{15}\text{-NH}_2$ etter HF-spaltning (før lyofilisering), (B) urenset $\text{Acr}^1\text{-[Taeg]}_{15}\text{-NH}_2$ etter HF-spaltning (før lyofilisering) og (C) rensset $\text{Acr}^1\text{-[Taeg]}_{15}\text{-NH}_2$. Buffer A, 5% $\text{CH}_3\text{CN}/95\% \text{H}_2\text{O}/0.0445\% \text{TFA}$, buffer B, 60% $\text{CH}_3\text{CN}/40\% \text{H}_2\text{O}/0.0390\% \text{TFA}$, lineær gradient, 0-100% B i 30 min, strømningsrate, 1,2 ml/min, kolonne, Vydac C_{18} (5 μm , 0,46 x 25 cm).

35

Fig. 10 viser analytiske HPLC kromatogrammer av: (A) rensset H-[Taeg]₁₀-Lys-NH₂ og (B) rensset H-[Taeg]₅-Caeg-[Taeg]₄-Lys-NH₂ ved anvendelse av samme betingelser som i fig. 9.

5 Fig. 11a og 11b viser binding av AcrT₁₀-Lys til dA₁₀.5'-³²P-merket oligonukleotid (1) (5' -GATCCT₁₀G) ble inkubert i fravær eller nærvær av AcrT₁₀-Lys og i fravær eller nærvær av oligonukleotidet (2) (5' -GATCCT₁₀G) og prøvene ble analysert ved polyakrylamidgelelektroforese (PAGE) og autoradiografi
10 under "native betingelser" (fig. 11a) eller under "denaturerende betingelser" (fig. 11b).

Figurene 12a-c viser kjemisk, fotokjemisk og enzymatisk probing av dsDNA-AcrT₁₀-Lys-NH₂ komplekset. Kompleksene
15 mellom AcrT₁₀-Lys-NH₂ og et ³²P-ende merket DNA fragment inneholdende en dA₁₀/dt₁₀ mål-sekvens ble probet ved affinitet fotospaltning (fig. 12a, kolonne 1-3, fig. 12b, kolonne 1-3), fotoavtrykk (fig. 12a, kolonne 5-6), kaliumpermanganatprobing (fig. 12b, kolonne 4-6) eller probing ved
20 stafylokokknuklease (fig. 12b, kolonne 8-10) eller ved nuklease S₁ (fig. 12c). Enten ble A-tråden (fig. 12a) eller T-tråden (figurene 12b,c) probet.

Fig. 13 angir en prosedyre for syntese av beskyttede PNA syntoner.
25

Fig. 14 angir en prosedyre for syntese av en beskyttet adeninmonomersynton.

30 Fig. 15 angir en prosedyre for syntese av en beskyttet guaninmonomersynton.

Fig. 16 angir eksempler på PNA skjelettendringer.

35 Fig. 17 angir en prosedyre for syntese av thyminmonomersyntoner med sidekjeder som tilsvarer normale aminosyrer.

Figurene 18a og 18b angir prosedyrer for syntese av en aminopropylanalog og en propionylanalog av en thyminmonomersynton.

- 5 Fig. 19 angir en prosedyre for syntese av en aminoetyl- β -alanin analog av thyminmonomersynton.

Fig. 20 viser en PAGE autoradiograf som demonstrerer at PNAs- T_{10} , $-T_9C$ og $-T_8C_2$ blir bundet til dobbelttrådet DNA med høy
10 sekvensspesifisitet.

Fig. 21 viser en graf basert på densitometrisk scanning av PAGE autoradiografer som demonstrerer kinetikken av binding av PNA- T_{10} til et dobbelttrådet mål.

- 15 Fig. 22 viser en graf basert på densitometrisk scanning av PAGE autoradiografer som demonstrerer termiske stabilitetene til PNA med varierende lengder bundet til et A_{10}/T_{10} dobbelttrådet DNA mål.

- 20 Fig. 23 viser en elektroforetisk gelfarving som demonstrerer at restriksjonsenzymaktiviteten overfor DNA blir inhibert når PNA er bundet proksymalt til restriksjonsenzymgjenkjenningssættet.

- 25 Fig. 24 viser en PAGE autoradiograf som demonstrerer at ^{125}I -merket PNA- T_{10} blir bundet til et komplementært dA_{10} oligonukleotid.

Figurene 25a til c viser prosentvis binding oppnådd ved
30 varierende temperaturer mellom en immobilisert PNA og paring eller et basefeilparet oligo-DNA.

Fig. 26 er en autoradiograf som viser inhibisjon av transkripsjonen ved RNA polymerase ved T_{10} PNA på den transkriberte tråden.
35

Fig. 27 er en autoradiograf av en blanding av merket plasmid dsDNA oppfanget på en immobilisert komplementær til en av disse og vasket ved varierende temperaturer.

5 Fig. 28 kombinerer en etidiumbromidgel og en autoradiograf derav som illustrerer den kvantitative bestemmelsen av plasmid dsDNA ved trådforflytting ved PNA.

I PNA med formel I og monomersyntoner anvendt i produksjon
 10 derav er ligand L hovedsaklig en naturlig forekommende nukleobase koblet ved posisjonen som finnes i naturen, d.v.s. posisjon 9 for adenin eller guanin, og posisjon 1 for thymin eller cytozin. Alternativt kan hver av noen av ligandene L være en ikke-naturlig forekommende nukleobase (nukleobase-analog), en annen base-bindingsdel, en aromatisk del, (C₁-
 15 C₄)alkanoyl, hydroksy eller selv hydrogen. Noen typiske nukleobaseligander og illustrerende syntetiske ligander er vist fig. 2. L kan videre være en DNA interkalator, en reporterligand så som f.eks. en fluorofoer, radiomarkør, spinnmarkør, hapten eller en protein-gjenkjennende ligand så
 20 som biotin.

I monomersyntoner kan L være utstyrt med beskyttende grupper. Dette er illustrert i fig. 4 hvor Pg¹ er en syre, en base
 25 eller en hydrogenolytisk eller fotokjemisk spaltbar beskyttede gruppe så som f.eks. t-butoksy-karbonyl (Boc), fluorenylmetyloksykarbonyl (Fmoc) eller 2-nitrobenzyl (2Nb).

Linker A kan være forskjellige grupper så som -CR¹R²CO-, -
 30 CR¹R²CS-, -CR¹R²CSe, -CR¹R²CNHR³-, -CR¹R²- og -CR¹R²C=C(CH₃)₂-, hvor R¹, R² og R³ er som definert ovenfor. A er fortrinnsvis metylenkarbonyl (-CH₂CO-). A kan også være en lengre kjededel så som propanoyl, butanoyl eller pentanoyl, eller tilsvarende derivat hvor O blir erstattet med en annen
 35 verdi av X eller kjeden blir substituert med R¹R² eller er heterogen, inneholdende Y. A kan videre være en (C₂-C₆)alkylen kjede, en (C₂-C₆)alylen kjede substituert med R¹R²

eller kan være heterogen, inneholdende Y. I visse tilfelle kan A bare være en enkeltbinding.

I den foretrukne formen ifølge oppfinnelsen er B et nitrogenatom som derved presenterer muligheten for et achiralt skjelett. B kan også være R^3N^+ , hvor R^3 er som definert ovenfor.

I den foretrukne formen ifølge oppfinnelsen er C $-CR^6R^7-$, men kan også være en tokarbonenhet, dvs. $-CHR^6CHR^7-$ eller $-CR^6R^7CH_2-$, hvor R^6 og R^7 er som definert ovenfor. R^6 og R^7 kan også være en heteroarylgruppe så som f.eks. pyrrolyl, furyl, tionyl, imidasolyl, pyridyl, pyrimidinyl, indolyl, eller kan sammen fullføre et alisyklisk system så som f.eks. 1,2-syklobutandiyl, 1,2-syklopentandiyl eller 1,2-sykloheksandiyl.

I den foretrukne formen ifølge oppfinnelsen er E i monomer-syntonet COOH eller et aktivert derivat derav og G i oligomeren er $-CONR^3-$. (Fortrinnsvis i orienteringen $-R^3NOC$ i formel I). Som definert ovenfor kan E også være CSOH, SOOH, SO_2OH eller et aktivert derivat derav, hvorved G i oligomeren blir henholdsvis $-CSNR^3-$, $-SONR^3-$ og $-SO_2NR^3-$. Aktiveringen kan f.eks. bli oppnådd ved anvendelse av et syreanhydrid eller et aktivt esterderivat, hvor hydrogen i gruppene representert ved E blir erstattet med en avspaltbar gruppe egnet for dannelsen av det voksende skjelettet.

Aminosyrene som danner skjelettet kan være identisk eller forskjellig. Vi har funnet at de som er basert på 2-aminoetylglisin er spesielt godt egnet for hensikten ifølge oppfinnelsen.

I noen tilfelle kan det være av interesse å koble ligander ved en av endeterminale (Q, I) for å modulere bindings-karaktertrekkene til PNA. Representative ligander omfatter DNA interkalatorer som vil forbedre dsDNA bindingen eller

basiske grupper, så som lysin eller polylysin som vil styrke bindingen av PNA forårsaket av elektrostatisk interaksjon. For å redusere negativt ladede grupper så som karboksy kan sulfogrupeer bli anvendt. Konstruksjonen av syntonene
5 muliggjør videre at andre deler blir liggende ikke-terminale posisjoner.

PNA oligomerene kan bli konjugert til lavmolekylære effekto-
ligander så som ligander som har nukleaseaktivitet eller
10 alkylerende aktivitet eller reporterligander (fluoresens, spinmarkør, radioaktive, proteingjenkjenningsligander, f.eks. biotin eller haptener). I et ytterligere aspekt ifølge oppfinnelsen blir PNA konjugert til peptider eller proteiner hvor peptidene har signaliserende aktivitet og proteinene er
15 f.eks. enzymer, transkripsjonsfaktorer eller antistoffer. PNA kan videre bli koblet til vann-oppløselige eller vann-uoppløselige polymerer. I et annet aspekt ifølge oppfinnelsen blir PNA konjugert til oligonukleotider eller karbohydrater. Når ønskelig kan en PNA oligomer bli
20 syntetisert på samme del (f.eks. en peptidkjede, reporter, interkalator eller annen type av ligand-inneholdende gruppe) koblet til en fast bærer.

Syntese av PNA for anvendelse i oppfinnelsen blir diskutert i
25 detalj nedenfor, hvor fig. 1 illustrerer en av de foretrukne PNA eksemplene og sammenligner dets struktur med det til et komplementært DNA.

Syntese av PNA oligomerer og polymerer.
30 Prinsippet for forankring av molekyler på en fast matrix som er hjelpelig med å utgjøre mellomprodukter iløpet av kjemiske omdanninger er kjent som fast-fase syntese eller Merrifield syntese (se f.eks. Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 1963, 85, 2149 og Science, 1986, 232, 341). Etablerte
35 metoder for den trinnvise eller fragmentvise fast-fase oppstillingen av aminosyrer til peptider anvender normalt en kuleformet matrix av delvis kryss-bundede styren-divinyl-

bensenkopolymer, idet den kryss-bundede kopolymeren er blitt dannet ved perlepolymerinsering av styrenmonomeren hvor det er blitt tilsatt en blanding divinylbensener. Et nivå på 1-2% kryss-binding ble vanligvis anvendt. En slik matrix kan
5 også bli anvendt i fast-fase PNA syntesen i henhold til foreliggende oppfinnelse (fig. 8).

Vedrørende den opprinnelige funksjonaliseringen av den faste fasen er mer enn femti metoder blitt beskrevet når det
10 gjelder tradisjonell fast-fase peptidsynteser (se f.eks. Barany og Merrifield i "The Peptides" Vol. 2, Academic Press, New York, 1979, s. 1-284 og Stewart og Young "Solid Phase Peptide Synthesis", 2nd Ed., Pierce Chemical Company, Illinois, 1984). Reaksjonene for innføring av klormetylfunksjonaliteten (Merrifield harpiks, via en klormetylmetyl-
15 eter/ SnCl_4 reaksjon) aminometylfunksjonalitet (via en N-hydroksymetylfthalimid reaksjon, se Mitchell, et al., Tetrahedron Lett., 1976, 3795), og benshydrylaminofunksjonalitet Pietta, et al., J. Chem. Soc., 1970, 650) er den mest
20 anvendte. Uansett egenskap er hensikten med funksjonaliteten normalt å danne en forankringsbinding mellom kopolymer fastbæreren og C-terminusen til den første aminosyre som skal bli koblet til den faste bæreren. Det er genrelt hensiktsmessig å uttrykke "konsenstrasjon" til en funksjonell
25 gruppe med hensyn på millimol pr. gram (mmol/g). Andre reaktive funksjonaliteter som opprinnelig er blitt innført omfatter 4-metylbenshydrylamino og 4-metoksybenshydrylamino. Alle disse etablerte metodene er i prinsippet nyttige innenfor foreliggende oppfinnelse. Foretrukne metoder for
30 PNA syntese anvender aminometyl som innledende funksjonalitet, idet aminometyl er spesielt foredelaktig med hensyn på innkorporering av "spacer" eller "handle" grupper på grunn av reaktiviteten til aminogruppen med aminometylfunksjonalitet med hensyn på den vesentlige kvantitative dannelsen av
35 amidbindinger til en karboksylsyregruppe ved den ene enden av det spacer-dannende reagenset. Et stort antall relevante spacer- eller skaft("handle")-dannende bifunksjonelle

reagenser er blitt beskrevet (se Barany, et al., Int. J. Peptide Protein Res., 1987, 30, 705), spesielt reagenser som er reaktive overfor aminogrupper som finnes i aminometylfunksjonen. Representative bifunksjonelle reagenser omfatter 4-
5 (haloalkyl)aryl-lavere alkanolske syrer så som 4-(bromometyl)-fenyleddiksyre, Boc-aminoacyl-4-(oksymetyl)aryl-lavere alkanolske syrer som som Boc-aminoacyl-4-(oksymetyl)pefyleddiksyre, N-Boc-p-acylbenshydrylaminer så som N-Boc-p-glutaroylbenshydrylamin, N-Boc-4'-lavere alkyl-p-acylbens-
10 hydrylaminer så som N-Boc-4'-metyl-p-glutaroylbenshydrylamin, N-Boc-4'-lavere alkoksy-p-acylbenshydrylaminer så som N-Boc-4'-metoksy-p-glutaroylbenshydrylamin og 4-hydroksymetylfenoksyeddiksyre. En type spacer-gruppe som er spesielt relevant innenfor denne sammenhengen er fenylasetamidometyl
15 (Pam) (Mitchell og Merrifield, J. Org. Chem., 1976, 41, 2015) som, avledet fra den elektrontiltrekkende virkningen til 4-fenylasetamidometylgruppen, er omtrent 100 ganger mere stabil enn den klassiske benzylester-bindingen overfor Boc-amino avspaltningsreagenset trifluoreddiksyre (TFA).

20 Visse funksjonaliteter (f.eks. benshydrylamino, 4-metylbenshydrylamino og 4-metoksybenshydrylamino som kan bli inkorporert for spaltning av en syntetisert PNA kjede fra den faste bæreren slik at C-terminalen til PNA kjeden er i
25 amidform krever ingen introduksjon av en spacer-gruppe. En hvilken som helst slik funksjonalitet kan med fordel bli anvendt i foreliggende oppfinnelse.

En alternativ strategi vedrørende innføring av spacer eller
30 skaft-grupper er den såkalte "preformed handle" strategien (se Tam, et al., Synthesis, 1979, 955-957), som medfører fullstendig kontroll over koblingen av den første aminosyresyren og utelukker muligheten av komplikasjoner som oppstår fra tilstedeværelse av uønskede funksjonelle grupper som ikke
35 er relatert til peptid eller PNA syntesen. I denne strategien blir spacer eller skaft-grupper, av samme type som beskrevet ovenfor, omsatt med den første aminosyren som er

ønskelig å bli bundet til den faste bæreren, idet aminosyren er en N-beskyttet og eventuelt beskyttet ved andre sidekjeder som ikke er relevante med hensyn på veksten av den ønskede PNA kjeden. I de tilfellene hvor en spacer eller

5 skaft-gruppe er ønskelig kan den første aminosyren som skal bli koblet til den faste bæreren enten bli koblet til den frie reaktive enden av en spacergruppe som er blitt bundet til den opprinnelige innførte funksjonaliteten (f.eks. en aminometylgruppe) eller kan bli omsatt med det spacer-

10 dannende reagenset. Det spacer-dannende reagenset blir deretter omsatt med den opprinnelige innførte funksjonaliteten. Andre nyttige forankringsmåter omfatter "multi-detachable" harpikser (Tam, et al., Tetrahedron Lett., 1979, 4935 og J. Am. Chem. Soc., 1980, 102, 611, Tam, J. Org.

15 Chem., 1985, 50, 5291) som gir mer enn en måte for frigjøring og som derved muliggjør mer fleksibilitet i syntesekonstruksjonen.

Egnede valg for N-beskyttelse er tertbutyloksykarbonyl (Boc) gruppen (Carpino, J. Am. Chem. Soc., 1957, 79, 4686, Anderson, et al., J. Am. Chem. soc., 1957, 79, 6180) normalt i kombinasjon med benzyl-baserte grupper for beskyttelse av sidekjedene og 9-fluorenylmetyloksykarbonyl (Fmoc) gruppen (Carpino, et al., J. Am. Chem. Soc., 1970, 92, 5748 og J.

25 Org. Chem., 1972, 37, 3404), normalt i kombinasjon med tertbutyl (tBu) for beskyttelse av hvilke som helst sidekjeder til tross for at et antall andre muligheter eksisterer som er velkjente innen konvensjonell fast-fase peptidsynteser. Mange andre nyttige aminobeskyttende grupper eksisterer og

30 noen av disse er Adoc (Hass, et al., J. Am. Chem. Soc., 1966, 88, 1988), Bpoc (Sieber, Helv. Chem. Acta., 1968, 51, 614), Mcb (Brady, et al., J. Org. Chem., 1977, 42, 143), Bic (Kemp, et al., Tetrahedron, 1975, 4624), o-nitrofenylsulfenyl (Nps) (Zervas, et al., J. Am. Chem. Soc., 1963, 85, 3660) og

35 ditiasukkinoyl (Dts) (Barany, et al., J. Am. Vhem. Soc., 1977, 99, 7363). Disse aminobeskyttende gruppene, spesielt de som er basert på den meget anvendte uretanfunksjona-

liteten, forhindrer på en vellykket måte rasemiseringen (formidlet ved tautomerisering av de lett dannede oksasolinon (aslakton) mellom produktene (Goodman, et al., J. Am. Chem. Soc., 1964, 86, 2918)) iløpet av koblingen av de fleste α -aminosyrene. I tillegg til slike aminobeskyttende grupper kan mange ellers "unyttige" ikke-uretantype aminobeskyttende grupper anvendes ved oppstilling av PNA molekyler, spesielt de som blir dannet fra achirale enheter. Derfor er ikke bare ovennevnte aminobeskyttende grupper (eller de som er avledet fra noen av disse gruppene) nyttig innenfor sammenhengen av foreliggende oppfinnelse, men hvilke som helst aminobeskyttende grupper som stort sett oppfølger følgende krav: (1) stabilitet overfor svake syrer (ikke-signifikant angrepet av karboksylgrupper), (2) stabilitet overfor svake baser eller nukleofiler (ikke-signifikant angrepet av angjeldende aminogru-
pper), (3) motstand overfor acylering (ikke-signifikant angrepet av aktivert aminosyrer). Tillegg: (4) den beskyttende gruppen må være nær opptil kvantitativ fjernbar uten alvorlige sidereaksjoner og (5) den optiske integriteten, om noen, til den innkommende aminosyren bør fortrinnsvis bli sterkt konserveret ved koblingen. Valg av side-kjede beskyttende grupper avhenger generelt av valget av aminobeskyttende gruppe kommende av at beskyttelse av side-kjede funksjonalitetene må motstå betingelsene med gjentatte aminobeskyttende sykler. Dette er tilfelle om strategien for kjemisk oppstilling av PNA molekyler f.eks. bygger på forskjellig syrestabilitet til amino- og side-kjedebeskyttende grupper (som er tilfelle for ovennevnte "Boc-benzyl" tilnærmelse) eller anvender en ortogonal, dvs. kjemoselektiv beskyttende metode (som er tilfelle for ovennevnte "Fmoc-tBu" metode).

Etter kobling av den første aminosyren er det neste stadiet av fast-fase syntesen systematisk dannelse av ønsket PNA kjede. Denne dannelsen involverer i gjentatte avspaltnings-/koblingssykluser. Den temporært beskyttende gruppen, så som en Boc eller Fmoc gruppe, på den sist-koblede aminosyren blir

fjernet kvantitativt ved en egnet behandling, f.eks. ved asidolyse, så som med trifluoreddiksyre, når det gjelder Boc, eller ved baseblanding, så som med piperidin når det gjelder Fmoc, for å frigjøre den N-terminale aminofunksjonen.

5

Den neste ønskede N-beskyttede aminosyren ble deretter koblet til N-terminalen av den sist-koblede aminosyren. Denne koblingen av N-terminalen til en aminosyre med N-terminalen til den sist-koblede aminosyren kan bli oppnådd på flere måter. Den kan f.eks. bli bundet ved å høytstyre den innkommende aminosyren i en form med karboksylgruppen aktivert med hvilke som helst av flere metoder, inkludert den opprinnelige dannelsen av et aktiv ester derivat så som en 2,4,5-triklorofenylester (Pless, et al., Helv. Chim. Acta, 1963, 46, 1609), en ftalimidoester (Nefkens, et al., J. Am. Chem. Soc., 1961, 83, 1263), en pentaklorofenylester (Kupryszewski, Roczn. Chem., 1961, 35, 595), en pentafluorfenylester (Kovacs, et al., J. Am. Chem. Soc., 1963, 85, 183), en o-nitrofenylester (Bodanzsky, Nature, 1955, 175, 685) en imidasolester (Li, et al., J. Am. Chem. Soc., 1970, 92, 7608), og en 3-hydroksy-4-okso-3,4-dihydrokvinasolin (Dhbt-OH) ester (Konig, et al., Chem. Ber., 1973, 103, 2024 og 2034), eller den innledende dannelsen av et anhydrid så som et symmetrisk anhydrid (Wieland, et al., Angew. Chem., Int. Ed. Engl., 1971, 10, 336). Alternativt, kan karboksylgruppen til den innkommende aminosyren bli omsatt direkte med N-terminalen til den sist-koblede aminosyren ved hjelp av et kondensasjonsreagens så som f.eks. disykloheksylkarbodiimid (Sheehan, et al., J. Am. Chem. Soc., 1955, 77, 1067) eller derivater derav. Bensotriasolyl N-oksytrisdimetylaminofosfoniumheksfluorfosfat (BOP), "Castro's reagent" (se f.eks. Rivaille, et al., Tetrahedron, 1980, 36, 3413) er anbefalt for oppstilling av PNA molekyler inneholdende sekundære aminogrupeer. Aktiverte PNA monomerer analoge med de nylig-rapporterte aminosyrefluoridene (Carpino, J. Am. Chem. Soc., 1990, 112, 9651) er lovende for anvendelse i PNA syntesen.

Etter oppstilling av den ønskede PNA kjeden, inkludert beskyttende grupper, vil det neste trinnet normalt være avspaltning av aminosyredelene til PNA kjeden og spaltning av syntetisert PNA fra den faste bæreren. Disse prosessene kan
5 foregå vesentlig samtidige for derved å tilveiebringe det frie PNA molekylet i ønsket form. I tilfeller hvor kondensasjon av to separat syntetiserte PNA kjeder skal bli utført er det mulig ved valg av en egnet spacer-gruppe ved begynnelsen av syntesen å spalte de ønskede PNA kjedene fra deres
10 respektive fase bærere (begge peptidkjedene inkorporerer fortsatt deres side-kjede beskyttende grupper) og endelig fjerning av de side-kjede beskyttende gruppene etter f.eks. kobling av de side-kjede beskyttende peptidkjedene for å danne en lengre PNA kjede.

15

I ovennevnte "Boc-benzyl" beskyttende skjema blir den endelige avspaltningen av side-kjedene og frigjøring av PNA molekylet fra den faste bæreren som oftest utført ved anvendelse av sterke syrer så som vannfri HF (Sakakibara, et
20 al., Bull. Chem. Soc. Jpn., 1965, 38, 4921), bortris (trifluorasetat) (Pless, et al., Helv. Chim. Acta, 1973, 46, 1609), og sulfonsyrer så som trifluormetansulfonsyre og metansulfonsyre (Yajima, et al., J. Chem. Soc., Chem. Comm., 1974, 107). Denne konvensjonelt sterk syre (f.eks. vannfri
25 HF) avspaltningsmetoden produserer meget reaktive karbokationer som kan føre til alkylering og acylering av følsomme residier i PNA kjeden. Slike side-reaksjoner blir bare delvis unngått ved tilstedeværelse av oppfangningsmidler så som anisol, fenol dimetyl, sulfid og merkaptoetanol og
30 derfor blir sulfid-assistert asidolytiske S_N2 avspaltningsmetoden (Tam, et al., J. Am. Chem. soc., 1983, 105, 6442 og J. Am. Chem. Soc., 1986, 108, 5242), den såkalte "lave" som fjerner forløpene til skadelige karbokationer for å danne inerte sulfoniumsalter, ofte anvendt peptid og PNA syntese,
35 enten alene eller i kombinasjon med "høye" metoder. Mindre ofte, i spesialtilfeller, blir andre metoder anvendt for avspaltning og/eller sluttspaltning av PNA-fastbærerbindin-

gen, f.eks., slike metoder som base-katalysert alkoholyse (Barton, et al., J. Am. chem. Soc., 1973, 95, 4501), og ammonolyse samt hydrasinolyse (Bodanszky, et al., Chem. Ind., 1964, 1423), hydrogenolyse (Jones, Tetrahedron Lett. 1977, 2853 og Schlatter, et al., Tetrahedron Lett. 1977, 2861)) og fotolyse (Rich og Gurwara, J. Am. Chem. Soc., 1975, 97, 1575)).

I kontrast til den kjemiske syntesen av "normal" peptider kan trinnvis kjededannelse av achirale PNA som de som er basert på aminoetylglusyl skjelett enhetene binde enten fra N-terminusen eller C-terminusen på grunn av at koblingsreaksjonene er fri rasemisering.

Basert på kjennsgjerningen at de fleste operasjonene er identiske i syntesesyklusene til fast-fase peptidsyntesen (som også er tilfelle for fast-fase PNA syntese), ble en ny matrix PEPS, nylig introdusert (Berg, et al., J. Am. Chem. Soc., 1989, 111, 8024, og Internasjonal Patentsøknad WO 90/02749) for å lette preparering av et stort antall peptider. Denne matrixen består av en polyetylen (PE) film med utragende lang-kjedede polystyren (PS) podninger (molekylvekt i størrelse på 10^6). Belastningskapasiteten til filmen er like høy som i en kuleformig matrix, men PEPS har den ytterligere fleksibiliteten for å tilfredsstille multipelsynteser samtidig. I en ny konfigurasjon for fast-fase peptidsyntese er PEPS filmen konstruert i form av diskrete, merkede ark hvor hver virker som en individuell del. Iløpet av alle identiske trinn ved syntesesyklusene blir arkene holdt sammen i en enkelt reaksjonsbeholder for å muliggjøre samtidig preparering av mange peptider ved en rate som er nære opp til et enkelt peptid ved hjelp av konvensjonelle metoder. Det ble resonert at PEPS-filmbæreren, omfattende linker eller spacer-grupper tilpasset til den spesielt gjeldende kjemien burde være spesielt verdifull ved syntese av multiple PNA molekyler, idet disse er enkle å syntetisere på grunn av at bare fire foreskjellige reaksjons-

delers er normalt nødvendig, en av hver av de fire "pseudo-nukleotid" enhetene. PEPS-filmbæreren har derfor blitt vellykket testet i et antall PNA synteser utført på en parallell og vesentlig simultan måte. Utbyttet og kvaliteten
5 til produktene oppnådd fra PEPS var sammenlignbar med de som ble oppnådd ved anvendelse av den tradisjonelle polystyren kuleformige bæreren. Eksperimenter med andre geometrier av pepspolymeren så som f.eks. ikke-vevd felt, knyttet nett, pinner eller mikrobrønnplater har ikke indikert noen
10 begrensninger ved synteseeffektiviteten.

To andre metoder foreslått for den samtidige syntensen av et stort antall peptider vedrører også fremstilling av mange forskjellige PNA molekyler. Den første av disse metodene
15 (Geysen, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1984, 81, 3998) anvender akryliske syre-podede poletylen-staver og 96-mikrotiter brønner for å immobilisere de voksende peptidkjedene og å utføre den oppdelte syntensen. Fremgangsmåten er bare anvendbar på en mikrogramskala. Den andre metoden
20 (Houghten, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985, 82, 5131) anvender en "tepose" inneholdende tradisjonelt-anvendte polymerkuler. Andre relevante forslag for multippelt peptid eller PNA syntese i foreliggende oppfinnelse omfatter den samtidige anvendelsen av to forskjellige bærere med forskjellige
25 tettheter (Tregear, i "Chemistry and Biology of Peptides", J. Meienhofer, ed., Ann Arbor Sci. Publ., Ann Arbor, 1972, s. 175-178), kombineringsreaksjonsbeholdere via en manifold (Gorman, Anal. Biochem., 1984, 136, 397), flerkolonne fast-fase syntese (f.eks. Krchnak, et al., Int.
30 J. Peptide Protein Res., 1989, 33, 209), og Holm og Meldal i "Proceedings of the 20th European Peptide Symposium", G. Jung og E. Bayer, eds., Walter de Gruyter & Co., Berlin 1989, s. 208-210), og anvendelse av cellulosepapir (Eichler, et al., Collect. Czech. Chem. Commun., 1989, 54, 1746).

35

Idet den konvensjonelle kryss-bundede styren/divinylbensenkopolymer matrixen av PEPS bæreren for tiden er foretrukket når

det gjelder fast-fase PNA syntese utgjøre en ikke-begrensende liste av eksempler på faste bærere som kan være relevante: (1) Partikler basert på kopolymerer av dimetylakrylamid kryss-bundet med N,N'-bisakryloyetylendiamin, inkludert en
5 kjent mengde N-tertbutoksykarbonyl-beta-alanyl-N'-akryloyl-heksametylendiamin. Flere spacermolekyler blir vanligvis tilsatt via betaalanylgruppen etterfulgt av aminosyre residiet subenhet. Dette alanyl-inneholdende monomer kan også bli erstattet med en akryloylsarkosinmonomer iløpet av
10 polymeriseringen for å danne harpikskuler. Polymeriseringen blir etterfulgt av reaksjon av kulene med et etylendiamin for å danne harpikspartikler som inneholder primære aminer som kovalentlig koblet funksjonalitet. De polyakrylamid-baserte bærerene er relativt mer hydrofile enn polystyren-baserte
15 bærere og blir vanligvis anvendt med polaraprotiske oppløsningsmidler inkludert dimetylformamid, dimetyl-asetamid, N-metylpyrrolidon o.l. (se Atherton, et al., J. Am. Chem. Soc., 1975, 97, 6584, Bioorg. Chem. 1979, 8, 351) og J.C.S. Perkin I 538 (1981)), (2) en annen gruppe av faste bærere er basert
20 på silika-inneholdende partikler så som porøse glasskuler og silikagel. Eksempel er reaksjonsproduktet til triklor-[3-(4-klormetyl)-fenyl]propylsilan og porøse glasskuler (se Parr og Grohmann, Angew. Chem. Internal. Ed. 1972, 11, 314) solgt under varemerket "PORASIL E" av Waters Associates, Framing-
25 ham, MA, USA. Likeledes er en monoester av 1,4-dihydroksymetylbenzen og silika (solgt under varemerket "BIOPAK" av Waters Associates) blitt rapportert å være nyttig (se Bayer og Jung, Tetrahedron Lett., 1970, 4503), (3) en tredje generell type av nyttige faste bærere kan bli betegnet
30 kompositter p.g.a. at de inneholder to hovedingredienser: En harpiks og et annet materiale som er også vesentlig inert for de anvendte organiske syntesereaksjonsbetingelsene. Et eksempel på en kompositt (se Scott, et al., J. Chrom. Sci., 1971, 9, 577) anvender glasspartikler belagt med en hydrofob,
35 kryss-bundet styrenpolymer inneholdende reaktive klormetylgrupper og var fra Northgate Laboratories, Inc., Hamden, CT, USA. ET annet eksempel på en kompositt inneholder en kjerne

av fluorbehandlet etylpolymer hvor det er blitt podet polystyren (se Kent og Merrifield, Israel J. Chem. 1978, 17, 243) og van Rietschoten i "Peptides 1974", Y. Wolman, Ed., Wiley og Sons, New York, 1975, s. 113-116), og (4) kontinuerlige faste bærere forskjellig fra PEPS, så som bomullsark (Lebl og Eichler, Peptide Res. 1989, 2, 232) og hyrdoksypropylakrylat-belagte polypropylenmembraner (Daniels, et al., Tetrahedron Lett. 1989, 4345), er egnede for PNA syntesen.

Enten manuelt eller automatisk drevet blir fast-fase PNA syntesen ifølge foreliggende oppfinnelse normalt utført i batcher. Det meste av syntesene kan også bli utført på kontinuerlig-strømningsvis måte hvor bæreren er pakket i kolonner (Bayer, et al., Tetrahedron Lett., 1970, 4503 og Scott, et al., J. Chromatogr. Sci., 1971, 9, 577). Med hensyn på kontinuerlig-strømning fast-fase syntese ser det ut som om den rigide poly(dimetylakrylamid)-Kieselguhr bæreren (Atherton, et al., J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1981, 1151) er spesielt vellykket, men andre verdifulle konfigurasjoner vedrøre den som er dannet for standard kopoly(styren-1%)divinylbensen) bæreren (Krchnak, et al., Tetrahedron Lett., 1987, 4469).

Fast-fase teknikken er for tiden foretrukket når det gjelder PNA syntese, men andre metodologier eller kombinasjoner derav, f.eks., i kombinasjon med fast-fase teknikken kan også anvendes: (1) klassiske oppløsnings-fasemetodene peptid-syntese (f. eks., Bodanszky, "Principles of Peptide Synthesis", Springer-Verlag, Berlin-New York 1984), enten ved trinnvis oppstilling eller ved segment/fragmentkondensasjon er av spesiell relevanse med betraktning av spesielt produksjoner i stor skala (gram, kilogram og til og med tonn) av PNA forbindelsene, (2) den såkalte "væske-fase" strategien som anvender oppløselige polymeriske bærere så som lineær polystyren (Shemyakin, et al., Tetrahedron Lett., 1965, 2323) og poletylenglykol (PRG) (Mutter og Bayer, Angew. Chem., Int. Ed. Engl., 1974, 13,88) er nyttig (3)

tilfeldig polymerisasjon (se f.eks. Odian, "Principles of Polymerization", McGraw-Gukkk, New York (1970)) som gir blandinger av mange molekyllvekter ("polydisperse") peptid eller PNA molekyler er spesielt relevante for screening av
5 antivirale effekter, (4) en teknikk basert på anvendelsen av polymer-bårede aminosyreaktive estere (Fridkin, et al., J. Am. Chem. Soc., 1965, 87, 4646), noen ganger referert til som "invers Merrifield syntese" eller "polymerisk reagenssyntese", gir fodelen av isolering og rensing av mellomprodukter
10 og kan dermed tilveiebringe en spesielt egnet metode for syntese av PNA molekyler med middels størrelse som eventuelt er beskyttede og som deretter kan bli anvendt for fragment-kondensasjon til større PNA molekyler, (5) det blir betraktet at PNA molekylet kan bli kapslet enzymatisk av enzymer så som
15 proteaser eller derivater derav med nye spesifisiteter (oppnådd f.eks. ved hjelp av kunstige midler så som proteinomkonstruering). Noen kan også betrakte utvikling av "PNA ligaser" for kondensasjonen av et antall PNA fragmenter til meget store PNA molekyler, (6) p.g.a. at antistoffer kan
20 bli dannet for omtrent et hvilket som helst molekyl av interesse kan de nye utviklede katalytiske antistoffene (absymene), oppdaget samtidig av gruppene til Lerner (Tramantano, et al., Science, 1986, 234, 1566) og Schultz (Pollack, et al., Science, 1986, 234, 1570) bør også bli
25 betraktet som potensielle kandidater for oppstilling av PNA molekyler. Det har derfor vært betraktelig suksess når det gjelder produsering av absymer som katalyserer absyl-transfer reaksjoner (se f.eks. Shokat, et al., Nature, 1989, 338, 269) og referansene deri). Fullstendige kunstige enzymer ble
30 nylig laget av gruppen til Stewart (Hahn, et al., Science, 1990, 248, 1544) og kan bli utviklet for å tilfredsstille PNA syntese. Konstruksjon av generelt anvendbare enzymer, ligaser og katalytiske antistoffer som kan formidle spesifikke koblingsreaksjoner ville bli lettere oppnådd for PNA
35 syntese enn for "normal" peptidsyntese på grunn av at PNA molekyler ofte består av bare 4 forskjellige aminosyrer (en for hver av de fire native nukleobasene) sammenlignet med de

20 naturlige ved "occurring" (proteinogeniske) aminosyrer som utgjør peptider. Ikke en eneste bestemt strategi er fullstendig egnet for syntese av et spesifikt PNA molekyl og derfor er det noen ganger best med en kombinasjon av metoder.

5

(a) Eksperiment for syntese av monomere byggestener.

10

Monomerene blir fortrinnsvis syntetisert ved hjelp av det generelle skjemaet som er beskrevet i fig. 8. Dette involverer preparering av enten metyl eller etylesteren til (Bocaminoetyl)glysin med en beskyttelses-/avspaltningsprosedyre som beskrevet i eksemplene 21-23. Syntese av thyminmonomeren er beskrevet i eksemplene 24-25 og den til den beskyttede cytozinmonomeren er beskrevet i eksempel 26.

15

20

Syntese av beskyttet adeninmonomer (fig. 14) involverer alkylering med etylbromasetat (eksempel 27) og verifisering av substitusjonsposisjonen ved røntgenkrystallografi, som ønsket 9-posisjon. N⁶-aminogruppen ble deretter beskyttet med besnyloksykarbonylgruppen ved anvendelse av reagenset N-etyl-benzyloksykarbonylimidasoltetrafluorborat (eksempel 28). Enkel hydrolyse av produkt ester (eksempel 29) ga N⁶-benzyloksykarbonyl-9-karboksymetyladenin som deretter ble anvendt i standardprosedyren (eksemplene 10-11), fig. 8). Adeninmonomeren er blitt dannet til to forskjellige PNA-oligomerer (eksempel 30 og 31).

25

30

35

Syntese av beskyttet G-monomer er beskrevet i fig. 15. Utgangsmaterialet, 2-amin-6-klorpurin, ble alkylert med bromeddiksyre (eksempel 32) og kloratomet ble deretter substituert med en benzyloksygruppe (eksempel 36). Den resulterende syren ble koblet til (bokaminoetyl)glysin-metylester (eksempel 33) med midlet PyBropTM og den resulterende esteren ble hydrolysert (eksempel 23). O⁶-benzylgruppen ble fjernet i det endelige HF-spaltningstrinnet ved syntese av PNA-oligomeren. Spaltningen ble verifisert ved å finne den ventede massen til den endelige PNA-oligomeren ved

inkorporering til en PNA-oligomer ved anvendelse av diisopropylkarbodiimid som kondenseringsmiddel (eksempel 52).

5 Følgende forkortelser blir anvendt i de eksperimentelle eksemplene: DMF, N,N-dimetylformamid, DCC, N,N-disykloheksylkarbodiimid, DCU, N,N-disykloheksylurea, THF tetrahydrofuran, aeg, N-acetyl (2'-aminoetyl)glysin, pfp, pentafluorfenyl, Boc, tert-butoksykarbonyl, z, benzyloksykarbonyl, NMR, nuklear magnetisk resonans, s, singlet, d, 10 dublett, dd, dublett av dubletter, t, triplett, kvartett, m, multiplett, b, bred, δ , kjemisk skift.

NMR spektra ble registrert på enten et JEOL FX 900 spektrometer eller en Bruker 250 MHz med tetrametylsilan som indre 15 standard. Massespektrometri ble utført på et MassLab VG 12-250 kvadropolinstrument utstyrt med en VG FAB kilde og probe. Smeltepunktene ble registrert på Buchi smeltepunkt apparaturer ukorrigerte. N,N-dimetylformamid ble utført over 4 Å molekyllære sikter, destillert og lagret over 4 Å molekyllære 20 sikter. Pyridin (HPLC kvalitet) ble tørket og lagret over 4 Å molekyllære sikter. Andre oppløsningsmidler som ble anvendt var enten med høyest kvalitet eller som på forhånd var destillert. Dioksan ble sendt igjennom basisk aluminiumoksyd før bruk. Bocanhydrid, 4-nitrofenol, metylbromasetat, 25 benzyloksykarbonylklorid, pentafluorfenol ble alle oppnådd gjennom Aldrich Chemical Company. thymin, cytozin, adenin ble alle oppnådd fra Sigma.

Tynnsjiktskromatografi (Tlc) ble utført ved anvendelse av 30 følgende oppløsningsmiddelsystemer: (1) kloroform:trietylamin:metanol, 7:1:2, (2) metylenklorid:metanol, 9:1, (3) kloroform:metanoleddiksyre 85:10:5. Flekkene ble visualisert ved UV (254 nm) eller/og spraying med en ninhydrinoppløsning (3 g ninhydrin i 1000 ml 1-butanol og 30 ml eddiksyre), etter 35 oppvarming ved 120°C i 5 min. og etter spraying, ny oppvarming.

Utvidete skjeletter ("backbones")

Variasjoner av gruppene A, C og D (fig. 16) ble demonstrert ved syntese av monomeriske byggesten inkorporering til PNA-oligomerer.

5

I et eksempel var C gruppen en $\text{CH}(\text{CH}_3)$ gruppe. Syntesen av den tilsvarende monomeren er beskrevet i fig. 17. Det involverer preparering av Boc-beskyttet 1-amino-2,3-propanediol (eksempel 35) som blir spaltet av periodat til bokaminoasetaldehyd som blir anvendt direkte i neste reaksjon. Bokaminoasetaldehydet kan bli kondensert med forskjellige aminer og i eksempel 36 ble alaninet etylester anvendt. I eksemplene 17-19 ble de tilsvarende thyminmonomerene dannet. Monomeren er blitt inkorporert til en 8-mer med DCC-koblingsprotokollen (eksemplene 30 og 31).

15

I et annet eksempel er D-gruppen $(\text{CH}_2)_3$ gruppen. Syntese av den tilsvarende monomeren er beskrevet i fig. 18.A og beskrevet i eksemplene 40 og 46.

20

I et annet eksempel er A-gruppen $(\text{CH}_2)_2\text{CO}$ gruppen. Syntese av den tilsvarende thyminmonomeren er beskrevet i fig. 18.B og eksemplene 42 til og med 45.

25

I et annet eksempel er C-gruppen en $(\text{CH}_2)_2$ gruppe. Syntese av thymin og beskyttet cytozinmonomer er beskrevet i fig. 19 og eksemplene 46 til og med 51. Hybridiseringseksperimentene med en PNA-oligomer innholdende en enhet er beskrevet i eksempel 61 som viser en signifikant senkning av affiniteten, men en retensjon av spesifisiteten.

30

Eksempel 1.

tert-Butyl 4-nitrofenylkarbonat

35

Natriumkarbonat (29,14 g, 0,275 mol) og 4-nitrofenol (12,75 g, 91,6 mmol) ble blandet med dioksan (250 ml). Boc-anhydrid

(20,0 g, 91,6 mmol) ble overført til en blanding med dioksan (50 ml). Blandingen ble tilbakestrømmet i 1 t, avkjølt til 0°C, filtrert og konsentrert til 1/3 og deretter helt inn i vann (350 ml) ved 0°C. Etter omrøring i 1/2 t ble produktet
5 samlet ved filtrering, vasket med vann og deretter tørket over sikapent i vakum. Utbyttet var 21,3 g (97%). Sm.p. 73,0-74,5°C (litt. 78,5-79,5°C). Anal. for $C_{11}H_{13}NO_5$ beregnet C: 55,20(55,23) H: 5,61(5,48) N: 5,82(5,85).

10 Eksempel 2.

(N'-Boc-2'-aminoetyl)glysin (2)

Tittelforbindelsen ble dannet ved en modifikasjon av
15 prosedyren til Heimer, et al., N-(2-Aminoetyl)glysin (1, 3,00 g, 25,4 mmol) ble løst opp i vann (50 ml), dioksan (50 ml) ble tilsatt og pH ble justert til 11,2 med 2 N natriumhydroksid. tert-Butyl-4-nitrofenylkarbonat (7,29 g, 30,5 mmol) ble løst opp i dioksan (40 ml) og dråpevis tilsatt over
20 en periode på 2 t og iløpet av denne tiden ble pH opprettholdt ved 11,2 med 2 N natriumhydroksid. pH ble justert periodisk til 11,2 i tre eller flere timer og deretter ble oppløsningen latt stå over natt. Oppløsningen ble avkjølt til 0°C og pH ble forsiktig justert til 3,5 med 0,5 M
25 saltsyre. Den vandige oppløsningen ble vasket med kloroform (3 x 200 ml), pH justert til 9,5 med 2N natriumhydroksid og oppløsningen ble avdampet til tørrhet i vakum (14 mmHg). Resten ble ekstrahert med DMF (25+2x10 ml) og ekstraktene filtrert for å fjerne salt i overskudd. Dette resulterer i
30 en oppløsning av tittelforbindelsen i omtrent 60% utbytte og mer enn 95% renhet ifølge tlc (system 1 og visualisert med ninhydrin, $R_f=0,3$). Oppløsningen ble anvendt i følgende prepareringer av Boc-aeg derivatere uten ytterligere rensning.

Eksempel 3.

N-1-Karboksymetylthymine (4)

Denne prosedyren er forskjellig fra litteratursyntesen, men er lettere, gir høyere utbytter og etterlater ikke noe ureagert thymin i produktet. Til en suspensjon av thymin (3, 0,40 g, 0,317 mol) og kaliumkarbonat (87,7 g, 0,634 mmol) in DMF (900 ml) ble det tilsatt metylbromasetat (30,00 ml, 0,317 mmol). Blandingen ble omfattende omrørt over natt under nitrogen. Blandingen ble filtrert og avdampet til tørrhet i vakum. Den faste resten ble behandlet med vann (300 ml) og 4 N saltsyre (12 ml), omrørt i 15 min. av 0°C filtrert og vasket med vann (2 x 75 ml). Presipitatet ble behandlet med vann (120 ml) og 2N natriumhydroksid (60 ml) og ble kokt i 10 min. Blandingen ble avkjølt til 0°C, filtrert og den rene tittelforbindelsen ble presipitert ved tilsetning av 4 N saltsyre (70 ml). Utbyttet etter tørking i vakum over sikapent: 37,1 g (64%). ¹H-NMR: (90 MHz, DMSO-d₆): 11,33 ppm (2,1H,NH), 7,49(d,J=0,92Hz,1H,ArH), 4,38 (s,2H,CH₂), 1,76 (d,J=0,92Hz,T-CH₃).

Eksempel 4.

N-1-Karboksymetylthyminpentfluorfenylester (5)

N-1-Karboksymetylthymine (4, 10,0 g, 54,3 mmol) og pentafluorfenol (10,0 g, 54,3 mmol) ble løst opp i DMF (100 ml) og avkjølt til 5°C i isvann. DCC (13,45 g, 65,2 mmol) ble deretter tilsatt. Når temperaturen gikk under 5°C ble isbadet fjernet og blandingen ble omrørt i 3 timer ved romtemperatur. Presipitert DCU ble fjernet ved filtrering og vasket to ganger med DMF (2 x 10 ml). Det kombinerte filtratet ble helt i eter (1400 ml) og avkjølt til 0°C. Petroleumeter (1400 ml) ble tilsatt og blandingen ble latt stå over natt. Tittelforbindelsen ble isolert ved filtrering og grundig vasket med petroleumeter. Utbytte: 14,8 g (78%).

Produktet var rent nok for å utføre reaksjon, men en analytisk prøve ble oppnådd ved omkrystallisering fra 2-propanol. Sm.p. 200,5-206°C Anal. for $C_{13}H_7F_5N_2O_4$. Funnet (beregnet) C: 44,79(44,59), H: 2,14(2,01) N: 8,13(8,00), FAB-MS: 443 (M+1+glyserol), 351 (M+1). 1H -NMR (90 MHz, DMSO- d_6): 11,52 ppm (s, 1H, NH), 7,64 (s, 1H, ArH), 4,99 (s, 2H, CH₂), 1,76 (s, 3H, CH₃).

Eksempel 5.

10

1-(Boc-aeg)thymine (6)

Til DMF-oppløsningen ovenfor ble det tilsatt trietylamin (7,08 ml, 50,8 mmol) etterfulgt av N-1-karboksymetyltymipentafluorfenylester (5, 4,45 g, 12,7 mmol). Den resulterende oppløsningen ble omrørt i 1 t. Oppløsningen ble avkjølt til 0°C og behandlet med kation byttmateriale ("Dowex 50W X-8", 40 g) i 20 min. Kation byttmateriale ble fjernet ved filtrering, vasket med diklormetan (2 x 15 ml) og diklormetan (150 ml) ble tilsatt. Den resulterende oppløsningen ble vasket med mettet natriumklorid, tørket over magnesiumsulfat og avdampet til tørrhet i vakuum, først av en vannutsuger og deretter ved en oljepumpe. Resten ble ristet med vann (50 ml) og avdampet til tørrhet. Denne prosedyren ble gjentatt en gang. Resten ble deretter løst opp i metanol (75 ml) og helt inn i eter (600 ml) og petroleumeter (1,4 L). Etter omrøring over natt ble det hvite, faste stoffet isolert ved filtrering og vasket med petroleumeter. Tørking over sikapent i vakuum ga 3,50 g (71,7 %). Sm.p. 142-147°C. Analyse for $C_{16}H_{24}N_4O_7$. Funnet (beregnet) C: 49,59(50,00) H: 6,34(6,29) N: 14,58(14,58). 1H -NMR (250 MHz, DMSO- d_6): På grunn av begrenset rotasjon rundt den sekundære amidbindingen ble flere av signalene doblet i forholdet 2:1, (indikerte listen ved m.j. for major og m.i. for minor). 12,73 ppm (b, 1H, -CO₂H), 11,27 ppm (s, m.j., imide), 11,25 ppm (s, m.i., imide), 7,30 ppm (s, m.j., ArH), 7,26 ppm (s, m.i., ArH), 6,92 ppm (unres. t, m.j., BocNH), 6,73 ppm (unres. t, m.i., BocNH), 4,64 ppm (2, m.j., T-CH₂-CO-), 4,47 ppm (2, m.i., T-CH₂-CO-),

4,19 ppm (s, mi., CONRCH₂CO₂H), 3,97 ppm (2, mj., CONCH₂-CO₂H), 3,41-2,89 ppm (unres. m, -CH₂CH₂- og vann), 1,75 ppm (2,3H, T-CH₃), 1,38 ppm (s, 9H, t-Bu). ¹³C-NMR: 170,68 ppm (CO), 170,34 (CO), 167,47 (CO), 167,08 (CO), 164,29 (CO),
 5 150,9 (C5''), 141,92 (C6''), 108,04 (C2'), 77,95 og 77,68 (Thy-CH₂CO), 48,96, 47,45 og 56,70 (CH₂CH₂- og NCH₂CO₂H), 37,98 (Thy-CH₃), 28,07 (t-Bu). FAB-MS: 407 (M+Na⁺), 385 (M+H⁺).

Eksempel 6.

1-(Boc-aeg)thyminpentafluorfenylester (7, Boc-Taeg.OPfp)

1-(Boc-aeg)thymin (6) (2,00 g, 5,20 mmol) ble løst opp i DMF
 15 (5 ml) og metylenklorid (15 ml) ble tilsatt. Pentafluorfenol (1,05 g, 5,72 mmol) ble tilsatt og oppløsningen ble avkjølt til 0°C i isbad. DDC ble deretter tilsatt (1,29 g, 6,24 mmol) og isbadet ble fjernet etter 2 min. Etter 3 t ved omrøring ved romtemperatur ble presipitert DCU fjernet ved
 20 filtrering og vasket med metylenklorid. Det kombinerte filtratet ble vasket to ganger med en vandig natriumhydrogenkarbonat og en gang med en mettet natriumfluorid, tørket over magnesiumsulfat og avdampet til tørrhet i vakum. Den faste resten ble løst opp i dioksan (150 ml) og helt inn
 25 i vann (200 ml) ved 0°C. Tittelforbindelsen ble isolert ved filtrering, vasket med vann og tørket over sikapent i vakum. Utbytte: 2,20 g (77%). En analytisk prøve ble oppnådd ved omkrystallisering fra 2-propanol. Sm.p. 174-175,5°C. Analyse for C₂₂H₂₃N₄O₇F₅, funnet (beregnet): C: 48,22(48,0-1), H: 4,64(4,21), N: 9,67(10,18). ¹H-NMR (250 MHz, CDC₁₃): På grunn av begrenset rotasjon rundt den sekundære amidbindingen ble flere av signalene doblet i forhold 6:1 (som idikert i listen med mj. for major og mi. for minor). 7,01 ppm (s, mi., arH), 6,99 ppm (s, mj., ArH), 5,27 ppm (unres.
 35 t, BocNH), 4,67 ppm (s, mj., T-CH₂-CO-), 4,60 ppm (s, mi., T-CH₂-CO-), 4,45 ppm (s, mj., CONRCH₂CO₂Pfp), 4,42 ppm (s, mi., CONRCH₂CO₂Pfp), 3,64 ppm (t, 2H, BocNHCH₂CH₂-), 3,87 ppm

("q", 2H, BocNHCH₂CH₂-), 1,44 (s, 9H, t-Bu). FAB-MS: 551 (10, M+1), 495 (10, M+1-tBu), 451 (80, Boc).

Eksempel 7.

5

N⁴-Benzyloksykarbonylcytozin (9)

10

15

20

Over en periode på 1 t ble benzyloksykarbonylchlorid (52 ml, 0,36 mol) tilsatt dråpevis til en suspensjon av cytozin (8, 20,0 g, 0,18 mol) i tørr pyridin (1000 ml) ved 0°C under nitrogen i ovnstørket utstyr. Oppløsningen ble deretter omrørt over natt og pyridinsuspensjonen ble deretter avdampet til tørrhet i vakum. Vann (200 ml) og 4 N saltsyre ble tilsatt for å oppnå pH -1. Det resulterende hvite presipitat ble filtrert ut, vasket med vann og delvis tørket av luftsug. Det forsatt våte presipitatet ble kokt med absolutt etanol (500 ml) i 10 min., avkjølt til 0°C, filtrert, vasket grundig med eter og tørket i vakum. Utbytte: 24,7 g (54%). Sm.p. >250°C. analyse for C₁₂H₁₁N₃O₃. Funnet (beregnet), C: 58,59(58,77), H: 4,55(4,52), N: 17,17(17,13). Det ble ikke registrert NMR spektra på grunn av at det ikke var mulig å løse opp produktet.

Eksempel 8.

25

N⁴-Benzyloksykarbonyl-N¹-karboksymetylcytozin (10)

30

35

I en trehalset rundbundet flaske ustyrt med mekanisk røring og nitrogen tilførsel ble det plassert metylbromasetat (7,82 ml, 82,6 mmol) og en suspensjon av N⁴-benzyloksykarbonylcytozin (9, 21,0g, 82,6 mmol) og kaliumkarbonat (11,4 g, 82,6 mmol) i tørr DMF (900 ml). Blandingen ble omfattende omrørt over natt, filtrert og avdampet til tørrhet i vakum. Vann (300 ml) og 4 N saltsyre (10 ml) ble tilsatt og blandingen ble omrørt i 15 minutter ved 0°C, filtrert og vasket med vann (2 x 75 ml). Det isolerte presipitatet ble behandlet med vann (120 ml), 2N natriumhydroksid (60 ml), omrørt i 30 min.,

filtrert, avkjølt til 0°C og 4 N saltsyre (35 ml) ble tilsatt. Tittelforbindelsen ble isolert ved filtrering, vasket grundig med vann, omkrystallisert fra metanol (1000 ml) og vasket grundig med eter. Dette ga 7,70 g (31%) ren
 5 forbindelse. Morvæsken fra omkrystalliseringen ble redusert til et volum på 200 ml og avkjølt til 0°C. Dette ga ytterligere 2,30 g av et materiale som var rent ifølge tlc, men som hadde en rødaktig farge. Sm.p. 266-274°C. Analyse for C₁₄H₁₃N₃O₅. Funnet (beregnet), C: 55,41(55,45), H: 4,23(4,32), N: 14,04(13,86). ¹H-NMR (90 MHz, DMSO-d₆): 8,02
 10 ppm (d, J=7,32Hz, 1H, H-6), 7,39 (s, 5H, Ph), 7,01 (d, J=7,32Hz, 1H, H-5), 5,19 (s, 2H, PhCH₂-), 4,52 (s, 2H).

Eksempel 9.

15 N⁴-Benzyloksykarbonyl-N¹-karboksymetyl-cytozinpentafluorfenylester (11)

N⁴-Benzyloksykarbonyl-N¹-karboksymetyl-cytosin (10, 4,00 g, 13,2 mmol) og pentafluorfenol (2,67 g, 14,5 mmol) ble blandet
 20 med DMF (70 ml), avkjølt til 0°C med isvann og DCC (3,27 g, 15,8 mmol) ble tilsatt. Isvannet ble fjernet etter 3 min. og blandingen ble omrørt i 3 t ved romtemperatur. Presipitert DCU ble fjernet ved filtrering, vasket med DMF og filtratet
 25 ble avdampet til tørrhet i vakum (0,2 mmHg). Den faste resten ble behandlet med metylenklorid (250 ml), omfattende omrørt i 15 min., filtrert, vasket to ganger med fortynnet natriumhydrogenkarbonat og en gang med mettet natriumklorid, tørket over magnesiumsulfat og avdampet til tørrhet i vakum.
 30 Den faste resten ble omkrystallisert fra 2-propanol (150 ml) og krystallene ble grundig vasket med eter. Utbytte 3,40 g (55%). Sm.p. 241-245°C. Analyse for C₂₀H₁₂N₃F₅O₅. Funnet (beregnet), C: 51,56(51,18), H: 2,77(2,58), N: 9,24(8,95). ¹H-NMR (90 MHz, CDCl₃): 7,66 ppm (d, J=7,63Hz, 1H, H-6), 7,37
 35 (s, 5H, Ph), 7,31 (d, J=7,63Hz, 1H, H-5), 5,21 (s, 2H, PhCH₂-), 4,97 (s, 2H, NCH₂-). FAB-MS: 470 (M+1).

Eksempel 10.

N⁴-Benzyloksykarbonyl-1-Boc-aeg-cytosin (12)

5 Til en oppløsning av (N-Boc-2-aminoetyl)glysin (2) i DMF, fremstilt som beskrevet ovenfor, ble det tilsatt trietylamin (7,00 ml, 50,8 mmol) og N⁴-benzyloksykarbonyl-N¹-karboksymetylcytosinpentafluorfenylester (11, 2,70 g, 5,75 mmol). Etter omrøring av oppløsningen i 1 t ved romtemperatur ble
 10 metylenklorid (150 ml) mettet natriumklorid (250 ml), og 4 N saltsyre til pH -1 tilsatt. Det organiske laget ble separert og vasket to mettet natriumklorid, tørket over magnesiumsulfat og avdampet til tørrhet i vakum, først med en vannutsuger og deretter med en oljepumpe. Den oljeholdige resten ble
 15 behandlet med vann (25 ml) og ble på ny avdampet til tørrhet i vakum. Denne prosedyren ble deretter gjentatt. Den oljeholdige resten (2,80 g) ble deretter løst opp i metylenklorid (100 ml), petroleumeter (250 ml) ble tilsatt og blandingen ble omrørt over natt. Tittelforbindelsen ble
 20 isolert ved filtrering og vasket med petroleumeter. Tlc (system 1) viste vesentlige mengder pentafluorfenol, men det ble ikke gjort noe forsøk på å fjerne det. Utbytte: 1,72 g (59%). Sm.p. 156°C(decomp.). ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): På grunn av begrenset rotasjon rundt den sekundære amidbindingen
 25 ble flere av signalene doblet i forholdet 2:1 (indikert i listen med mj. for major og Mi. for minor). 7,88 ppm (dd, 1H, H-6), 7,39 (m, 5H, Ph), 7,00 (dd, 1H, H-5), 6,92 (b, 1H, Boc-NH), 6,74 (b, 1H, ZNH)-?, 5,19 (s, 2H, Ph-CH₃), 4,81 ppm (s, mj., Cyt-CH₂-CO-), 4,62 ppm (s, mi., Cyt-CH₂-CO-), 4,23 (s, mi., CONRCH₂CO₂H), 3,98 ppm (s, mj., CONRCH₂CO₂H), 3,42-3,02
 30 (unres. m, -CH₂CH₂- og vann), 1,37 (s, 9H, tBu). FAB-MS: 504 (M+1), 448 (M+1+tBu).

Eksempel 11.

35

N⁴-Benzyloksykarbonyl-1-Boc-aeg-cytosinpentafluorfenylester (13)

N⁴-Benzyloksykarbonyl-1-Boc-aeg-cytosin (12, 1,50 g, 2,98 mmol) og panetafluorfenol (548 mg, 2,98 mmol) ble løst opp i DMF (10 ml) metylenklorid (10 ml) ble tilsatt og reaksjons-
5 blandingen ble avkjølt til 0°C i et isbad og DCC (676 mg, 3,28 mmol) ble tilsatt. Isbadet ble fjernet etter 3 min. og blandingen ble omrørt i 3 t. ved romtemperatur. Presipitatet ble isolert ved filtrering og vasket en gang med metylenklorid. Presipitatet ble løst opp i kokende dioksan (150 ml)
10 og oppløsningen ble avkjølt til 15°C, hvorved DCU presipitert. DCU ble fjernet ved filtrering og det resulterende filtratet ble helt inn i vann (250 ml) ved 0°C. Forbindelsen ble isolert ved filtrering, vasket med vann og tørket over sikapent i vakum. Utbytte: 1,30 g (65%). Analyse for
15 C₂₉H₂₈N₅O₈F₅. Funnet (beregnet), C: 52,63(52,02), H: 4,41(4,22), N: 10,55(10,46). ¹H-NMR (250 MHz, MDSO-d₆): viste vesentlige spektra til ovennevnte syre, sannsynligvis forårsaket av hydrolyse av esteren. FAB-MS: 670 (M+1), 614 (M+1+-tBu).

20

Eksempel 12.

4-Klorkarboksy-9-klorasridin

25 4-karboksyasridon (6,25 g, 26,1 mmol), tionylklorid (25 ml) og 4 dråper DMF ble forsiktig oppvarmet under en nitrogenstrøm helt til alt det faste materialet var løst opp. Oppløsningen ble deretter tilbakestrømmet i 40 min. Oppløsningen ble avkjølt og tionylklorid i overskudd ble
30 fjernet i vakum. Siste spor av tionylklorid ble fjernet ved koavdampning med tørr bensen (tørket over Na-Pb) to ganger. Det gjenværende gule pulveret ble anvendt direkte i neste reaksjon.

35 Eksempel 13.

4-(5-Metoksykarbonylpentylamidokarbonyl)-9-klorasridin

Metyl 6-aminoheksanoathydroklorid (4,70 g, 25,9 mmol) ble løst opp i metylenklorid (90 ml), avkjølt til 0°C og trietylamin (15 ml) ble tilsatt og den resulterende oppløs-
5 ningen ble deretter øyeblikkelig tilsatt til syrekloridet fra ovenfor. Den rundbunnede flasken inneholdende syrekloridet ble avkjølt til 0°C i et isbad. Blandingen ble omfattende omrørt i 30 min. ved 0°C og 3 t. ved romtemperatur. Den resulterende blandingen ble filtrert for å fjerne gjenværende
10 faste stoffer som ble vasket med metylenklorid (20 ml). Det rødbrune metylenkloridfiltratet ble deretter vasket to ganger med mettet natriumhydrogenkarbonat, en gang med mettet natriumklorid, tørket over magnesiumsulfat og avdampet til tørrhet i vakum. Til den resulterende oljeholdige for-
15 bindelsen ble det tilsatt tørr bensen (35 ml) og ligroin (60-80°C, tørket over Na-Pb). Blandingen ble oppvarmet til tilbakeløp. Aktivert karbon og selit ble tilsatt og blandingen ble tilbakestrømmet i 3 min. Etter filtrering ble tittelforbindelsen krystallisert ved avkjølig med magnetisk
20 røring. Det ble isolert ved filtrering og vasket med petroleumeter. Produktet ble lagret over fast kaliumhydroksid. Utbytte 5,0 g (50%).

Eksempel 14.

25

4-(5-Metoksykarbonylpentyl)amidokarbonyl-9-[6'-(4''-nitrobensamido)heksylamino]-aminoasridin

4-(5-Metoksykarbonylpentylamidokarbonyl)-9-klorasridin (1,30
30 g, 3,38 mmol) og fenol (5 g) ble oppvarmet til 80°C i 30 min. under en nitrogenstrøm og deretter ble 6-(4'-nitrobensamido)-1-heksylamin (897 mg, 3,38 mmol) tilsatt. Temperaturen ble øket til 120°C i 2 t. Reaksjonsblandingen ble avkjølt og metylenklorid (80 ml) ble tilsatt. Den resulterende
35 oppløsningen ble vasket tre ganger med 2N natriumhydroksid (60 ml posjoner) og en gang vann, tørket over magnesiumsulfat og avdampet til tørrhet i vakum. Den resulterende røde oljen

(1,8 g) ble løst opp i metylenklorid (40 ml), avkjølt til 0°C. Eter (120 ml) ble tilsatt og den resulterende oppløsningen ble omrørt over natt. Dette resulterte i en blanding av fast materiale og en olje. Det faste stoffet ble isolert ved filtrering. Det faste stoffet og oljen ble påny oppløst i metylenklorid (80 ml) og tilsatt dråpevis kald eter (150 ml). Etter 20 min. med omrøring ble tittelforbindelsen isolert ved filtrering i form av orange krystaller. Produktet ble vasket med eter og tørket i vakum over kaliumhydroksid. Utbytte 1,60 g (77%). Sm.p. 145-147°C.

Eksempel 15.

4-(5-Karboksyfentyl)aminokarbonyl-9-[6'-(4''-nitrobensamido)-heksylamino]-aminoasridin

4-(5-Metoksykarbonylpentyl)amidokarbonyl-9-[6'-(4''-nitrobensamido)heksylamino]aminoasridin (503 mg, 0,82 mmol) ble løst opp i DMF (30 ml) og 2N natriumhydroksid (30 ml) ble tilsatt. Etter omrøring i 15 min. ble 2N saltsyre (35 ml) og vann (50 ml) tilsatt ved 0°C. Etter omrøring i 30 min. ble oppløsningen dekantert og ga en oljeholdig forbindelse som ble løst opp i kokende metanol (150 ml), filtrert og konsentrert til 1/3 volum. Til metanoloopløsningen ble det tilsatt eter (125 ml) og 5-6 dråper HCl i etanol. Oppløsningen ble dekantert etter 1 t. omrøring ved 0°C. Den oljeholdige forbindelsen ble påny løst opp i metanol (25 ml) og presipitert med eter (150 ml). Tittelforbindelsen ble isolert som gule krystaller etter omrøring over natt. Utbytte 417 mg (80%). Sm.p. 173°C (dekomp.).

Eksempel 16.

(a) 4-(5-pentafluorfenyloksykarbonylpentyl)amidokarbonyl-9-[6'-(4''-nitrobensamido)heksylamino]-aminoasridin(Acr¹Opfp)

Ovennevnte syre (300 mg, 0,480 mmol) ble løst opp i DMF (2 ml) og metylenklorid (8 ml) ble tilsatt. Pentafluorfenol (97 mg, 0,53 mmol) overført med 2 x 2 ml metylenklorid ble tilsatt. Den resulterende oppløsningen ble avkjølt til 0°C
5 hvorefter DCC (124 mg, 0,60 mmol) ble tilsatt. Isbadet ble fjernet etter 5 minutter og blandingen ble latt stå med omrøring over natt. Presipitert DCU ble fjernet ved sentrifugering og sentrifugatet ble avdampet til tørrhet i vakum, ført med en vannutsuger og deretter med en oljepumpe.
10 Resten ble løst opp i metylenklorid (20 ml), filtrert og avdampet til tørrhet i vakum. Resten ble påny løst opp i metyleklorid og petroleumeter (150 ml). En 1 ml del 5M HCl eter ble tilsatt. Oppløsningsmiddelet ble fjernet ved dekantering etter 30 min. omrøring ved 0°C. Den gjenværende
15 oljeholdige forbindelsen ble løst opp i metylenklorid (100 ml). Petroleumeter (150 ml) ble tilsatt og blandingen ble latt stå med røring over natt. Neste dag ble det gule presipiterte krystallinske materialet isolert ved filtrering og ble vasket med rikelig mengder petroleumeter. Utbytte
20 etter tørking var 300 mg (78%). Sm.p. 97,5°C (dekomp.). Alle prøvene viste tilfredsstillende elementanalyse ¹H- og ¹³C-NMR og massespektra.

(b) Eksperimentelt for syntese av PNA forbindelser, jfr.
25 fig. 8.

Materialer: Boc-Lys (C1Z), benshydrylamin-kopoly(styren-1%-divinylbensen harpiks (BHA harpiks) og p-metylbenshydrylamin-kopoly(styren-1%-divninylbensen) harpiks (MBHA harpiks) ble
30 oppnådd fra Peninsula Laboratories. Andre reagenser og oppløsningsmidler var: Biograde trifluorediksyre fra Halocarbon Products, diisopropyletylamin (99%, ble ikke ytterligere destillert) og N-acetylimidasol (98%) fra Aldrich, H₂O ble destillert to ganger, vannfri HF fra Union
35 Carbide, sytesekvalitet N,N-dimetylformamid og analytisk kvalitet metylenklorid (ble ikke ytterligere destillert) fra Merck, HPLC kvalitet asetonitril fra Lab-Scan, purum kvalitet

anisol, N,N'-disykloheksylkarbodiimid og puriss. kvalitet 2,2,2-trifluoretanol fra Fluka.

(b) Generelle metoder og anmerkninger

5

Dersom ikke annet er angitt gjelder følgende.

PNA forbindelsene ble sytatisert ved trinnvis fast-fase metoden (Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 1963, 85, 2149) som anvender konvensjonell peptidkjemi ved anvendelse av TFA-labil tert-butyloksykarbonyl (Boc) gruppe for "temporær" N-beskyttelse (Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 1964, 86, 304) og mere syre-stabil benzyloksykarbonyl (Z) og 2-klorbenzyloksykarbonyl (ClZ) grupper for "permanent" sidekjedebeskyttelse. For å oppnå C-terminale amider ble PNA oppstilt på HF-labile BHA ekker MBHA harpikser (MBHA harpiksen har øket mottakelighet for sluttlig HF spaltning relativt til usubstituert BHA harpiks (Matsueda, et al., Peptides, 1981, 2, 45). Alle reaksjonene (unntatt HF reaksjonene) ble utført i manuelt drevet standard fast-fase reaksjonsbeholdere utstyrt med en grov glassfritte (Merrifield, et al., Biochemistry, 1982, 21, 5020). Den kvantitative ninhydrinreaksjonen (Kaiser testen) som opprinnelig er utviklet av Merrifield og medarbeidere (Sarin, et al., Anal. Biochem., 1981, 117, 147) for peptider inneholdende "normale" aminosyrer ble med hell anvendt (se tabell I-III) ved anvendelse av den "normalt" anvendte effektive ekstingsjonskoeffisienten E 15000 $M^{-1}cm^{-1}$ for alle residier for å bestemme fullstendigheten av individuelle koblinger samt måling av antall voksende peptidkjeder. Den teoretiske substitusjonen S_{n-1} med kobling av residienummer n (med antagelse av både fullstendig avspaltning og kobling samt p.g.a at verken kjedeterminering eller tap av PNA kjeder iløpet av syntesesyklusen) blir beregnet fra ligningen:

$$S_n = S_{n-1} \times (1 + S_{n-1} \times \Delta MW \times 10^{-3} \text{ mmol/mol}))^{-1}$$

hvor ΔMW er økningen i molekylvekt ($[\Delta MW] = g(mol)$ og S_{n-1} er den teoretiske substitusjonen ved kobling av det foregående residiet $n-1$ ($[S] = mmol/g$). Den vurderte verdien (%) på grad

35

av individuell kobling blir beregnet relativt til den målte substitusjonen (dersom ikke S var bestemt) og omfatter korreksjon for antall gjenværende frie aminogrupper etter den tidligere syklusen. HF reaksjonene ble utført i en Diaflon HF apparatur fra Toho Kasei (Osaka, Japan). Vydac C₁₈ (5 µm, 0,46 x 25 cm og 5 µm, 1,0 x 25 cm) reversfasekolonner ble anvendt for analytisk og semi-preparativ HPLC på et SP8000 instrument. Buffer A var 5 vol-% asetonitril i vann inneholdende 445 µl trifluoreddiksyre pr. liter og buffer B var 60 vol-% asetonitril i vann inneholdende 390 µl trifluoreddiksyre pr. liter. Den lineære gradienten var 0-100% buffer B i 30 min., strømningsratene 1,2 ml/min. (analytisk) og 5 ml/min. (semipreparativ). Elueringsmidlene ble registrert ved 215 nm (analytisk) og 230 nm (semi-preparativ). Molekylvektene til PNA ble bestemt ved ²⁵²Cf plasma desorpsjon "time-of-flight" massespektrometri fra gjennomsnittet til de mest hyppige isotopene.

Eksempel 17.

Fast-fase syntese av Acr₁-[Taeg]₁₅-NH₂ og kortere derivater.

(a) Trinnvis oppstilling av Boc-[Taeg]₁₅-BHA harpiks

Syntesen ble initiert på 100 mg forsvellet og nøytralisert BHA harpiks (bestemt ved den kvantitative ninhydrinreaksjonen og inneholder 0,57 mmol NH₂/g) ved anvendelse av enkeltkoblinger ("Synteseprotokoll 1") ved anvendelse av 3,2 ekvivalenter BocTaeg-OPfp i omtrent 33% DMF/CH₂Cl₂. De individuelle koblingsreaksjonene ble utført ved risting i minst 12 t. i en manuelt drevet 6 ml standard fast-fast reaksjonsbeholder og ureagert aminogruppe ble blokkert ved acetylering ved valgte stadier av sytesen. Progresjonen av kjedeelongeringen ble registrert ved flere stadier ved den kvantitative ninhydridreaksjonen (se tabell I). Deler av beskyttet Boc-[Taeg]₅-BHA, Boc-[Taeg]₁₀-BHA og Boc-[Taeg]₁₅-BHA harpikser ble tatt ut etter sammenstilling av henholdsvis 5, 10 og 15 residier.

Syntese- trinn	Residue koblet	Substitusjon etter avspaltnings (mmol/g)		Gjenværende frie aminogrupper etter (μmol/g)		Vurdert koblings grad
		Målt	Teoret.	Enkelt- kobling	Asetyl- ering	(%)
"0"		0.57				
1	BocTaeg	ND	0.50	1.30		<99.7
2	BocTaeg	ND	0.44	1.43		<99.9
3	BocTaeg	0.29	0.39	3.33		99.3
4	BocTaeg	0.27	0.35	13.30		96.3
5	BocTaeg	0.26	0.32	8.33		>99.9
6	BocTaeg	ND	0.30	7.78		>99.9
7	BocTaeg	ND	0.28	13.81	7.22	<97.8
8	BocTaeg	ND	0.26	14.00		<99.9
9	BocTaeg	ND	0.24	30.33		93.2
10	BocTaeg	0.16	0.23	11.67	2.67	>99.9
11	BocTaeg	ND	0.21	4.58		>99.9
12	BocTaeg	ND	0.20	5.87		<99.4
13	BocTaeg	ND	0.19	1.67		>99.9
14	BocTaeg	ND	0.18	14.02		<93.1
15	BocTaeg	0.07	0.17	4.20	3.33	>99.9

(b) Syntese av Acr¹-[Taeg]₁₅-BHA harpiks

Etter avspaltning av den gjenværende Boc-[Taeg]₁₅-BHA harpiksen (vurdert tørrvekt på omtrent 30 mg, ca. 0,002 mmol voksende kjeder), H-[Taeg]₁₅-BHA harpiks ble omsatt med omtrent 50 ekvivalenter (80 mg, 0,11 mmol) Acr¹-OPfp i 1 ml omtrent 66% DMF/CH₂Cl₂ (dvs. en 0,11 M oppløsning av pentafluorfenylester) i en 3 ml fast-fase reaksjonsbeholder. Vurdert ifølge en kvalitativ ninhydrinreaksjon var koblingen av akridindelen nærmest kvantitativ.

(c) Spaltning, rensing og identifikasjon av H-[Taeg]₅-NH₂

En del av den beskyttede Boc-[Taeg]₅-BHA harpiksen ble behandlet med 50% trifluorediksyre i metylenklorid for å fjerne den N-terminale Boc gruppen (som er en forløper av det potensielt skadelige tert-butylkationen) før HF spaltningen. Etter nøytralisering og vasking (utført på lignende måte som i trinnet 2-4 i "Synteseprotokoll 1" og tørking i 2 t. i vakum ble resulterende 67,1 mg (tørrvekt) H-[Taeg]₅-BHA harpiksen spaltet med 5 ml HF:anisol (9:1, v/v) og omrøring ved 0°C i 60 min. Etter fjerning av HF ble resten omrørt med tørr dietyleter (4 x 15 ml, 15 min. hver) for å fjerne anisol, filtrert under tyngdekraft gjennom en frittet glasstrakt og tørket. PNA ble deretter ekstrahert i en 60 ml (4 x 15 ml, omrøring 15 min. hver) 10% vanndig eddiksyre-oppløsning. Alikvoter av denne oppløsningen ble analysert ved analytisk revers-fase HPLC for å bestemme renheten av rå PNA. Hovedtoppen ved 13,0 min. utgjorde omtrent 93% av den totale absorbansen. Den gjenværende oppløsningen ble frosset og lyofilisert for å tilveiebringe omtrent 22,9 mg råmateriale. Til slutt ble 19,0 mg av råproduktet rensset fra fem batcher som hver inneholder 3,8 mg i 1 ml H₂O. Hovedtoppen ble samlet ved anvendelse av en semi-preparativ revers-fase kolonne. Asetonitril ble fjernet på en speedvac og den gjenværende oppløsningen ble frosset (tørris) og deretter lyofilisert til 13,1 mg >99% ren H-[Taeg]₅-NH₂. PNA molekylet ble lett løst opp i vann og hadde riktig molekylvekt ifølge massespektralbestemmelser. For (M+H)⁺ var den

beregnete m/z verdien 1349,3 og den målte m/z verdien var 1347,8.

(d) Spaltning, rensing og identifikasjon av $H-[Taeg]_{10}-NH_2$

5

En del av den beskyttede Boc- $[Taeg]_{10}$ -BHA harpiksen ble behandlet som beskrevet i del (c) og ga 11,0 mg råmateriale ved HF spaltning av 18,9 mg tørr $H-[Taeg]_{10}$ -BHA harpiks. Hovedtoppen ved 15,5 min. utgjorde omtrent 53% av den totale absorbanse. Omtrent 1 mg av råproduktet ble gjentatte ganger rensset (av grunner beskrevet nedenfor) for å oppnå omtrent 0,1 mg av minst 80%, men antageligvis >99% ren $H-[Taeg]_{10}-NH_2$. En bred hale som eluerte etter måltoppen og utgjorde omtrent 20% av den totale absorbanse var ikke mulig å fjerne (bare litt forminsket) ved gjentatt rensing. Vurdert fra massespekteret som bare bekrefter tilstedeværelse av $H-[Taeg]_{10}-NH_2$ med riktig molekylvekt, utgjør halefenomenet mer eller mindre veldefinerte aggregasjons-/konformasjonsstadier til målmolekylet. Råproduktet inneholder sannsynligvis mere enn ovennevnte 53% målmolekyl. $H-[Taeg]_{10}-NH_2$ blir lett løst opp i vann. For $(M+H)^+$ er den beregnede m/z verdien 2679,6 og den målte m/z verdien var 2681,5.

(e) Spaltning, rensing og identifikasjon av $H-[Taeg]_{15}-NH_2$

En del av den beskyttede Boc- $[Taeg]_{15}$ -BHA harpiksen ble behandlet som beskrevet i seksjon (c) og ga 3,2 mg råmateriale ved HF spaltning av 13,9 mg tørr $H-[Taeg]_{15}$ -BHA harpiks. Hovedtoppen ved 22,6 min. ble lokalisert i en stor topp som utgjorde omtrent 60% av den totale absorbanse (fig. 12a). Igjen (se den foregående delen) kan denne toppen tilskrives aggregasjons-/konformasjonsstadiene til målmolekylet $H-[Taeg]_{15}-NH_2$ p.g.a. massespektralanalyser av denne samlede "toppen" viste ikke tilstedeværelse av andre molekyler. Det totale råproduktet ble rensset og samlet "toppen" til omtrent

2,8 mg materiale. for $(m+Na)^+$ var den beregnede m/z verdien 4033,9 og den målte m/z verdien var 4032,9.

5 (f) Spaltning, rensing og identifikasjon av $Acr^1-[Taeg]_{15}-NH_2$

En del av den beskyttede $Acr^1-[Taeg]_{15}-BHA$ harpiksen ble behandlet som beskrevet i del (b) og ga 14,3 mg råmateriale ved HF spaltning av 29,7 mg tørr $Acr^1-[Taeg]_{15}-BHA$ harpiks. 10 Sammen utgjorde hovedtoppen ved 23,7 min. og en "dimer" (se nedenfor) ved 29,2 min. omtrent 40% av den totale absorbansen (fig. 12b). Råproduktet ble gjentatte ganger rensset til omtrent 1 mg av sannsynligvis >99% ren $Acr^1-[Taeg]_{15}-NH_2$ "kontaminert" med selv-aggregerte molekyler som eluerte ved 15 27,4 min., 29,2 min. og til slutt som en stor bred topp som eluerte med 100% buffer B (fig. 12c). Denne vurderingen er i samsvar med observasjonen om at disse toppene vokser ved henstand (i timer) i vanndig eddiksyreoppløsning og til slutt presipiterer ut kvantitativt. for $(M+H)^+$ var den beregnede 20 m/z verdien 4593,6 og den målte m/z verdien var 4588,7.

(g) Synteseprotokoll 1

(1) Boc-avspaltning med TFA/ CH_2Cl_2 (1:1, v/v), 3 ml, 3 x 1 25 min. og 1 x 30 min., (2) vasking med CH_2Cl_2 , 3 ml, 6 x 1 min., (3) nøytralisering med DIEA/ CH_2Cl_2 (1:19, v/v), 3 ml, 3 x 2 min., (4) vasking med CH_2Cl_2 , 3 ml, 6 x 1 min., og avrenning i 1 min., (5) 2-5 mg prøve av PNA-harpiksen kan bli tatt ut og grundig tørket for en kvantitativ ninhydrinanalyse 30 for å bestemme substitusjonen, (6) addisjon av 3,2 ekv. (0,18 mmol, 100 mg) Boc Taeg-OPfp løst opp i 1 ml CH_2Cl_2 etterfulgt av til tilsetning av 0,5 ml DMF (sluttkonsentrasjon av pentafluorfenylester omtrent 0,12 M), koblingsreaksjonen ble kjørt i totalt 12-24 t. med risting ved romtemperatur, (7) 35 vaskin med DMF, 3 ml, 1x 2 min., (8) vasking med CH_2Cl_2 , 3 ml, 4 x 1 min., (9) nøytralisering med DIEA/ CH_2Cl_2 (1: 19, v/v), 3 ml 2 x 2 min., (10) vasking med CH_2Cl_2 , 3 ml, 6 x 1

min., (11) 2-5 mg prøve av beskyttet PNA-harpiks blir tatt ut for hurtig kvalitativ ninhydrintest og ytterligere 2-5 mg blir grundig tørket for en kvantitativ ninhydrinanalyse for å bestemme koblingsgraden (etter syklusene 7, 10 og 15 ble ureagert aminogruppe blokkert ved acetylering med N-acetylimidasol i metylenklorid).

Eksempel 18.

Fast-fase syntese av $\text{Acr}^1\text{-[Taeg]}_{15}\text{-Lys(ClZ)-BHA}$ og kortere derivater

(a) Trinnvis oppstilling av $\text{Boc-[Taeg]}_{15}\text{-Lys(ClZ)-BHA}$ harpiks.

Syntesen ble initiert ved en kvantitativ belastning (standard DCC in situ kobling in bar CH_2Cl_2) av Boc-Lys(ClZ) på 100 mg forsvellet og nøytralisert BHA harpiks (0,57 mmol NH_2/g). Ytterligere utvidelse av den beskyttede PNA-kjeden anvendt til enkeltkoblinger ("Syntetisk Protokoll 2") for syklusene 1 til 5 og syklusene 10 til 15 ved anvendelse av 3,2 ekvivalenter BocTaeg-OPfg i omtrent 33% $\text{DMF/CH}_2\text{Cl}_2$. Syklusene 5 til 10 anvendte en ekstra rett DCC (dvs. in situ) kobling av den frie syren BocTaeg-OH i omtrent 33% $\text{DMF/CH}_2\text{Cl}_2$. Alle koblingsreaksjonene ble utført ved risting i minst 12 t. i en manuelt drevet 6 ml standar fast-fase reaksjonsbeholder. Ureagert aminogruppe ble blokkert ved acetylering med de samme stadiene av syntesen som i eksempel 17. Deler av beskyttet $\text{Boc-[Taeg]}_5\text{-Lys(ClZ)-BHA}$ og $\text{Boc-[Taeg]}_{10}\text{-Lys(ClZ)-BHA}$ harpikser ble tatt ut etter oppstilling av henholdsvis 5 og 10 PNA residier. Vurdert ved analytisk HPLC kromatogram av det råe spaltningsproduktet fra $\text{Boc-[Taeg]}_{10}\text{-Lys(ClZ)-BHA}$ harpiksen (se seksjon (e)) ga en ytterligere "fri syre" kobling av PNA residene 5 til 10 ikke noen signifikant forbedring av synteseutbyttet sammenlignet med de enkeltkoblede residene i eksempel 17.

(b) Syntese av $\text{Acr}^1\text{-[Taeg]}_{10}\text{-Lys(ClZ)-BHA}$ harpiks

Etter avspaltning av endel av Boc-[Taeg]₁₀-Lys(ClZ)-BHA harpiksen (vurdert tørrvekt er omtrent 90 mg, omtrent 0,01 mmol voksende kjeder), ble H-[Taeg]₁₅-BHA harpiksen omsatt med omtrent 20 ekvivalenter (141 mg, 0,19 mmol) Acr¹-OPfp i 1 ml av omtrent 66% DMF/CH₂Cl₂ i en 3 ml fast-fase reaksjonsbeholder. Vurdert ved en kvalitativ ninhydrinreaksjon var koblingen av akridindelen nærmest kvantitativ.

(c) Syntese av Acr¹-[Taeg]₁₅-Lys(ClZ)-BHA harpiks

Etter avspaltning av gjenværende Boc-[Taeg]₁₅-Lys(ClZ)-BHA harpiks (vurdert tørrhet omtrent 70 mg, omtrent 0,005 mmol voksende kjeder), H-[Taeg]₁₅-Lys(ClZ)-BHA harpiks ble omsatt med omtrent 25 ekvivalenter (91 mg, 0,12 mmol) Acr¹-OPfp i 1 ml omtrent 66% DMF/CH₂Cl₂ i en 3 ml fast-fase reaksjonsbeholder. Vurdert ved en kvalitativ ninhydrinreaksjon var koblingen av akridindelen nærmest kvantitativ.

(d) Spaltning, rensing og identifikasjon av H-[Taeg]₅-Lys-NH₂

En del av den beskyttede Boc-[Taeg]₅-Lys(ClZ)-BHA harpiksen ble behandlet som beskrevet i eksempel 17c til 8,9 mg råmateriale ved HF spaltning av 19,0 mg tørr H-[Taeg]₅-Lys(ClZ)-BHA harpiks. Hovedtoppen ved 12,2 min. (eluerte ved 14,2 min. dersom injisert fra en vandig oppløsning istedenfor 10% vandig eddiksyreoppløsning) utgjorde omtrent 90% av den totale absorbansen. Omtrent 2,2 mg av råproduktet ble rensset til omtrent 1,5 mg 99% ren H-[Taeg]₅-Lys-NH₂.

(e) Spaltning, rensing og identifikasjon av H-[Taeg]₁₀-Lys-NH₂

En del av den beskyttede Boc-[Taeg]₁₀-Lys(ClZ)-BHA harpiksen ble behandlet som beskrevet i eksempel 17c til 1,7 mg av råmaterialet ved HF spaltning av 7,0 mg tørr H-[Taeg]₁₀-Lys(ClZ)-BHA harpiks. Hovedtoppen ved 15,1 min. (eluert ved

17,0 min. dersom injisert fra en vanndig oppløsning istedenfor 10% vanndig eddiksyreoppløsning) utgjorde omtrent 50% av den totale absorbanse. Omtrent 1,2 g av råproduktet ble rensset til omtrent 0,2 mg >95% ren H-[Taeg]₁₀-Lys-NH₂. Fig. 13a. For (M+H)⁺ var den beregnede m/z verdien 2807,8 og den målte m/z verdien var 2808,2.

(f) Spaltning, rensing og identifikasjon av Acr¹-[Taeg]₁₀-Lys-NH₂

99,1 mg beskyttet Acr¹-[Taeg]₁₀-Lys(ClZ)-BHA harpiks (tørr vekt) ble spaltet som beskrevet i eksempel 17c til 42,2 mg råmateriale. Hovedtoppen ved 25,3 min. (eluerte ved 23,5 min. dersom den ble injisert fra en vanndig oppløsning istedenfor 10% vanndig eddiksyreoppløsning) utgjorde omtrent 45% av den totale absorbanse. En 8,87 mg del av råproduktet ble rensset til omtrent 5,3 mg av >97% ren H-[Taeg]₁₀-Lys-NH₂. For (M+H)⁺ når den beregnede m/z verdien var 2850,8 og den målte m/z verdien var 2849,8.

(g) Spaltning og rensing av Acr¹-[Taeg]₁₅-Lys-NH₂

En 78,7 mg del av beskyttet Acr¹-[Taeg]₁₅-Lys(ClZ)-BHA harpiks (tørr vekt) ble spaltet som beskrevet i eksempel I del (c) til 34,8 mg råmateriale. Hovedtoppen ved 23,5 min. (omtrent samme elueringstid dersom injisert fra en vanndig oppløsning istedenfor 10% vanndig eddiksyreoppløsning) og en "dimer" ved 28,2 min. utgjorde omtrent 35% av den totale absorbanse. Omtrent 4,5 mg av råproduktet ble rensset til omtrent 1,6 mg av antagelig >95% ren H-[Taeg]₁₀-Lys-NH₂. Denne forbindelsen kunne ikke være fri for "dimer" toppen som vokste ved henstand i vanndig eddiksyreoppløsning.

(h) Synteseprotokoll 2

(1) Boc-avspaltning med TFA/CH₂Cl₂ (1:1, v/v), 3 ml, 3 x 1 min. og 1 x 30 min., (2) vasking med CH₂Cl₂, 3 ml, 6 x 1

min., (3) nøytralisering med DIEA/CH₂Cl₂ (1: 19, v/v), 3 ml, 3 x 2 min., (4) vasking med CH₂Cl₂, 3 ml, 6 x 1 min. og avrenning i 1 min., (5) 2-5 mg prøve PNA-harpiks kan bli tatt ut og grundig tørket for en kvalitativ ninhydrinanalyse, (6) for syklusene 1 til 5 og syklusene 10 til 15 ble koblingsreaksjonen utført ved tilsetning av 3,2 ekv. (0,18 mmol, 100 mg) BocTaeg-OPfp løst opp i 1 ml CH₂Cl₂ etterfulgt av tilsetning av 0,5 ml DMF (sluttkonsentrasjon av pentafluorfenylester omtrent 0,12 M), koblingsreaksjonen ble utført i totalt 12-24 t. med resting, syklusene 5 til 10 anvendte ytterligere 0,12 M DCC kobling av 0,12 M BocTaeg-OH i 1,5 ml DMF/CH₂Cl₂ (1:2, v/v), (7) vasking med DMF, 3 ml, 1 x 2 min., (8) vasking med CH₂Cl₂, 3 ml, 4 x 1 min., (9) nøytralisering med DIEA/CH₂Cl₂ (1: 19, v/v), 3 ml, 2 x 2 min., (10) vasking med CH₂Cl₂, 3 ml, 6 x 1 min., (11) 2-5 mg prøve av beskyttet PNA-harpiks blir tatt ut for en kvalitativ ninhydrintest (etter syklusene 7, 10 og 15 ble ureagert aminogruppe blokkert ved acetylering med N-acetylimidasol i metylenklorid).

Eksempel 19.

Forbedret fast-fase syntese av H-[Taeg]₁₀-Lys-NH₂

Beskyttet PNA ble oppstilt på en MBHA harpiks ved anvendelse av omtrent halvparten av belastningen av BHA harpiksen anvendt i de foregående eksemplene. Alle syklusene med unntagelse av en ble etterfulgt av acetylering av ukoblede aminogrupeer. Følgende beskriver syntesen i detalj:

(a) Fremstilling av Boc-Lys(ClZ)-NH-CH(p-CH₃-C₆H₄)-C₆H₄ harpiks (MBHA harpiks) med en innledende substitusjon av 0,3 mmol/g

Den ønskede substitusjonen av Boc-Lys(ClZ)-MBHA harpiks var 0,25 - 0,30 mmol/g. For å oppnå denne verdien ble 1,5 mmol Boc-Lys(ClZ) koblet til 5,0 g nøytralisert og forsvellet MBHA

harpiks (bestemt ved den kvantitative ninhydrinreaksjonen og inneholder 0,64 mmol NH_2/g) ved anvendelse av en enkelt "in situ" kobling (1,5 mmol DCC) i 60 ml CH_2Cl_2 . Reaksjonen ble utført ved risting i 3 t. i manuelt drevet, 225 ml, standard, fast-fase reaksjonsbeholder. Ureagert aminogruppe ble deretter blokkert ved acetylering med en blanding av eddiksyreanhydrid/pyridin/ CH_2Cl_2 (1:1:2, v/v/v) i 18 t. En kvantitativ ninhydrinreaksjon på den nøytraliserte harpiksen viste at bare 0,00093 mmol/g fri amin var igjen (se tabell I), dvs. 0,15 % av de opprinnelige aminogruppene. Substitusjonsgraden ble vurdert ved avspaltning og ninhydrinanalyse og ble funnet å være 0,32 mmol/g for den nøytralisert H-Lys(ClZ)-MBHA harpiksen. Dette er i samsvar med maksimalverdien av 0,28 mmol/g for en kvantitativ kobling av 0,30 mmol Boc-Lys(ClZ)/g harpiks (se tabell II).

(b) Trinnvis oppstilling av Boc-[Taeg]₃-Lys(ClZ)-MBHA harpiks

Hele batchen av H-Lys(ClZ)-MBHA harpiks fremstilt i seksjon (a) ble brukt direkte (i den samme reaksjonsbeholder) for å oppstille(Boc-[Taeg]₃-Lys(ClZ)-MBHA harpiksen ved enkeltkoblinger (Syntese Protokoll 3") ved anvendelse av 2,5 ekvivalenter BocTaeg-OPfp i hver CH_2Cl_2 . Den kvantitative ninhydrinreaksjonen ble anvendt i syntesen (se tabell II).

(c) Trinnvis oppstilling av Boc-[Taeg]₈-Lys(ClZ)-MBHA harpiks

Omtrent 4,5 g våt Boc-[Taeg]₃-Lys(ClZ)-MBHA harpiks (omtrent 0,36 mmol voksende kjeder, tatt ut av totalt omtrent 19 g vårt harpiks dannet i del (b)) ble plassert i en 55 ml SPPS reaksjonsbeholder. Boc-[Taeg]₈-Lys(ClZ)-MBHA harpiksen ble dannet ved enkeltkoblinger ("Syntese Protokoll 4") ved anvendelse av 2,5 ekvivalenter BocTaeg-OPfp i omtrent 30% DMF/ CH_2Cl_2 . Progresjonen av syntesen ble registrert ved alle

trinnene ved hjelp av kvantitativ ninhydrinreaksjon (se tabell II).

(d) Trinnvis oppstilling av Boc-[Taeg]₈-Lys(ClZ)-MBHA harpiks Omtrent 1 g våt Boc-[Taeg]₈-Lys(ClZ)-MBHA harpiks (omtrent 0,09 mmol voksende kjeder tatt ut av totalt omtrent 4 g våt harpiks preparert i del (c)) ble plassert i en 20 ml SPPS reaksjonsbeholder. Boc-[Taeg]₁₀-Lys(ClZ)-MBHA harpiks ble oppstilt ved enkelt-koblingsprotokoll anvendt i den foregående delen ved anvendelse av 2,5 ekvivalenter BocTaeg-OPfp i omtrent 30% DMF/CH₂Cl₂. Reaksjonsvolumet var 3 ml (vigorøs risting). Sytesen ble registrert ved den kvantitative ninhydrinreaksjonen (se tabell II).

Syntese- trinn	Residie- koblet	Substitusjon etter avspaltning (mmol/g) /		Gjenværende fri aminogrupper etter		Vurdert- koblings- grad
		Målt	Teoret.	Enkelt- kobling	Asetyl- ering	
						(%)
"0"	BocLys(ClZ)	0.32	0.28		0.93	
1	BocTaeg	0.23	0.26	0.97	0.54	>99.9
2	BocTaeg	0.21	0.24	0.92	0.46	99.8
3	BocTaeg	0.19	0.23	1.00	0.57	99.7
4	BocTaeg	0.18	0.21	1.85		99.3
5	BocTaeg	0.17	0.20	2.01	0.19	99.9
6	BocTaeg	0.15	0.19	1.69	0.10	99.0
7	BocTaeg	0.11	0.18	1.11	0.66	99.1
8	BocTaeg	0.12	0.17	1.82	0.44	99.0
9	BocTaeg	0.10	0.17	5.63	0.56	94.8
10	BocTaeg	0.11	0.16	1.54	0.67	99.1

(e) Syntese av AC-[Taeg]₁₀-Lys(ClZ)-MBA harpiks.

Etter avspaltning av en del av Boc-[Taeg]₁₀-Lys(ClZ)-MBA harpiksen (vurdert tørrvekt er omtrent 45 g) ble harpiksen deretter acetyleret kvantitativt med en 2 ml blanding av eddiksyreanhydrid/pyridin/CH₂Cl₂ (1:1:2, v/v/v) i 2 t. i en 3
5 ml fast-fase reaksjonsbeholder.

(f) Spaltning, rensing og identifikasjon av H-[Taeg]₁₀-Lys-NH₂

10 En del av den beskyttede Boc-[Taeg]₁₀-Lys(ClZ)-BHA harpiksen ble behandlet som beskrevet i eksempel 17c for å tilveiebringe omtrent 24 mg av råmateriale ved HF spaltning av av 76 mg tørr H-[Taeg]₅-Lys(ClZ)-BHA harpiks. Hovedtoppen ved 15,2 min. (som innbefatter urenheter så som delesjonspep-
15 tider og forskjellige biprodukter) utgjorde omtrent 78% av den totale absorbanse. Hovedtoppen utgjorde også omtrent 88% av "hovedtopp plussdelesjonstopper" absorbanse som er i samsvar med det totalt vurderte koblingsutbyttet på 90,1 % oppnådd ved oppsummering av utbyttene ved de individuelle
20 koblingene i tabell II. En 7,2 mg del av råproduktet ble rensset fra 2 batcher ved anvendelse av en semi-preparativ revers-fase kolonne (oppsamling av hovedtoppen i en beholder avkjølt med tørris/2-propanol). Hver inneholdt 3,6 mg i 1 ml H₂O. Den frosne oppløsningen ble direkte lyofilisert (uten
25 på forhånd fjerning av asetonitril på en speed vac) for å tilveiebringe 4,2 mg 82% ren H-[Taeg]₁₀-Lys-NH₂.

(g) Spaltning, rensing og identifikasjon av Ac-[Taeg]₁₀-Lys-NH₂

30 En 400,0 mg del av beskyttet Ac-[Taeg]₁₀-Lys(ClZ)-BHA harpiks (tørrvekt) ble spaltet som beskrevet i eksempel 17c med unntagelse av TFA behandlingen som ga 11,9 mg råmateriale. Hovedtoppen ved 15,8 min. utgjorde omtrent 75% av den totale absorbanse. En 4,8 mg del av råproduktet ble rensset til
35 omtrent 3,5 mg >95% ren AC-[Taeg]₁₀-Lys-NH₂. for (M+H)⁺ var

den beregnede m/z verdien lik 2849,8 og den målte m/z veriden lik 2848,8.

(h) Syntese protokoll 3

- 5 (1) Boc-avspaltning med TFA/CH₂Cl₂ (1:1, v/v), 100 ml, 3 x 1 min. og 1 x 30 min., (2) vasking med CH₂Cl₂, 100 ml, 6 x 1 min., (3) nøytralisering med DIEA/CH₂Cl₂ (1: 19, v/v), 100 ml, 3 x 2 min., (4) vasking med CH₂Cl₂, 100 ml, 6 x 1 min. og avrenning i 1 min., (5) 2-5 mg prøve av PNA-harpiksen ble
10 tatt ut og grundig tørket for en kvantitativ ninhydrinanalyse for å bestemme substitusjonen, (6) tilsetning av 2,5 ekv. (3,75 mmol, 2,064 g) BocTaeg-OPfp løst opp i 35 ml CH₂Cl₂ (sluttkonsentrasjon av pentafluorfenylester omtrent 0,1 M), koblingsreaksjonen ble latt gå i totalt 20-24 t. med risting,
15 (7) vasking med DMF, 100 ml, 1 x 2 min. (for å fjerne presipitert BocTaeg-OH), (8) vasking med CH₂Cl₂, 100 ml, 4 x 1 min., (9) nøytralisering med CH₂Cl₂ (1: 19, v/v), 100 ml, 2 x 2 min., (10) vasking med CH₂Cl₂, 100 ml, 6 x 1 min., (11) 2-5 mg prøve av beskyttet PNA-harpiks ble tatt ut for
20 hurtigkvalitativ ninhydrintest og ytterligere 2-5 mg ble grundig tørket for en kvantitativ ninhydrinanalyse for å bestemme koblingsgrade, (12) blokkering av ureagerede aminogrupper ved acylering med en 100 ml blanding av eddiksyreanhydrid/pyridin/CH₂Cl₂ (1:1:2, v/v/v) i 2 t., (13)
25 vasking med CH₂Cl₂, 100 ml, 6 x 1 min., (14) 2 x 2-5 mg prøver av beskyttet PNA-harpiks ble tatt ut, nøytralisert med DIEA/CH₂Cl₂ (1: 19, v/v) og vasket med CH₂Cl₂ for kvalitative og kvantitative ninhydrinanalyser.

30 (i) Syntese protokoll 4

- (1) Boc-avspaltning med TFA/CH₂Cl₂ (1:1, v/v), 25 ml, 3 x 1 min. og 1 x 30 min., (2) vasking med CH₂Cl₂, 25 ml, 6 x 1 min., (3) nøytralisering med DIEA/CH₂Cl₂ (1: 19, v/v), 25 ml,
35 3 x 2 min., (4) vasking med CH₂Cl₂, 25 ml, 6 x 1 min. og avrenning i 1 min., (5) 2-5 mg prøve av PNA-harpiksen blir tatt ut og grundig tørket for en kvantitativ ninhydrinanalyse

for å bestemme substitusjonen, (6) tilsetning av 2,5 ekv. (0,92 mmol, 0,506 g) BocTaeg-OPfp løst opp i 6 ml CH₂Cl₂ etterfulgt av tilsetning av 3 ml DMF (sluttkonsentrasjon av pentafluorfenylester omtrent 0,1 M), koblingsreaksjonen ble
 5 latt gå i totalt 20-24 t. med risting, (7) vasking med DMF, 25 ml, 1 x 2 min., (8) vasking med CH₂Cl₂, 25 ml, 4 x 1 min., (9) nøytralisering med DIEA/CH₂Cl₂ (1: 19, v/v), 25 ml, 2 x 2 min., (10) vasking med CH₂Cl₂, 25 ml, 6 x 1 min., (11) 2-5 mg prøve av beskyttet PNA-harpiks blir tatt ut for en hyrtig
 10 kvalitativ ninhydrintest og ytterligere 2-5 mg blir grundig tørket for en kvantitativ ninhydrinanalyse for å bestemme koblingsgraden, (12) blokkering av ureagerte aminogrupeer ved acylering med en 25 ml blanding av eddiksyreanhydrid/-pyridin/CH₂Cl₂ (1:1:2, v/v/v) i 2 t. (unntatt etter første syklus), (13) vasking med CH₂Cl₂, 25 ml, 6 x 1 min., (14) 2 x
 15 2-5 mg prøver av beskyttet PNA-harpiks blir tatt ut, nøytralisert med DIEA/CH₂Cl₂ (1: 19, v/v) og vasket med CH₂Cl₂ for kvalitativ og kvantitativ ninhydrinanalyse.

20 Eksempel 20.

Fast-fase syntese av H[Taeg]₅-Caeg-[Taeg]₄-Lys-NH₂

(a) Trinnvis oppstilling av Boc-[TAEG]₅-Caeg-[Taeg]₄-
 25 Lys(ClZ)-MBHA harpiks.

Omtrent 2,5 g våt (Boc-[Taeg]₃-Lys(VlZ)-MBHA harpiks (omtrent 1/6 av totalt gjenværende omtrent 16 g våt harpiks, omtrnt 0,75 g tørr harpiks omtrent 0,15 mmol voksende kjeder) ble
 30 plassert i en 6 ml SPPS reaksjonsbeholder. Boc-[Taeg]₅-Caeg-[Taeg]₄-Lys(ClZ)-MBHA harpiks ble oppstilt ved dobbeltkobling av alle Taeg-residiene ved anvendelse av de vanlige 2,5 ekv. av BocTaeg-OPfp i 2,5 ml omtrent 30% DMF/CH₂Cl₂, med unntagelse av at det første residiet var enkelt-koblet.
 35 Inkorporering av C(Z)aeg-residier ble oppfanget ved kobling med 2,0 ekvivalenter BocC(Z)aeg-OPfp i TFE/CH₂Cl₂ (1:2, v/v).

Synteseprogresjonen ble registrert ved alle trinnene ved kvantitativ ninhydrinreaksjon (se tabell III).

Syntese- trinne	Residie- koblet	Substitusjon etter avspaltning (mmol/g)		Gjenværende frie aminogrupper etter (µmol/g)			Vurdert koblings grad
		Målt	Teoret.	1. kobling	2. kobling	asetyl- kobling ering	
3		0.19	0.23	1.00		0.57	
4	BocTaæg	0.17	0.21	4.88		97.3	97.3
5	BocC(Z)aæg	0.11	0.20	70.20	27.98	1.33	78.4 (46)
6	BocTaæg	0.10	0.19	24.79	4.58	2.40	95.4 (75)
7	BocTaæg	0.09	0.18	8.55	1.61	0.20	>99.9 (93)
8	BocTaæg	0.08	0.17	6.53	0.80	0.45	99.0 (91)
9	BocTaæg	0.07	0.16	9.26	3.66	0.61	94.8 (86)
10	BocTaæg	0.07	0.15	5.32	1.48	0.60	98.8 (93)

(b) Spaltning, rensing og identifikasjon av H-[Taæg]₅-Caæg-[Taæg]₄-Lys-NH₂

En del av beskyttet Boc-[Taeg]₅-Caeg-[Taeg]₄-Lys(ClZ)-BHA harpiks ble behandlet som beskrevet i eksempel I del (c) til omtrent 14,4 mg råmateriale ved HF spaltning av 66,9 mg tørr H-[Taeg]₅-Caeg-[Taeg]₄-Lys(ClZ)-BHA harpiks. Hovedtoppen ved 14,5 min. utgjorde >50% av den totale absorpsjonen. En 100,0 mg del av råproduktet ble renset (8 batcher, hver løst opp i 1 ml H₂O) for å tilveiebringe omtrent 9,1 mg 96% ren H-[Taeg]₅-Caeg-[Taeg]₄-Lys-NH₂ (fig. 13b). For (M+H)⁺ var den beregnede m/z verdien lik 2793,8 og den målte m/z verdien lik 2790,6.

Eksempel 21.

N-BenzyloksykARBONYL-N-'(bOKAMINOETYL)GLYSERIN

Aminoetylglisin (52,86 g, 0,447 mol) ble løst opp i vann (900 ml) og dioksan (900 ml) ble tilsatt. pH ble justert til 11,2 med sN NaOH. pH ble holdt ved 11,2 og tert-butyl-p-nitrofenylkarbonat (128,4 g, 0,537 mol) ble løst opp i dioksan (720 ml) og dråpevis tilsatt iløpet av 2 timer. pH ble holdt ved 11,2 i minst tre timer og deretter omrørt over natt. Den gule oppløsningen ble avkjølt til 0°C og pH ble justert til 3,5 med 2N HCl. Blandingen ble vasket med kloroform (4x100 ml) og pH til den vandige fasen ble på ny justert til 9,5 med 2N NaOH ved 0°C. BenzyloksykARBONYLKLORID (73,5 ml, 0,515 mol) ble tilsatt over en halv time mens pH ble holdt 9,5 med 2N NaOH. pH ble ofte justert iløpet av de neste 4 timene og oppløsningen ble latt stå med omrøring over natt. På den følgende dagen ble oppløsningen vasket med eter (3x600 ml) og pH til oppløsningen ble deretter justert til 1,5 med 2 N HCl ved 0°C. Tittelforbindelsen ble isolert ved ekstrahering med etylasetat (5x1000 ml). Etylasetatoppløsningen ble tørket over magnesiumsulfat og avdampet til tørrhet i vakum. Dette førte til 138 g som ble løst opp i eter (300 ml) og presipitert ved tilsetning av petroleumeter (1800 ml). Utbytte 124,7 (79%). Sm.p. 64,5-85°C. Analyse for C₁₇H₂₄N₂O₆ funnet (beregnet) C: 58,40 (57,94), H: 7,02(6,86), N:

7,94(7,95). ^1H -NMR (250 MHz, CDCl_3) 7,33 & 7,32 (5H, Ph), 5,15 & 5,12 (2H, PCH_2), 4,03 & 4,01 (2H, $\text{NCH}_2\text{CO}_2\text{H}$), 3,46 (b, 2H, $\text{BocNHCH}_2\text{CH}_2$), 3,28 (b, 2H, $\text{BocNHCH}_2\text{CH}_2$), 1,43 & 1,40 (9H, ^tBu). HPLC (260 nm) 20,71 min. (80,2 %) og 21,57 min. (19,8 %). UV-spektrene (200 nm - 300 nm) er identiske og tyder på at den mindre toppen består av Bis-Z-AEG.

Eksempel 22.

10 N'-Boc-aminoethylglysinetylester

N-Benzylloksykarbonyl-N'-(bokaminoetyl)glysin (60,0 g, 0,170 mol) og N,N-dimetyl-4-aminopyridin (6,00 g) ble løst opp i absolutt etanol (500 ml) og avkjølt til 0°C før tilsetning av DCC (42,2 g, 0,204 mol). Isbadet ble fjernet etter 5 minutter og omrøringen ble fortsatt ytterligere 2 timer. Presipitert DCU (32,5 g tørket) ble fjernet ved filtrering og vasket med eter (3x100 ml). Det kombinerte filtratet ble suksessivt vasket med fortynnet kaliumhydrogensulfat (2x400 ml), fortynnet natriumhydrogenkarbonat (2x400 ml) og mettet natriumklorid (1x400 ml). Den organiske fasen ble filtrert og deretter tørket over magnesiumsulfat og avdampet til tørrhet i vakum og ga 66,1 g av en oljeholdig forbindelse som inneholdt noe DCU.

25 Oljen ble løst opp i absolutt etanol (600 ml) og det ble tilsatt 10% paladium på karbon (6,6 g). Oppløsningen ble hydrert ved atmosfærisk trykk og reservoaret ble fylt med 2N natriumhydroksid. Etter 4 timer ble 3,3 L konsumert ut ifra teoretisk 4,2 L. Reaksjonsblandingen ble filtrert gjennom selit og avdampet til tørrhet i vakum og ga 39,5 g (94%) av en oljeholdig forbindelse. En 13g del av den oljeholdige forbindelsen ble rensset ved silikagel (600 g SiO_2) kromatografi. Etter eluering med 300 ml 20% petroleumeter i metylenklorid ble tittelforbindelsen eluert med 1700 ml 5% metanol i metylenklorid. Oppløsningsmiddelet ble fjernet fra fraksjoner med tilfredsstillende renhet, i vakum og utbyttet

var 8,49 g. Alternativt ble 10 g av råmaterialet rensset ved Kugel Rohr destillasjon. $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CD_3OD), 4,77 (b. s, NH), 4,18 (q, 2H, MeCH_2-), 3,38 (s, 2H, $\text{NCH}_2\text{CO}_2\text{Et}$), 3,16 (t, 2H, $\text{BocNHCH}_2\text{CH}_2$), 2,68 (t, 2H, $\text{BocNHCH}_2\text{CH}_2$), 1,43 (s, 9H, tBu) og 1,26 (t, 3H, CH_3) $^{13}\text{C-NMR}$ 171,4 (COEt), 156,6 (CO), 78,3 ($(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 59,9 (CH_2), 48,1 (CH_2), 39,0 (CH_2), 26,9 (CH_2) og 12,6 (CH_3).

Eksempel 23.

10

N'-Boc-aminoetylglysinmetylester

15

Ovennevnte fremgangsmåte ble anvendt idet metanol ble erstattet for etanol. Sluttproduktet ble rensset kolonnerenssing.

Eksempel 24.

1-(Boc-aeg)thyminetylester

20

N'-Boc-aminoetylglysinetylester (13,5 g, 54,8 mmol), DhbtOH (9,84 g, 60,3 mmol) og 1-karboksymetylthymine (11,1 g, 60,3 mmol) ble løst opp i DMF (210 ml). Metylklorid (210 ml) ble deretter tilsatt. Oppløsningen ble avkjølt til 0°C i et etanol/isbad og DCC (13,6 g, 65,8 mmol) ble tilsatt. Isbadet ble fjernet etter 1 time og omrøringen ble fortsatt i ytterligere 2 timer ved romtemperatur. Presipitert DCU ble fjernet ved filtrering og vasket to ganger med metylenklorid (2 x 75 ml). Til det kombinerte filtratet ble det tilsatt ytterligere metylenklorid (650 ml). Oppløsningen ble suksessivt vasket med fortynnet natriumhydrogenkarbonat (3 x 500 ml), fortynnet kaliumhydrogensulfat (2 x 500 ml) og mettet natriumklorid (1 x 500 ml). Noe presipitat ble fjernet fra den organiske fasen ved filtrering. Den organiske fasen ble tørket over magnesiumsulfat og avdampet til tørrhet i vakuum. Den oljeholdige resten ble løst opp i metylenklorid (150 ml), filtrert og tittelforbindelsen ble

35

presipitert ved tilsetning av petroleumeter (350 ml) ved 0°C. Metylenklorid/petroleumeter prosedyren ble gjentatt en gang. Dette ga 16, 0 g (71%) av et materiale som hadde høyere renhet enn 99% ifølge HPLC.

5

Eksempel 25.

1-(Boc-aeg)thymin

10 Materialet fra ovenfor ble suspendert i THF (194 ml og gir en 0,2 M oppløsning) og 1 M vandig litsiumhydroksid (116 ml) ble tilsatt. Blandingen ble omrørt i 45 minutter ved romtemperatur og deretter filtrert for å fjerne gjenværende DCU. Vann (40 ml) ble tilsatt til oppløsningen som deretter
15 ble vasket med metylenklorid (300 ml). Ytterligere vann (30 ml) ble tilsatt og den alkaliske oppløsningen ble vasket en gang til med metylen klorid (150 ml). Den vandige oppløsningen ble avkjølt til 0°C og pH ble justert til 2 ved dråpevis tilsetning av 1 N HCl (omtrent 110 ml). Tittelforbindelsen ble ekstrahert med etylasetat (9 x 200 ml) de
20 kombinerte ekstraktene ble tørket over magnesiumsulfat og ble avdampet til tørrhet i vakum. Resten ble avdampet en gang fra metanol som etter tørking over natt ga et fargeløst glassaktig fast stoff. Utbytte 9,57 g (64%). HPLC > 98%
25 $R_T=14,8$ min. Analyse for $C_{16}H_{24}N_4O_7 \cdot 0,25 H_2O$. funnet (beregnet) C: 49,29(49,42), H: 6,52(6,35), N: 14,11(14,41). På grunn av begrenset rotasjon rundt det sekundære aminet ble flere av signalene doblet i forholdet 2:1 (indikert i listen med mj. for major og mi. for minor). 1H -NMR (250 MHz, DMSO-
30 d_6): 12,75 (b.s., 1H, CO_2H), 11,28 (s, "1H", mj., imide NH), 11,26 (s, "1H", mi., imide NH), 7,30 (s, "1H", mj., T H16), 7,26 (s, "1H", mi., T H-6), 6,92 (b.t., "1H", mj., BocNH), 6,73 (b.t., "1H", mi., BocNH), 4,64 (s, "2H", mj., CH_2CON), 4,46 (s, "2H", mj., CH_2CON), 4,19 (s, "2H", mi., CH_2CO_2H),
35 3,97 (s, "2H", mj., CH_2CO_2H), 3,63-3,01 (uoppløst m, innbefatter vann, CH_2CH_2), 1,75 (s, 3H, CH_3) og 1,38 (s, 9H, tBu).

Eksempel 26.

N⁴-Benzyloksykarbonyl-1-(Boc-aeg)cytozin

5

N'-Boc-aminoetylglysinetyler (5,00 g, 20,3 mmol), DhbtOH (3,64 g, 22,3 mmol) og N⁴-benzyloksykarbonyl-1-karboksymetylcytozin (6,77 g, 22,3 mmol) ble suspendert i DMF (100 ml). Metylenklorid (100 ml) ble deretter tilsatt. Oppløsningen ble avkjølt til 0°C og DCC (5,03 g, 24,4 mmol) ble tilsatt. 10 Isbadet ble fjernet etter 2 t. og omrøringen ble fortsatt i ytterligere en time ved romtemperatur. Reaksjonsblandingen ble deretter avdampet til tørrhet i vakuum. Resten ble suspendert i eter (100 ml) og omrørt i 30 min. Det faste materialet ble isolert ved filtrering og etervaskprosedyren ble gjentatt to ganger. Materialet ble deretter omfattende 15 omrørt i 15 min. med fortynnet natriumhydrogenkarbonat (omtrent 4% oppløsning, 100 ml), filtrert og vasket med vann. Denne prosedyren ble deretter gjentatt en gang og etter tørking ga den 17,0 g av et gulaktig fast materiale. Det 20 faste materialet ble deretter kokt med dioksan (200 ml) og filtrert mens det var oppvarmet. Etter avkjøling ble vann (200 ml) tilsatt. Det prsipiterte materialet ble isolert ved filtrering, vasket med vann og tørket. Ifølge HPLC 25 (observert ved 260 nm) hadde dette materialet en renhet som var høyere enn 99%, bortsett fra DCU. Esteren ble deretter suspendert i THF (100 ml), avkjølt til 0°C og 1 N LiOH (61 ml) ble tilsatt. En omrøring i 15 min. ble blandingen filtrert og filtratet ble vasket med metylenklorid (2 x 150 30 ml). Den alkaliske oppløsningen ble deretter avkjølt til 0°C og pH ble justert til 2,0 med 1 N HCl. Tittelforbindelsen ble isolert ved filtrering og ble vasket en gang med vann og ga 11,3 g av et hvitt pulver etter tørking. Materialet ble suspendert i metylenklorid (300 ml) og petroleumeter (300 35 ml) ble tilsatt. Filtrering og vasking ga 7,1 g (69%) etter tørking. HPLC ga en renhet på 99% R_T= 19,5 min. og en mindre urenhet ved 12,6 min. (omtrent 1%) som mest sannsynlig er Z-

de beskyttet monomer. Analyse for $C_{23}H_{29}N_5O_8$ funnet (beregnet) C: 54,16(54,87), H: 5,76(5,81) og N: 13,65(13,9-1). 1H -NMR (250 MHz, DMSO- d_6). 10,87 (b.s, 1H, CO_2H), 7,88 (2 overlappende dupletter, 1H, Cyt H-5), 7,41-7,32 (m, 5H, Ph), 7,01 (2 overlappende dupletter, 1H, Cyt H-6), 6,94 & 6,78 (uopp. tripletter, 1H, BocNH), 5,19 (s, 2H, $PhCH_2$), 4,81 & 4,62 (s, 2H, CH_2CON), 4,17 & 3,98 (s, 2H, CH_2CO_2H), 3,42-3,03 (m, innbefatter vann, CH_2CH_2) og 1,38 & 1,37 (s, 9H, tBu). ^{13}C -NMR. 150,88, 128,52, 128,18, 127,96, 93,90, 66,53, 49,58 og 28,22. IR: Frekvensen i cm^{-1} (intensitet). 3423 (26,4), 3035 (53,2), 2978 (41,4), 1736 (17,3), 1658 (3,8), 1563 (23,0), 1501 (6,8) og 145 (26,4).

Ekempel 27.

9-Karboksymetyladeninetylester

Adenin (10,0 g, 74 mmol) og kaliumkarbonat (10,29 g, 74,0 mmol) ble suspendert i DMF og etylbromasetat (8,24 ml, 74 mmol) ble tilsatt. Suspensjonen ble omrørt i 2,5 t. under nitrogen ved romtemperatur og deretter filtrert. Den faste resten ble vasket 3 ganger med DMF (10 ml). Det kombinerte filtratet ble avdampet til tørrhet i vakum. Det gul-oransje faste materialet ble helt inn i vann (200 ml) og 4 N HCl ble tilsatt til pH ca. 6. Etter omrøring ved $0^\circ C$ i 10 min. ble det faste stoffet filtrert ut, vasket med vann og omkrystallisert fra 96% etanol (150 ml). Tittelforbindelsen ble isolert ved filtrering og grundig vasket med eter. Utbytte 3,4 g (20%). Sm.p. $215,5-220^\circ C$. Analyse for $C_9H_{11}N_5O_2$ funnet (beregnet): C: 48,86(48,65), H: 5,01(4,91), N: 31,66(31,42). 1H -NMR (250 MHz, DMSO- d_6): (s, 2H, H-2 & H-8), 7,25 (b. s., 2H, NH_2), 5,06 (s, 2H, NCH_2), 4,17 (q, sH, $J=7,11$ Hz, OCH_2) og 1,21 (t, 3H, $J=7,13$ Hz, NCH_2). ^{13}C -NMR. 152,70, 141,30, 61,41, 43,97 og 14,07. FAB-MS. 222 (MH^+). IR: Frekvens i cm^{-1} (intensitet). 3855 (54,3), 3274(10,4), 3246(14,0), 3117(5,3), 2989(22,3), 2940(33,9), 2876(43,4), 2753(49,0), 2346(56,1), 2106(57,1), 1899(55,7), 1762(14,2),

1742(14,2), 1742(1,0), 1671(1,8), 1644(10,9), 1606(0,6),
 1582(7,1), 1522(43,8), 1477(7,2), 1445(35,8) og 1422(8,6).
 Posisjonen til alkyleringen ble verifisert ved røntgen-
 krystallografi på krystallet som ble oppnådd ved omkrystalli-
 5 sering fra 96% etanol.

Eksempel 28.

N⁶-Benzyloksykarbonyl-9-karboksymetyladninetylester

10

9-Karboksymetyladeninetylester (3,40 g, 15,4 mmol) ble løst i
 tørr DMF (50 ml) ved forsiktig oppvarming, avkjølt til 20°C
 og tilsatt til en oppløsning av N-etyl- benzyloksykarbonyli-
 midasoltetrafluorborat (62 mmol) i metylenklorid (50 ml) over
 15 en periode på 15 min. med isavkjøling. En viss grad av
 presipitasjon ble observert. Isbadet ble fjernet og
 oppløsningen ble omrørt over natt. Reaksjonsblandingen ble
 behandlet med mettet natriumhydrogenkarbonat (100 ml). Etter
 omrøring i 10 min. ble fasene separert og den organiske fasen
 20 ble vasket suksessivt med et volum vann, fortynnet kalium-
 hydrogensulfat (to ganger) og med mettet natriumklorid.
 Oppløsningen ble tørket over magnesiumsulfat og avdampet til
 tørrhet i vakuum og ga 11 g av et oljeholdig materiale.
 Materialet ble løst opp i metylenklorid (25 ml), avkjølt til
 25 0°C og presipitert med petroleumeter (50 ml). Denne
 prosedyren ble gjentatt en gang til 3,45 g (63%) av tittel-
 forbindelsen. Sm.p. 132-35°C. Analyse for C₁₇H₁₇N₅O₄ funnet
 (beregnet): C: 56,95(57,46), H: 4,71(4,82), N: 19,35(19,-
 71). ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): 8,77 (s, 1H, H-2 eller H-8),
 30 7,99 (s, 1H, H-2 eller H-8), 7,45-7,26 (m, 5H, Ph), 5,31 (s,
 2H, N-CH₂), 4,96 (s, 2H, Ph-CH₂), 4,27 (q, 2H, J=7,15 Hz,
 CH₂CH₃) og 1,30 (t, 3H, J=7,15 Hz, CH₂CH₃). ¹³C-NMR: 153,09,
 143,11, 128,66, 67,84, 62,51, 44,24 og 14,09. FAB-MS: 356
 (MH⁺) og 312 (MH⁺-CO₂). IR: frekvens i cm⁻¹ (intensitet).
 35 3423 (52,1), 3182 (52,8), 3115(52,1), 3031(47,9), 2981(38,6),
 1747(1,1), 1617(4,8), 15,87(8,4), 1552(25,2), 1511(45,2),
 1492(37,9), 1465(14,0) og 1413(37,3).

Eksempel 29.

N⁶-Benzyloksykarbonyl-9-karboksymetyladenin

5

N⁶-Benzyloksykarbonyl-9-karboksymetyladeninetyler (3,20 g, 9,01 mmol) ble blandet med metanol (50 ml) avkjølt til 0°C. Natriumhydroksidoppløsning (50 ml, 2N) ble tilsatt og materialet ble hurtig oppløst. Etter 30 min. ved 0°C ble den alkaliske oppløsningen vasket med metylenklorid (2x50 ml). Den vandige oppløsningen ble bragt til pH 1,0 med 4 N HCl ved 0°C hvorved tittelforbindelsen presipiterte. Utbytte etter filtrering, vasking med vann og tørking var 3,08 g (104%). Produktet inneholdt salt og elementanalyser reflekterte dette. Analyse for C₁₅H₁₃N₅O₄ funnet beregnet: C: 46,32(55,05), H: 4,24(4,00), N: 18,10(21,40) og C/N: 2,57(2,56). ¹H-NMR(250MHz, DMSO-d₆): 8,70 (s, 2H, H-2 og H-8), 7,50-7,35 (m, 5H, Ph), 5,27 (s, sH, N-CH₂) og 5,15 (s, 2H, Ph-CH₂). ¹³C-NMR. 168,77, 152,54, 151,36, 148,75, 145,13, 128,51, 128,17, 127,98, 66,76 og 44,67. Ir (KBr) 3484(18,3), 3109(15,9), 3087(15,0), 2966(17,1), 2927(19,9), 2383(53,8), 1960(62,7), 1739(2,5), 1688(5,2), 1655(0,9), 1594(11,7), 1560(12,3), 1530(26,3), 1499(30,5), 1475(10,4), 1455(14,0), 1429(24,5) og 1411(23,6). FAB-MS: 328 (MH⁺) og 284 (MH⁺-CO₂). HPLC (215 nm, 260 nm) i system 1: 15,18 min., mindre urenheter som alle var mindre enn 2%.

25

Eksempel 30.

30

N⁶-Benzyloksykarbonyl-1-(Boc-aeg)adeninetyler

35

N'-Boc-aminoetylglysinetyler (2,00 g, 8,12 mmol), DhbtOH (1,46 g, 8,93 mmol) og N⁶-benzyloksykarbonyl-9-karboksymetyl-adenin (2,92 g, 8,93 mmol) ble løst opp i DMF (15 ml). Metylenklorid (15 ml) ble tilsatt. Oppløsningen ble avkjølt til 0°C i et etanol/isbad. DCC (2,01 g, 9,74 mmol) ble tilsatt. Isbadet ble fjernet etter 2,5 t. og omrøringen ble

fortsatt i ytterligere 1,5 time ved romtemperatur. Presipitert DCU ble fjernet ved filtrering og vasket en gang med DMF (15 ml) og to ganger med metylenklorid (2 x 15 ml). Til det kombinerte filtratet ble det tilsatt ytterligere metylenklorid (100 ml). Oppløsningen ble vasket med fortynnet natriumhydrogenkarbonat (2 x 100 ml), fortynnet kaliumhydrogensulfat (2 x 100 ml) og mettet natriumklorid (1 x 100 ml). Den organiske fasen ble avdampet til tørrhet i vakum og ga 3,28 g (73%) av en gulaktig oljeholdig forbindelse. HPLC av råproduktet viste en renhet på bare 66% med flere urenheter som begge var mer eller mindre polare enn hovedtoppen. Oljen ble løst opp i absolutt etanol (50 ml) og aktivert karbon ble tilsatt. Etter omrøring i 5 min. ble oppløsningen filtrert. Filtratet ble vasket med vann (30 ml) og ble latt stå med omrøring over natt. Neste dag ble det hvite presipitatet fjernet ved filtrering, vasket med vann og tørket og ga 1,16 g (26%) av et materiale med en renhet som var høyere enn 98% ifølge HPLC. Tilsetning av vann til morvæskan ga ytterligere 0,53 g med en renhet på omtrent 95%. Analyse for $C_{26}H_{33}N_7O_2H_2O$ funnet (beregnet). C: 55,01(54,4-4), H: 6,85(6,15) og N: 16,47(17,09). 1H -NMR (250 Mhz, $CDCl_3$) 8,74 (s, 1H, Ade H-2), 8,18 (b. s, 1H, ZNH), 8,10 & 8,04 (s, 1H, H-8), 7,46-7,34 (m, 5H, Ph), 5,63 (uopp. t, 1H, BocNH), 5,30 (s, 2H, $PhCH_2$), 5,16 & 5,00 (s, 2H, CH_2CON), 4,29 & 4,06 (s, sH, CH_2CO_2H), 4,20 (q, 2H, OCH_2CH_3), 3,67-3,29 (m, 4H, CH_2CH_2), 1,42 (s, 9H, tBu) og 1,27 (t, 3H, OCH_2CH_3). Spekteret viser spor av etanol og DCU.

Eksempel 31.

N^6 -Benzyloksykarbonyl-1-(Boc-aeg)adenin

N^6 -Benzyloksykarbonyl-1-(Boc-aeg)adeninetylster (1,48 g, 2,66 mmol) ble suspendert i THF (13 ml) og blandingen ble avkjølt til $0^\circ C$. Litiumhydroksid (8 ml, 1 N) ble tilsatt. Etter 15 min. omrøring ble reaksjonsblandingen filtrert, ekstra vann (25 ml) ble tilsatt og oppløsningen ble vasket

med metylenklorid (2 x 25 ml). pH til den vandige oppløsningen ble justert til pH 2,0 med 1 N HCl. Presipitatet ble isolert ved filtrering, vasket med vann og tørket og ga 0,82 g (58%). Produktet represipiterte to ganger med metylenklorid/petroleumeter, 0,77 g (55%) etter tørking. Sm.p. 119°C (dekomp.). Analyse for $C_{24}H_{29}N_7O_7$ funnet (beregnet) C: 53,32(52,84), H: 5,71(5,73), N: 17,68(17,97). FAB-MS. 528,5 (MH⁺). ¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆). 12,75 (meget b, 1H, CO₂H), 10,65 (b. s, 1H, ZNH), 8,59 (d, 1H, J= 2,14 Hz, Ade H-2), 8,31 (s, 1H, Ade H-8), 7,49-7,31 (m, 5H, Ph), 7,03 & 6,75 (uopp. t, 1H, BocNH), 5,33 & 5,16 (s, 2H, CH₂CON), 5,22 (s, 2H, PhCH₂), 4,34-3,99 (s, 2H, CH₂CO₂H), 3,54-3,03 (m's innbefatter vann, CH₂CH₂) og 1,39 & 1,37 (s, 9H, ^tBu). ¹³C-NMR. 170,4, 166,6, 152,3, 151,5, 149,5, 145,2, 128,5, 128,0, 127,9, 66,32, 47,63, 47,03, 43,87 og 28,24.

Eksempel 32.

2-Amino-6-klor-9-karboksymetylpurin

Til en suspensjon av 2-amino-6-klorfurin (5,02 g, 29,6 mmol) og kaliumkarbonat (12,91 g, 93,5 mmol) i DMF (50 ml) ble det tilsatt bromeddiksyre (4,70 g, 22,8 mmol). Blandingen ble omfattende omrørt i 20 t. under nitrogen. Vann (150 ml) ble tilsatt og oppløsningen ble filtrert gjennom selit til en klar gul oppløsning. Oppløsningen ble surgjort til pH på 3 med 4 N saltsyre. Presipitatet ble filtrert og tørket i vakum over sikapent. Utbytte 3,02 g, 44,8 %. ¹H-NMR(DMSO-d₆): d = 4,88 ppm (s, 2H), 6,95 (s, 2H), 8,10 (s, 1H).

Eksempel 33.

2-Amino-6-benzyloksy-9-karboksymetylpurin

Natrium (2,0 g, 87,0 mmol) ble løst opp i benzyloksy-9-karboksymetylpurin (20 ml) og oppvarmet til 130°C i 2 t. Etter avkjøling til 0°C

ble en oppløsning av 2-amino-6-klor-9-karboksymetyl-purin (4,05 g, 18,0 mmol) i DMF (85 ml) sakte tilsatt og den resulterende suspensjonen ble omrørt over natt ved 20°C. Natriumhydroksidoppløsningen (1N, 100 ml) ble tilsatt og den
 5 klare oppløsningen ble vasket med etylasetat (3 x 100 ml). Vannfasen ble deretter surgjort til en pH på 3 med 4 N saltsyre. Presipitatet ble tatt opp i etylasetat (200 ml) og vannfasen ble ekstrahert med etylasetat (2 x 100 ml). De kombinerte organiske fasene ble vasket med mettet natrium-
 10 kloridoppløsning (2 x 75 ml), tørket med vannfri natriumsulfat og avdampet til tørrhet i vakum. Resten ble omkrystallisert fra etanol (300 ml). Utbytte etter tørking i vakum over sikapent: 2,76 g (52%). Sm.p. 159-65°C. Analyse (beregnet, funnet) C(56,18, 55,97), H(4,38, 4,32), N(23,4, 23,10). ¹H-NMR (DMSO-d₆): 4,82 ppm.(s,2H), 5,51 (s,2H), 6,45 (s,2H),
 15 7,45 (m,5H), 7,82 (s,1H).

Eksempel 34.

20 N-[2.Amino-6-benzyloksy-purin-9-yl]-acetyl)-N-(2-Boc-aminoetyl)-glysin [BocGaeg-OH monomer]

2-Amino-6-benzyloksy-9-karboksymetyl-purin (0,50 g, 1,67 mmol), metyl-N(2-[tert-butoksykarbonylamino]etyl)-glysinat
 25 (0,65 g, 2,80 mmol), diisopropyletylamin (0,54 g, 4,19 mmol), og bromo-tris-pyrrolidino-fosfonium-heksafluorofosfat IPyBroP®) (0,798 g, 1,71 mmol) ble omrørt i DMF (2 ml) i 4 t. Den klare oppløsningen ble helt inn i en is-avkjølt oppløsning av natriumhydrogenkarbonat (1 N, 40 ml) og ekstrahert
 30 med etylasetat (3 x 40 ml). Det organiske laget ble vasket med kaliumhydrogensulfatoppløsning (1 N, 2 x 40 ml), natriumhydrogenkarbonat (1 N, 1 x 40 ml) og mettet natriumkloridoppløsning (60 ml). Etter tørking med vannfri natriumsulfat og avdampning i vakum ble den faste resten
 35 omkrystallisert fra etylasetat/heksan (20 ml (2:1)) for å tilveiebringe metylesteren i 63% utbytte (MS-FAB 514 (M+1)). Hydrolyse ble oppnådd ved oppløsning av esteren i etanol/vann

(30 ml (1:2)) inneholdende kons. natriumhydroksid (1 ml). Etter omrøring i 2 t. ble oppløsningen filtrert og surgjort til en pH på 3 ved tilsetning av 4 N saltsyre. Tittelforbindelsen ble oppnådd ved filtrering. Utbytte: 370 mg (72% for hydrolyse). Renhet ifølge HPLC var høyere enn 99%. På grunn av begrenset rotasjon rundt det sekundære amidet var flere av signalene koblet i forholdet 2:1 (indikert i listen med mj. for major og mi. for minor). $^1\text{H-NMR}$ (250, MHz, DMSO-d_6): δ = 1,4 ppm. (s, 9H), 3,2 (m, 2H), 3,6 (m, 2H), 4,1 (s, mj., $\text{CONRCH}_2\text{COOH}$), 4,4 (s, mi., $\text{CONRCH}_2\text{COOH}$), 5,0 (s, mi., $\text{Gua-CH}_2\text{CO-}$), 5,2 (s, mj., $\text{Gua-CH}_2\text{CO}$), 5,6 (s, 2H), 6,5 (s, 2H), 6,9 (m, mi., BocNH), 7,1 (m, mj., BocNH), 7,5 (m., 3H), 7,8 (s, 1H), 12,8 (s, 1H). $^{13}\text{C-NMR}$. 170,95, 170,52, 167,29, 166,85, 160,03, 159,78, 155,84, 154,87, 140,63, 136,76, 128,49, 128,10, 113,04, 78,19, 77,86, 66, 95, 49,22, 47,70, 46,94, 45,96, 43,62, 43,31 og 28,25.

Eksempel 35.

3-Boc-amino-1,2-propandiol

3-Amino-1,2-propandiol (40,00 g, 0,440 mol, 1,0 ekv.) ble løst opp i vann (1000 ml) og avkjølt til 0°C . Di-tert-butylidikarbonat (115,0 g, 0,526 mol, 1,2 ekv.) ble tilsatt i en porsjon. Reaksjonsblandingen ble oppvarmet ved romtemperatur på et vannbad iløpet av omrøringen. pH ble opprettholdt ved 10,5 med en oppløsning av natriumhydroksid (17,56 g, 0,440 mol, 1,0 ekv.) i vann (120 ml). Når tilsetningen av vanndig natriumhydroksid var fullført ble reaksjonsblandingen omrørt over natt ved romtemperatur. Deretter ble etylasetat (750 ml) tilsatt til reaksjonsblandingen etterfulgt av avkjøling til 0°C . pH ble justert til 2,5 med 4 N svovelsyre med omfattende omrøring. Fasene ble separert og vannfasen ble vasket med ytterligere etylasetat (6x350 ml). Volumet av den organiske fasen ble redusert til 900 ml ved avdampning under redusert trykk. Den organiske fasen ble deretter vasket med en mettet vanndig oppløsning av kaliumhydrogensul-

fat fortynnet til to ganger av dens volum (1x1000 ml) og med mettet vanndig natriumklorid (1x500 ml). Den organiske fasen ble tørket (MgSO_4) og avdampet under redusert trykk til 50,12 g (60%) av tittelforbindelsen. Produktet kunne stivne ved
5 avdampning fra metylenklorid og påfølgende frysing. ^1H -NMR (CDCl_3/TMS): δ = 1,43 (s, 9H, Me_3C), 3,25 (m, 2H, CH_2), 3,57 (m, 2H, CH_2), 3,73 (m, 1H, CH). ^{13}C -NMR (CDCl_3/TMS): δ = 28,2 (Me_3C), 42,6 (CH_2), 63,5 71,1 (CH_2OH , CHOH), 79,5 (Me_3C), 157,0 ($\text{C}=\text{O}$).

10

Eksempel 36.

2-(Boc-amino)etyl-L-alaninmetylester

15 3-Boc-amino-1,2-propandiol (20,76 g, 0,109 mol, 1 ekv.) ble suspendert i vann (150 ml). Kalium m-periodat (24,97 g, 0,109 mol, 1 ekv.) ble tilsatt og reaksjonsblandingen ble omrørt i 2 t. ved romtemperatur under nitrogen. Reaksjons-
blandingen ble filtrert og vannfasen ble ekstrahert med
20 kloroform (6x250 ml). Den organiske fasen ble tørket (MgSO_4) og avdampet til et nesten kvantitativt utbytte av Boc-aminoasetaldehyd som en fargeløs olje som ble anvendt uten ytterligere rensing i følgende prosedyre.

Palladium-på-karbon (10%, 0,8 g) ble tilsatt til MeOH (250
25 ml) under nitrogen med avkjøling (0°C) og omfattende omrøring. Vannfri natriumasetat (4,49 g, 54,7 mmol, 2 ekv.) og L-alaninmetylester, hydroklorid (3,82 g, 27,4 mmol, 1 ekv.) ble tilsatt. Boc-aminoasetaldehyd (4,79 g, 30,1 mmol, 1,1 ekv.) ble løst opp i MeOH (150 ml) og tilsatt til
30 reaksjonsblandingen. Reaksjonsblandingen ble hydrert ved atmosfærisk trykk og romtemperatur helt til hydrogenopptaket var opphørt. Reaksjonsblandingen ble filtrert gjennom selit som var vasket med ytterligere MeOH. MeOH ble fjernet under redusert trykk. Resten ble suspendert i vann (150 ml) og pH
35 justert til 8,0 ved dråpevis tilsetning av 0,5 N NaOH med omfattende omrøring. Vannfasen ble ekstrahert med metylenklorid (4x250 ml). Den organiske fasen ble tørket (MgSO_4),

filtrert gjennom selit og avdampet under redusert trykk for å tilveiebringe 6,36 g (94%) av tittelforbindelsen som en klar, noe gul olje. MS (FAB-MS): m/z (%) = 247 (100, M+1, 191 (90), 147 (18). $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3). 1,18 (d, $J=7,0$ Hz, 3H, Me), 1,36 (s, 9H, Me_3C), 1,89 (b, 1H, NH), 2,51 (m, 1H, CH_2), 2,66 (m, 1H, CH_2), 3,10 (m, sH, CH_2), 3,27 (q, $J=7,0$ Hz, 1H, CH), 3,64 (s, 3H, OMe), 5,06 (b, 1H, karbamat NH). $^{13}\text{V-NMR}$. δ = 18,8 (Me), 28,2 (Me_3C), 40,1, 47,0 (CH_2), 51,6 (OMe), 56,0 (CH), 155,8 (karbamat C=O), 175,8 (ester C=O).

Eksempel 37.

N-(Boc-aminoetyl)-N-(1-thyminyllacetyl)-L-alaninmetylester

Til en oppløsning av Boc-aminoetyl-(1)-alaninmetylester (1,23g, 5,0 mmol) i DMF (10 ml) ble det tilsatt Dhbt-OH (0,90 g, 5,52 mmol) og 1-thyminylleddiksyre (1,01 g, 5,48 mmol). Når 1-thyminylleddiksyre ble oppløst, ble diklormetan (10 ml) tilsatt og oppløsningen ble avkjølt på et isbad. Etterat reaksjonsblandingen hadde nådd 0°C ble DCC (1,24 g, 6,01 mmol) tilsatt. Iløpet av 5 min. etter tilsetningen fremkom et presipitat av DCU. Etter ytterligere 5 min. ble isbadet fjernet. To timer senere viste TLC analyse at reaksjonen var ferdig. Blandingen ble filtrert og presipitatet vasket med diklormetan (100 ml). Den resulterende oppløsningen ble ekstrahert to ganger med 5% natriumhydrogenkarbonat (150 ml) og to ganger med mettet kaliumhydrogensulfat (25 ml) i vann (100 ml). Etter en endelig ekstrahering med mettet natriumklorid (150 ml) ble oppløsningen tørket med magnesiumsulfat og avdampet til et hvitt skum. Skummet ble rensset ved kolonnekromatografi på silikagel ved anvendelse av diklormetan med en metanolgradient som elueringsmiddel. Dette ga en ren forbindelse (>99% ved HPLC) (1,08 g, 52,4 %). FAB-MS: 413 (M+1) og 431 (M+1 + vann). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 4,52 (s, 2H, CH_2), 3,73 (s, 3H, OMe), 3,2-3,6 (m, 4H, etyl CH_2 's), 1,90 (s, 3H, Me i T), 1,49 (d, 3H, Me i ala, $J=7,3$ Hz), 1,44 (s, 9H, Boc).

Eksempel 38.

N-(Boc-aminoetyl)-N-(1-thyminyllacetyl)-L-alanin

5

Metylesteren til tittelforbindelsen (2,07 g, 5,02 mmol) ble løst opp i metanol (100 ml) og avkjølt på et isbad. 2 M natriumhydroksid (100 ml) ble tilsatt. Etter omrøring i 10 min. ble pH til blandingen justert til 3 med 4 M hydrogenklorid. Oppløsningen ble deretter ekstrahert med etylasetat (3 x 100 ml). De kombinerte organiske ekstraktene ble tørket over magnesiumsulfat. Etter avdampning ble det resulterende skummet oppløst i etylasetat (400 ml) og noen få ml metanol for å oppløse det faste materialet. Petroleumeter ble deretter tilsatt helt presipiteringen begynte. Etter henstand over natt ved -20°C ble presipitatet fjernet ved filtrering. Dette ga 1,01 g (50,5 %) ren forbindelse (>99% ved HPLC). Forbindelsen kan bli omkrystallisert fra 2-propanol. FAB-MS: 399 (M+1). ¹H-NMR (DMSO-d₆): 11,35 (s, 1H, COO), 7,42 (s, 1H, H'₆), 4,69 (s, 2 H, CH'₂), 1,83 (s, 3 H, Me i T), 1,50-1,40 (m, 12 H, Me i Ala + Boc).

20

Eksempel 39.

(a) N-(Boc-aminoetyl)-N-(1-thyminyllacetyl)-D-alaninmetylester

25

Til en oppløsning av Boc-aminoetylalaninmetylester (2,48 g, 10,1 mmol) i DMF (20 ml) ble det tilsatt Dhbt-OH (1,80 g, 11,0 mmol) og thyminyldiksyre (2,14 g, 11,6 mmol). Etter oppløsning av 1-thyminyldiksyre ble metylenklorid (20 ml) tilsatt og oppløsningen avkjølt på et isbad. Når reaksjonsblandingen hadde nådd 0°C ble DCC (2,88 g, 14,0 mmol) tilsatt. Iløpet av 5 min. etter tilsetningen fremkom et presipitat av DCU. Etter 35 min. ble isbadet fjernet. Reaksjonsblandingen ble filtrert 3,5 t. senere og presipitatet ble vasket med metylenklorid (200 ml). Den resulterende

30

35

oppløsningen ble ekstrahert to ganger med 5% natriumhydrogenkarbonat (200 ml) og to ganger med mettet kaliumhydrogensulfat i vann (100 ml). Etter en endelig ekstrahering med mettet natriumklorid (250 ml) ble oppløsningen tørket med
5 magnesiumsulfat og avdampet til en olje. Oljen ble renset ved hjelp av kort kolonne silikagelkromatografi ved anvendelse av metylenklorid med en metanolgradient som elueringsmiddel. Dette ga en forbindelse som var 96% ren ifølge HPLC (1,05 g, 25,3 %) etter presipitering med
10 petroleumeter. FAB-MS: 413 (M+1). ¹H-NMR (CDCl₃): 5,64 (t, 1 H, BocNH, J=5,89 Hz), 4,56 (d, 2 H, CH'₂), 4,35 (q, 1 H, CH i Ala, J=7,25 Hz), 3,74 (s, 3 H, OMe), 3,64-3,27 (m, 4 H, etyl H's), 1,90 (s, 3 H, Me i T), 1,52-1,44 (t, 12 H, Boc-Me i Ala).

15

(b) N-(Boc-aminoetyl)-N-(1-thyminylacetyl)-D-alanin

Metylesteren av tittelforbindelsen (1,57 g, 3,81 mmol) ble løst opp i metanol (100 ml) og avkjølt på et isbad.
20 Natriumhydroksid (100 ml, 2 M) ble tilsatt. Etter omrøring i 10 min. ble pH til blandingen justert til 3 med 4 M hydrogenklorid. Oppløsningen ble deretter ekstrahert med etylasetat (3 x 100 ml). De kombinerte organiske ekstraktene ble tørket over magnesiumsulfat. Etter avdampning ble oljen løst opp i
25 etylasetat (200 ml). Petroleumeter ble tilsatt (til et totalvolum på 600 ml) helt til presipiteringen begynte. Etter henstand over natt ved -20°C ble presipitatet fjernet ved filtrering. Dette 1,02 g (67,3 %) av tittelforbindelsen som var 94% ren ifølge HPLC. (FAB-MS: (M+!). ¹H-NMR: 11,34
30 (s, 1 H, COOH), 7,42 (s, 1 H, H'₆), 4,69 (s, 2 H, CH'₂), 4,40 (q, 1 H, CH i Ala, J=7,20 Hz), 1,83 (s, 3 H, Me i T), 1,52-1,40 (m, 12 H, Boc + Me i Ala).

35

Eksempel 40.

N-(N'Boc-3'-aminopropyl)-N-[(1-tymilyl)acetyl]glysinmetylester

N-(N'-Boc-3'-aminopropyl)glysinmetylester (2,84 g, 0,0115 mol) ble løst opp i DMF (35 ml) etterfulgt av tilsetning av DhbtOH (2,07 g, 0,0127 mol) og 1-thyminyldiksyre (2,34 g, 0,0127 mol). Metylenklorid (35 ml) ble tilsatt og blandingen avkjølt til 0°C på et isbad. Etter tilsetning av DCC (2,85 g, 0,0138 mol) ble blandingen omrørt ved 0°C i 2 t., etterfulgt av 1 t. ved romtemperatur. Presipitert DCU ble fjernet ved filtrering, vasket med metylenklorid (25 ml) og en ytteligere mengde metylenklorid (150 ml) ble tilsatt til filtratet. Den organiske fasen ble ekstrahert med natriumhydrogenkarbonat (1 volum mettet fortynnet med 1 volum vann, 6 x 250 ml), kaliumsulfat (1 volum mettet fortynnet med 4 volum vann, 3 x 250 ml) og mettet vanndig natriumklorid (1 x 250 ml), tørket over magnesiumsulfat og avdampet til tørrhet i vakum. Den faste resten ble suspendert i metylenklorid (35 ml) og omrørt i 1 t. Presipitert DCU ble fjernet ved filtrering og vasket med metylenklorid (25 ml). Filtratet ble avdampet til tørrhet i vakum og resten renses ved kolonnekromatografi på silikagel, eluerende med en blanding av metanol og metylenklorid (gradient fra 3-7% metanol i metylenklorid). Dette ga tittelforbindelsen som et hvitt fast stoff (3,05 g, 64%). Sm.p. 76-79°C (decomp.) Analyse for C₁₈H₂₈N₄O₇, funnet (beregnet) C: 52,03 (52,42) H: 6,90 (6,84) N: 13,21 (13,58). Forbindelsen viste tilfredsstillende ¹H og ¹³C-NMR spektere.

Eksempel 41.

N-(N'-Boc-3'-aminopropyl)-N-[(1-thyminyl)acetyl]glysin

N-(N'-Boc-3'-aminopropyl)-N-[(thyminyl)acetyl]glysinmetylester (3,02 g, 0,00732 mol) ble løst opp i metanol (25 ml) og omrørt i 1,5 t. med 2 M natriumhydroksid (25 ml). Metanol ble fjernet ved avdampning, i vakum, og pH justert til 2 med 4 M saltsyre ved 0°C. Produktet ble isolert som hvite krystaller ved filtrering, vasket med vann (3 x 10 ml) og

tørket over sikapent i vakum. Utbytte 2,19 g (75%). Analyse for $C^{17}H_{26}N_4O_7$, H₂O. funnet (beregnet) C: 49,95 (49,03) H: 6,47 (6,29) N: 13,43 (13,45). Forbindelsen viste tilfredsstillende 1H og ^{13}C -NMR spektre.

5

Eksempel 42.

3-(1-Thyminy1)-propansyremetylester

Thymin (14,0 g, 0,11 mol) ble suspendert i metanol. Metyl-
10 akrylat (39,6 ml, 0,44 mol) ble tilsatt sammen med katalyti-
ske mengder natriumhydroksid. Oppløsningen ble tilbakestrøm-
met i mørket i 45 t., avdampet til tørrhet, i vakum og
residiet ble løst opp i metanol (8 ml) med oppvarming. Etter
avkjøling på et isbad ble produktet presipitert ved til-
15 setning av eter (20 ml), isolert ved filtrering, vakset med
eter (3 x 15 ml) og tørket over sikapent i vakum. Utbytte
11,23 g (48%). Sm.p. 112-119°C. Analyse for $C_9H_{12}N_2O_4$,
funnet (beregnet) C: 51,14 (50,94) H: 5,78 (5,70) N:
11,52 (13,20). Forbindelsen viste tilfredsstillende 1H og
20 ^{13}C -NMR spektre.

Eksempel 43.

3-(1-Thyminy1)-propansyre

25

3-(1-Thyminy1)-propansyremetylester (1,0 g, 0,0047 mol) ble
suspendert i 2 M natriumhydroksid (15 ml) og kokt i 10 min.
pH ble justert til 0,3 med kons. saltsyre. Oppløsningen ble
ekstrahert med etylasetat (10 x 25 ml). Den organiske fasen
30 ble ekstrahert med mettet vanndig natriumklorid, tørket over
magnesiumsulfat og avdampet til tørrhet i vakum for å gi
tittelforbindelsen som et hvitt fast stoff (0,66 g, 71%).
Sm.p. 118-1221°C. Analyse for $C_8H_{10}N_2O_4$, funnet (beregnet)
C: 48,38 (48,49) H: 5,09 (5,09) N: 13,93 (14,14).
35 Forbindelsen viste tilfredsstillende 1H og ^{13}C -NMR spektre.

Eksempel 44.

N-(N'-Boc-aminoethyl)-N-[(1-thyminy)propanyl]glysinetylester

5 N-(N'-Boc-aminoethyl)glysinetylester (1,0 g, 0,0041 mol) løst opp i DMF (12 ml). DhbtOH (0,73 g, 0,0045 mol) og 3-(1-thyminy)propanoisk syre (0,89 g, 0,0045 mol) ble tilsatt. Metylenklorid (12 ml) ble deretter tilsatt og blandingen ble avkjølt til 0°C på et isbad. Etter tilsetning av DCC (1,01
10 g, 0,0049 mol) ble blandingen omrørt ved 0°C i 2 t. etterfulgt av 1 t. ved romtemperatur. Presipitert DCU ble fjernet ved filtrering, vasket med metylenklorid (25 ml) og en ytterligere mengde metylenklorid (50 ml) ble tilsatt til filtratet. Den organiske fasen ble ekstrahert med natrium-
15 hydrogenkarbonat (1 volum mettet fortynnet med 1 volum vann, 6 x 100 ml), kaliumsulfat (1 volum mettet fortynnet med 4 volum vann, 3 x 100 ml) og mettet vandig natriumklorid (1 x 100 ml), tørket over magnesiumsulfat og avdampet til tørrhet i vakum. Den faste resten ble suspendert i metylenklorid (15
20 ml) og omrørt i 1 t. Presipitert DCU ble fjernet ved filtrering og vasket med metylenklorid. Filtratet ble avdampet til tørrhet i vakum og resten ble rensset ved kolonnekromatografi på silikagel, eluerende med en blanding av metanol og metylenklorid (gradient fra 1 til 6% metanol i
25 metylenklorid). Dette ga tittelforbindelsen som et hvitt fast stoff (1,02 g, 59%). Analyse for C₁₉H₃₀N₄O₇, funnet (beregnet) C: 53,15 (53,51) H: 6,90 (7,09) N: 12,76 (13,13). Forbindelsen viste tilfredsstillende ¹H og ¹³C-NMR spektre.

30

Eksempel 45.

N-(N'-Boc-aminoethyl)-N-[(1-thyminy)propanyl]glysin

35 N-(N'-Boc-aminoethyl)-N-[(1-thyminy)propanyl]glysinetylester (0,83 g, 0,00195 mol) ble løst opp i metanol (25 ml. Natriumhydroksid (25 ml, 2 M) ble tilsatt. Oppløsningen ble

omrørt i 1 t. Metanol ble fjernet ved avdampning i vakum og pH ble justert til 2 med 4 M saltsyre ved 0°C. Produktet ble isolert ved filtrering, vasket med eter (3 x 15 ml) og tørket over sikapent i vakum. Utbytte 0,769 g, 99%). Sm.p. 213°C (dekomp.).

Eksempel 46.

Mono-Boc-etylendiamin (2)

10

tert-Butyl-4-nitrofenylkarbonat (1) (10,0 g, 0,0418 mol) løst opp i DMF (50 ml) ble dråpevis tilsatt over en periode på 30 min. til en oppløsning av etyldiamin (27,9 ml, 0,418 mol) og DMF (50 ml) og omrørt over natt. Blandingen ble avdampet til tørrhet i vakum og den resulterende oljen ble løst opp i vann (250 ml). Etter avkjøling til 0°C ble pH justert til 3,5 med 4 M saltsyre. Oppløsningen ble deretter filtrert og ekstrahert med kloroform (3x250 ml). pH ble justert til 12 ved 0°C med 2 M natriumhydroksid og den vandige oppløsningen ble ekstrahert med metylenklorid (3x300 ml). Etter behandling med mettet vanndig natriumklorid (250 ml) ble metylkloridoppløsningen tørket over magnesiumsulfat. Etter filtrering ble oppløsningen avdampet til tørrhet i vakum og ga 4,22 g (63%) av produktet (olje). ¹H-NMR (90 MHz, CDCl₃), δ 1,44 (s, 9H), 2,87 (t, 2H), 3,1 (q, 2H), 5,62 (s, broad).

25

Eksempel 47.

(N-Boc-aminoetyl)-β-alaninmetylester, HCl

30

Mono-Boc-etylendiamin (2) (16,28 g, 0,102 mol) ble løst opp i asetonitril (400 ml) og metylakrylat (91,50 ml, 1,02 mol) ble overført til blandingen med asetonitril (200 ml). Oppløsningen ble tilbakestrømmet over natt under nitrogen i mørket for å unngå polymerisering av metylakrylat. Etter avdampning til tørrhet i vakum ble en blanding av vann og eter (200 + 200 ml) tilsatt og oppløsningen ble filtrert og omfattende

35

omrørt. Den vandige fasen ble ekstrahert en gang til med eter og deretter frysetørket for å tilveiebringe et gult fast stoff. Omkrystallisering fra etylasetat ga 13,09 g (46%) av tittelforbindelsen. Sm.p. 138-140°C. Analyse for C₁₁H₂₃N₂O-
 5 4Cl, funnet (beregnet) C: 46,49 (46,72) H: 8,38 (8,20) N: 9,83 (9,91) Cl: 12,45 (12,54). ¹H-NMR (90 MHz, DMSO-d₆): δ 1,39 (s, 9H), 2,9 (m, 8H), 3,64 (s, 3H).

Eksempel 48.

10

N-[(1-thyminyl)acetyl]-N'-Boc-aminoetyl-β-alaninmetylester

(N-Boc-amino-etyl)-β-alaninmetylester, HCl, (3) (2,0 g, 0,0071 mol) og 1-thyminyleddiksyrepentafluorfenylester (5)
 15 (2,828 g, 0,00812 mol) ble løst opp i DMF (50 ml). Trietylamin (1,12 ml, 0,00812 mol) ble tilsatt og blandingen omrørt over natt. Etter tilsetning av metylenklorid (200 ml) ble den organiske fasen ekstrahert med vanndig natriumhydrogenkarbonat (3x250 ml), halvmettet vanndig kaliumhydrogensulfat (3x250 ml) og mettet vanndig natriumklorid (250 ml) og tørket
 20 over magnesiumsulfat. filtrering og avdampning til tørrhet i vakum resulterte i 2,9 g (99%) utbytte (olje). ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): På grunn av begrenset rotasjon rundt det sekundære amidet har flere av signalene blitt doblet, δ 1,43
 25 (s, 9H), 1,88 (s, 3H), 2,63 (t, 1H), 2,74 (t, 1H), 3,25-3,55 (4xt, 8H), 3,65 (2xt, 2H), 3,66 (s, 1,5), 3,72 (s, 1,5), 4,61 (2, 1H), 4,72 (s, 2H), 5,59 (s, 0,5H), 5,96 (s, 0,5H), 7,11 (s, 1H), 10,33 (s, 1H).

30 Eksempel 49.

N-[(1-Thyminyl)acetyl]-N'-Boc-aminoetyl-β-alanin

N-[(1-Thyminyl)acetyl]-N'-Boc-aminoetyl-β-alaninmetylester
 35 (3,0 g, 0,0073 mol) ble løst i 2 M natriumhydroksid (30 ml), pH justert til 2 ved 0°C med 4 M saltsyre og oppløsningen ble omrørt i 2 t. Presipitatet ble isolert ved filtrering,

vasket tre ganger med kaldt vann og tørket over sikapent i vakum. Utbytte 2,23 g (77%). Sm.p. 170-176°C. Analyse for $C_{17}H_{26}N_4O_7$, H_2O , funnet (beregnet) C: 49,49 (49,03), H: 6,31 (6,78) N: 13,84 (13,45). 1H -NMR (90 MHz, $DMSO-d_6$): δ 1,38 (s, 9H), 1,76 (s, 3H), 2,44 og 3,29 (m, 8H), 4,55 (s, 2H), 7,3 (s, 1H), 11,23 (s, 1H). FAB-MS: 399 (M+1).

Eksempel 50.

N-[(1-(N⁴-Z)-sytyosyl(acetyl)]-N'-Boc-aminoetyl- β -alanin-metylester

(N-Boc-amino-etyl)- β -alaninmetylester, HCl (3) (2,0 g, 0,0071 mol) og 1-(N-4-Z)-sytyosyleddiksyrepentafluorfenylester (5) (3,319 g, 0,0071 mol) ble løst opp i DMF (50 ml). Trietylamin (0,99 ml, 0,0071 mol) ble tilsatt og blandingen omrørt over natt. Etter tilsetning av metylenklorid (200 ml) ble den organiske fasen ekstrahert med vanndig natriumhydrogenkarbonat (3x250 ml), halvmettet vanndig kaliumhydrogensulfat (3x250 ml) og mettet vanndig natriumklorid (250 ml) og tørket over magnesiumsulfat. Filtrering og avdampning til tørrhet i vakum resulterte i 3,36 g fast forbindelse som ble omkrystallisert fra metanol. Utbytte 2,42 g (64%). Sm.p. 158-161°C. Analyse for $C_{25}H_{33}N_5O_8$, funnet (beregnet) C: 55,19 (56,49) H: 6,19 (6,26) N: 12,86 (13,18). 1H -NMR (250 MHz, $CDCl_3$): På grunn av begrenset rotasjon rundt det sekundære amidet var flere av signalene doblet. δ 1,43 (s, 9H), 2,57 (t, 1H), 3,60-3,23 (m's, 6H), 3,60 (s, 1,5H), 3,66 (s, 1,5H), 4,80 (s, 1H), 4,88 (s, 1H), 5,20 (s, 2H), 7,80-7,25 (m's, 7H). FAB-MS: 532 (M+1).

Eksempel 51.

N-[(1-(N⁴-Z)-sytyosyl)acetyl]-N'-Boc-aminoetyl- β -alanin

N-[(1--(N-4-Z)-sytyosyl)acetyl]-N'-Boc-aminoetyl- β -alanin-metylester (0,621 g, 0,0012 mol) ble løst opp i 2 M natrium-

hydroksid (8,5 ml) og omrørt i 2 t. Deretter ble pH justert til 2 ved 0°C med 4 M saltsyre og oppløsningen ble omrørt i 2 t. Presipitatet ble isolert ved filtrering, vasket 3 ganger med kaldt vann og tørket over sikapent i vakum. Utbytte
 5 0,326 g (54%). Det hvite fast stoffet ble omkrystallisert fra 2-propanol og vasket med petroleumeter. Sm.p. 163°C (dekomp.). analyse for $C_{24}H_{31}N_5O_8$, funnet (beregnet) C: 49,49 (49,03) H: 6,31 (6,78) N: 13,84 (13,45). 1H -NMR (250 MHz, $CDCl_3$): På grunn av begrenset rotasjon det sekundære
 10 amidet var flere av signalene doble, δ 1,40 (s, 9H), 2,57 (t, 1H), 2,65 (t, 1H), 3,60-3,32 (m's, 6H), 4,85 (s, 1H), 4,98 (s, 1H), 5,21 (s, 2H), 5,71 (s, 1H, broad), 7,99-7,25 (m's, 7H). FAB-MS: 518 (M+1).

15 Eksempel 52.

Eksempel på en PNA-oligomer med et guaninresidie

(a) Fast-fase syntese av H-[Taeg]₅-[Gaeg]-[Taeg]₄-Lys-NH₂

20

Beskyttet PNA ble oppstilt på en Boc-Lys(ClZ) modifisert MBHA harpiks med en substitusjon på omtrent 0,15 mmol/g (bestemt ved kvantitativ ninhydrinreaksjon). Capping av ukoblede aminogru-
 25 pper ble bare utført før innkorporering av BocGaeg-OH monomeren.

(b) Trinnvis oppstilling av H-[Taeg]₅-[Gaeg]-[Taeg]₄-Lys-NH₂ (syntese protokoll)

30 Syntesen ble initiert på 102 mg (tørrvekt) forsvellet (over natt i DCM) og nøytralisert Boc-Lys(ClZ)-MBHA harpiks. Trinnene som ble utført var som følger: (1) Boc-avspaltning med TFA/DCM (1:1, v/v), 1 x 2 min. og 1 x 1/2 t., 3 ml, (2) vasking med DCM, 4 x 20 sek., 3 ml, vasking med DMF, 2 x 20
 35 sek., 3 ml, vasking med DCM 2 x 20 sek., 3 ml. og avrenning i 30 sek., (3) nøytralisering med DIEM/DCM (1:19 v/v), 2 x 3 min., 3 ml. (4) vasking med DCM, 4 x 20 sek., 3 ml og

avrenning i 1 min., (5) tilsetning av 4 ekv. diisopropylkarbodiimid (0,06 mmol, 9,7 µl) og 4 ekv. (0,06 mmol, 24 mg) BocTaeg-OH eller (0,06 mmol, 30 mg) BocGaeg-OH løst opp i 0,6 ml DCM/DMF (1:1, v/v) (sluttkonsentrasjon av monomer 0,1 M), og koblingsreaksjonen ble latt gå i 1/2 t. med risting ved romtemperatur, (6) suget ble påført i 20 sekunder (7) vasking med DMF, 2 x 20 sek. og 1 x 2 min., 3 ml, vasking med DCM 4 x 20 sek., 3 ml, (8) nøytralisering med DIEA/DCM (1:19 v/v), 2 x 3 min., 3 ml, (9) vasking med DCM 4 x 20 sek., 3 ml og avrenning i 1 min., (10) kvalitativ Kaiser test, (11) blokkering av ureagerede aminogrupper ved acetylering med Ac₂O/pyridin/DCM (1:1:2, v/v), 1 x 1/2 t., 3 ml, og (12) vasking med DCM, 4 x 20 sek., 2 x 2 min. og 2 x 20 sek., 3 ml. Trinnene 1-12 ble gjentatt helt til den ønskede sekvensen ble oppnådd. Alle kvalitative Kaiser testene var negative (strå-gul farge uten farging av kulene) indikerte nesten 100% koblingsutbytte. PNA-oligomeren ble spaltet og renses ved hjelp av normalprosedyren. FAB-MS: 2832,11 [M⁺+1] (beregn. 2832,15).

20

Eksempel 53.

Fast-fase syntese av H-TAEG-Aaeg-[Taeg]₈-Lys-NH₂

(a) Trinnvis oppstilling av Boc-Taeg-A(Z)aeg-[Taeg]₈-Lys(ClZ)-MBHA harpiks.

Omtrent 0,3 g våt Boc-[Taeg]₈-Lys(ClZ)-MBHA harpiks ble plassert i en 3 ml SPPS reaksjonsbeholder. BocTaeg-A(Z)aeg-[Taeg]₈-Lys(ClZ)-MBHA harpiks ble oppstilt ved in situ DCC kobling (enkel) av A(Z)aeg residiet ved anvendelse av 0,19 M BocA(Z)aeg-OH sammen med 0,15 M DCC i 2,5 ml 50% DMF/CH₂Cl₂ og en enkelt kobling med 0,15 M BocTaeg-OPfp i hver CH₂Cl₂ ("Syntese Protokoll 5"). Syntesen ble registrert ved kvantitativ ninhydrinreaksjon som viste omtrent 50% inkorporering av A(Z)aeg og omtrent 96% inkorporering av Taeg.

(b) Spaltning, rensing og identifikasjon av H-Taeg-Aaeg-[Taeg]₈-Lys-NH₂.

Beskyttet Boc-Taeg-A(Z)aeg-[Taeg]₈-Lys(ClZ)-BAH harpiks ble
5 behandlet som beskrevet i eksempel 40c for å tilveiebringe
omtrent 15,6 g råmateriale ved HF spaltning av 53,1 mg tørr
H-Taeg-A(Z)aeg-[Taeg]₈-Lys(ClZ)-BHA harpiks. Hovedtoppen ved
14,4 min. utgjorde mindre enn 50% av den totale absorpsjonen.
En 0,5 mg del av råproduktet ble renseset til omtrent 0,1 mg H-
10 Taeg-Aaeg-[Taeg]₈-Lys-NH₂. For (MH)⁺ var den beregnede m/z
verdien 1816,16 og den målte m/z verdien var 1816,28.

(c) Synteseprotokoll 5.

15 (1) Boc-avspaltningen med TFA/CH₂Cl₂ (1:1, v/v), 2,5 ml, 3 x
1 min. og 1 x 30 min., (2) vasking med CH₂Cl₂, 2,5 ml, 6 x 1
min., (3) nøytralisering med DIEA/CH₂Cl₂ (1: 19, v/v), 2,5
ml, 3 x 2 min., (4) vasking med CH₂Cl₂, 2,5 ml, 6 x 1 min.,
og avrenning i 1 min., (5) 2-5 mg prøve PNA harpiks ble tatt
20 ut og grundig tørket for en kvantitativ ninhydrinanalyse for
å bestemme substitusjon, (6) tilsetning av 0,47 mmol (0,25 g)
BocA(Z)aeg-OH løst opp i 1,25 ml DMF etterfulgt av tilsetning
av 0,47 mmol (0,1 g) DCC i 1,25 ml CH₂Cl₂, eller 0,36 mmol
(0,20 g) BocTaeg-OPfp i 2,5 ml CH₂Cl₂, koblingsreaksjonen ble
25 utført med totalt 20-24 t. risting, (7) vasking med DMF, 2,5
ml, 1 x 2 min., (8) vasking med CH₂Cl₂, 2,5 ml, 4 x 1 min.,
(9) nøytralisering med DIEA/CH₂Cl₂ (1: 19, v/v), 2,5 ml, 2 x
2 min., (10) vasking med CH₂Cl₂, 2,5 ml, 6 x 1 min., (11) 2-5
mg prøve av beskyttet PNA-harpiks blir tatt ut og grundig
30 tørket for en kvantitativ ninhydrinanalyse for å bestemme
koblinggraden, (12) blokkering av ureagerede aminogrupper ved
acetylering med en 25 ml blanding av eddiksyreanhydrid/
pyridin/CH₂Cl₂ (1:1:2, v/v/v) i 2 t. (unntatt etter siste
syklus) og (13) vasking med CH₂Cl₂, 2,5 ml, 6 x 1 min., (14)
35 2 x 2-5 mg prøver av beskyttet PNA-harpiks blir tatt ut,
nøytralisert med DIEA/CH₂Cl₂ (1: 19, v/v), og vasket med
CH₂Cl₂ for ninhydrinanalyser.

Eksempel 54.

Fast-fase syntese av H-[Taeg]₂-Aaeg-[Taeg]₅-Lys-NH₂

(a) Trinnvis oppstilling av Boc-[Taeg]₂-A(Z)aeg-[Taeg]₅-Lys(ClZ)-MBHA harpiks.

Omtrent 0,5 g våt Boc[Taeg]₅-Lys(VlZ)-MBHA harpiks ble plassert i en 5 ml SPPS reaksjonsbeholder. Boc-[Taeg]₂-A(Z)aeg-[Taeg]₅-Lys(ClZ)-MBHA harpik ble oppstilt ved in situ DCC kobling av både av A(Z)aeg og Taeg residier ved anvendelse 0,15 M til 0,2 M beskyttet PNA monomer (fri syre) sammen med en ekvivalent mengde DCC i 2 ml bar CH₂Cl₂ ("Syntese Protokoll 6"). Syntesen ble registrert ved den kvantitative ninhydrinreaksjonen som viste en total omtrent 82% inkorporering av A(Z)aeg etter kobling tre ganger (den første koblingen ga omtrent 50% inkorporering, en fjerde HOBt-formidlet kobling i 50% DMF/CH₂Cl₂ økte ikke det totale koblingsutbyttet og kvantitativ inkorporering (enkeltkoblinger) av Taeg residiene.

(b) Spaltning, rensing og identifikasjon av H-[Taeg]₂-Aaeg-[Taeg]₅-Lys-NH₂.

Den beskyttede Boc-[Taeg]₂-A(Z)aeg-[Taeg]₅-Lys(ClZ)-BHA harpiksen ble behandlet som beskrevet i eksempel 40c for å tilveiebringe omtrent 16,2 mg råmateriale ved HF spaltning av 102,5 mg tørr H-[Taeg]₂-A(Z)aeg-[Taeg]₅-Lys(ClZ)-BHA harpiks. En liten del av råproduktet ble renset. For (MH⁺)⁺ var den beregnede m/z verdien 2050,85 og den målte m/z verdien var 2050,90.

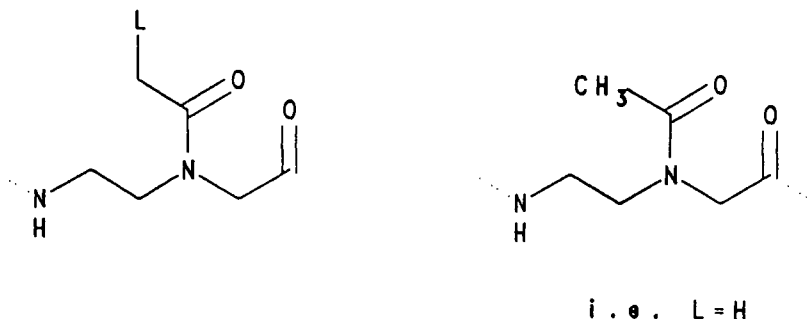
(c) Synteseprotokoll 6.

(1) Boc-avspaltning med TFA/CH₂Cl₂ (1:1, v/v), 2 ml, 3 x 1 min., og 1 x 30 min., (2) vasking med CH₂Cl₂, 2 ml, 6 x 1 min., (3) nøytralisering med DIEA/CH₂Cl₂ (1: 19, v/v), 2 ml,

3 x 2 min., (4) vasking med CH_2Cl_2 , 2 ml, 6 x 1 min., og avrenning i 1 min., (5) 2-5 mg prøve PNA-harpik ble tatt ut og grundig tørket for en kvantitativ ninhydrinanalyse for å bestemme substitusjon, (6) tilsetning av 0,44 mmol (0,23 g) BocA(Z)aeg-OH løst opp i 1,5 ml CH_2Cl_2 etterfulgt av tilsetning av 0,44 mmol (0,09 g) DCC i 0,5 ml CH_2Cl_2 eller 0,33 mmol (0,13 g) BocTaeg-OH i 1,5 ml CH_2Cl_2 etterfulgt av tilsetning av 0,33 mmol (0,07 g) DCC i 0,5 ml CH_2Cl_2 , koblingsreaksjonen ble kjørt i totalt 20-24 t. med risting, (7) vaskin med DMF, 2 ml, 1 x 2 min., (8) vaskin med CH_2Cl_2 , 2 ml, 4 x 1 min., (9) nøytralisering med DIEA/ CH_2Cl_2 (1: 19, v/v), 2 ml, 2 x 2 min., (10) vasking med CH_2Cl_2 , 2 ml, 6 x 1 min., (11) 2-5 mg prøve av beskyttet PNA-harpiks ble tatt ut og grundig tørket for en kvantitativ ninhydrinanalyse for å bestemme koblingsgraden, (12) blokkering av ureagerte aminogrupeer ved acetylering med en 25 ml blanding av eddiksyreanhydrid/pyridin/ CH_2Cl_2 (1:1:2, v/v/v) i 2 t. (unntatt etter siste syklus), (13) vasking med CH_2Cl_2 , 2 ml, 6 x 1 min., og (14) 2 x 2-5 mg prøver av beskyttet PNA-harpiks ble tatt ut, nøytralisert med DIEA/ CH_2Cl_2 (1: 19, v/v) og vasket med CH_2Cl_2 for ninhydrinanalyser.

Eksempel 55.

Eksempel med en "ingen base" substitusjon.



PNA	DNA	T _m
H-T ₁₀ -LysNH ₂	(dA) ₁₀	73°C
H-T ₄ (Ac)T ₅ -LysNH ₂	(dA) ₁₀	49°C
H-T ₄ (Ac)T ₅ -LysNH ₂	(dA) ₄ (dG)(dA) ₅	37°C
5 H-T ₄ (Ac)T ₅ -LysNH ₂	(dA) ₄ (dC)(dA) ₅	41°C
H-T ₄ (Ac)T ₅ -LysNH ₂	(dA) ₄ (dT)(dA) ₅	41°C
H-T ₄ (Ac)T ₅ -LysNH ₂	(dA) ₅ (dG)(dA) ₄	36°C
H-T ₄ (Ac)T ₅ -LysNH ₂	(dA) ₅ (dC)(dA) ₄	40°C
H-T ₄ (Ac)T ₅ -LysNH ₂	(dA) ₅ (dT)(dA) ₄	40°C

10

Det fremgår at sammenlignet med H-T₁₀-LysNH₂ resulterte erstatning av en thyminligand med H i et fall av T_m til 48°C fra 73°C. Effekten av også å introdusere en enkelt basefeilparing er også vist.

15

Visse biokjemiske/biologiske egenskaper til PNA oligomerene er illustrert i følgende eksperimenter.

20

1. Sekvensdiskriminering på dsDNA nivå (eksempel 63, figur 20).

25

30

Ved anvendelse av S₁-nuklease probeteknikken ble diskrimineringen av bindingen av T₁₀, T₅CT₄ (T₉C) & T₂CT₂CT₄ (T₈C₂) PNA til gjenkjenningsssekvensene A₁₀, A₅GA₄ (A₉G) & A₂GA₂GA₄ (A₈G₂) klonet inn i BamHI, Sall eller PstI sete av plasmid pUC19 analysert. Resultatene (figur 20) viser at de tre PNA blir bundet til deres respektive gjenkjenningsssekvenser med følgende relative effektiviteter: PNA T₁₀: A₁₀ > A₉G >> A₈G₂, PNA - T₉C: A₉G > A₁₀ >> A₈G₂. PNA - T₈C₂: A₈G₂ >- A₉G >> A₁₀. Ved 77°C gir derfor en feilparing ut av ti redusert effektivitet (vurdert til 5-10 ganger), mens to feilparinger er ikke akseptert.

35

2. Forflytting av et enkelttrådet DNA fra en ds-DNA ved hybridisering av PNA T₁₀/T₉C/T₈C₂ (figur 20) - eksempel 63.

3. Kinetikken til PNA-T₁₀ - dsDNA trådforflyttingskompleksdannelse (eksempel 64, figur 21).

5 Kompleksdannelsen ble probet av S₁-nuklease ved forskjellige tidspunkter etter blanding av PNA og ³²P-ende merket dsDNA fragment (fig. 21).

4. Stabiliteten til PNA-dsDNA komplekset (eksempel 65, figur 22).

10

Kompleksene mellom PNA-T_n og ³²P-dsDNA (A₁₀/T₁₀ mål ble dannet (60 min., 37°C). Kompleksene ble deretter inkubert ved ønsket temperatur i nærvær av overskudd oligo-dA₁₀ i 10 min., avkjølt til RT og probet med KMnO₄. Resultatene (figur 15 22) viser at den termiske stabiliteten til PNA-dsDNA kompleksene tilsvarer den til PNA oligonukleotidkompleksene med hensyn på "T_m".

5. Inhibisjon av restriksjonsenzymspaltningen til PNA 20 (eksempel 64, figur 23).

Plasmidkonstruksjonen, pT10, inneholder en dA₁₀/dT₁₀ trakt klonet inn i BamHI ssete i pUC19. Spaltning av pT10 med BamHI og PvuII resulterer i to små DNA fragmenter på 25 henholdsvis 211 og 111 bp. I nærvær av PNA-T₁₀, blir et 336 bp fragment oppnådd tilsvarende være spaltning med PvuII (fig. 23). Spaltning ved BamHI blir derfor inhibert av PNA binding proksimalt til restriksjonsenzymsetet. Resultatene viser også at PNA-dsDNA komplekset kan bli dannet i 100°C 30 utbytte. Lignende resultater ble oppnådd ved anvendelse av pT8C2 plasmidet og PNA-T8C2.

6. Binding av ¹²⁵I-merket PNA til oligonukleotider (eksempel 63, fig. 24).

35

Tyr-PNA-T₁₀-Lys-NH₂ ble merket med ¹²⁵I ved anvendelse av Na¹²⁵I og kloramin-T og rønset ved HPLV. ¹²⁵I-PNA-T₁₀ ble

vist å bli bundet til oligo-dA₁₀ ved PAGE og autordiografi (figur 24). Bindingen kunne bli konkurrert av denaturert kalvetymus DNA i overskudd.

5 I punkt (1) ovenfor blir den sekvens-spesifikke gjenkjenningen av dsDNA illustrert ved binding av en PNA, bestående av 10 thyminsubstituerte 2-aminoetylglusyl enheter som C-terminerer i et lysinamid og N-terminerer i et kompleks 9-aminoakridinligand (9-Acr¹-(Taeg)₁₀-Lys-NH₂, figurene 11a og
10 b) til en dA₁₀/dT₁₀ målsekvens. Målet er innbefattet i et 248 bp ³²P-ende-merket DNA-fragment.

Tårdforflyttingen ble bekreftet ved følgende type av eksperimenter:

15

1) 9-Acr¹ liganden (figur 5) som er utstyrt med en 4-nitrobensamidogruppe for å forsikre spaltning av DNA ved bestråling har ventet bare å spalte DNA i nærheten av dets bindingssete. Ved bestråling av PNA med ovennevnte 248 bp
20 DNA fragment blir selektiv spaltning ved dA₁₀/dT₁₀ sekvensen observert (figur 3a).

25

2) I en såkalt fotoavtrykksanalyse hvor et syntetisk diasokoblet akridin under bestråling spalter DNA ved interaksjon med DNA (med unntagelse av hvor DNA blir inkorporert av
nevnte bindingsforbindelse).

30

Et slikt eksperiment ble utført med ovennevnte 248 bp dsDNA fragment som viste en klar beskyttelse overfor fotospaltning av PNA bindingssetet (figur 3b).

35

(3) I et lignende eksperiment utviste DNA-spaltningensenzymet mikrokokkusnuklease, som også er hindret i dets virkning av de fleste DNA-bindende reagensene, økt spaltning ved T₁₀-målet (figur 3c).

4) I en annen eksperimenttype ble de velkjente med høy mottakelighet enkelttrådede thyminligandene (i forhold til dobbelttrådede thyminlegander) anvendt overfor kaliumpermananganatoksidering. Oksidering av 248 bp i nærvær av reagenset viste bare oksidering av T₁₀-tråden til målet (figur 3b).

5) I en lignende demonstrasjon viste den enkelttrådede spesifisiteten til S₁ nuklease at bare T₁₀-tråden til målet var angrepet (figur 3d).

10

Meget effektive bindinger av (Taeg)₁₀, (Taeg)₁₀-Lys-NH₂ og Acr¹-(Taeg)₁₀-Lys-NH₂ (figur 5) til tilsvarende dA₁₀ ble ytterligere illustrert på to måter:

15 1. Som vist i eksempel 56 nedenfor vil PNA-oligonukleotid-kompleksene migrere saktere enn det enkelttrådede oligonukleotidet med elektroforese i polyakrylamidgeler. Slike eksperimenter ble derfor utført med Acr¹-(Taeg)₁₀-Lys-NH₂ og ³²P-ende-merket dA₁₀. Dette viste begrenset migrering under betingelser hvor en normal dA₁₀/dT₁₀ dupleks er stabil samt under betingelser hvor et slikt dupleks er ustabil (denaturerende gel). Et kontrolleksperiment ble utført med en blanding av Acr¹-(Taeg)₁₀-Lys-NH₂ og ³²P-ende-merket dT₁₀ som ikke viste noen retardasjon under ovennevnte betingelser.

25

2. Ved dannelsen av DNA duplekser (dsDNA) fra enkelttrådet DNA reduseres ekstinsjonskoeffisienten (hypokromisiteten). Denaturering av DNA kan dermed bli fulgt ved måling av forandringene i absorbansen, for eksempel, som en funksjon av T_m, temperaturen hvor 50% av et dupleks har blitt borte for å tilveiebringe enkelttråder.

30

Duplekset ble dannet fra enkelt-trådede oligodeoksyribonukleotider og PNA er angitt nedenfor. Vanligvis var 0,3 OD₂₆₀ av den T-rike tråden hybridisert med en ekvivalent av den andre tråden ved oppvarming til 90°C i 5 min., avkjøling til romtemperatur og oppbevart i 30 min. og tilslutt lagret

35

kjølig ved 5°C i minst 30 min. Bufferene som ble anvendt var
 alle 10 mM i forsfat og 1 mM i EDTA. Lavsaltbufferen
 inneholdt ikke natriumklorid, mens middelsaltbufferen
 inneholdt 140 mM NaCl og høysaltbufferen 500 mM NaCl. pH til
 5 alle bufferene var 7,2. Smeltetemperaturen til hybridene ble
 bestemt på en Gilford responsapparat. Følgende eks-
 tinsjonskoeffisienter ble anvendt A: 15,4 ml/μmol·cm, T:
 8,8, G: 11,7 og C: 7,3 for både normal oligonukleotider og
 PNA. Smeltekurvene ble registrert i trinn på 0,5 C/min. T_m
 10 ble bestemt fra det maksimale av 1. derivatet til plotet til
 A₂₆₀ i forhold til temperaturen.

15 Liste over oligodeoksyrobonukleotider:

1. 5'-AAA-AAA-AA
2. 5'-AAA-AAA-AAA-A
3. 5'-TTT-TTT-TTT-T
4. 5'-AAA-AAG-AAA-A
- 20 5. 5'-AAG-AAG-AAA-A
6. 5'-AAA-AGA-AAA-A
7. 5'-AAA-AGA-AGA-A
8. 5'-TTT-TCT-TTT-T
9. 5'-TTT-TCT-TCT-T
- 25 10. 5'-TTT-TTC-TTT-T
11. 5', TTT-TTC-TTC-T
12. 5'-TTC-TTC-TTT-T
13. 5'-TTT-TTT-TTT-TTT-TTT
14. 5'-AAA-AAA-AAA-AAA-AAA

30

Liste over PNA:

- a. TTT-TTT-TTT-T-Lys-NH₂
- b. TTT-TTT-TT-Lys-NH₂
- c. TTT-TTC-TTT-T-Lys-NH₂
- 35 d. TTC-TTC-TTT-T-Lys-NH₂
- e. Acr-TTT-TTT-TTT-T-Lys-NH₂
- f. Ac-TTT-TTT-TTT-T-Lys-NH₂

5	Oligo/PNA	Låvsalt	Middelsalt	Høysalt
	1+b	56.0 /	51.5	50.0
	2+a	73.0	72.5	73.0
10	2+c		41.5 and 52.0*	
	2+e	84.5	86.0	≈90
	2+f		74	
15	4+a	60.0	59.0	61.5
	4+c	74.5	72.0	72.5
	4+f		62.0	
	5+a		47.0	
20	5+c		57.5	
	5+f		46.5	
	7+a		46.0	
25	7+c		58.0	
	7+f		43.5	
	7+12		23.0	
30	13+14		39.0	

35 * = To bestemte smeltetemperaturer fremkommer og indikerer lokalt smelting før fullstendig denaturering.

Hybridet dannet mellom RNA-A (poly rA) og PNA-T₁₀-Lys-NH₂ smelter med en slik høy tempteratur at det ikke kan bli målt (>90°C). Spesifikk hybridisering blir demonstrert ved det store fallet i A₂₆₀ ved blanding med RNA-A, men ikke G,A og U. Eksperimentet blir utført ved blanding av 1 ml av en oppløsning av PNA og 1 ml av en oppløsning av RNA, hver med A₂₆₀ = 0,6 og deretter måling av absorbansen ved 260 nm. Deretter blir prøven oppvarmet til 90°C i 5 min., avkjølt til romtemperatur og oppbevart ved denne temperaturen i 30 min. og tilslutt lagret ved 5°C i 30 min.

RNA	PNA	A ₂₆₀ Før blanding	A ₂₆₀ Etter blanding	A ₂₆₀ Etter blanding og oppvarming
RNA-A	PNA-T ₁₀ lys-NH ₂ ¹	0.600	0.389	0.360
RNA-U	PNA-T ₁₀ -lys-NH ₂	0.600	0.538	0.528
RNA-G	PNA-T ₁₀ -lys-NH ₂	0.600	0.514	0.517
RNA-C	PNA-T ₁₀ -lys-NH ₂	0.600	0.540	, 0.532

Fra ovennevnte målinger kan følgende konklusjoner bli trukket. Det eksisterer basestabling p.g.a. at en smelte-

kurve er observert. PNA-DNA hybridet er mere stabilt enn et normalt DNA-DNA hybrid og PNA-RNA er enda mer stabil. Feilparinger forårsaker signifikante fall i T_m -verdien enten om den feilparede basen er i DNA eller PNA-tråden. T_m -verdien er bare delvis avhengig av ionestyrken i motsetning til normale oligonukleotider.

Eksempel 56.

10 Binding av $\text{Acr}^1\text{-(Taeg)}_{10}\text{-Lys-NH}_2$ til dA_{10} (figur 11a).

$\text{Acr}^1\text{-(Taeg)}_{10}\text{-Lys}$ (100 ng) ble inkubert i 15 min. ved romtemperatur med 50 cps 5'-[^{32}P]-endemerket oligonukleotid [$\text{d(GATCCA}_{10}\text{G)}$] i 20 μl TE buffer (10 nM Tris-HCl, 1 nM EDTA, pH 7,4). Prøven ble avkjølt på is (15 min.) og analysert ved gelelektroforese i polyakrylamid (PAGE). Til 10 μl prøven ble det tilsatt 2 μl 50% glyserol, 5 μl TBE (TBE = 90 nM Tris-borat, 1 mM EDTA, pH 8,3) og prøven ble analysert ved PAGE (15% akrylamid, 0,5 % bisakrylamid) i TBE buffer ved 4°C. En 10 μl del av prøven ble lyofilisert og på ny oppløst i 10 μl 80% formamid, 1 TBE, oppvarmet til 90°C (5 min.) og analysert ved urea/PAGE (15% akrylamid, 0,5 % bisakrylamid, 7 M urea) i TBE. [^{32}P]-innholdende DNA bånd ble visualisert ved autoradiografi ved anvendelse av intensiverende sekter og Agfa Curix RPA røntgenfilmer eksponert ved -80°C i 2 t.

Oligonukleotidene ble syntetisert på en Biosearch 7500 DNA syntesemaskin, merket med $\gamma\text{[}^{32}\text{P}\text{]-ATP}$ (Amersham, 5000 Ci/mmol) og polynukleotidkinase og rensset ved PAGE ved anvendelse av standardteknikker (Maniatis et al. (1986): A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratories).

I figur 11a og figur aab er 5'- ^{32}P -merkede oligonukleotider 1 5'-GATCCA₁₀G. Dette ble inkubert i fravær (kolonne 1 og 4) eller nærvær av $\text{Acr-T}_{10}\text{-Lys-NH}_2$ (i kolonnene 2 og 5, 25 pmol, kolonne 3 og 6, 75 pmol) og også i fravær (kolonne 1 til 3) eller i nærvær (kolonne 4 til 6) av "oligo-2" som var 5'-

GATCCT₁₀G. 5'-³²P-merket oligo 2 ble inkubert i fravær (kolonne 7) eller nærvær av samme PNA (kolonne 8, 25 pmol, kolonne 9, 75 pmol) og analysert ved PAGE som beskrevet i detalj ovenfor.

5

Resultatene i figur 11a viser retardasjon av ssDNA når det blir hybridisert av PNA (kolonne 1 til 3) og evnen som PNA har til å konkurrere med et DNA oligonukleotid for merket komplementært oligonukleotid (kolonne 4 til 6). Intensiteten til båndet som kan tilskrives dsDNA vokser hurtigere når PNA konsentrasjonen øker og blir erstattet med et bånd som representerer det saktere bevegende PNA-DNA hybridet. Kolonne 7 til 9 viser at PNA ikke har noen virkning på T₁₀ oligo DNA som det er ikke-komplementært til.

10

I figur 11b som ble kjørt under DNA denaturerende betingelser forblir PNA-DNA dupleksene udenaturert.

Eksempel 57.

15

Dannelsen av trådforflyttningskomplekset.

20

En dA₁₀-dT₁₀ målssekvens innbefattet i en plasmid DNA sekvens ble konstruert ved kloning av to oligonukleotider (d(GATC-CA₁₀G) + d(GATCCT₁₀G)) inn i BamHI restriksjonsenzymsetet til pUC19 ved anvendelse av Eschericia coli JM101 stammen ved hjelp av standardteknikker (Maniatis et al., 1986). Det ønskede plasmidet (betegnet pT10) ble isolert fra en av de resulterende klonene og rensset ved alkalisk ekstraksjonsprosedyre og CsCl sentrifugering (Maniatis et al., 1986). Et 3'-[³²P]-ende-merket DNA fragment på 248 bp inneholdende dA₁₀/dT₁₀ målsekvensen ble oppnådd ved spaltning av pT10 DNA med restriksjonsenzymene EcoRI og PvuII, merking av spaltet DNA med α[³²P]-dATP (4000 Ci/mmol, Amersham) ved anvendelse av Klenow fragmentet til E. coli DNA polymerase (Boehringer Mannheim), og rensing av 248 bp DNA fragmentet ved PAGE (5% akrylamid, 0,06 % bisakrylamid, TBE buffer). Dette DNA

25

30

35

fragmentet ble oppnådd med [^{32}P]-ende-merking ved 5'-enden ved behandling av EcoRI-spaltet pT10 plasmid med bakteriell alkalisk fosfatase (Boehringer Mannheim), rensing av plasmid DNA'et ved gelelektroforese i lavtsmeltende agarose og merking med $\gamma[^{32}\text{P}]$ ATP og polynukleotidkinase. Etter behandling med PvuII ble 248 bp DNA fragmentet renset som ovenfor.

Komplekset mellom $\text{Acr}^1\text{-(Taeg)}_{10}\text{-Lys-NH}_2$ og 248 bp DNA fragmentet ble dannet ved inkubering av 50 ng $\text{Acr}^1\text{-(Taeg)}_{10}\text{-Lys-NH}_2$ med 500 cps $^{32}\text{-P}$ -merket 249 bp fragment og 0,5 μg kalvetymus DNA i 100 μl 25 mM Tris-HCl, 1 mM MgCl_2 , 0,1 mM CaCl_2 , pH 7,4 i 60 min. ved 37°C som beskrevet nedenfor.

Eksempel 58.

Probing av trådforflyttningskomplekser med:

(a) Stafylokokkusnuklease (figur 12b kolonne 8 til 10).

20

Trådforflyttningskomplekset ble dannet som beskrevet ovenfor. Komplekset ble behandlet med Stafylokokkusnuklease (Boehringer Mannheim) med 750 U/ml i 5 min. ved 20°C og reaksjonen ble stoppet ved tilsetning av EDTA til 25 mM. DNA ble presipitert med 2 vol etanol, 2% kaliumasetat på ny løst opp i 80% formamid, TBE, oppvarmet til 90°C (5 min.) og analysert ved PAGE med høy resolusjon (10% akrylamid, 0,3 % bisakrylamid, 7 M urea) og autoradiografi. Kolonnen 8 inneholder ikke PNA, kolonne 9 40 pmol og kolonne 10 120 pmol. Når PNA blir inkludert fremkommer avtrykket som indikerer økende mottakelighet for spaltning ved Staflokokkusnuklease og dermed økende forflytting av ssDNA fra dsDNA.

30

(b) Affinitetsfotospaltning (figur 12a + 12b, kolonne 1 til 3 i hver tilfelle).

35

Komplekset ble dannet i TE buffer. En prøve innbefattet i et Eppendorf rør ble bestålt fra ovenfor ved 300 nm (Philips TL 20 W/12 fluorescent lysrør, $24\text{Jm}^{-2}\text{s}^{-1}$) i 30 min. DNA ble presipitert som ovenfor, tatt opp i 1 M piperidin og oppvarmet til 90°C i 20 min. Etter lyofilisering ble DNA analysert ved PAGE som ovenfor. I hvert tilfelle inneholder kolonne 1 påny ikke noe PNA og kolonnene 2 og 3 inneholder 40 pmol og 120 pmol PNA. DNA tråden bundet til PNA (A_{10} tråden) spalter ved beliggenheten til akredinesteren (kolonnene 1 til 3 i figur 12a) som danner et nytt bånd (til), mens tråden som blir forflyttet av PNA (T_{10} tråden) spalter tilfeldig og produserer et avtrykk.

(c) Kaliumpermanganat (figur 12b, kolonnene 4 til 6).

Komplekset ble dannet i 100 μl TE og 5 μl 20 mM KMnO_4 ble tilsatt. Etter 15 s ved 20°C ble reaksjonen stoppet ved tilsetning av 50 μl 1,5 M natriumasetat, pH 7,0, 1 M 2-merkapttoetanol. DNA ble presipitert, behandlet med piperidin og analysert som ovenfor. De samme PNA konsentrasjonene blir anvendt i kolonnene 4 til 6 som i kolonnene 1 til 3. Man kan igjen se fremkomst av et avtrykk som viser spaltning av forflyttet ssDNA ved permanganat.

(d) Fotoavtrykk (figur 12a, kolonnene 5 til 6).

Komplekset ble dannet i 100 μl TE og diaso-koblet akridin (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) (DHA, Nielsen et al. (1988) Nucl. Acids res. 16, 3877-88) ble tilsatt. Prøven ble bestålt ved 365 nm (Philips TL 20 W/09N, $22\text{Jm}^{-2}\text{s}^{-1}$) i 30 min. og behandlet som beksrevet for "affinitetsfotospaltning". I nærvær av PNA, (kolonne 6) blir DNA beskyttet og båndene som tilsvarende spaltning i den beskyttede regionen blir borte.

(e) S_1 -nuklease (figur 12c, kolonnene 1 til 3).

Komplekset ble dannet i 50 mM natriumasetat, 200 mM NaCl, 0,5 % glyserol, 1 mM ZnCl_2 , pH 4,5 og behandlet med nuklease S_1

(Boehringer Mannheim) ved 0,5 U/ml i 5 min. ved 20°C. Reaksjonen ble stoppet og ytterligere behandlet som beskrevet under "Stafylokokkusnuklease". Mengden av PNA som ble anvendt var null (kolonnene 1 til 3) eller 120 pmol (kolonnene 4 til 6) kolonne 7 viser størrelsesstandarder. Igjen sees spaltning av T₁₀ DNA tråden forflyttet av PNA.

Eksempel 59.

Hybridiseringssensitiviteten ved (1) orientering (2) pH og (3) sekvensfeilparing.

PNA- oligomeren H-T₄C₂TCTC-LysNH₂ ble dannet ifølge syntese-protokoll 6, rensset ved reversfase HPLC og identifisert ved FAB-massespektrometri, funnet (beregnet) 2746,8 (2447,15). Hybridiseringseksperimentene med denne sekvensen bestemmer orienteringen p.g.a. at den er helt asymetrisk. Slike eksperimenter bestemmer også pH-avhengigheten til T_m og stoikiometrien til de dannede kompleksene.

Hybridiseringseksperimentene med PNA-oligomeren H-T₄C₂TCTC-LysNH₂ ble utført som følger:

Rad	Hybridisert med	pH	T _m	§
1	5'-(dA) ₄ (dG) ₂ (dA)(dG)(dA)(dG)	7,2	55,5	2:1
2	5'-(dA) ₄ (dG) ₂ (dA)(dG)(dA)(dG)	9,0	26,0	2:1
5	3 5'-(dA) ₄ (dG) ₂ (dA)(dG)(dA)(dG)	5,0	88,5	2:1
4	5'-(dG)(dA)(dG)(dA)(dG) ₂ (dA) ₄	7,2	38,0	2:1
5	5'-(dG)(dA)(dG)(dA)(dG) ₂ (dA) ₄	9,0	31,5	-
6	5'-(dG)(dA)(dG)(dA)(dG) ₂ (dA) ₄	5,0	52,5	-
		61,0		
10	7 5'-(dA) ₄ (dG)(dT)(dA)(dG)(dA)(dG)	7,2	39,0	-
8	5'-(dA) ₄ (dG)(dT)(dA)(dG)(dA)(dG)	9,0	>20	-
9	5'-(dA) ₄ (dG)(dT)(dA)(dG)(dA)(dG)	5,0	51,5	-
10	5'-(dA) ₄ (dG) ₂ (dT)(dG)(dA)(dG)	7,2	31,5	-
11	5'-(dA) ₄ (dG) ₂ (dT)(dG)(dA)(dG)	5,0	50,5	-
15	12 5'-(dG)(dA)(dG)(dA)(dT)(dG)(dA) ₄	7,2	24,5	-
13	5'-(dG)(dA)(dG)(dA)(dT)(dG)(dA) ₄	9,0	>20	-
14	5'-(dG)(dA)(dG)(dA)(dT)(dG)(dA) ₄	5,0	57,0	-
15	5'-(dG)(dA)(dG)(dT)(dG) ₂ (dA) ₄	7,2	25,0	-
16	5'-(dG)(dA)(dG)(dT)(dG) ₂ (dA) ₄	5,0	39,5	-
20			52,0	

§ = støkiometri bestemt fra UV-blandingskurver

- = ikke bestemt

Disse resultatene viser at en riktig blandet sekvens ga opphav til veldefinerte smeltekurver. PNA-oligomerene kan binde i begge orienteringene (sammenlign rad 1 og 4), til tross for at det er preferanse for den N-terminale/5'-orienteringen. Innføring av en enkelt feilparing motsatt enten T eller C forårsaket en verdisering av t_m med mer enn 16°C ved pH 7,2, ved pH 5,0 ble T_m-verdien redusert med mer enn 27°C. Dette viser at det er en meget høy grad av sekvensselektivitet.

Som angitt ovenfor er det en meget sterk pH-avhengighet for T_m-verdien og indikerer at Hoogsteen baseparingen er viktig for dannelsen av hybrider. Det er derfor ikke overraskend at støkiometrien ble funnet å være 2:1.

Mangel på symetri i sekvensen og den meget store senkningen av T_m hvor feilparinger er tilstede viser at Watson-Crick tråden og Hoogsteen tråden er parallelle når de er bundet komplementært DNA. Dette er tilfelle for begge orienteringene, dvs. 5'/N-terminal og 3'/N-terminal.

Eksempel 60.

Sekvensdiskriminering ved hybridisering.

10

Resultatene av hybridiseringseksperimentene med H-T₅GT₄-LysNH₂ til deoksyoligonukleotidene vist nedenfor var som følger:

15

Rad	Deoksyoligonukleotider	T_m
1	5'-(dA)5(dA)(dA)4-3'	55,0
2	5'-(dA)5(dG)(dA)4-3'	47,0
3	5'-(dA)5(dC)(dA)4-3'	56,5
20 4	5'-(dA)5(dT)(dA)4-3'	46,5
5	5'-(dA)4(dG)(dA)5-3'	48,5
6	5'-(dA)4(dC)(dA)5-3'	55,5
7	5'-(dA)4(dT)(dA)5-3'	47,0

25

Vist ved sammenligning av radene 1, 3 og 6 med radene 2, 4, 5 og 7 kan G på denne måten diskriminere mellom C/A og G/T i DNA-tråden, dvs. sekvensdiskriminering blir observert. Komplekset i rad 3 ble ytterligere bestemt å være 2 PNA:1 DNA kompleks ifølge UV-blandingskurvene.

30

Eksempel 61.

Sekvensspesifisitet ved hybridisering ved anvendelse av et modifisert skjelett.

35

Hybridiseringsdata for en PNA-oligomer med en enkelt enhet

med et utvidet skjelett (β -alanin modifikasjon) er som følger:

5

PNA	DNA	T_m
H-T ₁₀ -LysNH ₂	(dA) ₁₀	73°C
H-T ₄ (β T)T ₅ -LysNH ₂	(dA) ₁₀	57°C
10 H-T ₄ (β T)T ₅ -LysNH ₂	(dA) ₄ (dG)(dA) ₅	47°C
H-T ₄ (β T)T ₅ -LysNH ₂	(dA) ₄ (dC)(dA) ₅	49°C
H-T ₄ (β T)T ₅ -LysNH ₂	(dA) ₄ (dT)(dA) ₅	47°C

15

Til tross for at smeltetemperaturer reduseres demonstrerer dataene at den basespesifikke gjenkjenningen blir beholdt.

Eksempel 62.

Iodineringsprosedyre - radioaktiv merking.

20

25

A 5 μ g del av Tyr-PNA-T₁₀-Lys-NH₂ blir løst opp i 40 μ l 100 mM Na-fosfat, pH 7,0 og 1 mCi Na¹²⁵I og 2 μ l kloramin-T (50 mM i CH₃CN) blir tilsatt. Oppløsningen blir latt stå ved 20°C i 10 min. og deretter sendt gjennom en 0,5 + 5 cm sefadeks G10 kolonne. De første to fraksjonene (100 μ l hver) inneholdende radioaktivitet blir samlet og renses ved HPLC: reversfase C-18 ved anvendelse av en 0-60% CH₃CN gradient i 0,1 % CF₃COOH i H₂O. ¹²⁵I-PNA elueres rett etter PNA toppen. Oppløsningsmiddelet blir fjernet under redusert trykk.

30

Eksempel 63.

Binding av PNAs-T₁₀/T₉C/T₈C₂ til dobbelttrådede DNA målene A₁₀/A₉G/A₈G₂ (figur 20).

35

En blanding av 200 cps dobbelttrådede ³²P-merkede EcoRI-PvuII fragmenter (det store fragmentet er merket ved 3'-enden av

EcoRI setet) til det indikerte plasmidet, 0,5 µg bærer kalvetymus DNA og 300 ng av det indikerte PNA i 100 µl buffer (200 mM NaCl, 50 mM Na-asetat, pH 4,5, 1 mM ZnSO₄) ble inkubert ved 37°C i 120 min. 50 enheter nuklease S₁ ble
 5 tilsatt og inkubert ved 20°C i 5 min. Reaksjonen ble stoppet ved tilsetning av 3 µl 0,5 M EDTA og DNA ble presipitert ved tilsetning av 250 µl 2% kaliumasetat i etanol. DNA ble analysert ved elektroforese i 10% polyakrylamid sekvenseringsgeler og de radiomerkede DNA båndene ble visualisert ved
 10 autoradiografi. De fullstendige båndmønstrene som ble produsert viste produksjon ved trådforflytting av enkelttrådet DNA som er angrepet av nukleasen for å danne en blanding av kortere oligonukleotider. Sammenligning av resultatene for tre PNA anvendt i hvert tilfelle viser selektiviteten for
 15 hvert mål som blir oppnådd.

Målplasmidet ble dannet ved kloning av de hensiktsmessige oligonukleotidene inn i pUC19. Mål A₁₀: oligonukleotidene GATCCA₁₀ & GATCCT₁₀G klonet inn i BamHI setet (plasmid
 20 betegnet pT10). Mål A₅GA₄: oligonukleotidene TCGACT₄CT₅G & TCGACA₅GA₄G klonet inn i SalI setet (plasmid pT9C). Mål A₂GA₂GA₄: oligonukleotidene GA₂GA₂GA₄TGCA & GT₄CT₂CT₂CTGCA inn i PstI setet (plasmid pT8C2). Posisjonene til målene i gelen er angitt med streker til venstre. A/G er en A+G
 25 sekvensstige til mål P10.

Eksempel 64.

Inhibisjon av restriksjonsenzymspaltningen ved PNA (figur
 30 23).

En 2 µg del av plasmid pT10 ble blandet med den indikerte mengden av PNA-T₁₀ i 20 µl TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,4) og inkubert ved 37°C i 120 min. 2 µl 10 x
 35 konsentrert buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM, MgCl₂, 50 mM NaCl, 1 mM DTT) og PvuII (2 enheter) og BamHI (2 enheter) ble tilsatt og inkubasjonen ble fortsatt i 60 min. DNA ble

analysert ved gelelektroforese i 5% polyakrylamid og DNA ble visualisert ved etidumbromid farging.

I nærvær av en signifikant del PNA (0,2, 0,6) ble spaltningsmønsteret til enzymet Bam HI forandre og indikerte at enzymet ble inhibert ved tilstedeværelse av PNA sammen med spaltningssetet.

Eksempel 65.

Kinetikken til PNA-T₁₀ - dsDNA tråd forflyttningskompleksdannelsen (figur 21).

En blanding av 200 cps dobbelttrådet ³²P-merket EcoRI-PvuII fragmentet til pT10 (det større fragmentet merket ved 3'-enden av EcoRI setet), 0,5 µg bære kalvetymus DNA og 300 ng PNA-T₁₀-LysNH₂ i 100 µl buffer (200 mM NaCl, 50 mM Naasetat, pH 4,5, 1 mM ZnSO₄) ble inkubert ved 37°C. Ved de angitte tidspunktene ble 500 U S₁ nuklease tilsatt til hver av de 7 prøvene og inkubasjonen ble fortsatt i 5 min. ved 20°C. Et hvilket som helst enkelttrådet DNA produsert ved trådforflytting blir spaltet av nukleasen. DNA blir deretter presipitert ved tilsetning av 250 µl 2% kaliumasetat i etanol og analysert ved elektroforese i en 10% polyakrylamid sekvenseringsgel. Mengden av trådforflyttningskomplekset ble beregnet i vilkårlige enheter ut ifra intensiteten til S₁-spaltningen ved målsekvensen målt ved densitometrisk scanning av autoradiografer. Dannelsen av komplekset over tid kan sees.

Eksempel 66.

Stabiliteten til PNA-dsDNA kompleksene (figur 22).

En blanding av 200 cps ³²P-pT10 fragmentet (som i eksempel 65), 0,5 µg kalvetymus DNA og 300 ng av ønsket PNA (enten T₁₀-LysNH₂, T₈-LysNH₂ eller T₆-LysNH₂) ble inkubert i 100 µl

200 mM NaCl, 50 mM Na-asetat, pH 4,5, 1 mM ZnSO₄ i 60 min. ved 37°C. En 2 µg del av oligonukleotidet GATCCA₁₀G ble tilsatt for å konkurrere med PNA for merket oligonukleotid og hver prøve ble varmet i 10 min. ved den indikerte temperaturen, avkjølt i is i 10 min. og varmet til 20°C. 50 U S₁ nuklease ble tilsatt og mengden av radioaktivitet frigjort som enkelt nukleotider ble målt.

Ventede T_m verdier for en T₁₀ DNA dupleks kunne være 20°C for T₈ - 16°C og for T₆ - 12°C. De tilsvarende PNA/DNA verdiene er vist å være T₁₀ > 70°C, T₈ - 60°C og for T₆ - 37°C.

Eksempel 67.

15 Immobilisering av PNA.

For preparering av PNA-Sefarose ble 10 mg syanogenbromid aktivert Sefarose (sigma) inkubert med 10 µg PNA i 100 µl 50 mM Na-fosfat, pH 7,5 i 60 min. ved 37°C. Sefarosen ble isolert ved sentrifugering og vasket tre ganger med 250 µl 50 mM Na-fosfat, pH 7,5.

Eksempel 68.

25 Binding av 5'-³²P-endemerket oligonukleotid til PNA-sefarose.

1 mg PNA-Sefarose (eksempel 67) i 100 µl TE ble inkubert med 50 cps (ca. 100 ng) ³²P-merket oligonukleotid i 16 t. ved 20°C. Sefarosen ble isolert ved sentrifugering og vasket to ganger med 500 µl TE. Bundet oligonukleotid ble bestemt ved væskesintillasjonshelling ved anvendelse av "Cerenkov" metoden. Resultatene er vist i tabellen nedenfor for tre forskjellige PNA-sefaroser og fire oligo-DNA. Spesifisiteten av oppfangingen med immobilisert PNA fremgår klart, idet det bare tolereres en basepar feilparing.

5

10

15

%-binding av ³² P-oligo til PNA-sefarose				
PNA på fast bærer (CNBr- sefarose)				
	T10	T9C	T8C2	ingen
DNA				
A10	51	45	15	8
A9G	11	50	52	8
A8G2	11	45	42	4
blanding	11	13	14	15

20

I tabellen A10 er 5'-GATCCAAAAAAAAAAG,A9G er 5'-TCGACAAAAA-
GAAAAG, A8G2 er 5'-GAAGAAGAACTGAC og blanding er 5'-
GATCAGCTATACGCGT. PNA er: T10: H-T₁₀LysNH₂, T9C: H-
T₅CT₄-LysNH₂, T8V2: H-T₂CT₂CT₄-LysNH₂, ingen:etanolamin.

Eksempel 69 (figur 25a, b og c).

25

Temperaturavhengigheten av stabiliteten til ³²P-oligonukleo-
tid-bindingen til PNA-sefarose.

30

35

Oligonukleotidene ble bundet til PNA-sefarose som beskrevet i
eksemlene 67 og 69. I hvert tilfelle ble ³²P-oligonukleo-
tid-PNA-sefarose deretter vasket ved økende temperatur.
Sefarosen ble isolert ved sentrifugering, radioaktiviteten
ble bestemt ved "Cerenkov" telling og sefarosen ble på ny
tatt opp i 500 µl TE, inkubert ved den neste ønskede
temperaturen, sentrifugert osv. Figuren viser resultatene
normalisert til opprinnelig binding. Oligonukleotidet og
PNA-sefarosen var som beskrevet i tabellen i eksempel 68.
Skiftene mellom kurvene viser den reduserte stabiliteten til
oligonukleotidbindingen når en feilparing er tilstede.

Eksempel 70.

Inhibisjon av transkripsjonen ved PNA (figur 26).

5

En blanding av 100 ng plasmid DNA (spaltet med restriksjonsenzym PvuII (se nedenfor) og 100 ng PNA i 15 μ l 10mM tTris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,4 ble inkubert ved 37°C i 60 min. Deretter ble 4 μ l 5 x konsentrert buffer (0,2 M Tris-HCl (pH 8,0), 40 mM MgCl₂, 10 mM spermidin, 125 mM NaCl) blandet med 1 μ l NTP-miks. (10 mM ATP, 10 mM CTP, 10 mM GTP, 1 mM UTP, 0,1 μ Cl/ μ l ³²P-UTP, 5 mM DTT, 2 μ g/ml tRNA, 1 μ g/ml heparin) og 3 enheter RNA polymerase. Inkubasjonen ble fortsatt i 10 min. ved 37°C. RNA ble deretter presipitert ved tilsetning av 60 μ l 2% kaliumasetat i 96% etanol ved -20°C og analysert ved elektroforese i 8% polyakrylamid sekvenseringsgeler. RNA transskriptene ble visualisert ved autoradiografi. Det anvendte plasmidet var: Kolonne 1 til 5, pA10KS (A₁₀ målet er posisjonert på den transskriberte tråden). Kolonnene 6 til 10: pT10KS (A₁₀ målene er posisjonert på den ikke-transskriberte tråden). Plasmidet ble behandlet med følgende restriksjonsenzymmer før eksperimentet: Kolonnene 1, 4, 6 og 9: PvuII, kolonnene 2, 5, 7 og 10: Xba I, kolonnene 3 og 8: BamHI. Prøvene i kolonnene 4, 5, 9 og 10 inneholdt PNA, mens de gjenværende ikke gjorde dette. Det fremgår fra gelen at når PNA T₁₀ er bundet til transskriberte tråden, blir plasmidet, transkripsjonen av RNA stoppet ved PNA bindingssetet. Dersom PNA er bundet til den ikke-transskriberte tråden av plasmidet blir transkripsjonen ikke stoppet.

30

Eksempel 71.

Affiniteten PNA - sefarose (figur 27).

35

1 mg PNA-T₁₀ sefarose (se eksempel 67) i 100 μ l TE ble inkubert med ca. 50 cps av følgende ³²P-5'-endemerkede oligonukleotider:

1: 5'-GAT CCG GCA AAT CGG CAA TAC GGC ATA ACG GCT AAA
 CGG CTT TAC GGC TTA TCG GCT ATT CGG CAT TTC GGC
 AAT TCG,
 5 2: 5'-GAT CCG GCT TAA CGG CAA TTC GCT TAT ACG GCA TAT
 CGG CTA ATC GGC ATT ACG GCT TTT CGG G,
 3: 5'-GAC AAA CAT ACA ATT TCA ACA GAA CCA AAA AAA AAA
 AAA A,
 4: 5'-ACT GAC TAC CTA GGT TTA CCG TGC CAG TCA,
 10 5: 5'-GAA ACG GAT AGC TGC A

i 16 t. ved 20°C. Sefarosen ble isolert ved sentrifugering
 og vasket 3 ganger med TE. Oligonukleotidene ble deretter
 vasket med 500 µl TE ved økende temperaturer, presipitert med
 15 1 ml etanol, 2% kaliumasetat og analysert ved elektroforese i
 20% polyakrylamid, 7 M ureagel kjørt i TBE buffer og
 detektert ved autoradiografi (ca. 70°C, 16 t., intensiverende
 sikt). Resultatene er vist i figur 26. Kolonnenene er som
 følger:

20 Kolonne 1: Oligonukleotidene ble ikke bundet til sefadeks,
 Kolonne 2: Oligonukleotidene ble vasket ut ved 40°C,
 Kolonne 3: Oligonukleotidene ble vasket ut ved 60°C,
 Kolonne 4: Oligonukleotidene ble vasket ut ved 80°C.

25 Bare plasmid 3 er komplementær med PNA. Det fremgår at ved
 vasking ved opptil 80°C blir vesentlig bare det komplementære
 plasmidet beholdt på PNA-sefarosen. Dette eksempelet
 illustrerer ekstrahering av et oligonukleotid fra en blanding
 30 derav ved affinitetsoppfanging ved anvendelse av PNA.

Eksempel 72.

Kvantitativ analyse av en DNA sekvens i et ds plasmid ved
 35 pNA-tråd erstatning.

3 µg plasmid DNA spaltet ved de respektive restriksjonsenzymene angitt nedenfor i 10 µl 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,4 ble inkubert med 5000 cpm (ca. 10 ng) ^{125}I -PNA-T₁₀-Tyr og mengden av kald PNA T₁₀Tyr indikert ved totale PNA mengder angitt nedenfor i 60 min. ved 37°C. DNA ble presipitert ved 25 µl etanol. 2% kaliumasetat og deretter analysert ved elektroforese i 6% polyakrylamid i TBE buffer. Gelen ble farget med etidiumbromid og deretter utsatt for autoradiografi (-70°C, 16 t. intensiverende sikt). Resultatene fremkommer i figur 28. "A" er etidiumfarget gel og "b" er det tilsvarende autoradiogrammet. Anvendte plasmider var:

Kolonnene 1 til 3: pT₁₀ + HaeIII,
Kolonnene 4 til 6: pT₁₀ x HinfI,
Kolonnene 7 til 9: pT₁₀ x PvuII.

Totalmengden av PNA-T₁₀-Tyr i hver prøve var:

Kolonnene 1, 4 og 7: ca. 10 ng,
Kolonnene 2, 5 og 8: 25 ng,
Kolonnene 3, 6 og 9: 250 ng.

Etidiumbromidgelen (a) viser størrelsen på DNA fragmentene som er produsert (inkludert DNA-PNA hybrider). Autoradiografen (b) viser hvilket bånd i gelen (a) som inneholder PNA. Tilstedeværelse av et trådforflyttningskompleks framkommer i kolonne 1 og det samme gjør virkningen på intensiteten til dette båndet når det gjelder øking av proposjonen av kald PNA i kolonnene 2 og 3. Lignende resultater fremkommer for hvert av de andre to plasmidene i kolonnene 4 til 6 og 7 til 9. Beliggenheten av PNA-DNA båndet kan i hvert tilfelle bli anvendt for å identifisere plasmidet og den baserte intensiteten kan bli anvendt for å kvantifisere mengden av tilstedeværende plasmid.

P a t e n t k r a v

1.

Nukleinsyreanalog for anvendelse i oppfangning, gjenkjenning,
5 deteksjon, isolering, identifisering eller kvantifisering av
én eller flere kjemiske eller mikrobiologiske enheter, k a -
r a k t e r i s e r t v e d at analogen er en peptidnuk-
leinsyre (PNA) som omfatter et polyamidskjelett som bærer en
10 mengde ligander respektivt i avstand beliggende langs skje-
lettet, nevnte ligander er hver uavhengig naturlig forekom-
mende nukleobaser, ikke-naturlig forekommende nukleobaser
eller nukleobasebindende grupper, hvor hver ligand er bundet
direkte til, eller indirekte til, et nitrogenatom i nevnte
skjelett, og nevnte ligand bærer nitrogenatomer som i
15 hovedsak blir separert fra hverandre i nevnte skjelett ved
fra 4 til 8 mellomliggende atomer, hvor nevnte analog blir
inkorporert eller konjugert til et detekterbart merke.

2.

20 Nukleinsyreanalog ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t
v e d at ligandbærende nitrogenatomer i nevnte skjelett
hver er azanitrogenatomer.

3.

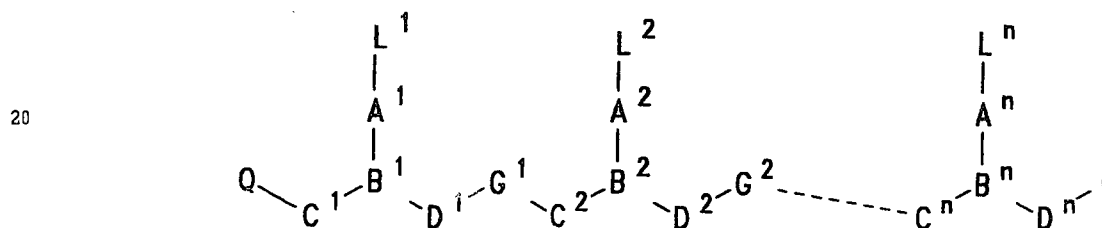
25 Nukleinsyreanalog for anvendelse i oppfangning, gjenkjenning,
deteksjon, isolering, identifisering eller kvantifisering av
én eller flere kjemiske eller mikrobiologiske enheter, k a -
r a k t e r i s e r t v e d at analogen er en nukleinsyre-
analog istand til å hybridisere til en nukleinsyre av
30 komplementær sekvens for å danne et hybrid som er mer stabilt
mot denaturering ved varme enn et hybrid mellom det konven-
sjonelle deoksyribonukleotid som korresponderer til nevnte
analog og nevnte nukleinsyre, hvor nevnte analog er inkor-
porert eller blir konjugert til et detekterbart merke.

4.

Nukleinsyreanalog for anvendelse i oppfangning, gjenkjenning, deteksjon, isolering, identifisering eller kvantifisering av én eller flere kjemiske eller mikrobiologiske enheter, k a r a k t e r i s e r t v e d at analogen er en nukleinsyreanalog istand til å hybridisere til en dobbelttrådet nukleinsyre hvori én tråd har en sekvens komplementær til nevnte analog, for å erstatte den andre tråden fra nevnte ene tråd, hvor nevnte analog blir inkorporert eller konjugert til et detekterbart merke.

5.

Merket nukleinsyreanalog ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter en nukleinsyreanalog som har den generelle formel:

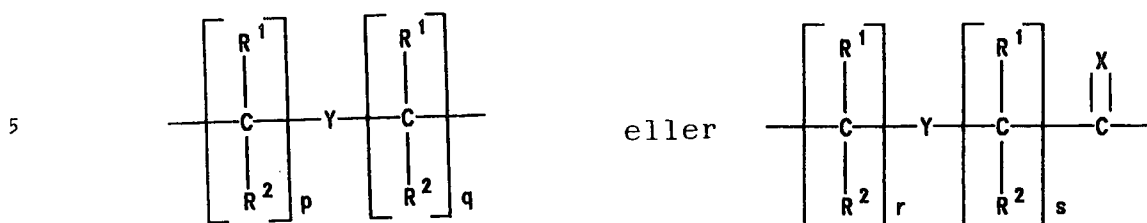


hvori:

n er minst 2,

hver L^1-L^n er uavhengig valgt fra gruppen bestående av hydrogen, hydroksy, (C_1-C_4) alkanoyl, naturlig forekommende nukleobaser, ikke-naturlig forekommende nukleobaser, aromatiske deler, DNA-interkalatorer, nukleobasebindende grupper og reporterligander, hvorved minst én L^1-L^n er en naturlig forekommende nukleobase, en ikke-naturlig forekommende nukleobase, en DNA-interkalator, eller en nukleobasebindende gruppe;

hvor hver av A^1-A^n er en enkel binding, en metylengruppe eller en gruppe med formelen:



10

hvor:

X er O, S, Se, NR³, CH₂ eller C(CH₃)₂;

Y er en enkel binding, O, S eller NR⁴;

15 hver av p og q er et heltall fra 1 til 5, summen p+q er ikke mer enn 10;

hver av r og s er null eller et heltall fra 1 til 5, hvor summen r+s ikke er mer enn 10;

hver R¹ og R² er uavhengig selektert fra gruppen bestående av hydrogen, (C₁-C₄)alkyl som kan være hydroksy- eller alkoksy- eller alkyltiosubstituert, hydroksy, alkoksy, alkyltio, amino og halogen; og

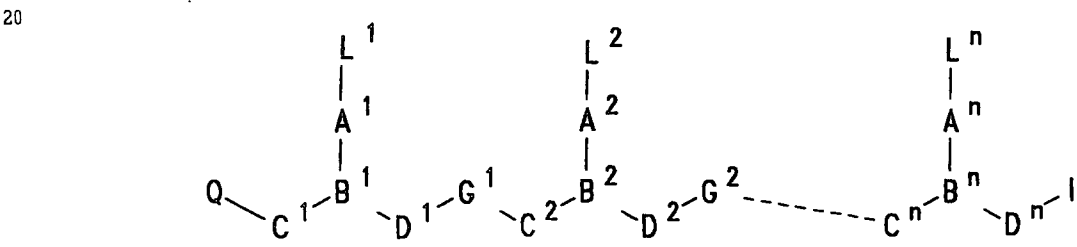
20 hver R³ og R⁴ er uavhengig selektert fra gruppen bestående av hydrogen, (C₁-C₄)alkyl, hydroksy- eller alkoksy- eller alkyltiosubstituert (C₁-C₄)alkyl, hydroksy, alkoksy, alkyltio og amino;

25 hver av B¹-Bⁿ er N eller R³N⁺, hvor R³ er som definert ovenfor;

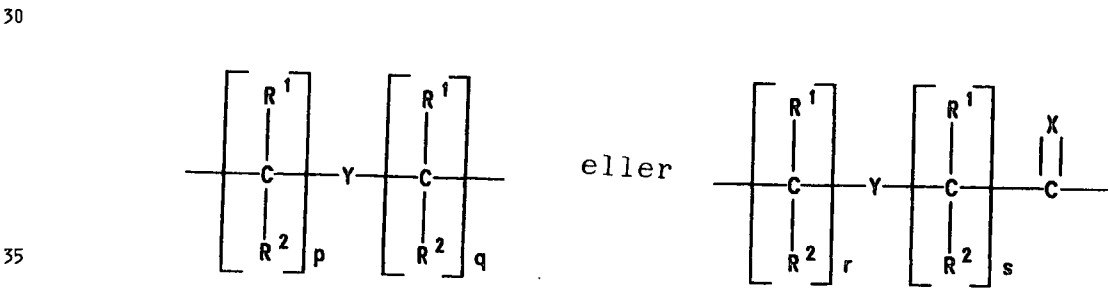
30 hver av C¹-Cⁿ er CR⁶R⁷, CHR⁶CHR⁷ eller CR⁶R⁷CH₂, hvor R⁶ er hydrogen og R⁷ er valgt fra gruppen bestående av sidekjedene bestående av naturlig forekommende alfa-aminosyrer, eller R⁶ og R⁷ er uavhengig selektert fra gruppen bestående av hydrogen, (C₂-C₆)alkyl, aryl, aralkyl, heteroaryl, hydroksy, (C₁-C₆)alkoksy, (C₁-C₆)alkyltio, NR³R⁴ og SR⁵, hvor R³ og R⁴ er som definert ovenfor, og R⁵ er hydrogen, (C₁-C₆)alkyl, hydroksy-, alkoksy-, eller alkyltiosubstituert (C₁-C₆)alkyl, eller R⁶ og R⁷ sammen fullstendiggjør et alicyklisk eller heterocyklisk system;

hver av D^1-D^n er CR^6R^7 , $CH_2CR^6R^7$ eller CHR^6CHR^7 , hvor R^6 og R^7 er som definert ovenfor;
hver av G^1-G^{n-1} er $-CINR^3-$, $-CSNR^3-$, $-SONR^3-$ eller $-SO_2NR^3-$, i hver orientering, hvor R^3 er som definert ovenfor;
5 Q er $-CO_2H$, $-CONR'R''$, $-SO_3H$ eller $-SO_2NR'R''$ eller et aktivert derivat av $-CO_2H$ eller $-SO_3H$; og
I er $-NHR'''R''''$ eller $-NR'''C(O)R''''$, hvor R_i , R'' , R''' og R'''' blir uavhengig selektert fra gruppen bestående av hydrogen, alkyl, aminobeskyttende grupper, rapporterings-
10 ligander, interkalatorer, chelatorer, peptider, proteiner, karbohydrater, lipider, steroider, oligonukleotider og oppløselige og ikke-oppløselige polymerer, som inkorporerer eller konjugerte til et detekterbart merke.

15 6.
Merket nukleinsyreanalog ifølge krav 1, k a r a k t e r i -
s e r t v e d at den omfatter en nukleinsyreanalog som har den generelle formel:



hvor i:
hver A^1-A^n er en enkel binding eller en gruppe med formel:



n, hver av L^1 til L^n , X, Y, p, q, r og s er som definert i krav 5,

hver R^1 og R^2 er uavhengig valgt fra gruppen bestående av hydrogen, (C_1-C_4) alkyl som kan være hydroksy- eller alkoksy-

substituert, hydroksy, alkoksy, amino og halogen; og
hver R^3 og R^4 er uavhengig valgt fra gruppen bestående av hydrogen, (C_1-C_4) alkyl, hydroksy- eller alkoksysubstituert (C_1-C_4) alkyl, hydroksy, alkoksy og amino;

hver av B^1-B^n er N eller R^3N^+ , hvor R^3 er som definert ovenfor;

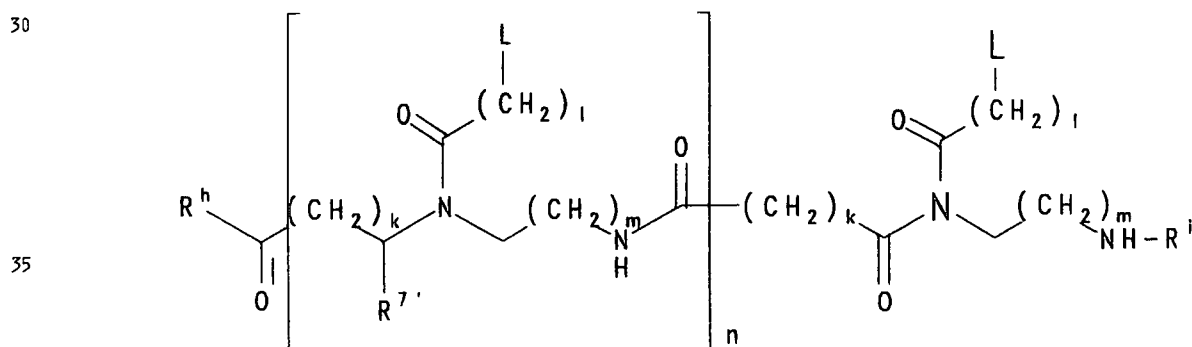
hver av C^1-C^n er CR^6R^7 , CHR^6CHR^7 eller $CR^6R^7CH_2$, hvor R^6 er hydrogen og R^7 er valgt fra gruppen bestående av sidekjedene fra naturlig forekommende alfa-aminosyrer, eller R^6 og R^7 er uavhengig valgt fra gruppen bestående av hydrogen, (C_2-C_6) alkyl, aryl, aralkyl, heteroaryl, hydroksy, metoksy NR^3R^4 og SR^5 , hvor R^3 og R^4 er som definert ovenfor; og R^5 er hydrogen, (C_1-C_6) alkyl, hydrokys- eller alkoksysubstituert (C_1-C_6) alkyl, eller R^6 og R^7 sammen fullstendiggjør et alicyklisk system;

hver av D^1-D^n er $CH_2CR^6R^7$ eller CHR^6CHR^7 , hvor R^6 og R^7 er definert som ovenfor; og

hver av G^1-G^n er som definert i krav 5, som inkorporerer eller konjugerer til et detekterbart merke.

7.

Merket nukleinsyreanalog ifølge krav 6, k a r a k t e r i -
s e r t v e d at den omfatter en nukleinsyreanalog som har den generelle formel:



hvor:

hver L er uavhengig selektert fra gruppen bestående av hydrogen, fenyl, naturlig forekommende nukleobaser og ikke-naturlig forekommende nukleobaser;

5 hver $R^{7'}$ er uavhengig selektert fra gruppen bestående av hydrogen og sidekjedene av naturlig forekommende alfa-aminosyrer;

n er et heltall fra 1 til 60,

10 hver k og m er uavhengig null eller én, og hver l er uavhengig fra null til 5;

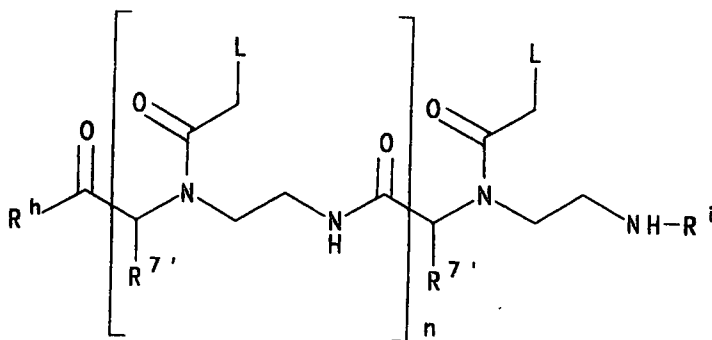
R^h er OH, NH_2 eller $-NHLysNH_2$; og

R^i er H eller $COCH_3$, inkorporert eller konjugert til et detekterbart merke.

15 8.

Merket nukleinsyreanalog ifølge krav 7, k a r a k t e r i -
s e r t v e d at den omfatter en nukleinsyreanalog som
har den genrelle formel:

20



25

hvor:

30 L, $R^{7'}$ og n er som definert i krav 7, inkorporert eller konjugert til et detekterbart merke.

9.

Merket nukleinsyreanalog ifølge krav 8, k a r a k t e r i -
s e r t v e d at:

35 hver L er uavhengig valgt fra gruppen bestående av nukleobasene tymin, adenin, cytosin, guanin og uracil;

hver $R^{7'}$ er hydrogen; og

n er et heltall fra 1 til 30.

10.

5 Merket nukleinsyreanalog ifølge hvilket som helst av de foregående krav, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte merke er et radioisotopmerke, et enzymerke, biotin, en fluorofor, et kjemiluminescensmerke, et antigen, et antistoff eller et spinnmerke.

10 11.

Merket nukleinsyreanalog ifølge krav 1, 2 eller et hvilket som helst av kravene 5 til 10, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte ligander er tymin og/eller cytosin.

15 12.

Anvendelse in vitro ved oppfangning, gjenkjenning, deteksjon, isolering, identifisering eller kvantifisering av én eller flere kjemiske eller mikrobiologiske enheter av en nukleinsyreanalog som er en peptidnukleinsyre (PNA), som omfatter et
20 polyamidskjelett som bærer en mengde ligander ved respektivt i avstand beliggende langs nevnte skjelett, hvor nevnte ligander hver er uavhengig naturlig forekommende nukleobaser, ikke-naturlig forekommende nukleobaser eller nukleobasebindende grupper, hvor hver nevnte ligand blir bundet direkte
25 eller indirekte til et nitrogenatom i nevnte skjelett, og nevnte ligand som bærer nitrogenatomer hovedsakelig blir separert fra hverandre i nevnte skjelett ved fra 4 til 8 mellomliggende atomer.

30 13.

Anvendelse ifølge krav 12, hvori de nevnte ligandbærende nitrogenatomene i nevnte skjelett hver er azanitrogenatomer.

14.

35 In vitro-anvendelse ved oppfangning, gjenkjenning, deteksjon, isolering, identifisering eller kvantifisering av én eller flere kjemiske eller mikrobiologiske enheter av en nukleinsyreanalog.

syreanalog som er en nukleinsyreanalog istand til å hybridisere til en nukleinsyre eller komplementær sekvens for å danne et hybrid som er mer stabilt mot denaturering ved varme enn et hybrid mellom den konvensjonelle deoksyribonukleotid
 5 korresponderende til nevnte analog og nevnte nukleinsyre.

15.

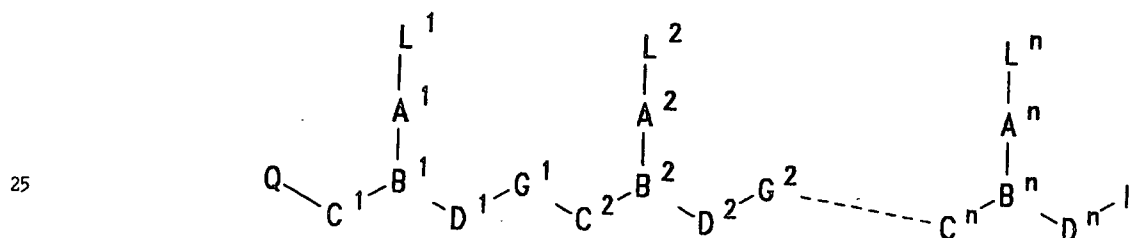
In vitro-anvendelse ved oppfangning, gjenkjenning, deteksjon, isolering, identifisering eller kvantifisering av én eller
 10 flere kjemiske eller mikrobiologiske enheter av en nukleinsyreanalog som er en nukleinsyreanalog som er istand til å hybridisere til en dobbelttrådet nukleinsyre hvori én tråd har en sekvens komplementær til nevnte analog, for å erstatte den andre tråden fra den nevnte ene tråden.

15

16.

Anvendelse av en nukleinsyreanalog ifølge hvilket som helst av kravene 12 til 15, hvori nukleinsyreanalogen har den generelle formel:

20



hvori:

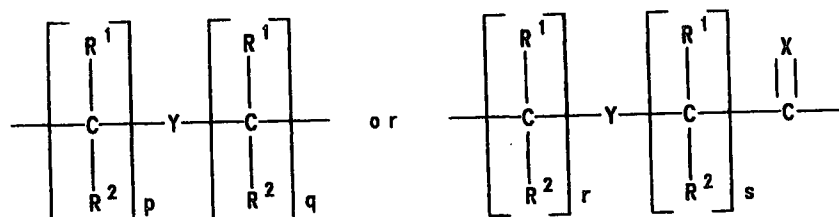
30

n er minst 2,

hver av L^1-L^n blir uavhengig valgt fra gruppen bestående av hydrogen, hydrokso, (C_1-C_4) alkanoyl, naturlig forekommende nukleobaser, ikke-naturlig forekommende nukleobaser, aromatiske deler, DNA-interkalatorer, nukleobasebindende
 35 grupper og reporterligander, hvor minst én av L^1-L^n er en naturlig forekommende nukleobase, en ikke-naturlig fore-

kommende nukleobase, en DNA-interkalator eller en nukleobase-bindende gruppe;

hver av A^1-A^n er en enkelt binding, en metylengruppe eller en gruppe med formel:



hvor:

X er O, S, Se, NR^3 , CH_2 eller $C(CH_3)_2$;

Y er en enkeltbinding, O, S eller NR^4 ;

hver av p og q er et heltall fra 1 til 5, summen av p+q er ikke mer enn 10;

hver av r og s er null eller et heltall fra 1 til 5, summen av r+s er ikke mer enn 10;

hver R^1 og R^2 blir uavhengig valgt fra gruppen bestående av hydrogen, (C_1-C_4) alkyl som kan være hydroksy- eller alkoksy- eller alkyltiosubstituert, hydroksy, alkoksy, alkyltio, amino og halogen; og

hver R^3 og R^4 blir uavhengig selektert fra gruppen bestående av hydrogen, (C_1-C_4) alkyl, hydroksy- eller alkoksy- eller alkyltiosubstituert (C_1-C_4) alkyl, hydroksy, alkoksy, alkyltio og amino;

hver av B^1-B^n er N eller R^3N^+ , hvor R^3 er som definert ovenfor:

hver av C^1-C^n er CR^6R^7 , CHR^6CHR^7 eller $CR^6R^7CH_2$, hvor R^6 er hydrogen og R^7 blir valgt fra gruppen bestående av sidekjedene av naturlig forekommende alfa-aminosyrer, eller R^6 og R^7 blir uavhengig selektert fra gruppen bestående av hydrogen, (C_2-C_6) alkyl, aryl, aralkyl, heteroaryl, hydroksy, (C_1C_6) alkoksy, (C_1-C_6) alkyltio, NR^3R^4 og SR^5 , hvor R^3 og R^4 er som definert ovenfor, og R^5 er hydrogen, (C_1-C_6) alkyl, hydroksy-, alkoksy-, eller alkyltiosubstituert (C_1-C_6) alkyl, eller R^6 og

R^7 sammen fullstendiggjør et alicyklisk eller heterocyklisk system;

hver av D^1-D^n er CR^6R^7 , $CH_2CR^6R^7$ eller CHR^6CHR^7 , hvor R^6 og R^7 er som definert ovenfor;

5 hver av G^1-G^{n-1} er $-CINR^3-$, $-CSNR^3-$, $-SONR^3-$ eller $-SO_2NR^3-$, i begge orientering, hvor R^3 er som definert ovenfor;

Q er $-CO_2H$, $-CONR'R''$, $-SO_3H$ eller $-SO_2NR'R''$ eller et aktivert derivat av $-CO_2H$ eller $-SO_3H$; og

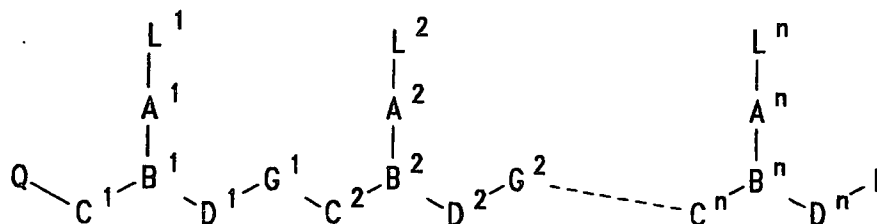
10 I er $-NHR'''R''''$ eller $-NR'''C(O)R''''$, hvor R_i , R'' , R''' og R'''' uavhengig blir valgt fra gruppen bestående av hydrogen, alkyl, aminobeskyttende grupper, rapporterende ligander, interkalatorer, chelatorer, peptider, proteiner, karbohydrater, lipider, steroider, oligonukleotider og oppløselige og ikke-oppløselige polymerer.

15

17.

Anvendelse ifølge hvilket som helst av kravene 12 til 15, ved at nukleinsyreanalogen har den generelle formel:

20

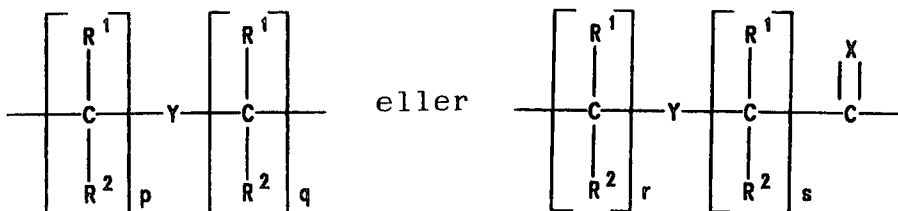


25

hvor:

hver av A^1-A^n er en enkel binding, eller en gruppe med formel:

30



35

hvor:

hver L blir uavhengig valgt fra gruppen bestående av hydrogen, fenyl, naturlig forekommende nukleobaser og ikke-naturlig forekommende nukleobaser;

5 hver $R^{7'}$ blir uavhengig valgt fra gruppen bestående av hydrogen og sidekjedene fra naturlig forekommende alfa-aminsyrer;

n er et heltall fra 1 til 60,

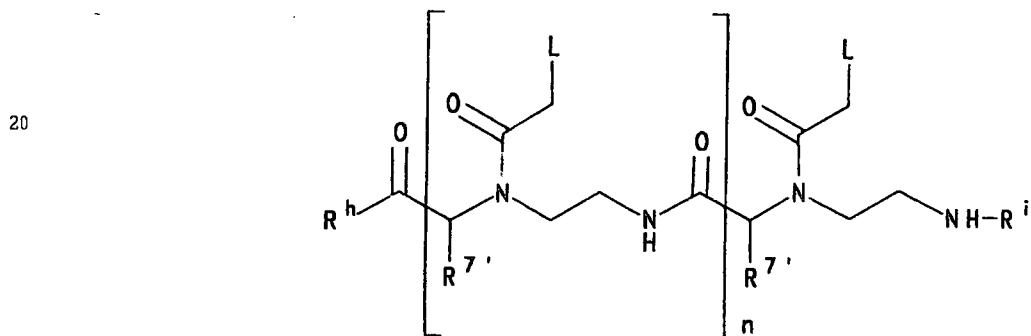
10 hver k og m er uavhengig null eller én; og hver l er uavhengig fra null til 5;

R^h er OH, NH_2 eller $-NHLysNH_2$; og

R^i er H eller $COCH_3$.

19.

15 Anvendelse av en nukleinsyreanalog ifølge krav 18, ved at nukleinsyreanalogen har den generelle formel:



og L, $R^{7'}$ og n er som definert i krav 7.

20.

Anvendelse ifølge krav 19, ved at:

30 hver L blir uavhengig valgt fra gruppen bestående av nukleobasene tymin, adenin, cytosin, guanin og uracil;

hver $R^{7'}$ er hydrogen; og

n er et heltall fra 1 til 30.

35 21.

Anvendelse av en nukleinsyreanalog ifølge krav 12 og 13 eller

et hvilket som helst av kravene 16 til 20, ved at nevnte ligander er tymin og/eller cytosin.

22.

- 5 Anvendelse av en nukleinsyreanalog ifølge hvilket som helst av kravene 12 til 21, ved at nukleinsyreanalogen inkorporeres eller blir konjugert til et detekterbart merke.

23.

- 10 Anvendelse av en nukleinsyreanalog ifølge krav 22, ved at nevnte merke er et radioisotopmerke, et enzymerke, biotin, en fluorofor, et kjemiluminescensmerke, et antigen, et antistoff eller et spinnmerke.

15 24.

- In vitro-fremgangsmåte for oppfangning av en nukleinsyre, k a r a k t e r i s e r t v e d å bringe nevnte nukleinsyre i kontakt under hybridiseringsbetingelser med en nukleinsyreanalog som definert i hvilket som helst av kravene
20 12 til 23 immobilisert på et fast støttemedium, hvis nukleinsyreanalog har en sekvens av ligander egnet til å hybridisere til nevnte nukleinsyre.

25.

- 25 Fremgangsmåte ifølge krav 24, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte oppfangede nukleinsyre detekteres, gjenkjennes, kvantifiseres eller identifiseres ved behandling med et nukleinsyre-gjenkjenningsmiddel mens det er bundet til nevnte immobiliserte nukleinsyreanalog.

30

26.

- Fremgangsmåte ifølge krav 25, k a r a k t e r i s e r t v e d at den oppfangede nukleinsyren har en første region hybridisert til nevnte immobiliserte nukleinsyreanalog og en
35 andre region som ikke er så hybridisert og blir behandlet med en merket nukleinsyre eller merket nukleinsyreanalog som

tilpasses til å hybridisere til minst en del av nevnte andre region og nevnte merke kan detekteres.

27.

5 Fremgangsmåte ifølge krav 24, for oppfangig av et mRNA, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte immobiliserte nukleinsyreanalog omfatter sekvensielle ligander hybridiserbare til poly-A-haler fra nevnte mRNA til oppfangning av nevnte mRNA.

10

28.

Fremgangsmåte ifølge krav 24, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte sekvensielle lingander er tymin.

15 29.

Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av kravene 24, 27 eller 28, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte nukleinsyre, straks den er fanget opp, frigis fra nevnte immobiliserte nukleinsyreanalog ved å utsette den immobili-
20 serte nukleinsyreanologen og oppfangede nukleinsyren for dehybridiseringsbetingelser.

30.

Nukleinsyreanalog ifølge hvilket som helst av kravene 12 til
25 23, k a r a k t e r i s e r t v e d at den er immobilisert på et fast støttemateriale.

31.

Immobilisert nukleinsyreanalog ifølge krav 30, k a r a k -
30 t e r i s e r t v e d at den er inkorporert i en affinitetsoppfangingskolonne.

32.

In vitro-fremgangsmåte for å gjenkjenne, detektere eller
35 kvantifisere en målnukleinsyre, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter å hybridisere nevnte målnukleinsyre til en merket nukleinsyreanalog ifølge hvilket som helst av

kravene 1 til 11 for tilstrekkelig å komplementere sekvensen til derved å hybridisere under hybridiseringsbetingelser og detekttere eller kvantifisere mere av nevnte nukleinsyreanalog som så blir hybridisert til nevnte målnukleinsyre.

5

33.

Fremgangsmåte ifølge krav 32, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte målnukleinsyre blir immobilisert på et substrat forut for nevnte hybridisering.

10

34.

Fremgangsmåte ifølge krav 33, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte målnukleinsyre blir immobilisert til nevnte substrat ved hybridiseringen av en første region derav for en oppfangning av nukleinsyre eller nukleinsyreanalog som har en sekvens tilstrekkelig komplementær til første region for å hybridisere derved og som i seg selv er immobilisert til nevnte substrat og hvori nevnte merkede nukleinsyreanalog hybridiserer til en andre region av nevnte målnukleinsyre.

20

35.

In vitro-fremgangsmåte for å erstatte én tråd fra nukleinsyredupleks, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter å hybridisere til nevnte dupleks en nukleinsyreanalog ifølge krav 3, som har en affinitet for den andre tråden av nevnte dupleks tilstrekkelig til å være istand til å erstatte nevnte ene tråd derfra.

25

36.

In vitro-fremgangsmåte for å detekttere, identifisere eller kvantifisere en dobbelttrådet målnukleinsyre, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter å hybridisere dertil en erstatningsnukleinsyreanalog ifølge krav 3, istand til å erstatte én tråd fra en dobbelttrådet målnukleinsyre hvori den andre tråden er av komplementær sekvens til nevnte erstattede nukleinsyreanalog, hvori nevnte erstattede nukleinsyreanalog er av tilstrekkelig komplementær sekvens til nevnte andre

35

tråd av nevnte dobbelttrådet målnukleinsyre for å hybridisere dertil for å erstatte nevnte ene tråd av nevnte målnukleinsyre i enkelttrådet form, og detektere eller kvantifisere tilstedeværelse av nevnte ene erstattede tråd.

5

37.

Fremgangsmåte ifølge krav 36, k a r a k t e r i s e r t v e d at den erstattede tråden blir brutt ned til fragmenter og tilstedeværelsen av nevnte fragmenter detekteres.

10

38.

Fremgangsmåte ifølge krav 37, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte erstattede tråd blir brutt ned ved angrep av en nuklease.

15

39.

Anvendelse for in vitro-deteksjon eller isolering av en spesifikk nukleinsyre fra en oligonukleotidanalogue som binder mer sterkt til dens komplementære sDNA eller RNA-tråder enn det korresponderende DNA eller RNA, respektivt.

20

40.

Kit for anvendelse i en diagnostisk prosedyre, k a r a k t e r i s e r t v e d at kittet omfatter minst én merket nukleinsyreanalog ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 11, og minst ett deteksjonsreagens for å detektere nevnte merkede nukleinsyreanalog.

25

41.

Kit ifølge krav 40, k a r a k t e r i s e r t v e d ytterligere å inkludere en nukleinsyreanalog som definert i et hvilket som helst av kravene 12 til 20 immobilisert på et fast støttemateriale.

30

42.

Kit, k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter en immobilisert nukleinsyreanalog ifølge krav 30, i kombinasjon

35

med minst ett nukleinsyregjenkjennende middel, for å
detektere tilstedeværelsen av nukleinsyre oppfanget ved
anvendelse av nevnte nukleinsyreanalog.

5 43.

Kit ifølge krav 42, k a r a k t e r i s e r t v e d at
nevnte nukleinsyregjenkjenningsmiddel er en merket nuklein-
syre.

10

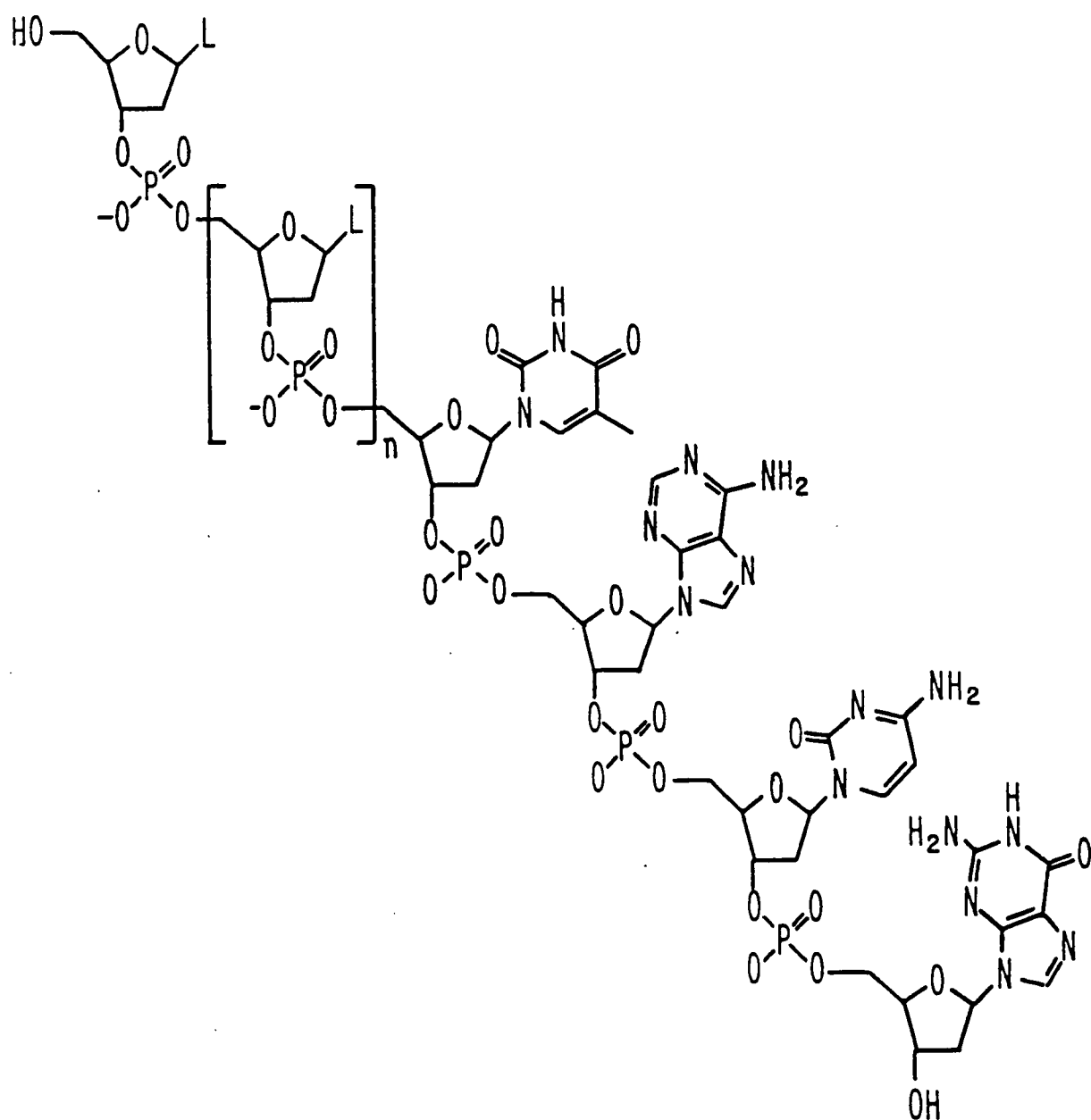
15

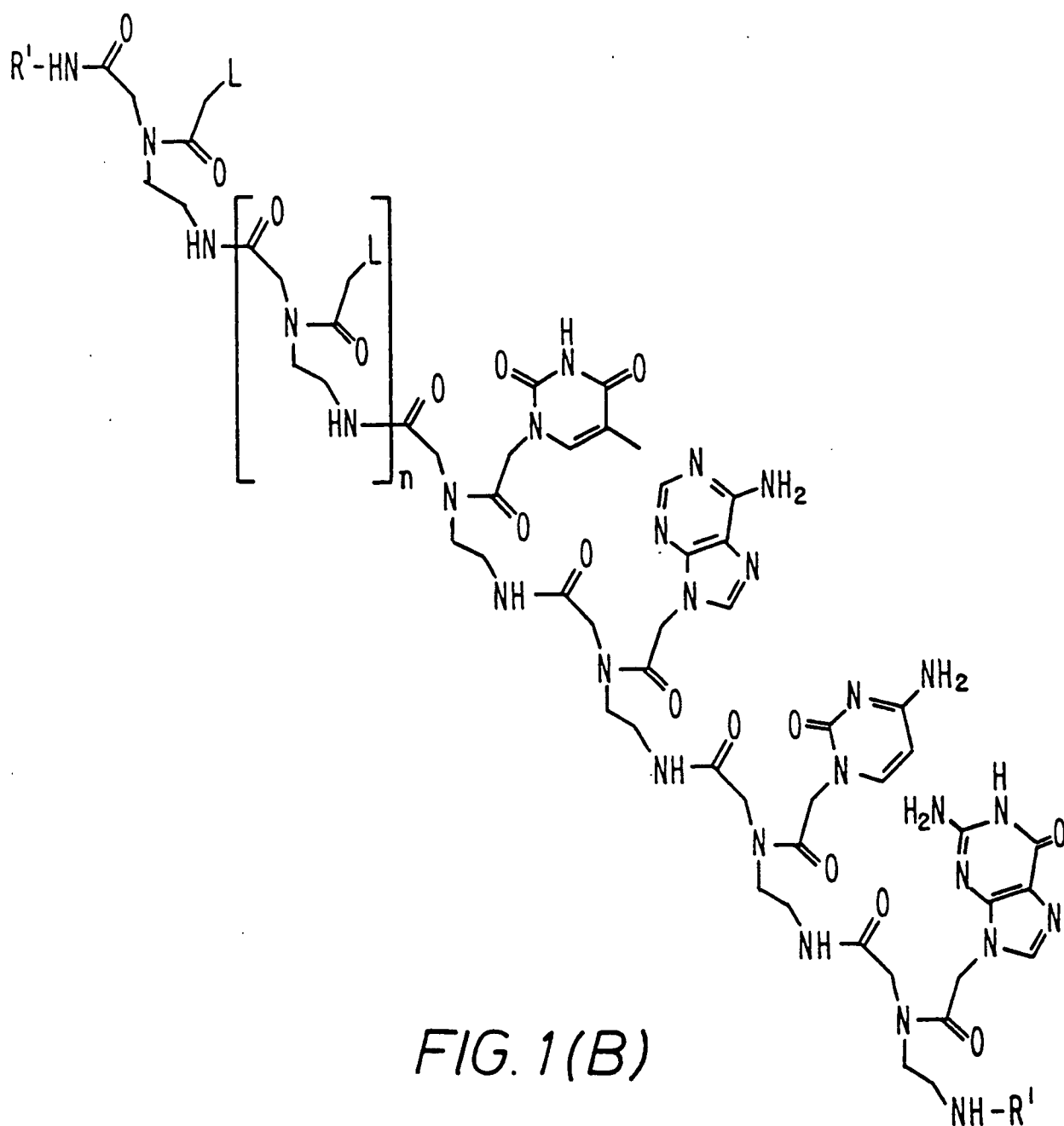
20

25

30

35

*FIG. 1(A)*



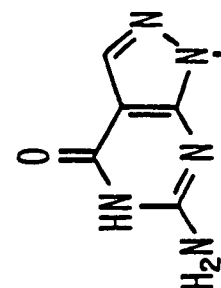
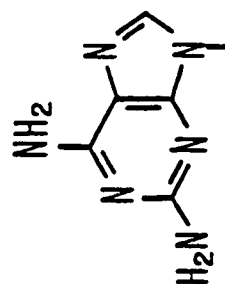
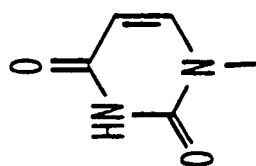
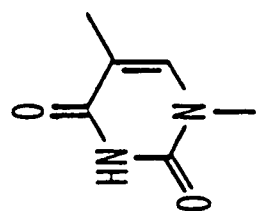
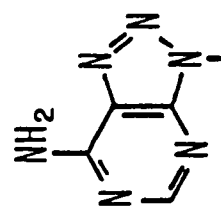
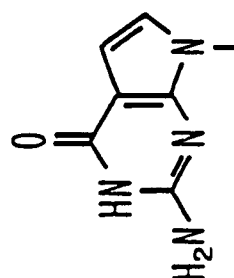
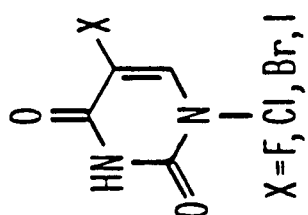
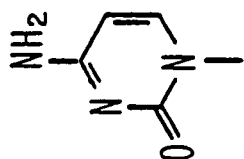
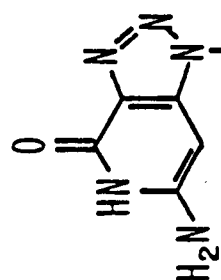
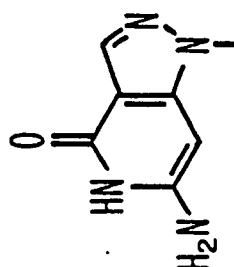
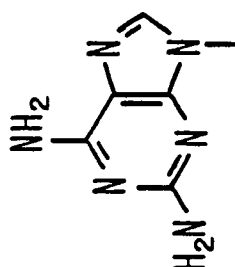
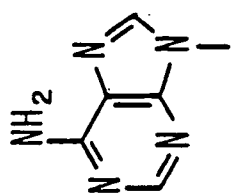
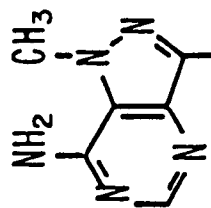
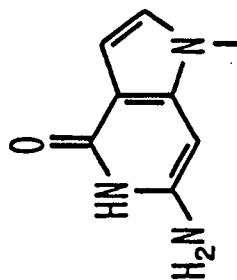
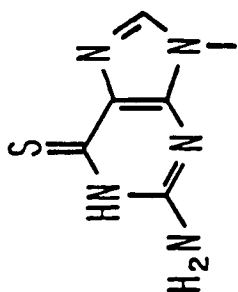
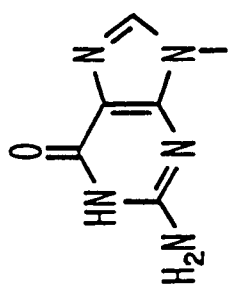


FIG. 2(A)

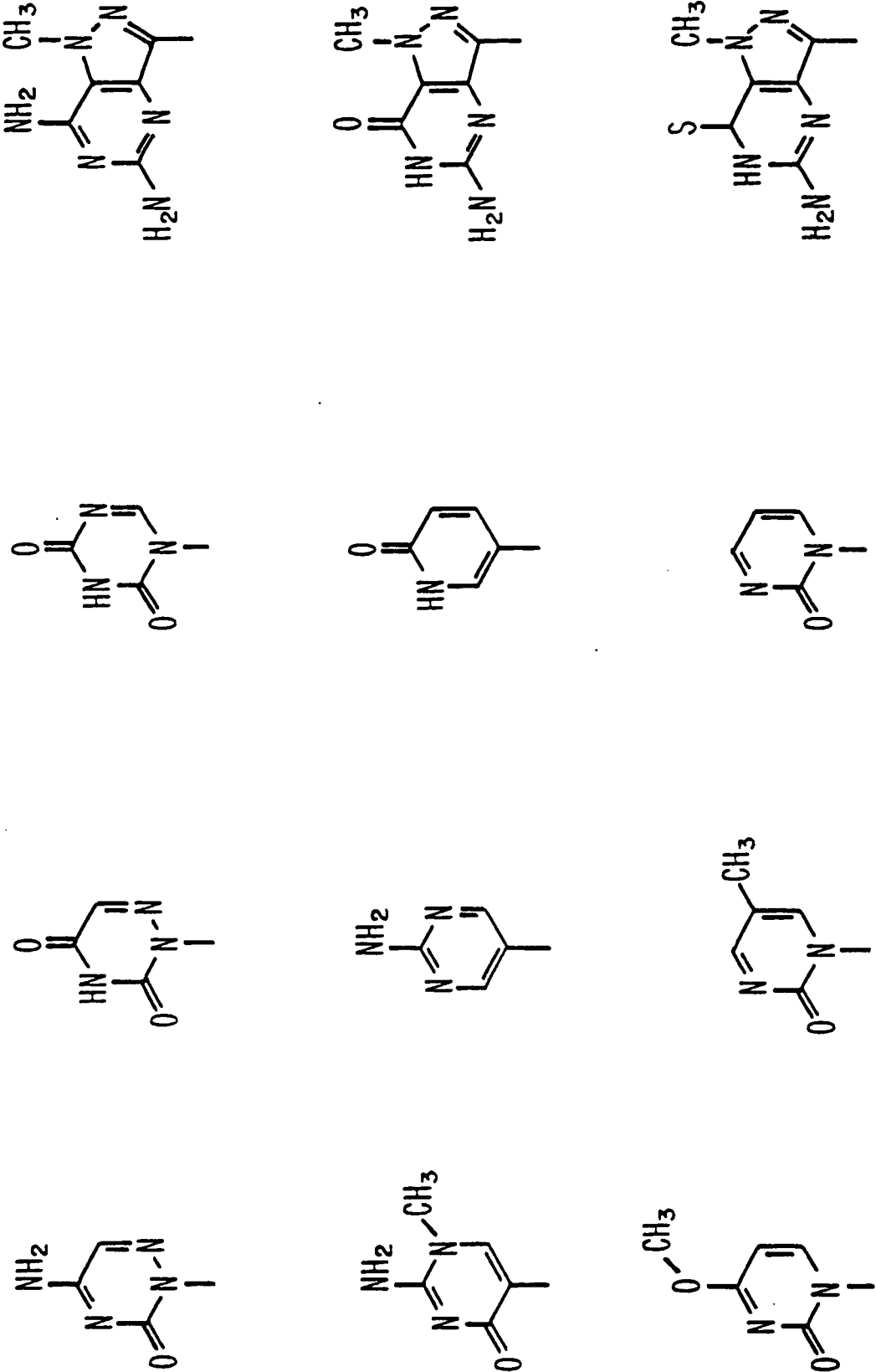
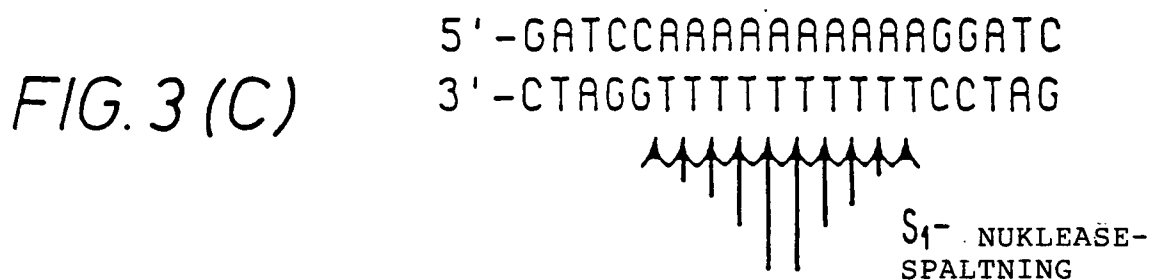
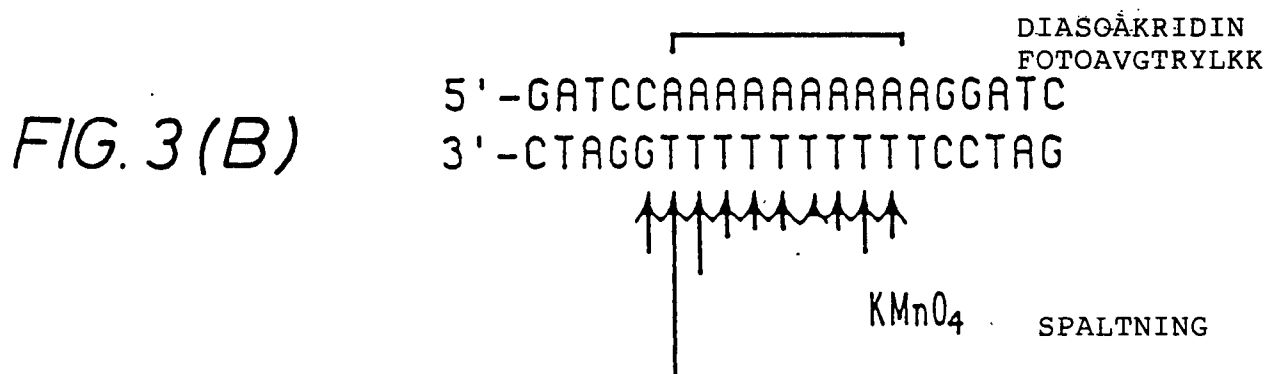
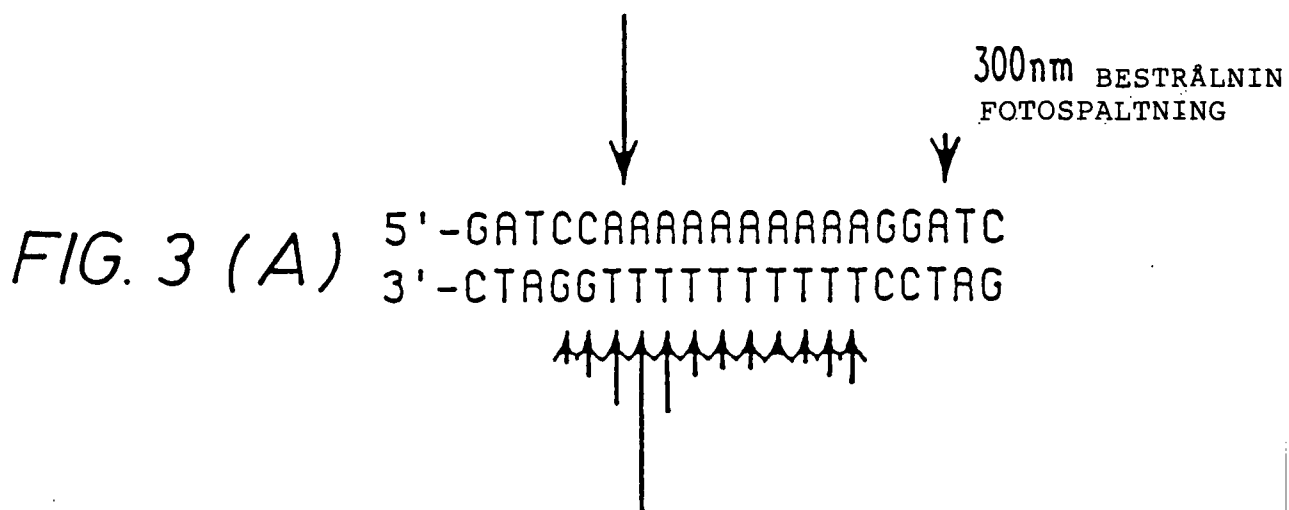


FIG. 2(B)



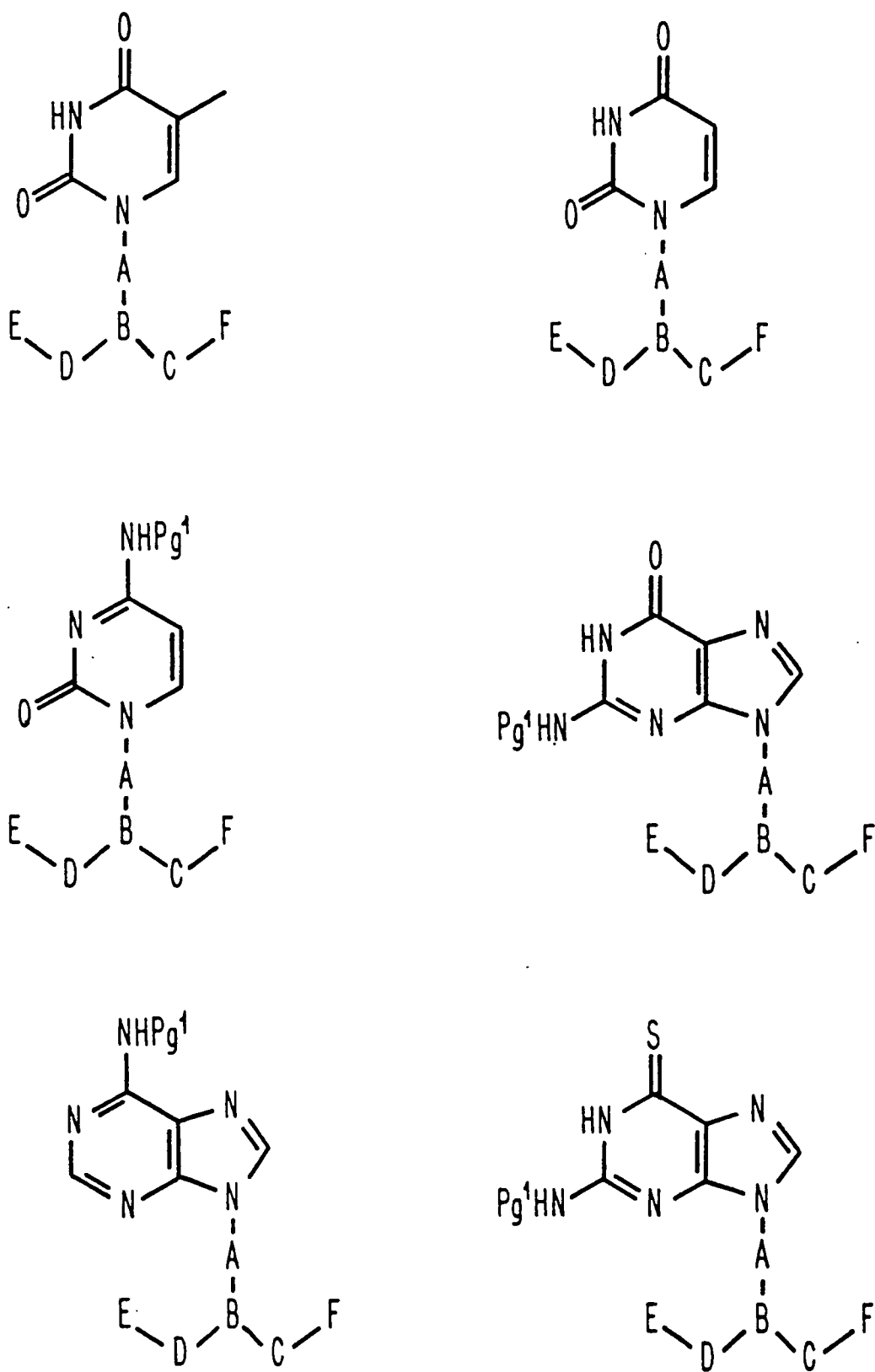


FIG. 4

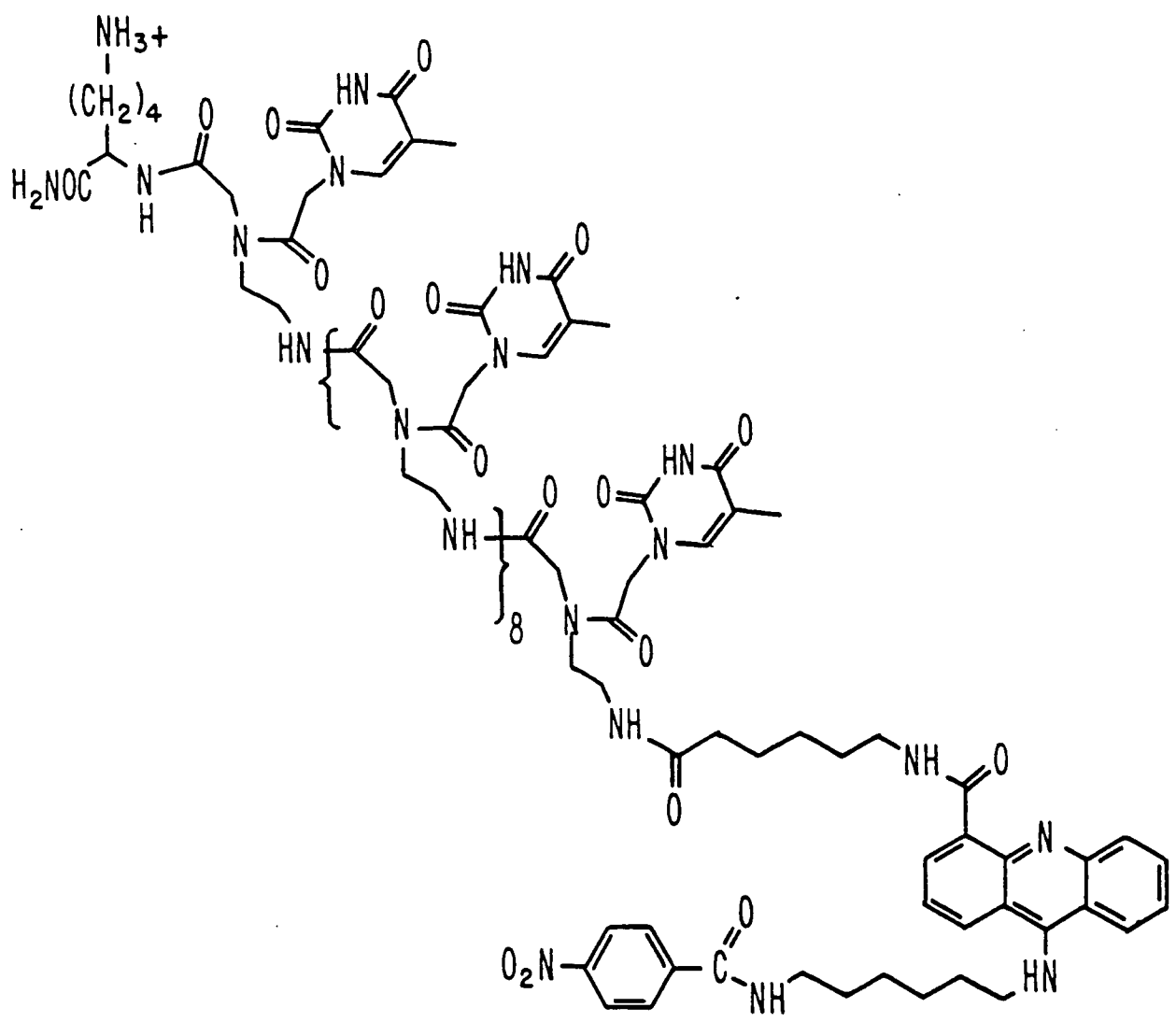
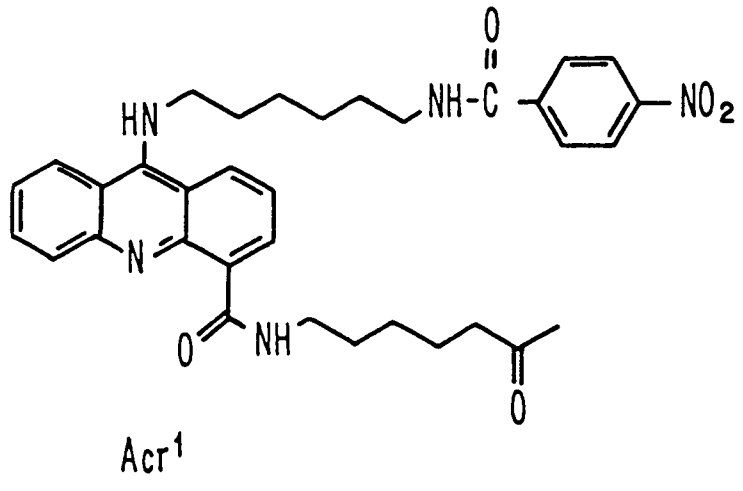
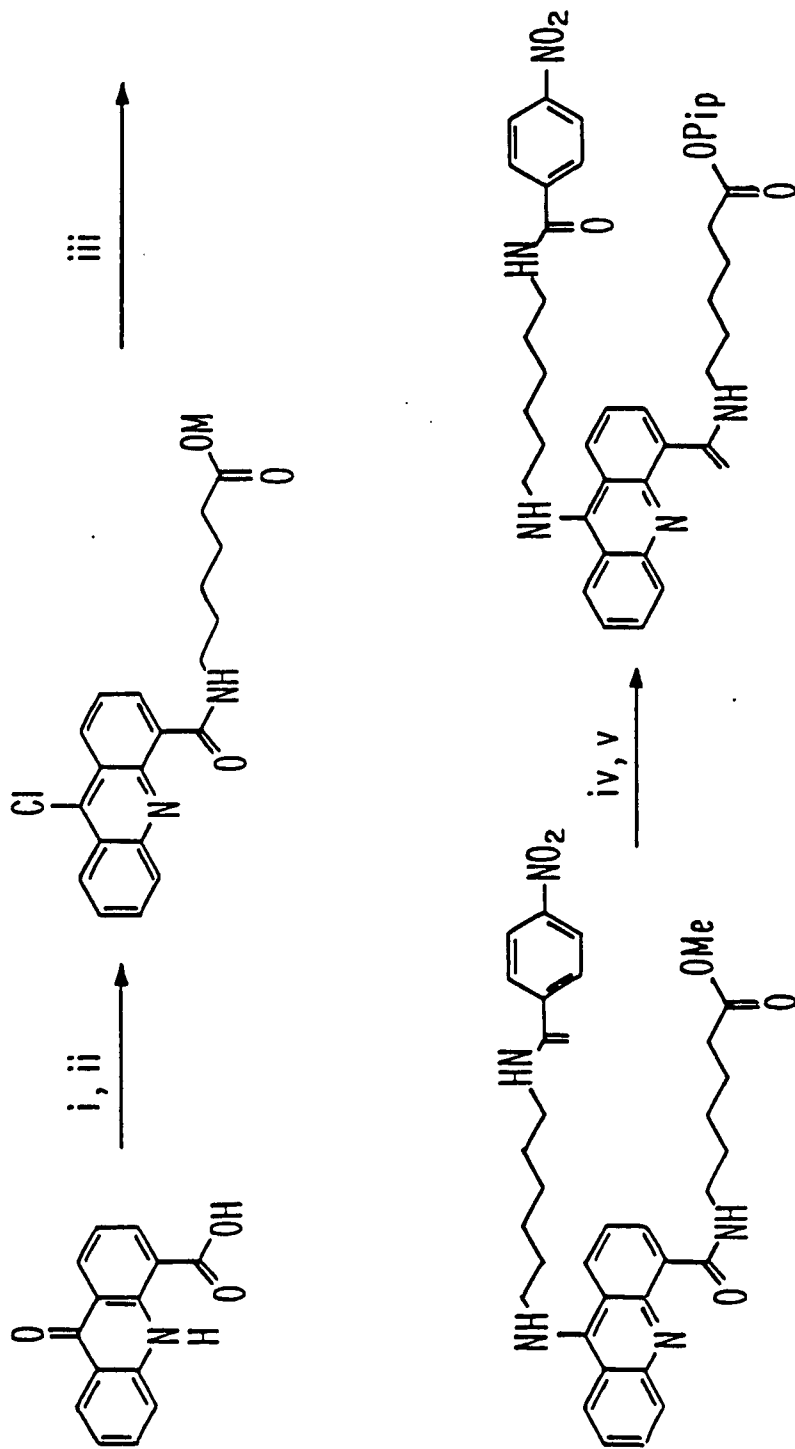


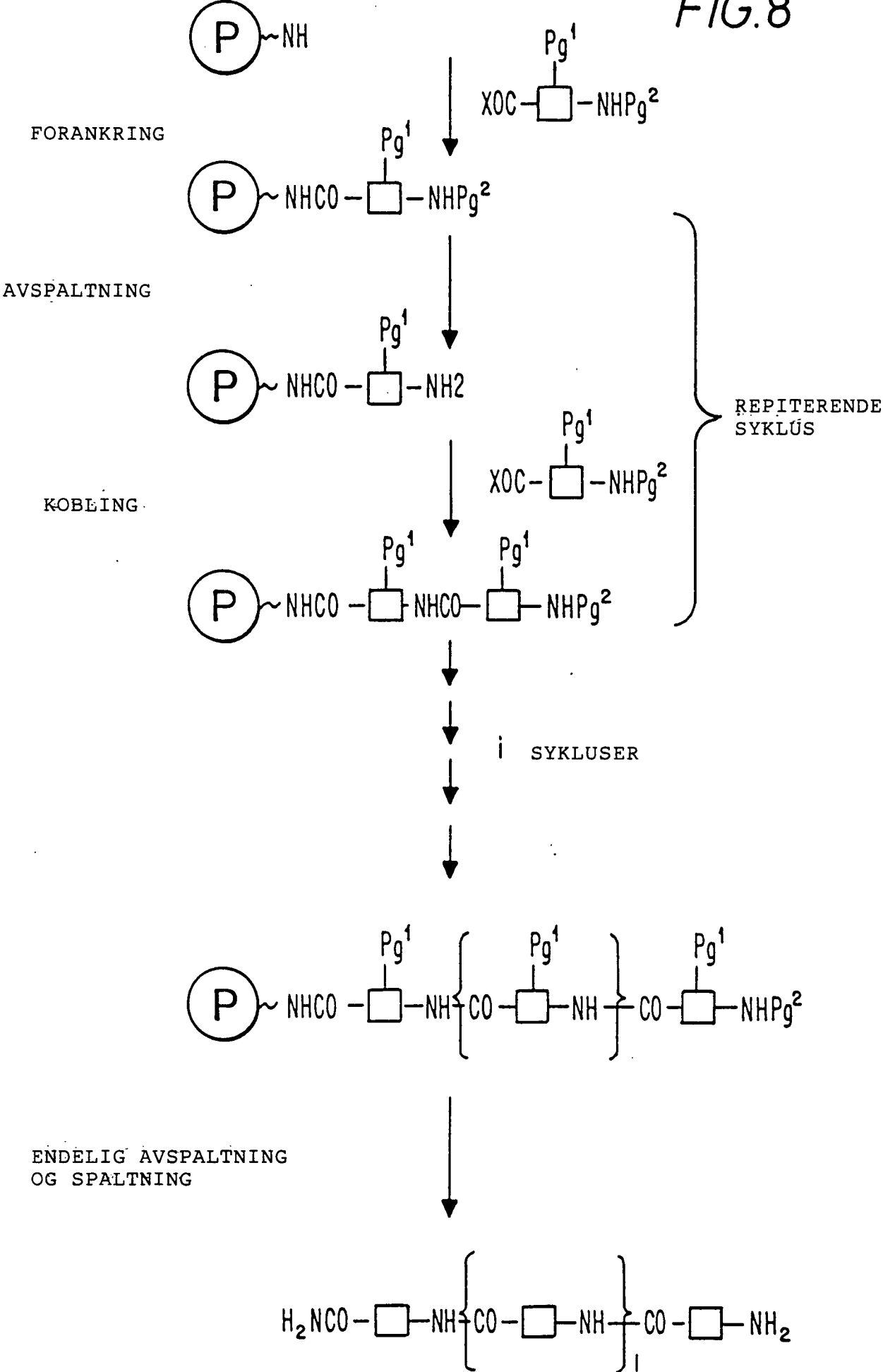
FIG. 5



- I) SOCl₂/DMF(cat.)_{REFLUKS}
- II) ⁺H₂N(CH₂)₅CO₂CH₃/Et₃N/CH₂Cl₂ AT 0°C
- III) PhOH/4-NO₂-Ph-CONH(CH₂)₆NH₂ AT 120°C
- IV) DMF/aq. NaOH
- V) DMF/CH₂Cl₂/PipOH/DCC

FIG.7

FIG.8



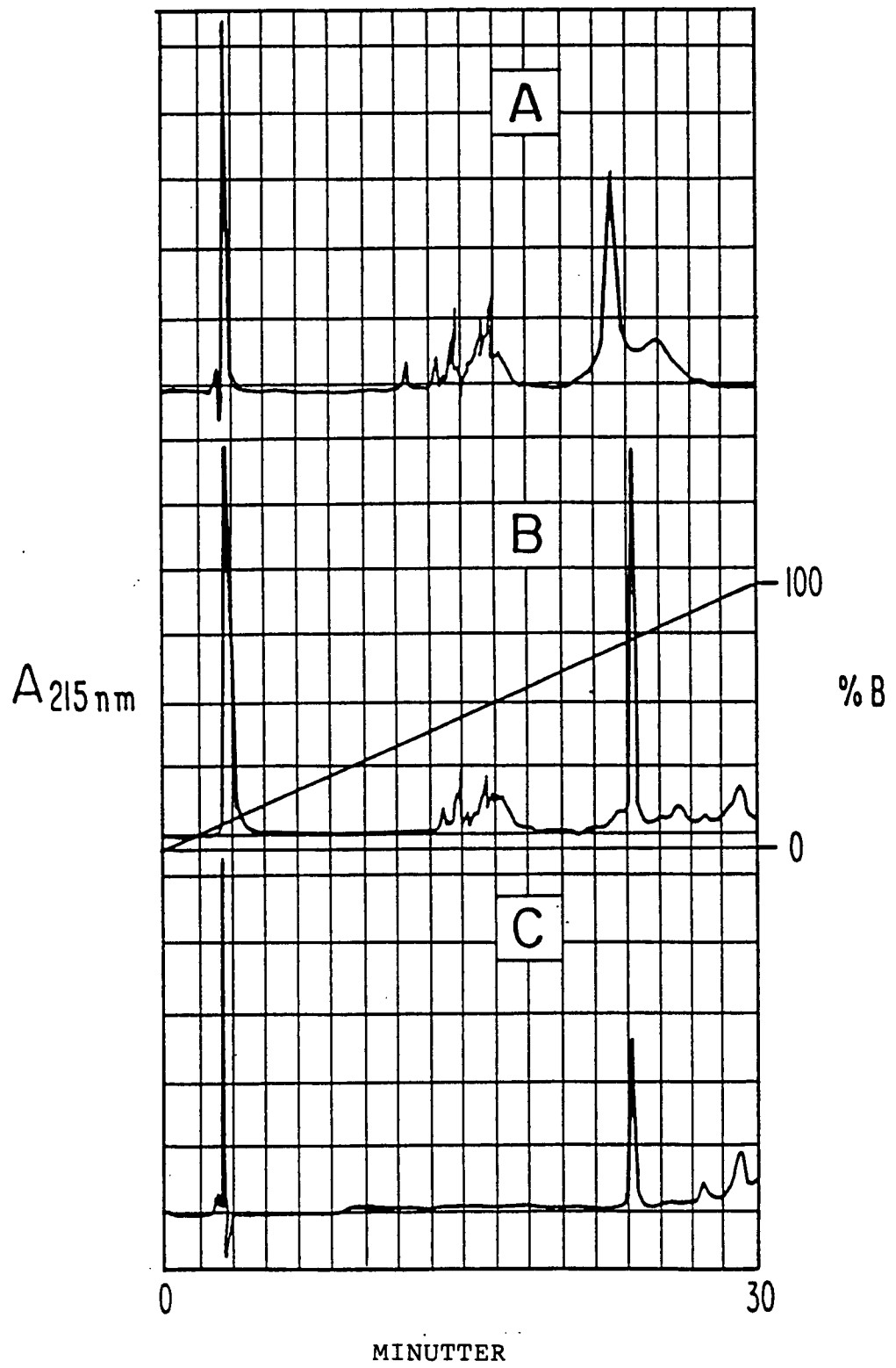


FIG. 9

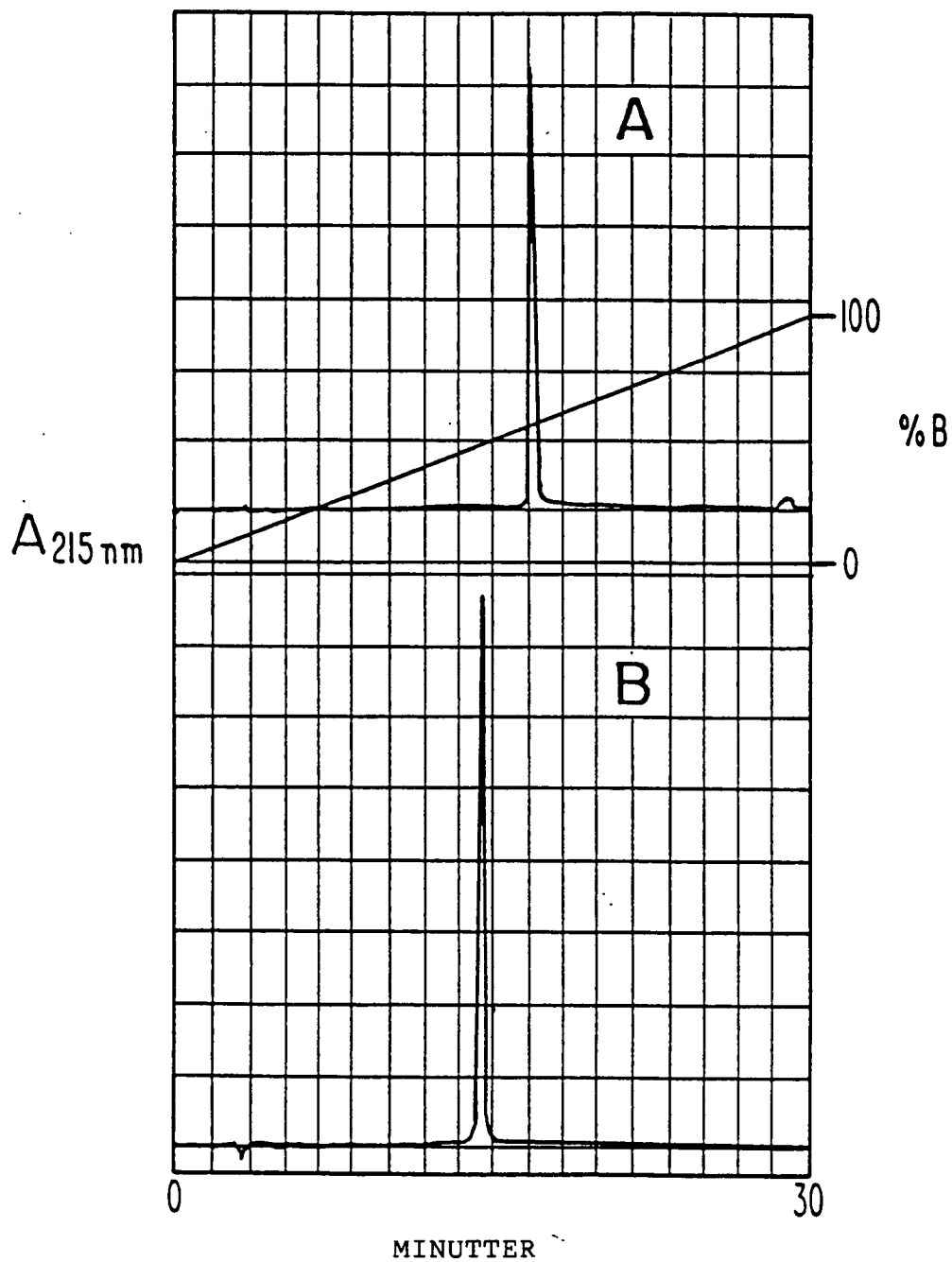


FIG. 10

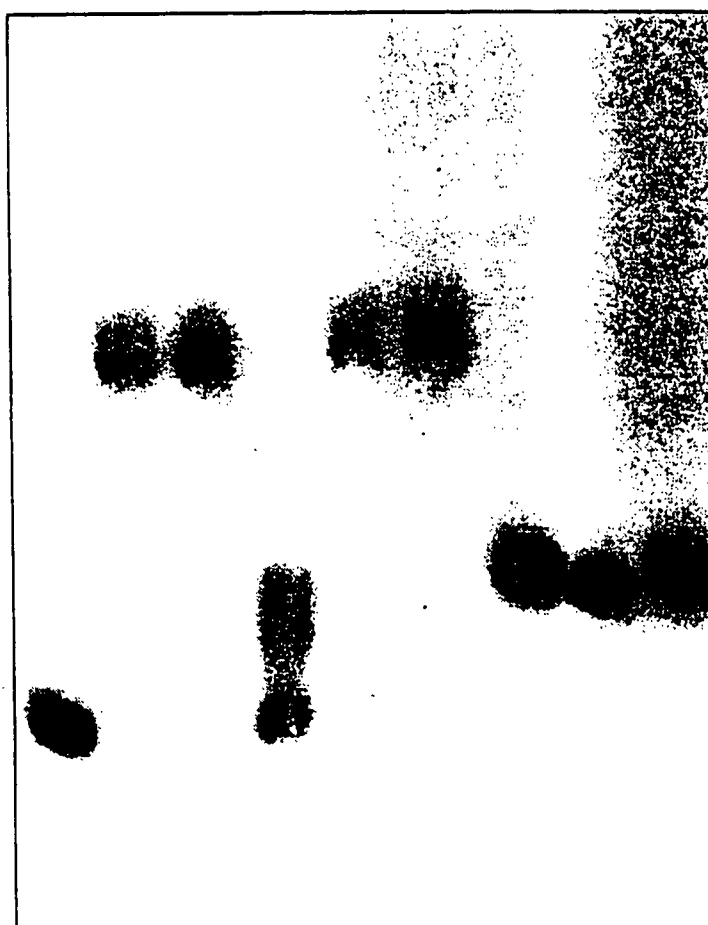
FIG. 11a

³² P-oligo	1	1	1	1	1	1	2	2	2
oligo 2	-	-	-	+	+	+	-	-	-
PNA-1	-	+	++	-	+	++	-	+	++
	1	2	3	4	5	6	7	8	9

PNA/DNA-
kompleks

dsDNA

ssDNA



ssDNA

FIG. 11b

³² P-oligo	1	1	1	1	1	1	2	2	2
oligo 2	-	-	-	+	+	+	-	-	-
PNA-1	-	+	++	-	+	++	-	+	++
	1	2	3	4	5	6	7	8	9

PNA/DNA-
kompleks

ssDNA

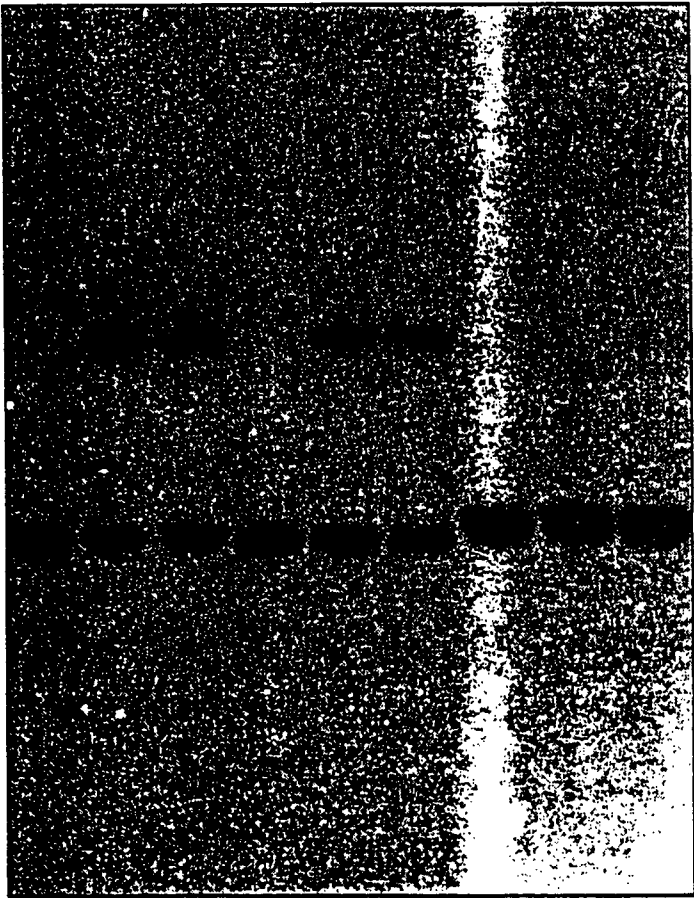


FIG. 12a

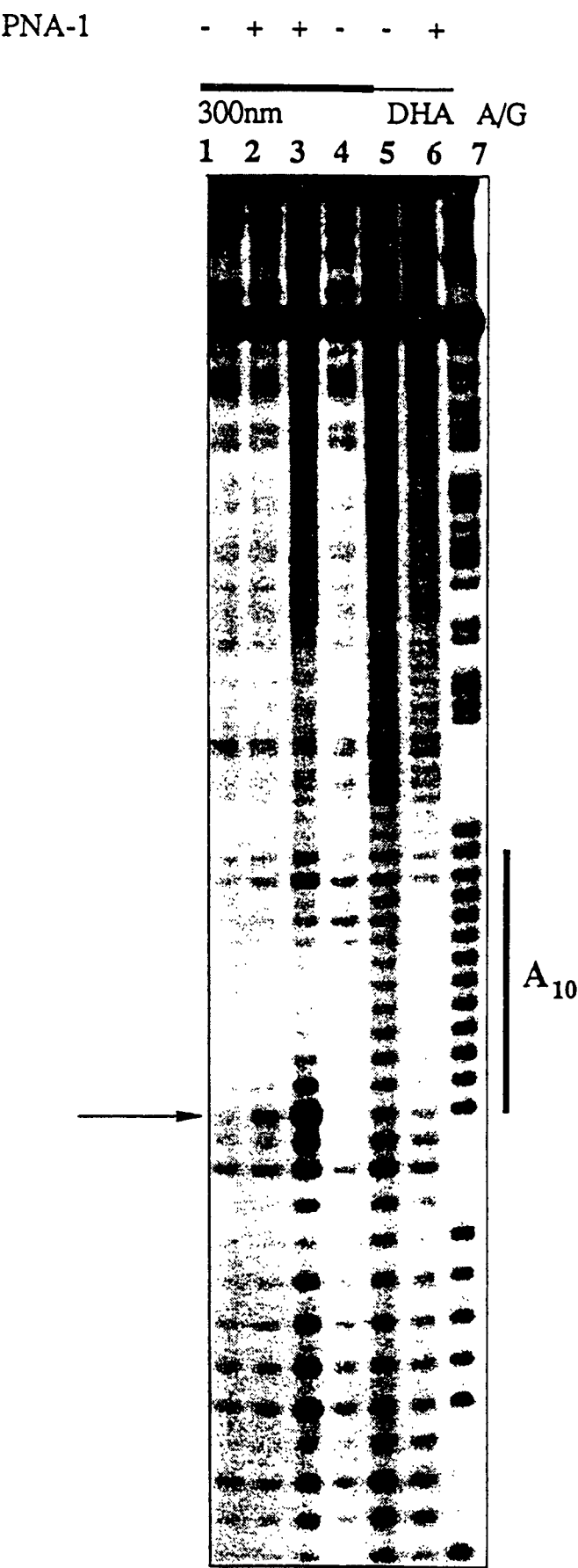


FIG. 12b

PNA-1 - + ++ - + ++ - - + +
300nm KMnO₄ c staph A/G
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

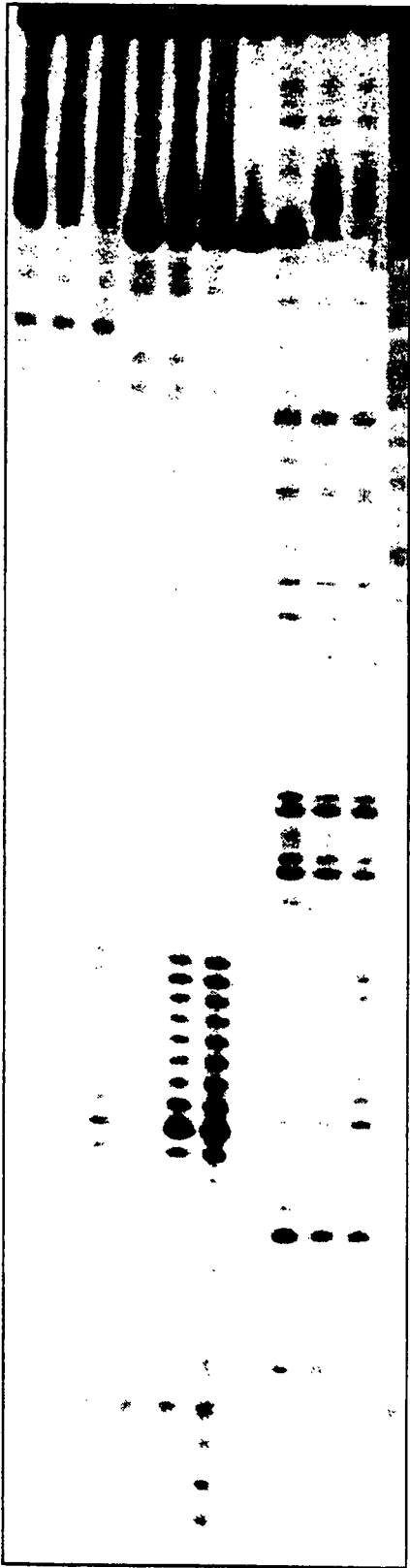
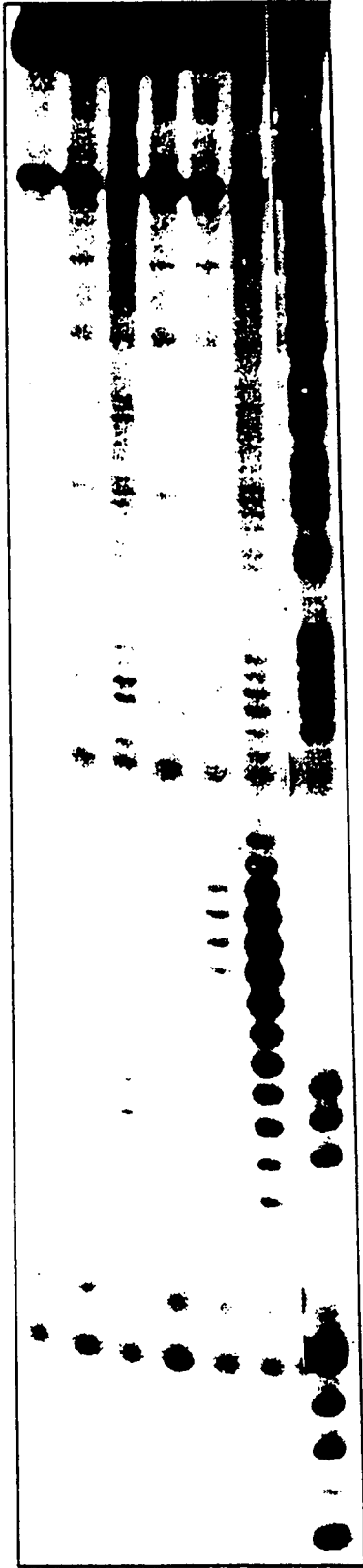


FIG. 12c

S_1 -nuklease	5	50	500	5	50	500	
PNA-1	-	-	-	+	+	+	A/G
	1	2	3	4	5	6	7



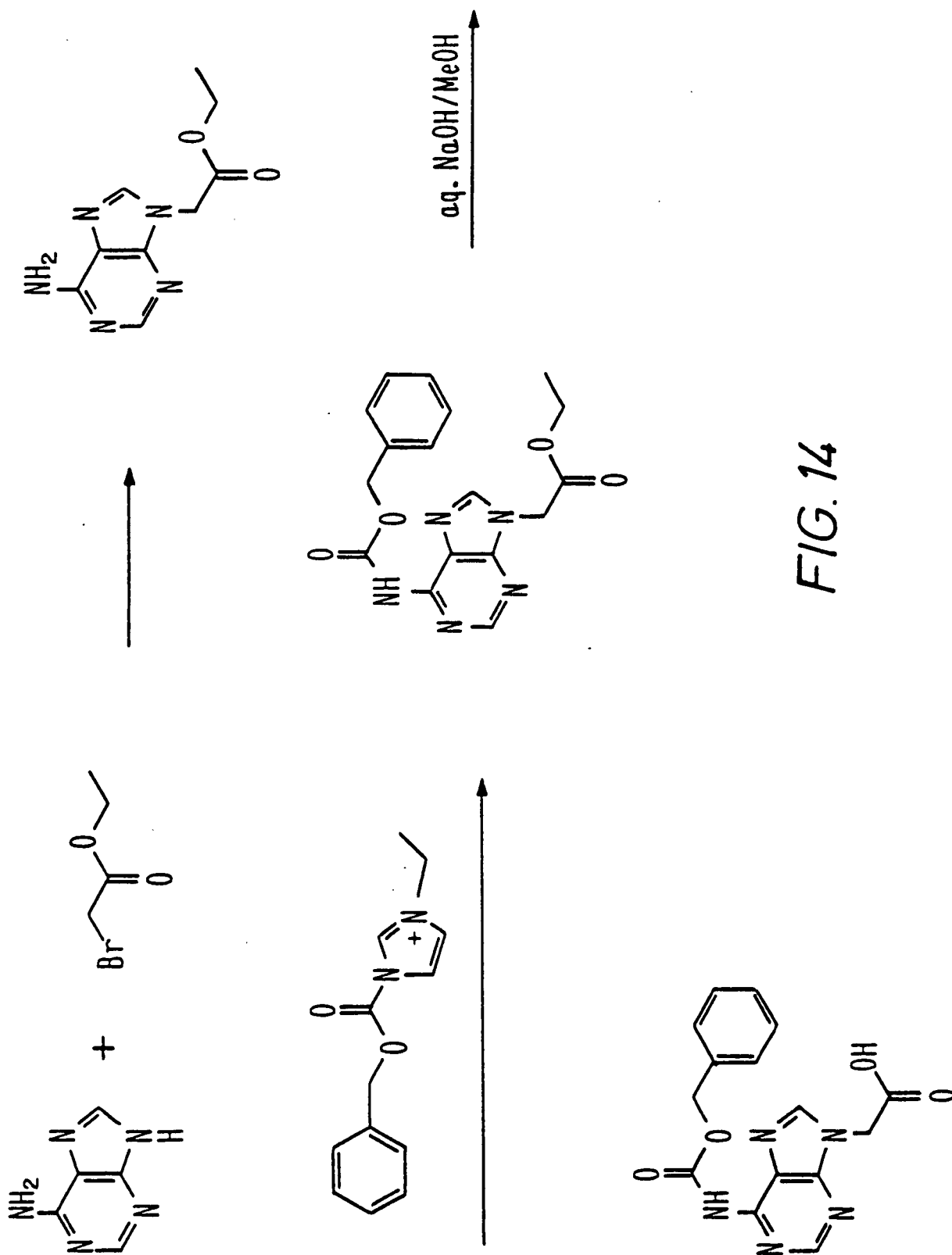


FIG. 14

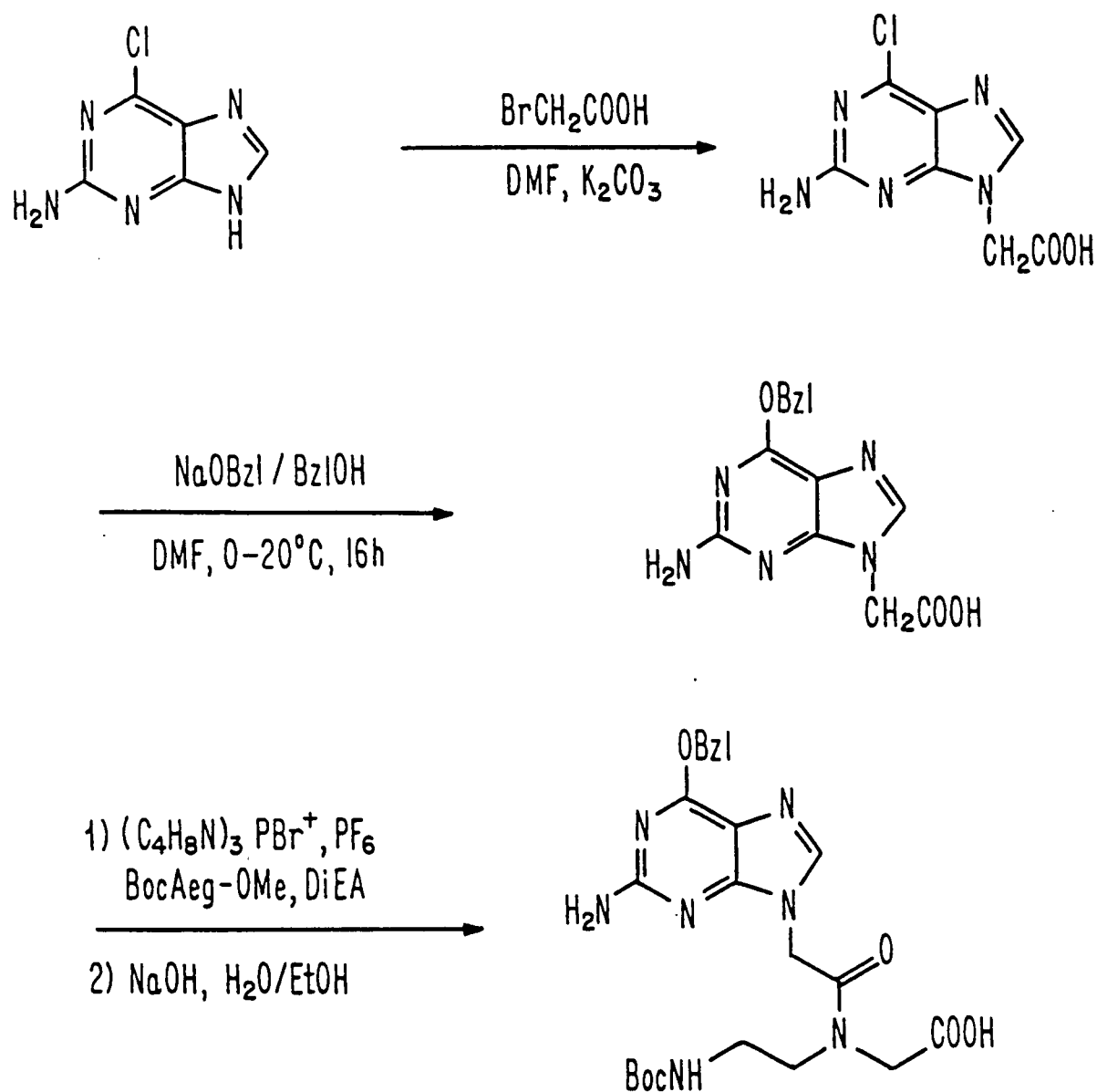


FIG. 15

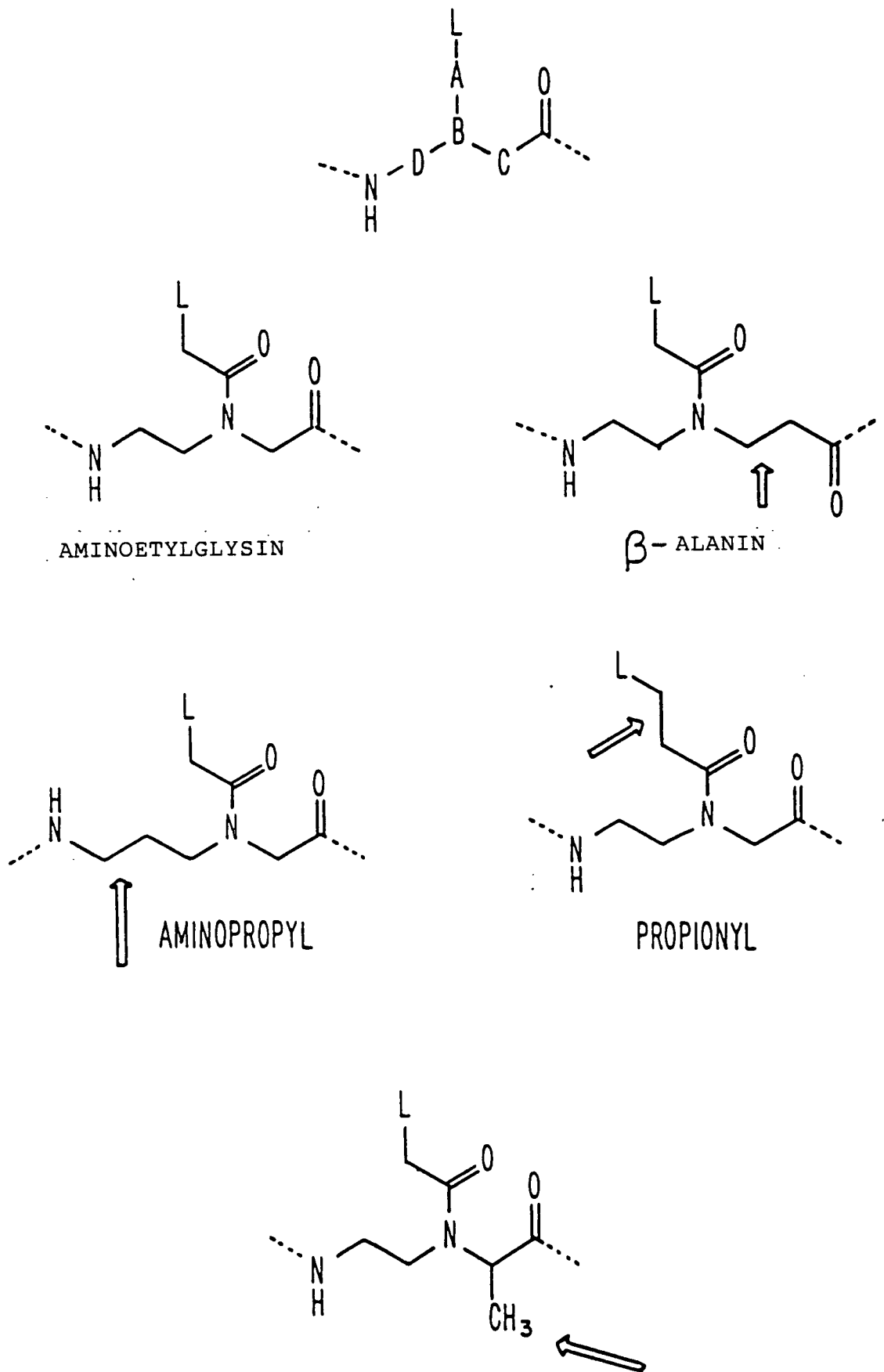


FIG.16

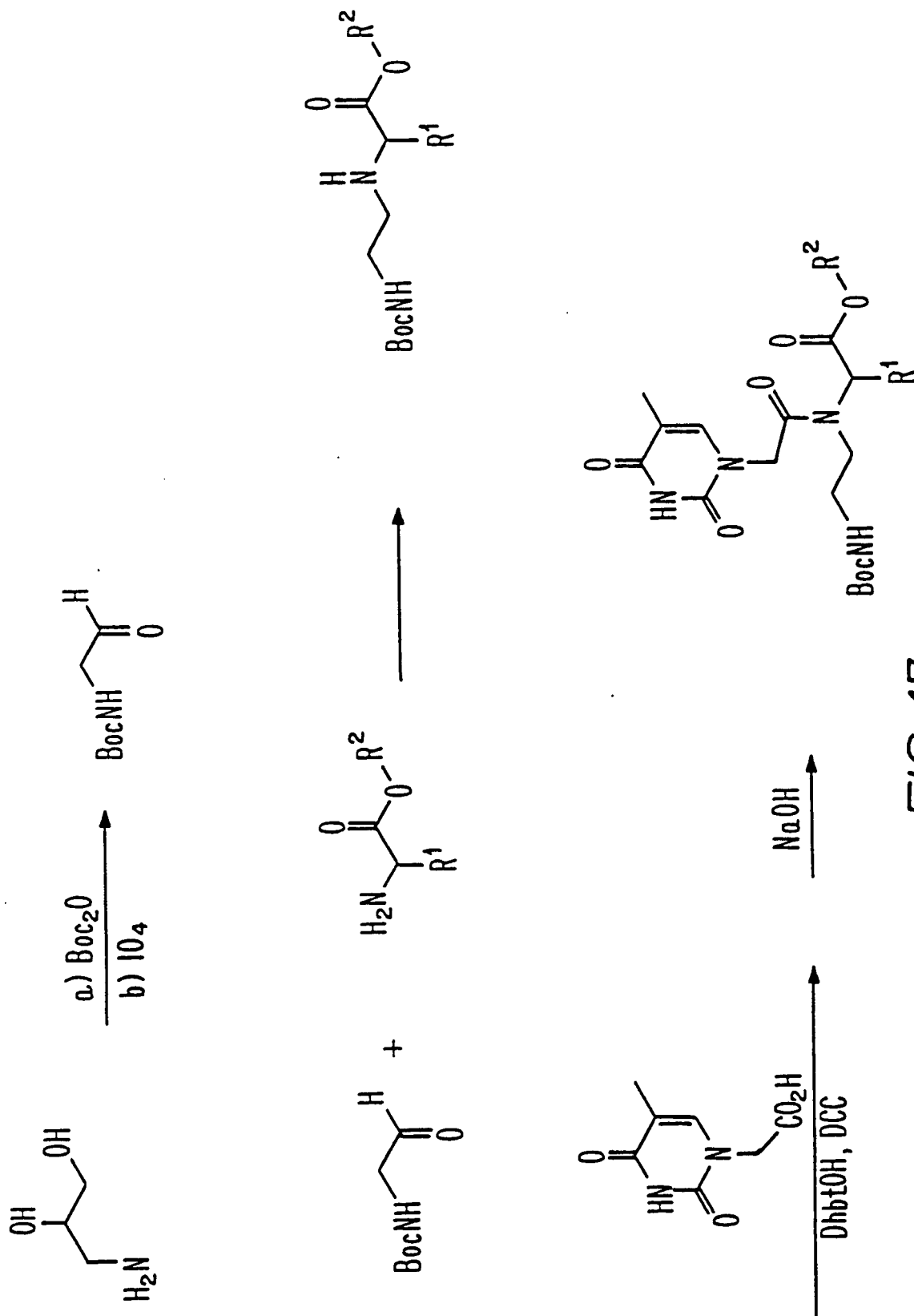


FIG. 17

$\text{R}^1 =$ AMINOSYRE SIDEKJEDE

$\text{R}^2 =$ METY, ETYL OSV.

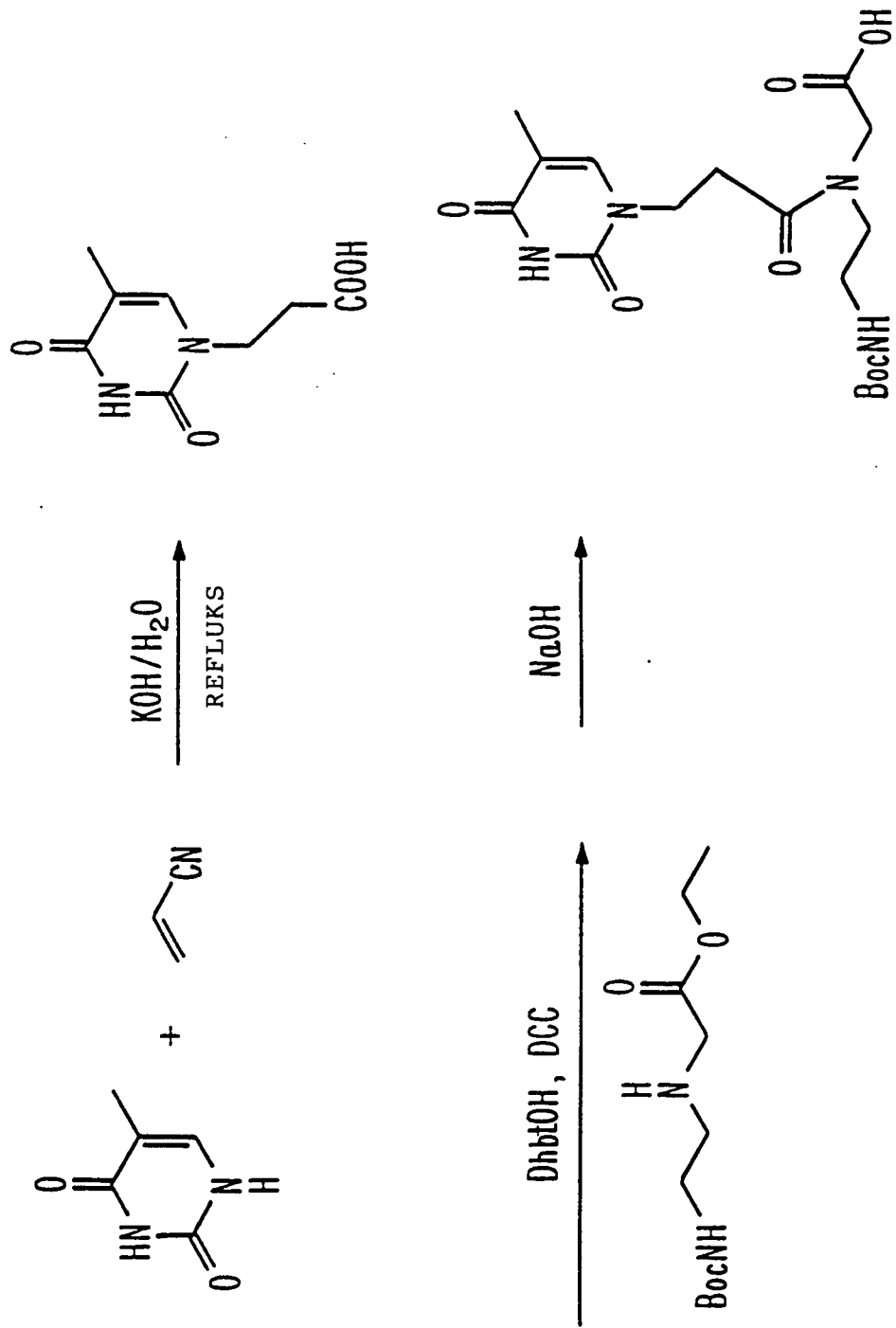


FIG. 18(B)

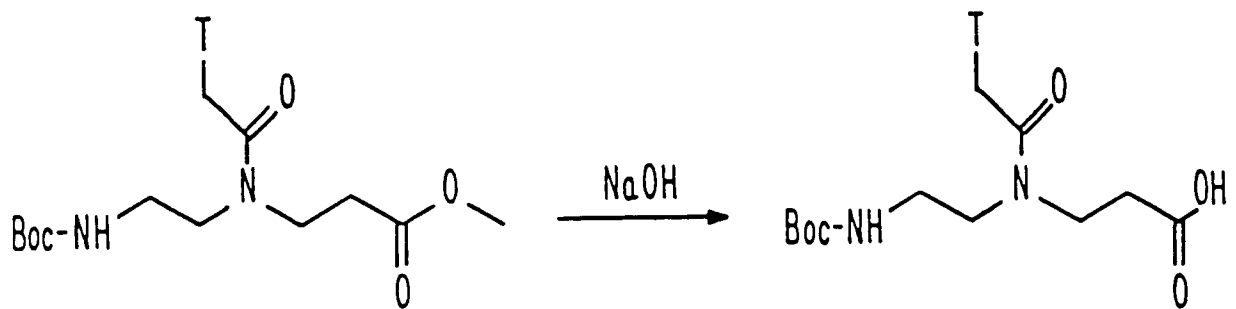
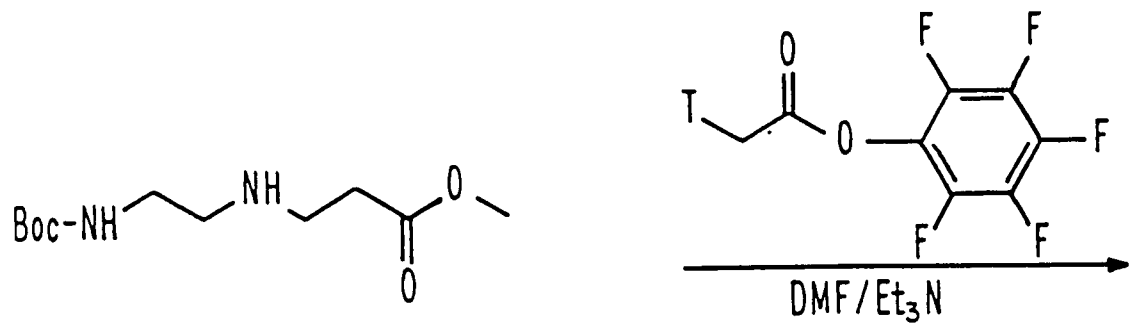
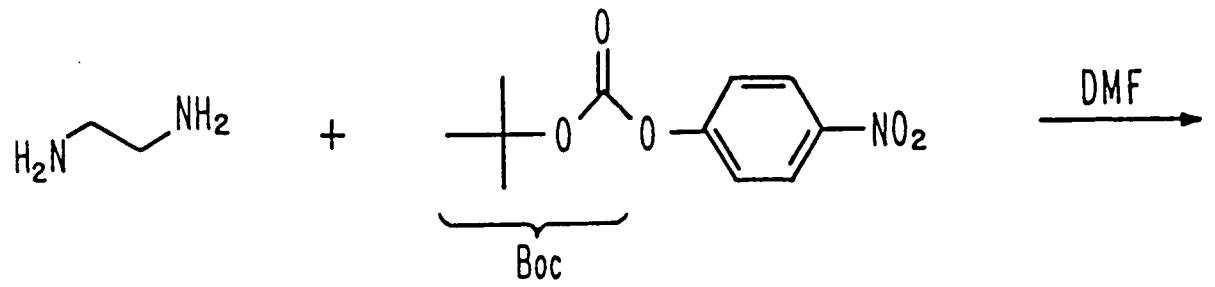
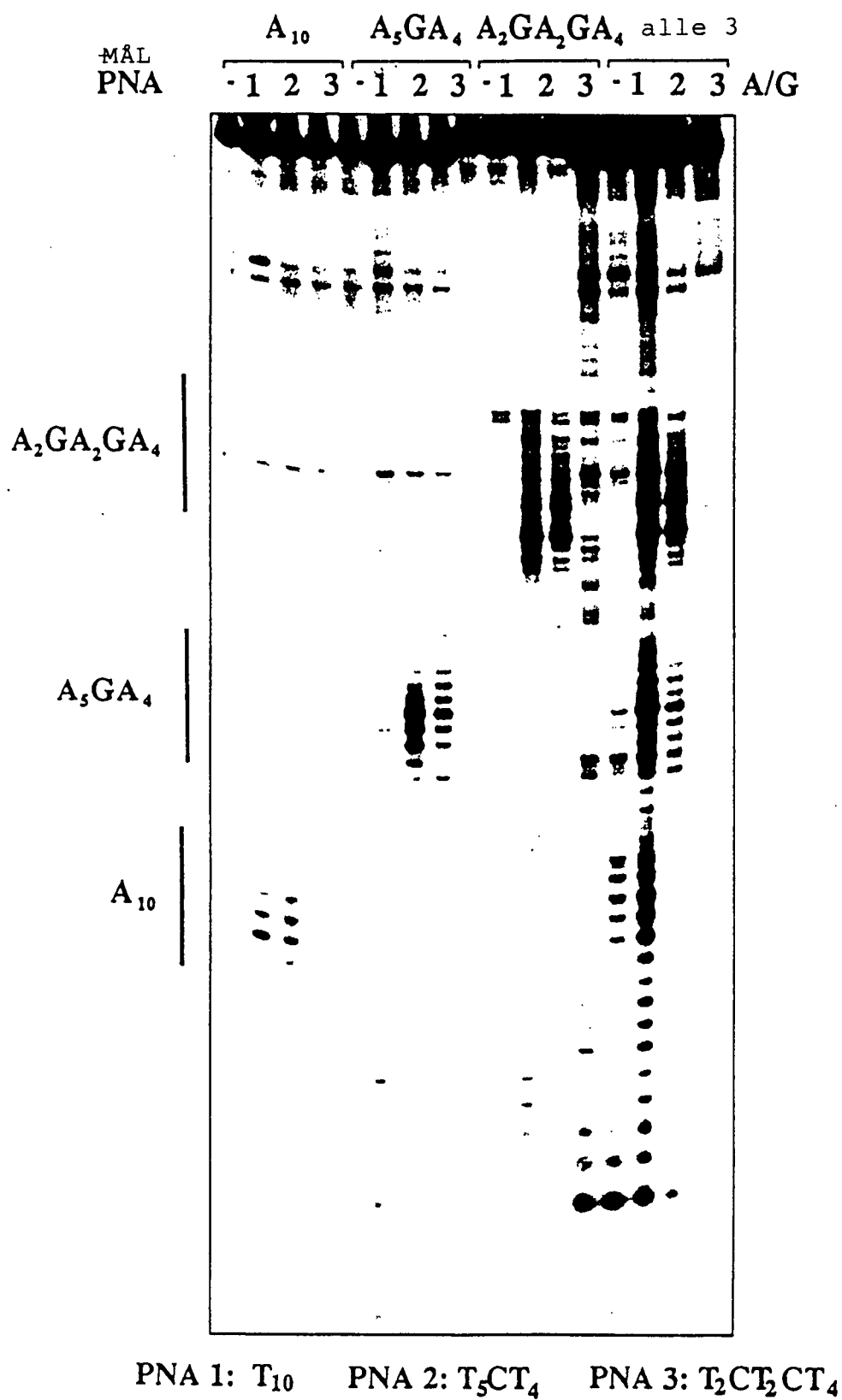


FIG. 19

FIG. 20



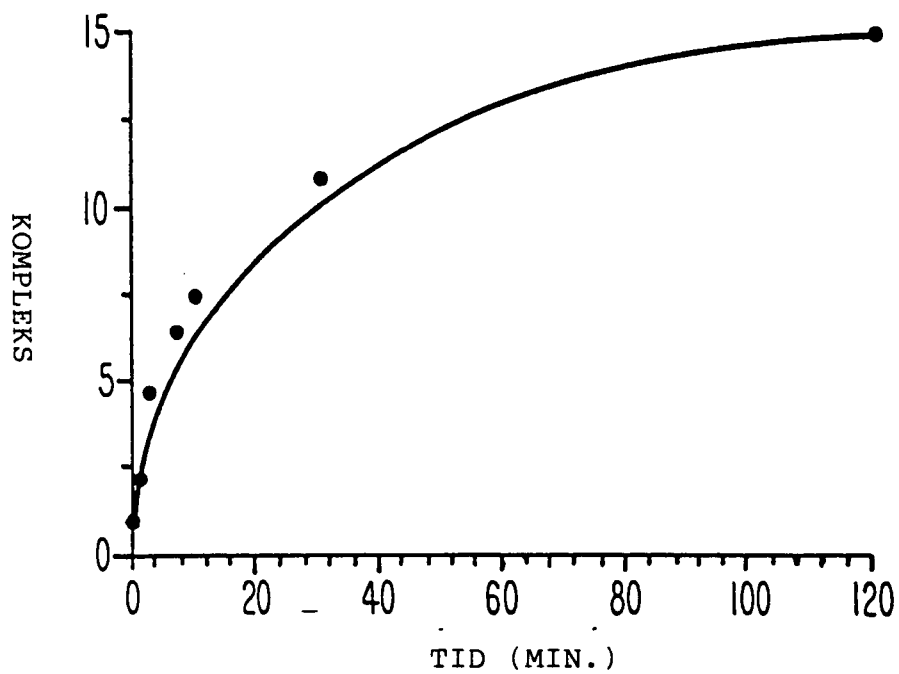


FIG. 21

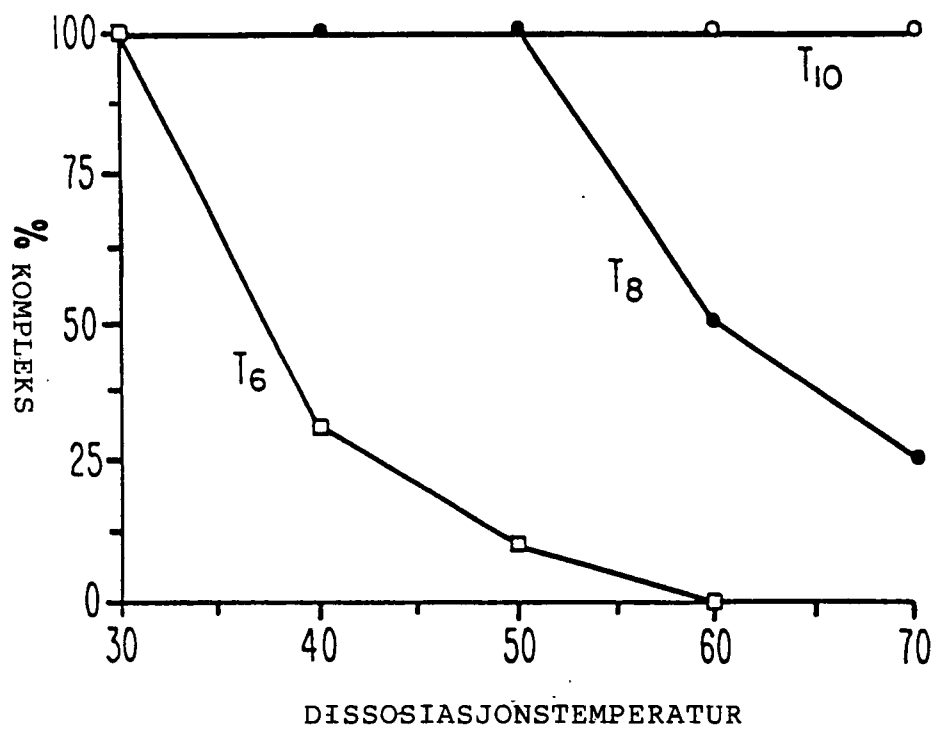


FIG. 22

FIG. 23

Inhibisjon av restriksjonsensymspaltning ved PNA

PNA/DNA 0 0.006 0.02 0.06 0.2 0.6

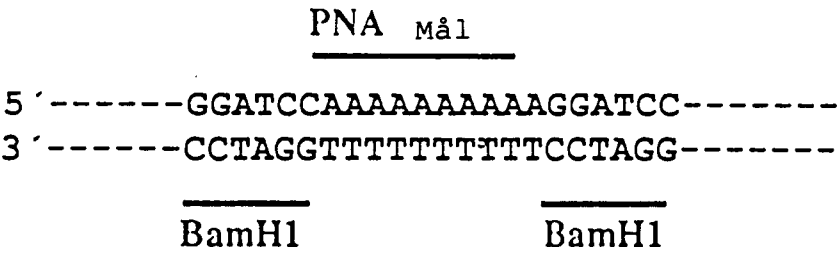
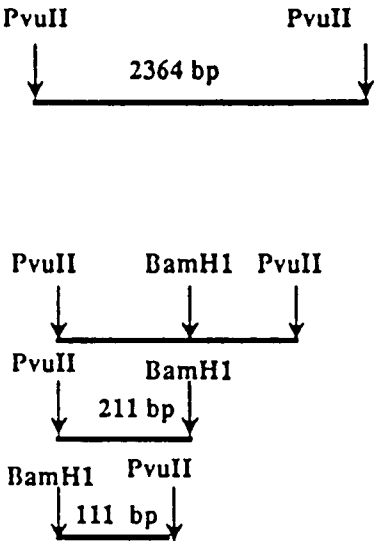
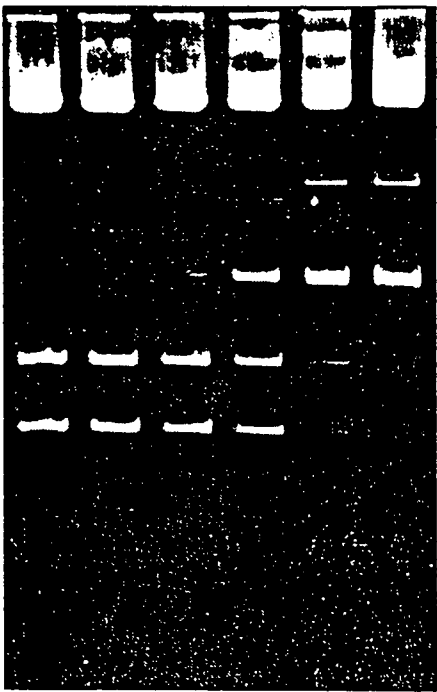


FIG. 24

Binding av ¹²⁵I-Tyr-PNA-T₁₀ to dA₁₀

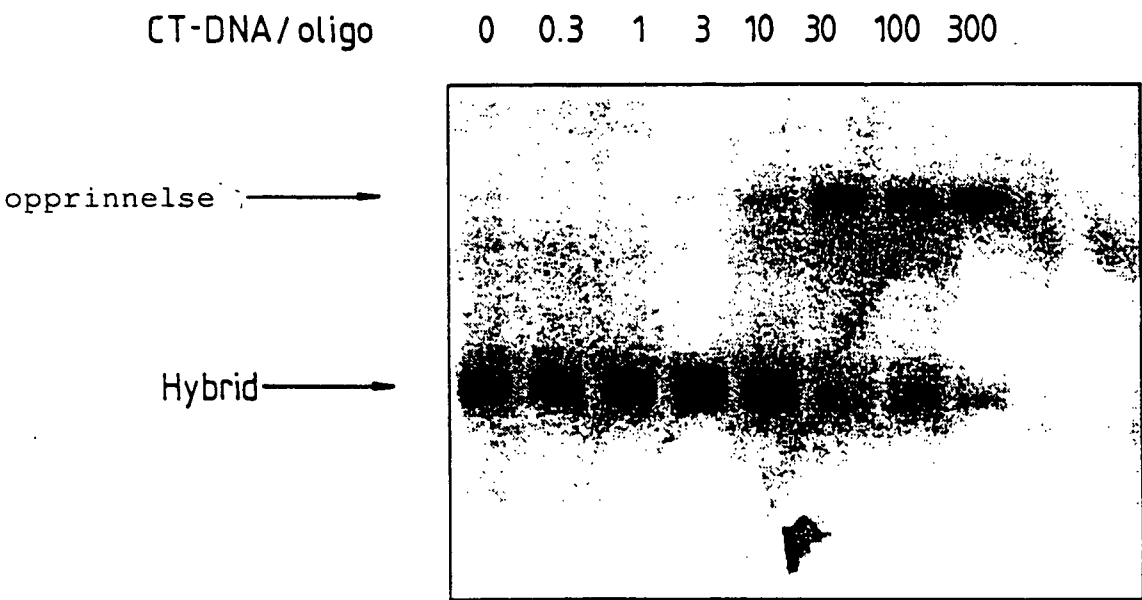


FIG. 25a

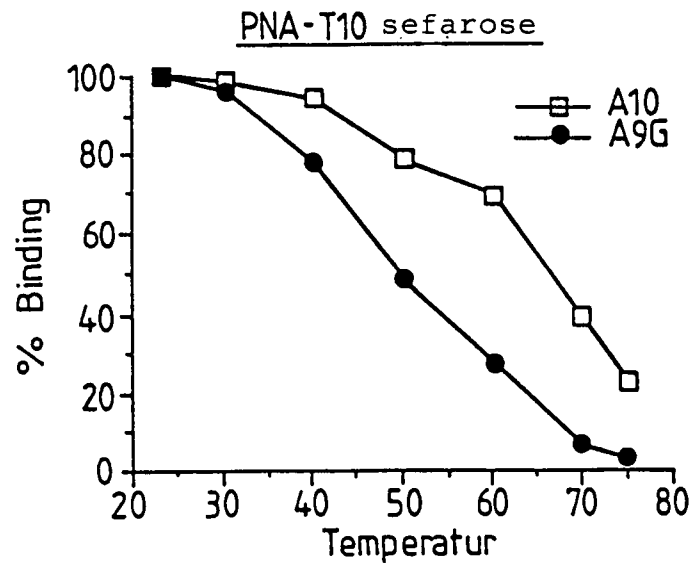


FIG. 25b

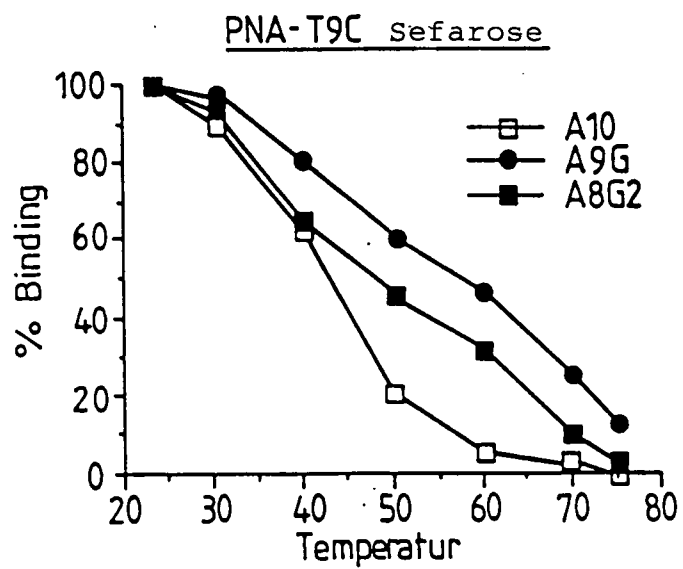


FIG. 25c

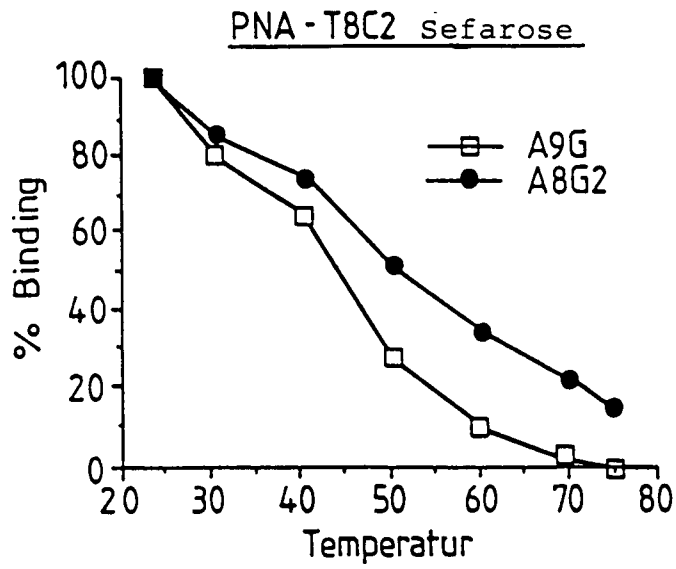


FIG. 26

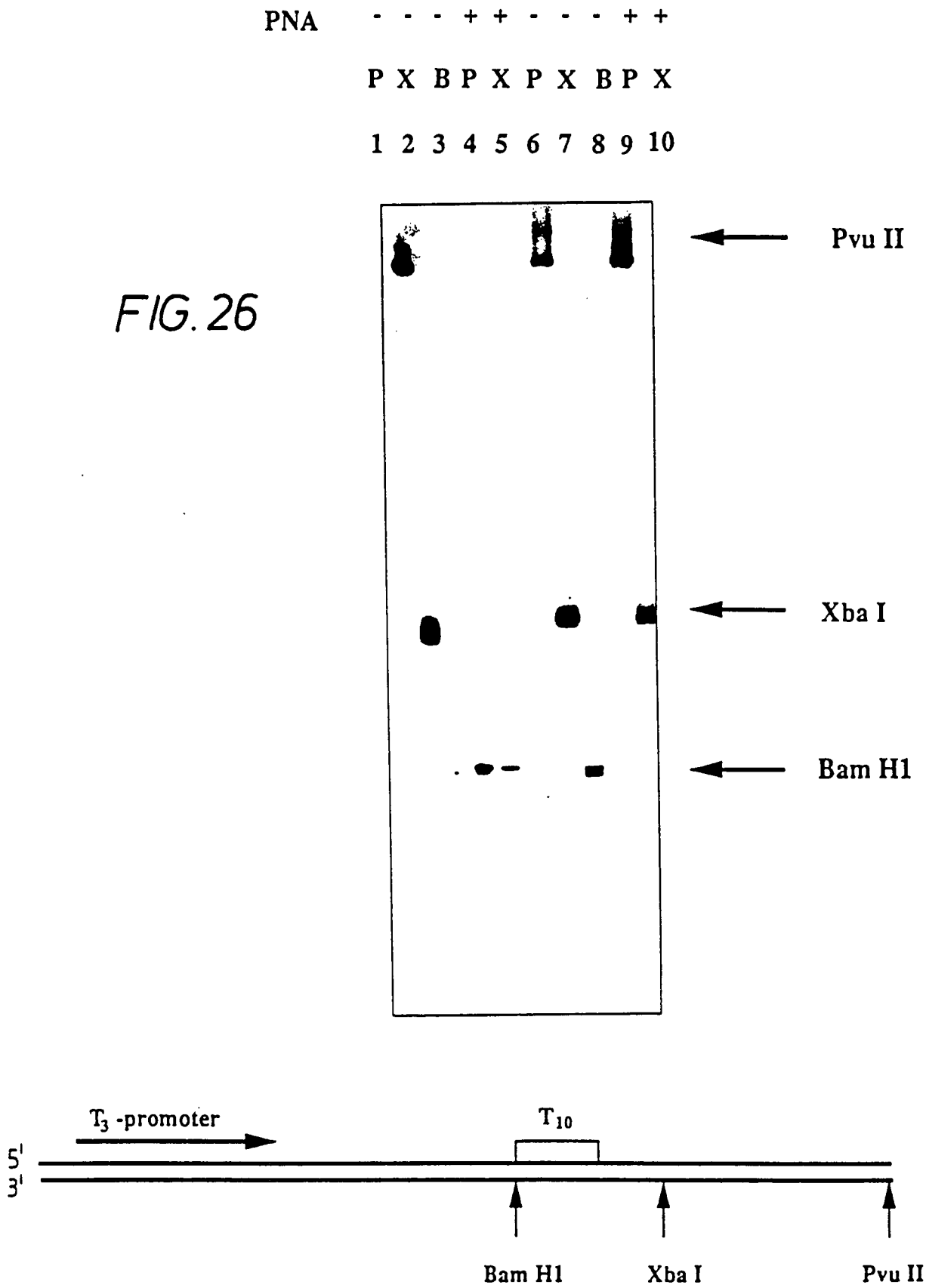


FIG. 27

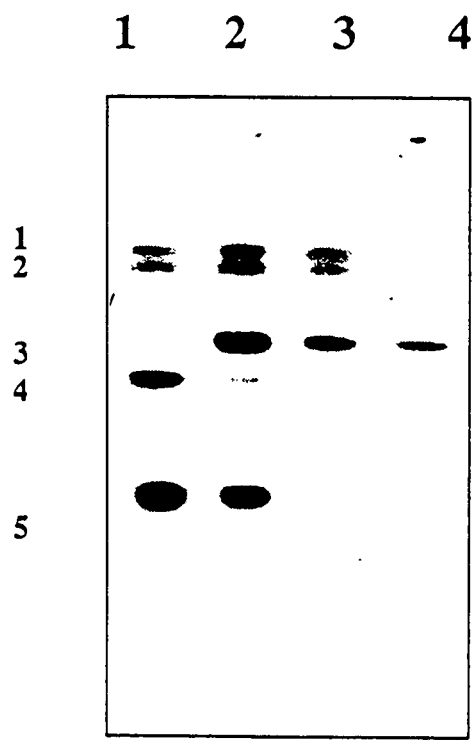


FIG. 28

