

# (12) Oversettelse av europeisk patentskrift

NORGE	(19) NO (51) Int Cl.
	C07C 237/10 (2006.01) C07K 5/06 (2006.01) C07K 14/00 (2006.01)

### Patentstyret

(21)	Oversettelse pub	olisert	2015.07.06
(80)	Dato for Den Eur Patentmyndighe	ropeiske ts	
	patentet	et meddelte	2015.02.18
(86)	Europeisk søkna	adsnr	09719041.7
(86)	Europeisk innlev	reringsdag	2009.03.13
(87)	Den europeiske Publiseringsdato	søknadens )	2011.01.05
(30)	Prioritet		2008.03.14, KR, 20080023658
(84)	Utpekte stater		AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO SE SI SK TR
	Utpekte samarbeidende	stater	AL BA RS
(73)	Innehaver		Cti Bio, 4th Floor 1236-9 Gaepo-dong Gangnam-gu, Seoul 135-964, KR-Sør-Korea
(72)	Oppfinner		CHUNG Shin, Shinchang Mission HillApt 203-2001558 Bora-dongGiheung, Yongin- siGyounggi-do 446-955, KR-Sør-Korea LEE Jong-Ook, Guanak PurgioApt 115-20031717 Bongchun-dongGuanak-gu, Seoul 151-050, KR-Sør-Korea KIM Heui-Yeon, 4-203 Family Town24-44 Imhak-dong, Geyang-guIncheon 407-814, KR-Sør-Korea PARK Hyun-Jin, I dong 600-2 103Sangrok-guAnsan-si, Gyeonggi-do426-160, KR- Sør-Korea KIM Mi-Ran, 1-dong 600-2 103Sangrok-guAnsan-si, Gyounggi-do 426-160, KR-Sør- Korea
(74)	Fullmektig		Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO, Norge
(54)	Benevnelse	PEPTIDNU	JKLEINSYREDERIVATER MED GOD CELLEGJENNOMTRENGNING OG STERK T FOR NUKLEINSYRE
(56)	Anførte publikasjoner	US-A1- 20 US-B1- 6 6 G HAAIMA containing 4639-4643 K G RAJEI analogues American (	04 265 885 617 422 A ET AL.: "Increased DNA binding and sequence discrimination of PNA oligomers 2, 6-diaminopurine", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 23, no. 22, 1997, pages 5, XP2956494, Information Retrieval Ltd. ISSN: 0305-1048 EV ET AL.: "High-affinity peptide nucleic acid oligomers containing tricyclic cytosine ", ORGANIC LETTERS, vol. 4, no. 25, 2002, pages 4395-4398, XP8156256, Chemical Society ISSN: 1523-7060

M ARDHAMMAR ET AL.: "In vitro membrane penetration of modified peptide nucleic acids (PNA)", JOURNAL OF BIOMOLECULAR STRUCTURE & DYNAMICS, vol. 17, no. 1, 1999, pages 33-40, XP920788, ADENINE PRESS, NEW YORK, NY ISSN: 0739-1102 WOLFGANG MAISON ET AL.: 'Multicomponent Synthesis of Novel Amino Acid-Nucleobase Chimeras: a Versatile Approach to PNA-Monomers' BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY vol. 8, 2000, pages 1343 - 1360, XP027411646

YUN WU ET AL.: 'Synthesis of N-Boc and N-Fmoc Dipeptoids with Nucleobase Residues as Peptoid Nucleic Acid Monomers' TETRAHEDRON vol. 57, 2001, pages 3373 - 3381, XP004235171

BOGDAN FALKIEWICZ: 'Peptide Nucleic Acids and Their Structural Modifications' ACTA BIOCHIMICA POLONICA vol. 46, no. 3, 1999, pages 509 - 529, XP002908350 THOMAS WAGNER ET AL.: 'Synthesis of Amino Acids with Unnatural Nucleobases or

Chromophores Suitable for Use in Model Electron-Transfer Studies' EUR. J. ORG. CHEM. 2003, pages 3673 - 3679, XP002408149

PENG ZHOU ET AL.: 'Novel Binding and Efficient Cellular Uptake of Guanidine-Based Peptide Nucleic Acids (GPNA)' J. AM. CHEM. SOC. vol. 125, 2003, pages 6878 - 6879, XP002439658 'Nucleobase', [Online] 22 March 2014, Applicant Retrieved from the Internet:

<URL:http://en.wikipedia.org/wiki/Nucleobas e> [retrieved on 2014-04-07]

### PEPTIDNUKLEINSYREDERIVATER MED GOD CELLEGJENNOMTRENGNING OG STERK AFFINITET FOR NUKLEINSYRE

### Beskrivelse

### **OPPFINNELSENS OMRÅDE**

**[0001]** Den foreliggende oppfinnelsen vedrører peptidnukleinsyrederivater som er kjemisk modifisert for å vise god cellegjennomtrengning og sterk affinitet for nukleinsyre.

### KORT BESKRIVELSE AV TEGNINGENE

### [0002]

Figur 1 viser HPLC-kromatogrammer før og etter rensing av <u>Oligo 17</u> ved reversfase HPLC. Figur 2 tilveiebringer et MALDI-TOF-massespektrum for en renset sats av <u>Oligo 17</u>. Figur 3 tilveiebringer grafer av absorbansendringer med temperatur for <u>Oligo 17</u> mot komplementær eller mismatch DNA.

Figur 4(a) og 4(b) tilveiebringer konfokalmikroskopibilder (ved 63x objektiv) 1, 2, 3 og 24 timer etter at HeLa-cellene ble behandlet med henholdsvis <u>Oligo 1</u> og <u>Oligo 2</u> ved 5  $\mu$ M. Figur 5(a) og 5(b) tilveiebringer konfokalmikroskopibilder (ved 63x objektiv) 0,5 og 1 time etter at MCF-7-cellene ble behandlet med henholdsvis <u>Oligo 6</u> og <u>Oligo 7</u> ved 2,5  $\mu$ M. Figur 6(a) og 6(b) tilveiebringer konfokalmikroskopibilder (ved 40x objektiv) 6 eller 24 timer etter at HeLa-cellene ble behandlet med henholdsvis <u>Oligo 1</u> og <u>Oligo 6</u> ved 1  $\mu$ M. Figur 7(a) og 7(b) tilveiebringer konfokalmikroskopibilder (ved 40x objektiv) 24 timer etter at JAR-cellene ble behandlet med henholdsvis <u>Oligo 21</u> og <u>Oligo 28</u> ved 2  $\mu$ M. Figur 7(c) og 7(d) tilveiebringer konfokalmikroskopibilder (ved 40x objektiv) 24 timer etter at A549-cellene ble behandlet med henholdsvis <u>Oligo 21</u> og <u>Oligo 28</u> ved 2  $\mu$ M. Figur 7(e) og 7(f) tilveiebringer konfokalmikroskopibilder (ved 40x objektiv) 12 timer etter at HeLa-cellene ble behandlet med henholdsvis <u>Oligo 21</u> og <u>Oligo 28</u> ved 2  $\mu$ M. Figur 7(e) og 7(f) tilveiebringer konfokalmikroskopibilder (ved 40x objektiv) 12 timer etter at HeLa-cellene ble behandlet med henholdsvis <u>Oligo 21</u> og <u>Oligo 28</u> ved 2  $\mu$ M.

cellene ble behandlet med <u>Oligo 21</u> ved 2 mM. Figur 8(a), 8(b) og 8(c) tilveiebringer konfokalmikroskopibilder (ved 40x objektiv) 24 timer

etter at HeLa-, A549- og JAR-cellene ble behandlet med henholdsvis 2  $\mu$ M <u>Oligo 22</u>. Figur 9 tilveiebringer western blotting-resultater for JAR-celler behandlet med 5  $\mu$ M eller 10  $\mu$ M <u>Oligo 9</u>, 5  $\mu$ M eller 10  $\mu$ M <u>Oligo 10</u>, kobehandling med oligomerene ved 5  $\mu$ M eller 10  $\mu$ M hver og blank (ingen oligomerbehandling).

Figur 10 er den representative strukturen for PNA-oligomerene ifølge oppfinnelsen.

### **BAKGRUNN FOR OPPFINNELSEN**

**[0003]** Oligonukleotidene har blitt anvendt for forskjellige biologiske formål, inkludert antisensehemming av genuttrykking, PCR (polymerasekjedereaksjon), diagnostisk analyse av genbrikker og så videre. Ettersom oligonukleotidene samvirker på en sekvensspesifikk måte med nukleinsyrer så som DNA og RNA, er de ganske nyttige for forutsigbar modulering av biologiske prosesser som involverer DNA eller RNA i cellen. I motsetning til lavmolekylære legemidler, trenger imidlertid ikke oligonukleotider lett inn i pattedyrcellemembranen og påvirker derfor neppe biologiske prosesser i cellen med mindre de modifiseres eller formuleres skikkelig for å trenge inn i plasmamembranen på en enkel måte.

**[0004]** Proteiner som legemiddelmål: Proteiner medierer ulike cellefunksjoner. Det ville ikke være overraskende å finne at de fleste av de for tiden markedsførte legemidlene viser terapeutisk aktivitet via moduleringsfunksjoner av protein(er). For eksempel hemmer det ikke-steroide antiinflammatoriske legemidlet aspirin enzymer som kalles syklooksygenaser for deres antiinflammatoriske aktivitet. Losartan binder til og antagoniserer funksjonen til en transmembranreseptor kalt angiotensin-II-reseptor for sin antihypertensive aktivitet. Rosiglitazon aktiverer selektivt en intracellulær reseptor kalt peroksisomproliferatoraktivert reseptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) for å fremkalle dens antidiabetiske aktivitet. Etanercept er et fusjonsprotein som binder til et cytokin kalt tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) og nøytraliserer den biologiske aktiviteten til TNF- $\alpha$  for sin antirevmatiske aktivitet. Herceptin er et monoklonalt antistoff for behandling av brystkreft ved selektiv binding til erbB2 overuttrykkt i visse typer brystkreftceller.

[0005] Antisensehemming av proteinsyntese: Proteiner kodes av DNA

(2-deoksyribosenukleinsyre). I respons på cellestimulering transkriberes DNA for å produsere premRNA (pre-messengerribonukleinsyre) i kjernen. Introndelen(e) av pre-mRNA spleises enzymatisk ut for å gi mRNA (messengerribonukleinsyre), som deretter translokeres til det cytosoliske rommet. I cytosolen binder et kompleks av translasjonelt maskineri kalt ribosom til mRNA og utfører proteinsyntesen ettersom den skanner den genetiske informasjonen som kodes langs mRNA-et. (Biochemistry bind 41, 4503-4510, 2002; Cancer Res. bind 48, 2659-2668, 1988).

**[0006]** En oligonukleotidbinding til mRNA eller pre-mRNA på en sekvensspesifikk måte kalles antisenseoligonukleotid (AO). AO kan binde tett til et mRNA og hemme proteinsyntesen ved ribosomet langs mRNA-et i cytosolen. AO må være til stede i cellen for å hemme syntesen av dets målprotein. AO kan binde tett til et pre-mRNA i kjernen og påvirke spleisingen av pre-mRNA-et, som produserer et mRNA av den endrede sekvensen og følgelig et endret protein.



**[0007]** <u>Unaturlige oligonukleotider:</u> Oligonukleotider av DNA eller RNA er mottakelige for nedbrytning ved endogene nukleaser, noe som begrenser deres terapeutiske nytte. Hittil har det blitt utviklet mange typer unaturlige oligonukleotider og de har blitt studert intensivt. (Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. bind 33, 533-540, 2006). Noen av dem viser forlenget metabolsk stabilitet i forhold til DNA og RNA. Ovenfor er det tilveiebrakt kjemiske strukturer for noen av de representative unaturlige oligonukleotidene. Slike oligonukleotider binder forutsigbart til en komplementær nukleinsyre slik DNA eller RNA gjør.

[0008] Fosfortioatoligonukleotid (PTO) er en DNA-analog der ett av ryggradsfosfatoksygenatomene er erstattet med et svovelatom per monomer. En slik liten strukturell endring gjorde PTO forholdsvis motstandsdyktig mot nedbrytning av nukleaser. (Ann. Rev. Biochem. bind 54, 367-402, 1985).
[0009] Ved å reflektere den strukturelle likheten mellom PTO og DNA, trenger de begge dårlig inn i cellemembranen i de fleste pattedyrcelletypene. For noen celletyper som rikelig uttrykker transportør(er) av DNA, viser imidlertid DNA og PTO god cellegjennomtrengning. Systemisk administrerte PTO-er er kjent for å fordeles lettvint til leveren og nyrene. (Nucleic Acids Res. bind 25, 3290-3296, 1997).

**[0010]** For å lette PTO-enes cellegjennomtrengning in vitro har lipofeksjon populært blitt praktisert. Imidlertid endrer lipofeksjon fysisk cellemembranen, forårsaker cytotoksisitet og ville derfor ikke være ideell for langvarig terapeutisk anvendelse.

**[0011]** I løpet av de siste 20 årene har antisense-PTO-er og varianter av PTO-er blitt klinisk evaluert for å behandle kreftformer, immunologiske forstyrrelser, metabolske sykdommer og så videre. (Biochemistry bind 41, 4503-4510, 2002; Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. bind 33, 533-540, 2006). Mange slike antisenselegemiddelkandidater har ikke vært vellykket delvis grunnet PTO-enes dårlige cellegjennomtrengning. For å overvinne den dårlige cellegjennomtrengningen må PTO administreres ved høy dosering for terapeutisk aktivitet. Imidlertid er PTO-er kjent for å forbindes med doseavhengige toksisiteter så som økt koagulasjonstid, komplementaktivering, rørformet nefropati, Kupffer-celleaktivering og immunstimulering inkludert splenomegali, lymfoidhyperplasi, mononukleær celleinfiltrasjon. (Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. bind 33, 533-540, 2006).

**[0012]** Mange antisense-PTO-er har vist seg å utvise relevant klinisk aktivitet for sykdommer med et vesentlig bidrag fra leveren eller nyrene. ISIS-301012 (mipomersen) er en PTO-analog som hemmer syntesen av apoB-100, et protein som er involvert i LDL-kolesteroltransport. Mipomersen manifesterte relevant klinisk aktivitet i en viss populasjon av aterosklerosepasienter mest sannsynlig grunnet sin preferensielle fordeling til leveren. (www.medscape.com/viewarticle/556073: aksessert 19. februar 2009) ISIS-113715 er en antisense-PTO-analog som hemmer

synteseproteintyrosinfosfatasen 1B (PTP1B) og ble funnet å vise terapeutisk aktivitet hos type-IIdiabetespasienter. (Curr. Opin. Mol. Ther. bind 6, 331-336, 2004).

**[0013]** I fosforamidittmorfolinooligonukleotid (PMO), erstattes ryggradsfosfatet og 2-deoksyribosen av DNA med henholdsvis fosforamiditt og morfolin. (Appl. Microbiol. Biotechnol. bind 71, 575-586, 2006). Mens DNA-ryggraden er ladet negativt er ikke PMO-ryggraden ladet. Dermed er bindingen mellom PMO og mRNA fri for elektrostatisk frastøtning mellom ryggradene og har en tendens til å være sterkere enn den mellom DNA og mRNA. Ettersom PMO er strukturelt svært forskjellig fra DNA, ville ikke PMO gjenkjennes av de(n) hepatisk(e) transportøren(e) som gjenkjenner DNA. PMO trenger imidlertid ikke lett inn i cellemembranen.

**[0014]** Peptidnukleinsyre (PNA) er et polypeptid med N-(2-aminoetyl)glysin som enhetsryggraden og ble oppdaget av Nielsen og kolleger. (Science bind 254, 1497-1500, 1991). Som DNA og RNA, binder PNA også selektivt til komplementær nukleinsyre [Nature (London) bind 365, 566-568, 1992]. Som PMO er ikke PNA-ryggraden ladet. Dermed har bindingen mellom PNA og RNA en tendens til å være sterkere enn mellom DNA og RNA. Ettersom PNA strukturelt markeres forskjellig fra DNA, ville ikke PNA gjenkjennes av de(n) hepatisk(e) transportøren(e) som gjenkjenner DNA og ville vise en vevsfordelingsprofil svært forskjellig fra den til DNA eller PTO. Imidlertid gjennomtrenger PNA også pattedyrcellemembranen dårlig. (Adv. Drug Delivery Rev. bind 55, 267-280, 2003).

[0015] I den låste nukleinsyren (LNA) begrenses ryggradsriboseringen av RNA strukturelt for å øke

bindingsaffiniteten for RNA eller DNA. Dermed kan LNA-ene betraktes som DNA- eller RNA-derivater med høy affinitet. (Biochemistry bind 45, 7347-7355, 2006).

**[0016]** <u>Antisensemekanismer:</u> Antisensemekanismen er forskjellig avhengig av AO-typene. RNAse H gjenkjenner en dupleks av mRNA med DNA, RNA, eller PTO og forringer dupleksdelen av mRNA. Dermed forsterkes antisenseaktiviteten av PTO vesentlig med RNAse H. I mellomtiden gjenkjenner ikke RNAse H en dupleks av mRNA med PMO, PNA eller LNA. Med andre ord må PMO, PNA og LNA utelukkende stole på den steriske blokkeringen av mRNA for deres antisenseaktivitet. (Biochemistry bind 41, 4501-4510, 2002).

**[0017]** For oligonukleotider med samme bindingsaffinitet for mRNA, bør PTO derfor vise sterkere antisenseaktivitet enn PMO, PNA og LNA. For sterisk blokkering av AO-er så som PMO, PNA og LNA, ønskes sterk affinitet for mRNA for antisenseaktivitet.

**[0018]** <u>Antisenseaktivitet av PNA:</u> Bindingsaffiniteten til PNA for mRNA vil øke etter hvert som lengden av PNA øker til et visst punkt. Imidlertid synes ikke antisenseaktiviteten av PNA alltid å øke til lengden av PNA. Det var tilfeller der antisenseaktiviteten av PNA nådde den maksimale aktiviteten ved 12- til 13-mer og deretter avtok. (Nucleic acids Res. bind 32, 4893-4902, 2004). På den annen side ble optimal antisenseaktivitet nådd med 15- til 18-mer-PNA-er mot en bestemt mRNA, noe som reflekterer at den strukturelle tilgjengeligheten av målbindingssetet av mRNA ville være viktig. (Biochemistry bind 40, 53-64, 2001).

**[0019]** I mange tilfeller har PNA-er blitt rapportert å hemme proteinsyntese ved ribosomet på mikromolart nivå under gode cellegjennomtrengende forhold. (Science bind 258, 1481-85, 1992; Biochemistry bind 40, 7853-7859, 2001; Nucleic acids Res. bind 32, 4893-4902, 2004). Men PNA-er som retter seg mot en svært tilgjengelig posisjon av mRNA ble funnet å vise antisenseaktivitet på sub-mikromolare nivå (Neuropeptides bind 38, 316-324, 2004; Biochemistry bind 40, 53-64, 2001) eller selv på sub-nanomolare nivå (Nucleic Acids Res. bind 36, 4424-4432, 2008) under gode transfeksjonsforhold.

**[0020]** I tillegg til målretting mot et svært tilgjengelig sete i mRNA, ville sterk bindingsaffinitet av PNA for mRNA være svært nødvendig for god antisenseaktivitet. I motsetning til DNA, PTO og LNA er ikke PNA-ryggraden ladet. PNA har en tendens til å aggregere og bli mindre egnet for binding til mRNA ettersom dens størrelse øker. Den ønskes for å forbedre PNA-enes bindingsaffinitet for mRNA uten å øke lengden av PNA. Inkorporering av PNA-monomerer med en punktlading ville være fordelaktig for å forhindre PNA fra aggregering.

**[0021]** <u>Cellegjennomtrengningsstrategier for PNA:</u> PNA-er trenger ikke lett inn i cellemembranen og har en tendens til å vise dårlig antisenseaktivitet med mindre den transfekteres skikkelig. I gamledager ble antisenseaktiviteten til PNA vurdert ved mikroinjeksjon (Science bind 258, 1481-85, 1992) eller elektroporering (Biochemistry bind 40, 7853-7859, 2001). Mikroinjeksjon og elektroporering er invasivt og upassende å påføres for terapeutiske formål. For å forbedre cellegjennomtrengningen har det blitt utviklet ulike strategier. (Adv. Drug Delivery Rev. bind 55, 267-280, 2003; Curr. Top. Med. Chem. bind 7, 727-737, 2007).

**[0022]** PNA-er har blitt levert effektivt til cellen ved kovalent inkorporering av cellegjennomtrengende peptider (Neuropeptides bind 38, 316-324, 2004), lipofeksjon etter dupleksformasjon med et komplementært DNA (Biochemistry bind 40, 53-64, 2001), lipofeksjon av PNA-er med et kovalent festet 9-aminoakridin (Nucleic Acids Res. bind 32, 2695-2706, 2004), lipofeksjon av PNA-er med kovalent festede fosfonatanioner (Nucleic Acids Res. bind 36, 4424-4432, 2008) og så videre. Også cellegjennomtrengning ble forbedret ved festing av en lipofil rest til PNA så som adamantan (Bioconjugate Chem. bind 10, 965-972, 1999) eller en amfifil gruppe så som

tetrafenylfosfonium. (Nucleic Acids Res. bind 29, 1852-1863, 2001). Ikke desto mindre er en slik kovalent modifikasjon usannsynlig å øke bindingsaffiniteten for mRNA til tross for markert forbedring i cellegjennomtrengningen.

**[0023]** <u>PNA-er med et kovalent festet CPP:</u> Cellegjennomtrengende peptider (CPP-er) er polypeptider som viser god cellegjennomtrengning og har flere positive ladninger fra arginin- eller lysinrester. Hittil har det blitt oppdaget mange CPP-er så som transportan, penetratin, NLS (kjernelokaliseringssignal) og Tat. CPP-er er kjent for effektivt å bære en festet last til cellen. PNA-er med en kovalent festet CPP viste også god cellegjennomtrengning.

**[0024]** Selv om noen PNA-er med en kovalent festet CPP viste antisense- $IC_{50}$ -er rundt 100 nM (Neuropeptides bind 38, 316-324, 2004), er mikromolare antisense- $IC_{50}$ -er ganske utbredt for slike PNA-er.

**[0025]** PNA-er med en kovalent festet CPP er sammensatt av to deler, det hydrofobe PNA-domenet og det positivt ladede CPP-domenet. Et slikt PNA har en tendens til å aggregere og bli fanget i endosomer i cellen og vil ikke være tilgjengelig for antisensehemmingen av proteinsyntesen. (Curr. Top. Med. Chem. bind 7, 727-737, 2007; Nucleic Acids Res. bind 33, 6837-6849, 2005). Videre øker en slik kovalent festet CPP knapt bindingsaffiniteten til PNA for mRNA.

**[0026] PNA-er med en kiral ryggrad:** Det har blitt gjort forsøk på å innføre en kiral substituent på PNA-ryggraden av 2-aminoetyl-glysin (Aeg). For eksempel ble den vandige løseligheten av PNA vesentlig forbedret ved inkorporering av PNA-monomer(er) med en ryggrad av 2-aminoetyl-lysin i stedet for Aeg. (Angew. Chem. Int. Ed. Engl. bind 35, 1939-1941, 1996).

**[0027]** Ved innføring av ryggraden av L-(2-amino-2-metyl)etyl-glysin i stedet for Aeg, ble bindingsaffiniteten til PNA for DNA og RNA vesentlig forbedret. En 10-mer PNA med hele ryggraden til <u>L</u>-(2-amino-2-metyl)etylglysin i stedet for 2-aminoetyl-glysin viste en økning på 19 °C og 10 °C i T<sub>m</sub> mot henholdsvis komplementært DNA og RNA. En slik økning ser ikke ut til å være proporsjonal med antallet substitusjon med <u>L</u>-(2-amino-2-metyl)etyl-glysin. (J. Am. Chem. Soc. bind 128, 10258-10267, 2006).

**[0028]** <u>GPNA:</u> Cellegjennomtrengningen av PNA ble rapportert å forbedres merkbart ved inkorporering av PNA-monomerer med en ryggrad av 2-aminoetyl-arginin i stedet for Aeg. (J. Am. Chem. Soc. bind 125, 6878-6879, 2003). Slike PNA-er har blitt kalt 'GPNA' ettersom de har guanidiniumresten på ryggraden.

**[0029]** GPNA-er med ryggraden av 2-aminoetyl-<u>D</u>-arginin ble rapportert å ha sterkere affinitet for DNA og RNA enn de tilsvarende GPNA-ene med det til 2-aminoetyl-<u>L</u>-arginin. (Chem. Commun. 244-246, 2005). For en 10-mer GPNA med 5 GPNA-monomerer med ryggraden til 2-aminoetyl-<u>D</u>-arginin var det en økning på 7 °C i T<sub>m</sub> (smeltetemperatur) mot komplementær DNA sammenlignet med det tilsvarende umodifiserte PNA-et. (Bioorg. Med. Chem. Lett. bind 16, 4931-4935, 2006).

**[0030]** Et 16-mer antisense-GPNA mot humant EGFR-TK ble rapportert å vise antitumoraktivitet ved ip (intraperitoneal) administrering i atymiske nakne mus, selv om in vitro-antisenseaktiviteten ikke ble dokumentert for antisense-GPNA i teknikkens stand. (WO 2008/061091).

**[0031] PNA-er med modifisert nukleobase:** Som tilfeller med DNA har nukleobasemodifikasjoner blitt forfulgt for å forbedre PNA-enes affinitet for nukleinsyrer.

**[0032]** PNA-er med adenin erstattet med 2,6-diaminopurin ble evaluert med hensyn på deres affinitet for komplementær DNA eller RNA. Substitusjon med 2,6-diaminopurin ble funnet å lokke frem en økning på 2,5 ~ 6 °C i T<sub>m</sub> per erstatning. (Nucleic Acids Res. bind 25, 4639-4643,1997).



Cytosin og modifiserte cytosiner

**[0033]** PNA-er med cytosin erstattet med 9-(2-aminoetoksy)fenoksazin ble evaluert med hensyn på deres affinitet for komplementær DNA eller RNA. En enkelt substitusjon med 9-(2-aminoetoksy)fenoksazin fremkalte en økning på 10,7 ~ 23,7 °C i T<sub>m</sub>, selv om en slik økning ble markert avhengig av nukleotidsekvensen. Nukleobase-9-(2-aminopropoksy)fenoksazin induserte også en stor økning i T<sub>m</sub>. Grunnet en enorm økning i T<sub>m</sub>, har PNA-monomer med enten 9-(2-aminoetoksy)-fenoksazin eller 9-(2-aminopropoksy)fenoksazin i form av en cytosinerstatning blitt kalt 'G-klemme'. (Org. Lett. bind 4, 4395-4398, 2002). Cellegjennomtrengningsdataene ble imidlertid ikke rapportert for PNA-er med G-klemme(r).

**[0034]** PNA-er med cytosin erstattet med enten 6-{2-(2-aminoetoksy)fenyl}-pyrrolocytosin eller 6-{2,6-di(2-aminoetoksy)fenyl}pyrrolocytosin ble evaluert med hensyn på deres affinitet for komplementær DNA eller RNA. En enkelt substitusjon med enten 6-{2-(2-

aminoetoksy)fenyl}pyrrolocytosin eller 6-{2,6-di(2-aminoetoksy)-fenyl}pyrrolocytosin økte  $T_m$ -en med 3 ~ 11,5 °C. (J. Am. Chem. Soc. bind 130, 12574-12575, 2008). Slike PNA-er ble imidlertid ikke evaluert for cellegjennomtrengning.

**[0035]** <u>Annen anvendelse av PNA-er:</u> Ved tett binding til et mikroRNA, kan PNA hemme den regulerende funksjonen av mikroRNA-et, som fører til en økning i uttrykkingsnivået av proteinet/proteinene direkte regulert av mikroRNA-et. (RNA bind 14, 336-346, 2008). Ved tett binding til et ribonukleoprotein så som telomerase, kan PNA modulere den cellefunksjonen til ribonukleoproteinet. (Bioorg. Med. Chem. Lett, bind 9, 1273-1278, 1999). Ved tett binding til en viss del av et gen i kjernen kan PNA modulere transkripsjonen av genet. (Biochemistry bind 46, 7581-89, 2007.)

**[0036]** Ettersom PNA binder tett til DNA og RNA og følsomt diskriminerer en enkelt baseparmismatch, ville PNA være egnet for deteksjon med høy gjengivelse av enkeltnukleotidpolymorfisme (SNP). Ettersom PNA binder tett til DNA og RNA med høy sekvensspesifisitet, kan PNA finne forskjellige andre terapeutiske og diagnostiske anvendelser som involverer DNA eller RNA. (FASEB bind 14, 1041-1060, 2000).

# **OPPSUMMERING AV OPPFINNELSEN**

**[0037]** Den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer et peptidnukleinsyrederivat ved **formel I** eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav:





der

n er et heltall lik eller større enn 5;

S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, ..., S<sub>n-1</sub>, S<sub>n</sub>, T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, ..., T<sub>n-1</sub> og T<sub>n</sub> uavhengig representerer hydrogen, deuterium, substituert eller usubstituert alkyl, eller substituert eller usubstituert arylradikal;

X og Y uavhengig representerer hydrogen, deuterium, substituert eller usubstituert alkyl, substituert eller usubstituert acyl, substituert eller usubstituert sulfonyl, eller substituert eller usubstituert arylradikal;

Z representerer hydroksy, substituert eller usubstituert alkyloksy, substituert eller usubstituert aryloksy, eller substituert eller usubstituert aminoradikal;

B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, ..., B<sub>n-1</sub> og B<sub>n</sub> velges uavhengig fra naturlige nukleobaser inkludert adenin, tymin, guanin, cytosin og uracil og unaturlige nukleobaser; og

minst én av B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, ..., B<sub>n-1</sub> og B<sub>n</sub> velges uavhengig fra unaturlige nukleobaser representert ved **formel** II, formel III eller formel IV:



der

R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub> og R<sub>6</sub> uavhengig velges fra substituert eller usubstituert alkyl og hydrogenradikal; og L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub> og L<sub>3</sub> er et kovalent bindingsmiddel representert ved **formel V** som forbinder en basisk aminogruppe til resten ansvarlig for nukleobasesammenkoblingsegenskaper: der





 $Q_1$  og  $Q_m$  er substituert eller usubstituert metylen-(-CH2-)-radikal og  $Q_m$  knyttes direkte til den basiske aminogruppen;  $Q_2$ ,  $Q_3$ , ... og  $Q_{m-1}$  velges uavhengig fra substituert eller usubstituert metylen, oksygen (-O-), svovel (-S-) og substituert eller usubstituert aminoradikal [-N(H)-, eller -N(substituent)-]; og

m er et heltall fra 2 til 15.

**[0038]** En PNA-oligomer ved **formel I** viser forbedret bindingsaffinitet for nukleinsyre og cellegjennomtrengning sammenlignet med dens tilsvarende "umodifiserte" PNA-oligomer. PNA-oligomerene ifølge denne oppfinnelsen er nyttige for å sekvensere spesifikt hemme eller modulere cellefunksjoner og fysiologiske funksjoner formidlet av nukleinsyrer eller fysiologisk aktive molekyler som har et nukleinsyredomene så som ribonukleoproteiner. Også PNA-oligomerene ifølge denne oppfinnelsen er nyttige for diagnostiske formål grunnet deres sekvensspesifikke bindingskapasitet for nukleinsyrer.

# **BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN**

**[0039]** Den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer en ny klasse av PNA-oligomerer representert ved **formel I**, eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav:



der

n er et heltall lik eller større enn 5;

S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, ..., S<sub>n-1</sub>, S<sub>n</sub>, T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, ..., T<sub>n-1</sub> og T<sub>n</sub> uavhengig representerer hydrogen, deuterium, substituert eller usubstituert alkyl, eller substituert eller usubstituert arylradikal;

X og Y uavhengig representerer hydrogen, deuterium, hydroksy, substituert eller usubstituert alkyloksy, substituert eller usubstituert aryloksy, substituert eller usubstituert amino, substituert eller usubstituert alkyl, substituert eller usubstituert acyl, substituert eller usubstituert sulfonyl eller substituert eller usubstituert arylradikal;

Z representerer hydrogen, deuterium, hydroksy, substituert eller usubstituert alkyloksy, substituert eller usubstituert aryloksy, substituert eller usubstituert amino, substituert eller usubstituert alkyl, eller substituert eller usubstituert arylradikal;

B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, ..., B<sub>n-1</sub> og B<sub>n</sub> velges uavhengig fra naturlige nukleobaser inkludert adenin, tymin, guanin, cytosin og uracil og unaturlige nukleobaser; og

minst én av B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, ..., B<sub>n-1</sub> og B<sub>n</sub> uavhengig representerer en unaturlig nukleobase med et substituert eller usubstituert aminoradikal som er kovalent festet til resten som er ansvarlig for dets relevante nukleobasesammenkoblingsegenskaper.

**[0040]** En PNA-oligomer ifølge denne oppfinnelsen viser forbedret cellegjennomtrengning og -binding til nukleinsyre i forhold til sin tilsvarende 'umodifiserte' PNA-oligomer. I denne oppfinnelsen refererer 'umodifisert' PNA-oligomer til en PNA-oligomer ved **formel I**, der S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, ..., S<sub>n-1</sub>, S<sub>n</sub>, T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, ..., T<sub>n-1</sub> og T<sub>n</sub> er hydrogenradikal; og B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, ..., B<sub>n-1</sub> og B<sub>n</sub> velges uavhengig fra naturlige nukleobaser omfattende adenin, tymin, guanin og cytosin.

**[0041]** En PNA-oligomer ifølge denne oppfinnelsen trenger lett inn i pattedyrcellemembranen og kan påvirke eller endre cellefunksjoner ved sekvensspesifikk binding til en nukleinsyre eller et

nukleoprotein i cellen.

**[0042]** En PNA-oligomer ved **formel I** kan potensielt hemme ribosomal proteinsyntese ved tett binding til mRNA. En PNA-oligomer ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan binde tett til et premRNA og endre spleisingen av pre-mRNA-et til mRNA. Videre kan en PNA-oligomer ifølge den foreliggende oppfinnelsen binde tett til et mikroRNA og hemme mRNA-nedbrytning indusert av mikroRNA-et.

**[0043]** En PNA-oligomer ved **formel I** kan forutsigbart binde til nukleinsyredomenet av et ribonukleoprotein, f.eks. telomerase og modulere dets fysiologiske funksjon(er). En PNA-oligomer ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan binde til et gen og modulere transkripsjonen av genet. En PNA-oligomer ved **formel I** kan binde til et viralt gen eller dets transkripsjon og hemme proliferasjonen av viruset. En PNA-oligomer ifølge denne oppfinnelsen kan påvirke andre cellefunksjoner enn de som er beskrevet ovenfor ved sekvensspesifikk binding til en nukleinsyre eller et nukleoprotein innenfor pattedyrcellen. I tillegg kan en PNA-oligomer ifølge den foreliggende oppfinnelsen binde tett til et bakterielt mRNA, nukleinsyre, eller gen og hemme bakteriell proliferasjon eller endre bakterielle biosynteseprofiler.

**[0044]** En PNA-oligomer ifølge denne oppfinnelsen er meget følsom for en basemismatch i å binde til dens komplementære DNA-motstykke og ville være egnet for detektering av enkeltnukleotidpolymorfisme (SNP) med høy gjengivelse. PNA-oligomerene ifølge den foreliggende oppfinnelsen binder tett til deres komplementære DNA-er med høy sekvensspesifisitet og kan være nyttige for genprofilering. En PNA-oligomer ved **formel I** kan være nyttig for å undersøke eller lokalisere et nukleinsyrebærende molekyl så som telomer i cellen hvis den er korrekt kjemisk merket med en kromofor, for eksempel fluorofor. PNA-oligomerene ifølge denne oppfinnelsen kan være nyttige for en rekke andre diagnostiske eller analytiske formål enn de som er beskrevet detaljert ovenfor.

**[0045]** En PNA-oligomer ifølge den foreliggende oppfinnelsen har god løselighet i vann sammenlignet med den tilsvarende "umodifiserte" PNA-oligomeren og kan anvendes oppløst i vann, saltløsning eller en bufferløsning. En PNA-oligomer ved **formel I** kan formuleres med et kationisk lipid, så som lipofektamin. En PNA-oligomer ifølge denne oppfinnelsen kan duplekseres med et komplementært DNA og den resulterende dupleksen kan formuleres med et kationisk lipid.

[0046] En PNA-oligomer ifølge denne oppfinnelsen kan formuleres i en rekke doseringsformer, inkludert, men ikke begrenset til, injiserbar formulering, nesespray, tablett, granuler, hard kapsel, myk kapsel, liposomal formulering, oral suspensjon, transdemal formulering og så videre.
[0047] En PNA-oligomer ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan administreres til et individ i

terapeutisk effektive doser, noe som vil variere avhengig av indikasjonen, administreringsveien, doseringsplanen, situasjoner med individet og så videre.

**[0048]** En PNA-oligomer ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan administreres til et individ ved en rekke forskjellige veier, inkludert, men ikke begrenset til, intravenøs injeksjon, subkutan injeksjon, intraperitoneal injeksjon, nasal inhalering, oral administrering, transdermal applikasjon og så videre.

**[0049]** En PNA-oligomer ved **formel I** kan administreres til et individ i kombinasjon med en farmasøytisk akseptabel adjuvans, inkludert, men ikke begrenset til, sitronsyre, saltsyre, vinsyre, stearinsyre, polyetylenglykol, polypropylenglykol, etanol, natriumbikarbonat, destillert vann, hyaluronsyre, kationisk lipid så som lipofektamin, stivelse, gelatin, talkum, askorbinsyre, olivenolje, palmeolje, metylcelluose, titanoksid, natriumkarboksymetylcellulose, søtningsmiddel, konserveringsmiddel og så videre.

[0050] En PNA-oligomer ifølge den foreliggende oppfinnelsen, avhengig av nærværet av basiske

NO/EP2268607

eller sure funksjonelle gruppe(r) deri, kan anvendes nøytralisert med en ekvivalent mengde av en farmasøytisk akseptabel syre eller base, inkludert, men ikke begrenset til, natriumhydroksid, kaliumhydroksid, saltsyre, metansulfonsyre, sitronsyre og så videre.

**[0051]** Foretrukne PNA-oligomerer omfatter PNA-oligomerer ved **formel I**, eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav:

der

n er et heltall lik eller større enn 5, men mindre enn eller lik 30;

 $S_1$ ,  $S_2$ , ...,  $S_{n-1}$ ,  $S_n$ ,  $T_1$ ,  $T_2$ , ...,  $T_{n-1}$  og  $T_n$  er hydrogenradikal;

X og Y velges uavhengig fra hydrogen, substituert eller usubstituert alkyl, substituert eller usubstituert acyl, substituert eller usubstituert sulfonyl og substituert eller usubstituert arylradikal;

Z representerer hydrogen, hydroksy, substituert eller usubstituert alkyloksy, substituert eller usubstituert amino, substituert eller usubstituert alkyl, eller substituert eller usubstituert arylradikal;

B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, ..., B<sub>n-1</sub> og B<sub>n</sub> velges uavhengig fra naturlige nukleobaser, inkludert adenin, tymin, guanin, cytosin og uracil og unaturlige nukleobaser; og

minst én av  $B_1$ ,  $B_2$ , ...,  $B_{n-1}$  og  $B_n$  velges uavhengig fra unaturlige nukleobaser representert ved **formel II**, **formel III** eller **formel IV**:



der

 $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_5$  og  $R_6$  uavhengig velges fra substituert eller usubstituert alkyl, hydrogen, hydroksy og substituert eller usubstituert alkyloksyradikal; og

 $L_1$ ,  $L_2$  og  $L_3$  er et kovalent bindingsmiddel representert ved **formel V** som forbinder en basisk aminogruppe til resten som er ansvarlig for nukleobasesammenkoblingsegenskaper:



der

 $Q_1$  og  $Q_m$  er substituert eller usubstituert metylen-(-CH<sub>2</sub>-)-radikal og  $Q_m$  bindes direkte til den basiske aminogruppen;

Q2, Q3, ... og Qm-1 velges uavhengig fra substituert eller usubstituert metylen, oksygen (-O-),

svovel (-S-) og substituert eller usubstituert aminoradikal [-N(H)-, eller -N(substituent)-]; og m er et heltall lik eller større enn 2, men mindre enn eller lik 15.

**[0052]** PNA-oligomerer av spesiell interesse omfatter PNA-oligomerer ved **formel I**, eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav:

der

n er et heltall lik eller større enn 8, men mindre enn eller lik 25;

 $S_1,\,S_2,\,...,\,S_{n\text{-}1},\,S_n,\,T_1,\,T_2,\,...,\,T_{n\text{-}1}$  og  $T_n$  er hydrogenradikal;

X og Y velges uavhengig fra hydrogen, substituert eller usubstituert alkyl og substituert eller usubstituert acylradikal;

Z representerer hydroksy, eller substituert eller ikke-substituert aminoradikal;

 $B_1$ ,  $B_2$ , ...,  $B_{n-1}$  og  $B_n$  velges uavhengig fra naturlige nukleobaser, inkludert adenin, tymin, guanin, cytosin og uracil og unaturlige nukleobaser;

minst to av  $B_1$ ,  $B_2$ , ...,  $B_{n-1}$  og  $B_n$  velges uavhengig fra unaturlige nukleobaser som representeres ved **formel II**, **formel III** eller **formel IV**;

 $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_5$  og  $R_6$  velges uavhengig fra substituert eller usubstituert alkyl og hydrogenradikal;

 $Q_1$  og  $Q_m$  er substituert eller usubstituert metylenradikal og  $Q_m$  knyttes direkte til den basiske aminogruppen;

 $Q_2, Q_3, ...$  og  $Q_{m-1}$  velges uavhengig fra substituert eller usubstituert metylen, oksygen og aminoradikal; og

m er et heltall lik eller større enn 2, men mindre enn eller lik 12.

**[0053]** PNA-oligomerer av høy interesse omfatter PNA-oligomerer ved **formel I**, eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav:

der

n er et heltall lik eller større enn 10, men mindre enn eller lik 25;

 $S_1$ ,  $S_2$ , ...,  $S_{n-1}$ ,  $S_n$ ,  $T_1$ ,  $T_2$ , ...,  $T_{n-1}$  og  $T_n$  er hydrogenradikal;

X og Y velges uavhengig fra hydrogen og substituert eller usubstituert acylradikal; Z representerer hydroksy, alkyloksy, eller substituert eller usubstituert aminoradikal; og B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, ..., B<sub>n-1</sub> og B<sub>n</sub> velges uavhengig fra naturlige nukleobaser inkludert adenin, tymin, guanin, cytosin og uracil og unaturlige nukleobaser;

minst tre av B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, ..., B<sub>n-1</sub> og B<sub>n</sub> velges uavhengig fra unaturlige nukleobaser som representeres ved **formel II**, **formel III** eller **formel IV**;

 $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_5$  og  $R_6$  velges uavhengig fra substituert eller usubstituert alkyl og hydrogenradikal;

 $Q_1$  og  $Q_m$  er metylenradikal og  $Q_m$  knyttes direkte til den basiske aminogruppen;  $Q_2$ ,  $Q_3$ , ... og  $Q_{m-1}$  velges uavhengig fra metylen, oksygen og aminoradikal; og m er et heltall lik eller større enn 2, men mindre enn eller lik 10.

**[0054]** PNA-oligomerer av større interesse omfatter PNA-oligomerer ved **formel I**, eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav:

der

n er et heltall lik eller større enn 10, men mindre enn eller lik 20;

 $S_1,\,S_2,\,...,\,S_{n\text{-}1},\,S_n,\,T_1,\,T_2,\,...,\,T_{n\text{-}1}$  og  $T_n$  er hydrogenradikal;

X og Y velges uavhengig fra hydrogen og substituert eller usubstituert acylradikal; Z representerer hydroksy eller substituert eller usubstituert aminoradikal;

B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, ..., B<sub>n-1</sub> og B<sub>n</sub> velges uavhengig fra naturlige nukleobaser inkludert adenin, tymin, guanin, cytosin og uracil og unaturlige nukleobaser;

minst tre av  $B_1$ ,  $B_2$ , ...,  $B_{n-1}$  og  $B_n$  velges uavhengig fra unaturlige nukleobaser som er representert ved **formel II, formel III** eller **formel IV**;

 $R_1$ ,  $R_3$  og  $R_5$  er hydrogenradikal og  $R_2$ ,  $R_4$  og  $R_6$  uavhengig representerer hydrogen, eller substituert eller usubstituert amidinylradikal;

 $Q_1$  og  $Q_m$  er metylenradikal og  $Q_m$  knyttes direkte til den basiske aminogruppen;

 $Q_2$ ,  $Q_3$ , ... og  $Q_{m-1}$  velges uavhengig fra metylen-, oksygen- og aminoradikal; og m er et heltall lik eller større enn 2, men mindre enn eller lik 10.

**[0055]** PNA-oligomerer av størst interesse omfatter PNA-oligomerer ved **formel I**, eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav:

der

n er et heltall lik eller større enn 10, men mindre enn eller lik 20;

 $S_1$ ,  $S_2$ , ...,  $S_{n-1}$ ,  $S_n$ ,  $T_1$ ,  $T_2$ , ...,  $T_{n-1}$  og  $T_n$  er hydrogenradikal;

X og Y velges uavhengig fra hydrogen og substituert eller usubstituert acylradikal;

Z representerer hydroksy eller substituert eller usubstituert aminoradikal;

 $B_1$ ,  $B_2$ , ...,  $B_{n-1}$  og  $B_n$  velges uavhengig fra adenin, tymin, guanin, cytosin og unaturlige nukleobaser;

minst tre av B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, ..., B<sub>n-1</sub> og B<sub>n</sub> velges uavhengig fra unaturlige nukleobaser representert ved **formel II**, **formel III** eller **formel IV**;

 $R_1$ ,  $R_3$  og  $R_5$  er hydrogenradikal og  $R_2$ ,  $R_4$  og  $R_6$  uavhengig representerer hydrogen- eller amidinylradikal;

Q1 og Qm er metylenradikal og Qm knyttes direkte til den basiske aminogruppen;

Q<sub>2</sub>, Q<sub>3</sub>, ... og Q<sub>m-1</sub> velges uavhengig fra metylen- og oksygenradikal; og

m er et heltall lik eller større enn 2, men mindre enn eller lik 8.

**[0056]** Spesifikke PNA-oligomerer av stor interesse omfatter PNA-oligomerer ved **formel I**, eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav:

der

n er et heltall lik eller større enn 8, men mindre enn eller lik 20;

 $S_1,\,S_2,\,...,\,S_{n\text{-}1},\,S_n,\,T_1,\,T_2,\,...,\,T_{n\text{-}1}$  og  $T_n$  er hydrogenradikal;

X er hydrogenradikal;

Y representerer hydrogen, eller substituert eller usubstituert acylradikal;

Z representerer hydroksy eller substituert eller usubstituert aminoradikal;

 $B_1$ ,  $B_2$ , ...,  $B_{n-1}$  og  $B_n$  velges uavhengig fra adenin, tymin, guanin, cytosin og unaturlige nukleobaser;

minst tre av  $B_1$ ,  $B_2$ , ...,  $B_{n-1}$  og  $B_n$  velges uavhengig fra unaturlige nukleobaser som representeres ved **formel II**, **formel III** eller **formel IV**;

 $R_1$ ,  $R_3$  og  $R_5$  er hydrogenradikal og  $R_2$ ,  $R_4$  og  $R_6$  uavhengig representerer hydrogen- eller amidinylradikal;

 $L_1$  representerer -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-, eller -CH<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>- der den høyre enden knyttes direkte til den basiske aminogruppen; og

 $L_2$  og  $L_3$  velges uavhengig fra -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-, - (CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>- og -(CH<sub>2</sub>)<sub>8</sub>- der den høyre enden knyttes direkte til den basiske aminogruppen.

**[0057]** De ovenfor anvendte uttrykkene og forkortelsene for PNA-oligomerene ifølge denne oppfinnelsen er illustrert i tabellen nedenfor.

Uttrykk/Forkortelse	Illustrasjon eller definisjon
oligomer	oligonukleotid
hydrogen	enkelt hydrogenatom (-H)
deuterium	enkelt deuteriumatom (-D)
alkyl	rett eller forgrenet alkylradikal
arvl	aromatisk gruppe så som fenyl, pyridyl, furyl, naftyl osv.
metylen	-(CH2)-
acyl	'-C(O)-' substituert med hydrogen, alkyl eller arylradikal
sulfonyl	'-S(O)2-' substituert med alkyl, eller arylradikal
alkyloksy	'R-O-' der R er substituert eller usubstituert alkylradikal
oksygen	'-O-'
svovel	'-S-'
amidinyl	NH2 -22 NH
cytosin (C)	
tymin (T)	
uracil (U)	
adenin (A)	NH <sub>2</sub> N N N N
guanin (G)	

#### **GENERELLE SYNTESEPROSEDYRER**

**[0058]** For karakterisering av molekyler ifølge denne oppfinnelsen ble NMR-massespektrometri registrert på et 300 MHz Varian Mercury-, 400 MHz Bruker Avance- eller 500 MHz Varian Inova-NMR-spektrometer. Det ble enten benyttet et Bruker Daltonics Ultraflex MALDI-TOF- eller et Agilent LC/MS-ionefellesystem for å bestemme molekylvekten. PNA-oligomerene ble analysert og renset ved C<sub>18</sub>-reversfase HPLC på enten en Hewlett Packard 1050 HPLC eller en Shimazu LC-6AD HPLC. Med mindre annet er angitt ble silikagel anvendt for kromatografisk separasjon av små molekyler fremstilt i denne oppfinnelsen. Smeltepunktet er rapportert som ukorrigert.

[0059] Unaturlige nukleobasederivater anvendt for syntesen av PNA-monomerer ifølge denne oppfinnelsen ble fremstilt ifølge én av metodene (metodene A, B og C) tilveiebrakt nedenfor, eller med mindre modifikasjon(er) derav, med mindre annet er beskrevet i selve synteseeksemplene.
[0060] <u>Metode A:</u> 6-alkyl-pyrollocytosinderivatene ble syntetisert som skikkelig beskyttet ifølge skjema 1, eller med mindre variasjon(er) derav. Slike 6-alkyl-pyrollocytosinderivater ble anvendt til å syntetisere PNA-monomerer som inneholder en nukleobase representert ved formel II i form av en cytosinekvivalent.

**[0061]** Først ble forbindelse **a** deprotonert med NaH og deretter alkylert med etylbromacetat for å oppnå forbindelse **b**. Forbindelse **b** ble underkastet en palladiumkatalysert kobling med et terminalt acetylenderivat, som ble in situ-annulert til produkt **c** ifølge litteraturen. (Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids bind 22, 1029-1033, 2003).



Skjema 1

**[0062]** <u>Metode B:</u> 2,6-diaminopurinderivater ble syntetisert som skikkelig beskyttet ifølge skjema 2 eller med mindre variasjon(er) derav. Slike 2,6-diamino-purinderivater ble anvendt til å syntetisere PNA-monomerer som inneholder en nukleobase representert ved **formel III** i form av en adeninekvivalent.

[0063] Først ble 2-haloadenin omsatt med et diamin ved høy temperatur for å oppnå forbindelse d,

som deretter ble omsatt med Boc<sub>2</sub>O for å gi forbindelse **e**. Forbindelse **e** ble deprotonert med NaH og alkylert med etylbromacetat for å oppnå forbindelse **f**. Den aromatiske aminogruppen av forbindelse **f** ble beskyttet med enten Cbz- eller Boc-gruppen for å gi forbindelse **g**.



Formel I

**[0064]** <u>Metode C:</u> De N-alkylerte guaninderivatene ble syntetisert som skikkelig beskyttet ifølge skjema 3 eller med mindre variasjoner derav. Slike guaninderivater ble anvendt til å syntetisere PNA-monomerer som inneholdt en nukleobase representert ved **formel IV** i form av en guaninekvivalent.



[0065] Først ble 2-halohypoksantin omsatt med et diamin ved høy temperatur for å oppnå forbindelse h, som deretter ble omsatt med Boc<sub>2</sub>O for å gi forbindelse i. Forbindelse i ble deprotonert med NaH og alkylert med etylbromacetat for å oppnå forbindelse j.
[0066] To typer PNA-monomerer ble syntetisert ifølge enten metode D eller metode E for å fremstille PNA-oligomerer ved formel I. PNA-oligomerene ble fremstilt av Panagene, Inc.
(www.panagene.com, Daejon, Sør-Korea) ved hjelp av PNA-monomerer av type o ifølge skjema 4 på anmodning fra CTI Bio. Alternativt ble PNA-monomerene av type q i skjema 5 anvendt internt for syntesen av PNA-oligomerer ifølge metoden beskrevet i teknikkens stand, eller med mindre modifisering(er) derav. (USP 6,133,444).

**[0067]** <u>Metode D:</u> PNA-monomerer med en modifisert nukleobase ble fremstilt ifølge skjema 4, eller med mindre variasjon(er) derav som skikkelig beskyttet for PNA-oligomersyntesemetoden som er beskrevet i litteraturen. (Org. Lett. bind 9, 3291-3293, 2006). I skjema 4 kan forbindelse **k** korrespondere til forbindelse **c** i skjema 1, forbindelse **g** fra skjema 2 eller en forbindelse **j** fra skjema 3 kan imidlertid ikke nødvendigvis begrenses til én av disse esterforbindelsene.

### Skjema 4



**[0068]** Først ble ester k underkastet alkalisk hydrolyse for å gi syre **I**, som deretter ble koblet med etyl-N-[2-{N-(2- benzotiazolinyl)sulfonylamino}etyl]-glysinat for å oppnå forbindelse **m**. Forbindelse **m** ble mildt hydrolysert med LiOH for å gi syre **n**, som ble syklisert ved en EDCI-koblingsreaksjon for å oppnå endret PNA-monomer **o**. Den kjemiske strukturen for PNA-monomer **o** ble antatt som i skjema 4 i denne oppfinnelsen, gitt at slike tilordnede PNA-monomerer med hell har gitt PNA-oligomerer i litteraturen. (Org. Lett. bind 9, 3291-3293, 2006).

**[0069]** <u>Metode E:</u> Alternativt ble PNA-monomerene med en modifisert nukleobase fremstilt ifølge skjema 5, eller med mindre variasjon(er) derav som skikkelig beskyttet for PNA-oligomersyntesemetoden i teknikkens stand. (USP 6,133,444). I skjema 5 kan forbindelse **k** korrespondere til forbindelse **c** i skjema 1, forbindelse **g** i skjema 2 eller forbindelse **j** i skjema 3, men kan imidlertid ikke nødvendigvis begrenses til én av disse esterforbindelsene.

#### Skjema 5



**[0070]** Først ble syre I koblet med etyl-N-[2-{N-(9H-fluoren-9-yl)amino}etyl]-glysinat for å oppnå forbindelse **p** med en EDCI-koblingsreaksjon. Deretter ble forbindelse **p** mildt hydrolysert med LiOH

for å oppnå PNA-monomer **q** med en modifisert nukleobase.

**[0071]** De følgende eksemplene inneholder detaljerte beskrivelser av fremstillingsmetodene for forbindelsene ifølge denne oppfinnelsen. De detaljerte beskrivelsene av disse eksemplene er kun presentert for illustrerende formål og skal ikke tolkes i form av en begrensning for den foreliggende oppfinnelsen. De fleste av disse detaljerte beskrivelsene faller innenfor omfanget og tjener til å eksemplifisere de ovenfor beskrevne <u>GENERELLE SYNTESEPROSEDYRENE</u> som danner en del av oppfinnelsen. Forkortelsene som anvendes i de følgende eksemplene er definert i den følgende tabellen.

Kategori	Forklaring
<sup>1</sup> H NMR	Protonkjernemagnetisk resonans. I presentasjon av NMR-data ble allment
	aksepterte forkortelser anvendt som følger: s for singlett, d for dublett, t for
	triplett, q for kvartett, m for multiplett, br for bred, J for koblingskonstant, CDCl <sub>3</sub>
	for deuterert kloroform, DMSO <sub>d6</sub> for heksa-deuterert DMSO og så videre.
MS	Massespektroskopi. I presentasjon av MS-data ble de følgende populære
	aksepterte forkortelsene anvendt: MALDI-TOF for matriseassistert
	laserdesorpsjon/ionisering-flygetid, ESI for elektrosprayionisering, MW for
	molekylvekt, (m+1) for MH <sup>+</sup> -ionetopp, (m + 23) for MNa <sup>+</sup> -ionetopp osv.
Løsningsmidler	Det ble anvendt allment aksepterte forkortelser for løsningsmidler som følger:
	THF for tetrahydrofuran, MC for metylenklorid, DMF for dimetylformamid, EtOH
	for etanol, MeOH for metanol, DMSO for dimetylsulfoksid, EA for etylacetat og
	så videre.
Reagenser	For reagensene ble de følgende populære aksepterte forkortelsene anvendt:
	NaH for natriumhydrid, HCl for saltsyre, EDCl for 1-etyl-3-(3-
	dimetylaminopropyl) karbodiimidhydroklorid, HOBT for 1-hydroksy-benzotriazol,
	Boc for t-butyloksykarbonyl, Boc <sub>2</sub> O for Boc-anhydrid, eller di-t-butyl-dikarbonat,
	Cbz for benzyloksykarbonyl, Fmoc for (9H-fluoren-9-yl)-metoksykarbonyl, Bts for
	(benzo[d]tiazol-2-sulfonyl), Bts-Cl for (benzo[d]tiazol-2-sulfonyl)klorid, TFA for
	trifluoreddiksyre, TEA for trietylamin, DIEA for N,N-diisopropyletylamin, LiOH for
	litiumhydroksid, Aeg for N-(2-aminoetyl)glysin, Fmoc-Aeg-OH for N-[2-{(9H-
	fluoren-9-yl)-metoksykarbonyl}amino-etyl]glysin, Fmoc-Aeg-OMe for metyl-N-[2-
	(Fmoc-amino)etyl]-glysinat, Fmoc-Aeg-OtBu for t-butyl-N-[2-(Fmoc-amino)etyl]-
	glysinat, Fmoc-Aeg-OSu for N-suksinyl-N-[2-(Fmoc-amino)-etyl]-glysinat, HBTU
	for O-(benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametyluraniumheksafluorfosfat, DCC for
	1,3-disykloheksylkarbodiimid og så videre.
Andre	Det ble anvendt allment aksepterte forkortelser for terminologier som følger:
	smp. for smeltepunkt, °C for grad i Celsius, t for time, min for minutt, g for gram,
	mg for milligram, kg for kilo, I for liter, mI for milliliter, M for mol/I, forb. for
	forbindelse, vand. for vandig, RT for romtemperatur og så videre.

Eksempel 1: Fremstilling av 3-{(t-butoksykarbonyl)amino}-1-propanol (1).

[0072]

HO\_\_\_\_NHBoc

**[0073]** Til 14 g 3-amino-1-propanol oppløst i 150 ml THF og 150 ml vann ble det i løpet av 30 min dråpevis tilsatt 40,7 g Boc<sub>2</sub>O oppløst i 100 ml THF. Etter at reaksjonsblandingen ble omrørt i

24 timer, ble THF fjernet under redusert trykk. Det resulterende vandige laget ble ekstrahert med 200 ml EA og det organiske laget ble vasket med 0,5 M vandig sitronsyre og med destillert vann og deretter tørket over vannfritt magnesiumsulfat. Magnesiumsulfat ble filtrert fra og det resulterende filtratet ble konsentrert under vakuum for å gi 25 g av forb. **1** i form av en fargeløs væske. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz; CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  4,84 (br s, 1H), 3,66 (t, *J* = 5,6 Hz, 2H), 3,28 (q, *J* = 6,0 Hz, 2H), 3,05 (br s, 1H), 1,66 (m, 2H), 1,45 (s, 9H).

Eksempel 2: Fremstilling av etyl-{(N-benzoyl)-5-jodcytosin-1-yl}acetat (2).

**[0074]** Til en omrørt løsning av 8,3 g N-benzoyl-5-jodcytosin oppløst i 60 ml DMF, ble det tilsatt 1,06 g 55 % NaH i mineralolje ved 0 °C og løsningen ble omrørt ved RT i 2 timer. Etterpå ble 2,7 ml etylbromacetat tilsatt til reaksjonsblandingen, reaksjonsløsningen ble omrørt i ytterligere 24 timer ved RT, som ble etterfulgt av fjerning av løsningsmidlet under redusert trykk. Den resulterende resten ble oppløst og det uløselige materialet ble filtrert av. Filtratet ble vasket to ganger med mettet vandig ammoniumklorid, tørket over vannfritt magnesiumsulfat og konsentrert under vakuum. Den resulterende resten ble renset ved kolonnekromatografi (1:1 heksan:EA) for å gi 6,5 g av forb. 2 (forb. **b** i skjema 1) i form av et gult faststoff. Smp. 154-5 °C. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz; CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  13,31 (br s, 1H), 8,37 (d, *J* = 7,2 Hz, 2H), 7,69 (s, 1H), 7,55 (t, *J* = 7,4 Hz, 1H), 7,46 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H), 4,49 (s, 2H), 4,27 (q, *J* = 7,2 Hz, 2H), 1,32 (t, *J* = 7,2 Hz, 3H).

Eksempel 3: Fremstilling av 3-{3-(t-butoksykarbonylamino)propyloksy}-1-propyn (3).

### [0075]



**[0076]** Til 6,5 g 55 % NaH i mineralolje dispergert i 150 ml THF ved 0 °C ble det i løpet av 15 min dråpevis tilsatt 25 g av forb. **1** og blandingen ble omrørt i 1 time. Etterpå ble 17,5 ml propargylbromid (80 % toluenløsning) tilsatt dråpevis i løpet av 30 min, reaksjonsblandingen ble omrørt ved RT i 20 timer. Reaksjonen ble quenchet ved langsom tilsetning av 250 ml vann og THF ble fjernet under redusert trykk. Deretter ble den resulterende vandige blandingen ekstrahert med 250 ml EA, som ble vasket 3 ganger med 250 ml vann. Det organiske laget ble tørket over vannfritt magnesiumsulfat og magnesiumsulfat ble filtrert fra. Det resulterende filtratet ble konsentrert under vakuum og underkastet kolonnekromatografi (5:1 heksan:EA) for å gi 22,7 g av forb. **3** i form av en gul væske. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz; DMSO<sub>d6</sub>)  $\delta$  6,78 (t, *J* = 5,2 Hz, 1H), 4,09 (d, *J* = 2,4 Hz, 2H), 3,43-3,39 (m, 3H), 2,95 (q, *J* = 6,4 Hz, 2H), 1,60 (m, 2H), 1,37 (s, 9H).

Eksempel 4: Fremstilling av 4-{2-(t-butoksykarbonylamino)etoksy}-1-butyn (4)

# [0077]



**[0078]** Til 3,8 g 4-(2-azidoetoksy)-1-butyn oppløst i 17 ml THF, ble det tilsatt 7,2 g trifenylfosfin og 0,7 ml vann og reaksjonsblandingen ble omrørt i 8 timer, som ble etterfulgt av fjerning av løsningsmidlet under redusert trykk. Deretter ble den resulterende resten oppløst i 20 ml EA og

ekstrahert to ganger med 10 ml 1M vandig HCl. Vandig natriumkarbonat ble tilsatt til det vandige laget for å justere pH-en til 9 ~ 10. 5,96 g Boc<sub>2</sub>O oppløst i 15 ml THF ble tilsatt til løsningen og reaksjonsblandingen ble omrørt i 12 timer. Etterpå ble THF-en fjernet under vakuum, den resulterende løsningen ble ekstrahert med EA. Det organiske laget ble vasket med 0,5 M vandig sitronsyre og ble tørket over vannfritt magnesiumsulfat. Det organiske laget ble konsentrert og renset ved kolonnekromatografi. (9:1 heksan:EA) for å gi 3,4 g av forb. **4** i form av en gul olje. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz; CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  4,95 (s, 1H), 3,58 (t, *J* = 6,8 Hz, 2H), 3,53 (t, *J* = 5,0 Hz, 2H), 3,32 (m, 2H), 2,46 (m, 2H), 2,00 (t, *J* = 2,8 Hz, 1H), 1,45 (s, 9H).

Eksempel 5: Fremstilling av 3-{2-(t-butoksykarbonylamino)etoksy}-1-propyn (5).

[0079]



**[0080]** 20 g 2-{(t-butoksykarbonyl)amino}-1-etanol ble omsatt og renset ved tilsvarende å følge prosedyren beskrevet i <u>eksempel 3</u> for å gi 23,7 g av forb. **5** i form av en lysegul olje. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz; DMSO<sub>d6</sub>)  $\delta$  6,81 (t, 1H), 4,11 (d, *J* = 2,4 Hz, 2H), 3,41 (m, 3H), 3,07 (q, *J* = 6,0 Hz, 2H), 1,38 (s, 9H).

<u>Eksempel 6:</u> Fremstilling av 3-[N-{3-(t-butoksykarbonylamino)propyl}-N-(t-butoksy-karbonyl)amino]-1-propyn (**6**)

# [0081]



**[0082]** Til en omrørt løsning av N-[3-(t-butoksykarbonylamino)propyl]-N- (2-propynyl)amin oppløst i 83 ml THF og 95 ml vann, ble det dråpevis tilsatt 42 g Boc<sub>2</sub>O ved RT. Reaksjonsløsningen ble omrørt i 1,5 timer og konsentrert under vakuum. Det resulterende vandige laget ble ekstrahert med EA. EA-laget ble vasket i serie med 0,5 M vandig sitronsyre og saltløsning, tørket over vannfritt magnesiumsulfat, konsentrert under redusert trykk og renset ved kolonnekromatografi (1:1 heksan:EA) for å gi 19 g av forb. **6** i form av en gul olje. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz; CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  5,26 (br s, 0,6H), 4,74 (br s, 0,4H), 4,07 (br s, 1H), 3,98 (br s, 1H), 3,40 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H), 3,13 (m, 2H), 2,21 (t, 1H), 1,73 (m, 2H), 1,49 (s, 9H), 1,45 (s, 9H).

Eksempel 7: Fremstilling av 3-[2-{2,3-bis(benzyloksykarbonyl)guanidino}-etoksy]-1-propyn (7)

[0083]



**[0084]** Til en omrørt løsning av 10,9 g av forb. **5** oppløst i 110 ml MC, ble det tilsatt 110 ml TFA ved 0 °C dråpevis i løpet av 2 timer og reaksjonsblandingen ble omrørt i ytterligere 3 timer.

Reaksjonsløsningen ble konsentrert under redusert trykk og den resulterende resten ble oppløst i 40 ml MC ved 0 °C og til dette ble det tilsatt 12,3 ml TEA og deretter 8,8 g 1,3bis(benzyloksykarbonyl)-2-(metyltio)pseudourea ved RT. Reaksjonsløsningen ble omrørt i 4 timer og vasket to ganger med vann. Det organiske laget ble tørket over vannfritt magnesiumsulfat, konsentrert under vakuum og underkastet kolonnekromatografi (5:1 heksan:EA) for å gi 9,8 g av forb. **7** i form av et hvitt faststoff. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz; DMSO<sub>d6</sub>)  $\delta$  11,72 (s, 1H), 8,58 (s, 1H), 7,40-7,35 (m, 10H), 5,18 (s, 2H), 5,12 (s, 2H), 4,18 (d, 2H), 3,67-3,66 (m, 4H), 2,43 (t, 1H).

Eksempel 8: Fremstilling av 2-{(t-butoksykarbonyl)amino}-1-(2-propynyl-1-oksy)}-(R)-propan (8).

[0085]



**[0086]** 10,8 g t-butyl-(R)-1-hydroksypropan-2-ylkarbamat ble omsatt og renset ved tilsvarende å følge prosedyren beskrevet i <u>eksempel 3</u> for å gi 10,1 g av forb. **8** i form av en gul olje. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz; DMSO<sub>d6</sub>)  $\delta$  6,63 (d, 1H), 4,11 (d, 2H), 3,60 (m, 1H), 3,37-3,33 (m, 2H), 3,26-3,23 (m, 1H), 1,38 (s, 9H), 1,05 (d, 3H).

<u>Eksempel 9</u>: Fremstilling av N-[2-{2-(t-butoksykarbonyl)aminoetoksy}etyl]-N-[2-{(3-butynyl)-1-oksy}etyl]-N-(t-butoksykarbonyl)amin (**9**).

[0087]



**[0088]** Til en omrørt løsning av 5 g 2-{(3-butynyl)-1-oksy}etylmetansulfonat og 5,32 g 2-[2-{2-(t-butoksykarbonyl)amino}etyl-1-oksy]etylamin i 60 ml acetonitril, ble det dråpevis tilsatt 3,6 g kaliumkarbonat oppløst i vann ved 0 °C. Reaksjonsløsningen ble tillatt å langsomt oppvarmes til RT og ble omrørt i ytterligere 24 timer og deretter konsentrert under redusert trykk. Den resulterende resten ble oppløst i MC og vasket med vann. Det organiske laget ble konsentrert og oppløst i 80 ml THF og 80 ml vann, til dette ble det tilsatt 8,4 g Boc<sub>2</sub>O oppløst i 50 ml THF. Reaksjonsblandingen ble omrørt ved RT i 16 timer, noe som ble etterfulgt av fjerning av THF under vakuum og ekstraksjon med EA. Det organiske laget ble vasket i serie med 0,5 M vandig sitronsyre, vann og saltløsning. Det organiske laget ble tørket over vannfritt natriumsulfat, konsentrert og renset ved kolonnekromatografi (heksan  $\rightarrow$  1:4 EA:heksan) for å oppnå 2,45 g av forb. 9 i form av en lysegul olje. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz; CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  5,08 (br s, 0,5H), 4,93 (br s, 0,5H), 3,61-3,46 (m, 12H), 3,31 (m, 2H), 2,48 (m, 2H), 1,99 (t, 1H), 1,48 (s, 9H).

<u>Eksempel 10:</u> Fremstilling av etyl-2-[6-{3-(t-butoksykarbonylamino)propyl-1-oksy}-metyl-2-okso-2H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-3(7H)-yl]acetat (**10**).

[0089]



**[0090]** Til en omrørt løsning av 6,5 g av forb. **2** oppløst i 120 ml DMF, ble det i serie tilsatt 580 mg av Cul, 4,2 ml TEA, 9,74 g av forb. **3** og 1,76 g Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>. Deretter ble reaksjonsblandingen omrørt i 24 timer ved 50 °C med lys avskjermet og konsentrert under redusert trykk. Den resulterende resten ble oppløst i 250 ml EtOH og blandingen ble omrørt ved tilbakeløp i 18 timer. Deretter ble løsningen konsentrert under vakuum og underkastet kromatografisk separasjon. (95:5 EA:EtOH) for å oppnå 2,3 g av forb. **10** i form av et mørkerødt skum/faststoff. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz; DMSO<sub>d6</sub>)  $\delta$  11,30 (br s, 1H), 8,37 (s, 1H), 6,78 (m, 1H), 6,19 (s, 1H), 4,70 (s, 2H), 4,37 (s, 2H), 4,14 (q, *J* = 7,2 Hz, 2H), 3,42 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H), 2,98 (m, 2H), 1,63 (m, 2H), 1,36 (s, 9H), 1,20 (t, *J* = 7,2 Hz, 3H).

<u>Eksempel 11:</u> Fremstilling av 2-[6-{3-(t-butoksykarbonylamino)propyl-1-oksy}metyl-2-okso-2H-pyrrolo-[2,3-d]pyrimidin-3(7H)-yl]eddiksyre (**11**).

[0091]



**[0092]** Til 3,3 g av forb. **10** ble det tilsatt 15 ml THF, 30 ml vann og deretter 760 mg LiOH og blandingen ble omrørt ved RT i 20 min. Etterpå ble THF-en fjernet under redusert trykk og den resulterende vandige løsningen ble vasket med dietyleter. Det vandige laget ble surgjort til pH 3 med 1M vandig HCI og ekstrahert med EA. Det organiske laget ble tørket over vannfritt natriumsulfat og konsentrert under vakuum for å gi 2,46 g av forb. **11** i form av et hvitt faststoff. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz; DMSO<sub>d6</sub>)  $\delta$  11,05 (s, 1H), 8,16 (s, 1H), 6,79 (t, 1H), 6,12 (s, 1H), 4,35 (s, 2H), 4,23 (s, 2H), 3,41 (t, 2H), 2,97 (q, *J* = 6,4 Hz, 2H), 1,64 (m, 2H), 1,36 (s, 9H). <u>Eksempel 12:</u> Fremstilling av etyl-N-[2-{(benzo[d]tiazol-2-sulfonyl)amino}-etyl]-N-[2-[6-{3-(t-butoksykarbonylamino)propyl-1-oksy}metyl-2-okso-2H-pyrrolo-[2,3-d]pyrimidin-3(7H)-yl]acetyl]glysinat (**12**).

[0093]



**[0094]** Til 4,0 g av forb. **11** og 3,6 g etyl-N-[2-{(benzo[d]tiazol-2-sulfonyl)amino}etyl]glysinat oppløst i 30 ml DMF, ble det ved RT tilsatt 2,42 g EDCl og 1,70 g HOBt. Reaksjonsblandingen ble omrørt i 8 timer. Etterpå ble løsningsmidlet fjernet under vakuum, den resulterende resten ble oppløst i MC og vasket med 1 M vandig HCl og deretter med vann. MC-laget ble konsentrert under redusert trykk og renset ved kolonnekromatografi. (95:5 MC:MeOH) for å oppnå 4,6 g av forb. **12** i form av et gult skum/faststoff. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz; DMSO<sub>d6</sub>)  $\delta$  11,09 (br s, 1H), 8,74 (s, 0,6H), 8,58 (s, 0,4H), 8,27 (m, 1H), 8,20-8,14 (m, 2H), 7,66 (m, 2H), 6,56 (br s, 1H), 6,16 (m, 1H), 4,91 (s, 1,2H), 4,73 (s, 0,8H), 4,38 (s, 2,6H), 4,17 (m, 0,9H), 4,07 (m, 2,5H), 3,67 (m, 1,1H), 3,49-3,44 (m, 4H), 3,26 (m, 0,9H), 3,01 (m, 2H), 1,66 (m, 2H), 1,38 (s, 9H), 1,24 (t, *J* = 7,0 Hz, 1,2H), 1,17 (t, *J* = 7,0 Hz, 1,8H).

<u>Eksempel 13:</u> Fremstilling av N-[2-{(benzo[d]tiazol-2-sulfonyl)amino}etyl]-N-[2-[6-{3-(t-butoksykarbonylamino)propyl-1-oksy}metyl-2-okso-2H-pyrrolo-[2,3-d]-pyrimidin-3(7H)-yl]acetyl]glysin (**13**).

[0095]



**[0096]** 4,5 g av forb. **12** og 670 mg LiOH ble dispergert i 20 ml THF og 20 ml vann og omrørt ved RT i 20 min. THF ble fjernet under vakuum og den resulterende vandige løsningen ble vasket med dietyleter. Det vandige laget ble surgjort til pH 3 med 1M vandig HCl og ekstrahert med EA. EA-laget ble tørket over vannfritt natriumsulfat og konsentrert under redusert trykk for å gi 4,4 g av forb. **13** i form av et mørkegult faststoff. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz; DMSO<sub>d6</sub>)  $\delta$  11,32 (br s, 1H), 8,36 (m, 1H), 8,28 (m, 1,6H), 8,22 (s, 0,4H), 7,73 (m, 2H), 6,78 (m, 1H), 6,20 (s, 1H), 4,94 (s, 1,2H), 4,84 (s, 0,8H), 4,52 (s,

0,8H), 4,37 (s, 2H), 4,30 (s, 1,2H), 4,26 (m, 1,2H), 4,07 (m, 2H), 3,87 (m, 0,8H), 3,43 (m, 2H), 2,99 (m, 2H), 1,63 (m, 2H), 1,37 (s, 9H).

<u>Eksempel 14:</u> Fremstilling av 1-{(benzo[d]tiazol-2-sulfonyl)}-2-okso-4-[6-{3-(tbutoksykarbonylamino)propyl-1-oksy}metyl-2-okso-2H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-3(7H)yl]acetyl]piperazin (**14**).

[0097]



**[0098]** 4,4 g av forb. **13** og 1,49 g EDCI i 50 ml DMF ble omrørt ved RT i 16 timer. Etter at reaksjonsblandingen ble konsentrert under vakuum ble den resulterende resten oppløst i 50 ml MC. MC-løsningen ble vasket i serie med 1M vandig HCI og vann, konsentrert under vakuum og deretter renset ved kolonnekromatografi (aceton) for å oppnå 1,5 g av forb. **14** i form av et brunt skum/faststoff. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz; DMSO<sub>d6</sub>)  $\delta$  11,25 (br s, 1H), 8,36 (m, 1H), 8,29 (m, 1H), 8,25 (s, 0,6H), 8,19 (0,4H), 7,72 (m, 2H), 6,78 (t, *J* = 5,2 Hz, 1H), 6,18 (s, 1H), 4,92 (s, 1,2H), 4,82 (s, 0,8H), 4,51 (s, 0,8H), 4,37 (s, 2H), 4,29 (s, 1,2H), 4,23 (m, 1,2H), 4,06 (m, 2H), 3,87 (m, 0,8H), 3,41 (t, *J* = 6,4 Hz, 2H), 2,98 (q, *J* = 6,8 Hz, 2H), 1,62 (m, 2H), 1,36 (s, 9H). MS/ESI (m+23/MNa+) = 682,2 (observert), MW = 659,8 (C<sub>28</sub>H<sub>33</sub>N<sub>7</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub>).

**[0099]** Med utgangspunkt i acetylenderivatene  $4 \sim 9$  ble pyrollocytosinderivatene  $15 \sim 20$  fremstilt ved tilsvarende å følge prosedyren beskrevet i <u>eksempel 10</u>. Massespektrometridata og fysiske data for forb.  $15 \sim 20$  er gitt i tabellen nedenfor.

Eksemplene  $\textbf{15} \sim \textbf{20}$ : Analytiske data for pyrollocytosinderivatene  $\textbf{15} \sim \textbf{20}.$ 

[0100]



Forb.	Utgangsmateriale	Х	Massespektrometridata og Fysiske data
15 4		BocHN	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz; DMSO <sub>d6</sub> ) δ 11,12 (s, 1H),
			8,27 (s, 1H), 6,79 (t, J = 5,4 Hz, 1H), 6,00 (s, 1H),
	4		4,68 (s, 2H), 4,14 (q, J = 7,2 Hz, 2H), 3,65 (t,
	4	Q <sup>r</sup>	J = 6,6, 2H), 3,39 (t, J = 6,2 Hz, 2H), 3,08 (m, 2H),
		لځ	2,78 (t, J = 6,6 Hz, 2H), 1,37 (s, 9H), 1,20 (t,
		~كم	J = 7,2 Hz, 3H). Lysegrønt skum/faststoff.
16	5	BocHN	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz; DMSO <sub>d6</sub> ) δ 11,35 (s, 1H),
		)	8,39 (s, 1H), 6,87 (t, J = 5,2 Hz, 1H), 6,21 (s, 1H),
		J	4,70 (s, 2H), 4,41 (s, 2H), 4,15 (q, J = 7,2 Hz, 2H),
		Q´	3,43 (m, 2H), 3,12 (m, 2H), 1,38 (s, 9H), 1,21 (t,
		~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~	J = 7,2 Hz, 3H). Lysegult skum/faststoff.

Forb.	Utgangsmateriale	X	Massespektrometridata og Fysiske data
17	6	NHBoc BocN	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz; DMSO <sub>d6</sub> ) δ 11,20 (br s, 0,6H), 8,86 (br s, 0,4H), 8,57 (s, 0,2H), 8,35 (s, 0,8H), 6,83-6,76 (m, 1H), 6,00 (s, 0,8H), 5,76 (s, 0,2H), 4,75 (s, 0,3H), 4,70 (s, 1,7H), 4,55 (s, 0,3H), 4,30 (s, 1,7H), 4,14 (q, <i>J</i> = 7,2 Hz, 2H), 3,18 (m, 2H), 2,90-2,88 (m, 2H), 1,58 (m, 2H), 1,40-1,36 (m, 18H), 1,20 (t, 3H). Brunt skum/faststoff.
18	7		<sup>1</sup> H NMR (400 MHz; DMSO <sub>d6</sub> ) δ 11,57 (s, 1H), 11,33 (s, 1H), 8,50 (m, 1H), 8,37 (s, 1H), 7,44- 7,31 (m, 10H), 6,22 (s, 1H), 5,22 (s, 2H), 5,03 (s, 2H), 4,70 (s, 2H), 4,44 (s, 2H), 4,14 (q, 2H), 3,57- 3,53 (m, 4H), 1,21 (t, 3H). Lysebrunt faststoff.
19	8	BocHN	<sup>1</sup> H NMR (500 MHz; DMSO <sub>d6</sub> ) δ 11,32 (s, 1H), 8,38 (s, 1H), 6,71 (d, 1H), 6,20 (s, 1H), 4,70 (s, 2H), 4,41 (m, 2H), 4,14 (q, 2H), 3,65 (m, 1H), 3,37-3,34 (m, 1H), 3,26-3,22 (m, 1H), 1,37 (s, 9H), 1,20 (t, 3H), 1,02 (d, 3H). Lysebrunt faststoff.
20	9	BocHN	<sup>1</sup> H NMR (500 MHz; DMSO <sub>d6</sub> ) δ 11,13 (s, 1H), 8,25 (s, 1H), 6,73 (s, 1H), 5,99 (s, 1H), 4,68 (s, 2H), 4,12 (q, 2H), 3,67 (t, 2H), 3,48 ~ 3,27 (m, 10H), 3,04 (q, 2H), 2,78 (t, 2H), 1,38 (s, 9H), 1,36 (s, 1H), 1,19 (t, 3H). Brunt faststoff.

**[0101]** Med utgangspunkt i pyrollocytosinderivatene **15**, **16**, **17** og **20**, ble de modifiserte cytosin-PNA-monomerene **21** ~ **24** fremstilt ved tilsvarende å følge prosedyrene beskrevet i <u>eksemplene 11</u> ~ <u>14</u>. Massespektrometridataene og de fysiske dataene for forb. **21** ~ **24** er gitt i tabellen nedenfor.

<u>Eksemplene 21 ~ 24:</u> Analytiske data for cytosin-PNA-monomerene **21** ~ **24**.

[0102]



Forb.	Utgangsmateriale	Х	Massespektrometridata og Fysiske data
21	15	BocHN	<sup>1</sup> Η NMR (400 MHz; DMSO <sub>d6</sub> ) δ 11,06 (s, 1H), 8,36
		)	(m, 1H), 8,28 (m, 1H), 8,14 (s, 0,6H), 8,08 (2, 0,4H),
			7,72 (m, 2H), 6,78 (t, 1H), 5,98 (s, 1H), 4,91 (s,
		Ŏ,	1,2H), 4,80 (s, 0,8H), 4,51 (s, 0,8H), 4,29 (s, 1,2H),
		لح	4,24 (m, 1,2H), 4,06 (m, 2H), 3,86 (m, 0,8H), 3,64 (t,
		-كم	J = 6,4 Hz, 2H), 3,38 (t, J = 6,0 Hz, 2H), 3,07 (m, 2H),

Forb.	Utgangsmateriale	X	Massespektrometridata og Fysiske data
			2,78 (m, 2H), 1,37 (s, 9H). MS/ESI (m+1) = 660,2
			(observert), MW = 659,8 (C <sub>28</sub> H <sub>33</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub> S <sub>2</sub> ). Brunt
			skum/faststoff.
			<sup>1</sup> H NMR (400 MHz; DMSO <sub>d6</sub> ) δ 11,31 (s, 1H), 8,36
		BocHN	(m, 1H), 8,30-8,27 (m, 1,6H), 8,22 (s, 0,4H), 7,73 (m,
			2H), 6,87 (t, J = 5,6 Hz, 1H), 6,20 (m, 1H), 4,94 (s,
22	16		1,2H), 4,83 (s, 0,8H), 4,52 (s, 0,7H), 4,41 (s, 2,1H),
~~~	10	0	4,30 (s, 1,1 H), 4,25 (m, 1,2H), 4,06 (m, 2H), 3,87
		~~~~	(m, 0,8H), 3,42 (t, 2H), 3,12 (m, 2H), 1,38 (s, 9H).
		l l	MS/ESI (m+1) = 646,2 (observert), MW = 645,7 (C <sub>27</sub>
			H <sub>31</sub> N <sub>7</sub> O <sub>8</sub> S <sub>2</sub> ). Rødt skum/faststoff.
			<sup>1</sup> H NMR (400 MHz; DMSO <sub>d6</sub> ) δ 11,16 (br s, 1H), 8,36
	17		(m, 1H), 8,28 (m, 1H), 8,21 (s, 0,6H), 8,15 (s, 0,4H),
			7,73 (m, 2H), 6,77 (br s, 1H), 6,00 (br s, 1H), 4,92 (s,
23			1,2H), 4,82 (s, 0,8H), 4,52 (s, 0,9H), 4,30 (s, 3,1H),
23		ſ	4,25 (m, 1,2H), 4,07 (m, 2H), 3,87 (m, 0,8H), 3,19
		BocN کی	(m, 2H), 2,89 (m, 2H), 1,59 (m, 2H), 1,41-1,36 (m,
		ي <sup>ين</sup> ر (	18H); MS/ESI (m+23/MNa+) = 781,3 (observert),
			$MW = 758,9 (C_{33}H_{42}N_8O_9S_2). Rødt skum/faststoff.$
			<sup>1</sup> H NMR (500 MHz; DMSO <sub>d6</sub> ) δ 11,10 (m,1H), 8,35
		BocHN	(m, 1H), 8,28 (m, 1H), 8,14 (s, 0,6H), 8,08 (s, 0,4H),
			7,72 (m, 2H), 6,76 (m, 1H), 5,97-5,96 (s, 1H), 4,90
		٩ <sup>٢</sup>	(s, 1,2H), 4,80 (s, 0,8H), 4,51 (s, 0,8H), 4,29 (s,
24	20		1,2H), 4,25 (t, 1,2H), 4,08-4,04 (m, 2H), 3,86 (t,
	20	NBoc	0,8H), 3,66 (m, 2H), 3,47 (m, 2H), 3,41 (m, 2H),
			3,32-3,30 (m, 4H), 3,27 (m, 2H), 3,04 (m, 2H), 2,77
		<u>``o</u>	(m, 2H), 1,37 (s, 9H), 1,35 (s, 9H). MS/ESI
		~~~	(m+23/MNa+) = 869,3 (observert), MW = 847,0
			$(C_{37}H_{50}N_8O_{11}S_2)$ . Gult faststoff.

Eksempel 25: Fremstilling av 2-{3-(t-butoksykarbonylamino)propyl}amino-adenin (25).

[0103]



**[0104]** 6,8 g 2-kloradenin oppløst i 68 ml 1,3-diaminopropan og 68 ml monometoksyetanol ble omrørt ved tilbakeløp i 24 timer og reaksjonsblandingen ble konsentrert under vakuum. Den resulterende resten ble oppløst i 100 ml THF og 100 ml vann og til dette ble det langsomt tilsatt 60 g Boc<sub>2</sub>O oppløst i 70 ml THF. Reaksjonsblandingen ble omrørt ved RT i 6 timer og deretter ble det organiske løsningsmidlet fjernet under redusert trykk. Det resulterende vandige laget ble ekstrahert to ganger med 100 ml EA. Det organiske laget ble vasket med 0,5 M vandig sitronsyre og med saltløsning og tørket over vannfritt magnesiumsulfat. Det organiske laget ble konsentrert under redusert trykk og underkastet kromatografisk separasjon (1:10 MeOH:MC) for å oppnå 4,07 g av en forb. beskyttet med to Boc-grupper. Denne forbindelsen ble oppløst i 100 ml MeOH og til dette ble det langsomt tilsatt 45 ml mettet vandig natriumkarbonat. Reaksjonsløsningen ble omrørt ved 50 °C i 1 time og deretter konsentrert under vakuum. Den resulterende resten ble oppløst i 50 ml MeOH og det uløselige materialet ble filtrert fra. Deretter ble filtratet konsentrert for å gi 3,16 g av forb. **25** i form av et hvitt faststoff. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz; DMSO<sub>d6</sub>)  $\delta$  12,11 (br s, 1H), 7,63 (s, 1H), 6,78 (t, 1H), 6,55 (s, 2H), 6,07 (t, 1H), 3,20 (q, 2H), 2,96 (q, 2H), 1,60 (m, 2H), 1,37 (s, 9H).

**[0105]** Med utgangspunkt i 2-kloradenin og et hensiktsmessig diamin ble 2,6diaminopurinderivatene **26** ~ **30** fremstilt ved tilsvarende å følge prosedyren beskrevet i <u>eksempel</u> <u>25</u>. Massespektrometridataene og de fysiske dataene for forbindelsene **26** ~ **30** er gitt i tabellen nedenfor.

<u>Eksemplene 26 ~ 30</u>: De analytiske dataene for 2,6-diaminopurinderivatene  $26 \sim 30$ .

[0106]



Forb.	Utgangsdiamin	L2	Massespektrometridata og Fysiske data
26	$H_2N$ $H_2N$	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz; DMSO <sub>d6</sub> ) δ 12,20 (br s, 1H), 7,66 (s, 1H), 6,84 (t, 1H), 6,62 (s, 2H), 6,10 (t, 1H), 3,25 (q, 2H), 3,08 (q, 2H), 1,36 (s, 9H). Lysegult faststoff.
27		-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -	<sup>1</sup> H NMR (500 MHz; DMSO <sub>d6</sub> ) δ 12,07 (br s, 1H), 7,63 (s, 1H), 6,75 (s, 1H), 6,50 (s, 2H), 6,02 (s, 1H), 3,18 (q, 2H), 2,91 (q, 2H), 1,48-1,36 (m, 13H). Gulaktig grønt faststoff.
28	H <sub>2</sub> N	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz; DMSO <sub>d6</sub> ) δ 12,14 (br s, 1H), 7,65 (s, 1H), 6,77 (t, 1H), 6,55 (s, 2H), 6,01 (s, 1H), 3,17 (m, 2H), 2,89 (q, 2H), 1,48 (m, 2H), 1,41-1,36 (m, 11H), 1,26 (m, 2H). Lysegult faststoff.
29	NH <sub>2</sub>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -	<sup>1</sup> H NMR (500 MHz; DMSO <sub>d6</sub> ) δ 12,11 (br s, 1H), 7,64 (s, 1H), 6,78 (t, $J$ = 5,6 Hz, 1H), 6,56 (s, 2H), 6,04 (t, $J$ = 5,5 Hz, 1H), 3,17 (td, $J$ = 6,3, 6,3 Hz, 2H), 2,88 (td, $J$ = 6,7, 6,7 Hz, 2H), 1,49-1,47 (m, 2H), 1,36-1,31 (m, 11H), 1,29-1,22 (m, 6H). Gulaktig grønt faststoff.
30	H <sub>2</sub> N	A Construction	<sup>1</sup> H NMR (500 MHz; DMSO <sub>d6</sub> ) δ 12,15 (s, 1H), 7,64 (s, 1H), 6,84 (t, 1H), 6,56 (s, 2H), 6,05 (t, 1H), 3,48 (t, 2H), 3,39- 3,34 (m, 4H), 3,07 (q, 2H), 1,37 (s, 9H). Gult skum.

<u>Eksempel 31:</u> Fremstilling av 2-[2-{2-(t-butoksykarbonylamino)-2-metyl}etyl]-amino-1H-purin-6(9H)- on (**31**).

[0107]



**[0108]** 11 g 2-klorhypoksantin og 4,96 ml 1,2-diaminopropan (racemisk) ble dispergert i 33 ml monometoksyetanol og omrørt i 24 timer ved 130 °C. Løsningsmidlet ble fjernet under vakuum og den resulterende resten ble oppløst i 97 ml THF og 97 ml vann og til dette ble det langsomt tilsatt 22,8 g Boc<sub>2</sub>O oppløst i 64 ml THF. Reaksjonsblandingen ble omrørt ved RT i 6 timer og EA ble tilsatt til løsningen. Det resulterende bunnfallet ble oppsamlet ved filtrering for å oppnå forb. **31** i form av et grått faststoff. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz; DMSO<sub>d6</sub>)  $\delta$  12,42 (s, 1H), 10,44 (br s, 1H), 7,61 (s, 1H), 6,76 (d, 1H), 6,27 (m, 1H), 3,67 (m, 1H), 3,32 (m, 1H), 3,14 (m, 1H), 1,36 (s, 9H), 1,02 (d, 3H).

<u>Eksempel 32:</u> Fremstilling av etyl-2-[6-amino-2-{3-(t-butoksykarbonylamino)-propyl}amino-9H-purin-9-yl]acetat (**32**).

[0109]



**[0110]** Til en omrørt løsning av 3,16 g av forb. **25** oppløst i 100 ml DMF, ble det tilsatt 480 mg 55 % NaH i mineralolje. Reaksjonsløsningen ble omrørt i 2 timer, etter dette ble det sakte tilsatt 1,98 ml etylbromacetat. 2 timer senere ble reaksjonsblandingen konsentrert under vakuum og renset ved kolonnekromatografi (1:10 EtOH:EA) for å gi 2,92 g av diaminopurinanalogen **32** i form av et lysegult faststoff. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz; DMSO<sub>d6</sub>)  $\delta$  7,67 (s, 1H), 6,80 (t, 1H), 6,71 (s, 2H), 6,28 (t, 1H), 4,85 (s, 2H), 4,15 (q, 2H), 3,20 (q, 2H), 2,94 (q, 2H), 1,57 (m, 2H), 1,37 (s, 9H), 1,21 (t, 3H).

<u>Eksempel 33:</u> Fremstilling av etyl-2-[6-(benzyloksykarbonyl)amino-2-{3-(t-butoksy-karbonylamino)propyl}amino-9H-purin- 9-yl]acetat (**33**).

[0111]



**[0112]** Til en omrørt løsning av 4,68 g av forb. **32** oppløst i 100 ml DMF ble det tilsatt 13,2 g N-(benzyloksykarbonyl)-N'-metyl-imidazoliumtriflat ved RT. 12 t senere ble reaksjonsblandingen

konsentrert under redusert trykk og underkastet kolonnekromatografi (5 % MeOH i MC) for å gi 5,4 g av forb. **33** i form av et hvitt faststoff. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz; DMSO<sub>d6</sub>)  $\delta$  10,19 (s, 1H), 7,92 (s, 1H), 7,45-7,33 (m, 5H), 6,88 (t, 1H), 6,77 (t, 1H), 5,18 (s, 2H), 4,94 (s, 2H), 4,16 (q, 2H), 3,25 (q, 2H), 2,95 (q, 2H), 1,60 (m, 2H), 1,36 (s, 9H), 1,21 (t, 3H).

<u>Eksempel 34:</u> Fremstilling av etyl-N-[2-{2-(benzo[d]tiazol)sulfonyl}amino-etyl]-N-[2-[6-(benzyloksykarbonyl)amino-2-{3-{t-butoksykarbonylamino}-propyl}amino-9H-purin-9yl]acetyl]glysinat (**34**).

[0113]



**[0114]** 5,4 g av forb. **33** og 950 mg LiOH ble oppløst i 40 ml THF og 40 ml vann og omrørt ved RT i 1 time. THF ble fjernet under vakuum og den resulterende vandige løsningen ble surgjort til pH 3 med 1M vandig HCl og deretter ekstrahert med EA. Det organiske laget ble tørket over vannfritt natriumsulfat og konsentrert under redusert trykk. Den resulterende resten og 2,92 g etyl-2-N-[2-{(benzo[d]tiazol-2-sulfonyl)amino}etyl]glysinat ble oppløst i 240 ml DMF, hvortil det ble tilsatt 1,95 g EDCl og 1,38 g HOBt ved RT. Reaksjonsblandingen ble omrørt i 20 timer, konsentrert under redusert trykk og oppløst i MC. MC-løsningen ble vasket med 1 M vandig HCl, konsentrert under vakuum og deretter renset ved kolonnekromatografi (5 % MeOH:MC) for å oppnå 2,7 g av forb. **34** i form av et lysegult skum. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz; DMSO<sub>d6</sub>)  $\delta$  10,18 (m, 1H), 8,97 (br s, 0,6H), 8,80 (br s, 0,4H), 8,28 (d, 1H), 8,18 (m, 1H), 7,80 (s, 0,6H), 7,76 (s, 0,4H), 7,66 (m, 2H), 7,46-7,32 (m, 5H), 6,77 (m, 2H), 5,18 (s, 2H), 5,10 (s, 1,2H), 4,89 (s, 0,8H), 4,45 (s, 0,8H), 4,17 (q, 0,8H), 4,07-4,00 (m, 2,4H), 3,68 (m, 1,2H), 3,47 (m, 1,2H), 3,41 (m, 0,9H), 3,22 (m, 2,7H), 2,94 (m, 2H), 1,59 (m, 2H), 1,36 (s, 9H), 1,31-1,12 (m, 3H).

<u>Eksempel 35:</u> Fremstilling av 1-(benzo[d]tiazol-2-sulfonyl)-2-okso-4-[[6-(benzyl-oksykarbonyl)amino-2-{3-(t-butoksykarbonylamino)propylamino}-9H-purin-9-yl]-acetyl]piperazin (**35**).

[0115]



**[0116]** 2,7 g av forb. **34** og 340 mg LiOH ble dispergert i 15 ml THF og 20 ml vann og omrørt i 30 min ved RT. THF ble fjernet under redusert trykk. Deretter ble det resulterende vandige laget surgjort til pH 3 med 1M vandig HCl og ekstrahert med EA. EA-laget ble tørket over vannfritt natriumsulfat og konsentrert under vakuum for å oppnå 2,48 g av et urent produkt. Det urene produktet og 716 mg

av EDCI oppløst i 70 ml DMF ble omrørt ved RT i 20 timer. Løsningsmidlet ble fjernet under redusert trykk og den resulterende resten ble oppløst i MC og vasket med 1 M vandig HCI og deretter med vann. Det organiske laget ble konsentrert under vakuum og renset ved kolonnekromatografi (aceton) for å oppnå 1,4 g av forb. **35** i form av et hvitt skum. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz; DMSO<sub>d6</sub>)  $\delta$  10,16 (s, 1H), 8,35 (m, 1H), 8,26 (m, 1H), 7,81 (s, 0,6H), 7,77 (s, 0,4H), 7,72 (m, 2H), 7,45-7,31 (m, 5H), 6,78 (m, 2H), 5,18 (s, 2H), 5,12 (s, 1,2H), 5,01 (s, 0,8H), 4,55 (s, 0,8H), 4,29-4,27 (m, 2,4H), 4,09 (m, 2H), 3,88 (m, 0,8H), 3,26 (m, 2H), 2,95 (m, 2H), 1,61 (m, 2H), 1,36 (s, 9H); MS/ESI (m+1) = 779,2 (observert), MW = 778,9 (C<sub>34</sub>H<sub>38</sub>N<sub>10</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub>).

**[0117]** Med utgangspunkt i 2,6-diaminopurinderivatene **26** ~ **30**, ble de modifiserte adenin-PNAmonomerene **36** ~ **40** fremstilt ved tilsvarende å følge prosedyrene beskrevet i <u>eksemplene 32 ~ 35</u>. Massespektrometridata og fysiske data for forb. **36** ~ **40** er gitt i tabellen nedenfor.

<u>Eksemplene  $36 \sim 40$ </u>: Analytiske data for adenin-PNA-monomerene **36** ~ **40**.

# [0118]



Forb.	Utgangs- materiale	L2	Massespektrometridata og Fysiske data
36	26	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz; DMSO <sub>d6</sub> ) $\delta$ 10,17 (s, 1H), 8,36 (m, 1H), 8,26 (m, 1H), 7,82 (s, 0,6H), 7,78 (s,0,4H), 7,72 (m, 2H), 7,45-7,31 (m, 5H), 6,79 (2H), 5,18 (s, 2H), 5,12 (s, 1,2H), 5,01 (s, 0,8H), 4,55 (s, 0,8H), 4,29-4,25 (m, 2,4H), 4,09 (m, 2H), 3,87 (m, 0,8H), 3,29 (m, 2H), 3,11 (m, 2H), 1,33 (d, 9H). MS/ESI (m+1) = 765,2 (observert), MW = 764,8 (C <sub>33</sub> H <sub>36</sub> N <sub>10</sub> O <sub>8</sub> S <sub>2</sub> ). Hvitt skum.
37	27	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz; DMSO <sub>d6</sub> ) $\delta$ 10,10 (s, 1H), 8,36 (m, 1H), 8,26 (m, 1H), 7,80 (s, 0,6H), 7,76-7,71 (m, 2,4H), 7,46-7,31 (m, 5H), 6,81-6,73 (m, 2H), 5,18 (s, 2H), 5,12 (s, 1,2H), 5,01 (s, 0,8H), 4,55 (s, 0,8H), 4,30-4,25 (m, 2,4H), 4,09 (m, 2H), 3,88 (m, 0,8H), 3,26 (m, 2H), 2,90 (m, 2H), 1,50-1,36 (m, 13H); MS/ESI (m+1) = 793,3 (observert), MW = 792,9 (C <sub>35</sub> H <sub>40</sub> N <sub>10</sub> O <sub>8</sub> S <sub>2</sub> ). Gulaktig rødt skum/faststoff.
38	28	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz; DMSO <sub>d6</sub> ) $\delta$ 10,09 (s, 1H), 8,35 (m, 1H), 8,26 (m, 1H), 7,80 (s, 0,6H), 7,76 (s, 0,4H), 7,74-7,72 (m, 2,0H), 7,46-7,31 (m, 5H), 6,79-6,72 (m, 2H), 5,18 (s, 2H), 5,12 (s, 1,2H), 5,01 (s, 0,8H), 4,56 (s, 0,8H), 4,30-4,27 (m, 2,4H), 4,09 (m, 2H), 3,88 (m, 0,8H), 3,25 (m, 2H), 2,89 (m, 2H), 1,49 (m, 2H), 1,36 (m, 11H), 1,25 (m, 2H); MS/ESI (m+1) = 807,3 (observert), MW = 806,9 (C <sub>36</sub> H <sub>42</sub> N <sub>10</sub> O <sub>8</sub> S <sub>2</sub> ). Gult skum/faststoff.
39	29	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -	<sup>1</sup> H NMR (500 MHz; DMSO <sub>d6</sub> ) δ 10,11 (d, <i>J</i> = 3,1 Hz, 1H), 8,37- 8,34 (m, 1H), 8,28-8,24 (m, 1H), 7,80 (s, 0,6H), 7,76 (s, 0,4 Hz), 7,75-7,70 (m, 2H), 7,75-7,31 (m, 5H), 6,82-6,74 (m, 2H), 5,18 (s,

Forb.	Utgangs- materiale	L2	Massespektrometridata og Fysiske data
			2H), 5,12 (s, 1,2H), 5,01 (s, 0,8H), 4,58 (s, 0,8H), 4,29 (m, 1,2H), 4,27 (q, $J = 4,9$ Hz, 1H), 4,06-4,03 (m, 2H), 3,88 (t, $J = 5,2$ Hz, 1H), 3,26-3,20 (m, 2H), 2,88-2,85 (m, 2H), 1,51-1,45 (m, 2H), 1,39-1,32 (m, 11H), 1,28-1,15 (m, 6H). MS/ESI (m+1) = 834,8 (observert), MW = 835,0 (C <sub>38</sub> H <sub>46</sub> N <sub>10</sub> O <sub>8</sub> S <sub>2</sub> ). Rødaktig gult skum/faststoff.
40	30	y y y	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz; DMSO <sub>d6</sub> ) $\delta$ 10,14 (s, 1H), 8,35 (m, 1H), 8,26 (m, 1H), 7,82 (s, 0,6H), 7,78 (s, 0,4H), 7,73 (m, 2H), 7,46-7,31 (m, 5H), 6,81-6,74 (m, 2H), 5,18 (s, 2H), 5,13 (s, 1,2H), 5,02 (s, 0,8H), 4,55 (s, 0,8H), 4,30-4,26 (m, 2,4H), 4,09 (m, 2H), 3,88 (m, 0,8H), 3,50 (m, 2H), 3,43-3,38 (m, 4H), 3,07 (m, 2H), 1,36 (s, 9H); MS/ESI (m+1) = 809,3 (observert), MW = 808,9 (C <sub>35</sub> H <sub>40</sub> N <sub>10</sub> O <sub>9</sub> S <sub>2</sub> ). Lysegult skum.

<u>Eksempel 41:</u> Fremstilling av etyl-2-[2-[2-{2-(t-butoksykarbonyamino)-2-metyl}etyl]amino-6-okso-6,9-dihydro-1H-purin-2-yl]acetat (**41**).

[0119]



**[0120]** Til en omrørt løsning av 4,69 g av forb. **31** i 47 ml DMF, ble det tilsatt 790 mg 55 % NaH i mineralolje og reaksjonsløsningen ble omrørt i 2 timer. Etter dette ble det sakte tilsatt 1,85 ml etylbromacetat, reaksjonsløsningen ble omrørt i ytterligere 2 timer. Reaksjonsblandingen ble konsentrert under vakuum og renset ved kolonnekromatografi (5:95 MeOH:MC) for å oppnå 5,04 g av forb. **41** i form av et lysegult faststoff. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz; DMSO<sub>d6</sub>)  $\delta$  10,55 (s, 1H), 7,67 (s, 1H), 6,74 (d, 1H), 6,40 (m, 1H), 4,87 (s, 2H), 4,17 (q, 2H), 3,65 (m, 1H), 3,28 (m, 1H), 3,16 (m, 1H), 1,36 (s, 9H), 1,21 (t, 3H), 1,01 (d, 3H).

Eksempel 42: Fremstilling av 2-{2-(t-butoksykarbonylamino)etoksy}etylamin (42).

[0121]

**[0122]** Til 146 g [2-{2-(t-butoksykarbonylamino)etoksyletyl]metansulfonat som var blitt oppløst i 500 ml DMF, ble det tilsatt 134 g natriumazid. Reaksjonsblandingen ble omrørt ved 70 °C i 20 timer og deretter konsentrert under redusert trykk. Den resulterende resten ble oppløst i 1 200 ml vann og ekstrahert med EA. Det organiske laget ble tørket over vannfritt natriumsulfat og konsentrert under

vakuum. Den resulterende resten ble oppløst i 2 000 ml THF, som det ble tilsatt 162 g trifenylfosfin til. Reaksjonsblandingen ble omrørt ved RT i 2 timer, etter dette ble det tilsatt 200 ml vann. Reaksjonsblandingen ble omrørt ved RT i 18 timer og konsentrert til 500 ml under redusert trykk. Deretter ble det resulterende bunnfallet filtrert fra. Filtratet ble videre konsentrert under redusert trykk for å fjerne THF og vasket med MC. Det vandige laget ble konsentrert for å oppnå 86,2 g av forb. **42** i form av en væske. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz; CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  4,96 (br s, 1H), 3,54-3,48 (m, 4H), 3,34 (q, 2H), 2,88 (t, 2H), 1,48-1,46 (m, 11H).

<u>Eksempel 43:</u> Fremstilling av 2-[2-{2-(t-butoksykarbonylamino)-etoksy}etyl]amino-1H-purin-6(9H)-on (43).

[0123]



**[0124]** 6,3 g av forb. **42** og 2,0 g 2-bromhypoksantin ble dispergert i 55 ml monometoksyetanol og 17,5 ml vann. Reaksjonsblandingen ble omrørt ved tilbakeløp i 16 timer og løsningsmidlet ble fjernet under redusert trykk. Deretter ble konsentratet omrørt i 20 ml MC og 10 ml vann i 30 min og det resulterende bunnfallet ble oppsamlet ved filtrering for å oppnå 2,1 g av forb. **43** i form av et lysegult faststoff. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz; DMSO<sub>d6</sub>)  $\delta$  12,43 (br s, 1H), 10,45 (br s, 1H), 7,89 (s, 0,2H), 7,61 (s, 0,8H), 6,77 (m, 1H), 6,34 (s, 0,8H), 6,12 (s, 0,2H), 3,52 (t, 2H), 3,41 (m, 4H), 3,09 (q, 2H), 1,36 (s, 9H).

<u>Eksempel 44:</u> Fremstilling av 2-[2-[3-(t-butoksykarbonylamino)propyloksy}-etyl]]-amino-1H-purin-6(9H)-on (**44**).

[0125]



**[0126]** 2-{3-(t-butoksykarbonylamino)propyloksy}etylamin og 2-bromhypoksantin ble omsatt på samme måte ved å følge prosedyren beskrevet i <u>eksempel 43</u> for å gi forbindelse **44** i form av et hvitt faststoff. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz; DMSO<sub>d6</sub>)  $\delta$  12,43 (br s, 1H), 10,45 (br s 1H), 7,61 (m, 1H), 6,80 (t, 1H), 6,30 (s, 0,7H), 6,08 (s, 0,3H), 3,49 (t, 2H), 3,41 (t, 4H), 2,99 (q, 2H), 1,61 (m, 2H), 1,37 (s, 9H).

Eksempel 45: Fremstilling av 2-{3-(t-butoksykarbonylamino)propyl}amino-1H-purin-6(9H)-on (45).

[0127]



**[0128]** En blanding av 10 g klorhypoksantin og 19,6 ml 1,3-diaminopropan dispergert i 40 ml monometoksyetanol ble omrørt ved 130 °C i 10 timer. Deretter ble løsningsmidlet fjernet under

redusert trykk og den resulterende resten ble oppløst i 150 ml THF og 150 ml vann, som det langsomt ble tilsatt 19,2 g Boc<sub>2</sub>O oppløst i 100 ml THF til. Blandingen ble omrørt ved RT i 6 timer. Etterpå ble EA tilsatt, det resulterende bunnfallet ble oppsamlet ved filtrering for å oppnå 6,31 g av forb. **45** i form av et mørkegrønt faststoff. <sup>1</sup>H NMR (400MHz; DMSO<sub>d6</sub>)  $\delta$  11,13 (br s, 1H), 7,64 (s, 1H), 6,87 (s, 1H), 6,31 (s, 1H), 3,23 (q, 2H), 2,98 (m, 2H), 1,62 (m, 2H), 1,38 (s, 9H).

**[0129]** Guaninderivatene **46** ~ **47** ble fremstilt ved anvendelse av et hensiktsmessig diamin ved tilsvarende å følge prosedyren beskrevet i <u>eksempel 45</u>. Massespektrometridataene og de fysiske dataene for forb. **46** ~ **47** er gitt i tabellen nedenfor.

<u>Eksemplene 46 ~ 47:</u> Analytiske data for guaninderivatene **46** ~ **47**.

[0130]

Forb.	Anvendt diamin	n	Massespektrometridata og Fysiske data
46	Etylendiamin	2	1H NMR (500 MHz; DMSO <sub>d6</sub> ) δ 12,43 (br s, 1H), 10,61 (br, 1H), 7,62 (s, 1H), 6,93 (t, 1H), 6,32 (s, 1H), 3,29 (q, 2H),3,10 (q, 2H), 1,37 (s, 9H). Grått faststoff.
47	Pentylendiamin	5	1H NMR (500 MHz; DMSO <sub>d6</sub> ) $\delta$ 12,44 (s, 1H), 10,35 (s, 1H), 7,60 (s, 1H), 6,80 (m, 1H), 6,29 (m, 1H), 3,21 (m, 2H), 2,90 (m, 2H), 1,49 (m, 2H), 1,39-1,35 (m, 11H), 1,27-1,23 (m, 2H). Lysebrunt faststoff.

**[0131]** Forb. **43** ~ **46** ble transformert til forb. **48** ~ **51** ved tilsvarende å følge prosedyren beskrevet i <u>eksempel 32</u>. Massespektrometridataene og de fysiske dataene for forbindelsene **48** ~ **51** er gitt i tabellen nedenfor.

Eksemplene 48 ~ 51: Analytiske data for guaninderivatene 48 ~ 51.

[0132]



Forb.	Utgangs- materiale	L3	Massespektrometridata og Fysiske data
48	43	vy v	$^1\text{H}$ NMR (500 MHz; DMSOd6) $\delta$ 10,67 (s, 1H), 7,69 (s, 1H), 6,78 (m, 1H), 6,15 (t, 1H), 4,87 (s, 2H), 4,15 (q, 2H), 3,51 (m, 2H), 3,41 (m, 4H), 3,10 (m, 2H), 1,37 (s, 9H), 1,20 (t, 3H). Hvitt skum/faststoff.

Forb.	Utgangs- materiale	L3	Massespektrometridata og Fysiske data
49	44		<sup>1</sup> H NMR (500 MHz; DMSO <sub>d6</sub> ) δ 10,57 (s, 1H), 7,69 (s, 1H), 6,79 (m, 1H), 6,44 (m, 1H), 4,87 (s, 2H), 4,16 (q, 2H), 3,48 (t, 2H), 3,40 (m, 4H), 2,99 (q, 2H), 1,61 (m, 2H), 1,37 (s, 9H), 1,21 (t, 3H). Gult skum/faststoff.
50	45	~~~~~	<sup>1</sup> H NMR (500 MHz; DMSO <sub>d6</sub> ) δ 10,64 (s, 1H), 7,68 (s, 1H), 6,91 (t, 1H). 6,47 (s, 1H), 4,88 (s, 2H), 4,16 (q, 2H), 3,28 (q, 2H), 3,08 (q, 2H), 1,36 (s, 9H), 1,21 (t, 3H). Mørkerødt faststoff.
51	46	- ver	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz; DMSO <sub>d6</sub> ) δ 10,44 (br s, 1H), 7,66 (s, 1H), 6,77 (m, 1H), 6,41 (m, 1H), 4,86 (s, 2H), 4,16 (q, 2H), 3,21 (q, 2H), 2,89 (q, 2H), 1,48 (m, 2H), 1,41-1,36 (m, 11H), 1,28-1,19 (m, 5H). Mørkegrått faststoff.

**[0133]** Med utgangspunkt i guaninderivatene **48**, **49** og **51**, ble de modifiserte guanin-PNAmonomerene **52** ~ **54** fremstilt ved tilsvarende å følge prosedyrene beskrevet i <u>eksemplene 34 ~ 35</u>. Massespektrometridataene og de fysiske dataene for forb. **52** ~ **54** er gitt i tabellen nedenfor.

<u>Eksemplene 52 ~ 54:</u> Analytiske data for guanin-PNA-monomerene  $52 \sim 54$ .

# [0134]



Forb.	Utgangs- materiale	L3	Massespektrometridata og Fysiske data
52	48	y y y	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz; DMSO <sub>d6</sub> ) δ 10,61 (m, 1H), 8,36 (m, 1H), 8,25 (m, 1H), 7,76-7,65 (m, 3H), 6,78 (t, 1H), 6,54 (m, 1H), 5,07 (s, 1,2H), 4,96 (s, 0,8H), 4,54 (s, 0,8H), 4,30 (s, 1,2H), 4,25 (m, 1,2H), 4,07 (m, 2H), 3,88 (m, 0,8H), 3,49 (m, 2,4H), 3,40 (m, 3,6H), 3,09 (m, 2H), 1,36 (s, 9H); MS/ESI (m+1) = 676,1 (observert), MW = 675,8 ( $C_{27}H_{33}N_9O_8S_2$ ). Mørkebrunt skum/faststoff.
53	49		<sup>1</sup> H NMR (400 MHz; DMSO <sub>d6</sub> ) $\delta$ 10,69 (s, 1H), 8,36 (m, 1H), 8,25 (m, 1H), 7,73 (m, 2H), 7,64-7,60 (m, 1H), 6,80 (t, 1H), 6,65 (br s, 1H), 5,05 (s, 1,2H), 4,94 (s, 0,8H), 4,54 (s, 0,8H), 4,29 (s, 1,2H), 4,24 (m, 1,2H), 4,07 (m, 2H), 3,87 (m, 0,8H), 3,46~3,39 (m, 6H), 2,97 (m, 2H), 1,60 (m, 2H), 1,36 (s, 9H); MS/ESI (m+1) = 689,8 (observert), MW = 689,8 (C <sub>28</sub> H <sub>35</sub> N <sub>9</sub> O <sub>8</sub> S <sub>2</sub> ). Gult skum/faststoff.

Forb.	Utgangs- materiale	L3	Massespektrometridata og Fysiske data
54	51	vere jore	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz; DMSO <sub>d6</sub> ) δ 10,42-10,40 (m, 1H), 8,37-8,32 (m, 1H), 8,28-8,25 (m, 1H), 7,73-7,70 (m, 2H), 7,58-7,54 (m, 1H), 6,76 (t, 1H), 6,39-6,38 (m, 1H), 5,03 (s, 1,2H), 4,92 (s, 0,8H), 4,54 (s, 0,8H), 4,29 (s, 1,2H), 4,25 (m, 1,2H), 4,08-4,07 (m, 2H), 3,87 (m, 0,8H), 3,18 (m, 2H), 2,89 (m, 2H), 1,47 (m, 2H), 1,40-1,30 (m, 11H), 1,24 (m, 2H). MS/ESI (m+23/MNa+) = 696,2 (observert), MW = 673,8 (C <sub>28</sub> H <sub>35</sub> N <sub>9</sub> O <sub>7</sub> S <sub>2</sub> ). Rødt skum/faststoff.

Eksempel 55: Fremstilling av etyl-2-[6-amino-2-{2-(t-butoksykarbonyl-amino)etyl}-amino-9H-purin-9-yl]acetat (55).

[0135]



**[0136]** Forb. **55** ble fremstilt fra forb. **26** ved tilsvarende å følge prosedyren i <u>eksempel 32</u>. Lysegult faststoff. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz; DMSO<sub>d6</sub>) δ 7,70 (s, 1H), 6,84 (t, 1H), 6,79 (s, 2H), 6,30 (t, 1H), 4,87 (s, 2H), 4,16 (q, 2H), 3,25 (q, 2H), 3,08 (q, 2H), 1,37 (s, 9H), 1,22 (t, 3H).

<u>Eksempel 56:</u> Fremstilling av etyl-2-[6-amino-2-[2-{2,3-bis(benzyloksy-karbonyl)guanidino}etyl]amino-9H-purin-9-yl]acetat (**56**).

[0137]



**[0138]** Til 4,42 g av forb. **55** oppløst i 22 ml MC ble det langsomt tilsatt 22 ml TFA ved 0 °C og løsningen ble omrørt i 2,5 timer. Reaksjonsløsningen ble konsentrert under redusert trykk og til dette ble det tilsatt 100 ml dietyleter. Det resulterende bunnfallet ble oppsamlet ved filtrering for å oppnå 5,79 g av et lysebrunt faststoffmellomprodukt. 3,9 g av mellomproduktet ble oppløst i 39 ml MC, som det ble tilsatt 6,9 ml TEA til ved 0 °C. Løsningen ble omrørt i 15 min ved RT, som det ble tilsatt 2,48 g 1,3-bis(benzyloksykarbonyl)-2-(metyltio)pseudourea til. Deretter ble reaksjonsblandingen omrørt i ytterligere 24 timer og vasket med 0,5 M vandig HCl. Det organiske laget ble tørket over vannfritt magnesiumsulfat og konsentrert under redusert trykk for å gi 4,58 g av

NO/EP2268607

forb. **56** i form av et lysegult faststoff. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz; DMSO<sub>d6</sub>) δ 11,59 (s, 1H), 8,56 (t, 1H), 7,69 (s, 1H), 7,39-7,29 (m, 10H), 6,75 (s, 2H), 6,53 (s, 1H), 5,15 (s, 2H), 5,02 (s, 2H), 4,86 (s, 2H), 4,13 (q, 2H), 3,50 (q, 2H), 3,37 (m, 2H), 1,19 (t, 3H).

<u>Eksempel 57:</u> Fremstilling av etyl-2-[6-(benzyloksykarbonylamino)-2-[2-{2,3-bis-(benzyloksykarbonyl)guanidino}etyl]amino-9H-purin-9-yl]acetat (**57**).

[0139]



**[0140]** 4,54 g av forb. **56** og 8,22 g av N-(benzyloksykarbonyl)-N'-metylimidazoliumtriflat ble oppløst i 90 ml DMF og omrørt i 29 timer ved RT. Løsningsmidlet ble fjernet under redusert trykk og den resulterende resten ble renset ved kolonnekromatografi (1:3 heksan:EA) for å gi 3,06 g av forb. **57** i form av et hvitt skum/faststoff. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz; DMSO<sub>d6</sub>)  $\delta$  11,60 (s, 1H), 10,25 (s, 1H), 8,57 (t, 1H), 7,95 (s, 1H), 7,45-7,29 (m, 15H), 7,14 (t, 1H), 5,18 (s, 2H), 5,14 (s, 2H), 5,02 (s, 2H), 4,95 (s, 2H), 4,15 (q, 2H), 3,54 (q, 2H), 3,42 (q, 2H), 1,19 (t, 3H).

<u>Eksempel 58:</u> Fremstilling av etyl-2-[6-amino-2-{4-(t-butoksykarbonyl-amino)butyl}-amino-9H-purin-9-yl]acetat (**58**).

# [0141]



**[0142]** Forb. **58** ble fremstilt fra forb. **27** i form av et rødaktig gult skum/faststoff ved tilsvarende å følge prosedyren beskrevet i <u>eksempel 32</u>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz; DMSO<sub>d6</sub>)  $\delta$  7,67 (s, 1H), 6,79 (t, 1H), 6,69 (s, 2H), 6,30 (m, 1H), 4,85 (s, 2H), 4,15 (q, 2H), 3,22-3,17 (m, 2H), 2,93-2,89 (m, 2H), 1,45 (m, 2H), 1,40-1,36 (m, 11H), 1,21 (t, 3H).

<u>Eksempel 59:</u> Fremstilling av etyl-2-[6-(benzyloksykarbonylamino)-2-[4-(2,3-bis-(benzyloksykarbonyl)guanidino}butyl]amino-9H-purin-9-yl]acetat (**59**).

[0143]



**[0144]** Forb. **59** ble fremstilt fra forb. **58** i form av et lysegult skum/faststoff ved tilsvarende å følge prosedyrene beskrevet i <u>eksemplene 56 ~ 57</u>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz; DMSO<sub>d6</sub>)  $\delta$  11,49 (s, 1H), 10,12 (s,

1H), 8,28 (t, 1H), 7,91 (s, 1H), 7,45-7,31 (m, 5H), 6,95 (t, 1H), 5,17 (s, 2H), 4,93 (s, 2H), 4,16 (q, 2H), 3,28 (m, 4H), 1,51 (m, 4H), 1,46 (s, 9H), 1,38 (s, 9H), 1,21 (t, 3H).

<u>Eksempel 60:</u> Fremstilling av etyl-2-[6-amino-2-{5-(t-butoksykarbonylamino)-pentyl}amino-9H-purin-9-yl]acetat (**60**).

### [0145]



**[0146]** Forb. **60** ble fremstilt fra forb. **28** i form av et rødaktig gult skum/faststoff ved tilsvarende å følge prosedyren beskrevet i <u>eksempel 32</u>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz; DMSO<sub>d6</sub>)  $\delta$  7,67 (s, 1H), 6,78 (t, 1H), 6,69 (s, 2H), 6,28 (m, 1H), 4,85 (s, 2H), 4,15 (q, 2H), 3,18 (q, 2H), 2,89 (q, 2H), 1,47 (m, 2H), 1,40-1,34 (m, 11H), 1,25 (m, 2H), 1,21 (t, 3H).

<u>Eksempel 61:</u> Fremstilling av etyl-2-[6-{di-(t-butoksykarbonyl))amino-2-[5-1(t-butoksykarbonyl)amino}pentyl]amino-9H-purin-9-yl]acetat (**61**).

[0147]



**[0148]** Til 6,98 g av forb. **60** oppløst i 100 ml THF ble det tilsatt 7,95 g Boc<sub>2</sub>O og 186 mg 4-(N,Ndimetylamino)pyridin og løsningen ble omrørt i 10 min. Deretter ble løsningen blandet med 4,62 ml TEA, omrørt i 30 minutter, langsomt oppvarmet til 50 °C og deretter omrørt i ytterligere 24 timer ved den temperaturen. Reaksjonsløsningen ble konsentrert under vakuum og den resulterende resten ble oppløst i 170 ml EA og vasket i serie med 0,5 M vandig HCl og vann. Det organiske laget ble tørket over vannfritt natriumsulfat, konsentrert og underkastet kromatografisk separasjon. (1:1 heksan:MC  $\rightarrow$  MC) for å oppnå forb. **61** i form av et gult skum/faststoff. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz; DMSO<sub>d6</sub>)  $\delta$  8,05 (s, 1H), 7,23 (t, 1H), 6,77 (t, 1H), 5,00 (s, 2H), 4,19 (q, 2H), 3,25 (q, 2H), 2,91 (q, 2H), 1,53 (m, 2H), 1,40-1,39 (m, 29H), 1,28 (m, 2H), 1,22 (t, 3H).

<u>Eksempel 62:</u> Fremstilling av etyl-2-[2-[2-{2,3-bis-(benzyloksykarbonyl)-guanidino}etyl]amino-6-okso-6,9-dihydro-1H-purin-2-yl]acetat (**62**).

[0149]



**[0150]** Forb. **50** ble omdannet til forb. **62** i form av et hvitt faststoff ved tilsvarende å følge prosedyren beskrevet i <u>eksempel 57</u>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz; DMSO<sub>d6</sub>)  $\delta$  11,59 (s, 1H), 10,68 (s, 1H), 8,50

(t, 1H), 7,68 (s, 1H), 7,42-7,29 (m, 10H), 6,58 (m, 1H), 5,13 (s, 2H), 5,02 (s, 2H), 4,86 (s, 2H), 4,12 (q, 2H), 3,50 (m, 2H), 3,46 (m, 2H), 1,18 (t, 3H).

<u>Eksempel 63:</u> Fremstilling av 2-[6-(benzyloksykarbonylamino)-2-[2-12,3-bis-(benzyloksykarbonyl)guanidino}etyl]amino-9H-purin-9-yl]eddiksyre (**63**).

## [0151]



**[0152]** Til 2,57 g av forb. 57 oppløst i 7,1 ml THF og 7,1 ml vann, ble det tilsatt 340 mg LiOH ved 0 °C og løsningen ble omrørt ved RT i 40 min. Reaksjonsløsningen ble surgjort til pH 5 ~ 6 med 1 N vandig HCl ved 0 °C og det resulterende faststoffet ble samlet ved filtrering for å gi 2,33 g av forb. **63** i form av et hvitt faststoff. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz; DMSO<sub>d6</sub>)  $\delta$  11,59 (s, 1H), 10,21 (s, 1H), 8,57 (t, 1H), 7,93 (s, 1H), 7,45-7,28 (m, 15H), 7,12 (t, 1H), 5,17 (s, 2H), 5,13 (s, 2H), 5,02 (s, 2H), 4,83 (s, 2H), 3,53 (q, 2H), 3,42 (q, 2H).

<u>Eksempel 64:</u> Fremstilling av t-butyl-N-[2-{(9H-fluoren-9-yl)metoksykarbonyl-amino}etyl)]-N-[2-{6-(benzyloksykarbonylamino)-2-[2-{2,3-bis-(benzyloksy-karbonyl)-guanidino}etyl]amino-9H-purin-9yl}acetyl]glysinat (**64**).

### [0153]



**[0154]** Til 1,6 g av forb. **63** oppløst i 30 ml DMF, ble det ved 0 °C tilsatt 660 mg av EDCI og 910 mg Fmoc-Aeg-OtBu. Reaksjonsløsningen ble omrørt i 2 timer ved RT og deretter konsentrert under redusert trykk. Den resulterende resten ble oppløst i 50 ml MC og vasket med 0,5 M vandig HCl og det organiske laget ble tørket over vannfritt natriumsulfat. Deretter ble det organiske laget konsentrert og underkastet kromatografisk separasjon (65:1 MC:MeOH) for å oppnå 500 mg av forb. **64** i form av et hvitt faststoff. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz; DMSO<sub>d6</sub>)  $\delta$  11,59 (s, 0,4H), 11,58 (s, 0,6H), 10,21 (s, 1H), 8,55 (m, 1H), 7,47-7,28 (m, 20H), 7,06 (br, 1H), 5,17-4,89 (m, 8H), 4,34-4,28 (m, 2,8H), 4,20 (m, 1H), 3,95 (s, 1,2H), 3,52 (m, 3,4H), 3,43 (m, 2,2H), 3,34 (m, 1,7H), 3,12 (m, 0,7H), 1,43 (s, 3H), 1,34 (s, 6H).

<u>Eksempel 65:</u> Fremstilling av N-[2-{(9H-fluoren-9-yl)metoksykarbonylamino}-etyl)]-N-[2-{6-(benzyloksykarbonylamino)-2-[2-{2,3-bis(benzyloksykarbonyl)-guanidino}etyl]amino-9H-purin-9yl}acetyl]glysin (**65**).

## [0155]



**[0156]** Til 460 mg av forb. **64** oppløst i 3,6 ml MC, ble det langsomt tilsatt 3,6 ml TFA ved 0 °C. Reaksjonsløsningen ble omrørt ved RT i 3,5 timer og deretter ble 50 ml dietyleter tilsatt. Det resulterende bunnfallet ble oppsamlet ved filtrering for å gi 430 mg av forb. **65** i form av et hvitt faststoff. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz; DMSO<sub>d6</sub>)  $\delta$  11,57 (s, 1H), 10,77 (br s, 1H), 8,66 (s, 1H), 8,54 (s, 1H), 7,87 (m, 2H), 7,63 (m, 2H), 7,50-7,28 (m, 21H), 5,26-4,96 (m, 8H), 4,34-4,18 (m, 4H), 4,03 (s, 1H), 3,52-3,36 (m, 7H), 3,13 (m, 1H). MS/ESI (m+1) = 1019,4 (observert), MW = 1018,0 (C<sub>53</sub>H<sub>51</sub>N<sub>11</sub>O<sub>11</sub>).

<u>Eksempel 66:</u> Fremstilling av N-[2-{(9H-fluoren-9-yl)metoksykarbonylamino}-etyl)]-N-[2-{6-(benzyloksykarbonylamino)-2-[4-{2,3-bis(benzyloksykarbonyl)-guanidino}-butyl]amino-9H-purin-9yl}acetyl]glysin (**66**).

### [0157]



**[0158]** Forb. **59** ble omdannet til forb. **66** i form av et hvitt skum/faststoff ved tilsvarende å følge prosedyrene beskrevet i <u>eksemplene 63 ~ 65</u>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz; DMSO<sub>d6</sub>)  $\delta$  12,84 (br s, 1H), 11,50 (s, 1H), 10,14-10,13 (m, 1H), 8,28 (m, 1H), 7,88 (m, 2H), 7,80-7,77 (m, 1H), 7,68-7,66 (m, 2H), 7,49 (t, 1H), 7,45-7,29 (m, 9H), 6,90 (m, 1H), 5,17 (s, 2H), 5,07 (s, 1,2H), 4,89 (s, 0,8H), 4,35-4,18 (m, 3H), 4,00 (s, 1H), 3,52 (m, 1H), 3,35-3,25 (m, 6H), 3,12 (m, 1H), 1,49 (m, 4H), 1,44 (d, 9H), 1,37 (d, 9H). MS/ESI (m+1) = 978,4 (observert), MW = 978,1 (C<sub>49</sub>H<sub>59</sub>N<sub>11</sub>O<sub>11</sub>).

<u>Eksempel 67:</u> Fremstilling av N-[2-{(9H-fluoren-9-yl)metoksykarbonylamino}-etyl)]-N-[2-[6-[2-{2,3-bis(benzyloksykarbonyl) guanidino}etoksy]metyl-2-okso-2H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-3(7H)-yl]acetyl]glysin (**67**).

# [0159]



**[0160]** Forb. **18** ble omdannet til forb. **67** i form av et lysegult faststoff ved tilsvarende å følge prosedyrene beskrevet i <u>eksemplene 63 ~ 65</u>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz; DMSO<sub>d6</sub>)  $\delta$  11,99 (br s, 1H), 11,57 (br, 1H), 8,56 (m, 1H), 8,48-8,45 (m, 1H), 7,89-7,87 (m, 2H), 7,70-7,65 (m, 2H), 7,49-7,26 (m, 15H), 6,36-6,33 (m, 1H), 5,20 (s, 2H), 5,03-5,01 (m, 3,3H), 4,83 (s, 0,7H), 4,49-4,17 (m, 5,7H), 4,01 (m, 1,3H), 3,57-3,11 (m, 8H); MS/ESI (m+1) = 899,7 (observert), MW = 898,9 (C<sub>47</sub>H<sub>46</sub>N<sub>8</sub>O<sub>11</sub>).

<u>Eksempel 68:</u> Fremstilling av N-[2-{(9H-fluoren-9-yl)metoksykarbonylamino}-etyl)]-N-{2-[2-{2,3-bis-(benzyloksykarbonyl)guanidino}etyl]amino-6-okso-6,9-dihydro-1H-purin-2-yl]acetyl}glysin (**68**).

# [0161]



**[0162]** Forb. **62** ble omdannet til forb. **68** i form av et hvitt skum/faststoff ved å følge prosedyrene beskrevet i eksemplene  $63 \sim 65$ . <sup>1</sup>H NMR (500 MHz; DMSO<sub>d6</sub>)  $\delta$  11,58 (s, 1H), 10,88 (s, 1H), 8,51 (m, 1H), 7,93 (m, 1H), 7,87 (m, 2H), 7,64 (m, 2H), 7,47 (t, 1H), 7,41-7,26 (m, 14H), 6,66 (br, 1H), 5,16-4,89 (m, 8H), 4,34-4,18 (m, 3,8H), 4,00 (m, 1,2H), 3,50-3,35 (m, 7H), 3,13 (m, 1H); MS/ESI (m+1) = 885,3 (observert), MW = 884,9 (C<sub>45</sub>H<sub>44</sub>N<sub>10</sub>O<sub>10</sub>).

<u>Eksempel 69:</u> Fremstilling av 2-[6-{2-(t-butoksykarbonylamino)etoksy}metyl-2-okso-2H-pyrrolo-[2,3-d]pyrimidin-3(7H)-yl]eddiksyre (**69**).

# [0163]



**[0164]** Forb. **16** ble hydrolysert til forbindelse **69** i form av et lysebrunt faststoff ved tilsvarende å følge prosedyren beskrevet i <u>eksempel 11</u>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz; DMSO<sub>d6</sub>)  $\delta$  13,03 (br s, 1H), 11,31 (s,

NO/EP2268607

1H), 8,37 (s, 1H), 6,85 (t, 1H), 6,19 (s, 1H), 4,63 (s, 2H), 4,40 (s, 2H), 3,42 (t, 2H), 3,11 (q, 2H), 1,37 (s, 9H).

<u>Eksempel 70:</u> Fremstilling av metyl-N-[2-{(9H-fluoren-9-yl)metoksykarbonyl-amino}etyl)]-N-{2-[6-{2- (t-butoksykarbonylamino)etoksy}metyl-2-okso-2H-pyrrolo-[2,3-d]pyrimidin-3(7H)-yl]acetyl}glysinat (**70**).

[0165]



**[0166]** 3,6 g av forb. **69**, 3,6 g Fmoc-Aeg-OMe, 2,5 g EDCl, 1,73 g HOBt og 2,24 ml DIEA ble oppløst i 70 ml DMF og omrørt ved RT i 1,5 timer. Reaksjonsløsningen ble fjernet under redusert trykk og den resulterende resten ble oppløst i 100 ml MC og vasket i serie med 1M vandig HCl, destillert vann og saltløsning. Det organiske laget ble tørket over vannfritt natriumsulfat, konsentrert under vakuum og renset ved kolonnekromatografi. (100:2 MC:MeOH) for å gi 2,5 g av forb. **70** i form av et gult skum/faststoff. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz; DMSO<sub>d6</sub>)  $\delta$  11,30 (s, 1H), 8,24 (s, 0,65H), 8,21 (s, 0,35H), 7,89-7,87 (m, 2H), 7,71-7,67 (m, 2H), 7,48-7,25 (m, 5H), 6,87 (t, 1H), 6,17 (s, 0,7H), 6,15 (s, 0,3H), 4,93 (s, 1,3H), 4,74 (s, 0,7H), 4,40-4,39 (m, 2,7H), 4,35-4,21 (m, 3H), 4,08 (s, 1,3H), 3,73 (s, 0,8H), 3,62 (s, 2,2H), 3,51 (t, 1,4H), 3,43-3,30 (m, 3,6H), 3,13-3,10 (m, 3H), 1,37 (s, 9H).

<u>Eksempel 71:</u> Fremstilling av N-[2-{(9H-fluoren-9-yl)metoksykarbonylamino}-etyl)]-N-{2-[6-{2-(t-butoksykarbonylamino)etoksy}metyl-2-okso-2H-pyrrolo-[2,3-d]pyrimidin-3(7H)-yl]acetyl}glysin (**71**).

[0167]



**[0168]** Til 5,0 g av forb. **70** oppløst i 75 ml 1:1:1 acetonitril:aceton:vann, ble det langsomt tilsatt 28,5 ml 2,5 N vandig LiOH ved °C. Reaksjonsløsningen ble omrørt i 10 min og nøytralisert med 20 % vandig sitronsyre. Etterpå ble løsningens pH justert til 8 med mettet vandig natriumbikarbonat, 516 mg Fmoc-OSu ble tilsatt til løsningen og løsningen ble omrørt i 2 timer ved RT. Løsningen ble deretter surgjort til pH 3 med 20 % vandig sitronsyre og omrørt i 90 min ved 0 °C. Det resulterende bunnfallet ble oppsamlet ved filtrering for å gi 4,0 g av forb. **71** i form av et gulaktig grønt faststoff.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz; DMSO<sub>d6</sub>)  $\delta$  12,02 (br, 1H), 8,51-8,49 (m, 1H), 7,89-7,88 (d, 2H), 7,70-7,50 (m, 2H), 7,49 (t, 1H), 7,42-7,28 (m, 4H), 6,87 (t, 1H), 6,36 (s, 0,7H), 6,33 (s, 0,3H), 5,02 (s, 1,2H), 4,84 (0,8H), 4,43-4,42 (m, 2,4H), 4,34-4,19 (m, 3,2H), 4,01 (s, 1,4H), 3,48 (t, 1,2H), 3,44-3,41 (m, 2,1H), 3,37-3,29 (m, 2H), 3,12-3,10 (m, 2,7H), 1,37 (s, 9H); MS/ESI (m+1) = 689,3 (observert), MW = 688,7 (C<sub>35</sub>H<sub>40</sub>N<sub>6</sub>O<sub>9</sub>).

<u>Eksempel 72:</u> Fremstilling av N-[2-{(9H-fluoren-9-yl)metoksykarbonylamino}-etyl)]-N-{2-[5-{(t-butoksykarbonyl)amino}pentyl]amino-6-okso-6,9-dihydro-1H-purin-2-yl]acetyl}glysin (**72**).

[0169]



**[0170]** Forb. **51** ble omdannet til forb. **72** i form av et hvitt skum/faststoff ved tilsvarende å følge prosedyrene beskrevet i <u>eksemplene 69 ~ 71</u>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz; DMSO<sub>d6</sub>)  $\delta$  13,01 (br, 1H), 10,52-10,46 (m, 1H), 7,88 (d, 2H), 7,65 (d, 2H), 7,54 (s, 0,5H), 7,50 (s, 0,5H), 7,48 (m, 1H), 7,40 (t, 2H), 7,31 (m, 2H), 6,81 (t, 0,5H), 6,72 (t, 0,5H), 6,52-6,48 (m, 1H), 4,98 (s, 1H), 4,77 (s, 1H), 4,33 (d, 1H), 4,23-4,21 (m, 2H), 4,05 (m, 1H), 3,96 (s, 1H), 3,50 (m, 1H), 3,35 (m, 2H), 3,21 (m, 2H), 3,14 (q, 1H), 2,88 (m, 2H), 1,46 (q, 2H), 1,39-1,35 (m, 11H), 1,23 (m, 2H); MS/ESI (m+1) = 717,4 (observert), MW = 716,8 (C<sub>36</sub>H<sub>44</sub>N<sub>8</sub>O<sub>8</sub>).

<u>Eksempel 73:</u> Fremstilling av N-[2-{(9H-fluoren-9-yl)metoksykarbonylamino}-etyl)]-N-[2-[6-{bis(t-butoksykarbonyl)amino}-2-{5-(t-butoksykarbonylamino)-pentyl}amino-9H-purin-9-yl]acetyl]glysin (**73**).

[0171]



**[0172]** Forb. **61** ble omdannet til forb. **73** i form av et hvitt skum/faststoff ved tilsvarende å følge prosedyrene beskrevet i <u>eksemplene 69 ~ 71</u>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz; DMSO<sub>d6</sub>)  $\delta$  12,71 (br s, 1H), 7,90-7,87 (m, 3H), 7,67 (m, 2H), 7,44-7,39 (m, 3H), 7,31 (m, 2H), 7,07 (m, 1H), 6,69 (m, 1H), 5,11 (s, 1,2H), 4,93 (s, 0,8H), 4,37-4,21 (m, 3,8H), 4,01 (s, 1,2H), 3,52 (m, 1H), 3,36 (m, 2H), 3,23 (m, 2H), 3,13 (m, 1H), 2,88 (m, 2H), 1,49 (m, 2H), 1,38-1,35 (m, 27H), 1,27-1,25 (m, 4H); MS/ESI (m+1) = 916,5 (observert), MW = 916,0 (C<sub>46</sub>H<sub>61</sub>N<sub>9</sub>O<sub>11</sub>).

**[0173]** <u>Fremstilling av PNA-oligomerer:</u> PNA-monomerene **o**, som ble syntetisert ifølge skjema 4, ble sendt til Panagene, Inc (www.panagene.com, Daejon, Sør-Korea) for å fremstille PNA-oligomerer ved **formel I** fra Panagene ifølge metoden beskrevet i litteraturen, eller med mindre modifisering(er) derav. (Org. Lett. bind 9, 3291-3293, 2006). PNA-oligomerene ble mottatt fra Panagene som

karakterisert ved MALDI-TOF og analysert ved hjelp av  $C_{18}$ -reversfase HPLC. PNA-oligomerene som ble mottatt fra Panagene ble anvendt uten ytterligere rensing.

**[0174]** PNA-monomerene **q** i skjema 5 ble anvendt til å syntetisere PNA-oligomerer ved **formel I** ifølge metoden offentliggjort i teknikkens stand med mindre modifisering(er) derav. (USP 6,133,444) Disse PNA-oligomerene ble renset ved hjelp av C<sub>18</sub>-reversfase-HPLC (vandig acetonitril med 0,1 % TFA) og karakterisert ved MALDI-TOF. Figur 1 tilveiebringer HPLC-kromatogrammene før og etter rensing av <u>Oligo 17</u> ved reversfase HPLC. Figur 2 tilveiebringer et MALDI-TOF-massespektrum for en renset sats av <u>Oligo 17</u>. Figurene 1 og 2 tilveiebringes kun som illustrerende formål og skal ikke tolkes som en begrensning for denne oppfinnelsen.

**[0175]** PNA-oligomerene syntetisert for denne oppfinnelsen er gitt i tabell 1 sammen med deres molekylvektdata ved MALDI-TOF. Av forkortelsene som anvendes i tabell 1 refererer A, T, G og C til henholdsvis umodifisert nukleobaseadenin, tymin, guanin og cytosin. De modifiserte nukleobasene C(mXn), C(mXng), A(mXn), A(m), A(mg) og G(m) er som definert i tabell 1 nedenfor sammen med Lys, Fam, L(1) og L(2). Disse PNA-oligomerene er kun presentert som illustrerende formål og skal ikke tolkes som en begrensning for den foreliggende oppfinnelsen.

Oppføring	Sekvens (N $ ightarrow$ C)	MW	(m+1) <sup>b</sup>
Oligo 1	Fam-L(1)L(1)-TGC(1O3)-TAC(1O3)-TAC(1O3)-TG-Lys-NH <sub>2</sub>	4079,0	4078,3
Oligo 2	Fam-L(1)L(1)-TGC-TAC-TAC-TG-Lys-NH <sub>2</sub>	3745,6	3745,5
Oligo 3	TGC(103)-TAC-TAC(103)-TG-Lys-NH <sub>2</sub>	3319,4	3318,5
Oligo 4	TGC-TAC(1O3)-TAC-TG-Lys-NH <sub>2</sub>	3208,3	3208,3
Oligo 5	TGC-TAC-TAC-TG-Lys-NH <sub>2</sub>	3097,2	3097,8
Oligo 6	Fam-L(1)L(1)-TC(1O3)T-CC(1O3)C-AGC(1O3)-GTG-C(1O3)GC-C(1O3)AT-Lys- NH2	6140,1	6141,8
Oligo 7	Fam-L(1)L(1)-TCT-CCC-AGC-GTG-CGC-CAT-Lys-NH <sub>2</sub>	5584,4	5583,1
Oligo 8	TGC(2O2)-TAC-TAC(2O2)-TG-Lys-NH <sub>2</sub>	3319,4	3318,9
Oligo 9	GC(2O2)A-C(2O2)AT-TTG-C(2O2)CT-NH2	3553,7	3552,7
Oligo 10	GC(102)A-C(102)AT-TTG-C(102)CT-NH2	3511,6	3511,1
Oligo 11	GCA-CAT-TTG-CCT-Lys-NH <sub>2</sub>	3348,3	3345,8
Oligo 12	CA(3)T-A(3)GT-A(3)TA-A(3)GT-NH2	3580,8	3580,9
Oligo 13	CA(4)T-A(4)GT-A(4)TA-A(4)GT-NH2	3636,9	3634,9
Oligo 14	CA(5)T-A(5)GT-A(5)TA-A(5)GT-NH <sub>2</sub>	3693,0	3691,5
Oligo 15	CA(7)T-A(7)GT-A(7)TA-A(7)GT-NH2	3805,0	3803,4
Oligo 16	CAT-AGT-ATA-AGT-Lys-NH <sub>2</sub>	3420,3	3418,3
Oligo 17	CA(5)T-A(5)GT-A(5)TA-A(5)GT-Lys-NH <sub>2</sub>	3820,9	3819,8
Oligo 18	CA(2O2)T-A(2O2)GT-A(2O2)TA-A(2O2)GT-NH2	3700,7	3701,4
Oligo 19	L(1)-TAG(2O3)-CTG(2O3)-CTG-ATT-Lys-NH <sub>2</sub>	3746,9	3748,9
Oligo 20	TG(5)G-C(1O2)AA-C(1O2)TG-A(5)T-Lys-NH <sub>2</sub>	3525,6	3523,8
Oligo 21	Fam-L(2)-TG(5)G-C(102)AA-C(102)TG-A(5)T-Lys-NH <sub>2</sub>	3997,0	3996,1
Oligo 22	Fam-L(2)-TT-C(1O2)AT-A(5)GT-A(5)TA-AG(5)T-Lys-NH <sub>2</sub>	4806,9	4806,7
Oligo 23	Fam-L(2)L(2)-TC(1O2)A-GA(5)A-C(1O2)TT-A(5)T-Lys-NH <sub>2</sub>	4084,2	4083,8
Oligo 24	$Fam-L(2)-CA(5)T-A(4_g)GT-A(4_g)TA(5)-AGT-Lys-NH_2$	4348,5	4347,4
Oligo 25	TT-C(1O2g)AT-A(5)GT-A(5)TA-AG(5)T-Lys-NH2	4377,4	4375,6
Oligo 26	GC(1N3)A-C(1N3)AT-TTG-C(1N3)CT-NH2	3550,8	3550,9
Oligo 27	CAT-AGT-ATA-AGT-NH <sub>2</sub>	3292,3	3292,5
Oligo 28	Fam-L(2)-TGG-CAA-CTG-AT-Lys-NH <sub>2</sub>	3617,5	3616,3
a. De benyt	ede forkortelsene for monomerene er definert som under.		
b. Observer	t ionetopp for MH⁺ med mindre annet er angitt.		

Tabell 1. PNA-oligomerene ifølge denne oppfinnelsen og massespektrometridata derav.<sup>a</sup>



**[0176] <u>Bindingsaffinitet for DNA:</u>** PNA-oligomerene ifølge denne oppfinnelsen ble evaluert med hensyn på deres bindingsaffinitet for DNA ved å måle T<sub>m</sub>-verdiene som følger.

**[0177]** 4 μM PNA-oligomer og 4 μM DNA ble blandet i vandig buffer (pH 7,16, 10 mM natriumfosfat, 100 mM NaCl) og inkubert ved 90 °C i noen få minutter og langsomt avkjølt til RT. Løsningen ble deretter overført til en 4 ml kvartskuvette og kuvetten ble tett tillukket. Kuvetten ble montert på et Agilent 8453 UV/synlig spektrofotometer og absorbansendringene ved 260 nm ble registrert ved å øke temperaturen i kuvetten med enten 0,5 eller 1,0 °C per minutt. Fra absorbans- vs.

temperaturkurven, ble temperaturen som viser den største økningsraten i absorbans lest ut som smeltetemperaturen  $T_m$  mellom PNA og DNA. DNA-er for  $T_m$ -måling ble kjøpt enten fra Bioneer, Inc. (www.bioneer.com, Daejon, Sør-Korea) eller fra Ahram Biosystems (www.ahrambio.com, Seoul, Sør-Korea) og anvendt uten ytterligere rensing.

**[0178]** Figur 3 tilveiebringer grafer av absorbansendringer med temperatur for <u>Oligo 17</u> mot komplementær eller mismatch DNA. For sekvenser av mismatch-DNA-ene mot <u>Oligo 17</u>, se tabell 2. I

figur 3 er det en overgangstemperatur i hver kurve, som ble lest ut som T<sub>m</sub>-verdien for kurven. **[0179]** T<sub>m</sub>-verdiene er gitt i tabell 2 for PNA-oligomerer ifølge oppfinnelsen. Disse T<sub>m</sub>-verdiene er gitt kun for illustrerende formål og må ikke tolkes som en begrensning for denne oppfinnelsen.

Oppføring	DNA-sekvens (5' $\rightarrow$ 3')	T <sub>m</sub> , °C	Bemerkning
Oligo 5		55	umodifisert PNA-oligomer
Oligo 3		65	C(1O3) x 2
Oligo 4	CAG-TAG-TAG-CA	61	C(1O3) x 1
Oligo 8		68	C(2O2) x 2
Oligo 10		> 85	C(1O2) x 3
Oligo 11	AGG-CAA-TTG-TGC	59	umodifisert PNA-oligomer
Oligo 12		60	A(3) x 4
Oligo 13		64	A(4) x 4
Oligo 14		69	A(5) x 4
Oligo 15	ACT-TAT-ACT-ATG	71	A(7) x 4
Oligo 18		66	A(2O2) x 4
Oligo 27		55	umodifisert PNA-oligomer
Oligo 16	ACT-TAT-ACT-ATG	56	umodifisert PNA-oligomer
	ACT-TAT-ACT-ATG	72	komplementær
Oligo 17	ACT-TA <b>C</b> -ACT-ATG	61	mismatch (T $\rightarrow$ C)
Oligo 17	ACT-T <b>A<u>A</u>-</b> ACT-ATG	59	mismatch (T $\rightarrow$ A)
	ACT-TA <b>G</b> -ACT-ATG	58	mismatch (T $\rightarrow$ G)
Oligo 24	ACT-TAT-ACT-ATG	70	A(5) x 2 pluss A(4g) x 2
Oligo 20	ATC-AGT-TGC-CA	84	komplementær
	ATC-A <u>T</u> T-TGC-CA	62	mismatch (G $\rightarrow$ T)
	ATC-A <u>T</u> T-TGC-CA	65	mismatch (G $\rightarrow$ A)

Tabell 2. T<sub>m</sub>-verdier mellom PNA og komplementær eller mismatch DNA.

**[0180]** Utskifting av cytosin med et unaturlig nukleobasepyrrolocytosinderivat ifølge denne oppfinnelsen økte merkbart PNA-oligomerenes affinitet for komplementær DNA. For eksempel viste <u>Oligo 10</u> som har tre 'modifiserte' cytosin 'C(1O2)-monomerer en T<sub>m</sub> over 85 °C, mens den tilsvarende 'umodifiserte' <u>Oligo 11</u> viste en T<sub>m</sub> på 58 °C. Andre modifiserte cytosinmonomerer så som 'C(1O3) eller 'C(2O2)' økte også PNA-oligomerenes affinitet for komplementær DNA merkbart, som eksemplifisert med <u>Oligo 3</u> og <u>Oligo 8</u>.

**[0181]** 'Modifiserte' adeninnukleobaser ifølge denne oppfinnelsen økte også PNA-oligomerenes affinitet for komplementært DNA merkbart. For eksempel viste <u>Oligo 15</u> som har fire 'modifiserte' adenin A-(7)-monomerer en  $T_m$  på 71 °C, som er vesentlig høyere enn  $T_m$ -en på 55 °C som ble observert med 'umodifisert' <u>Oligo 27</u>. Andre 'modifiserte' adeninmonomerer så som A(4) og A(5) økte også affiniteten for komplementært DNA merkbart.

**[0182]** De 'modifiserte' PNA-monomerene ifølge denne oppfinnelsen ble funnet å være svært følsomme for basemismatch. For eksempel ble reduksjoner på  $11 \sim 14$  °C i T<sub>m</sub> observert med enkle basemismatcher for en A(5)-monomer i <u>Oligo 17</u>. Enkle basemismatcher for en C(102)-monomer i <u>Oligo 20</u> resulterte i reduksjoner på  $19 \sim 22$ °C i T<sub>m</sub>.

**[0183]** <u>Cellegjennomtrengning</u>: For å evaluere cellegjennomtrengningsevnen til PNA-oligomerene ifølge denne oppfinnelsen ble kreftceller av human opprinnelse behandlet med PNA-oligomerer kovalent merket med fluorescein. Den anvendte metoden er gitt i korte trekk som følger.

**[0184]** Til hvert dekkglass (autoklavert) plassert i hver brønn av en 24-brønners plate, ble det sådd 20 000 ~ 100 000 celler avhengig av vekstraten til cellelinjen som anvendes og cellene ble dyrket ved 37 °C og 5 % CO<sub>2</sub> i 16 til 24 t. Deretter ble mediet erstattet med 500 µl ferskt Opti-MEM-medium (med eller uten 1 % FBS) og til dette ble det tilsatt en alikvot av vandig stamløsning av en PNA-oligomer kovalent merket med fluorescein. Etter at cellene ble dyrket i et utpekt intervall ble cellene vasket med PBS og fiksert ved å inkubere de i 3,7 eller 4 % paraformaldehyd. Cellene ble grundig vasket flere ganger med PBS eller PBS inneholdende 0,1 % Tween-20. Deretter ble dekkglasset montert på et objektglass ved hjelp av en dråpe monteringsløsning og forseglet med neglelakk for konfokal fluorescensmikroskopi. Fluorescensbildene ble tatt på enten et Zeiss LSM 510-konfokalt mikroskop (Tyskland) ved 63X objektiv eller på et Nikon C1Si-konfokalt mikroskop ved 40X objektiv. **[0185]** Cellegjennomtrengningsbildene i figurene 4~8 er gitt kun for illustrative formål og må ikke tolkes som en begrensning av oppfinnelsen.

**[0186]** I figur 4(a) og 4(b) er det gitt konfokalmikroskopibilder (ved 63x objektiv) 1, 2, 3 og 24 timer etter at HeLa-cellene ble behandlet med henholdsvis <u>Oligo 1</u> og <u>Oligo 2</u> ved 5  $\mu$ M (uten FBS). Mens fluorescensintensiteten er klar og blir intens i løpet av 24 timer i figur 4(a), er fluorescensintensiteten svak i figur 4(b), noe som indikerer at Oligo 1 giennomtrenger Hela-cellene

fluorescensintensiteten svak i figur 4(b), noe som indikerer at <u>Oligo 1</u> gjennomtrenger HeLa-cellene vesentlig raskere enn 'umodifisert' <u>Oligo 2</u>.

**[0187]** I figur 5(a) og 5(b) er det gitt konfokalmikroskopibilder (ved 63x objektiv) 0,5 og 1 time etter at MCF-7-cellene ble behandlet med henholdsvis <u>Oligo 6</u> og <u>Oligo 7</u> ved 2,5  $\mu$ M (uten FBS). Mens fluorescensintensiteten er klar og blir intens i løpet av 1 t i figur 5(a) er fluorescensintensiteten svak i figur 5(b), noe som indikerer at <u>Oligo 6</u> gjennomtrenger MCF-7-cellene vesentlig raskere enn 'umodifisert' <u>Oligo 7</u>.

**[0188]** I figur 6(a) og 6(b) er det gitt konfokalmikroskopibilder (ved 40x objektiv) 6 eller 24 timer etter at HeLa-cellene ble behandlet med henholdsvis <u>Oligo 1</u> og <u>Oligo 6</u> ved 1 μM (med 1 % FBS). Mens fluorescensintensiteten er svak selv etter 24 timer i figur 6(a), er fluorescensintensiteten klar og blir intens i løpet av 24 timer i figur 6(b), noe som tyder på at <u>Oligo 6</u> gjennomtrenger HeLacellene vesentlig raskere enn <u>Oligo 1</u>.

**[0189]** I figur 7(a) og 7(b) er det gitt konfokalmikroskopibilder (40x objektiv) 24 timer etter at JARcellene ble behandlet med henholdsvis <u>Oligo 21</u> og <u>Oligo 28</u> ved 2  $\mu$ M (uten FBS). Mens fluorescensintensiteten er sterk i figur 7(a), er det ingen vesentlig fluorescensintensitet i figur 7(b), noe som tyder på at <u>Oligo 21</u> gjennomtrenger JAR-cellene vesentlig raskere enn 'umodifisert' <u>Oligo</u> <u>28</u>.

**[0190]** I figur 7(c) og 7(d) er det gitt konfokalmikroskopibilder (ved 40x objektiv) 24 timer etter at A549-cellene ble behandlet med henholdsvis <u>Oligo 21</u> og <u>Oligo 28</u> ved 2 μM (uten FBS). Mens fluorescensintensiteten er sterk i figur 7(c), er det ingen vesentlig fluorescensintensitet i figur 7(d), noe som tyder på at <u>Oligo 21</u> gjennomtrenger A549-cellene vesentlig raskere enn 'umodifisert' <u>Oligo 28</u>.

**[0191]** I figur 7(e) og 7(f) er det gitt konfokalmikroskopibilder (ved 40x objektiv) 12 t etter at HeLacellene ble behandlet med henholdsvis <u>Oligo 21</u> og <u>Oligo 28</u> ved 2  $\mu$ M (uten FBS). Mens fluorescensintensiteten er tydelig i figur 7(e), er det ingen vesentlig fluorescensintensitet i figur 7(f), hvilket antyder at <u>Oligo 21</u> gjennomtrenger HeLa-cellene vesentlig raskere enn 'umodifisert' <u>Oligo</u> <u>28</u>.

**[0192]** I figur 7(g) er det gitt konfokalmikroskopibilder (ved 40x objektiv) 24 timer etter at HeLacellene ble behandlet med <u>Oligo 21</u> ved 2  $\mu$ M (uten FBS). Gitt at cellefluorescensen i figur 7(g) er vesentlig sterkere enn den i figur 7(e), synes <u>Oligo 21</u> ut til å gjennomtrenge i 24 timer i stedet for i 12 timer.

**[0193]** Figur 8(a), 8(b) og 8(c) tilveiebringer konfokalmikroskopibilder (40x objektiv) 24 timer etter at henholdsvis HeLa-, A549- og JAR-cellene ble behandlet med 2  $\mu$ M <u>Oligo 22</u> (uten FBS). Alle bildene forbindes med fluorescens i cellen, noe som indikerer at <u>Oligo 22</u> besitter god cellegjennomtrengning i de undersøkte cellene.

[0194] <u>Antisenseeksempel:</u> Oligo 9 og Oligo 12 har de samme basesekvensene som henholdsvis T1-12 og T5-12, som ble rapportert å hemme ribosomal syntese av mdm2 i litteraturen. (Nucleic Acids Res. bind 32, 4893-4902, 2004) <u>Oligo 9</u> og <u>Oligo 12</u> ble evaluert for deres evne til å hemme ribosomal syntese av mdm2 i JAR-celler som følger. Det følgende antisenseeksemplet presenteres kun for illustrerende formål og skal ikke tolkes som en begrensning for den foreliggende oppfinnelsen.
[0195] JAR-celler (ATCC-katalog # HTB-144) ble dyrket i RPMI-1640-medium supplert med 10 % FBS

og 1 % penicillin-streptomycin ved 37 °C og 5 % CO<sub>2</sub>. Cellene ble deretter sådd ut i hver brønn av en 12-brønners plate inneholdende 1 ml av det samme mediet og behandlet med en alikvot av en vandig forrådsløsning av <u>Oligo 9</u> eller <u>Oligo 12</u> av en bestemt konsentrasjon. Deretter ble cellene inkubert ved 37 °C og 5 % CO<sub>2</sub> i 15 timer.

**[0196]** Cellene i hver brønn ble vasket med kald PBS og behandlet med 80  $\mu$ l RIPA-buffer inneholdende 1 % proteasehemmercocktail og platen ble inkubert ved 4 °C og omrørt langsomt i 15 min. Innholdet i hver brønn ble skrapet ut i et mikrorør. Mikrorøret ble inkubert på is i 10 min og sentrifugert ved 10 000 g. Den resulterende supernatanten ble samlet og underkastet proteinkvantifisering av Bradford-analysen og western blott-analysen. For elektroforese ble 20  $\mu$ g av proteinet fylt på hvert spor av gelen i et minigelapparat, separert og overført på en PVDF-membran (0,45  $\mu$ , Millipore). Det primære mdm2-antistoffet som ble anvendt til western blotting var SC-965 (Santa Cruz Biotechnology).

**[0197]** Figur 9 gir western blotting-resultater for JAR-celler behandlet med 5 eller 10  $\mu$ M <u>Oligo 9</u>, 5 eller 10  $\mu$ M <u>Oligo 10</u>, kobehandling med oligomerene ved 5 eller 10  $\mu$ M hver og blank (ingen oligomerbehandling). I figur 9 hemmet behandling med <u>Oligo 9</u> eller <u>Oligo 10</u>, eller kobehandling med <u>Oligo 9</u> og <u>Oligo 10</u> i vesentlig grad ribosomal syntese av mdm2 i JAR-celler både ved 5 og 10  $\mu$ M.

#### Patentkrav

**1.** Peptidnukleinsyrederivat ved **formel I** eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav:





#### der

n er et heltall lik eller større enn 5;

S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, .... S<sub>n-1</sub>, S<sub>n</sub>, T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, ..., T<sub>n-1</sub> og T<sub>n</sub> uavhengig representerer hydrogen, deuterium, substituert eller usubstituert alkyl, eller substituert eller usubstituert arylradikal; X og Y uavhengig representerer hydrogen, deuterium, substituert eller usubstituert alkyl, substituert eller usubstitutert acyl, substituert eller usubstituert sulfonyl, eller substituert eller usubstituert arylradikal;

Z representerer hydroksy, substituert eller usubstituert alkyloksy, substituert eller usubstituert aryloksy, substituert eller usubstituert amino, radikal;

B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, ..., B<sub>n-1</sub> og B<sub>n</sub> velges uavhengig fra naturlige nukleobaser, inkludert adenin, tymin, guanin, cytosin og uracil og unaturlige nukleobaser; og

minst én av  $B_1$ ,  $B_2$ , ...,  $B_{n-1}$  og  $B_n$  velges uavhengig fra unaturlige nukleobaser representert ved **formel II**, **formel III** eller **formel IV**:



der

 $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_5$  og  $R_6$  velges uavhengig fra substituert eller usubstituert alkyl og hydrogenradikal;

og L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub> og L<sub>3</sub> er et kovalent bindingsmiddel representert ved **formel V** som forbinder en basisk aminogruppe til resten ansvarlig for nukleobasesammenkoblingsegenskaper:



Formel V

#### der

 $Q_1$  og  $Q_m$  er substituert eller usubstituert metylen (-CH<sub>2</sub>-)-radikal og  $Q_m$  knyttes direkte til den basiske aminogruppen;

 $Q_2$ ,  $Q_3$ , ... og  $Q_{m-1}$  velges uavhengig fra substituert eller usubstituert metylen, oksygen (-O-), svovel (-S-) og substituert eller usubstituert aminoradikal [-N(H)-, eller -N(substituent)-]; og m er et heltall fra 2 til 15.

2. Peptidnukleinsyrederivatet ifølge krav 1 eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav:

#### der

n er et heltall fra 5 til 30;

 $S_1,\,S_2,\,...,\,S_{n\text{-}1},\,S_n,\,T_1,\,T_2,\,...,\,T_{n\text{-}1}$  og  $T_n$  er hydrogenradikal;

X og Y velges uavhengig fra hydrogen, substituert eller usubstituert alkyl, substituert eller usubstituert acyl, substituert eller usubstituert sulfonylradikal;

Z representerer hydroksy, substituert eller usubstituert alkyloksy, substituert eller usubstituert aryloksy, substituert eller usubstituert aminoradikal;

 $B_1$ ,  $B_2$ , ...,  $B_{n-1}$  og  $B_n$  velges uavhengig fra naturlige nukleobaser inkludert adenin, tymin, guanin, cytosin og uracil og unaturlige nukleobaser; og

minst én av  $B_1$ ,  $B_2$ , ...,  $B_{n-1}$  og  $B_n$  velges uavhengig fra unaturlige nukleobaser representert ved **formel II**, **formel III** eller **formel IV**.

**3.** Peptidnukleinsyrederivatet ifølge krav 1 eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav:

der

n er et heltall fra 8 til 25;

 $S_1,\,S_2,\,...,\,S_{n\text{-}1},\,S_n,\,T_1,\,T_2,\,...,\,T_{n\text{-}1}$  og  $T_n$  er hydrogenradikal;

X og Y velges uavhengig fra hydrogen og substituert eller usubstituert alkyl, substituert eller usubstituert acylradikal;

Z representerer hydroksy eller substituert eller usubstituert aminoradikal;

B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, ..., B<sub>n-1</sub> og B<sub>n</sub> velges uavhengig fra naturlige nukleobaser, inkludert adenin, tymin, guanin, cytosin og uracil og unaturlige nukleobaser,

minst to av  $B_1$ ,  $B_2$ , ...,  $B_{n-1}$  og  $B_n$  velges uavhengig fra unaturlige nukleobaser representert ved **formel II**, **formel III**, **formel IV**;

 $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_5$  og  $R_6$  velges uavhengig fra substituert eller usubstituert alkyl og hydrogenradikal;

 $Q_1$  og  $Q_m$  er substituert eller usubstituert metylenradikal og  $Q_m$  knyttes direkte til den basiske aminogruppen;

 $Q_2, Q_3, ...$  og  $Q_{m-1}$  velges uavhengig fra substituert eller usubstituert metylen-, oksygen- og aminoradikal; og

m er et heltall fra 2 til 12.

**4.** Peptidnukleinsyrederivatet ifølge krav 1 eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav:

der

n er et heltall fra 10 til 25;

 $S_1,\,S_2,\,...,\,S_{n\text{-}1},\,S_n,\,T_1,\,T_2,\,...,\,T_{n\text{-}1}$  og  $T_n$  er hydrogenradikal;

X og Y velges uavhengig fra hydrogen og substituert eller usubstituert acylradikal; Z representerer hydroksy eller substituert eller usubstituert aminoradikal;

 $B_1$ ,  $B_2$ , ...,  $B_{n-1}$  og  $B_n$  velges uavhengig fra naturlige nukleobaser, inkludert adenin, tymin, guanin, cytosin og uracil og unaturlige nukleobaser;

minst tre av B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, ..., B<sub>n-1</sub> og B<sub>n</sub> velges uavhengig fra unaturlige nukleobaser representert ved **formel II**, **formel III**, **formel IV**;

 $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_5$  og  $R_6$  velges uavhengig fra substituert eller usubstituert alkyl og hydrogenradikal;

 $Q_1$  og  $Q_m$  er metylenradikal og  $Q_m$  knyttes direkte til den basiske aminogruppen;  $Q_2$ ,  $Q_3$ , ... og  $Q_{m-1}$  velges uavhengig fra metylen-, oksygen- og aminoradikal; og m er et heltall fra 2 til 10.

**5.** Peptidnukleinsyrederivatet ifølge krav 1 eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav:

der

n er et heltall fra 10 til 20;

 $S_1,\,S_2,\,...,\,S_{n\text{-}1},\,S_n,\,T_1,\,T_2,\,...,\,T_{n\text{-}1}$  og  $T_n$  er hydrogenradikal;

X og Y velges uavhengig fra hydrogen og substituert eller usubstituert acylradikal;

Z representerer hydroksy eller substituert eller usubstituert aminoradikal;

B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, ..., B<sub>n-1</sub> og B<sub>n</sub> velges uavhengig fra naturlige nukleobaser, inkludert adenin, tymin, guanin, cytosin og uracil og unaturlige nukleobaser;

minst tre av B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, ..., B<sub>n-1</sub> og Bn velges uavhengig fra unaturlige nukleobaser som representeres ved **formel II**, **formel III** eller **formel IV**;

 $R_1$ ,  $R_3$  og  $R_5$  er hydrogenradikal og  $R_2$ ,  $R_4$  og  $R_6$  uavhengig representerer hydrogen, eller substituert eller usubstituert amidinylradikal;

 $Q_1$  og  $Q_m$  er metylenradikal og  $Q_m$  knyttes direkte til den basiske aminogruppen;  $Q_2$ ,  $Q_3$ , ... og  $Q_{m-1}$  velges uavhengig fra metylen-, oksygen- og aminoradikal; og m er et heltall fra 2 til 10.

**6.** Peptidnukleinsyrederivatet ifølge krav 1 eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav:

der

n er et heltall fra 10 til 20;

 $S_1$ ,  $S_2$ , ...,  $S_{n-1}$ , Sn,  $T_1$ ,  $T_2$ , ...,  $T_{n-1}$  og  $T_n$  er hydrogenradikal;

X og Y velges uavhengig fra hydrogen og substituert eller usubstituert acylradikal,

Z representerer hydroksy eller substituert eller usubstituert aminoradikal;

 $B_1$ ,  $B_2$ , ...,  $b_{n-1}$  og  $B_n$  velges uavhengig fra adenin, tymin, guanin, cytosin og uracil og unaturlige nukleobaser;

minst tre av  $B_1$ ,  $B_2$ , ...,  $B_{n-1}$  og  $B_n$  velges uavhengig fra unaturlige nukleobaser representert ved **formel II**, **formel III** eller **formel IV**;

 $R_1$ ,  $R_3$  og  $R_5$  er hydrogenradikal og  $R_2$ ,  $R_4$  og  $R_6$  uavhengig representerer hydrogen- eller amidinylradikal;

 $Q_1$  og  $Q_m$  er metylenradikal og  $Q_m$  knyttes direkte til den basiske aminogruppen;  $Q_2$ ,  $Q_3$ , ... og  $Q_{m-1}$  velges uavhengig fra metylen- og oksygenradikal; og m er et heltall fra 2 til 8.

7. Peptidnukleinsyrederivatet ifølge krav 1 eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav:

der n er et heltall fra 8 til 20; S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, ..., S<sub>n-1</sub>, S<sub>n</sub>, T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>n-1</sub> og T<sub>n</sub> er hydrogenradikal; X er hydrogenradikal; Y representerer hydrogen, eller substituert eller usubstituert acylradikal; Z representerer hydroksy eller substituert eller usubstituert aminoradikal; B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, ..., B<sub>n-1</sub> og B<sub>n</sub> velges uavhengig fra adenin, tymin, guanin, cytosin og unaturlige nukleobaser; minst tre av B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, ..., B<sub>n-1</sub> og B<sub>n</sub> velges uavhengig fra unaturlige nukleobaser som representeres ved formel II, formel III eller formel IV; R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub> og R<sub>5</sub> er hydrogenradikal og R<sub>2</sub>, R<sub>4</sub> og R<sub>6</sub> uavhengig representerer hydrogeneller amidinylradikal; L<sub>1</sub> representerer -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>- eller -CH<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>- der den høyre enden knyttes direkte til den basiske aminogruppen; og L<sub>2</sub> og L<sub>3</sub> velges uavhengig fra -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>- og - (CH<sub>2</sub>)<sub>8</sub>- der den høyre enden knyttes direkte til den basiske aminogruppen.

8. Farmasøytisk sammensetning som inneholder en terapeutisk effektiv mengde av peptidnukleinsyrederivatet ifølge hvilket som helst av kravene  $1 \sim 7$  eller et farmasøytisk akseptabelt salt derav for et terapeutisk formål.

**9.** Metode for å anvende nukleinsyrederivatet ifølge hvilket som helst av kravene  $1 \sim 7$  eller et salt derav for et diagnostisk formål.

**10.** Metode for å anvende peptidnukleinsyrederivatet ifølge hvilket som helst av kravene  $1 \sim 7$  eller et salt derav for in vitro-modulering av cellulær proteinuttrykking.

**11.** Forbindelse ved **formel VI**:



#### der

R<sub>7</sub> er hydrogen, N-suksinyl, eller substituert eller usubstituert alkylradikal; P<sub>1</sub> velges fra hydrogen, t-butoksykarbonyl, (9H-fluoren-9-yl)metoksy-karbonyl, substituert eller usubstituert benzyloksykarbonyl og substituert eller usubstituert arylsulfonylradikal; P<sub>2</sub> velges fra hydrogen, t-butoksykarbonyl, (9H-fluoren-9-yl)metoksy-karbonyl, substituert eller usubstituert benzyloksykarbonyl, substituert alkyloksykarbonyl, substituert eller usubstituert alkyl, amidinyl, 1,3-bis(t-butoksykarbonyl)amidinyl, 1,3-bis-(benzyloksykarbonyl)amidinylradikal; og

 $L_1$  er et bindeledd representert ved formel V:



der

 $Q_1$  og  $Q_m$  er substituert eller usubstituert metylenradikal og  $Q_m$  knyttes direkte til aminoradikalet;

 $Q_2$ ,  $Q_3$ , ... og  $Q_m$ -1 velges uavhengig fra substituert eller usubstituert metylen, oksygen, svovel og substituert eller usubstituert aminoradikal; og m er et heltall fra 2 til 15.

**12.** Forbindelse ved **formel VII**:



Formel VII

#### der

R<sub>8</sub> er hydrogen, N-suksinyl eller substituert eller usubstituert alkylradikal; P<sub>1</sub>velges fra hydrogen, t-butoksykarbonyl, (9H-fluoren-9-yl)metoksy-karbonyl, substituert eller usubstituert benzyloksykarbonyl og substituert eller usubstituert arylsulfonylradikal; P<sub>2</sub> velges fra hydrogen, t-butoksykarbonyl, (9H-fluoren-9-yl)metoksy-karbonyl, substituert eller usubstituert benzyloksykarbonyl, substituert alkyloksykarbonyl, substituert eller usubstituert alkyl, amidinyl, 1,3-bis(t-butoksykarbonyl)amidinyl, 1,3-bis-(benzyloksykarbonyl)amidinylradikal;

P<sub>3</sub> velges fra hydrogen, t-butoksykarbonyl, (9H-fluoren-9-yl)metoksy-karbonyl, substituert eller usubstituert benzyloksykarbonylradikal;

P4 velges fra hydrogen og t-butoksykarbonylradikal; og

L<sub>2</sub> er et bindeledd representert ved formel V:



der

 $Q_1$  og  $Q_m$  er substituert eller usubstituert metylenradikal og  $Q_m$  knyttes direkte til aminoradikalet;

 $Q_2$ ,  $Q_3$ , ... og  $Q_{m-1}$  velges uavhengig fra substituert eller usubstituert metylen, oksygen, svovel og substituert eller usubstituert aminoradikal; og m er et heltall fra 2 til 15.

**13.** Forbindelse ved **formel VIII**:



Formel VIII

der

R<sub>9</sub>er hydrogen, N-suksinyl, eller substituert eller usubstituert alkylradikal; P<sub>1</sub> velges fra hydrogen, t-butoksykarbonyl, (9H-fluoren-9-yl)metoksy-karbonyl, substituert eller usubstituert benzyloksykarbonyl og substituert eller usubstituert arylsulfonylradikal; P<sub>2</sub> velges fra hydrogen, t-butoksykarbonyl, (9H-fluoren-9-yl)metoksy-karbonyl, substituert eller usubstituert benzyloksykarbonyl, substituert alkyloksykarbonyl, substituert eller usubstituert alkyl, amidinyl, 1,3-bis(t-butoksykarbonyl)amidinyl, 1,3-bis-(benzyloksykarbonyl)amidinylradikal; og

L<sub>3</sub> er et bindeledd representert ved formel V:

-√m-1

Formel V

der,

 $Q_1$  og  $Q_m$  er substituert eller usubstituert metylenradikal og  $Q_m$  knyttes direkte til aminoradikalet;

 $Q_2$ ,  $Q_3$ , ..., o  $Q_{m-1}$  velges uavhengig fra substituert eller usubstituert metylen, oksygen, svovel og substituert eller usubstituert aminoradikal; og m er et heltall fra 2 til 15.

#### **14.** Forbindelse ved **formel IX**:



der

R<sub>10</sub> er hydroksy, substituert eller usubstituert alkyloksy, eller substituert eller usubstituert aminoradikal;

P<sub>2</sub> velges fra hydrogen, t-butoksykarbonyl, (9H-fluoren-9-yl)metoksy-karbonyl, substituert eller usubstituert benzyloksykarbonyl, substituert alkyloksykarbonyl, substituert eller usubstituert alkyl, amidinyl, 1,3-bis(t-butoksykarbonyl)amidinyl, 1,3-bis-

(benzyloksykarbonyl)amidinylradikal; og

 $L_1$  er et bindeledd representert ved formel V:



Formel V

der

 $Q_1$  og  $Q_m$  er substituert eller usubstituert metylenradikal og  $Q_m$  knyttes direkte til aminoradikalet;

 $Q_2$ ,  $Q_3$ , ... og  $Q_{m-1}$  velges uavhengig fra substituert eller usubstituert metylen, oksygen, svovel og substituert eller usubstituert aminoradikal; og m er et heltall fra 2 til 15.

#### **15.** Forbindelse ved **formel X**:



der

R<sub>11</sub> er hydroksy, substituert eller usubstituert alkyloksy, eller substituert eller usubstituert aminoradikal;

P<sub>2</sub> velges fra hydrogen, t-butoksykarbonyl, (9H-fluoren-9-yl)metoksy-karbonyl, substituert eller usubstituert benzyloksykarbonyl, substituert alkyloksykarbonyl, substituert eller usubstituert alkyl, amidinyl, 1,3-bis(t-butoksykarbonyl)amidinyl, 1,3-bis-(benzyl-oksykarbonyl)amidinylradikal;

P<sub>3</sub> velges fra hydrogen, t-butoksykarbonyl, (9H-fluoren-9-yl)metoksy-karbonyl, substituert eller usubstituert benzyloksykarbonylradikal;

P4 velges fra hydrogen og t-butoksykarbonylradikal; og

 $L_2$  er et bindeledd representert ved formel V:



der  $Q_1$  og  $Q_m$  er substituert eller usubstituert metylenradikal og  $Q_m$  knyttes direkte til aminoradikalet;

 $Q_2$ ,  $Q_3$  ... og  $Q_{m-1}$  velges uavhengig fra substituert eller usubstituert metylen, oksygen, svovel og substituert eller usubstituert aminoradikal; og m er et heltall fra 2 til 15.

**16.** Forbindelse ved **formel XI**:



Formel XI

#### der

R<sub>12</sub> er hydroksy, substituert eller usubstituert alkyloksy, eller substituert eller usubstituert aminoradikal;

P<sub>2</sub> velges fra hydrogen, t-butoksykarbonyl, (9H-fluoren-9-yl)metoksy-karbonyl, substituert eller usubstituert benzyloksykarbonyl, substituert alkyloksykarbonyl, substituert eller usubstituert alkyl, amidinyl, 1,3-bis(t-butoksykarbonyl)amidinyl, 1,3-bis-(benzyl-oksykarbonyl)amidinylradikal; og

 $L_3$  er et bindeledd representert ved **formel V**:



Formel V

der

 $\mathsf{Q}_1$  og  $\mathsf{Q}_m$  er substituert eller usubstituert metylenradikal og  $\mathsf{Q}_m$  knyttes direkte til aminoradikalet;

 $Q_2,\,Q_3,\,...\,\,og\,\,Q_{m\text{-}1}\,velges\,\,uavhengig\,fra\,\,substituert\,\,eller\,\,usubstituert\,\,metylen,\,oksygen,\,svovel\,\,og\,\,substituert\,\,eller\,\,usubstituert\,\,aminoradikal;\,og$ 

m er et heltall fra 2 til 15.



![](_page_59_Figure_1.jpeg)

NO/EP2268607

![](_page_60_Figure_1.jpeg)

![](_page_61_Figure_1.jpeg)

![](_page_62_Figure_0.jpeg)

![](_page_63_Figure_1.jpeg)

Figur 6

![](_page_64_Figure_1.jpeg)

Figur 7 (fortsatt fra forrige side)

![](_page_65_Figure_1.jpeg)

![](_page_66_Figure_1.jpeg)

.

	e	®	6	e	H	Ø		0			8	۲
mdm2												
Spor	10	<b>qo 1</b> 2, μ/	5		Ō	6 0	M			A	nmerkni	þ
1		0				0					Kontroll	
2	·. ·	2			· ,	0						
3		0	-			S		,				-
4		ŝ				S						
5				2	<b>Aark</b> (	ørprot	eine					
9		0				0			۰.,	-	Controll	
7	1	10				0						
8		0				10						-
9		10				10						
							•	2				

.

Figur 10

![](_page_68_Figure_2.jpeg)