(12) **PATENT**

(19) NO (11) **319860** (13) **B1**

NORGE (51) Int Cl[7] C 07 H 21/00, A 61 K 48/00

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19955352	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1994.06.29 PCT/EP94/02121
(22)	Inng.dag	1995.12.29	(85)	Videreføringsdag	1995.12.29
(24)	Løpedag	1994.06.29	(30)	Prioritet	1993.07.01, DE, 4321946
(41)	Alm.tilgj	1996.02.14			
(45)	Meddelt	2005.09.26			

(73) Innehaver Hoechst AG , 65929 FRANKFURT AM MAIN, DE

(72) Oppfinner Eugen Uhlmann, Zum Talblik 31, 61479 GLASHÜTTEN, DE
Chris Meier, Bad Homburg, DE

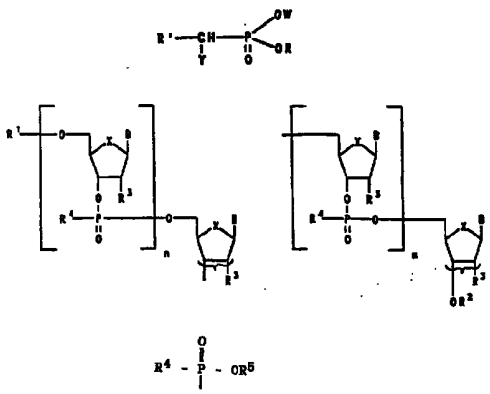
(74) Fullmektig Zacco Norway AS , Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, NO

(54) Benevnelse **Metylfosfonsyre-ester, fremgangsmåte for fremstilling, legemiddel samt anvendelse**

(56) Anførte publikasjoner Tetrahedron lett, Bd. 33, side 2359-2360, 1992, av Roelen et al.

(57) Sammendrag

Forbindelse med formel (I), hvor substituentene R', Y, W og R har den angitte betydningen, har In vivo-aktiviteten til den aktive virkestoffresten W med forbedret farmakokinetikk. Oligonukleotidene kan anvendes for behanlding av sykdommer ved å påvirke ekspresjon av utvalgte gener med antisenceteknologiskemetoder.
Forbindelse med formel I,
k a r a k t e r i s e r t v e d at
Y har betydningen OH, SH, OAc eller Sac. hvor Ac-(C1-C18)acyl, evt. er en til tre ganger umettet,
R' står for aryl, heteroaryl eller alkyl,
W har betydningen en farmasøytisk virkestoffrest,
R har betydningen for W hvor R og W kan være like eller eller R står for en eventuelt substituert forskjellige,alkylrest eller W og R danner sammen med fosfonatresten som bærer dem et oligonukleotid hvor W står for en rest med formel II og R står for en rest med formel II' hvor X står for oksy, sulfandiyl eller metylen,
B står uavhengig av hverandre for en nukleotidbase, n er uavhengig av hverandre et helt tall fra 0 til 50,
Rl og R2 står uavhengig av hverandre for H (Cl-C18)-acyl, eller en rest med formelhvor R4 står for O, S, CH3 eller CHYR', hvor R' og Y har den ovenfor nevnte betydning og R5 står for en eventuelt substituert alkylrest med 1-18 C-atomer, R3 står uavhengig av hverandre for H, O(C1-C18)-alkyl, O(C1-C18)-acyl, F, Cl, N3, NH2 eller NHR6 hvor R6 står for (C1-C6)-alkyl eller -acyl og hakeparentesen antyder at R3 og den naboliggende fosfonylresten kan befinne seg i 2'- hhv. 3'-posisjon.

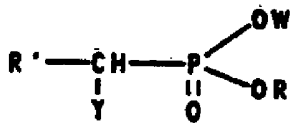


Foreliggende oppfinnelse angår metylfosfonsyre-ester, fremgangsmåter for dens fremstilling, legemiddel og dens anvendelse.

Det er allerede kjent fosforylerte virkestoffderivater som delvis også kan bli anvendt for farmasøytiske formål. Således er det f.eks. i J. Med. Chem. 1993, 36, 1048-1052, beskrevet fosfoamidatester med AZT. Den antivirale aktiviteten til disse forbindelsene er imidlertid omkring faktor 10 mindre enn den til AZT og toksisiteten til den nevnte forbindelsen er omkring faktor 5 høyere enn den til AZT. I J. Med. Chem. 1991, 34, 1830-1837, blir det beskrevet fosfotriesterderivater med AZT; også ved disse forbindelsene er aktiviteten lavere og toksisiteten større enn for AZT. Lignende resultater med beslektede forbindelser har blitt oppnådd og omtalt i J. Org. Chem. 1992, 57, 7300-7307.

Med den hensikt å oppnå fosforylerte virkestoffderivater som ikke har ulempene ved disse forbindelsene ifølge teknikkens stand, er det nå funnet at oppfinnelsens metylfosfonsyreestere har fremragende egenskaper. Oppfinnelsens gjenstand er således

1) Forbindelse med formel I,



(I)

som er kjennetegnet ved at
karakterisert ved at
Y har betydningen OH, SH, OAc eller Sac, hvor Ac=(C1-C18)-acyl, evt. er en til tre ganger umettet,
R' står for aryl, heteroaryl eller alkyl,
W har betydningen nukleotid eller nukleotidanalog,
R har betydningen for W hvor R og W kan være like eller forskjellige,
W og R danner sammen med fosfonatresten som bærer dem et oligonukleotid.

2) Foretrukket er forbindelser med formel I ifølge 1) som er kjennetegnet ved at
Y har betydningen OH, SH, OAc eller SAc, hvor Ac=(C1-C8)-acyl, evt. 1 til tre ganger umettet,
R' står for aryl med 6-14 C-atomer,
heteroaryl med 3 til 13 C-atomer og opptil tre heteroatomer utvalgt fra gruppen N, O og S;

(C1-C16)-alkyl, som er forgrenet eller ikke-forgrenet.

3) Spesielt foretrukket er forbindelser med formelen I ifølge 1) eller 2), som er kjennetegnet ved at Y har betydningen OH, SH, OAc eller SAc, hvor Ac=(C1-C3)-acyl, evt. 1 til 3 ganger umettet,
R' står for aryl med 6-14 C-atomer,
heteroaryl med 3 til 6 C-atomer og opptil tre heteroatomer utvalgt fra gruppen N, O og S;
(C1-C8)-alkyl, forgrenet eller uforgrenet,
W har betydningen en 5'-, 3'- eller 2' nukleosid-analog.

4) Helt spesielt foretrukket er forbindelser med formelen I ifølge 1) til 3), som er kjennetegnet ved at
Y står for betydningen OH,
R' står for aryl med 6 C-atomer,
heteroaryl med 3 til 6 C-atomer og opptil tre heteroatomer utvalgt fra gruppen N, O og S;
(C1-C8)-alkyl, forgrenet eller ikke-forgrenet,
W har betydningen en 5'- eller 3' nukleosid-analog.

5) Videre er av spesiell betydning for forbindelser med formelen I ifølge 1) til 4), som er kjennetegnet ved at
Y har betydningen OH,
W har betydningen en 5'- eller 3' nukleosid-analogon,
R har betydningen W eller (C1-C4)-alkyl, som er forgrenet eller ikke-forgrenet,
R' står for aryl med 6 C-atomer, evt. substituert med opptil 3 av hverandre uavhengige rester utvalgt fra gruppen
Cl, NO_2, CN, (C1-C3)-alkoksy, amino og (C1-C3)-alkylamino.

Det ovenforstående i sammenheng med flere gangers opptreden av substituenter (f.eks. "B") benyttede begrepet "uavhengig av hverandre" skal anskueliggjøre at i en forbindelse kan de enkelte substituentene være forskjellige, også hva angår n-ganger gjentatte elementer.

Eksempler på de i de ovenfor nevnte definisjonene for acylgrupper, er acetyl, butyryl, pivaloyl, krotonoyl, pentaoyl, heksanoyl, oktadekanoyl eller oleyl.

Egnede alkylgrupper er f.eks. metyl, etyl, propyl, butyl, isobutyl, pentyl eller heksyl.

Eksempelvis arylgrupper er fenyl eller naftyl.

Egnede heteroarylgrupper er f.eks. pyridyl, oksazol, furyl, benzofuryl eller fenotiazinyl.

Eksempelvis alkylaminogrupper er metyl- og dimetylaminogruppene.

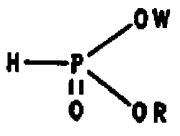
Eksempelvis dialkylaminogrupper er dimetylamino- og dietylaminogruppene.

Spesielt egnede nukleosid-analoger er av basene adenin, cytosin, guanin, tymin, purin, 7-deaza-adenin, 7-deazaguanin eller 5-klorcytosin avledede forbindelser, spesielt f.eks. 3'-deoksy-3'-azidotymidin, 2',3'-dideoksy-2',3'-didehydrotymidin, 2',3'-dideoksytymidin, 2',3'-dideoksyuridin, 2',3'-dideoksyadenosin, 2',3'-dideoksyinosin, 3'F,3'-deoksytymidin, acyklovir og cancyklovir.

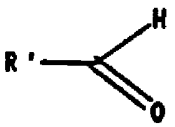
De ovenfor nevnte restene R^5 kan eventuelt være substituert med halogen, fortrinnsvis Cl, CF_3, CN, NH_2 eller (C1-C6)-fortrinnsvis (C1-C3)-alkoksy.

Gjenstanden for foreliggende oppfinnelse er videre fremgangsmåter for fremstilling av forbindelser ifølge ett eller flere av kravene 1-5, som er kjennetegnet ved at

a) en forbindelse med formelen III blir omsatt med en forbindelse med formelen IV,



(III)



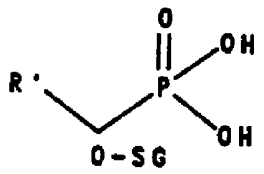
(IV)

eller at

b) en forbindelse med formelen V i ønsket rekkefølge og under anvendelse av et kondensasjonsmiddel blir omsatt med forbindelser med formelen VI,

eller at

c) en forbindelse med formelen V i ønsket rekkefølge og under anvendelse av et kondensasjonsmiddel blir omsatt med forbindelser med formelen VI og formelen VII,



(V)



(VI)

(VII)

hvor SG står for en beskyttelsesgruppe, som evt. i forbindelse med formel I blir avspaltet,

eller en nukleotidenhet med 3'(2')-terminal H-fosfonatgruppering og beskyttet 5'-hydroksygruppe med en ytterligere nukleotidenhet med frie 5'-hydroksygrupper og beskyttet 3'(2')-hydroksygruppe i nærvær av et aktiveringsmiddel til H-fosfosfonat-dinukleosid og kondenserer dette med et aldehyd til dinukleosid-α-hydroksyalkyl(aryl)-fosfonat, som etter omsetning til deres aktiverte derivater med ytterligere (oligo)-nukleotidfragmenter reagerer til oligonukleotider, hvorved temporært innførte beskyttelsesgrupper blir avspaltet, eller at

a) en nukleotidenhet med 3'(2')-terminal fosfor(III)-eller fosfor(V)-gruppering blir omsatt med en fri 5'-hydroksygruppe av en ytterligere nukleotidenhet hhv. voksende oligonukleotidkjede i nærvær av et kondensasjonsmiddel eller

b) det aktiverte derivater, eller at

oligonukleotidanaloger i fragmenter blir oppbygget på lik måte, i de ifølge a) eller b) fremstilte oligonukleotidene blir temperært innførte beskyttelsesgrupper for beskyttelse av andre grupper avspaltet og de således fremstilte oligonukleotid-analoger med formel I hvor W er en rest med formelen II og R er en rest med formel II', eventuelt blir overført til deres fysiologisk akseptable salter.

Den under a) beskrevne reaksjonen løper fortrinnsvis under de følgende betingelsene.

A) Reaksjon av fosfonatdiesteren med formelen III med de tilsvarende substituerte aldehyder med formel IV i et organisk oppløsningsmiddel, f.eks. i tørr trietylamin (NEt_3) ved forhøyet temperatur, fortrinnsvis ved kokepunktet.

B) Reaksjon av fosfonatdiesterne med formelen III med aldehydet med formelen IV i et tørt aprotisk oppløsningsmiddel, f.eks. tetrahydrofuran (THF) under tilsetning av en organisk base, f.eks. NEt_3 eller chinin ved romtemperatur ± 10°C.

Etter utført reaksjon blir produktet på kjent måte renset, f.eks. ved kromatografi.

De under b) og c) beskrevne reaksjonene løper ifølge kjente betingelser i teknikkens stand for forestringer. Spesielt gode resultater oppnår man ved hjelp av intermediær aktivesterdanelse, f.eks. med triazol/dimesitylensulfonsyreklorid.

Egnede beskyttelsesgrupper som evt. etter reaksjonen blir avspaltet ifølge fremgangsmåter, er f.eks. alkylsilyl, alkylarylsilyl og acyl, spesielt t-butyldimetylsilyl. Den sistnevnte beskyttelsesgruppen lar seg fordelaktig avspalte med ammoniumfluorid i metanol.

Oppfinnelsens forbindelser lar seg også fremstille stereoselektivt etter forskjellige kjente fremgangsmåter, En foretrukket begynnelse for innføring av chiraliteten på α-karbonatomet er reaksjonen til C-aninonet av en t-butyldimetylsilylbeskyttet alkohol (forbindelse med formelen V) med de fra (+)-efedrin som chiralt hjelpemiddel avledet oksazafosfolidin. Oksazafosfolidin blir f.eks. fremstilt ved reaksjon med fosforylklorid med (+)-efedrin i 60% utbytte og et diastereomerforhold på 24:1. En ytterligere mulighet for innføring av chiralitet består i den enantioselektive oksazaborolidinkatalyserte reduksjonen (Tetrahedron Lett., 31, 611, (1990).

De for gjennomføring av de ovenfor nevnte reaksjonene benyttede utgangsstoffer er kommersielt tilgjengelige eller kan bli fremstilt ifølge kjente fremgangsmåter. En foretrukket fremstillingsmåte er beskrevet i eksemplene.

Nukleosid-H-fosfonatdiesterne med formelen III som tjener som utgangsforbindelser, lar seg fremstille f.eks. ved omsetning av diisopropylamindiklorfosfin med de tilsvarende nukleosider til fosforamiditt, som direkte under tetrazolaktivering kan bli hydrolysert med vann i en "alt-i-ett-reaksjon" til forbindelsene med formelen III.

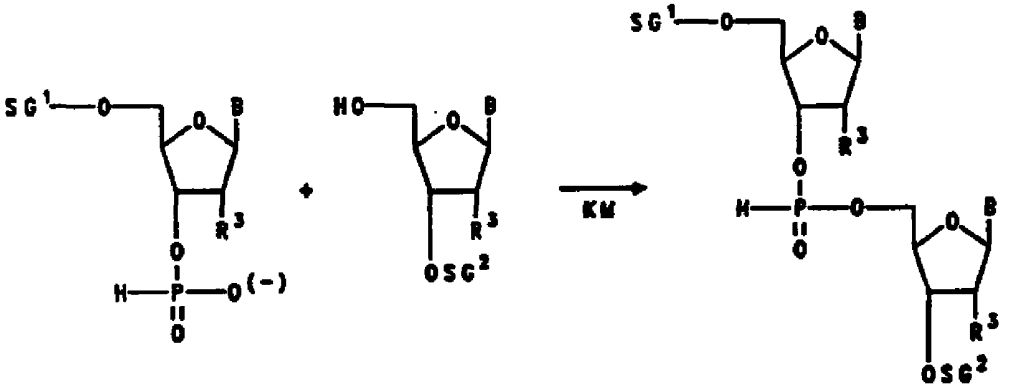
Alternativt lykkes syntesen f.eks. ved forestringen av en 5'-nukleosidfosforsyremonoester med en andre ekvivalent av nukleosidet under pivaloylkloridaktivering. En 5'-nukleosid-fosforsyremonoester er tilgjengelig ved reaksjon av fosfortriklorid med imidazol til fosfortriimidazolide etter reaksjon med det tilsvarende nukleosidet og ifølge hydrolsyse.

Alternativt lar forbindelsen med formelen III seg fremstille ved forestringen av en 5'-nukleosid-fosforsyremonoester med en andre ekvivalent av tilsvarende nukleosid under pivaloylklorid-aktivering.

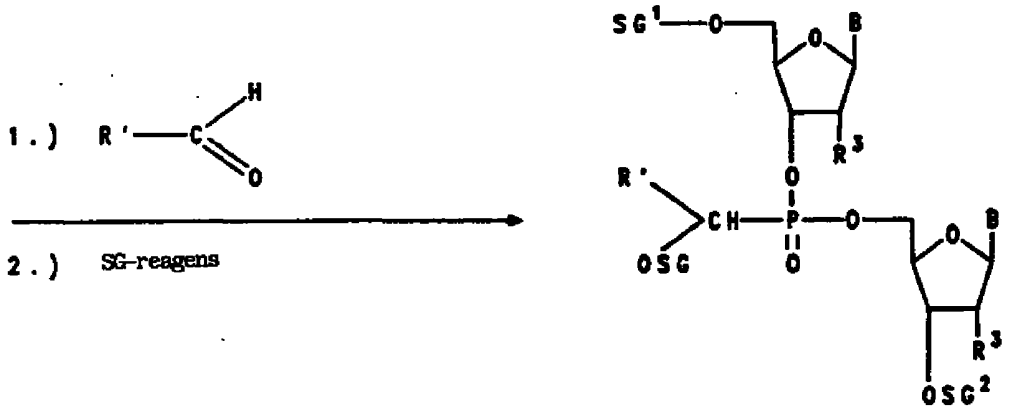
Fremstillingen av forbindelsen med formel I skjer fortrinnsvis slik at man i prinsippet fremstiller som ovenfor beskrevne dimere nukleotider med formelen XI, som så ifølge vanlige fremgangsmåter blir innbygget i oligonukleotidet. Eksempelvis (skjema 1) kan en 5'-beskyttet-nukleosid-3'-H-fosfonatester med formelen VIII bli omsatt med en 3'-beskyttet 5'-hydroksy-komponent med formelen IX i nærvær av et kondensasjonsmiddel som pivaloylklorid i pyridin til dinukleosid H-fosfonatester med formelen X. Dette blir deretter omsatt med det tilsvarende aldehyd til dinukleosid-hydroksyalkylfosfonat. Den frie α-hydroksygruppen må bli beskyttet for videre omsetning, fortrinnsvis med TBDMS (t-butyldimetylsilyl)-beskyttelsesgruppen, som på slutten av syntesen blir avspaltet med fluoridioner. Formel XI-forbindelser blir eksempelvis omsatt etter avspalting av 3'-beskyttelsesgruppen (SG^2) til fosforamiditt med formelen XIII, som også lar seg innføre analogt med fosforamiditt i oligonukleotid ifølge kjente fremgangsmåter. Pro-medikament-nukleotidet lar seg imidlertid også bygge opp som monomere enheter ved kondensasjon av tilsvarende beskyttet nukleosid-3' (hhv. 5')-fosfonatester med 5' (hhv. 3'-)-hydroksygruppen fra en 3' (hhv. 5'-) beskyttet nukleotid (skjema 2). Fortrinnsvis anvender man nukleosid-3'-fosfonamidatet med formelen XIII (hvor (P) = P-N(ipropyl)$_2$, som lar seg innebygge ifølge kjente fremgangsmåter i oligonukleotider.

Fremstillingen av oligonukleotidnanalogen med formelen I følger på samme måten som syntesen av biologiske oligonukleotider i oppløsning eller fortrinnsvis i fast fase, eventuelt under anvendelse av et automatisk synteseutstyr.

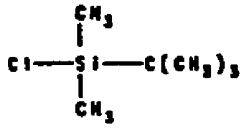
SKJEMA 1



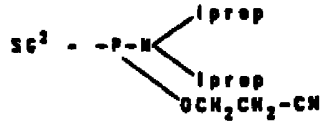
VIII IX X



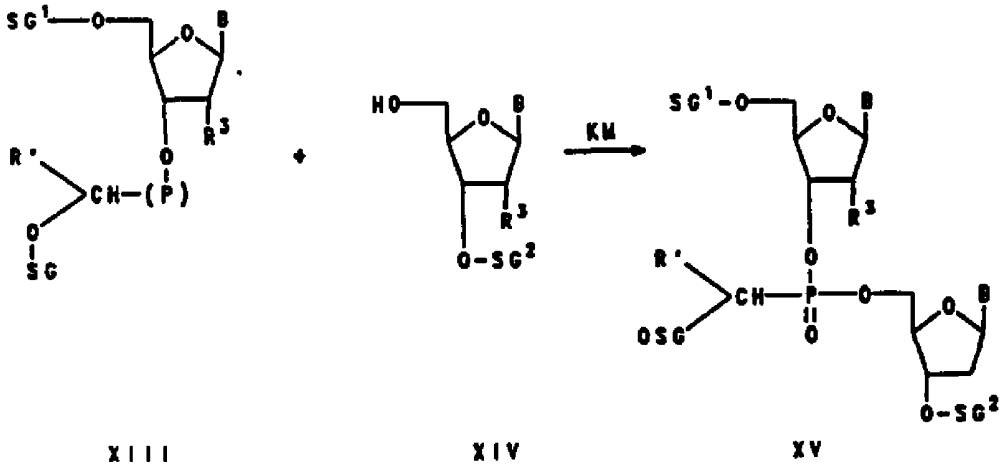
XI

SG-reagens z.B. 

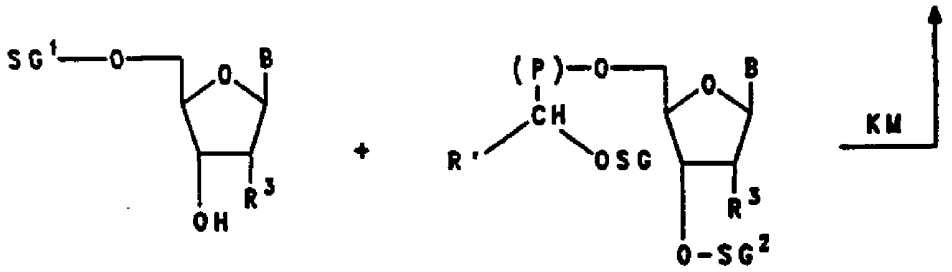
XII SG^1 - Dimetoksytrityl

SG^2 - 

SKJEMA 2

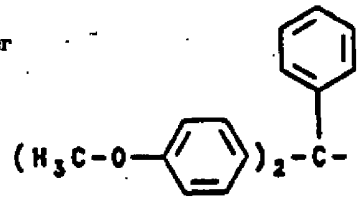


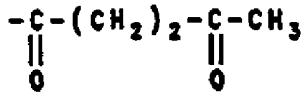
XIII XIV XV



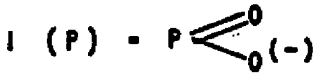
XVI XVII

SG^1, SG^2 = ortogonale beskyttelsesgrupper

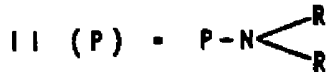
z.B. SG^1 = dimetoksytrityl 

z.B. SG^2 = levullnoyl 

KM = kondensasjonsmiddel

I (P) = 

syrelabil

II (P) = 

Oppfinnelsens forbindelser med formelen I og deres farmasøytisk akseptable salter, viser den farmasøytiske virksomheten til de tilgrunnliggende virkestoffene. Da de dessuten viser gunstige toksikologiske og farmakokinetiske egenskaper, er de verdifulle kjemoterapeutika.

Foreliggende oppfinnelse angår således også legemiddel, kjennetegnet ved at det inneholder en eller flere forbindelser med formel I ifølge oppfinnelsen.

Legemiddel som inneholder en eller flere forbindelser av den generelle formel I som virkestoff, kan bli fremstilt ved at man blander forbindelsen med formel I med en eller flere farmakologisk akseptable bærestoffer eller fortynningsmidler, f.eks. bufferstoffer, og bringer i en egnet leveringsform.

Som fortynningsmiddel kan eksempelvis nevnes polyglykoler, etanol og vann. Bufferstoffer er eksempelvis organiske forbindelser, som f.eks. N',N'-dibenzyletylendiamin, dietanolamin, etylendiamin, N-metylglukamin, N-benzylfenetylamin, dietylamin, tris(hydroksymetyl)aminometan, eller organiske forbindelser som f.eks. fosfatbuffer, natriumbikarbonat, natriumkarbonat. For oral anvendelse kommer fortrinnsvis suspensjoner eller oppløsninger i vann, med eller uten bufferstoffer, i betraktning. Det er også mulig å gi virkestoffet som sådan uten bære- eller fortynningsmiddel i egnet form, eksempelvis i kapsler.

Egnede doser av forbindelsene med formel I eller deres farmasøytisk akseptable salter er sterkt avhengig av de tilgrunnliggende virkestoffene; f.eks. for AZT ligger det ved omkring 0,4 g, fortrinnsvis 0,5 g til maksimalt 20 g pr. dag for en voksen med omkring 75 kg kroppsvekt. Det kan bli gitt i enkelt- eller vanligvis i flergangsdoser, hvor enkeltdosen kan inneholde virkestoffet i en mengde fra omkring 50 til 1000 mg.

Foreliggende oppfinnelse angår videre anvendelsen av en forbindelse med formel I ifølge oppfinnelsen for fremstilling av legemidler med en promedikamentfunksjon.

Oligonukleotider finner i voksende grad anvendelse som hemmere av genekspresjonen (G. Zon, Pharmaceutical Research 5, (1988); J.S. Cohen, Topics i Molecular and Structural Biology 12 (1989) Macmillan Press; C. Helene og J.J. Toulme, Biochemica et Biophysica Acta 1049, 99 (1990); E. Uhlmann og A. Peyman, Chemical Reviews 90, 543 (1990)). Antisens-oligonukleotdier er nukleinsyrefragmenter, hvis basis-sekvens komplementerer til med mRNA som skal hemmes. Dette mål-mRNA kan være

cellulært, viralt eller ha spesielt patogent opphav. Aktuelle som cellulære mål-sekvenser er eksempelvis reseptorer, enzymer, immunmodulatorer, ionekanaler eller onkogener. Hemmingen av virusformeringen ved hjelp av antisens-oligonukleotider ble eksempelvis beskrevet for RSV (Rous Sarcoma Virus), HSV-1 og -2 (Herpes Simplex Virus Type I og II), HIV (humant immunsvikt virus) og influensavira. Her benytter man oligonukleotid som er komplementært med den virale nukleinsyren. Sens-oligonukleotider er derimot slike utformet i sin sekvens at de eksempelvis binder nukleinsyrebindende proteiner eller nukleinsyreprosesserende enzymer og således hemmer deres biologiske aktivitet (Helene, 1990). Som virale mål er her eksempelvis revers transkriptase, DNA-polymerase og transaktivator-proteiner. Triplexdannende oligonukleotider har generelt DNA som mål og danner etter dannelse på dette en trippelhelisk struktur. Mens ved hjelp av antisens-oligonjukleotider generelt prosess-eringen (Splicing etc.) av mRNA eller dets translasjon i proteinet blir hemmet, hemmer Triplexdannende oligonukleotider transkripsjonen eller replikasjonen av DNA (Helene et al., 1990, Uhlmann og Peyman, 1990). Det er imidlertid også mulig å binde enkeltstrengs-nukleinsyrer i en første hybridisering med et antisens-oligonukleotid under dannelse av en dobbeltstreng, som så i en andre hybridisering danner en Triplex-struktur med Triplex-dannende oligonukleotid. Antisens- og Triplex-bindingsregioner kan her enten være i to separate oligonukleotider eller kun i et oligonukleotid. En ytterligere anvendelse av syntetiske oligonukleotider er de såkalte ribozymer som ødelegger mål-RNA på grunn av deres ribonukleaseaktivitet (J.J. Rossi og N. Sarver, TIBTECH 8, 179 (1990)).

For de fleste nevnte anvendelser er oligonukleotider i deres naturlig forekommende form lite eller fullstendig uegnet. De må bli modifisert slik kjemisk at de oppfyller spesielle krav. For at oligonukleotidene skal kunne bli anvendt i biologiske systemer, eksempelvis for hemming av virus-formering, må de oppfylle følgende forutsetninger:

1. De må under in vivo-betingelser, også såvel i serum som også intracellulært, ha en tilstrekkelig stor stabilitet.
2. De må være således beskaffet at de kan passere celle- og kjernemembranen.
3. De må under fysiologiske betingelser på basespesifikk måte binde til deres mål-nukleinsyrer for å ha den hemmende effekt.

Når internukleotid-fosfatrestene blir permanent forandret, forandrer egenskapene til oligonukleotidene seg ofte drastisk. Eksempelvis virker fosfortioat-oligonukleotidene ofte sekvensuspesifikt.

Videre oppgave for oppfinnelsen er således å fremskaffe oligonukleotidanaloger med spesifikk virksomhet og forhøyet serumstabilitet, som i biologiske systemer (serum, organ, celle) igjen tilbakedanner seg til sine naturlige fosfodiester-oligonukleotider. Det kan således bli modifisert en eller flere internukleotid-fosfatrester i oligonukleotidene som promedikament. Det ble funnet at oligonukleotidet med 3' og/eller 5'-terminale pro-medikamentmodifikasjonen allerede i serum er mer stabile enn de naturlig forekommende fosfodiester-oligonukleotider.

Oppfinnelsen er ikke innskrenket til α- og ß-D- hhv. L-ribofuranosider, α- og ß-D- hhv. L-desoksyribofuranosider og tilsvarende karbocykliske femringsanaloger, men gjelder også for oligonukleotidanaloger som er oppbygget av andre sukkerbyggestener, eksempelvis ringutvidede og ringinnsnevrede sukkere, acykliske, ringbroslåtte og egnede andre typer sukkerderivater. Oppfinnelsen er dessuten ikke innskrenket til de med formel I eksempelvis oppførte derivatene av fosfatrestene, men angår spesielt de kjente defosfoderivatene.

Oligonukleotidene kan også på mange måter være omdannet fra deres naturlige struktur. Slike modifikasjoner som er innført ifølge kjente fremgangsmåter, er eksempelvis:

a) Modifikasjoner av fosfatbroen
Eksempelvis kan nevnes: Fosfortioat, fosforditioat, metylfosfonat, fosforamidat, boranfosfat, fosfatmetylester, fosfonatetylester, fenylfosfonat. Foretrukne modifikasjoner av fosfatbroen er fosfortioat, fosforditioat og metylfosfonat.

b) Erstatning av fosfatbroen
Eksempelvis kan nevnes: Erstatning ved formacetal, 3'-tioformacetal, metylhydroksylamin, oksim, metylendimetylhydroazo, dimetylensulfon, silylgrupper. Foretrukket er erstatning med formacetal og 3'-tioformacetal.

c) Modifikasjoner av sukkeret
Eksempelvis kan nevnes: α-anomert sukker, 2'-O-metylribose, 2'-O-butylribose, 2'-O-allylribose, 2'-fluor-2'-desoksyribose, 2'-amino-2'-desoksyribose, α-arabinfuranose, karbocykliske sukkeranaloger. Foretrukne modifikasjoner er de ved 2'-O-metylribose og 2'-O-n-butylribose.

d) Modifikasjoner av basene som ikke forandrer spesifisiteten i Watson-Crick baseparringen

Eksempelvis kan nevnes: 5-propinyl-2'-desoksyuridin, 5-propinyl-2'-desoksycytidin, 5-heksinyl-2'-desoksyuridin, 5-heksinyl-2'-desoksycytidin, 5-fluor-2'-desoksycytidin, 5-fluor-2'-desoksyuridin, 5-hydroksymetyl-2'-desoksyuridin, 5-metyl-2'-desoksycytidin, 5-brom-2'-desoksycytidin. Foretrukne modifikasjoner er 5-propionyl-2'-desoksyuridin, 5-heksinyl-2'-desoksyuridin, 5-heksinyl-2'-desoksycytidin og 5-propimyl-2'-desoksycytidin.

e) 3'-3'- og 5'-5'-inversjoner [f.eks. M. Koga et al., J. Org. Chem. 56 (1991) 3757]

f) 5'- og 3'-fosfat, såvel som 5'- og 3'-tiofosfat.

Eksempler på grupper som begunstiger det intracellulære opptaket er forskjellige lipofile rester som -O-$(CH_2)_x$-CH_3, hvor x står for et helt tall fra 6 til 18, -O-$(CH_2)_n$-CH=CH-$(CH_2)_m$-CH_3, hvor n og m uavhengig av hverandre er et helt tall fra 6 til 12, -O-$(CH_2CH_2O)_4$-$(CH_2)_9$-CH_3, -O-$(CH_2CH_2O)_8$-$(CH_2)_{13}$-CH_3 og -O-$(CH_2CH_2O)_7$-$(CH_2)_{15}$-CH_3, men også steroidrester som cholesteryl eller vitaminrester som vitamin E, vitamin A eller vitamin D og andre konjugater, som utnytter de naturlige bærersystemene som gallesyre, folsyre, 2-(N-alkyl, N-alkoksy)-aminoantrachinon og konjugater av mannose og peptid fra de tilsvarende reseptorene, som fører til reseptormidlet endocytose av oligonukleotidet, som EGF (Epidermal Growth Factor), Bradykinin og PDGF (Platelet Derived Growth Factor).

Oppbyggingen av oligonukleotidet skjer ifølge de av fagmannen kjente fremgangsmåtene som triester-fremgangsmåten, H-fosfonat-metoden eller fosforamiditt-metoden, fortrinnsvis ifølge standard fosforamiditt-kjemi ifølge Caruthers (M.D. Matteucci og M.H. Caruthers, J. Am. Chem. Soc. 103, 3185 (1981)).

Det ble dessuten funnet at forbindelsene med formelen I, hvor W er lik formel II og R er lik formel II', avhengig av baserekkefølgen i DNA-delen, hemmer ekspresjonen av spesifikke gener, eksempelvis av enzymer, reseptorer eller vekstfaktorer i cellekultur og i utvalgte eksempler i dyremodeller.

Helt generelt angår også foreliggende oppfinnelse anvendelsen av forbindelsen med formel I som terapeutisk virksomme bestanddeler i et legemiddel. Som terapeutisk virksomme oligonukleotid-derivater forstår man generelt antisens-oligonukleotid, trippelhelix-dannende-oligonukleotider, aptamerer eller ribozymer, spesielt antisens-oligonukleotider.

Legemidlet ifølge foreliggende oppfinnelse kan eksempelvis bli benyttet for behandling av sykdommer som er forårsaket av vira, eksempelvis HIV, HSV-1, HSV-2, influensa, VSV, Hepatitis N eller Papilloma-vira.

Oppfinnelsens antisense-oligonukleotid-derivater som er virksomme mot slike mål, har eksempelvis følgende basesekvens:

a) mot HIV, f.eks.
5'-ACACCCAATTCTGAAAATGG-3' eller
(I)

5'-AGGTCCCTGTTCGGGCGCCA-3' eller
(II)

5'-GTCGACACCCAATTCTGAAAATGGATAA-3' eller
(III)
5'-GCTATGTCGACACCCAATTCTGAAA-3' eller
(IV)

5'-TCGTCGCTGTCTCCGCTTCTTCTTCCTGCCA eller
(VI)

b) mot HSV-1, f.eks.
5'-GCGGGGCTCCATGGGGGTCG-3'
(VII)

Legemidlet ifølge foreliggende oppfinnelse egner seg eksempelvis også for behandling av kreft. Eksempelvis kan oligonukleotid-sekvenser derved komme til anvendelse, som er rettet mot mål som er ansvarlige for kreftdannelsen hhv. kreftveksten. Slike mål er eksempelvis:

1) Nukleære onkoproteiner som eksempelvis c-myc, N-myc, c-myb, c-fos, c-fos/jun, PCNA, p120

2) Cytoplasmiske/membran-assosierte onkoproteiner som eksempelvis EJ-ras, c-Ha-ras, N-ras, rrg, bcl-2, cdc-2, c-raf-1, c-mos, c-src, c-abl

3) Cellulære reseptorer som eksempelvis EGF-reseptor, c-erbA, retinoidreseptorer, proteinkinaseregulatorisk underenhet, c-fms

4) Cytokin, vekstfaktorer, ekstracellulær matriks som eksempelvis CFS-1, IL-6, IL-1a, IL-1b, OL-2, IL-4, bFGF, myeloblasin, fibronektin.

Oppfinnelsens antisens-oligonukleotider med formelen I, som er virksom mot slike mål, har eksempelvis følgende basesekvens:

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

5'-CAGCTGCAACCCAGC-3'
(VIII)

c) c-myc, f.eks.

5'-GGCTGCTGGAGCGGGGCACAC-3'
(IX)

5'-AACGTTGAGGGGCAT-3'
(X)

d) c-myb, f.eks.

5'-GTGCCGGGGTCTTCGGGC-3'
(XI)

e) c-fos, f.eks.

5'-GGAGAACATCATGGTCGAAAG-3'
(XII)

5'-CCCGAGAACATCATGGTCGAAG-3'
(XIII)

5'-GGGGAAAGCCCGGCAAGGGG-3'
(XIV)

f) p 120, f.eks.

5'-CACCCGCCTTGGCCTCCCAC-3'
(XV)

g) EGF-reseptor, f.eks.
5'-GGGACTCCGGCGCAGCGC-3'
(XVI)

5'-GGCAAACTTTCTTTTCCTCC-3'
(XVII)

h) p53 tumorsuppressor, f.eks.

5'GGGAAGGAGGAGGATGAGG-3'
(XVIII)

5'-GGCAGTCATCCAGCTTCGGAG-3'r
(XIX)

Legemidlet ifølge foreliggende oppfinnelse egner seg eksempelvis videre for behandling av sykdommer som blir påvirket ved integrin eller celle-celle-adhesjonsreseptorer, eksempelvis ved VLA-4, VLA-2, ICAM, VCAM eller ELAM.

Oppfinnelsens antisens-oligonukleotid-derivater, som er virksomme mot slike mål, har eksempelvis følgende basesekvens:

a) VLA-4, f.eks.

5'-GCAGTAAGCATCCATATC-3' eller
(XX)

b) ICAM, f.eks.

5'-CCCCCACCACTTCCCCTCTC-3'
(XXI)

5'-CTCCCCCACCACTTCCCCTC-3'
(XXII)

5'-GCTGGGAGCCAGAGCGAGG-3'
(XXIII)

c) ELAM-1, f.eks.

5'-ACTGCTGCCTCTTGTCTCAGG-3'
(XXIV)

5'-CAATCAATGACTTCAAGAGTTC-3'
(XXV)

Legemidlet ifølge foreliggende oppfinnelse egner seg eksempelvis også for forhindring av restenose. Eksempelvis kan det her komme til anvendelse oligonukleotidsekvenser som er rettet mot mål som er ansvarlig for proliferasjon eller migrasjon. Slike mål er eksempelvis:

1) Nukleære transaktivator-proteiner og cyklin som eksempelvis c-myc, c-myb, c-fos, c-fos/jun, cyklin og cdc2-kinase

2) Mitogener eller vekstfaktorer som eksempelvis PDGF, bFGF, EGF, HB-EGF og TGT-ß.

3) Cellulære reseptorer som eksempelvis bFGF-reseptor, EGD-reseptor og PDGF-reseptor.

Oppfinnelsens antisens-oligonukleotider med formel I som er virksom mot slike mål, er følgende basesekvens:

a) c-myb
5'-GTGTCGGGGTCTCCGGGC-3'
(XXVI)

b) c-myc
5'-CACGTTGAGGGGCAT-3'

(XXVII)

c) cdc2-kinase
5'-GTCTTCCATAGTTACTCA-3'
(XXVIII)

d) PCNA (prolifererende cellenukleært antigen fra rotte)
5'-GATCAGGCGTGCCTCAAA-3'
(XXIX)

Egnede leveringsformer for forbindelsene med formel I, hvor W og R sammen med fosfonatresten som bærer dem danner et oligonukleotid, er topiske applikasjoner, lokale applikasjoner som eksempelvis ved hjelp av et kateter eller også injeksjon. For injeksjon blir antisens-oligonukleotid-derivatene formulert i en flytende oppløsning, fortrinnsvis i en fysiologisk akseptabel buffer, som f.eks. Hank's oppløsning eller Ringer's oppløsning. Antisens-oligonukleotidene kan også bli formulert i fast form og før bruk bli suspendert. Den for sene systemiske levering foretrukne doseringen er ca. 0,01 mg/kg til ca. 50 mg/kg kroppsvekt og dag.

Legemidlet kan f.eks. også bli gitt i form av farmasøytiske preparater som kan bli gitt oralt, f.eks. i form av tabletter, dragéer, harde og myke gelatinkapsler, oppløsninger, emulsjoner eller suspensjoner. Inkluderingen av legemidlet i liposomer som eventuelt kan inneholde ytterligere komponenter som proteiner, er også en egnet applikasjonsform. De kan også bli gitt rektalt f.eks. i form av stikkpiller eller parenteralt, f.eks. i form av injeksjonsoppløsninger. For fremstilling av farmasøytiske preparater kan disse forbindelsene bli bearbeidet i terapeutisk inerte organiske og uorganiske bærere. Eksempler på slike bærere for tabletter, drageer og harde gelatinkapsler, er laktose, maisstivelse eller derivater derav, talg og stearinsyre eller salter derav. Egnede bærere for fremstillingen av oppløsninger er vann, polyol, sakkarose, invert sukker og glukose. Egnede bærere for injeksjonsoppløsninger er vann, alkoholer, polyoler, glyceroler og planteoljer. Egnede bærere for stikkpiller er planteoljer og herdede oljer, vokser, fett og halvflytende polyoler. De farmasøytiske preparatene kan også inneholde konserveringsmiddel, oppløsningsmiddel, stabiliseringsmiddel, fuktingsmiddel, emulgatorer, søtningsstoffer, fargestoffer, smaksmiddel, salter for forandring av osmotisk trykk, buffer, overtrekksmiddel, antioksydanter såvel som evt. andre terapeutiske virkestoffer.

Dinukleosid-α-hydroksymetylarylfosfonat 1-3 in vitro anti-HIV-test.

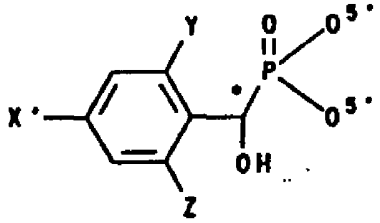
In vitro HIV-test ble gjennomført med dinukleosid-α-hydroksymetylarylfosfonater. Som testsystem ble det anvendt humane T-lymfocytter (CEM/O). Dessuten ble forbindelsene testet i en tymidin-kinase defisient T-lymfocyttstamme (CEM/TK). CEM/O-cellene ble såvel infisert med HIV-1 ald som også med HIV-2. Før testen ble det sikret at forbindelsene som skulle testes var frie for fritt nukleosid (maks. 0,5% HPLC). Resultatene i testanalysen er angitt i tabell 1.

Som tabell 1 tydeliggjør, viser alle forbindelsene høy aktivitet såvel mot HIV-1- som også mot HIV-2-replikasjonen.

I motsetning til de tidligere i litteraturen beskrevne promedikamentformer, har oppfinnelsens forbindelser med formelen I ingen cytotoksisk virkning.

Tabell 1: Resultat fra anti-HIV in vitro testanalysen av 1-3, 11-13, 4-6 og 28-30 mot HIV-1 og HIV-2 i humane T-lymfocytter (CEM/0 og CEM/TK)

Tabell 1: Syntetiserte α-hydroksymetylarylfosfonsyrediester 1-3



Nukleosidanaloger

Nukleosidanaloger

1: Nukleosid = 2',3'-dideoksytymidin (ddT); 2: Nukleosid = 2',3'-dideoksy-2',3'-didehydrotymidin (d4T); 3: Nukleosid = 3'-deoksy-3'-azidotymidin (AZT)

1-3	X'	Y	Z
a	NMe_2	H	H
b	OCH_3	H	H
c	CH_3	H	H
d	H	H	H
e	Cl	H	H

1-3	X'	Y	Z
f	H	Cl	Cl
g	CN	H	H
h	NO_2	H	H
i	H	NO_2	H
j	NO_2	NO_2	H
k	H	NO_2	NO_2

		Antiviral aktivitet EC_{50} [a] (µg/ml) CEM/O			
Forbindelse	Substituent	HIV-1	HIV-2	CEM/TK⁻ HIB-2	Toksisitet CC_{50} [b] (µg/ml)
1a	NMe_2	3,25±1,06	7,0±4,24	>100	>100
1b	OCH_3	0,5±0,0	0,55±0,07	>20	>20

		Antiviral aktivitet EC_{50} [a] (µg/ml) CEM/O			
Forbindelse	Substituent	HIV-1	HIV-2	CEM/TK⁻ HIB-2	Toksisitet CC_{50} [b] (µg/ml)
1c	CH_3	3,25±1,06	10,0±0,0	>100	>100
1d	H	2,93±1,85	13,3±2,9	>100	>100
1e	Cl	4,0±0,0	4,0±0,0	>100	>100
1f	2,6-Di-Cl	1,4±0,85	2,0±0,0	>20	>20
1g	CN	3,93±3,10	7,7±4,6	>100	>100
1h	NO_2	2,25±0,35	3,0±1,41	>100	>100
1j	2,4-Di-NO_2	2,0±0,0	3,50±0,71	>100	>100
2b	OCH_3	0,10±0,065	0,12±0,06	>100	>20
2c	CH_3	0,12±0,064	0,33±0,24	>100	>20
2d	H	0,16±0,0	0,19±0,19	>100	>100

		Antiviral aktivitet EC_{50}[a] (µg/ml) CEM/O			
Forbindelse	Substituent	HIV-1	HIV-2	CEM/TK⁻ HIB-2	Toksisitet CC_{50}[b] (µg/ml)
2e	Cl	0,10±0,05	0,12±0,06	>100	>100
2f	2,6-Di-Cl	0,056±0,034	0,12±0,06	>20	>100
2g	CN	0,091±0,065	0,33±0,24	>100	>100
2h	NO_2	0,066±0,048	0,12±0,06	>100	>100
2j	2,4-Di-NO_2	0,16±0,0	0,33±0,24	>100	>100

Oppfinnelsens forbindelser viser høyere fordelingskoeffisienter i en oktanol/vann-blanding enn nukleosidanalogene som ligger til grunn for dem. De er således bedre passivt transporterbare over biomembraner.

Ved de følgende utførelseseksempler, og ved innholdet i patentkravene, skal oppfinnelsen bli nærmere forklart.

EKSEMPLER

1. Fremstilling av hydroksy-(4-metylfenyl)-metylfosfonsyre-bis-(5'-O-2',3'-dideoksytymidin)-ester:

904 mg (4,0 mmol) 2',3'-dideoksytymidin ble tørket under høyvakuum og deretter oppløst i 60 ml tørr acetonitril. Denne oppløsningen ble tilsatt 774 mg (6,0 mmol; 1,07 ml) diisopropyletylamin og avkjølt til 0°C i isbad. Deretter tilsatte man porsjonsvis i løpet av 15 minutter 404 mg (2,0 mmol) diisopropylamin-diklorfosfin. Etter avsluttet tilsetning lot man det omrøre under oppvarming til romtemperatur i 15 minutter. Ved romtemperatur fulgte tilsettingen av 254 mg (4,0 mmol) tetrazol og 80 ml vann. Etter 30 minutters omrøring ble oppløsningsmidlet avkondensert i høyvakuumanlegg. Resten ble renset på kromatotron over kieselgel ved hjelp av en gradient av eddikester/metanol (0% til 30% metanol). Produktet ble isolert som fargeløst faststoff (797 mg [1,6 mmol]; 80% utbytte). 797 mg (1,6 mmol) 2',3'-ddT-H-fosfonatdiester ble oppløst i 40 ml tørr tetrahydrofuran og tilsatt 518 mg (4,8 mmol) 4-metylbenzaldehyd. Under omrøring ble det til denne oppløsningen tilsatt 20 ml tørr, på forhånd destillert trietylamin. Etter 4 timer ved romtemperatur var eduktet avreagert. Den avsluttende kontrollen skjedde ved hjelp av reversfase-HPLC-kromatografi. Reaksjonsblandingen ble nøytralisert med tilsetning av 20 ml eddiksyre og inndampet til tørrhet på en rotasjonsfordamper. Resten ble renset på kromatotron ved hjelp av en gradient av metylenklorid/metanol (0% til 15% metanol). Produktet ble etter lyofilisering isolert som fargeløst faststoff (921 mg [1,52 mmol]; 95% utbytte). Rensingen av forbindelsen for in vitro anti-HIV-testen ble deretter gjennomført med en semipreparativ HPLC-rensing med en isokratisk eluentblanding (30% metanol i acetonitril).

2. Fremstilling av hydroksy-(4-dimetylaminofenyl)-metylfosfonsyre-bis-(5'-O-2',3'-dideoksytymidin)-ester:

Analogt med fremgangsmåten under 1. ble i stedet for 4-metylbenzaldehyd her 4-dimetylaminobenzaldehyd tilsatt. (Utbytte 90%).

3. Fremstilling av hydroksy-(4-metoksyfenyl)-metylfosfonsyre-bis-(5'-O-2',3'-dideoksytymidin)-ester:
Analogt med fremgangsmåten under 1. ble i stedet for 4-metylbenzaldehyd her 4-metoksybenzaldehyd tilsatt. (Utbytte 87%).

4. Fremstilling av hydroksy-(fenyl)-metylfosfonsyre-bis-(5'-O-2',3'-di-deoksytymidin)-ester:
Analogt med fremgangsmåten under 1. ble i stedet for 4-metylbenzaldehyd her benzaldehyd tilsatt. (Utbytte 93%).

5. Fremstilling av hydroksy-(4-klorfenyl)-metylfosfonsyre-bis-(5'-O-2',3'-di-deoksytymidin)-ester:
Analogt med fremgangsmåten under 1. ble i stedet for 4-metylbenzaldehyd her 4-klorbenzaldehyd tilsatt. (Utbytte 90%).

6. Fremstilling av hydroksy-(4-cyanfenyl)-metylfosfonsyre-bis-(5'-O-2',3'-di-deoksytymidin)-ester:
Analogt med fremgangsmåten under 1. ble i stedet for 4-metylbenzaldehyd her 4-cyanbenzaldehyd tilsatt. (Utbytte 86%).

7. Fremstilling av hydroksy-(4-nitrofenyl)-metylfosfonsyre-bis-(5'-O-2',3'-dideoksytymidin)-ester: Analogt med fremgangsmåten under 1. ble i stedet for 4-metylbenzaldehyd her 4-nitrobenzaldehyd tilsatt. (Utbytte 85%).

8.
Fremstilling av hydroksy-(2-nitrofenyl)-metylfosfonsyre-bis-(5'-O-2',3'-dideoksytymidin)-ester:
Analogt med fremgangsmåten under 1. ble i stedet for 4-metylbenzaldehyd her nitrobenzaldehyd tilsatt. (Utbytte 87%).

9.
Fremstilling av hydroksy-(2,4-dinitrofenyl)-metylfosfonsyre-bis-(5'-O-2',3'-dideoksytymidin)-ester:
Analogt med fremgangsmåten under 1. ble i stedet for 4-metylbenzaldehyd her 2,4-dinitrobenzaldehyd tilsatt. (Utbytte 85%).

10. Fremstilling av hydroksy-(9-fluorenyl)-metylfosfonsyre-bis-(5'-O-2',3'-dideoksytymidin)-ester:
Analogt med fremgangsmåten under 1. ble i stedet for 4-metylbenzaldehyd her 9-fluorenon tilsatt. (Utbytte 91%).

11. Fremstilling av hydroksy-(4-pyridyl)-metylfosfonsyre-bis-(5'-O-2',3'-dideoksytymidin)-ester:
Analogt med fremgangsmåten under 1. ble i stedet for 4-metylbenzaldehyd her 4-pyridylaldehyd tilsatt. (Utbytte 82%).

12. Fremstilling av hydroksy-(2,6-diklorfenyl)-metylfosfonsyre-bis-(5'-O-2',3'-dideoksytymidin)-ester:
Analogt med fremgangsmåten under 1. ble i stedet for 4-metylbenzaldehyd her 2,4-diklorbenzaldehyd tilsatt. (Utbytte 96%).

13. Fremstilling av hydroksy-(4-metoksyfenyl)-metylfosfonsyre-bis-(5'-O-2',3'-dideoksy-2',3'-didehydrotymidin)-ester:
Analogt med fremgangsmåten under 1. ble i stedet for 2',3'-ddT-H-fosfonatdiester her d4T-H-fosfonatdiester tilsatt, og i steden for 4-metylbenzaldehyd ble 4-metoksybenzaldehyd tilsatt. (Utbytte 80%).

14. Fremstilling av hydroksy-(4-metylfenyl)-metylfosfonsyre-bis-(5'-O-2',3'-dideoksy-2',3'-didehydrotymidin)-ester:
Analogt med fremgangsmåten under 1. ble i stedet for 2',3'-ddT-H-fosfonatdiester her d4T-H-fosfonatdiester tilsatt. (Utbytte 83%).

15. Fremstilling av hydroksy-(fenyl)-metylfosfonsyre-bis-(5'-O-2',3'-dideoksy-2',3'-didehydrotymidin)-ester:
Analogt med fremgangsmåten under 1. ble i stedet for 2',3'-ddT-H-fosfonatdiester her tilsatt d4T-H-fosfonatdiester og i steden for 4-metylbenzaldehyd ble benzaldehyd tilsatt. (Utbytte 87%).

16. Fremstilling av hydroksy-(4-klorfenyl)-metylfosfonsyre-bis-(5'-O-2',3'-dideoksy-2',3'-didehydrotymidin)-ester:
Analogt med fremgangsmåten under 1. ble i stedet for 2',3'-ddT-H-fosfonatdiester her tilsatt d4T-H-fosfonatdiester, og i steden for 4-metylbenzaldehyd ble 4-klorbenzaldehyd tilsatt. (Utbytte 86%).

17. Fremstilling av hydroksy-(4-cyanfenyl)-metylfosfonsyre-bis-(5'-O-2',3'-dideoksy-2',3'-didehydrotymidin)-ester:
Analogt med fremgangsmåten under 1. ble i stedet for 2',3'-ddT-H-fosfonatdiester her d4T-H-fosfonatdiester tilsatt, og i steden for 4-metylbenzaldehyd ble 4-cyanbenzaldehyd tilsatt. (Utbytte 86%).

18. Fremstilling av hydroksy-(4-nitrofenyl)-metylfosfonsyre-bis-(5'-O-2',3'-dideoksy-2',3'-didehydrotymidin)-ester: Analogt med fremgangsmåten under 1. ble i stedet for 2',3'-ddT-H-fosfonatdiester her tilsatt d4T-H-fosfonatdiester, og i stedet for 4-metylbenzaldehyd ble 4-nitrobenzaldehyd tilsatt. (Utbytte 81%).

19. Fremstilling av hydroksy-(2-nitrofenyl)-metylfosfonsyre-bis-(5'-O-2',3'-dideoksy-2',3'-didehydrotymidin)-ester:
Analogt med fremgangsmåten under 1. ble i stedet for 2',3'-ddT-H-fosfonatdiester her d4T-H-fosfonatdiester tilsatt, og i stedet for 4-metylbenzaldehyd ble 2-nitrobenzaldehyd tilsatt. (Utbytte 86%).

20. Fremstilling av hydroksy-(2,4-dinitrofenyl)-metylfosfonsyre-bis-(5'-O-2',3'-dideoksy-2',3'-didehydrotymidin)-ester:
Analogt med fremgangsmåten under 1. ble i stedet for 2',3'-ddT-H-fosfonatdiester her d4T-H-fosfonatdiester tilsatt, og i stedet for 4-metylbenzaldehyd ble 2,4-dinitrobenzaldehyd tilsatt. (Utbytte 80%).

21. Fremstilling av hydroksy-(4-pyridyl)-metylfosfonsyre-bis-(5'-O-2',3'-dideoksy-2',3'-didehydrotymidin)-ester:
Analogt med fremgangsmåten under 1. ble i stedet for 2',3'-ddT-H-fosfonatdiester her d4T-H-fosfonatdiester tilsatt, og i stedet for 4-metylbenzaldehyd ble 4-pyridylaldehyd tilsatt. (Utbytte 80%).

22. Fremstilling av hydroksy-(2,6-diklorfenyl)-metylfosfonsyre-bis-(5'-O-2',3'-dideoksy-2',3'-didehydrotymidin)-ester:
Analogt med fremgangsmåten under 1. ble i stedet for 2',3'-ddT-H-fosfonatdiester her tilsatt d4T-H-fosfonatdiester, og i stedet for 4-metylbenzaldehyd ble 2,6-diklorbenzaldehyd tilsatt. (Utbytte 87%).

23. Fremstilling av hydroksyheptyl-metyl-fosfonsyre-bis-(5'-O-2',3'-dideoksy-2',3'-didehydrotymidin)-ester: Analogt med fremgangsmåten under 1. ble i stedet for

2',3'-ddT-H-fosfonatdiester her d4T-H-fosfonatdiester tilsatt, og i stedet for 4-metylbenzaldehyd ble oktanal tilsatt. (Utbytte 75%).

24. Fremstilling av hydroksy-(4-nitrofenyl)-metylfosfonsyre-bis-(5'-O-2',3'-dideoksy-3'-azidotymidin)-ester:
Analogt med fremgangsmåten under 1. ble i stedet for 2',3'-ddT-H-fosfonatdiester her AZT-H-fosfonatdiester tilsatt, og i stedet for 4-metylbenzaldehyd ble 4-nitrobenzaldehyd tilsatt. (Utbytte 96%).

25. Fremstilling av hydroksy-(2-nitrofenyl)-metylfosfonsyre-bis-(5'-.O-2',3'-dideoksy-3'-azidotymidin)-ester:
Analogt med fremgangsmåten under 1. ble i stedet for 2'3'-ddT-H-fosfonatdiester her AZT-H-fosfonatdiester tilsatt, og i stedet for 4-metylbenzaldehyd ble 2-nitrobenzaldehyd tilsatt. (Utbytte 92%).

26. Fremstilling av hydroksy-(2,6-di-nitrofenyl)-metylfosfonsyre-bis-(5'-O-2',3'-dideoksy-3'-azidotymidin)-ester:
Analogt med fremgangsmåten under 1. ble i stedet for 2',3'-ddT-H-fosfonatdiester her AZT-H-fosfonatdiester tilsatt, og istedet for 4-metylbenzaldehyd ble 2,6-dinitrobenzaldehyd tilsatt. (Utbytte 88%).

27. Fremstilling av hydroksy-(2,4-di-nitrofenyl)-metylfosfonsyre-bis-(5'-O-2',3'-dideoksy-3'-azidotymidin)-ester:
Analogt med fremgangsmåten under 1. ble i stedet for 2',3'-ddT-H-fosfonatdiester her AZT-H-fosfonatdiester tilsatt, og i stedet for 4-metylbenzaldehyd ble 2,4-dinitrobenzaldehyd tilsatt. (Utbytte 90%).

28. Fremstilling av hydroksy-(4-pyridyl)-metylfosfonsyre-bis-(5'-O-2',3'-dideoksy-3'-azidotymidin)-ester:
Analogt med fremgangsmåten under 1. ble i stedet for 2',3'-ddT-H-fosfonatdiester her AZT-H-fosfonatdiester tilsatt, og i stedet for 4-metylbenzaldehyd ble 4-pyridylaldehyd tilsatt. (Utbytte 96%).

29. Fremstilling av hydroksyheptyl-metylfosfonsyre-bis-(5'-O-2',3'-dideoksy-3'-azidotymidin)-ester:
Analogt med fremgangsmåten under 1. ble i stedet for 2'.3'-ddT-H-fosfonatdiester her AZT-H-fosfonatdiester tilsatt, og i stedet for 4-metylbenzaldehyd ble oktanal tilsatt.

(Utbytte 96%).

30. Fremstilling av hydroksy-(2,6-dinitrofenyl)-metylfosfonsyre-(5'-O-2',3'-dideoksy-3'-azidotymidin)-(5'-O-2',3'-dideoksytymidin)-ester:
Analogt med fremgangsmåten under 1. ble i stedet for 2',3'-ddT-H-fosfonatdiester her ddT/AZT-H-fosfonatdiester tilsatt, og i stedet for 4-metylbenzaldehyd ble 2,6-nitrobenzaldehyd tilsatt. (Utbytte 88%).

31. Fremstilling av hydroksy-(4-nitrofenyl)-metylfosfonsyre-(5'-O-2',3'-dideoksy-3'-azidotymidin)-(5'-O-2',3'-dideoksy-2',3'-didehydrotymidin)-ester:
Analogt med fremgangsmåten under 1. ble i stedet for 2'.3'-ddT-H-fosfonatdiester her d4T/AZT-H-fosfonatdiester tilsatt, og i stedet for 4-metylbenzaldehyd ble 4-nitrobenzaldehyd tilsatt. (Utbytte 96%).

32. Fremstilling av hydroksy-(2,6-dinitrofenyl)-metylfosfonsyre-(5'-O-2',3'-dideoksy-3'-azidotymidin)-(5'-O-2',3'-dideoksy-2',3'-didehydrotymidin)-ester:
Analogt med fremgangsmåten under 1. ble i stedet for 2',3'-ddT-H-fosfonatdiester her d4T/AZT-H-fosfonatdiester tilsatt, og i stedet for 4-metylbenzaldehyd ble 2,6-dinitrobenzaldehyd tilsatt. (Utbytte 87%).

40. Fremstilling av hydroksy-(2-nitrofenyl)-metylfosfonsyre-(5'-O-2',3'-dideoksy-tymidin)-(5'-O-2',3'-dideoksy-2',3'-didehydrotymidin)-ester: Analogt med fremgangsmåten under 1. ble istedent for 2',3'-ddT-H-fosfonatdiester her d4T/ddT-H-fosfonatdiester tilsatt, og i stedet for 4-metylbenzaldehyd ble 2-nitrobenzaldehyd tilsatt. (Utbytte 91%).

41. Fremstilling av hydroksy-(2-nitrofenyl)-metylfosfonsyre-(5'-O-tymidin)-(5'-O-2',3'-dideoksy-2',3'-didehydrotymidin)-ester:
Analogt med fremgangsmåten under 1. ble i stedet for 2',3'-ddT-H-fosfonatdiester her d4T/T-H-fosfonatdiester benyttet, og i steden for 4-metylbenzaldehyd ble 2-nitrobenzaldehyd tilsatt. (Utbytte 85%).

42. Fremstilling av hydroksy-(4-klorfenyl)-metylfosfonsyre-bis-(5'-O-3'-O-levulinyltymidin)-ester:
Analogt med fremgangsmåten under 1. ble i stedet for 2',3'-ddT-H-fosfonatdiester her 3'-levulinyltymidin-H-fosfonatdiester benyttet, og i stedet for 4-metylbenzaldehyd ble 4-klorbenzaldehyd tilsatt. (Utbytte 93%).

43. Fremstilling av hydroksy-(4-klorfenyl)-metylfosfonsyre-bis-(5'-O-3'-O-t-butyldimetylsilyltymidin)-ester:
Analogt med fremgangsmåten under 1. ble i stedet for 2',3'-ddT-H-fosfonatdiester her 3'-levulinyltymidin-H-fosfonatdiester benyttet, og i stedet for 4-metylbenzaldehyd ble 4-klorbenzaldehyd tilsatt. (Utbytte 85%).

44. Fremstilling av hydroksy-(4-klorfenyl)-metylfosfonsyre-bis-(5'-O-3'-O-acetyltymidin)-ester:
Analogt med fremgangsmåten under 1. ble i stedet for 2',3'-ddT-H-fosfonatdiester her 3'-acetyltymidin-H-fosfonatdiester benyttet, og i stedet for 4-metylbenzaldehyd ble 4-klorbenzaldehyd tilsatt. (Utbytte 75%).

45. Fremstilling av hydroksy-(4-metoksyfenyl)-metylfosfonsyre-bis-(5'-O-3'-O-acetyltymidin)-ester:
Analogt med fremgangsmåten under 1. ble i stedet for 2',3'-ddT-H-fosfonatdiester ble 3'-acetyltymidin-H-fosfonatdiester her benyttet, og i stedet for 4-metylbenzaldehyd ble 4-metoksybenzaldehyd tilsatt. (Utbytte 70%).

46. Fremstilling av hydroksy-(4-klorfenyl)-metylfosfonsyre-bis-(5'-O-tymidin)-ester:
Fremstillingen skjedde fra det under 5a) beskrevne 3'-O-levulinyl-beskyttede derivatet etter standardbetingelser ved hjelp av 5 ekvivalenter hydrazinhydrat i pyridin/eddiksyre 4:1 i løpet av 15 minutter ved romtemperatur.

47. Fremstilling av di-(5'-O-2',3'-dideoksy-2',3'-didehydrotymidin)-fosfitt:
Analogt med fremgangsmåten under 1. ble i stedet for 2',3'-dideoksytymidin her 2',3'-dideoksy-2',3'-didehydrotymidin tilsatt. (Utbytte 75%).

48. Fremstilling av di-(5'-O-2',3'-dideoksy-2',3'-didehydrotymidin)-fosfitt:
Analogt med fremgangsmåten under 1. ble i stedet for 2',3'-dideoksytymidin her 2',3'-dideoksy-3'-azidotymidin tilsatt. (Utbytte 85%).

49. Fremstilling av di-(5'-O-3'-levulinyltymidin)-fosfitt:
Analogt med fremgangsmåten under 1. ble i stedet for 2',3'-dideoksytymidin her 3'-levulinyltymidin tilsatt. (Utbytte 65%).

50. Fremstilling av di-(5'-O-3'-t-butyldimetylsilyltymidin)-fosfitt:
Analogt med fremgangsmåten under 1. ble i stedet for 2',3'-dideoksytymidin her 3'-t-

butyldimetylsilyltymidin tilsatt. (Utbytte 65%).

51. Fremstilling av di-(5-O-3'-acetyltymidin)-fosfitt: Analogt med fremgangsmåten under 1. ble i stedet for 2',3'-dideoksytymidin her 3'-acetyltymidin tilsatt. (Utbytte 86%).

Reaksjonene med de sterkt akzeptorsubstituerte benzaldehydene (4-nitro-, 2-nitro-, 2,6-dinitro- og 2,4-dinitrobenzaldehyd) lot seg også gjennomføre med det chirale chining som base. Reaksjonene med de donorsubstituerte benzaldehydene (4-dimetylamino-, 4-metoksy-, 4-metyl- og benzaldehyd) ble gjennomført alternativt til de ovenfor beskrevne forsøkene også i rent trietylamin under oppvarming.

52. Fremstilling av 5'-O-(4,4'-dimetoksytrityl)-tymidylyl-(3'5')-tymidin-3'-((O-trietylsiloksy)-2-nitrobenzyl)-fosfonat (TES-beskyttet hydroksy-3'-OH-fosfonat-dimer D):

a) Fremstilling av 5'-O-(4',4'-dimetoksytrityl)-tymidylyl-(3'5')-3'-O-levulinyltymidin-3'-H-fosfonat:

(H-fosfonat-dimer A)

1,9 g (2,7 mmol; 1,1 ekv.) 5'-O-(4,4'-dimetoksytrityl)-tymidylyl-3'-H-fosfonat ble tørket under høyvakuum og oppløst i 30 ml tørr pyridin. Til denne oppløsningen ble det tilsatt 828 mg (2,4 mmol; 1,0 ekv.) fortørket 3'-O-levulinyl-tymidin. Deretter ble 899 ml friskt destillert pivaloylklorid dryppet til og blandingen omrørt ved romtemperatur. Etter 8 min. ble det fortynnet med 150 ml metylenklorid og ekstrahert i skilletrakt med 150 ml 5% natriumhydrogenkarbonatoppløsning. Etter ytterligere to gangers ektrahering hver med 150 ml metylenklorid ble det tørket over natriumsulfat, filtrert fra tørkemidlet og inndampet på rotasjonsfordamper til tørrhet. Råproduktet ble renset ved flashkromatografi. Gradienten av løpemidlet eddikester/metanol (+ tilsetning av 0,1% eddiksyre) ble forhøyet fra 0% til 5% metanol.
Produktet ble isolert som gult faststoff (1,972 g; 2,12 mmol; 78%).

b) Fremstilling av 5'-O-(4,4'-dimetoksytrityl)-tymidylyl-(3',5')-3'-O-levulinyl-tymidin-3'-((hydroksy)-2-nitrobenzyl)-fosfonat:

(_-hydroksyfosfonat-dimer B)

1,5 g (1,6 mmol; 1 ekv.) av H-fosfonat-dimeren A ble fortørket oppløst i 20 ml tørr metylenklorid. Denne oppløsningen ble tilsatt 725 mg (4,8 mmol; 3 ekv.) fortørket 2-nitrobenzaldehyd og deretter med 40 ml trietylamin. Etter åtte timers omrøring ved

romtemperatur ble det nøytralisert med eddiksyre og oppløsningen direkte renset med flashkromatografi. Gradienten av løpemidlet metylenklorid/metanol (+ tilsetning av 0,1% eddiksyre) ble forhøyet fra 0% til 5% metanol.
Produktet er et farveløst faststoff (1,374 g; 1,27 mmol; 79%).

c) Fremstilling av 5'-O-(4,4'-dimetoksytrityl)-tymidylyl-(3'5')-3'-O-levulinyl-tymidin-3'-((-I-trietylsiloksy)-2-nitrobenzyl)-fosfonat:

(TES-beskyttet hydroksyfosfonat-dimer C)

1,1 g (1,01 mmol; 1 ekv.) -hydroksyfosfonat-dimer B ble fortørket oppløst i 20 ml tørr pyridin. Til denne oppløsningen ble det dryppet til 914 mg (6,07 mmol; 1,02 ml; 6 ekv.) trietylsilylklorid og omrørt ved romtemperatur. Etter syv timers omrøring ble det inndampet til tørrhet på rotasjonsfordamper.
Råproduktet ble renset ved flashkromatografi. Gradienten av løpemidlet eddikester/metanol ble forhøyet fra 0% til 4% metanol. Produktet er et lysegult faststoff (1,13 g; 0,95 mmol; 93%).

d) Fremstilling av 5'-O-(4,4'-dimetoksytrityl)-tymidylyl-(3'5')-tymidin-3'-((-O-trietylsiloksy)-2-nitrobenzyl)-fosfonat (D):

1,1 g (0,92 mmol) TES-beskyttet hydroksyfosfonat-dimer C ble oppløst i 10 ml pyridin og tilsatt 10 ml av en oppløsning av 3 ml hydrazinhydrat (24% i vann), 6,92 ml pyridin og 4,61 ml eddiksyre. Etter tre minutters omrøring ved romtemperatur ble oppløsningen avkjølt til 0°C og fortynnet med 100 ml vann og 100 ml eddikester. Etter skilling av fasene i skilletrakt ble den organiske fasen en gang vasket med 25 ml av en 5% natriumhydrogenkarbonatoppløsning og deretter tørket over natriumsulfat. Etter fjerning av tørkemidlet ble det inndampet på rotasjonsfordamper til tørrhet. Råproduktet ble renset ved flashkromatografi. Gradienten av løpemidlet metylenklorid/metanol ble forhøyet fra 0% til 7% metanol.
Produktet ble isolert som et lysegult faststoff (858 mg; 0,78 mmol; 85%).

53. Fremstilling av 5'-O-(4,4'-dimetoksytriyl)-tymidylyl-(3'5')-tymidin-3'-O-(ß-cyanoetyl-diisopropylaminofosforamiditt)-((-O-trietylsiloksy)-2-n-itrobenzyl)-fosfonat (TES-beskyttet hydroksy-3'-fosforamiditt-fosfonat-dimer E)

230 mg (0,21 mmol; 1 ekv.) TES-beskyttet hydroksy-3'-OH-fosfonat-dimer D ble fortørket i oppløst 15 ml tørr metylenklorid, under omrøring tilsatt 177 ml (1,05 mmol; 135 mg; 5 ekv.) diisopropyletylamin og deretter 70 ml (0,31 mmol; 74,2 mg, 1,5 ekv.) ß-cyanoetyl-diisopropylklorofosfin. Det ble omrørt i 5 timer ved romtemperatur, tilsatt 20 ml eddikester og inndampet til tørrhet på rotasjonsfordamper. Deretter ble det to

ganger ekstrahert med hver 20 ml 2% natriumhydrogenkarbonatoppløsning fulgt av mettet koksaltoppløsning. Den organiske fasen ble tørket over natriumsulfat. Etter filtrering ble resten inndampet til tørrhet på rotasjonsfordamper.
Råproduktet ble renset ved flashkromatografi. Som løpemiddel ble det anvendt metylenklorid/acetonitril 1:1 (+ tilsetning av 1% trietylamin).
Produktet var et lysegult faststoff (123 mg; 0,095 mmol; 45%).

54. Fremstilling av 5'-O-(4,4'-dimetoksytrityl)-tymidylyl-(3'_5')-tymidin-3'-O-suksinyl-((-O-trietylsiloksy)-2-nitrobenzyl)-fosfonat

(TES-beskyttet hydroksy-3'-sukinylfosfonat-dimer F) 200 mg (0,18 mmol; 1,4 ekv.) TES-beskyttet hydroksy-3'-OH-fosfonat-dimer D ble fortørket oppløst i 2 ml tørr pyridin. Deretter ble det etter hverandre tilsatt 24,4 mg (0,2 mmol) 4-dimetylamino-pyridin og 20,0 mg (0,2 mmol) ravsyreanhydrid og under omrøring reagert ved romtemperatur i 4 timer. Det ble tilsatt 45 ml vann og etter 10 minutters omrøring inndampet til tørrhet på rotasjonsfordamper. Resten ble tatt opp i 15 ml metylenklorid og en gang ekstrahert med 8 ml 10% sitronsyre og to ganger med 8 ml kaldt vann. Deretter ble den organiske fasen tørket over natriumsulfat. Etter filtrering ble det inndampet på rotasjonsfordamper til tørrhet. Råproduktet ble tatt opp i 3 ml metylenklorid og tildryppet 25 ml iskald n-heksan. Produktet falt ut som et fargeløst bunnfall. For fullstendiggjøring av fellingen ble morluten lagret noen timer ved -20°C, deretter avfiltrert og tørket. Produktet er et fargeløst faststoff (167 mg; 0,14 mmol; 78%).

55. Fremstilling av 5'-O-(4,4'-dimetoksytrityl)-tymidylyl-(3_5')-tymidin-3'-O-suksinyl-CPG-((_-O-trietylsiloksy)-2-nitrobenzyl)-fosfonat

(CPG-bundet TES-beskyttet hydroksy-3'-suksinylfosfonat-dimer G)
I en Pierce-flaske ble 50 mg (0,042 mmol; 1,5 ekv.) TES-beskyttet hydroksy-3'-sukcinylfosfonat-dimer F oppløst i 1,5 ml tørr dimetylformamid og tilsatt 13,41 mg (0,042 mmol; 1,5 ekv.) O-benzotriazol-1-yl-N,N,N',N'-tetrametyluronium –tetrafluorborat (TBTU) og 4,2 ml (0,033 mmol; 3,84 mg; 1,2 ekv.) N-etylmorfolin. Deretter ble 370 mg CPG-bærer tilsatt og ytterligere ristet i 4 timer ved romtemperatur. Det ble overført til en fritte, vasket med metanol og metylenklorid og igjen overført til Pierse-flasen og tilsatt 1,5 ml Capping-reagens. Det ble ristet i en ytterligere time, pånytt overført til en fritte, avfiltrert, vasket med metanol, metylenklorid, tetrahydrofuran og dietyleter og tørket ved 40°C under oljepumpevakuum.
Bærerens last: 47,12 mmol/g

56. Fremstilling av oligonukleotid med formelen

TTTTTTTTT(pp)T

(pp betyr en _-hydroksy(o-nitrofenyl)metylfosfonat-bro)

CPG-bæreren fra eksempel 55, som inneholdt dinukleotidet bundet over 3'-enden, ble behandlet i rekkefølge med de følgende reagenser:

1. Acetonitril abs.
2. 2% dikloreddiksyre i diklormetan
3. Acetonitril abs.
4. 10 µmol 5'-O-dimetoksytrityltymidin-3'-fosforsyre-ß-cyanoetylester-diisopropylamiditt og 40 µmol tetrazol i acetonitril abs.
5. Acetonitril
6. 20% acetanhydrid i THF med 40% lutidin og 10% dimetylaminopyridin
7. Acetonitril
8. Jod (1,3 g i THF/vann/pyridin; 70:20:5=v:v:v)

Trinnene 1 til 8, nedenfor kalt en reaksjonssyklus, ble gjentatt syv ganger for oppbygging av dekatymidylatderivatet. Etter avsluttet syntese fulgte avspaltningen av dimetoksytritylgruppene som beskrevet i trinnene 1 til 3. Ved behandling med ammoniakk ble oligonukleotidet spaltet fra bæreren og likeledes ble ß-cyanoetylgruppene eliminert. Avspaltingen av silylbeskyttelsesgruppene skjedde ved behandling med 80% eddiksyre. Det dannede råproduktet av dekatymidylatderivat, som på 3'-enden inneholder en (-hydroksy-o-nitro-fenyl-metylfosfonat)-internukleotidbinding, ble renset ved polyakrylamid-geleletroforese eller HPLC.

57. Kommersielt tilgjengelige CPG-bærere, som inneholdt 1 µmol av 5'-O-dimetoksytrityltymidinet bundet over 3'-enden, ble etter hverandre behandlet med følgende reagenser:

1. Acetonitril abs.
2. 2% dikloreddiksyre i diklormetan
3. Acetonitril abs.
4. 10 µmol 5'-O-dimetoksytrityltymidin-3'-fosforsyre-ß-cyanoetylester-diisopropylamiditt og 40 µmol tetrazol i acetonitril abs.
5. Acetonitril
6. 20% acetanhydrid THF/ med 40% lutidin og 10% dimetylaminopyridin
7. Acetonitril

8. Jod (1,3 g i THF/vann/pyridin; 70:20:5=v:v:v)

Trinnene 1 til 8, nedenfor kalt en reaksjonssyklus, ble gjentatt syv ganger for oppbygging av dekatymidylatderivatet. I den siste syklusen ble i stedet for monomeren i trinn 4, det tilsvarende dinukleotidet, som det fremstilt i eksempel 53, tilsatt. Etter avsluttet syntese fulgte avspaltingen av dimetoksytritylgruppen som beskrevet under trinnene 1 til 3. Under behandling med ammoniakk ble oligonukleotidet spaltet fra bæreren, og likeledes ble ß-cyanoetyl-gruppene eliminert. Avspaltingen av silylbeskyttelsesgruppen skjedde ved behandling med 80% eddiksyre. Det dannede råproduktet av dekatymidylatderivat, som på 5'-enden inneholdt en (-hydroksy-o-nitrofenyl-metylfosfonat)-internukleotid-binding, ble renset ved polyakrylamid-gelelektroforese eller HPLC.

58. Fremstilling av et oligonukleotid med formelen

T(pp) TTTTTTTT(PP)T

(pp betyr alltid en α-hydroksy(o-nitrofenyl)metylfosfonat-bro). Syntesen skjer analogt som beskrevet i eksempel 56 med utgangspunkt i T(pp)T-CPG-bæreren fra eksempel 55, som inneholdt 1 µmol av dinukleotidet bundet over 3'-enden. I den siste syklusen ble i steden for monomeren i trinn 4 det tilsvarende dinukleotid, som ble fremstilt i eksempel 53, tilsatt. Etter avsluttet syntese fulgte avspaltingen av dimetoksytritylgruppen som beskrevet i trinnene 1 til 3. Ved behandling med ammoniakk ble oligonukleotidet spaltet fra bæreren, og samtidig ble ß-cyanoetylgruppene eliminert. Avspalting av silylbeskyttelsesgruppen skjedde ved behandling med 80% eddiksyre. Det dannede råproduktet av dekatymidylatderivat, som på 3'- og 5'-enden alltid inneholdt en (-hydrok-sy-o-nitrofenyl-metylfosfonat)-internukleotidbinding, ble renset ved polyakrylamid-gelelktorforese eller HPLC.

59. Fremstilling av GCAGGAGGATGCTGAGGAGG(pp)C (HSV mål)

Fremstillingen skjedde analogt som beskrevet i eksempel 56, hvor man i stedet for T(pp)T-CPG gikk ut fra tilsvarende G(pp)C-CPG-bærer. I kondensasjonsreaksjonen ble det i trinn 4 alltid tilsatt den til sekvensen tilsvarende monomerbyggestenen blant desoksyadenosin, desoksyguanosin eller desoksycytidin. Man foretrekker slik kommersielt tilgjengelige byggestener som har hurtig avspaltbar beskyttelsesgrupper (®Expedite Fast Deprotecting Amidites; fa. Millipore, Eschborn).

60. Fremstilling av G(pp)CAGGAGGATGCTGAGGAGG(pp)C

Fremstillingen skjedde analogt som beskrevet i eksempel 5, hvor man i siste konden-

sasjonstrinnet i stedet for T(pp)T-fosforamidet gikk ut fra det tilsvarende G(pp)C-fosforamiditt.

61. Fremstilling av G(pp)CAGGAGGATG(pp)CTGAGGAGG(pp)C
Fremstillingen skjedde analogt som beskrevet i eksempel 5, hvor man i åttende og siste kondendsasjonstrinn tilsatte det tilsvarende G(pp)C-fosforamiditt.

62. Fremstilling av G(pp)CGGGGCTCCATGGGGGTC(pp)G
Fremstillingen skjedde analogt som beskrevet i eksempel 60, hvor man i stedet for G(pp)C-CPG gikk ut fra den tilsvarende C(pp)G-CPG-bærer.

63. Fremstilling av C(pp)GAGAACATVAYGGTC(pp)G (c-fos mål)
Fremstillingen skjedde analogt som beskrevet i eksempel 62, hvor man i den siste syklus tilsatte det tilsvarende C(pp)G-fosforamiditt.

64. Karakterisering av oligonukleotidene
Karakteriseringen skjedde ved hjelp av HPLC, polyakrylamid-gelelektroforese (PAGE) og negativion-elektrospray-massespektrometri (ES-MS$^-$). Produktet ble renset som ovenfor beskrevet og viste deretter ved PAGE (20% akrylamid, 2% bisakrylamid og 7 M urinstoff) et enhetlig bånd. HPLC fulgte ved revers-fase-kolonne RP-18 fra fa. Merck eller på en PA 100-kolonne fra fa. Dionex.
For ES-MS$^-$ ble oligonukleotidet overført ved ammoniumacetat-felling eller andre omsalting til ammoniumsaltet. Prøveopptakelsen skjedde fra en oppløsning i acetonitril-/vann (1:1) med 5 OD_{260}/ml oligomer. Nøyaktigheten til metoden ligger ved ca. ± 1,5 Dalton.

65. Bestemmelse av stabiliteten og celleopptaket etter radioaktiv markering.

Radioaktiv markering:
En generell anvendbar markering med 35S består i at man ved syntesen av oligonukleotidet gjennomfører minst en oksydasjon i DNA-syntesesyklusen (trinn 20 i eksempel 11) med elemtært ^{35}svovel. Oligonukleotider som har en fri 5'-hydroksy-gruppe, kan ved hjelp av polynukleotidkinasen på kjent måte bli merket med ^{32}P eller ^{35}S.
Oligonukleotider som bærer en fri 3'-hydroksygruppe, kan på kjent måte bli markert med 3'-terminal transferase. Som eksempel er her 5'-markeringen av DNA-delen gjengitt: Oligonukleotidet med en fri 5'-hydroksygruppe (500 pmol) ble oppløst i 425 µl

vann, oppløsningen oppvarmet til 90°C og hurtig avkjølt. Deretter tilsatte man 50 µl 10 x kinasebuffer og 50 µl ^{32}P gamma-ATP (6000 Ci/mmol) hhv. ^{35}S-gamma-ATP og inkubert i 1 time ved 37°C. Reaksjonsblandingen ble stoppet ved tilsetning av 0,5 M EDTA-oppløsning. Avsaltingen skjedde ved hjelp av en NAP^R-kolonne fra firmaet Pharmacia.

Undersøkelse av stabiliteten av oligomeren i mediumet med celler:
Supernatant 1 (10 µl) ble blandet med 5 µl 80% formamid (med XC og BB), oppvarmet til 95°C (5 minutter) og satt på en polyakrylamidgel (20% akrylamid, 7 M urinstoff). Etter utviklingen av gelen i det elektriske feltet, tilordnet man båndene på gelen ved hjelp av autoradiografi til de "stabile oligomerene" hhv. de manglende båndene til de "nedbrutte oligomerene". Resultatet etter 24 timers inkuberingstid: Sammenlignet med de ikke-modifiserte oligonukleotidene har forbindelsene med formelen I (W lik formel II, R lik formel II') alle en sterkt forlenget levetid.

Bestemmelse av celleopptak:
Man inkuberte Vero-celler i 96-brønners mikrotiterplater i DMEM, 5% FCS i 24 timer ved 37°C. Deretter ble mediumet fjernet, cellene vasket to ganger med serumfritt DMEM. Den radioaktivt merkede oligomeren (10^6cpm) ble fortynnet med ikke-markert oligomer til en konsentrasjon på 10 µM i serum og cellene ble inkubert ved 37°C med dette. Etter 1, 7 og 24 timer ble det hver gang tatt 150 µl (betegnelse: "supernatant 1"). Cellene i brønnene i mikrotiterplaten ble vasket 7 ganger med 300 µl friskt medium, og de sammenslåtte vaskemidlene (betegnelse: "supernatant 2") målt i scintillasjons-telleren. Deretter tilsatte man 100 µl trypsinoppløsning, ventet i 30 sekunder og trakk av supernatanten. For oppløsning av cellene fra platen, inkuberte man 3 min. ved 37°C. De løse cellene ble overført i 1,5 ml Eppendorf-rør og sentrifugert ved 2000 pmdr. pr. min. i 6 min. ("supernatant 3"). Supernatant 1 (5 µl), 2 og 3 (0,5 ml) ble hver målt separat på scintillasjonsteller. Oligomeren ble beregnet i pmol pr. 100.000 celler, hvor supernatant 3 står for den cellebundne oligomerfraksjonen og summen av supernatanten 1 og 2 er den ikke-cellebundne oligomerfraksjonen.

66. Bestemmelse av celleopptak etter fluorescens-merking:
Man lot COS-cellene vokse sammen til konfluens i Dulbecco's MEM, som var tilsatt 10% FCS i 5 cm petriskåler. Cellene ble vasket 2 ganger med cerumfritt DMEM. Ved hjelp av en steril nål ble en flate på ca. 1 cm^2 i midten av petriskålen innringet. På denne flaten ble DNA-oligomeroppløsningen (0,1 mM) som skulle undersøkes, påført. Det ble inkubert ved 37°C under CO_2 atmosfære. Etter 2, 4 og 16 timer ble cellene

undersøkt ved fluorescensmikroskopi. Fra dette ble cellene fire ganger vasket med serumfritt DMEM, dekket med et glass og vurdert under fluorescensmikroskop hhv. ved fasekontrast.

67. Bestemmelse av smeltetemperaturene:
Bestemmelsen av smeltetemperaturene skjedde ved hjelp av et HP 8452A diodenarray-spektrofotometer, et HP 89090 A Peltier-element og HP temperaturkontroll programvare revisjon B5.1 (fa. Hewlett Packard). Det ble målt i trinn på 0,5°C/min. i 10 mM HEPES og 140 mM NaCl (pH 6,5) som buffer. Oligomerkonsentrasjonen var 0,5 til 1,5 OD_{260} pr. ml.

68. Testing av antiviral aktivitet i cellekultur:
Den antivirale aktiviteten til prøvestoffene mot forskjellige humanpatogene herpesvira ble undersøkt i cellekulturtestsystemet. For forsøkende ble apenyreceller (Vero, $2x10^5$/ml) i serumholdig Dulbecco's MEM (5% føtalt kalveserum FCS) sådd ut i 96-brønners nitrotiterplater og inkubert i 24 timer ved 37°C og 5% CO_2. Det serumholdige mediumet ble så avsuget og cellene ble to ganger overspylt med serumfritt Dulbeccoæs MEM (-FCS). Teststoffene ble forhåndsfortynnet i H_2O til en konsentrasjon på 600 µM og ble oppbevart ved -18°C. For testen fulgte ytterligere fortynningstrinn i Dulbecco's Minimal Essential Medium (MEM). Hver gang ble 100 µl av de enkelte prøvestoff-fortynningene ble tilsatt til cellene sammen med 100 µl serumfri Dulbecco's MEM (-FCS) til de spylte cellene. Etter 3 timers inkubering ved 37°C og 5% CO_2, ble cellene infisert med Herpes simplex Virus type 1 (ATCC VR7SS, HSV-1 F-stamme) eller med Herpes simplex Virus type 2 (ATCC VR734, HSV-2 G-stamme), ved hvilke celletypen ble fullstendig ødelagt i løpet av 3 dager. For HSV-1 var infeksjonsstyrken 500 Plaque-dannende enheter (PFU) pr. brønn, for HSV-2 350 PFU/brønn. Forsøksoppsettet inneholder så prøvestoffet i konsentrasjoner på 80 µM til 0,04 µM i MEM, tilsatt 100 U/ml penicillin G og 100 mg/l Streptomycin. Alle forsøk ble gjeninnført ved dobbel bestemmelse ved unntak av kontrollene, som ble gjennomført 8 ganger pr. spalte. Forsøksoppsettet ble inkubert i 17 timer ved 37°C og 5% CO_2. Cytotoksisiteten til prøvestoffene ble bestemt etter 20 timer, total inkuberingstid ved mikroskopisk betraktning av cellekulturene. Som dosis tolerata mazima (DTM) ble den høyeste preparatkonsentrasjonen betegnet som under de nevnte forsøksbetingelsene som ikke ga noen mikroskopisk observerbar cellebeskadigelse. Deretter fulgte tilsetning av FCS til en sluttkonsentrasjon på 4% med en ytterligere inkubasjon i 55 timer ved 37°C og 5% CO_2. De ubehandlede infeksjonskontrollene viste så en komplett cytopatisk effekt (CPE). Etter mikroskopisk observasjon av cellekulturene ble disse så farget med

nøytralt rødt tilsvarende vitalfargingsfremgangsmåtene ifølge Finter (1966). Den antivirale aktiviteten til et teststoff ble definert som minimal hemmekonsentrasjon (MHK), som ble benyttet for å beskytte 30-60% av cellene for den virusbetingede cytopatogene effekt. MIC-verdiene til forskjellige oligonukleotider ligger i området fra 0,1 til 80 µmol/l.

69. Bestemmelse av in vivo-aktiviteten mot vira

For testingen av forbindelsene in vivo ble 5 uker gamle NMRI-mus med en vekt på ca. 16 til 18 gram benyttet. Musene ble holdt under vanlige betingelser i grupper opptil fem dyr og med fôr og vann ad libitum. Infeksjonen av musene fulgte intraperitonalt med ca. 10 til 50 LD50 enheter av en HSV-stamme (HSV "corneae"). Doseringen av forbindelsen skjedde to ganger daglig i.p. med 1, 10 eller 50 mg/kg. Kontrolldyrene fikk en 1% natriumkloridoppløsning. Overlevelsesraten av dyrene ble fulgt over en periode på to uker. Ved anvendelse av antisens-oligonukleotidene var det 1 til 5 overlevende, mens etter Placebo-giving var alle dyrene døde.

70. Bestemmelse av in vivo-aktiviteten: Hemming av c-Fos protein-ekspresjon hos rotte:

Bestemmelsen skjedde som beskrevet (Sandkühler et al. (1991) i: Proceedings of the VIth World Congress on Pain, Charlton og Woolf, Editors; Elsevier, Amsterdam; side 313-318) ved superfusjon av ryggmargen. Etter laminektomi av en barbiturat-bedøvet Sprague-Dawley rotte ble en tokammer-beholder av silikon dannet for opptak av antisens-oligomeren. Et kammer ble fylt med antisens-oligonukleotid-derivatet, mens det andre kammeret ble fylt med kontroll-oligomeren (konsentrasjon hver 75 µM). Hver gang etter en time ble superfusatet utbyttet. Etter 6 timers superfusjon ble c-fos-ekspresjonen stimulert ved varmebehandling (52°C) av bakløperen. Hemmingen av c-fos ekspresjonen kan bli påvist immunohistokjemisk på tilsvarende vevsnittprøver.

71. Fremstilling av 5'-O-(4,4'-dimetoksytrifenylmetyl)-2'-desoksytymidylyl-(3'_5')-3'-O-levulinyl-2'-desoksytymidin 3'-((α-O-tributylsiloksy)-2-nitrobenzyl)-fosfonat:

TBS(tributylsiloksy)-beskyttet hydroksyfosfonat-dimer H)

1,77 g (1,636 mmol; 1 ekv.) α-hydroksyfosfonat-dimer B ble fortørket oppløst i 30 ml tørr pyridin. Til denne oppløsningen ble det dryppet til 2,62 ml (9,816 mmol; 2,306 g; 6 ekv.) klortributylsilan. Etter åtte timers omrøring ved romtemperatur ble reaksjonen avbrutt ved tilsetning av metanol og blandingen inndampet til tørrhet i rotasjonsfordamperen.

Råproduktet ble renset ved flashkromatografi. Gradienten av løpemidlet

eddikester/metanol ble forhøyet fra 0% til 2% metanol. Produktet var et lysegult faststoff (1,78 g; 1,39 mmol; 85%).

72. Fremstilling av 5'-O-(4,4'-dimetoksytrifenylmetyl)-2'-desoksytymidylyl-(3' → 5')-2'-desoksytymidin 3'-((α-O-tributylsiloksy)-2-nitrobenzyl)-fosfonat:

(TBS-beskyttet hydroksy-3'-OH-fosfonat-dimer I) 1,2 g (0,94 mmol) TBS-beskyttet hydroksyfosfonat-dimer H ble oppløst i 10 ml pyridin og tilsatt 10 ml av en oppløsning av 3 ml hydrazinhydrat (24% i vann), 6,92 ml pyridin og 4,61 ml eddiksyre. Etter tre minutters omrøring ved romtemperatur ble oppløsningen avkjølt til 0°C og fortynnet med 100 ml vann og 100 ml eddikester. Etter adskillelse av fasene i skilletrakten ble den organiske fasen vasket en gang med 25 ml av en 5% natriumhydrogenkarbonatoppløsning og deretter tørket over natriumsulfat. Tørkemidlet ble avfiltrert og filtratet inndampet på rotasjonsfordamper til tørrhet.
Råproduktet ble renset ved flashkromatografi. Gradienten av løpemidlet metylenklorid/metanol ble forhøyet fra 0% til 5% metanol. Produktet ble isolert som lysegult faststoff (910 mg; 0,77 mmol; 82%).

73. Fremstilling av 5'-O-(4,4'-dimetoksytrifenylmetyl)-2'-desoksytymidylyl-(3'_5')-2'-desoksytymidin 3'-O-suksinyl-((α-O-tributylsiloksy)-2-nitrobenzyl)-fosfonat

(TBS-beskyttet hydroksy-3'-suksinylfosfonat-dimer J)
120 mg (0,10 mmol; 1 ekv.) TBS-beskyttet hydroksy-3'-OH-fosfonat-dimer I ble forhåndstørket oppløst i 1 ml tørr pyridin. Deretter ble det etter hverandre tilsatt 14,8 mg (0,12 mmol; 1,2 ekv.) 4-dimetylaminopyridin og 12,1 mg (0,12 mmol; 1,2 ekv.) ravsyreanhydrid og ved romtemperatur omrørt i 4 timer. Det ble tilsatt 40 ml vann og etter 120 minutters omrøring inndampet til tørrhet på rotasjonsfordamper. Resten ble tatt opp i 10 ml metylenklorid og en gang vasket med 5 ml kald 10% sitronsyre og to ganger ekstrahert med 5 ml kaldt vann. Deretter ble den organiske fasen tørket over natriumsulfat. Etter filtrering ble det inndampet til tørrhet på rotasjonsfordamper. Produktet ble tatt opp i 3 ml metylenklorid og dryppet til i 25 ml iskald n-heksan. Produktet falt ut som fargeløst bunnfall. For fullstendiggjøring av fellingen ble morluten satt ved -20°C i noen timer, deretter avfiltrert og tørket. Råproduktet er et fargeløst faststoff (115 mg; 0,09 mmol; 90%).

74. Fremstilling av 5'-O-(4,4'-dimetoksytrifenylmetyl)-2'-desoksytymidylyl-(3' → 5')-2'-desoksytymidin 3'-O-suksinyl-CPG-((α-O-tributylsiloksy)-2-nitrobenzyl)-fosfonat

(CPG-bundet TBS-beskyttet hydroksy-3'-suksinylfosfonat-dimer K)
I en Pierce-flaske ble 26,5 mg (0,021 mmol; 1,5 ekv.) TBS-beskyttet hydroksy-3'-

suksinylfosfonat-dimer J oppløst i 0,7 ml tørr dimetylformamid og tilsatt 6,74 mg (0,021 mmol; 1,5 ekv.) O-benzotriazol-1-yl-N,N,N',N'-tetrametyluronium–tetrafluorborat (TBTU) og 2,1 ml (0,017 mmol; 1,96 mg; 1,2 ekv.) N-etylmorfolin. Deretter ble 183 mg CPG-bærer ristet og ytterligere ristet i 4 timer ved romtemperatur. Det ble overført i en fritte, vasket med metanol og metylenklorid, igjen overført i Pierce-flasken og tilsatt 0,7 ml Capping-reagens. Det ble igjen ristet i en time, pånytt overført i en fritte, avfiltrert, vasket med metanol, metylenklorid, tetrahydrofuran og dietyleter og tørket under oljepumpevakuum.

Bærerens last: 33,15 mmol/g

75. Fremstilling av CGTCCATGTCGGCAAACAGCT(pp)C (HSV mål)

Fremstilling skjedde analogt som beskrevet i eksempel 56, hvor man i steden for T(pp)T-CPG gikk ut fra tilsvarende T(pp)T-CPG-bærer fra eksempel 74. I kondensasjonsrekasjonene ble det i trinn 4 tilsatt alltid monomerbyggestenen som tilsvarte sekvensen av desoksyadenosin, desoksyguanosin eller desoksycytidinet. Foretrukket er slike kommersielt tilgjengelig byggestener som har hurtig avspaltbar beskyttelsesgrupper (^{R}Expedite Fast Deprotecting Amidites; fa. Millipore, Eschborn).

TABELL 2

X	Nukl.	$\delta_{H\alpha}$ [ppm]	δ_{OH} [ppm]	$\delta_{c\alpha}$ [ppm]	δ_{31p} [ppm]
NMe_2	d4T	-	-	-	-
OCH_3	d4T	4,85	6,64	69,06/68,86 (1648Hz)(163,49Hz)	24,09/24,01
CH_3	d4T	4,95	6,30	69,50/69,10	23,84/23,81
H	d4T	4,975/5,01	6,35	69,53/69,35	23,72/23,64
Cl (MS=O.K.)	d4T	5,05	6,47	68,47	23,18/23,09
2.6-DiCl	d4T	5,77	6,45	-	22,24/22,14
CN	d4T	5,19	6,64	68,99/68,90	22,41/22,32
4-NO_2	d4T	5,28	6,71	-	22,11/22,10
2-NO_2	d4T	6,06	6,83	-	21/72/21,65
2.4-$DINO_2$	d4T	7,13/7,09	6,13/6,11	-	20,21/20,46
2.6-$DiNO_2$	d4T				
π	d4T	5,14	6,605	69,3	22,24/22,13
Oktyl	d4T	3,74	5,55	-	27,86/27,82
NMe_2	ddT	4,885	6,08	69,2 (163.78Hz)	24,72/24,67
OCH_3	ddT	4,98	6,24	68,83 (165,72Hz)	24,28/24,25
CH_3	ddT	5,015	6,27	69,18 (159,06Hz)	24,09/24,06

X	Nucl.	$\delta_{H\alpha}$ [ppm]	δ_{OH} [ppm]	$\delta_{c\alpha}$ [ppm]	δ_{31p} [ppm]
H	ddT	5,056	6,355	69,33 (163,53Hz)	23,91/23,88
Cl	ddT	5,15	6,465	68,59 (164,016Hz)	23,38/23,35
2.6-DiCl	ddT	5,82	6,67	67,64 (170,2Hz)	22,54/22,44
CN	ddT	5,25	6,63	68,77 (166,3Hz)	22,65/22,60
4-NO_2	ddT	5,32	6,69	68,74	22,44/22,40
2-NO_2	ddT	6,07	6,81	N.D.	22,12/22,10
2.4-NO_2	ddT	6,15	7,07	69,25	20,77/20,61
2,6-NO_2	ddT	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
π (MS O.K.)	ddT	5,17	6,67	67,55	22,51/22,49
Fluorenon	ddT	-	6,75	80,59 (165,71Hz)	23,37
NMe_2	AZT				
OCH_2	AZT				
CH_3	AZT				
H	AZT				
Cl	AZT				
CN	AZT				
4.NO_2	AZT	5,38	6,82	-	22,745 (DMSO)

X	Nukl.	$\delta_{H\alpha}$ [ppm]	δ_{OH} [ppm]	$\delta_{C\alpha}$ [ppm]	δ_{31P} [ppm]
2.NO_2	AZT	6,27	7,31	-	23,17/23,08 (MeOD)
2,6-NO_2	AZT	6,32	7,51	-	21,37/21,30 (MeOD)
2,4-DiNO_2 (Triester O.K. (MS O.K.))	AZT	6,16 [6,39]	7,173 [7,48]	- -	20,95/20,83 [21,57/21,38] (MeOD)
π	AZT	5,22	6,69	-	22,79/22,76
Oktyl (MS O.K.)	AZT	3,83	5,63	66,72	28,17/28,09

X	Nukleo.I	Nukleo.II	$\delta_{H\alpha}$ [ppm]	^{13}C [ppm]	δ_{OH} [ppm]	δ_{31P} [ppm]
2,6-DiNO_2 Triester O.K.	ddT	AZT	6,34	-	-	21,27/21,25 (MeOD) 21,23/21,17
2,6-Di-NO_2 Triester O.K.	d4T	AZT	6,29	-	7,22	20,38/20,28 (DMSO) 20,06/19,56
4-NO_2	d4T	AZT	5,32	-	6,78	22,63/22,20 (DMSO)
2-NO_2	ddT	d4T	6,01	-	6,86	22,24/22,23/ 21,71/21,40 (DMSO)
2-NO_2	3'T	d4T	6,15	-	6,86	22,37/22,15 (DMSO)
4-Cl	T	T	5,12	68,36 (163,20Hz)	-	21,5/21,01/ 23,55/23,52 (DMSO)
4-Cl	$T_{3'heo}$	$T_{3'heo}$	5,16	68,38 (163,30Hz)	6,58	23,68/23,66 (DMSO)
4-Cl	$T_{3'TBDMS}$	$T_{3'TBDMS}$	5,12	68,32 (163Hz)	N.D.	23,25/22,86 ($CDCl_3$)

X	Nukleo.I	Nukleo.II	$\delta_{H\sigma}$ [ppm]	^{13}C [ppm]	δ_{OH} [ppm]	δ_{31P} [ppm]
4-Cl	$T_{3'Ac}$	$T_{3'Ac}$	5,16	68,49 (164,05Hz)	6,59	23,77/23,73 (DMSO)
4-OCH_3	$T_{3'Ac}$	$T_{3'Ac}$	5,05	68,72 (165,12Hz)	6,38	24,59/24,52 (DMSO)

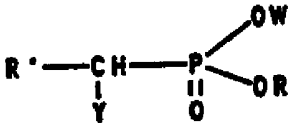
H-fosfonat-diester og H-fosfonat-monoester

Nucl. I	Nucl. II	δ_H [ppm]	J_{HP} [Hz]	δ_{31P} [ppm]	LM
ddT	ddT	6,949	711,00	11,18	DMSO
ddT	-	6,815	637,01	7,24	D_2O
d4T	d4T	6,87	710,98	11,12	DMSO
d4T	-	6,71	637,67	7,07	D_2O
AZT	AZT	6,97	719,4	11,40	DMSO
AZT	-	7,02	674,54	1,06	DMSO
ddT	d4T	6,91	711,10	11,35/10,88	DMSO
ddT	AZT	6,939	736,51	11,35/11,26	DMSO
d4T	AZT	6,954	739,59	11,46/11,09	DMSO
$^{3'}T$	AZT	7,026	720,12	10,51/10,04	DMSO
$^{3'}T$	d4T	6,97	716,55	10,15/10,07	DMSO

Patentkrav

1.

Forbindelse med formel I,



(I)

karakterisert ved at

Y har betydningen OH, SH, OAc eller Sac, hvor Ac=(C1-C18)-acyl, evt. er en til tre ganger umettet,

R' står for aryl, heteroaryl eller alkyl,

W har betydningen nukleotid eller nukleotidanalog,

R har betydningen for W hvor R og W kan være like eller forskjellige,

W og R danner sammen med fosfonatresten som bærer dem et oligonukleotid.

2.

Forbindelse med formel I ifølge krav 1, karakterisert ved at

Y har betydningen OH, SH, OAc eller SAc, hvor Ac=(C1-C8)-acyl, evt. 1 til tre ganger umettet,

R' står for aryl med 6-14 C-atomer,

heteroaryl med 3 til 13 C-atomer og opptil tre heteroatomer utvalgt fra gruppen N, O og S;

(C1-C16)-alkyl, som er forgrenet eller ikke-forgrenet.

3.

Forbindelse med formel I ifølge krav 1 eller 2, karakterisert ved at

Y har betydningen OH, SH, OAc eller SAc, hvor Ac=(C1-C3)-acyl, evt. 1 til 3 ganger umettet,

R' står for aryl med 6-14 C-atomer,

heteroaryl med 3 til 6 C-atomer og opptil tre heteroatomer utvalgt fra gruppen N, O og S;

(C1-C8)-alkyl, forgrenet eller uforgrenet,

W har betydningen en 5'-, 3'- eller 2' nukleosid-analog.

4.

Forbindelse med formel I ifølge et eller flere av kravene 1 til 3, karakterisert ved at

Y står for betydningen OH,

R' står for aryl med 6 C-atomer,

heteroaryl med 3 til 6 C-atomer og opptil tre heteroatomer utvalgt fra gruppen N, O og S;

(C1-C8)-alkyl, forgrenet eller ikke-forgrenet,

W har betydningen en 5'- eller 3' nukleosid-analog.

5.

Forbindelse med formel I ifølge et eller flere av kravene 1 til 4, karakterisert ved at

Y har betydningen OH,

W har betydningen en 5'- eller 3' nukleotsid-analog,

R har betydningen for W eller (C1-C4)-alkyl, som er forgrenet eller uforgrenet,

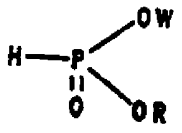
R' står for aryl med 6 C-atomer, evt. substituert med opptil 3 av hverandre uavhengige rester utvalgt fra gruppen

Cl, NO_2, CN, (C1-C3)-alkoksy, amino og (C1-C3)-alkylamino.

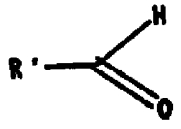
6.

Fremgangsmåte for fremstilling av forbindelser ifølge et eller flere av kravene 1 til 5, karakterisert ved at

a) en forbindelse med formelen III blir omsatt med en forbindelse med formelen IV,



(III)



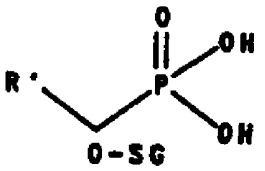
(IV)

eller at

b) en forbindelse med formelen V i ønsket rekkefølge og under anvendelse av et kondensasjonsmiddel blir omsatt med forbindelser med formelen VI,

eller at

c) en forbindelse med formelen V i ønsket rekkefølge og under anvendelse av et kondensasjonsmiddel blir omsatt med forbindelser med formelen VI og formelen VII,



WOH

ROH

(V) (VI) (VII)

hvor SG står for en beskyttelsesgruppe, som evt. i forbindelse med formel I blir avspaltet,

eller en nukleotidenhet med 3'(2')-terminal H-fosfonatgruppering og beskyttet 5'-hydroksygruppe med en ytterligere nukleotidenhet med frie 5'-hydroksygrupper og beskyttet 3'(2')-hydroksygruppe i nærvær av et aktiveringsmiddel til H-fosfosfonatdinukleosid og kondenserer dette med et aldehyd til dinukleosid-_-hydroksyalkyl(aryl)-fosfonat, som etter omsetning til deres aktivere derivater med ytterligere (oligo)-nukleotidfragmenter reagerer til oligonukleotider, hvorved temporært innførte beskyttelsesgrupper blir avspaltet, eller at

a) en nukleotidenhet med 3'(2')-terminal fosfor(III)- eller fosfor(V)-gruppering blir omsatt med en fri 5'-hydroksygruppe av en ytterligere nukleotidenhet hhv. voksende oligonukleotidkjede i nærvær av et kondensasjonsmiddel eller

b) det aktiverte derivater, eller at

oligonukleotidanaloger i fragmenter blir oppbygget på lik måte, i de ifølge a) eller b) fremstilte oligonukleotiden blir temperært innførte beskyttelsesgrupper for beskyttelse av andre grupper avspaltet, og de således fremstilte oligonukleotid-analoger med formel I, hvor W er en rest med formelen II og R er en rest med formel II', eventuelt blir overført til deres fysiologisk akseptable salter.

7.

Legemiddel, k a r a k t e r i s e r t v e d at det inneholder en eller flere forbindelser med formel I ifølge et eller flere av kravene 1 til 5.

8.

Anvendelse av forbindelse med formel I ifølge et eller flere av kravene 1 til 5, for fremstilling av legemidler med en promedikamentfunksjon.