

Foreliggende oppfinnelse vedrører nye oligonukleotidanaloger med verdifulle fysiske, biologiske og farmakologiske egenskaper, fremgangsmåte for deres fremstilling samt ulike anvendelser av nevnte oligonukleotidanaloger.

- 5 Oligonukleotider finner i økende grad anvendelse som inhibitorer for genekspressjon (J.F. Milligan, M.D. Matteucci og J.C. Martin, *J. Med. Chem.*, 36 (1993) 1923; E. Uhlmann og A. Peyman, *Chemical Reviews*, 90 (1990) 543; S.T. Crooke, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 32 (1992) 329).
- 10 Antisensoligonukleotider er nukleinsyrefragmenter hvis basesekvens er komplementær til et mRNA som skal inhiberes. Dette mål-mRNA kan være av cellulært, viralt eller forøvrigt patogent opphav. Eksempler på cellulære målsekvenser er reseptorer, enzymer, vekstfaktorer, immunmodulatorer, ionekanaler og onkogener. Inhiberingen av virusreplikasjon ved hjelp av antisens-oligonukleotider er eksempelvis beskrevet for
- 15 RSV (Rous sarkomavirus), HSV-1 og -2 (Herpes simplexvirus, type I og II), HIV (humant immunsviktvirus) og influensa-vira. I dette tilfellet anvendes oligonukleotider som er komplementære til den virale nukleinsyre.

- Sekvensen til sensoligonukleotider er derimot utformet slik at de eksempelvis binder
- 20 nukleinsyre-bindende proteiner eller nuklein-prosesserende enzymer ("innfanger" disse) og på denne måten inhiberer deres biologiske aktivitet (C. Hélène og J.J. Toulmé, *Biochim. Biophys. Acta* 1049 (1990) 99). Som virale mål kan her eksempelvis nevnes reverstranskriptase, DNA-polymerase og transaktivatorproteiner. Tripleks-dannende oligonukleotider har generelt DNA som mål og danner etter binding til denne en
- 25 trippelheliksstruktur.

- Ved hjelp av antisensoligonukleotidene inhiberes prosesseringen (Splicing osv.) av mRNA eller dets translasjon til protein, mens trippelheliksdannende oligonukleotider inhiberer transkripsjonen eller replikasjonen av DNA (N.T. Thuong og C. Hélène,
- 30 *Angew. Chem.*, 105 (1993) 697; Uhlmann og Peyman, *Chemical Reviews*, 90 (1990) 543). Det er imidlertid også mulig å binde enkeltkjadede nukleinsyrer til et antisens-oligonukleotid i en første hybridisering under dannelse av en dobbeltkjede, som så sanner en tripleks struktur i en andre hybridisering med et tripleks-dannende oligonukleotid. Antisens- og tripleks-bindingsområdene kan derved enten være
- 35 inneholdt i to separate oligonukleotider eller i et oligonukleotid.

En ytterligere anvendelse av syntetiske oligonukleotider er de såkalte ribozymene som

ødelegger mål-RNA som en konsekvens av deres ribonuklease-aktivitet (D. Castanotto, J.J. Rossi, J.O. Deshler, *Critical Rev. Eukar. Gene Expr.*, 2 (1992) 331).

5 Innen DNA-diagnostikk anvendes nukleinsyrefragmenter med egnet merking som såkalte DNA-prober for spesifikk hybridisering til den nukleinsyre som skal påvises. Den spesifikke dannelsen av den nye dobbeltkjeden følges således ved hjelp av merkingen, som fortrinnsvis ikke er radioaktiv. På denne måten kan genetiske, ondartede, virale eller andre patogen-forårsakede sykdommer påvises.

10 For de fleste av de nevnte anvendelser er oligonukleotider i deres naturlig forekommende form lite egnede eller fullstendig uegnede. De må bli kjemisk modifisert på en slik måte at de tilfredsstiller de spesielle kravene. For at oligonukleotider skal kunne anvendes i biologiske systemer, eksempelvis for inhibering av virusreplikasjon, må de oppfylle følgende krav:

- 15
1. De må under in vivo-betingelser, dvs. så vel i serum som også intracellulært, oppvise en tilstrekkelig høy stabilitet.
 2. De må være slik beskaffet at de kan passere gjennom cellen og nukleusmembranen.
 3. De må under fysiologiske betingelser, på base-spesifikk måte, binde deres mål-nukleinsyre, for å fremvise den inhibitoriske effekten.

20

For DNA-prober er disse forutsetningene ikke absolutte; imidlertid må disse oligonukleotidene være avledet på en slik måte at en påvisning, eksempelvis ved hjelp av fluorescens, kjemiluminescens, kolorimetri eller spesifikk farging, er mulig (Beck og Köster, *Anal. Chem.*, 62 (1990) 2258).

25

Det er kjent et stort antall kjemiske variasjoner av oligonukleotider som er syntetisert for det formål å bedre oppfylle de ovenfor angitte kravene enn de ikke-modifiserte oligo-nukleotidene. Den kjemiske modifiseringen av oligonukleotidene blir normalt utført ved passende modifisering av fosfat-ryggraden, ribose-enheten eller nukleobasene (Uhlmann og Peyman, *Chemical Review*, 90 (1990) 543). Modifikasjonene inkluderer også de hvor både fosfat-broen og sukkerenheten er blitt erstattet med andre grupper, eksempelvis med "morfolinonukleosid"-oligomerer (E.P. Stirchak et al., *Nucleic Acids Res.* 17 (1989) 6129) eller "PNA'er" (P.E. Nielsen et al., *Bioconj. Chem.* 5 (1994) 3). PNA'er skiller seg spesielt ut ved uvanlig høye affiniteter til mål-RNA, men har andre ugunstige egenskaper som manglende oppløselighet eller manglende cellepenetrasjonsevne (W. Wang et al., *Tetrahedron Letters*, 36 (1995) 1181; M. Egholm et al. i "Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis, Peptides,

30

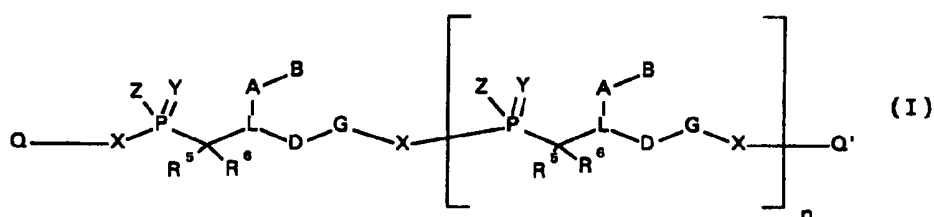
35

Proteins, Nucleic Acids", Roger Epton, red. Mayflower Worldwide Limited, Birmingham, 1994, 145-148).

Målet er følgelig å finne nye oligonukleotidanaloger som har gunstige egenskaper.

5

Et første aspekt ved fopreliggende oppfinnelse vedrører forbindelser som er kjennetegnet ved formel (I)



hvor

10 n betyr et tall fra 0 til 100;

B betyr uavhengig av hverandre hydrogen, hydrokxy, (C₁–C₂₀)-alkyl, (C₁–C₂₀)-alkoksy, (C₁–C₂₀)-alkyltio, (C₆–C₂₀)-aryl, (C₆–C₂₀)-aryl-(C₁–C₆)-alkyl, (C₆–C₂₀)-aryl-(C₁–C₆)-alkoksy, (C₆–C₂₀)-aryl-(C₁–C₆)-alkyltio, en

15 aromatisk gruppe eller en heterocyklisk gruppe, hvorved alkyl, aryl og/eller de aromatiske eller heterocykliske gruppene eventuelt kan være substituert en eller flere ganger med hydrokxy, (C₁–C₄)-alkoksy, -NR⁹R¹⁰, -C(O(OH)), okso, -C(O)OR⁸, -C(O)NR⁹R¹⁰, -CN, -F, -Cl, -Br, -NO₂, (C₂–C₆)-alkoksyalkyl, -S(O)_mR⁸, -(C₁–C₆)-alkyl-S(O)_mR⁸, -NHC(=NH)NHR⁸, -C(=NH)NHR⁸,

20 -NR⁹C(=O)R⁸, =NOR⁸, NR⁹C(=O)OR¹⁰, -OC(=O)NR⁹R¹⁰ og -NR⁹C(=O)NR⁹R¹⁰, eller

B står uavhengig av hverandre for en naturlig nukleobase, en unaturlig nukleobase eller en reporterligand;

25

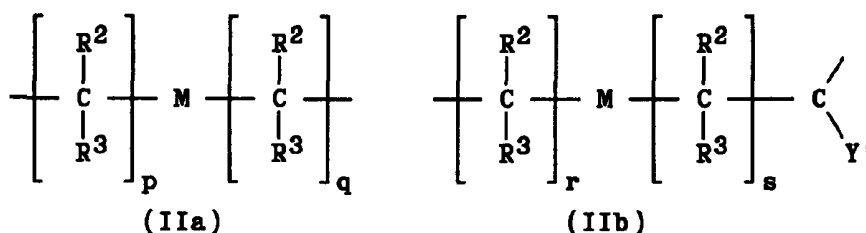
A-B kan også stå for en over karboksylgruppen påkondensert D- eller L-aminosyre eller for peptider bestående av disse aminosyrene med inntil en lengde på 5 aminosyrerester,

30 L står uavhengig av hverandre for N eller R¹N⁺, og

R¹ står for hydrogen eller (C₁–C₆)-alkyl, som kan være substituert med hydrokxy,

(C₁–C₆)-alkoksy, (C₁–C₆)-alkyltio eller amino, fortrinnsvis hydrogen eller metyl;

- 5 A betyr uavhengig av hverandre en enkeltbinding, en metylengruppe eller en gruppe med formel (IIa) eller (IIb);



- Y' står for =O, =S, =CH₂, =C(CH₃)₂ eller =NR¹, hvorved R¹ er som definert ovenfor;
- 10 M står for en enkeltbinding, -O-, -S- eller -NR¹-, hvorved R¹ er som definert ovenfor;

- R² og R³ står uavhengig av hverandre for hydrogen, hydroksey, (C₁–C₆)-alkoksy, (C₁–C₆)-alkyltio, amino, halogen, som F, Cl, Br eller (C₁–C₆)-alkyl, som eventuelt kan være substituert med hydroksey, (C₁–C₆)-alkoksy eller (C₁–C₆)-alkyltio, men er fortrinnsvis hydrogen;
- 15

p og q står uavhengig av hverandre for 0 til 5;

- 20 r og s står uavhengig av hverandre for 0 til 5;

D og G står uavhengig av hverandre for CR⁵R⁶;

- R⁵ og R⁶ står uavhengig av hverandre for hydrogen, (C₁–C₆)-alkyl, (C₆–C₂₀)-aryl, (C₆–C₂₀)-aryl-(C₁–C₆)-alkyl, hydroksey, (C₁–C₆)-alkoksy, (C₁–C₆)-alkyltio, og alkyl og aryl kan eventuelt være substituert med SR¹ eller NR¹R^{1'}, hvorved R¹ er som definert ovenfor og R^{1'} har uavhengig av R¹ samme betydning som R¹, R⁵ og R⁶ er imidlertid fortrinnsvis hydrogen;
- 25

- 30 X står for -O-, -S- eller -NR¹-, hvori R¹ er som definert ovenfor;

- Y står for =O eller =S;
- Z står for -OR⁸, -NR⁹R¹⁰ eller X'Q", hvorved X' er definert som X og Q" er definert som Q;
- 5 R⁸ betyr hydrogen, (C₁-C₁₈)-alkyl, (C₂-C₁₈)-alkenyl, (C₃-C₁₈)-alkinyl, (C₆-C₁₂)-aryl, (C₆-C₁₂)-aryl-(C₁-C₆)-alkyl, hvorved alkyl kan være substituert en eller flere ganger med hydroksy, (C₁-C₄)-alkoksy, F, Cl, Br og aryl kan være substituert 1-3 ganger med hydroksy, (C₁-C₄)-alkoksy, (C₁-C₄)-alkyl, F, Cl, Br, NO₂, -NR⁹R¹⁰, -C(O)OH, -C(O)O-(C₁-C₈)-alkyl,
- 10 -C(O)NR⁹R¹⁰, men står fortrinnsvis for hydrogen, (C₁-C₆)-alkyl, (C₆-C₁₂)-aryl eller (C₆-C₁₂)-aryl-(C₁-C₆)-alkyl, hvorved aryl kan være enkelt substituert med (C₁-C₄)-alkoksy, (C₁-C₄)-alkyl, F, Cl, Br, NO₂, men betyr spesielt foretrukket hydrogen, (C₁-C₆)-alkyl, fenyl eller 2-(4-nitrofenyl)etyl;
- 15 R⁹ og R¹⁰ står uavhengig av hverandre for hydrogen, (C₁-C₁₈)-alkyl, (C₁-C₁₈)-alkenyl, (C₁-C₁₈)-alkinyl, (C₆-C₁₂)-aryl, (C₆-C₁₂)-aryl-(C₁-C₆)-alkyl, hvorved alkyl kan være substituert en eller flere ganger med hydroksy, (C₁-C₄)-alkoksy, F, Cl, Br, eller R⁹ og R¹⁰ kan sammen med N-atomet som bærer dem danne en 4- til 7-leddet ring;
- 20 hvorved aromatiske grupper og C₆-C₂₀-arylgrupper er valgt fra gruppen bestående av: fenyl, naftyl, pyrenyl, antracenyl, fenantryl, bifenyl, binaftyl, tetracenyl, pentacenyl, heksacenyl, trifenylenyl, krysenyl eller benzopyrenyl;
- 25 Q og Q' betyr uavhengig av hverandre hydrogen eller R⁸, eller står for konjugater som gunstig påvirker egenskapene for antisens-oligonukleotider eller av trippelheliksdannende oligonukleotider eller tjener som markør for en DNA-probe eller som ved hybridisering av oligonukleotidanalogen til målnukleinsyren angriper denne ved dannelse av binding eller tverrbinding, eller betyr oligonukleotider som kan være
- 30 umodifiserte eller modifiserte.

Følgende varianter er eksempler på noen modifikasjoner (f.eks. beskrevet i E. Uhlmann og A. Peyman, Chemical Reviews, 90 (1990) 543; "Protocols for Oligonucleotides and Analogs", Synthesis and Properties Synthesis and Analytical Techniques, S. Agrawal, red., Humana Press, Totowa, USA, 1993):

35

- a) fullstendig eller delvis erstatning av 3'- og/eller 5'-fosforsyrediester-broer, eksempelvis ved fosforotioat-, fosforoditioat-, $\text{NR}^4\text{R}^{4'}$ -fosforamidat-, boranofosfat-, fosfat-($\text{C}_1\text{--C}_{21}$)-O-alkylester, fosfat-[($\text{C}_6\text{--C}_{12}$)-aryl-($\text{C}_1\text{--C}_{21}$)-O-alkyl]ester, 2,2,2-triklordimetyletylfosfonat-, ($\text{C}_1\text{--C}_8$)-alkylfosfonat- eller ($\text{C}_6\text{--C}_{12}$)-arylfosfonat-broer, hvorved R^4 og $\text{R}^{4'}$ uavhengig av hverandre står for hydrogen, ($\text{C}_1\text{--C}_{18}$)-alkyl, ($\text{C}_6\text{--C}_{20}$)-aryl, ($\text{C}_6\text{--C}_{14}$)-aryl-($\text{C}_1\text{--C}_8$)-aryl eller $-(\text{CH}_2)_c\text{--}[\text{NH}(\text{CH}_2)_c]_d\text{--NR}^7\text{R}^7$, hvor c er et helt tall fra 2 til 6 og d er et helt tall fra 0 til 6, og R^7 betyr uavhengig av hverandre hydrogen, ($\text{C}_1\text{--C}_6$)-alkyl eller ($\text{C}_1\text{--C}_4$)-alkoksy- ($\text{C}_1\text{--C}_6$)-alkyl, fortrinnsvis står R^4 og $\text{R}^{4'}$ for hydrogen, ($\text{C}_1\text{--C}_8$)-alkyl eller metoksyetyl, spesielt foretrukket for hydrogen, ($\text{C}_1\text{--C}_4$)-alkyl eller metoksyetyl eller R^4 og $\text{R}^{4'}$ kan også sammen med nitrogenatomet som bærer dem danne en 5-6-leddet heterocyklisk ring, som i tillegg kan inneholde et ytterligere heteroatom fra rekken O, S, N;
- b) fullstendig eller delvis erstatning av 3'- eller 5'-fosforsyrediester-broene ved "defosfo"-broer (se f.eks. Uhlmann og Peyman i "Methods in Molecular Biology", bind 20, "Protocols for Oligonucleotides and Analogs", S. Agrawal, red., Humana Press, Totowa 1993, kap. 16, 355ff), eksempelvis ved formacetal, 3'-trioformacetal, metylhydroksylamin, oksim, metylendimetylhydrazo, dimetylsulfon eller silylgrupper;
- c) fullstendig eller delvis erstatning av sukkerfosfat-ryggraden, eksempelvis ved hjelp av "morfolinonukleosid"-oligomerer (E.P. Stirchak et al., Nucleic Acids Res., 17 (1989) 6129) eller "PNA'er" (P.E. Nielsen et al., Bioconj. Chem. 5 (1994) 3), eller PNA-DNA-hybrider som eksempelvis beskrevet i DE-P 44 08 528.1 henholdsvis EP-A 0 672 677 (HOE 94/F 057);
- d) fullstendig eller delvis erstatning av β -D-2'-desoksyribose-enheten, eksempelvis med β -D-2'-desoksyribose, L-2'-desoksyribose, 2'-F-2'-desoksyribose, 2'-O-($\text{C}_1\text{--C}_6$)-alkyl-ribose, 2'-O-($\text{C}_2\text{--C}_6$)-alkenyl-ribose, 2'- NH_2 -2'-desoksyribose, β -D-xylofuranose, β -arabinofuranose, 2,4-dideoksy- β -D-erythrohekso-pyranose, og karbocykliske (f.eks. Froehler, J. Am. Chem. Soc., 114 (1992) 8320) og åpenkjedede sukkeranaloger (f.eks. Vandendriessche et al., Tetrahedron, 49 (1993) 7223) eller bicyklo-sukkeranaloger (f.eks. M. Tarkov et al., Helv. Chim. Acta, 76 (1993) 481);

- e) fullstendig eller delvis erstatning av de naturlige nukleosid-basene, eksempelvis med 5-(hydroksymetyl)uracil, 5-aminouracil, pseudouracil, dihydrouracil, 5-(C₁-C₆)-alkyl-uracil, 5-(C₂-C₆)-alkenyl-uracil, 5-(C₂-C₆)-alkinyl-uracil (eksempelvis beskrevet i Gutierrez et al., J. Am. Chem. Soc., 116 (1994) 540 eller Sagi et al., Tetrahedron Lett., 34 (1993) 2191), 5-(C₁-C₆)-alkyl-cytosin, 5-(C₂-C₆)-alkenyl-cytosin, 5-(C₂-C₆)-alkinyl-cytosin (Gutierrez et al., J. Am. Chem. Soc., 116 (1994) 540 eller Sagi et al., Tetrahedron Lett., 34 (1993) 2191), 5-fluoruracil, 5-fluorcytosin, 5-kloruracil, 5-klorcytosin, 5-bromuracil, 5-bromcytosin eller 7-deaza-7-substituerte puriner (eksempelvis beskrevet i Seela, Nucl. Acids. Res. 20 (1992) 2297; Heterocycles 34 (1992) 229).

- Q og Q' kan også stå for konjugater som i gunstig retning påvirker egenskapene av antisens-oligonukleotider eller av trippelheliks-dannende oligonukleotider (som eksempelvis cellepenetrering, nukleasenedbrytning, affinitet til mål-RNA/DNA, farmakokinetikk) eller tjene som merking av en DNA-probe eller ved hybridiseringen av oligonukleotidanalogen til mål-nukleinsyren angripe denne med binding eller tverring. Eksempler på dette er konjugater med poly-lysin, med interkalatorer som pyren, akridin, fenacin, fenantridin, med fluorescerende forbindelser som fluorescein, med tverringbindere som psoralen, azidoproflavin, med lipofile molekyler som (C₁₂-C₂₀)-alkyl, med lipider som 1,2-di-heksadecyl-rac-glycerin, med steroider som kolesterol eller testosteron, med vitaminer som vitamin E, med poly- hhv. oligoetylglykol, med (C₁₂-C₁₈)-alkyl-fosfatdiesterer, med -O-CH₂-CH(OH)-O-(C₁₂-C₁₈)-alkyl. Foretrukket er konjugater med lipofile molekyler som (C₁₂-C₂₀)-alkyl, med steroider som kolesterol eller testosteron, med poly- eller oligoetylglykol, med vitamin E, med interkalatorer som pyren, med (C₁₄-C₁₈)-alkyl-fosfatdiesterer, med -O-CH₂-CH(OH)-O-(C₁₂-C₁₆)-alkyl. Fremstillingen av slike oligonukleotidkonjugater er kjente for fagmannen (se f.eks. Uhlmann & Peyman, Chem. Rev., 90 (1990) 543; M. Manoharan i "Antisense Research and Applications", Crooke og Lebleu, red., CRC Press, Boca Raton, 1993, kap. 17, s. 303ff og EP-A 0 552 766). Videre kan oligonukleotidene ved 3'- eller ved 5'-enden bære 3'-3'- og 5'-5'-inversjoner (beskrevet eksempelvis i M. Koga et al., J. Org. Chem., 56 (1991) 3757).

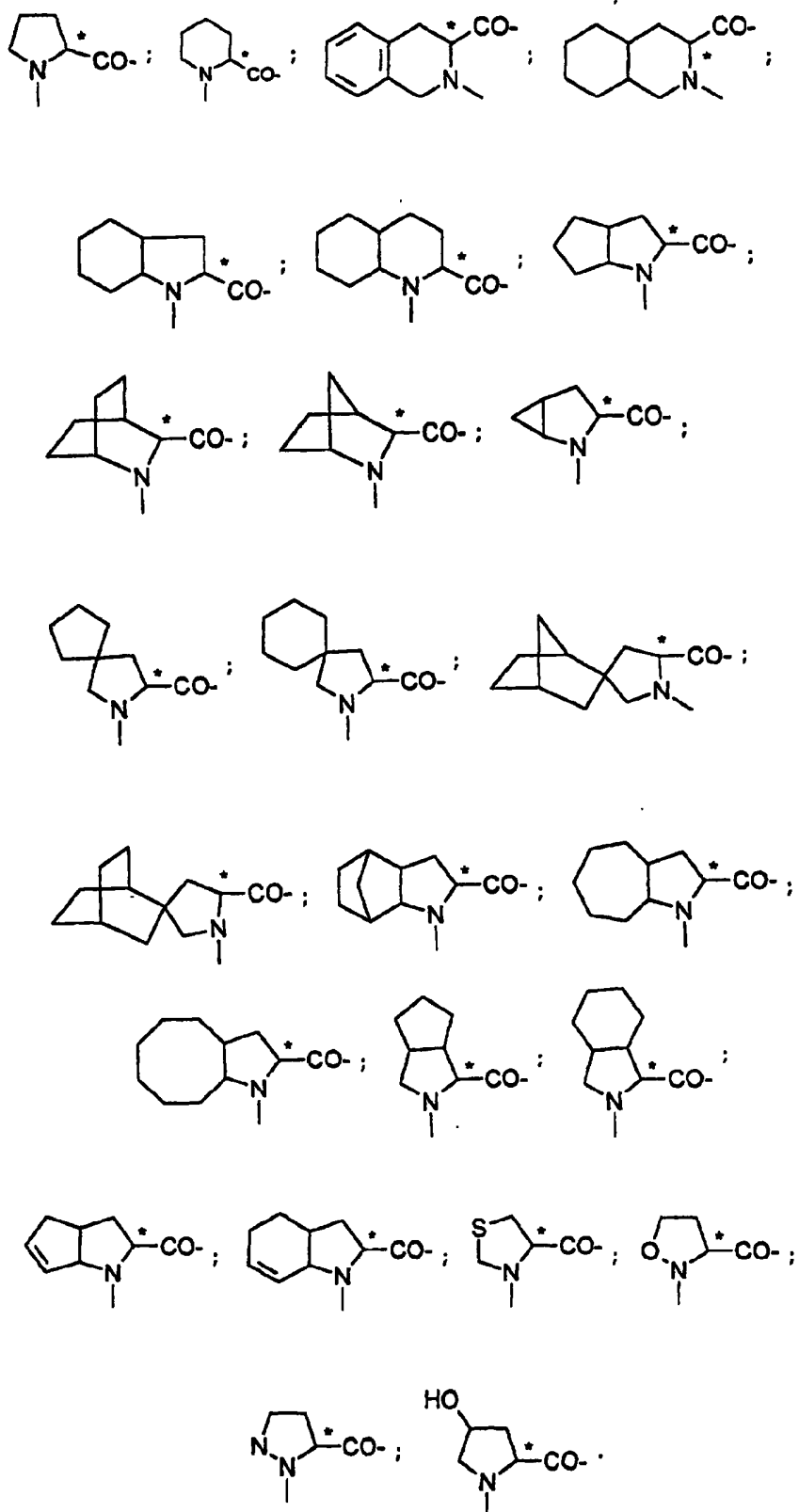
- Aromatiske grupper er eksempelvis fenyl, naftyl, pyrenyl, antraceny, fenantryl, bifenyl, binaftyl, tetraceny, pentaceny, heksaceny, trifenylenyl, krysenyl eller benzopyrenyl.

- Under heterocykliske grupper forstås eksempelvis kromanyl, kromenylium-1-yl, furanyl, isokromanyl, isokromenyl, isokinolyl, piperazinyl, kinoliny, pyridinyl,

- pyrrolidinyl, imidazyl, tetrahydrofuranlyl, aziranyl, oksiranyl, tiofenyl, pyrimidinyl, tielanyl, tiazolyl, azepinyl, pyrrolyl, tetrahydropyrrolol, benzofuranlyl, indolyl, isoindolyl, isatinyll, dioksindolyl, indoksylyl, koumarinyl, koumaronyl, karbazolyl, pyrazolyl, pyrrolyl, indazolyl, oksazolyl, isoksazolyl, tiazolyl, 1,2,4-triazolyl, 1,2,3-triazolyl, tetrazolyl, pentazolyl, piperidinyl, pyradizinyl, fenazinyl, fenoksazinyl, fenotiazinyl, morfolinyl, tiazinyl, benzodiazepinyl, purinyl, xantinyll, hypoxantinyll, teofyllinyl, teobrominyl, koffeinyll, pteridinyl, pterinyl, pteridinyl, allokazinyll og nortropinyl.
- 5
- 10 Under naturlige nukleobaser forstås f.eks. uracil, cytosin, 5-metyluracil, adenin og guanin og under unaturlige nukleobaser forstås f.eks. 5-nitroindol, 5-(hydroksymetyl)-uracil, 5-aminouracil, pseudouracil, dihydrouracil, 5-(C₁-C₆)-alkyl-uracil, 5-(C₂-C₆)-alkenyl-cytosin, 5-(C₃-C₆)-alkinyl-cytosin, 5-fluoruracil, 5-fluorcytosin, 5-kloruracil, 5-klorcytosin, 5-bromuracil, 5-bromcytosin og 7-deaza-7-substituerte puriner, som 7-deaza-7-(C₃-C₇)-alkinylguanin, 7-deaza-7-(C₃-C₇)-alkinyladenin, 7-deaza-7-(C₂-C₇)-alkenylguanin, 7-deaza-7-(C₂-C₇)-alkenyladenin, 7-deaza-7-(C₁-C₇)-alkylguanin, 7-deaza-7-(C₁-C₇)-alkyladenin, 7-deaza-7-bromguanin og 7-deaza-7-bromadenin.
- 15
- 20 Fortrinnsvis står unaturlige nukleobaser for 5-(C₁-C₆)-alkyl-uracil, 5-(C₂-C₆)-alkenyl-uracil, 5-(C₃-C₆)-alkinyl-uracil, 5-(C₁-C₆)-alkyl-cytosin, 5-(C₂-C₆)-alkenyl-cytosin, 5-(C₃-C₆)-alkinyl-cytosin, 5-fluoruracil, 5-fluorcytosin, 5-kloruracil, 5-klorcytosin, 5-bromuracil, 5-bromcytosin eller 7-deaza-7-substituerte puriner, som 7-deaza-7-(C₃-C₇)-alkinylguanin, 7-deaza-7-(C₃-C₇)-alkinyladenin, 7-deaza-7-(C₂-C₇)-alkenylguanin, 7-deaza-7-(C₂-C₇)-alkenyladenin, 7-deaza-7-(C₁-C₇)-alkylguanin, 7-deaza-7-(C₁-C₇)-alkyladenin, 7-deaza-7-bromguanin og 7-deaza-7-bromadenin, spesielt foretrukket for 5-(C₃-C₆)-alkyl-uracil, 5-(C₂-C₆)-alkenyl-uracil, 5-(C₃-C₆)-alkinyl-uracil, 5-(C₁-C₆)-alkyl-cytosin, 5-(C₂-C₆)-alkenyl-cytosin, 5-(C₃-C₆)-alkinyl-cytosin eller 7-deaza-7-substituerte puriner, og helt spesielt
- 25
- 30 foretrukket for 5-pentinyllcytosin, 5-heksinylluracil, 5-heksinyllcytosin, 7-deaza-7-propinyllguanin, 7-deaza-7-propinylladenin, 7-deaza-7-metyllguanin, 7-deaza-7-metylladenin, 7-deaza-7-propinylladenin, 7-deaza-7-bromguanin, 7-deaza-7-bromadenin.
- 35
- Reporterligander er eksempelvis fluorescein, biotin, akridin, fenantrolin, fenantridin og eosin.

Under D- eller L-aminosyrer er, dersom ikke annet er angitt, spesielt følgende nevnt (kfr. Schröder, Lübke, Peptides, bind 1, New York 1965, sidene XXII-XXIII; Houben-Weyl, Methoden der Organischen Chemie, bind XV/1 og 2, Stuttgart 1974):

- 5 Aad, Abu, _Abu, Abz, 2ABz, _Aca, Ach, Acp, Adpd, Ahb, Aid, β Aib, Ala, β Ala, _Ala, Alg, All, Ama, Amt, Ape, Apm, Apr, Arg, Asn, Asp, Asu, Aze, Azi, Bai, Bph, Can, Cit, Cys, Cyta, Daad, Dab, Dadd, Dap, Dapm, Dasu, Djen, Dpa, Dtc, Fel, Gln, Glu, Gly, Guv, hAla, hArg, hCys, hGln, Hglu, His, hIle, hLeu, hLys, hMet, hPhe, hPro, hSer, hThr, hTrp, hTyr, Hyl, Hyp, 3Hyp, Ile, Ise, Iva, Kyn, Lant, Lcn, Leu, Lsg, Lys, β Lys,
- 10 _Lys, Met, Mim, Min, hArg, Nle, Nva, Oly, Orn, Pan, Pec, Pen, Phe, Phg, Pic, Pro, _Pro, Pse, Pya, Pyr, Pza, Qin, Ros, Sar, Sec, Sem, Ser, Thi, β Thi, Thr, Thy, Thx, Tia, Tle, Tly, Trp, Trta, Tyr, Val, osv. hvis forkortelse uten en stereodeskriptor står for restene i L-formen, eller også cycliske aminosyrer, som f.eks.
- 15 pyrrolidin-2-karboksylysyre;
piperidin-2-karboksylysyre;
1,2,3,4-tetrahydroisokinolin-3-karboksylysyre;
decahydroisokinolin-3-karboksylysyre;
oktahydroindol-2-karboksylysyre;
- 20 decahydrokinolin-2-karboksylysyre,
oktahydrocyklopenta[b]pyrrol-2-karboksylysyre;
2-azabicyklo[2.2.2]oktan-3-karboksylysyre; 2-azabicyklo[2.2.1]heptan-3-karboksylysyre;
2-azabicyklo[3.1.0]heksan-3-karboksylysyre;
2-azaspiro[4.4]nonan-3-karboksylysyre;
- 25 2-azaspiro[4.5]decan-3-karboksylysyre;
spiro[(bicyklo[2.2.1]heptan)-2,3-pyrrolidin-5-karboksylysyre];
spiro[(bicyklo[2.2.2]oktan)-2,3-pyrrolidin-5-karboksylysyre];
2-azatricyklo[4.3.0.1^{6,9}]decan-3-karboksylysyre;
decahydrocyklohepta[b]pyrrol-2-karboksylysyre;
- 30 decahydrocyklookta[b]pyrrol-2-karboksylysyre;
oktahydrocyklopenta[c]pyrrol-2-karboksylysyre;
oktahydroisoindol-1-karboksylysyre;
2,3,3a,4,6a-heksahydrocyklopenta[b]pyrrol-2-karboksylysyre;
2,3,3a,4,5,7a-heksahydroindol-2-karboksylysyre;
- 35 tetrahydrothiazol-4-karboksylysyre;
isoksazolidin-3-karboksylysyre; pyrazolidin-3-karboksylysyre;
hydroksypyrrolidin-2-karboksylysyre; som alle eventuelt kan være substituerte:



US-A 4 344 949, US-A 4 374 847, US-A 4 350 704, EP-A 29 488, EP-A 31 741, EP-A 49 605, EP-A 49 658, EP-A 50 800, EP-A 51 020, EP-A 52 870, EP-A 84 164, EP-A 89 637, EP-A 90 341, EP-A 90 362, EP-A 105 102, EP-A 109 020, EP-A 111 873, EP-A 271 865 og EP-A 344 682.

5

Alkyl og derav avledede rester som eksempelvis alkoksy og alkyltio kan være forgrenede, uforgrenede eller cykliske, mettede eller en- eller fler umettede.

Foretrukket er forbindelser med formel I, hvori

10 n betyr et tall fra 0 til 50;

B står uavhengig av hverandre for en naturlig nukleobase eller en unaturlig nukleobase;

15 L betyr N;

A betyr en gruppe med formel IIb, hvori
 $r = 1$ og $s = 0$, og R^2 , $R^3 = H$ og $Y^* = O$ og M en enkeltbinding;

20 D og G betyr avhengig av hverandre CHR^5 ;

R^5 står for hydrogen;

X betyr -O-;

25

Y betyr =O;

Z står for hydroksy, metoksy, etoksy, (4-nitrofenol)etoksy, propoksy, isopropoksy, butoksy, pentoksy, fenoksy eller allyloksy;

30

Q og Q' står uavhengig av hverandre for hydrogen, R^8 eller for oligonukleotider som kan være umodifiserte og modifiserte, hvorved

a) 3'- og/eller 5'-fosforsyrediester-broene helt eller delvis er erstattet med
 35 fosforotioat-, fosforoditioat-, NR^4R^4 -fosforamidat-, $N3'_P5'$ -fosforamidat (eksempelvis beskrevet i Gryaznov et al., J. Am. Chem. Soc., 116 (1994) 3143), fosfat-O-metylester-, fosfat-O-etylester-, fosfat-O-isopropylester-, metylfosfonat-

eller fenyfosfonat-broer;

- 5 b) en, to eller tre 3'- eller 5'-fosforsyrediester-broer på pyrimidin-posisjonene og ved 5'-enden og/eller ved 3'-enden er erstattet med formacetal og/eller 3'-tioformacetal;
- c) sukkerfosfat-ryggraden er helt eller delvis erstattet med "PNA'er" eller PNA-DNA-hybrider;
- 10 d) β -D-2'-desoksyribose-enhetene er helt eller delvis erstattet med 2'-F-2'-desoksyribose, 2'-O-(C₁-C₆)-alkyl-ribose, 2'-O-(C₂-C₆)-alkenyl-ribose, 2'-NH₂-2'-desoksyribose;
- 15 e) de naturlige nukleosid-basene er helt eller delvis erstattet med 5-(C₁-C₆)-alkyl-uracil, 5-(C₂-C₆)-alkenyl-uracil, 5-(C₂-C₆)-alkinyl-uracil, 5-(C₁-C₆)-alkyl-cytosin, 5-(C₂-C₆)-alkenyl-cytosin, 5-(C₂-C₆)-alkinyl-cytosin, 5-fluoruracil, 5-fluorcytosin, 5-kloruracil, 5-klorcytosin, 5-bromuracil, 5-bromcytosin, 7-deaza-7-(C₂-C₇)-alkinylguanin, 7-deaza-7-(C₂-C₇)-alkinyladenin, 7-deaza-7-(C₂-C₇)-alkenylguanin, 7-deaza-7-(C₂-C₇)-alkenyladenin, 7-deaza-7-(C₁-C₇)-alkylguanin, 7-deaza-7-(C₁-C₇)-alkyladenin, 7-deaza-7-bromguanin, 7-deaza-7-bromadenin.
- 20

Spesielt foretrukket er forbindelser med formel I, hvori

n betyr et tall fra 0 til 30;

25

Q og Q' står uavhengig av hverandre for hydrogen, R⁸, hvori R⁸ står for H, (C₁-C₆)-alkyl, fenyl eller 2-(4-nitrofenyletyl), eller står for oligonukleotider som kan være umodifiserte og modifiserte, hvorved

30

a) 3'- og/eller 5'-fosforsyrediester-broene er helt eller delvis erstattet med fosfortioat-, fosforoditioat- eller metylfosfonat-broer;

b) en, to eller tre 3'- eller 5'-fosforsyrediester-broer ved 5'-enden og ved 3'-enden er erstattet;

35

c) sukkerfosfat-ryggraden er helt eller delvis erstattet med "PNA'er" eller PNA-DNA-hybrider;

- d) β -D-2'-desoksyribose-enhetene er helt eller delvis erstattet med 2'-F-2'-desoksyribose, 2'-O-(C₁-C₄)-alkyl-ribose, 2'-O-(C₂-C₄)-alkenyl-ribose, 2'-NH₂-2'-desoksyribose;
- 5
- e) de naturlige nukleosid-basene er fullstendig eller delvis erstattet med 5-(C₃-C₆)-alkyl-uracil, 5-(C₂-C₆)-alkenyl-uracil, 5-(C₂-C₆)-alkinyl-uracil, 5-(C₁-C₆)-alkyl-cytosin, 5-(C₂-C₆)-alkenyl-cytosin, 5-(C₂-C₆)-alkinyl-cytosin, 7-deaza-7-(C₂-C₇)-alkinylguanin, 7-deaza-7-(C₂-C₇)-alkinyladenin, 7-deaza-7-(C₂-C₇)-alkenylguanin, 7-deaza-7-(C₂-C₇)-alkenyladenin, 7-deaza-7-(C₁-C₇)-alkylguanin, 7-deaza-7-(C₁-C₇)-alkyladenin, 7-deaza-7-bromguanin, 7-deaza-7-bromadenin.
- 10
- Helt spesielt foretrukket er forbindelser med formel I, hvori
- 15 n betyr et tall fra 0 til 25;
- B står uavhengig av hverandre for en naturlig nukleobase;
- Z står for hydroksy, etoksy, (4-nitrofenol)etoksy eller fenoksy;
- 20 Q og Q' står uavhengig av hverandre for hydrogen, R⁸, hvori R⁸ står for H, (C₁-C₆)-alkyl, fenyl eller 2-(4-nitrofenyletyl), eller står for oligonukleotider som kan være umodifiserte og modifiserte, hvorved
- a) 3'- og/eller 5'-fosforsyrediester-broene er helt eller delvis erstattet med
- 25 fosfortioat-broer;
- c) sukkerfosfat-ryggraden er helt eller delvis erstattet med "PNA'er" eller PNA-DNA-hybrider;
- 30 d) β -D-2'-desoksyribose-enhetene er helt eller delvis erstattet med 2'-O-metyl-, 2'-O-allyl-, 2'-O-butylribose;
- e) de naturlige nukleosid-basene er helt eller delvis erstattet med 5-heksinylcytosin, 5-heksinyluracil, 5-heksinylcotylin, 7-deaza-7-propinylguanin, 7-deaza-
- 35 7-propinyladenin, 7-deaza-7-metylguanin, 7-deaza-7-metyladenin, 7-deaza-7-bromguanin, 7-deaza-7-bromadenin;

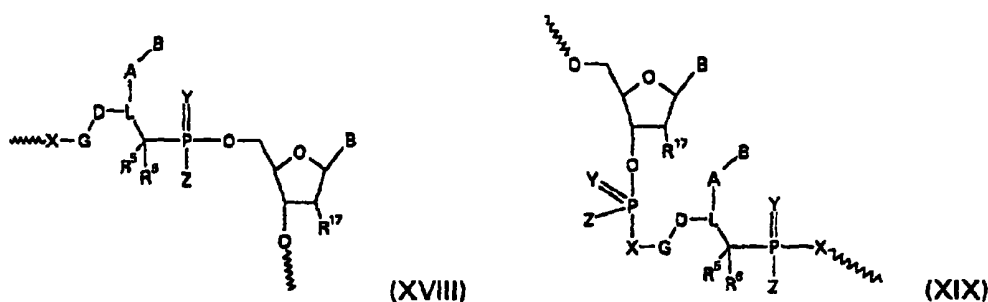
En ytterligere gjenstand for oppfinnelsen er forbindelser med formel I, hvori Q og Q' er sammenføyede, dvs. danner et cyklisk molekyl, hvorved også den muligheten skal gjelde at Q og Q' sammen gir en enkeltbinding. Syntesen av slike forbindelser kan foregå analogt beskrevne fremgangsmåter, som eksempelvis Gao et al., Nucl. Acids Res., 23 (1995) 2025 eller Wand og Kool, Nucl. Acids Res. 22 (1994) 2326.

En ytterligere gjenstand for oppfinnelsen er oligonukleotider hhv. modifiserte oligonukleotider, eksempelvis PNA'er, i hvilke forbindelser med formel I er bygget inn ved 3'-enden eller ved 5'-enden eller ved 5'- og 3'-enden.

10

Sammenføyningene av oligonukleotidene med forbindelsene med formel I foregår fortrinnsvis over 5'- eller 3'-hydroksygruppen av nukleotid-byggestenene, likeledes over en fosforylmonoesterbinding. I formlene XVIII og XIX tydeliggjøres sammenføyningen med oligonukleotider som eksempler.

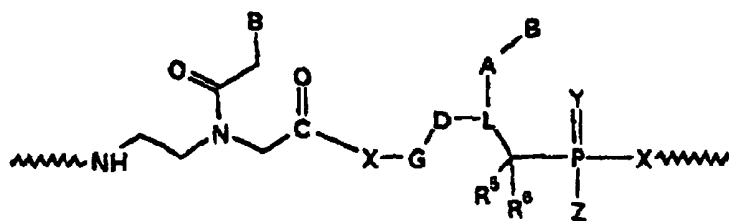
15



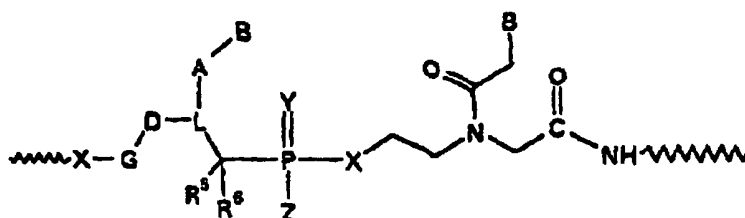
R¹⁷ står her for H, OH, F, 2'-O-(C₁-C₆)-alkyl, 2'-O-(C₂-C₆)-alkenyl, fortrinnsvis for H eller metoksy eller O-allyl, spesielt foretrukket for H. Alle andre variabler er beskrevet ovenfor.

Formlene XX og XXI, hvor variablene har betydningen ovenfor, tydeliggjør som eksempel sammenføyningen med PNA'er.

25



(XX)



(XXI)

Kombinasjonene av forbindelsene med formel I ifølge oppfinnelsen, dersom Q og Q' = H (forkortet PMENA) med oligonukleotider eller modifiserte oligonukleotider, som eksempelvis PNA'er eller andre modifikasjoner, som er beskrevet ovenfor, skal
5 skjematisk tydeliggjøres igjen (OLIGO står for umodifiserte eller modifiserte oligonukleotider):

Eksempler på slike kombinasjoner er:

- 10 5'-OLIGO-PMENA
5'-PMENA-OLIGO
5'-OLIGO-PMENA-OLIGO.

Videre skal nevnes

- 15 5'-OLIGO-(PMENA-OLIGO)_a (a = 1-20)
5'-PMENA-OLIGO-PMENA
5'-PMENA-(OLIGO-PMENA)^a (a = 1-20)

Syntesen av disse kombinerte forbindelsene foregår slik at avhengig av molekylet
begynnes først med syntesen av PMENA-byggestenene, som beskrives i det følgende,
20 deretter kobles det med oligonukleotid-byggestenene. Derved påkobles
oligonukleotidene ved for fagmannen kjente fremgangsmåter (Sonveaux, Bioorganic
Chemistry, 14 (1986) 274ff) ved fastfasesyntese eller ved oppløsningsyntese som
monomer-byggestener eller ved blokk-kondensasjon. Kondensasjonene foregår valgfritt

ved amiditt-fremgangsmåten, H-fosfonat-metoden eller fosfortriester-fremgangsmåten (Sonveaux, Bioorganic Chemistry, 14 (1986) 274ff). Dersom omvendt

PMENA-byggestener kobles på OLIGO-byggestener, så foregår dette fortrinnsvis ved den i fj) foreslåtte fremgangsmåten. Konjugeringen med PNA-byggestenene foregår på

- 5 samme måten eller, når (monomere eller oligomere) PNA-byggestener kobles på PMENA-byggestener ved for fagmannen kjente fremgangsmåter fra peptid-syntesen eller ester-syntesen.

- 10 Gjenstand for oppfinnelsen er videre en fremgangsmåte for fremstilling av forbindelser med formel I som er kjennetegnet ved at man

- a1) omsetter forbindelser med formel III



- 15 hvori

D, G, L og X har de ovenfor angitte betydningene og

S¹ står for en egnet beskyttelsesgruppe, som eksempelvis dimetoksytrityl,

monometoksytrityl, trityl, piksyll, tert-butoksykarbonyl eller

fluorenylmetyloksykarbonyl, fortrinnsvis monometoksytrityl eller

- 20 tert-butoksykarbonyl,

med forbindelser med formel IV



hvori

- 25 R⁵ og R⁶ har de ovenfor angitte betydningene,

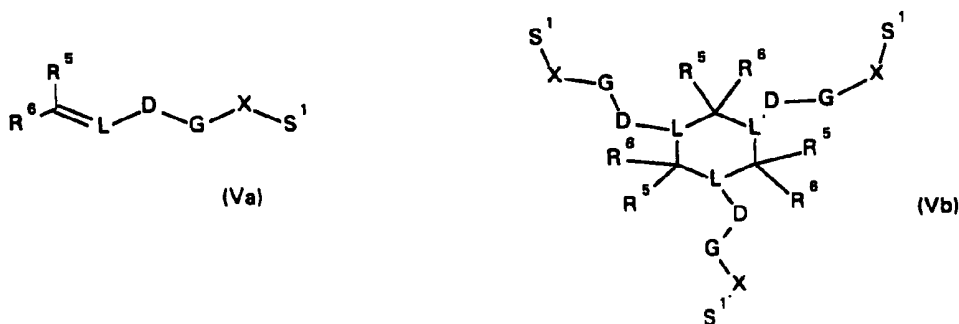
i et egnet organisk oppløsningsmiddel, eksempelvis i metanol, etanol, iso-

propanol, butanol, acetonitril, diklormetan (DCM), kloroform, benzen,

dimetylformamid (DMF), dimetylsulfoksyd (DMSO), dietyleter, eddiksyre-

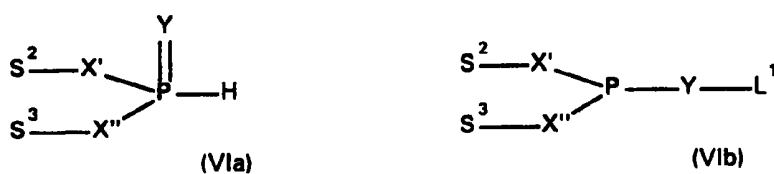
- 30 etylester (EE), tetrahydrofuran (THF), N-metylpyrrolidon, petroleumseter, xylen

eller toluen eller blandinger av egnede oppløsningsmidler, fortrinnsvis i metanol eller etanol, ved temperaturer fra 0°C til 100°C, fortrinnsvis ved 10 til 50°C, til forbindelser med formel Va eller Vb



- 5 hvorved det ved valget av reaksjonsbetingelser, som kjent for fagmannen (f.eks. i S.R. Sandler, W. Karo, "Organic Functional Group Preparations", bind II, 2. utgave, Academic Press, London, 1986, kapittel 12 ("Imines")) må legges vekt på at de er kompatible med beskyttelsesgruppen S¹, dvs. dersom det eksempelvis velges en syrelabil beskyttelsesgruppe som monometoksytrityl-
10 beskyttelsesgruppen, så må det gis avkall på syretilsats ved reaksjonen,

- b₁) Forbindelser med formel Va eller Vb omsettes med forbindelser med formel VIa eller VIb, fortrinnsvis med forbindelser med formel VIa

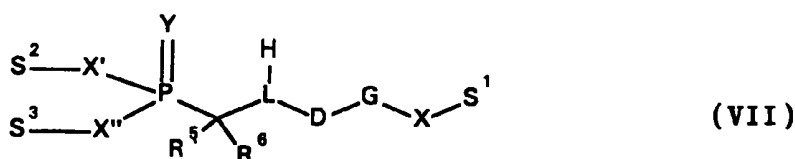


- 15 hvori
Y er som definert ovenfor,
X' og X'' er uavhengig av hverandre definert som X,
S² og S³ betyr uavhengig av hverandre beskyttelsesgrupper, som eksempelvis
20 metyl, etyl, fenyl, 2-klorfenyl, 2,5-diklorfenyl, 2,4-diklorfenyl, 4-nitrofenyl, 4-metoksyfenyl, 2-cyanoetyl, 2-(4-nitrofenyl)etyl, allyl, benzyl, 2,2,2-triklor-1,1-dimetyletyl, 4-metoksybenzyl, 2,2,2-trikloretyl, 8-hydroksykinolin eller andre fosfatbeskyttelsesgrupper som er kjente for fagmannen (Sonveaux, Bioorganic Chemistry, 14 (1986) 274ff), men står fortrinnsvis for metyl, etyl, fenyl, 2-(4-nitrofenyl)etyl, allyl, 2,2,2-triklor-

etyl, og

L¹ står for en avspaltbar gruppe, fortrinnsvis for (C₁–C₄)-alkyl,

- 5 i et egnet organisk oppløsningsmiddel, eksempelvis i metanol, etanol, iso-
propanol, butanol, acetonitril, benzen, DMF, DMSO, DCM, EE, kloroform,
dietyleter, THF, N-metylpyrrolidon, petroleumseter, xylene eller toluen eller
blandinger av egnede oppløsningsmidler, fortrinnsvis i THF, ved temperaturer fra
0°C til 100°C, fortrinnsvis ved 50 til 80°C, eventuelt under tilsats av baser, som
eksempelvis tri-(C₁–C₆)-alkylamin, N-alkylmorfolin, pyridin, N,N-
10 dimetylaminopyridin, butyllitium, litiumdiisopropylamid (LDA), natriumhydrid,
natriumamid, kaliumkarbonat, cesiumkarbonat, kalium-tert-butylat eller
komplekse baser som natriumamid-R¹¹ONa, hvorved R¹¹ står for (C₂–C₆)-alkyl
eller CH₃CH₂-O-CH₂CH₃, eller uladete peralkylerte polyamino-fosfazen-baser
(Schwesinger, Nachr. Chem. Tech. Lab., 38 (1990) 1214; Angew. Chem. 99
15 (1987) 1212), men fortrinnsvis uten basetilsats, til forbindelser med formel VII



hvor

D, G, L, R⁵, R⁶, S¹, S², S³, X, X', X'' og Y er som definert ovenfor;

- 20 c₁) Forbindelser med formel VII omsettes med forbindelser med formel VIII



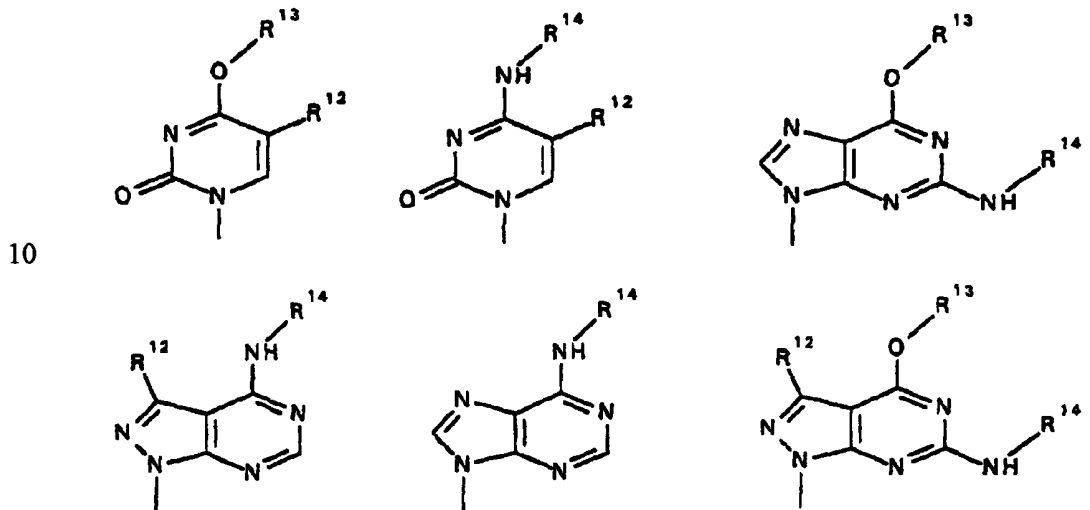
hvis

syntese f.eks. er beskrevet i Dueholm et al., J. Org. Chem., 59 (1994) 5767 og
hvor

A har den ovenfor angitte betydningen,

- 25 B^{PR} har samme betydning som B, men foreligger eventuelt i beskyttet form, dvs.
dersom B står for en naturlig eller unaturlig nukleose, så står B^{PR} for
nukleobasene hvis amino- hhv. hydroksygrupper er beskyttet ved hjelp av
egne kjente beskyttelsesgrupper, som eksempelvis para-
nitrofenyletylgruppen, benzoylgruppen, allylgruppen og para-(t-

butyl)benzoylgruppen for hydroksygruppen og acetyl-, benzoyl-, para-(t-butyl)benzoyl-, para-(t-butyl)benzoyl-, para-(metoksy)benzoylgruppen, para-nitrofenyletyloksykarbonylgruppen, isobutyrylgruppen, para-(t-butyl)fenylacetylgruppen, N,N-dimetylformamidino, fluorenylmetyloksykarbonylgruppen, benzyloksykarbonylgruppen, fenoksyacetylgruppen for aminogruppen eller andre innen oligonukleotidkjemien for nukleobaser vanlige beskyttelsesgrupper (Sonveaux, Bioorganic Chemistry, 14 (1986) 274ff; Beaucage, Tetrahedron, 49 (1933) 2223ff), for B^{PR} kan fortrinnsvis nevnes:



hvor

15 R¹² betyr hydrogen, 1-propinyl, 1-butinyl, 1-pentinyl eller 1-heksinyl, spesielt hydrogen, 1-propinyl eller 1-heksinyl; og

R¹³ står for hydrogen, difenylkarbamoyl eller 2-(4-nitrofenyl)etyl og

R¹ betyr acetyl, benzoyl, para-(t-butyl)benzoyl, para-(metoksy)benzoyl, para-nitrofenyletyloksykarbonyl, isobutyryl, para-(t-butyl)fenylacetyl, benzyloksykarbonyl eller fenoksyacetyl, og

20

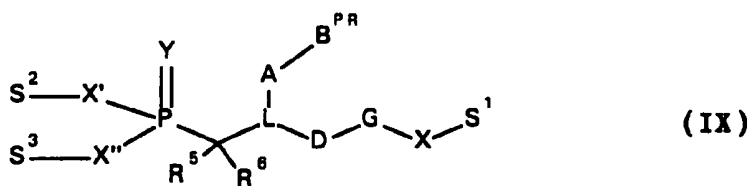
L² står for en for fagmannen kjent avspaltbar gruppe som eksempelvis Cl, Br, O-SO₂-metyl, O-SO₂-trifluormetyl, O-tosylat, O-C₆F₅ eller, dersom A har betydningen fra formel IIb, kan også stå for OH;

25

i et egnet organisk oppløsningsmiddel, eksempelvis i acetonitril, benzen, DMF, DMSO, DCM, EE, kloroform, dietyler, tetrametylurea, THF, N-metylpyrrolidon, petroleumseter, xylen eller toluen eller blandinger av egnede

oppløsningsmidler, fortrinnsvis i DMF, ved temperaturer på -20°C til 100°C , fortrinnsvis ved 0 til 50°C , eventuelt under tilsats av baser, som eksempelvis tri- $(\text{C}_1\text{--}\text{C}_6)$ -alkylamin, N-alkylmorfolin, pyridin, N,N-dimetylaminpyridin, butyllitium, litiumdiisopropylamid (LDA), natriumhydrid, natriumamid, kaliumkarbonat, cesiumkarbonat, kalium-tert-butylat eller komplekse baser som natriumamid- R^{11}ONa , hvorved R^{11} står for $(\text{C}_2\text{--}\text{C}_6)$ -alkyl eller $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{--O--CH}_2\text{CH}_3$ eller uladede, peralkylerte polyamino-fosfazen-baser (Schwesinger, Nachr. Chem. Tech. Lab., 38 (1990) 1214; Angew. Chem. 99 (1987) 1212), dersom A står for formel IIb og L^2 står for OH, fortrinnsvis under tilsats av trietylamin, diisopropyletylamin eller N-etylmorfolin eller uten basetilsats og under tilsats av et for kobling av peptid-bindinger vanlig koblingsreagens,

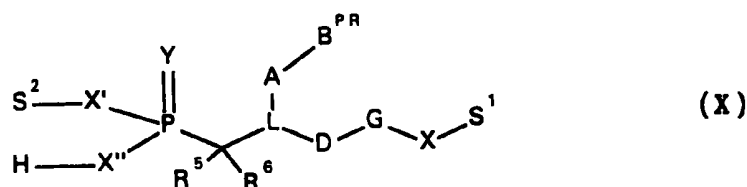
til forbindelser med formel IX



15 hvori A, B^{PR} , D, G, L, R^5 , R^6 , S^1 , S^2 , S^3 , X, X', X'' og Y er som definert ovenfor;

d₁) fra forbindelser med formel IX avspaltes beskyttelsesgruppen S^3 ved kjente fremgangsmåter (f.eks. Greene, Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, J. Wiley & Sons, New York 1991), følgelig f.eks. for forbindelser med formel IX, hvori S^2 og S^3 står for 2-(4-nitrofenyl)etyl ved behandling med 0,1M 1,8-diazabicyklo[5,4,0]undec-7-en (DBU) i pyridin eller acetonitril ved romtemperatur eller for forbindelser med formel IX, hvori S^2 og S^3 står for fenyl eller etyl ved behandling med vandig ammoniakk eller for forbindelser med formel IX, hvori S^2 står for 2-(4-nitrofenyl)etyl og S^3 står for allyl, ved behandling med $\text{Pd}[\text{P}(\text{C}_6\text{H}_5)_3]_4$ og trifenylfosfin i DCM (Hayakawa et al., J. Org. Chem., 58 (1993) 5551), eller for forbindelser med formel IX, hvori S^2 står for 2-(4-nitrofenyl)etyl og S^3 står for allyl ved behandling med 0,5M DBU i pyridin eller acetonitril eller for forbindelser med formel IX hvori S^2 står for 2-cyanoetyl og S^3 står for allyl ved behandling med trietylamin i pyridin, eller for forbindelser med formel IX hvori S^2 står for 2-(4-nitrofenyl)etyl og S^3 står for 2,2,2-triklor-1,1-dimetyletyl ved behandling med tributylfosfin,

hvorved man oppnår forbindelser med formel X

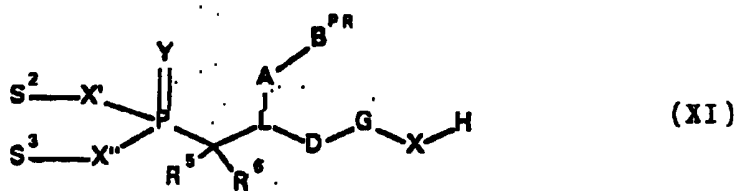


hvor

5 A, B^{PR}, D, G, L, R⁵, R⁶, S¹, S², X, X', X'' og Y er som definert ovenfor;

e₁) fra forbindelser med formel IX avspaltes beskyttelsesgruppen S¹ ved kjente fremgangsmåter (f.eks. Greene, Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, J. Wiley & Sons, New York 1991, Sonveaux, Bioorganic Chemistry, 14 (1986) 274ff), følgelig avspaltes eksempelvis monometoksytritylbeskyttelsesgruppen ved behandling med syre, eksempelvis ved behandling med 80% eddiksyre, med 1-4% dikloreddiksyre i metylenklorid eller kloroform, med 2% p-toluensulfonsyre i DCM/metanol eller ved behandling med 1% trifluoreddiksyre i kloroform,

15 hvorved man oppnår forbindelser med formel XI



hvor

A, B^{PR}, D, G, L, R⁵, R⁶, S², S³, X, X', X'' og Y er som definert ovenfor;

20 f₁) forbindelser med formel XI omsettes med forbindelser med formel X ifølge den fra oligonukleotidkjemien Sonveaux, Bioorganic Chemistry, 14 (1986) 274ff, Reese, J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1993, 2291 ff) kjente "fosfortriester-fremgangsmåten" i et egnet organisk oppløsningsmiddel, som acetonitril, benzen, DMF, DMSO, DCM, EE, kloroform, dietyleter, tetrametylurea, THF, N-metylpyrrolidon, petroleumseter, xylen eller toluen eller 25 blandinger av egnede oppløsningsmidler, fortrinnsvis i pyridin, ved temperaturer fra -20°C til 100°C, fortrinnsvis ved 0 til 50°C, under tilsats av en

koblingsreagens, som eksempelvis 6-nitrobenzotriazol-1-yloksytris(dimetylamino)-fosfonium-heksafluorofosfat (NBOP, Hashmi, Nucleosides & Nucleosides, 13 (1994) 1059), benzotriazol-1-yloksytris-(dimetylamino)fosfoniumheksafluorofosfat (BOP, B. Castro, J.R. Dormoy, G. Evin og C. Selve, Tetrahedron Lett., 1975, 1219-1222), benzotriazol-1-yloksytripyrrolidino-fosfoniumheksafluorofosfat (PyBOP, J. Coste, D. LeNguyen og B. Castro, Tetrahedron Lett., 1990, 205-208), O-(7-aza)benzotriazol-1-yltetrametyluroniumheksafluorofosfat (HATU, L. Carpino, J. Am. Chem. Soc., 1993, 115, 4397), N,N-bis[2-okso-3-oksazolidinyl]fosfordiamidklorid (Katti, Tetrahedron Lett., 26 (1985) 2547), 2-klor-5,5-dimetyl-2-okso-1,3,2-dioksosoforinan (Stawinski, Nucl. Acids Res., Symp. Ser. 24, 1991, 229) eller en forbindelse med formel XII



15 hvori

R¹⁵ står for (C₆-C₁₂)-aryl, eventuelt substituert en til fire ganger med (C₁-C₆)-alkyl, (C₁-C₆)-alkoksy, nitro, klor, brom, og hvorved eventuelt 1 til 3 C-atomer er substituert med N, S eller O, hvorved (C₆-C₁₂)-aryl er valgt fra gruppen omfattende fenyl, naftyl, pyrenyl, bifenyl eller binaftyl; dvs. 20 står eksempelvis for fenyl, tolyl, 2,4,6-trimetylfenyl, 2,4,6-triisopropylfenyl, 2,3,5,6-tetrametylbenzen (Losse, Liebigs Ann. Chem., 1989, 19ff), 4-brombenzen, 2-nitrobenzen, 4-nitrobenzen, 8-kinolyl, fortrinnsvis 2,4,6-trimetylfenyl eller 2,4,6-triisopropylfenyl, og

25 R¹⁶ står for en avspaltbar gruppe som eksempelvis klor, brom, imidazol, triazol, 4-nitroimidazol, 1,2,3,4-tetrazol, 3-nitro-1,2,4-triazol,

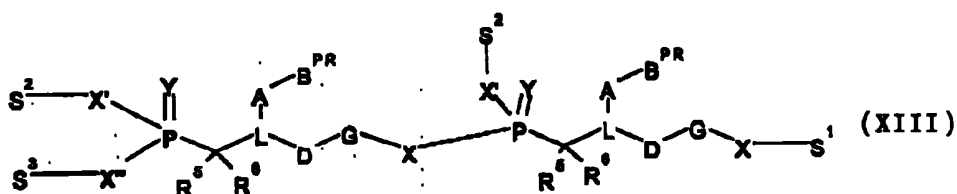
fortrinnsvis under tilsats av en koblingsreagens av forbindelsen med formel XII eller BOP, PyBOP eller HATU,

30

eventuelt under tilsats av en katalysator (Reese, J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1993, 2291ff), som eksempelvis N-metylimidazol, pyridin-N-oksyder som 4-metoksy-pyridin-N-oksyd eller 4-etoksy-pyridin-N-oksyd, 4,6-dinitro-

1-hydroksybenzotriazol, 1-hydroksy-5-fenyltetrazol, 1-hydroksy-(5-(4-nitrofenyl)tetrazol, 3-nitro-1H-1,2,4-triazol, 5-(3-nitrofenyl)-1H-tetrazol, 5-(3,5-dinitrofenyl)-1H-tetrazol, 5-(1-metylimidazol-2-yl)-1H-tetrazol, 5-[(1-metylimidazol-2-yl)metyl]-1H-tetrazol eller 1-hydroksy-4-nitro-6-(trifluormetyl)benzotriazol, fortrinnsvis med 4-etoksy-pyridin-N-oksyd eller 4-metoksy-pyridin-N-oksyd som katalysator, hvorved fremstillingen av koblingsreagensene kan foregå in situ, eller kan foregå separat og oppløsningen av de aktiverte spesies (forbindelser med formel X + koblingsreagens) kan tilsettes i et egnet oppløsningsmiddel,

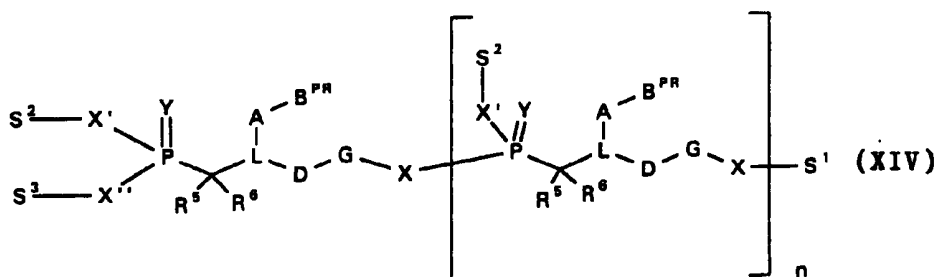
til forbindelser med formel XIII



hvor

A, B^{PR}, D, G, L, R⁵, R⁶, S¹, S², S³, X, X', X'' og Y er som definert ovenfor;

- g1) med utgangspunkt fra forbindelser med formel XIII gjentas trinnene e₁) og f₁) inntil ønsket kjedelengde, hvorved det oppstår forbindelser med formel XIV



hvor

A, B^{PR}, D, G, L, R⁵, R⁶, S¹, S², S³, X, X', X'', Y og n er som definert ovenfor;

- h₁) beskyttelsesgruppene S¹, S² og S³ og beskyttelsesgruppene på B^{PR} avspaltes ved kjente fremgangsmåter (f.eks. Greene, Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, J. Wiley & Sons, New York 1991), dvs. eksempelvis beskyttelsesgruppen S¹ som beskrevet i trinn e₁), beskyttelsesgruppene S² eller S³, dersom de står for 2-(4-nitrofenyl)etyl, ved behandling med 0,5M 1,8-diaza-

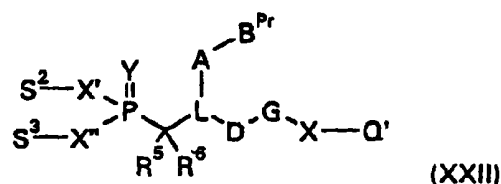
bicyklo[5,4,0]undec-7-en (DBU) i pyridin eller acetonitril ved romtemperatur, dersom S² eller S³ står for fenyl, ved behandling med vandig ammoniakk, dersom S² eller S³ står for allyl, ved behandling med Pd[(P(C₆H₅)₃)₄ og trifenyfosfin i DCM (Hayakawa et al., J. Org. Chem., 58 (1993) 5551), dersom S² eller S³ står for 2-cyanoetyl, ved behandling med trietylamin i pyridin, eller dersom S² eller S³ står for 2,2,2-triklor-1,1-dimetyetyl, ved behandling med tributylfosfin, og beskyttelsesgruppene på B^{PR}, dersom R¹⁴ står for para-nitrofenyletyloksykarbonyl med 0,5M DBU i pyridin, dersom R¹⁴ står for isobutyryl eller benzoyl eller para-(metoksy)benzoyl med kons. NH₄OH ved 20 til 60°C, eller dersom R¹³ står for 2-(4-nitrofenyl)etyl, ved behandling med 0,5M DBU i pyridin eller acetonitril, når S¹ er lik monometoksytrityl og S² er lik 2-(para-nitrofenyl)etyl avspaltes fortrinnsvis først monometoksytritylgruppen som i e₁), deretter avspaltes S² som beskrevet, deretter fjernes de resterende beskyttelsesgruppene, eksempelvis på nukleobasene;

15

og eventuelt innføres gruppene Q og Q' ved for fagmannen kjente fremgangsmåter (se f.eks. Uhlmann & Peyman, Chem. Rev., 90 (1990) 543; M. Manoharan i "Antisense Research and Applications", Crooke og Lebleu, red., CRC Press, Boca Raton, 1993, kap. 17, s. 303ff og EP—A 0 552 766; S. Agrawal i Methods in Molecular Biology, bind 20 26, s. 93ff, Humana Press, Totowa 1994), og eventuelt ringsluttet de oppnådde forbindelsene ifølge Wang, Nucl. Acids Res. 22 (1994) 2326, hvorved det oppstår forbindelser med formel I.

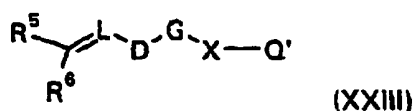
Alternativt kan konjugatene Q' også bygges inn ved for fagmannen kjente fremgangsmåter (J. March, "Advanced Organic Chemistry", 4. utgave, J. Wiley & Sons, 1992) i monomerbyggestenen med formel XXII, som deretter tilsvarende den angitte fremgangsmåten bygges inn i forbindelsene med formel I.

25



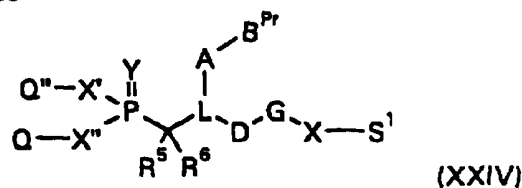
Forbindelser med formel XXII lar seg eksempelvis for Q' = alkyl fremstille ved omsetning av forbindelser med formel XXIII med forbindelser med formlene VIa eller VIb og ytterligere omsetninger analogt det som er beskrevet for formlene Va hhv. Vb.

5



Forbindelser med formel XXII lar også fremstille fra forbindelser med formel IX ved avspaltning av beskyttelsesgruppen S¹ og innføring av gruppen Q' ved kjente fremgangsmåter (J. March, "Advanced Organic Chemistry", 4. utgave, J. Wiley & Sons, 1992).

Alternativt lar konjugatene Q og Q" seg også bygge inn ved for fagmannen kjente fremgangsmåter (J. March, "Advanced Organic Chemistry", 4. utgave, J. Wiley & Sons, 1992) i monomerbyggestenene med formel XXIV, som deretter tilsvarende de kjente fremgangsmåtene bygges inn i forbindelsene med formel I.



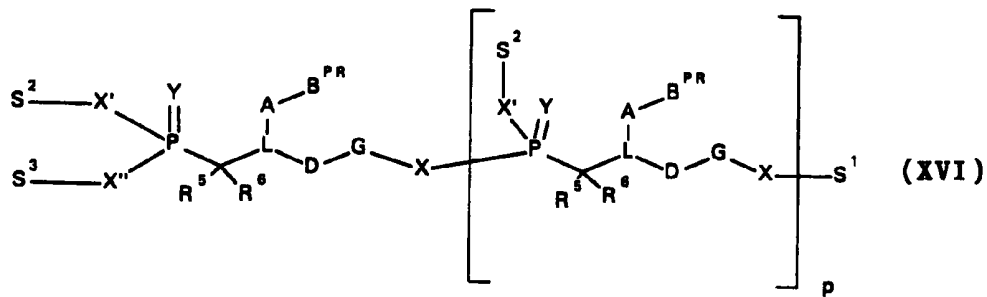
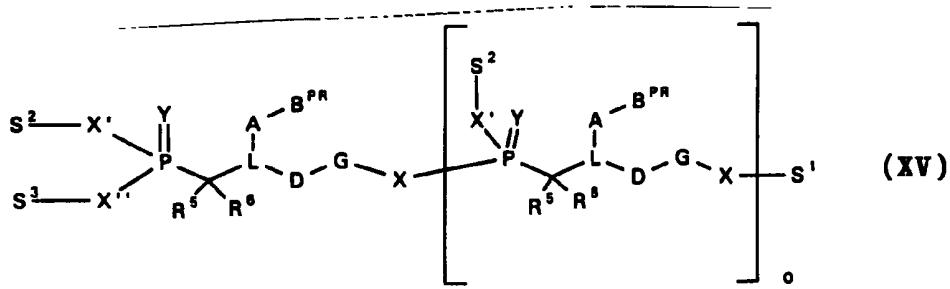
Koblingsreagenser for tilknytning av peptidbindinger (se c₁) er eksempelvis beskrevet i Houben-Weyl, "Methoden der organischen Chemie", bind 15/2, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974 og ytterligere reagenser som f.eks. BOP (B. Castro, J.R. Dormoy, G. Evin og C. Selve, Tetrahedron Lett., 1975, 1219-1222), PyBOP (J. Coste, D. LeNguyen og B. Castro, Tetrahedron Lett., 1990, 205-208), BroP (J. Coste, M.-N. Dufour, A. Pantaloni og B. Castro, Tetrahedron Lett., 1990, 669-672), PyBroP (J. Coste, E. Frerot, P. Jouin og B. Castro, Tetrahedron Lett., 1991, 1967-1970) og uronium-reagenser, som f.eks. HBTU (V. Dourtoglou, B. Gross, V. Lambropoulou, C. Zioudrou, Synthesis 1984, 572-574), TBTU, TPTU, TSTU, TNTU (R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth og D. Gillessen, Tetrahedron Letters, 1989, 1927-1930), TOTU (EP-A-0460 446),

20

25

- HATU, (L.A. Carpino, J. Am. Chem. Soc., 1993, 115, 4397), HAPyU, TAPipU (A. Ehrlich, S. Rothmund, M. Brudel, M. Beyermann, L.A. Carpino og M. Bienert, Tetrahedron Lett., 1993, 4781-4784), BOI (K. Akaji, N. Kuriyama, T. Kimura, Y. Fujiwara og Y. Kiso, Tetrahedron Lett., 1992, 3177-3180) eller syreklorider hhv.
- 5 syrefluorider (L.A. Carpino, H.G. Chao, M. Beyermann og M. Bienert, J. Org. Chem., 56 (1991), 2635; J.-N. Bertho, A. Loffet, C. Pinel, F. Reuther og G. Sennyey i E. Giralt og D. Andreu (red.), Peptides, 1990, Escom Science Publishers B.V. 1991, sidene 53-54; J. Green og K. Bradley, Tetrahedron, 1993, 4141-4146), 2,4,6-mesitylensulfonyl-3-nitro-1,2,4-triazolid (MSNT) (B. Blankemeyer-Menge, M. Nimitz og R. Frank,
- 10 Tetrahedron Lett., 1990, 1701-1704), 2,5-difenyl-2,3-dihydro-3-okso-4-hydroksytiofendioksyd (TDO) (R. Kirstgen, R.C. Sheppard, W. Steglich, J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1987, 1870-1871) eller aktiverte estere (D. Hudson, Peptide Res., 1990, 51-55) som beskrevet i de respektive referansene.
- 15 Foretrukket er videre anvendelsen av karbodiimider, f.eks. dicykloheksylkarbodiimid eller diisopropylkarbodiimid. Fortrinnsvis anvendes likeledes fosfoniumreagenser, som f.eks. PyBOP eller PyBroP, uroniumreagenser, som f.eks. HBTU, TBTU, TPTU, TSTU, TNTU, TOTU eller HATO, BOI.
- Derved kan koblingen gjennomføres direkte ved addisjon av forbindelser med formel
- 20 VIII med aktiveringsreagensen og eventuelt under tilsats av additiver som f.eks. 1-hydroksybenzotriazol (HOBt) (W. König, R. Geiger, Chem. Ber., 103, 788 (1970)) eller 3-hydroksy-4-okso-3,4-dihydrobenzotriazin (HOOBt) (W. König, R. Geiger, Chem. Ber., 103, 2034 (1970)) eller foraktivering av byggestenen som aktivert ester kan foregå separat og oppløsningen av de aktiverte spesies kan tilsettes i et egnet
- 25 oppløsningsmiddel.

Gjenstand for oppfinnelsen er videre en fremgangsmåte for fremstilling av forbindelser med formel I, hvori n betyr 1 til 100, som er kjennetegnet ved at man i forbindelser med formlene XV og XVI



5

hvor

A, B^{PR}, D, G, L, R⁵, R⁶, S¹, S², S³, X, X', X'' og Y er som definert ovenfor,
o og p er uavhengig av hverandre 0 til 50, fortrinnsvis 0 til 20 og o + p + 1 = n;

10

a₂) i forbindelsene med formel XV avspalter beskyttelsesgruppen S¹ som beskrevet under e₁),

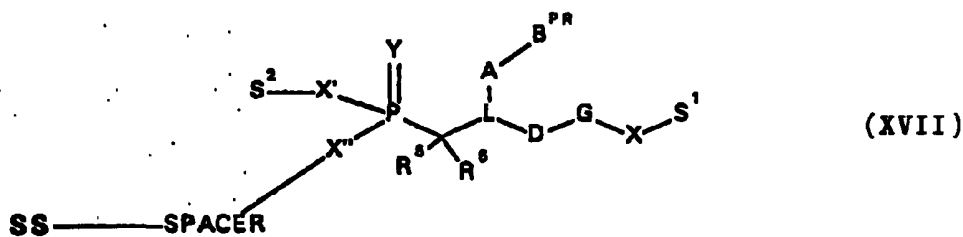
15

b₂) i forbindelsene med formel XVI avspalter beskyttelsesgruppen S³ som beskrevet under d₁) og

c₂) de dannede forbindelsene kobles med hverandre som beskrevet under f₁), hvorved det oppstår forbindelser med formel XIV

(Sonveaux, Bioorganic Chemistry, 14 (1986) 274ff), eksempelvis bis(hydroksyetyl)sulfonylgruppen, som beskrevet i EP—A 0 552 766 (HOE 92/F 012), eller SPACER står for bisfunksjonelle konjugatmolekyler Q, som tilknyttes over kjente avspaltbare grupper til den faste bæreren eksempelvis for nukleotider eller oligonukleotider som bindes over en ravsyreerest til den faste bæreren (Sonveaux, Bioorganic Chemistry, 14 (1986) 274ff) eller poly- hhv. oligoetylenglykoler som bindes over en ravsyreerest til den faste bæreren (Jäschke, Tetrahedron Lett., 34 (1993) 301) eller eksempelvis kolesterinderivater som bindes over en ravsyreerest til den faste bæreren (MacKellar, Nucl. Acids Res., 20 (1992) 3411);

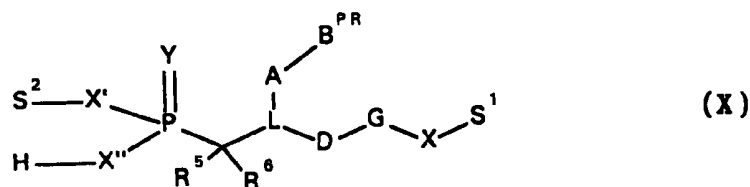
b₃) fra forbindelser med formel XVII



hvor

15 A, B^{PR}, D, G, L, R⁵, R⁶, S¹, S², SS, SPACER, X, X', X'' og Y er som definert ovenfor; avspaltes beskyttelsesgruppen S¹ som beskrevet under e₁);

c₃) den resulterende forbindelsen omsettes med forbindelser med formel X



20 hvor

A, B^{PR}, D, G, L, R⁵, R⁶, S¹, S², X, X', X'' og Y er som definert ovenfor, som beskrevet under f₁);

25 d₃) trinnene b₃) og c₃) gjentas inntil ønsket kjedelengde;

e₃) eventuelt påkobles konjugatet Q' ved kjente fremgangsmåter (se f.eks. Uhlmann

& Peyman, Chem. Rev., 90 (1990) 543; M. Manoharan i "Antisense Research and Applications", Crooke og Lebleu, red., CRC Press, Boca Raton, 1993, kap. 17, s. 303ff; EP—A 0 552 766; S. Agrawal i "Methods in Molecular Biology", bind 26, s. 93ff, Humana Press, Totowa 1994);

- 5 f₃) de derved oppnådde forbindelsene avspaltes ved kjente fremgangsmåter fra fast bærer, eksempelvis fra bis(hydroksyetyl)sulfonyl-linkeren, som beskrevet i EP—A 0 552 766 (HOE 92/F 012), ved behandling med DBU, ravsyre-linkeren ved behandling med vandig ammoniakk og beskyttelsegruppene som beskrevet i trinn h₁), hvorved avspaltningen av beskyttelsesgruppene også kan foregå før
- 10 avspaltningen av bæreren, og eventuelt påkobles konjugater Q ved kjente fremgangsmåter (se ovenfor), hvorved rekkefølgen av påkoblingen av Q hhv. Q' (e₃), f₃) også kan endres, og eventuelt ringsluttet de oppnådde forbindelsene.

Forbindelsene med formel I finner anvendelse som inhibitorer av genekspressjonen.

15

Gjenstand for oppfinnelsen er følgelig anvendelsen av terapeutisk virksomme forbindelsen ifølge oppfinnelsen for fremstilling av et legemiddel samt en fremgangsmåte for fremstilling av et legemiddel som er kjennetegnet ved at man blander forbindelsene ifølge oppfinnelsen med en fysiologisk godtagbar bærer samt

20 eventuelt egnede tilsats- og/eller hjelpestoffer.

Som terapeutisk virksomme forbindelser forstår man generelt slike som på grunn av rekkefølgen av byggestenene B, som tilsvare nukleobasene utøver en funksjon som analog antisens-oligonukleotider, trippelheliks-dannende oligonukleotider, aptamerer

25 (RNA eller DNA-molekyler som kan bindes til spesifikke målmolekyler, f.eks. proteiner eller reseptorer (f.eks. L.C. Bock et al., Nature, 1992, 355, 564) eller ribozymmer (katalytisk RNA, se f.eks. Castanetto et al., Critical Rev. Eukar. Gene Expr. 1992, 2, 331), spesielt som analoger av antisens-oligonukleotider og trippelheliks-dannende oligonukleotider.

30

Videre en ytterligere gjenstand for foreliggende oppfinnelse anvendelsen av forbindelsene ifølge oppfinnelsen som diagnostikum, eksempelvis for deteksjon av nærvær eller fravær eller mengden av et spesifikt dobbelkjedet eller enkelkjedet nukleinsyremolekyl i en biologisk prøve.

35

For anvendelse ifølge oppfinnelsen har forbindelsene en lengde (n-1) på ca. 6 - 100, fortrinnsvis på ca. 10 - 40, spesielt på ca. 12 - 31 nukleotider. Forøvrig gjelder også her

de ovenfor angitte foretrukne områdene, modifikasjonene hhv. konjugasjonene.

Legemidlet ifølge foreliggende oppfinnelse kan eksempelvis anvendes for behandling av sykdommer som fremkalles av vira, eksempelvis av HIV, HSV-1, HSV-2, influensa, VSV, hepatitt B eller papilloma-vira.

Sekvenser ifølge oppfinnelsen (baserekkefølger) som er virksomme for slike "Targets" er eksempelvis:

ACACCCAATTCTGAAAATGG	SEQ ID NO:1
AGGTCCCTGTTCCGGGCGCCA	SEQ ID NO:2
GGTCCCTGTTCCGGGCGCCA	SEQ ID NO:26
GTCGACACCCAATTCTGAAAATGGATAA	SEQ ID NO:3
GCTATGTGACACCCAATTCTGAAA	SEQ ID NO:4
GTCGCTGTCTCCGCTTCTTCTTCCTG	SEQ ID NO:5
GTCTCCGCTTCTTCTTCCTGCCATAGG	SEQ ID NO:6

10

b) mot HSV-1, f.eks.

GCGGGGCTCCATGGGGGTCG	SEQ ID NO:7
GGAGGATGCTGAGGAGG	SEQ ID NO:28
GGAGGATGCTGAGG	SEQ ID NO:29
CAGGAGGATGCTGAGGAGG	SEQ ID NO:30

15

Legemidlene ifølge foreliggende oppfinnelse egner seg eksempelvis også for behandling av kreft eller restenose. I et slikt tilfelle kan eksempelvis sekvenser (baserekkefølger) som er rettet mot "Targets" som er ansvarlige for karsinogenese hhv. kreftvekst komme til anvendelse. Slike "Targets" er eksempelvis:

20

1) Nukleære onkoproteiner som eksempelvis c-myc, N-myc, c-myc, 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

25

3) Cellulære reseptorer som eksempelvis EGF-reseptor, c-erbA, retinoid-reseptorer, protein-kinase regulatorisk underenhet, c-fms

- 4) Cytokiner, vekstfaktorer, ekstracellulær matriks som eksempelvis CSF-1, IL-6, IL-1a, IL-1b, IL-2, IL-4, bFGF, myeloblastin, fibronectin,
- 5 Sekvenser ifølge oppfinnelsen (baserekkefølger) som er virksomme mot slike "Targets" er eksempelvis
- a) mog c-Ha-ras, f.eks.
CAGCTGCAACCCAGC SEQ ID NO:8
- 10 c) c-myc, f.eks.
GGCTGCTGGAGCGGGGCACAC SEQ ID NO:9
AACGTTGAGGGGCAT SEQ ID NO:10
- d) c-myb, f.eks.
GTGCCGGGGTCTTCGGGC SEQ ID NO:11
GTGCCGGGGTCTTCGGG SEQ ID NO:27
- 15 e) c-fos, f.eks.
GGAGAACATCATGGTCGAAAG SEQ ID NO:12
CCCGAGAACATCATGGTCGAAG SEQ ID NO:13
GGGGAAAGCCCGGCAAGGGG SEQ ID NO:14
- f) p120, f.eks.
CACCCGCCTTGGCCTCCCAC SEQ ID NO:15
- g) EGF-reseptor, f.eks.
GGGACTCCGGCGCAGCGC SEQ ID NO:16
GGCAAAC TTTCTTTTCCTCC SEQ ID NO:17
- 20 h) p53 tumorsupressor, f.eks.
GGGAAGGAGGAGGATGAGG SEQ ID NO:18
GGCAGTCATCCAGCTTCGGAG SEQ ID NO:19
- i) bFGF, f.eks.
GGCTGCCATGGTCCC SEQ ID NO:31
- 25

Legemidlene ifølge foreliggende oppfinnelse egner seg eksempelvis videre for behandling av sykdommer som påvirkes ved integriner eller celle-celle-adhesjonsreseptorer, eksempelvis ved VLA-4, VLA-2, ICAM eller ELAM.

Sekvenser (baserekkefølger) ifølge oppfinnelsen som er virksomme mot slike "Targets" er eksempelvis

a) VLA-4, f.eks.

5 **GCAGTAAGCATCCATATC** SEQ ID NO:20

b) ICAM, f.eks.

CCCCACCACTTCCCCTCTC SEQ ID NO:21

CTCCCCACCACTTCCCCTC SEQ ID NO:22

GCTGGGAGCCATAGCGAGG SEQ ID NO:23

c) ELAM-1, f.eks.

ACTGCTGCCTCTTGTCTCAGG SEQ ID NO:24

CAATCAATGACTTCAAGAGTTC SEQ ID NO:25

10

Legemidlet ifølge foreliggende oppfinnelse egner seg eksempelvis videre for behandling av sykdommer som utløses ved faktorer som TNF- α .

Sekvenser (baserekkefølger) ifølge oppfinnelsen som er virksomme mot slike "Targets" er eksempelvis

15

a) TNF- α , f.eks.

TCATGGTGTCCTTTGCAGCC SEQ ID NO:32

TCATGGTGTCCTTTGCAG SEQ ID NO:33

20 Legemidlet kan f.eks. anvendes i form av farmasøytiske preparater som eksempelvis administreres topisk eller oralt, f.eks. i form av tabletter, dragéer, hård- eller mykgelatinkapsler, oppløsninger, emulsjoner eller suspensjoner. De kan også administreres rektalt, f.eks. i form av suppositorier eller parenteralt, f.eks. i form av injeksjonsoppløsninger. For fremstillingen av farmasøytiske preparater kan disse forbindelsene bearbeides i terapeutisk, inerte organiske eller uorganiske bærere.

25 Eksempler på slike bærere for tabletter, dragéer og hårdgelatinkapsler er laktose, maisstivelse eller derivater derav, talk og stearinsyre eller salter derav. Egnede bærere for fremstillingen av oppløsninger er vann, polyoler, sakkarose, invertsukker og glukose. Egnede bærere for injeksjonsoppløsninger er vann, alkoholer, polyoler, glycerol og vegetabiliske oljer. Egnede bærere for suppositorier er vegetabiliske og
30 herdede oljer, vokser, fett og halvflytende polyoler. De farmasøytiske preparatene kan også inneholde konserveringsmidler, oppløsningsmidler, stabiliseringsmidler, fuktemidler, emulgatorer, søtningsstoffer, fargestoffer, smaksmidler, salter for

forandring av det osmotiske trykket, buffere, overtrekksmidler, antioksydanter samt eventuelt andre terapeutisk virksomme stoffer.

- 5 En foretrukket anvendelse er den orale tilførselen. En ytterligere foretrukket form for administrering er injeksjon. For dette formålet formuleres antisens-oligonukleotidene i en flytende oppløsning, fortrinnsvis i en fysiologisk godtagbar buffer, som f.eks. Hanks oppløsning eller Ringers oppløsning. De terapeutisk virksomme forbindelsene ifølge oppfinnelsen kan imidlertid også formuleres i fast form og før bruk oppløses eller suspenderes. Foretrukne doseringer for den systematiske administreringen utgjør ca.
- 10 0,01 mg/kg til ca. 50 mg/kg kroppsvekt og dag.

Sekvensliste:

ACACCCAATTCTGAAAATGG	SEQ ID NO:1
AGGTCCCTGTTCGGGCGCCA	SEQ ID NO:2
GTCGACACCCAATTCTGAAAATGGATAA	SEQ ID NO:3
GCTATGTGACACCCAATTCTGAAA	SEQ ID NO:4
GTCGCTGTCTCCGCTTCTTCTTCCTG	SEQ ID NO:5
GTCTCCGCTTCTTCTTCCTGCCATAGG	SEQ ID NO:6
GCGGGGCTCCATGGGGGTCG	SEQ ID NO:7
CAGCTGCAACCCAGC	SEQ ID NO:8
GGCTGCTGGAGCGGGGCACAC	SEQ ID NO:9
AACGTTGAGGGGCAT	SEQ ID NO:10
GTGCCGGGGTCTTCGGGC	SEQ ID NO:11
GGAGAACATCATGGTCGAAAG	SEQ ID NO:12
CCCGAGAACATCATGGTCGAAG	SEQ ID NO:13
GGGAAAGCCCGGCAAGGGG	SEQ ID NO:14
CACCCGCCTTGGCCTCCAC	SEQ ID NO:15
GGACTCCGGCGCAGCGC	SEQ ID NO:16
GGCAAACCTTCTTTTCCTCC	SEQ ID NO:17
GGGAAGGAGGAGGATGAGG	SEQ ID NO:18
GGCAGTCATCCAGCTTCGGAG	SEQ ID NO:19
GCAGTAAGCATCCATATC	SEQ ID NO:20

CCCCACCACTTCCCCTCTC	SEQ ID NO:21
CTCCCCACCACTTCCCCTC	SEQ ID NO:22
GCTGGGAGCCATAGCGAGG	SEQ ID NO:23
ACTGCTGCCTCTTGTCTCAGG	SEQ ID NO:24
CAATCAATGACTTCAAGAGTTC	SEQ ID NO:25
GGTCCCTGTTCGGGCGCCA	SEQ ID NO:26
GTGCCGGGGTCTTCGGG	SEQ ID NO:27
GGAGGATGCTGAGGAGG	SEQ ID NO:28
GGAGGATGCTGAGG	SEQ ID NO:29
CAGGAGGATGCTGAGGAGG	SEQ ID NO:30
GGCTGCCATGGTCCC	SEQ ID NO:31
TCATGGTGTCCTTTGCAGCC	SEQ ID NO:32
TCATGGTGTCCTTTGCAG	SEQ ID NO:33

EKSEMPLER:

5 1) N-(4-metoksytrifenylmetoksy)etylaminometanfosfonsyredi-(2-(p-nitrofenyl)etyl)ester

- 1a) N-fluorenylmetyloksykarbonyl-2-aminoetanol
 8,61 g (0,141 mol) 2-aminoetanol ble oppløst i 250 ml dioksan og 150 ml H₂O. Ved 15-
 10 20°C ble det først tilsatt 17,79 g (0,212 mol) NaHCO₃, deretter porsjonsvis 50 g (0,148
 mol) fluorenylmetyloksykarbonyl-N-succinimid. Det ble omrørt 1 time ved
 romtemperatur, deretter ble det inndampet til tørrhet. Resten ble fordelt mellom
 diklormetan (DCM) og H₂O, den organiske fasen ble tørket over Na₂SO₄ og
 oppløsningsmidlet ble avdampet i vakuum. Resten ble utrustet med 100 ml eter,
 15 produktet ble frasuget og vasket godt med eter. Utbyttet utgjorde 38,77 g (97%).

MS (ES+): 284,2 [M+H]⁺;

- ¹H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS): δ = 3,05 (dd, 2H, CH₂OH); 3,39 (dd, 2H, N-
 CH₂); 4,25 (m, 3H, Ar-CH-CH₂); 4,61 (t, 1H, OH); 7,14-7,98 (m, 15H,
 20 Ar-H, NH).

1b) N-fluorenylmetyloksykarbonyl-2-amino-1-(4-metoksytrifenylmetoksy)etan

10 g (35,3 mmol) N-fluorenylmetyloksykarbonyl-2-aminoetanol (fra eksempel 1a), oppløst i 100 ml abs. N,N-dimetylformamid (DMF) ble ved 0°C blandet med 5,93 g (45,93 mmol) diisopropyletylamin (DIPEA) og 10,91 g (35,3 mmol) 4-metoksytrifenylnetylklorid og først omrørt i 1 time ved 0°C, deretter 1 time ved romtemperatur.

5 Reaksjonsblandingen ble inndampet og fordelt mellom DCM og en mettet, vandig NaHCO₃-oppløsning. Den organiske fasen ble vasket med H₂O, tørket over Na₂SO₄ og oppløsningsmidlet ble avdampet i vakuum. For rensing ble det kromatografert over kiselgel (først n-heptan/eddiksyreetyler (EE)/trietylamin (TEA) 70/29/1; deretter EE/TEA 99/1). Utbyttet utgjorde 14,4 g (73%).

10

MS (FAB): 562,3 [M+Li]⁺;

¹H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS): δ = 2,95 (t, 2H, CH₂OH-MMTr); 3,21 (dd, 2H, N-CH₂); 3,75 (m, 3H, Ar-CH-CH₂); 4,61 (t, 1H, OH); 6,80-7,96 (m, 23H, Ar-H, NH).

15

1c) 2-amino-1-(4-metoksytrifenylnetylmetoksy)etan

5,0 g (9 mmol) N-fluorenylmetyloksykarbonyl-2-amino-1-(4-metoksytrifenylnetylmetoksy)etan (fra eksempel 1b), oppløst i 50 ml abs. DMF ble ved romtemperatur blandet med 6,55 g (90 mmol) dietylamin og omrørt i 2 timer. For rensing ble det kromatografert på kiselgel (først n-heptan/EE/TEA 40/49/1; deretter EE/metanol/TEA 79/20/1). Utbyttet utgjorde 2,96 g (98,7%).

20

MS (ES⁺): 340,3 [M+Li]⁺;

¹H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS): δ = 2,75 (t, 2H, CH₂O-MMTr); 2,93 (dd, 2H, N-CH₂); 3,75 (s, 3H, OCH₃); 6,83-7,47 (m, 14H, Ar-H).

25

1d) 2-metylimino-1-(4-metoksytrifenylnetylmetoksy)etan (trimer)

2,96 g (8,9 mmol) 2-amino-1-(4-metoksytrifenylnetylmetoksy)etan (fra eksempel 1c), oppløst i 10 ml metanol ble under isavkjøling blandet med 1,08 g (13,22 mmol) 37% formaldehyd og omrørt i 4 timer ved romtemperatur, hvorved det ble dannet et seigt bunnfall. Reaksjonsblandingen ble inndampet og for rensing kromatografert over kiselgel (n-heptan/EE/TEA 50/49/1). Utbyttet utgjorde 1,7 g (55%).

30

MS (FAB): 1042,8 [M+Li]⁺; 1034,8 [M+H]⁺.

35 ¹H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS): δ = 2,60 (t, 6H, O-CH₂); 2,99 (t, 6H, N-CH₂); 3,69 (s, 9H, OCH₃); 6,787,42 (m, 42H, Ar-H).

1e) di(2-(4-nitrofenyl)etyl)fosfitt

23,42 g (0,1 mol) difenyfosfitt ble sammen med 33,43 g (0,2 mol) p-nitrofenyletanol oppvarmet under argon i 14 timer til 100°C., for rensing ble det kromatografert på over kiselgel (n-heptan/EE 50/50; deretter EE/metanol 80/20). Utbytte: 55%

5

MS (FAB): 403,1 [M+Na]⁺; 381,1 [M+H]⁺.

¹H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS): δ = 3,03 (t, 4H, Ar-CH₂); 4,20 (4H, dt, O-CH₂);

6,71 (d, J=140 Hz, 1H, PH); 7,52 (d, 4H, Ar-H); 8,17 (d, 4H, Ar-H).

10 1f) N-(4-metoksytrifenylmetoksy)etylaminometanfosfonsyredi(2-(p-nitrofenyl)etyl)ester

Til 500 mg (1,32 mmol) di(2-(4-nitrofenyl)etyl)fosfitt (fra eksempel 1e), oppløst i 2 ml abs. tetrahydrofuran (THF) ble det tilsatt 341 mg (0,329 mmol) 2-metylimino-1-(4-metoksytrifenylmetoksy)etan (trimer) (fra eksempel 1d) og blandingen ble omrørt i 3 timer ved 80°C. Oppløsningsmidlet ble avdampet og det ble omrørt i ytterligere 30 minutter ved 100°C. For rensing ble det kromatografert over kiselgel (først EE/TEA 99/1; deretter EE/metanol/TEA 90/9/1). Utbytte: 83%.

MS (FAB): 732,2 [M+Li]⁺;
20 ¹H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS): δ = 2,64-3,06 (m, 10H, Ar-CH₂ + P-CH₂ + CH₂-OMMTr + N-CH₂); 3,73 (s, 3H, OCH₃); 4,16 (dt, 4H, PO-CH₂); 6,78-8,08 (m, 22H, Ar-H).

25 2) N-(⁶-anisoyl)cytosin-1-yl-acetyl-N-(4-metoksytrifenylmetoksy)etylaminometanfosfonsyredi(2-(p-nitrofenyl)etyl)ester

2a) Til 2,00 g (2,76 mmol) N-(4-metoksytrifenylmetoksy)etylaminometanfosfonsyredi(2-(p-nitrofenyl)etyl)ester (fra eksempel 1f), oppløst i 60 ml abs. DMF, ble det tilsatt 0,952 g (8,27 mmol) N-etylmorfolin (NEM), 0,834 g (2,76 mmol) (N⁶-anisoyl)cytosin-1-yl-eddiksyre og 1,153 g (3,03 mmol) O-(7-aza)benzotriazol-1-yltetrametyluroniumheksafluorofosfat (HATU, L.A. Carpino, J. Am. Chem. Soc., 1993, 115, 4397) og det ble omrørt i 12 timer ved romtemperatur. Deretter ble igjen den samme mengden HATU tilsatt og det ble omrørt ytterligere 3 timer ved romtemperatur. For rensing ble det kromatografert på kiselgel (DCM/metanol/TEA 94/4/1). Utbyttet utgjorde 2,7 g (97%).

MS (ES+): 1012,0 [M+H]⁺.

¹H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS): δ = 2,94 (t, 4H, P-O-CH₂-CH₂-Ar); 3,06 (t, 2H, MMTr-O-CH₂); 3,23-3,63 (m, 4H, P-CH₂ + N-CH₂); 3,75 (s, 3H, OCH₃); 3,83 (s, 3H, OCH₃); 4,10 (dt, 4H, P-O-CH₂); 4,79 (s, bred, 2H, CO-CH₂); 6,80-8,18 (m, 28H, Ar-H, cytosinyl-H); 11,03 (s bred, 1H, NH).

2b) Blanding som i eksempel 2a), imidlertid under anvendelse av O-(cyan(etoksykarbonyl)metylenamino)-1,1,3,3-tetrametyluroniumtetrafluorborat (TOTU, EP 0 460 446) istedenfor HATU. Utbyttet utgjorde 57%. Spektroskopiske data: se eksempel 2a).

3) **N-(N⁶-anisoyl)cytosin-1-yl-acetyl-N-(4-metoksytrifenyl-metoksy)etylaminometanfosfonsyre-(2-(p-nitrofenyl)etyl)-monoester (trietylammoniumsalt)**

1 g (0,99 mmol) N-(N⁶-anisoyl)cytosin-1-yl-acetyl-N-(4-metoksytrifenylmetoksy)etylaminometanfosfonsyre-di(2-(p-nitrofenyl)etyl)ester (fra eksempel 2) ble oppløst i 20 ml av en 0,1M oppløsning av 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en (DBU) i abs. acetonitril og omrørt i 4 timer ved romtemperatur. Reaksjonsblandingen ble fordelt mellom DCM og en vandig KH₂PO₄-oppløsning (pH 7), den organiske fasen ble tørket over Na₂SO₄ og oppløsningsmidlet ble avdampet i vakuum. For rensing ble det kromatografert over kiselgel (EE/metanol/TEA 70/29/1). Utbyttet utgjorde 540 mg (57%).

MS (FAB): 906,5 [M-H+2Na]⁺; 884,6 [M+Na]⁺; 862,5 [M+H]⁺.

¹H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS): δ = 3,00 (m, 4H, P-O-CH₂-CH₂-Ar + MMTr-O-CH₂); 3,38-3,60 (m, 4H, P-CH₂ + N-CH₂); 3,73 (s, 3H, OCH₃); 3,82 (s, 3H, OCH₃); 4,01 (dt, 2H, P-O-CH₂); 4,79 & 5,03 (i hvert tilfelle s, bred, 2H, CO-CH₂); 6,78-8,20 (m, 24H, Ar-H, cytosinyl-H); 11,00 (s bred, 1H, NH).

4) **N-(N⁶-anisoyl)cytosin-1-yl-acetyl-N-(2-hydroksy)etyl-aminometanfosfonsyredi(2-(p-nitrofenyl)etyl)ester**

1,00 g (0,99 mmol) N-(N⁶-anisoyl)cytosin-1-yl-acetyl-N-(4-metoksytrifenylmetoksy)etylaminometanfosfonsyredi(2-(p-nitrofenyl)etyl)ester (fra eksempel 2) ble oppløst i 80 ml 80% vandig eddiksyre og omrørt i 4 timer ved romtemperatur. Oppløsningsmidlet ble avdampet og det ble samfordampet to ganger med toluen. For rensing ble det kromatografert over kiselgel (EE/metanol/TEA 85/14/1). Utbyttet utgjorde 522 mg (71%).

10 MS (FAB): 761,2 [M+Na]⁺; 739,3 [M+H]⁺.

¹H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS): δ = 2,98 (t, 4H, P-O-CH₂-CH₂-Ar); 3,38-3,67 (m, 4H, N-CH₂CH₂-OH); 3,80-3,89 (m, 2H, P-CH₂); 3,91 (s, 3H, OCH₃); 4,12 (dt, 4H, P-O-CH₂); 4,78 & 4,87 (i hvert tilfelle s, bred, 2H, CO-CH₂); 6,98-8,19 (m, 14H, Ar-H, cytosinyl-H); 11,02 (s bred, 1H, NH).

15

5) **5'-MMTr-C^{An}-P(ONPE)-C^{An}-P(ONPE)₂**

Syntesen foregikk analogt eksempel 17 fra N-(N⁶-anisoyl)cytosin-1-yl-acetyl-N-(4-metoksytrifenylmetoksy)etylaminometanfosfonsyre(2-(p-nitrofenyl)etyl)monoester (trietylammoniums salt) (eksempel 3) og N-(N⁶-anisoyl)cytosin-1-yl-acetyl-N-(2-

20 hydroksy)etylaminometanfosfonsyredi(2-(p-nitrofenyl)etyl)ester (eksempel 4). For rensing ble det kromatografert over kiselgel (EE/metanol/TEA 85/14/1). Utbytte: 73%.

MS (FAB): 1605 [M+Na]⁺; 1583[M+H]⁺.

¹H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS): δ = 2,94-3,18 (m, 6H, P-O-CH₂-CH₂-Ar); 3,26-3,95 (m, 10H); 3,75 (s, 3H, OCH₃); 3,85 (s, 6H, OCH₃); 3,99-4,36 (m, 25 8H, P-O-CH₂); 4,75-4,92 (m, bred, 4H, CO-CH₂); 6,83-8,18 (m, 38H, Ar-H, cytosinyl-H); 10,98 & 11,03 (i hvert tilfelle s bred, 2H, NH).

6) **5'-HO-C^{An}-P(ONPE)-C^{An}-P(ONPE)₂**

Syntesen foregikk analogt eksempel 4 fra "5'-MMTr-C^{An}-P(ONPE)-C^{An}-P(ONPE)₂"

30 (eksempel 5). For rensing ble det kromatografert over kiselgel (EE/metanol/TEA 85/14/1). Utbyttet utgjorde 74%.

MS (FAB) 1332,4 [M+Na]⁺; 1310,3 [M+H]⁺;

7) **N-(4-metoksytrifenylmetoksy)etylaminometanfosfonyredietyler**

Syntesen foregikk analogt eksempel 1F), imidlertid med dietylfosfitt. Utbytte: 87,5%.

MS (FAB): 490,2 [M+Li]⁺.

- 5 ¹H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS): δ = 1,22 (t, 6H, CH₂-CH₃); 2,80 (t, 2H, N-CH₂);
2,91 (d, J=12,5 Hz, 2H, P-CH₂); 3,02 (t, 2H, CH₂-OMMTri); 3,75 (s, 3H,
OCH₃); 4,01 (dq, 4H, PO-CH₂); 6,84-7,45 (m, 14H, Ar-H).

8) **N-thymin-1-yl-acetyl-N-(4-metoksytrifenylmetoksy)etyl-aminometanfosfonyredietyler**

10

Til 2,04 g (4,22 mmol) N-(4-metoksytrifenylmetoksy)etylaminometanfosfonyredietyler (eksempel 7), oppløst i 50 ml abs. DMF ble det tilsatt 570,3 mg (4,22 mmol) hydroksybenzotriazol (HOBT), 972,1 mg (8,44 mmol) NEM, 777 mg (4,22 mmol) thymidin-1-yl-eddiksyre og 639 mg (5,06 mmol) diisopropylkarbodiimid.

- 15 Det ble omrørt 16 timer ved romtemperatur, oppløsningsmidlet ble avdampet, resten ble oppløst i DCM og ekstrahert med mettet, vandig NaHCO₃-oppløsning, deretter med mettet, vandig NaCl-oppløsning. Det ble tørket over natriumsulfat, oppløsningsmidlet ble avdampet. For rensing ble det kromatografert over kiselgel (EE/metanol/TEA 98/2/1). Utbyttet utgjorde 2,47 g (90%).

20

MS (FAB): 662,3 [M+Na]⁺; 656,3 [M+Li]⁺.

- 25 ¹H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS): δ = 1,12-1,32 (m, 6H, CH₂-CH₃);
1,68 & 1,75 (i hvert tilfelle s, 3H, T-CH₃); 3,10-3,40 (m, 2H, CH₂-
OMMTri); 3,53-3,70 (m, 4H, P-CH₂ + N-CH₂); 3,75 (s, 3H, OCH₃); 3,83-
4,16 (m, 4H, PO-CH₂); 4,62 & 4,72 (i hvert tilfelle s, 2H, CO-CH₂); 6,83-
7,42 (m, 15H, Ar-H, T-H); 11,28 (s, 1H, NH).

9) **N-thymin-1-yl-acetyl-N-(4-metoksytrifenylmetoksy)etyl-aminometanfosfonyremoetyler (trietylammoniumsalt)**

30

811 mg (1,25 mmol) N-thymin-1-yl-acetyl-N-(4-metoksytrifenylmetoksy)etylaminometanfosfonyredietyler (eksempel 8) ble suspendert i 3,75 ml 1N NaOH. Det ble omrørt i 3 timer ved romtemperatur, deretter 6 timer ved 50°C.

Reaksjonsblandingen ble inndampet i vakuum, resten ble kromatografert over kiselgel (EE/metanol/TEA 100/10/10, deretter 100/40/10).

35

Utbyttet utgjorde 897 mg (99,5%).

MS (ES+): 620,4 [M+H].

¹H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS): δ = 1,18 (t, 9H, N-CH₂-CH₃); 1,68 & 1,74 (i hvert tilfelle s, 3H, T-CH₃); 2,96-3,08 (q, 6H, N-CH₂-CH₃); 3,35 (m, 2H, N-CH₂); 3,43-3,70 (d, J=11 Hz, 2H, P-CH₂); 3,63 (t, 2H, CH₂-OMMTr); 3,75 (s, 3H, OCH₃); 3,78 (dq, 2H, PO-CH₂); 4,60 & 4,86 (i hvert tilfelle s, 2H, CO-CH₂); 6,82-7,41 (m, 15H, Ar-H, T-H); 11,24 (s, 1H, NH).

10) N-thymin-1-yl-acetyl-N-(2-hydroksy)etylaminometanfosfonsyredietyler

Syntesen foregikk analogt eksempel 4 fra N-thymin-1-yl-acetyl-N-(4-metoksytrifenylmetoksy)etylaminometanfosfonsyredietyler (eksempel 8). For rensing ble det kromatografert over kiselgel (EE/metanol 90/10). Utbytte: 80%.

MS (FAB): 400,1 [M+Na]⁺; 378,1 [M+H]⁺.

¹H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS): δ = 1,17-1,32 (m, 6H, CH₂-CH₃); 1,78 (s, 3H, T-CH₃); 3,40-3,69 (m, 4H, CH₂-OH + N-CH₂); 3,89 (d, J=11 Hz, 2H, P-CH₂); 3,92-4,19 (m, 4H, PO-CH₂); 4,70 (s, 2H, CO-CH₂); 4,98 (t, 1H, OH); 7,22 & 7,30 (for hver s, 1H, t-H); 11,25 (s, 1H, NH).

11) N-(4-metoksytrifenylmetoksy)etylaminometanfosfonsyredifenylester

Syntesen foregikk analogt eksempel 1f), men imidlertid med dietylfosfitt. Utbytte: 100%.

MS (FAB) 58,2 [M + Li]⁺.

12) N-thymin-1-yl-acetyl-N-(4-metoksytrifenylmetoksy)etylaminometanfosfonsyremonofenylester (trietylammoniumsalt)

Syntesen foregikk analogt eksempel 8) fra N-(4-metoksytrifenylmetoksy)etylaminometanfosfonsyredifenylester (eksempel 11) og thymidin-1-yl-eddiksyre. For rensing ble det kromatografert over kiselgel (EE/metanol/TEA/H₂O 90/10/5/0,5). Utbytte: 47%.

MS (FAB): 682,3 [M+2Li-H]⁺.

¹H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS): δ = 1,16 (t, 9H, N-CH₂-CH₃); 1,67 & 1,72 (for hver s, 3H, T-CH₃); 2,96-3,70 (m, 12H, N-CH₂-CH₃ + N-CH₂ + P-CH₂ + CH₂-OMMTRi); 3,75 (s, 3H, OCH₃); 4,58 & 4,88 (for hver s, 2H, CO-CH₂); 6,74-7,46 (m, 20H, Ar-H, T-H); 11,23 (s, 1H, NH).

13) **N-thymin-1-yl-acetyl-N-(4-metoksytrifenylnitrofenyletyl)etyl-aminometanfosfonsyrefenyl-(4-nitrofenyletyl)diester**

385,4 mg (0,5 mmol) N-thymin-1-yl-acetyl-N-(4-metoksytrifenylnitrofenyletyl)etylaminometanfosfonsyremonofenylester (trietylammoniumsalt)

- 5 (eksempel 12) og 92 mg (0,55 mmol) (4-nitrofenyletanol) ble samfordampet tre ganger med abs. pyridin, deretter oppløst i 15 ml abs. pyridin. Ved 0°C ble det tilsatt 403,4 mg (0,15 mmol) 3-nitro-1-(p-toluensulfonyl)-1H-1,2,4-triazol (TSNT), deretter omrørt i 16 timer ved 0-5°C, pyridinet ble avdestillert i vakuum, resten ble opptatt i EE og etter hverandre vasket med mettet, vandig NaHCO₃-oppløsning, deretter med NaCl-
- 10 oppløsning. For rensing ble det kromatografert over kiselgel (EE/TEA 100/2). Utbyttet utgjorde 162 mg.

MS (FAB): 831,3 [M+2Li-H]⁺; [M+Li]⁺.

15 14) **N-thymin-1-yl-acetyl-N-(4-metoksytrifenylnitrofenyletyl)etyl-aminometansfosfonsyredi(2-(p-nitrofenyl)etyl)ester**

Syntesen foregikk analogt eksempel 8 fra N-(4-metoksytrifenylnitrofenyletyl)etylaminometanfosfonsyredi(2-(p-nitrofenyl)etyl)ester (eksempel 1f) og thymidin-1-yl-eddiksyre.

- 20 Utbytte: 63%.

MS (ES⁺): 898,4 [M+Li]⁺.

- ¹H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS): δ = 1,65 & 1,72 (for hver s, 3H, T-CH₃); 2,96 (t, 4H, P-O-CH₂-CH₂-Ar); 3,06 (t, 2H, N-CH₂); 3,67 (d, J=11 Hz, 2H, P-CH₂); 3,70 (m, 2H, MMTr-O-CH₂); 3,75 (s, 3H, OCH₃); 3,83 (s, 3H, OCH₃); 4,10 (dt, 4H, P-O-CH₂); 4,59 & 4,62 (for hver s, bred, 2H, CO-CH₂); 6,83-8,18 (m, 23H, Ar-H, T-H); 1,30 (s bred, 1H, NH).
- 25

30 15) **N-thymin-1-yl-acetyl-N-(4-metoksytrifenylnitrofenyletyl)etyl-aminometanfosfonsyre-(4-nitrofenyletyl)monoester (trietylammoniumsalt)**

15a) Fra 30 mg N-thymin-1-yl-acetyl-N-(4-metoksytrifenylnitrofenyletyl)etylaminometanfosfonsyrefenyl-(4-nitrofenyletyl)diester (eksempel 13)

- 30 mg N-thymin-1-yl-acetyl-N-(4-metoksytrifenylnitrofenyletyl)etylaminometanfosfonsyrefenyl-(4-nitrofenyletyl)diester (eksempel 13) ble oppløst i en blanding av 1 ml TEA, 1 ml dioksan og 80 mg p-nitrobenzaldoksim og ble omrørt i 3 timer ved romtemperatur. Oppløsningsmidlet ble avdampet i vakuum, resten ble

samfordampet tre ganger med pyridin og to ganger med toluen. Resten ble kromatografert over kiselgel (EE/TEA 100/2, deretter EE/metanol/TEA 60/40/2). Utbyttet utgjorde 23 mg.

5 MS (FAB): 755,3 [M+2Li]⁺.

¹H-NMR (250 MHz, DMSO, TMS): δ = 1,15 (t, 9H, N-CH₂-CH₃); 1,60 & 1,79 (m, 3H, T-CH₃); 2,80-3,3,60 (m, 14H, N-CH₂-CH₃ + N-CH₂ + P-CH₂ + CH₂-OMMTi + Ar-CH₂); 3,73 (s, 3H, OCH₃); 4,01 (dt, 2H, P-O-CH₂); 4,58-4,92 (m, 2H, CO-CH₂); 6,82-8,18 (m, 19H, Ar-H, T-H); 11,30 (s, 1H, NH).

10

15b) Fra N-thymin-1-yl-acetyl-N-(4-metoksytrifenylnmetoksy)etylaminometanfosfonsyredi(2-(p-nitrofenyl)etyl)ester (eksempel 14).

Syntesen foregikk analogt eksempel 3 fra N-thymin-1-yl-acetyl-N-(4-

15 metoksytrifenylnmetoksy)etylaminometanfosfonsyredi(2-(p-nitrofenyl)etyl)ester (eksempel 14), men i pyridin som oppløsningsmiddel. Utbytte: 82%. Spektroskopiske data se eksempel 15a).

16) **N-thymin-1-yl-acetyl-N-(4-metoksytrifenylnmetoksy)etylaminometanfosfonsyre**

20

Syntesen foregikk analogt eksempel 15b). Som biprodukt oppnås i 18% utbytte N-thymin-1-yl-acetyl-N-(4-metoksytrifenylnmetoksy)etylaminometanfosfonsyre.

MS (ES⁻): 592,2 [M-H].

25

17) **5'-MMTr-T-P(O-etyl)-T-P(O-etyl)₂**

361 mg (0,5 mmol) N-thymin-1-yl-acetyl-N-(4-metoksytrifenylnmetoksy)etylaminometanfosfonsyremonoetylester (trietylammoniumsalt) (IX) og 188,7 mg (0,5 mmol) N-thymin-1-yl-acetyl-N-(2-

30 hydroksy)etylaminometanfosfonsyredietyler (X) ble sammen koevaporert to ganger med abs. pyridin, deretter oppløst i 10 ml abs. pyridin. Ved 5-10°C ble det tilsatt 1,5 mmol TSNT og det ble omrørt i 16 timer ved romtemperatur. Pyridinet ble avdampet i vakuum, resten ble oppløst i EE og etter hverandre vasket med mettet, vandig NaHCO₃-oppløsning, deretter med NaCl-oppløsning. Det ble tørket over Na₂SO₄, inndampet og
35 for rensing kromatografert over kiselgel (EE/metanol/TEA 92/8/2). Utbyttet utgjorde 223 mg (46%).

MS (FAB): 987,5 [M+Li]⁺.

¹H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS): Karakteristiske signaler er: Ar-H & thymin-H: 6,82-7,43 (m, 16H); CO-CH₂: 4,59-4,78 (m, 4H); thymin-CH₃: 1,63-1,80 (m, 6H).

5

18) 5'-HO-T-P(O-etyl)-T-P(O-etyl)₂

Syntesen foregikk analogt eksempel 4 fra 5'-MMTr-T-P(O-etyl)-T-P(O-etyl)₂ (eksempel 17). For rensing ble det kromatografert over kiselgel (EE/metanol/TEA 85/15/2, deretter 100/50/1,5). Utbyttet utgjorde 95%.

10

MS (FAB): 731,2 [M+Na]⁺; 709,1 [M+H]⁺.

¹H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS): Karakteristiske signaler er: thymin-H: 7,21-7,36 (m, 2H); CO-CH₂: 4,60-4,76 (m, 4H); thymin-CH₃: 1,63-1,79 (m, 6H).

15) 19) 5'-MMTr-T-P(O-fenyl)-T-P(O-etyl)₂

Syntesen foregikk analogt eksempel 17 fra N-thymin-1-yl-acetyl-N-(2-hydroksy)etylaminometanfosfonsyrediester (eksempel 10) og N-thymin-1-yl-acetyl-N-(4-metoksytrifenylmetoksy)etylaminometanfosfonsyremonofenylester (trietyl-ammoniums salt) (eksempel 12). For rensing ble det kromatografert over kiselgel

(EE/metanol/TEA 93/7/2). Utbytte: 58%

MS (FAB): 1051,4 [M+Na]⁺; 1029,5 [M+H]⁺.

¹H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS): Karakteristiske signaler er: Ar-H & thymin-H: 6,82-7,53 (m, 21H); CO-CH₂: 4,52-4,82 (m, 4H); thymin-CH₃: 1,62-1,80 (m, 6H).

25

20) N-thymin-1-yl-acetyl-N-(2-hydroksyetyl)aminometanfosfonsyredi(4-nitrofenyletyl)ester

Syntesen foregikk analogt eksempel 4 fra N-thymin-1-yl-acetyl-N-(4-metoksytrifenylmetoksy)etylaminometanfosfonsyredi(2-(p-nitrofenyl)etyl)ester (eksempel 14). For rensing ble det kromatografert over kiselgel (EE/metanol 90/10). Utbytte: 85%

30

MS (ES⁺): 620,3 [M+H]⁺.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO, TMS): δ = 1,73 (s, 3H, T-CH₃); 2,97 (t, 4H, P-O-CH₂-CH₂-Ar); 3,41 (m, 2H, N-CH₂); 3,59 (m, 2H, CH₂-OH); 3,83 (d, 2H, J=11 Hz, P-CH₂); 4,08-4,30 (m, 4H, P-O-CH₂); 4,54 & 4,78 (for hver s, bred, 2H, CO-CH₂); 4,99 (t, 1H, OH); 7,14-8,19 (m, 9H, Ar-H,

35

thymidinyl-H); 11,30 (s bred, 1H, NH).

21) 5'-MMTr-T-P(ONPE)-T-P(O-etyl)₂

Syntesen foregikk analogt eksempel 17 fra N-thymin-1-yl-acetyl-N-(2-
5 hydroksy)etylaminometanfosfonsyredietyler (eksempel 10) og N-thymin-1-yl-acetyl-
N-(4-metoksytrifenylnitro)etylaminometanfosfonsyre-(4-nitrofenyletyl)monoester
(trietylammoniumsalt) (eksempel 15). I stedet for TSNT ble det anvendt 3-nitro-1-(2,4,6-
triisopropylfenylsulfonyl)-1H-1,2,4-triazol (TIPSNT) for kobling. For rensing ble det
10 kromatografert over kiselgel (EE/metanol/TEA 95/5/2, deretter 90/10/2). Utbytte:
>90%.

MS (ES+): 1109,0 [M+Li]⁺.

¹H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS): Karakteristiske signaler er: Ar-H & thymin-H:
6,82-81,18 (m, 20H); CO-CH₂: 4,51-4,76 (m, 4H); thymin-CH₃: 1,61-1,78
15 (m, 6H).

22) 5'-MMTr-T-P(ONPE)-T-P(OEt)₂

Syntesen foregikk analogt eksempel 21 fra N-thymin-1-yl-acetyl-N-(2-
hydroksy)etylaminometanfosfonsyredietyler (eksempel 10) og N-thymin-1-yl-acetyl-
20 N-(4-metoksytrifenylnitro)etylaminometanfosfonsyre-(4-nitrofenyletyl)monoester
(trietylammoniumsalt) (eksempel 15). I stedet for TSNT ble det anvendt 3-nitro-1-(2,4,6-
triisopropylfenylsulfonyl)-1H-1,2,4-triazol (TIPSNT) for kobling. Utbytte: >90%.

Spektroskopiske data, se eksempel 21.

25

23) 5'-HO-T-P(ONPE)-T-P(OEt)₂

Syntesen foregikk analogt eksempel 4 fra "5'-MMTr-T-P(ONPE)-T-P(OEt)₂"

(eksempel 22). For rensing ble det kromatografert over kiselgel (EE/metanol/TEA
90/10/2, deretter 80/20/2). Utbyttet utgjorde 75%.

30

MS (ES+): 836,3 [M+Li]⁺.

¹H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS): Karakteristiske signaler er: Ar-H & thymin-H:
7,11-8,22 (m, 6H); CO-CH₂: 4,55-4,77 (m, 4H); thymin-CH₃: 1,71 (s,
bred, 6H).

35

24) 5'-HO-T-P(OH)-T-P(O-etyl)₂

10 mg (0,012 mmol) "5'-HO-T-P(ONPE)-T-P(OEt)₂" (eksempel 23) ble oppløst i 1 ml av en 0,5M oppløsning DBU i pyridin og først omrørt 24 timer ved 4°C, deretter 24 timer ved romtemperatur. Oppløsningsmidlet ble avdampet i vakuum, resten ble digerert
 5 to ganger med pentan, deretter to ganger med eter, deretter ble for rensing kromatografert over kiselgel (EE/metanol/TEA 9/1/0,2, deretter 70/30/2, deretter 60/40/2). Utbytte: 10,2 mg

MS (FAB): 725,3 [M+2Na-H]⁺; 703,3 [M+Na]⁺.

10 ¹H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS): Karakteristiske signaler er: Thymin-H: 7,15-7,70 (m, 2H); CO-CH₂: 4,67-4,92 (m, 4H); thymin-CH₃: 1,67-1,81 (m, 6H).

25) 5'-MMTr-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(OEt)₂

Syntesen foregikk analogt eksempel 17 fra "5'-HO-T-P(ONPE)-T-P(OEt)₂" (eksempel
 15 22) og N-thymin-1-yl-acetyl-N-(4-metoksytrifenylnitro)etylaminometanfosfonsyre-(4-nitrofenyletyl)monoester (trietylammoniumsalt) (eksempel 15) under tilsats av 1,5 ekv. (relativt til eksempel 23) 4-metoksy-pyridin-N-oksyd. For rensing ble det kromatografert over kiselgel (EE/metanol/TEA 90/10/2, deretter 85/15/2). Utbyttet: 61%.

20 MS (ES⁺): 1555,8 [M+H]⁺.

¹H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS): Karakteristiske signaler er: Ar-H & thymin-H: 6,83-8,220 (m, 25H); CO-CH₂: 4,52-4,75 (m, 6H); thymin-CH₃: 1,61-1,78 (m, 9H).

26) 5'-HO-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(OEt)₂

Syntesen foregikk analogt eksempel 4 fra "5'-MMTr-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(OEt)₂" (eksempel 25). For rensing ble det kromatografert over kiselgel (EE/metanol/TEA 70/30/2. Utbyttet utgjorde 89%.

30 MS (ES⁺): 1283,1 [M+H]⁺.

27) 5'-MMTr-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-(OEt)₂

Syntesen foregikk analogt eksempel 17 fra "5'-HO-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(OEt)₂"
 35 (eksempel 26) og N-thymin-1-yl-acetyl-N-(4-metoksytrifenylnitro)etylaminometanfosfonsyre-(4-nitrofenyletyl)monoester (trietylammoniumsalt) (eksempel 15) under tilsats av 1,5 ekv. (relativt til eksempel 23) 4-metoksy-pyridin-N-

oksyd. For rensing ble det kromatografert over kiselgel (EE/metanol/TEA 90/10/2, deretter 80/20/2). Utbytte: 15%.

MS (ES+): 2007 [M+H]⁺; 2029 [M+Na]⁺.

- 5 ¹H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS): Karakteristiske signaler er: Ar-H & thymin-H: 6,79-8,21 (m, 30H); CO-CH₂: 4,53-4,87 (m, 8H); thymin-CH₃: 1,58-1,89 (m, 12H).

28) 5'-HO-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(OEt)₂

- 10 Syntesen foregikk analogt eksempel 4 fra "5'-MMTr-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(OEt)₂" (eksempel 27). For rensing ble det kromatografert over kiselgel (EE/metanol/TEA 70/30/2. Utbyttet utgjorde 55%.

MS (FAB): 17353 [M+H]⁺; 1757 [M+Na]⁺.

15

29) 5'-MMTR-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)₂

- Syntesen foregikk analogt eksempel 17 fra N-thymin-1-yl-acetyl-N-(2-hydroksyetyl)aminometanfosfonsyredi(4-nitrofenyletyl)ester (eksempel 20) og N-thymin-1-yl-acetyl-N-(4-metoksytrifenylmetoksy)etylaminometanfosfonsyre-(4-nitrofenyletyl)monoester (trietylammoniumsalt) (eksempel 15). For rensing ble det
- 20 kromatografert over kiselgel (EE/metanol/TEA 100/0/1, deretter 90/10/1). Utbytte: 87%

MS (FAB): 1356,2 [M+2Li-H]⁺.

- 25 ¹H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS): Karakteristiske signaler er: Ar-H & thymin-H: 6,82-8,18 (m, 28H); CO-CH₂: 4,50-4,71 (m, 4H); thymin-CH₃: 1,59-1,78 (m, 6H).

30) 5'-HO-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)₂

- Syntesen foregikk analogt eksempel 4 fra "5'-MMTr-T-P(ONPE)₂" (eksempel 29). For rensing ble det kromatografert over kiselgel (EE/metanol/TEA 85/15/1, deretter 80/20/1). Utbytte utgjorde 78%.

MS (ES+): 1072,7 [M+H]⁺.

- 35 ¹H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS): Karakteristiske signaler er: Ar-H & thymin-H: 7,08-8,20 (m, 14H); CO-CH₂: 4,52-4,80 (m, 4H); thymin-CH₃: 1,70 (s, bred, 6H).

31) 5'-MMTR-C^{An}-P(ONPE)-C^{An}-P(ONPE)-C^{An}-P(ONPE)₂

Syntesen foregikk analogt eksempel 17 fra N-(N⁶-anisoyl)cytosin-1-yl-acetyl-N-(4-metoksytrifenylnitrofenyl)etylaminometanfosfonisyre(2-(p-nitrofenyl)etyl)monoester (trietylammoniumsalt) (eksempel 3) og "5'-HO-C^{An}-P(ONPE)-C^{An}-P(ONPE)-C^{An}-P(ONPE)₂" (eksempel 6). For rensing ble det kromatografert over kiselgel (EE/metanol/TEA 80/19/1). Utbytte: 66%.

MS (FAB): 2155 [M+H]⁺; 2161 [M+Li]⁺; 2177 [M+Na]⁺.

10 32) 5'-HO-C^{An}-P(ONPE)-C^{An}-P(ONPE)-C^{An}-P(ONPE)₂

Syntesen foregikk analogt eksempel IV fra "5'MMTr-C^{An}-P(ONPE)-C^{An}-P(ONPE)-C^{An}-P(ONPE)₂" (eksempel 31). For rensing ble det kromatografert over kiselgel (EE/metanol/TEA 81/15/1, deretter 80/20/1). Utbyttet utgjorde 70%.

15 MS (FAB): 1882 [M+H]⁺; 1904 [M+Na]⁺.

33) N-(N⁶-anisoyl)cytosin-1-yl-acetyl-N-(4-metoksytrifenylnitrofenyl)etylaminometanfosfonisyre-allyl-(2-(p-nitrofenyl)etyl)diester

20 Syntesen foregikk analogt eksempel 17 fra N-(N⁶-anisoyl)cytosin-1-yl-acetyl-N-(4-metoksytrifenylnitrofenyl)etylaminometanfosfonisyre(2-(p-nitrofenyl)etyl)monoester (trietylammoniumsalt) (eksempel 3) og allylalkohol. For rensing ble det kromatografert over kiselgel (EE/metanol/TEA 95/5/1).

25 MS (ES⁺): 902,1 [M+H]⁺; 924,1 [M+Na]⁺.

¹H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS): δ = 2,94-3,70 (m, 8H, P-O-CH₂-CH₂-Ar + MMTR-O-CH₂ + N-CH₂ + P-CH₂); 3,75 (s, 3H, OCH₃); 3,86 (s, 3H, OCH₃); 4,10-4,60 (m, 4H, P-O-CH₂); 4,79 & 4,84 (hver s, bred, 2H, CO-CH₂); 5,09-5,39 (m, 2H, H₂C=CH-); 5,71-6,00 (m, 1H, H₂C=CH-); 6,83-

30 8,19 (m, 24H, Ar-H, cytosinyl-H); 11,03 (s bred, 1H, NH).

34) N-(N⁶-anisoyl)cytosin-1-yl-acetyl-N-(2-hydroksyetylaminometanfosfonisyre-allyl-(2-(p-nitrofenyl)etyl)diester

35 Syntesen foregikk analogt eksempel 4 fra N-(N⁶-anisoyl)cytosin-1-yl-acetyl-N-(4-metoksytrifenylnitrofenyl)etylaminometanfosfonisyre-allyl-(2-(p-nitrofenyl)etyl)diester (eksempel 33). For rensing ble det kromatografert over kiselgel (EE/metanol/TEA 94/5/1). Utbyttet utgjorde 83%.

MS (Es+): 630,2 [M+H]⁺.

¹H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS): δ = 3,02 (t, 2H, P-O-CH₂-CH₂-Ar); 3,37-3,71 (m, 4H, HO-CH₂-CH₂); 3,86 (s, 3H, OCH₃); 3,91 (d, J=11 Hz, 2H, P-CH₂); 4,22 (dt, 2H, P-O-CH₂-CH₂-Ar); 4,40 (dd, 2H, O-CH₂-CH=CH₂); 4,78&5,01 (m, 2H, CO-CH₂); 5,11-5,33 (m, 2H, H₃C=CH-); 5,71-6,00 (m, 1H, H₂C=CH-); 6,99-8,21 (m, 14H, Ar-H, cytosinyl-H); 11,03 (s bred, 1H, NH).

10 **35) N-thymin-1-yl-acetyl-N-(4-metoksytrifenylmetoksy)etylaminometanfosfosytre-allyl-(2-(p-nitrofenyl)etyl)diester**

Syntesen foregikk analogt eksempel 17 fra N-thymin-1-yl-acetyl-N-(4-metoksytrifenylmetoksy)etylaminometanfosfosytre-(4-nitrofenyletyl)monoester (trietylammoniumsalt, eksempel 15) og allylalkohol. For rensing ble det kromatografert over kiselgel (EE/metanol/TEA 97/3/2). Utbyttet utgjorde 100%.

MS (FAB): 805,3 [M+Na]⁺.

20 **36) N-thymin-1-yl-acetyl-N-(2-hydroksy)etylaminometanfosfosytre-allyl-(2-(p-nitrofenyl)etyl)diester**

Syntesen foregikk analogt eksempel 4 fra N-thymin-1-yl-acetyl-N-(4-metoksytrifenylmetoksy)etylaminometanfosfosytre-allyl-(2-(p-nitrofenyl)etyl)diester (eksempel 35). For rensing ble det kromatografert over kiselgel (EE/metanol/TEA 90/10/2). Utbyttet utgjorde 86%.

25 MS (ES+): 511,1 [M+H]⁺.

37) 5'-MMTR-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)(O-allyl)

30 Syntesen foregikk analogt eksempel 17 fra N-thymin-1-yl-acetyl-N-(2-hydroksy)etylaminometanfosfosytre-allyl-(2-(p-nitrofenyl)etyl)diester (eksempel 36) og N-thymin-1-yl-acetyl-N-(4-metoksytrifenylmetoksy)etylaminometanfosfosytre-(4-nitrofenyletyl)monoester (trietylammoniumsalt) (eksempel 15). For rensing ble det kromatografert over kiselgel (EE/metanol/TEA 90/10/2). Utbytte: 90%

MS (FAB): 1257,3 [M+Na]⁺.

38) 5'-MMTr-T-(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(OEt)₂

Syntesen foregikk analogt eksempel 17 fra "5'-HO-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(OEt)₂"

(eksempel 28) og N-thymin-1-yl-acetyl-N-(4-metoksytrifenylmetoksy)etylaminometanfosfonsyre-(4-nitrofenyletyl)monoester

5 (trietylammoniumsalt) (eksempel 15). For rensing ble det kromatografert over kiselgel (EE/metanol/TEA 80/20/2). Utbytte: 57%.

MS (FAB): 2460 [M+H]⁺; 2482 [M+Na]⁺.

10 39) 5'-HO-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(OEt)₂

Syntesen foregikk analogt eksempel 4 fra "5'-MMTr-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(OEt)₂" (eksempel 38). For rensing ble det kromatografert over kiselgel (EE/metanol/TEA 70/30/2). Utbyttet utgjorde 55%.

15 MS (FAB): 2209 [M+Na]⁺.

40) 5'-HO-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OEt)₂

4,0 mg (0,00183 mmol) "5'-HO-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(OEt)₂" (eksempel 39) ble oppløst i 1,1 ml av en 0,5 molar oppløsning av DBU i

20 pyridin og omrørt i 24 timer ved romtemperatur. Reaksjonsblandingen ble inndampet i vakuum, resten ble flere ganger rørt ut med toluen. Oppløsningsmidlet ble fjernet ved hjelp av en sprøyte, resten ble flere ganger utrørt med pentan, oppløsningsmidlet ble igjen fjernet med en sprøyte. Produktet ble tørket i vakuum. Utbyttet utgjorde 4 mg av et sterkt hygroskopisk pulver.

25

MS (ES⁺): 1589,7 [M-H]⁻; 1611,8 [M+Na-2H]⁻.

41) 5'-MMTr-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(OEt)₂

30 a) Syntese analogt eksempel 17 fra "5'-HO-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(OEt)₂" (eksempel 39) og N-thymin-1-yl-acetyl-N-(4-metoksytrifenylmetoksy)etylaminometanfosfonsyre-(4-nitrofenyletyl)monoester (trietylammoniumsalt) (eksempel 15). For rensing ble det kromatografert over kiselgel (EE/metanol/TEA 80/20/2, deretter 70/30/2).

35

MS (FAB): 2934 [M+Na]⁺, 2957 [M+2Na-H]⁺, 2978 [M+3Na-2H]⁺.

b) Syntese analogt eksempel 17 fra "5'-HO-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(OEt)₂" (eksempel 28) og "5'-MMTr-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)(OH)" (eksempel 42). For rensing ble det kromatografert over kiselgel (EE/metanol/TEA 80/20/2, deretter 70/30/2). Målfraksjonen ble inndampet i vakuum, deretter triturert med pentan og eter. MS som

5 ovenfor.

42) 5'-MMTr-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)(OH)

24,7 mg (0,02 mmol "5'-MMTr-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)(O-alkyl)" (eksempel 37) ble oppløst sammen med 16,2 mg (0,12 mmol) dietylammoniumhydrogenkarbonat i 2 ml abs. DCM. Ved 15-20°C ble det tildryppet en oppløsning av 13,9 mg (0,012 mmol)

10 tetrakis(trifenylfosfin)palladium (0) og 2,1 mg (0,008 mmol) trifenylfosfin i 2 ml abs. DMC i løpet av 2 minutter. Det ble omrørt i 30 minutter ved romtemperatur. For rensing ble reaksjonsblandingen kromatografert over kiselgel (EE/metanol/TEA 80/20/1, deretter 60/40/1). Produktfraksjonen ble inndampet i vakuum, resten ble triturert med

15 pentan, deretter med EE/eter, deretter igjen med pentan og tørket i vakuum. Utbytte: 57%.

MS (ES-): 1193,6 [M-H]⁻.

¹H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS): Karakteristiske signaler: δ = 1,67 & 1,72 (hver s, 3H, T-CH₃); 4,60 & 4,82 (hver s, 2H, CO-CH₂); 6,83-8,19 (m, 24H, Ar-H, T-H);

20

43) 5'-HO-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(OEt)₂

25 Syntese analogt eksempel 4 fra "5'-MMTr-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(OEt)₂" (eksempel 41). Etter avsluttet reaksjon ble reaksjonsblandingen inndampet, resten ble koevaporert tre ganger med toluen, deretter utrørt først med EE/eter, deretter med pentan. Resten ble tørket i vakuum.

30 MS (FAB): 2662 [M+Na]⁺.

44) 5'-HO-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)(O-allyl)

Syntese analogt eksempel 4 fra 5-MMTR-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)(O-allyl) (eksempel 37). For rensing ble det kromatografert over kiselgel (EE/metanol/TEA 90/10/1, deretter

35 80/20/1). Utbyttet utgjorde 87%.

MS (FAB): 963,0 [M+H]⁺; 98,5,1 [M+Na]⁺.

45) **5'-MMTr-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)(OH)**

a) **5'-MMTr-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-(O-allyl)**

5 Syntese analogt eksempel 17 fra "5'-HO-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)(O-allyl)" (eksempel 44) og N-thymin-1-yl-acetyl-N-(4-metoksytrifenylmetoksy)etylaminometanfosfonsyre-(4-nitrofenyletyl)monoester (trietylammoniums salt) (eksempel 15). For rensing ble det kromatografert over kiselgel (EE/metanol/TEA 90/10/1, deretter 85/15/1). Utbytte: 55%

10 b) **5'-MMTr-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)(OH)**

"5'-MMTr-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)(O-allyl)" (eksempel 45a) ble omsatt som beskrevet i eksempel 42 med tetrakis(trifenylfosfin)palladium (0). For rensing ble det kromatografert over kiselgel (EE/metanol/TEA 80/20/2, deretter 70/30/2).

Produktfraksjonen ble inndampet i vakuum, resten ble triturerert med pentan og eter.

15 Utbytte: 98%.

MS (ES+; LiCl): 1654,1 [M+Li]⁺.

46) **5'-MMTr-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(OEt)₂**

20 Syntese analogt eksempel 17 fra N-thymin-1-yl-acetyl-N-(2-hydroksy)etylaminometanfosfonsyredietyler (eksempel 10) og "5'-MMTr-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)(OH)" (eksempel 45b). For rensing ble det kromatografert over kiselgel (EE/metanol/TEA 90/10/2, deretter 80/20/2).

Opparbeidelse, rensing og karakterisering som i eksempel 27.

25

47) **5'-MMTr-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(OEt)₂**

Syntese analogt eksempel 17 fra "5'-HO-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(OEt)₂"

(eksempel 26) og "5'-MMTr-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)(OH)" (eksempel

30 45b). For rensing ble det kromatografert over kiselgel (EE/metanol/TEA 80/20/2).

Produktfraksjonen ble inndampet i vakuum, koevaporert med toluen og renses ved preparativ HPLC (høytrykksvæskekromatografi): "RP8 LiChrospher60", vann/acetonitril: 1/1; 0,1% ammoniumacetat; 1 ml/min.) R_f = 12,97 min.

48) 5'-HO-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OEt)₂

a) 5-HO-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(OEt)₂

Syntese analogt eksempel 4 fra (5'-MMTr-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(OEt)₂)" (eksempel 47). For rensing ble det kromatografert

5 over kiselgel (EE/metanol/TEA 70/30/2, deretter 60/40/2). Produktfraksjonen ble inndampet i vakuum, resten ble utrørt først med pentan, deretter med eter og tørket i vakuum. Utbytte: 100%.

MS (FAB): 2662 [M+Na]⁺, 2684 [M+2Na-H]⁺, 2706 [M+3Na-2H]⁺.

10

b) "5-HO-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OEt)₂

"5'-HO-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(OEt)₂"

(eksempel 48a) ble omsatt analogt eksempel 40 med DBU og opparbeidet.

15 MS (ES-): 1892 [M-H]⁻; 1915 [M+Na-2H]⁻.

49) 5'-MMTr-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(OEt)₂

Syntese analogt eksempel 17 fra "5'-HO-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(OEt)₂" (eksempel 28) og "-5-MMTr-T-P(ONPE)-

20

-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)(OH)" (eksempel 45b). For rensing ble det kromatografert over kiselgel (EE/metanol/TEA 80/20/2, deretter 70/30/2). Produktfraksjonen ble inndampet i vakuum, koevaporert med toluen og renset ved preparat HPLC: "RP8 LiChrospher60", vann/acetoneitril: 1/1; 0,1% ammoniumacetat; 1 ml/min.) R_f = 15,24

25 min.

MS (FAB): 3386 [M+Na]⁺, 3409 [M+2Na-H]⁺.

50) 5'-OH-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(OEt)₂

30

Syntese analogt eksempel 4 fra "5'-MMTr-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(OEt)₂" (eksempel 49). For rensing ble det inndampet i vakuum, koevaporert med toluen tre ganger, resten ble først utrørt med pentan, deretter med eter og ble tørket i vakuum. Utbytte: >90%.

35

MS (FAB): 3114 [M+Na]⁺.

51) 5'-HO-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OEt)₂

"5'-HO-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(OEt)₂" (eksempel 50) ble omsatt analogt eksempel 40 med DBU og opparbeidet.

5 MS (ES-): 2196 [M-H]⁻; 2218 [M+Na-2H]⁻.

52) 5'-MMTr-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(OEt)₂

10 Syntese analogt eksempel 17 fra "5'-HO-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(OEt)₂" (eksempel 48a) og "5'-MMTr-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)(OH)" (eksempel 45b). For rensing ble det kromatografert over kiselgel (EE/metanol/TEA 70/30/2, deretter 60/40/2). Produktfraksjonen ble inndampet i vakuum, koevaporert med toluen og renses ved preparativ HPLC: "RP8 LiChrospher60", vann/acetoneitril: 1/1; 0,1% ammoniumacetat; 1 ml/min.) R_f = 23,95
15 min.

53) 5'-HO-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OEt)₂

20 a) 5'-HO-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(OEt)₂

Syntese analogt eksempel 4 fra "5'-MMTr-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(OEt)₂" (eksempel 52). For rensing ble det inndampet i vakuum, koevaporert tre ganger med toluen, resten ble utført først med pentan, deretter med eter og tørket i vakuum. Utbytte: >90%.

b) 5'-HO-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OEt)₂

30 "5'-HO-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(OEt)₂" (eksempel 53a) ble omsatt analogt eksempel 40 med DBU og opparbeidet.

MS (ES-): 2802 [M-H]⁻; 2815 [M+Na-2H]⁻.

54) 2-(N'-tert-butylloksykarbonylamino)etylaminometanfosfonsyredi(2-(p-nitrofenyl)etyl)ester

a) 1-metylimino-2-(N'-tert-butylloksykarbonylamino)etan (trimer)

- 5 2,0 g (12,5 mmol) 2-amino-1-(N'-tert-butoksykarbonylamino)etan, oppløst i 8 ml metanol ble under isavkjøling blandet med 1,52 ml (18,72 mmol) 37% formaldehyd og omrørt i 1 time ved romtemperatur. Resten ble opptatt i EE, vasket to ganger med mettet NaHCO₃-oppløsning, deretter med NaCl-oppløsning, tørket, filtrert og inndampet i vakuu. For rensing ble det kromatografert over kiselgel (EE/TEA 100/0,2, deretter
- 10 EE/metanol/TEA 90/10/0,2). Utbyttet utgjorde 0,8 g.

MS (FAB/LiCl): 523,4 [M+2Li-H]⁺.

¹H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS): δ = 1,38 (s, 27H, tBu-H); 2,40 (t, 6H, N-CH₂); 2,99 (t, 6H, N-CH₂); 3,25 (t, 6H, N-CH₂); 6,81 (t, bred, 3H, NH).

15

b) 2-(N'-tert-butylloksykarbonylamino)etylaminometanfosfonsyredi(2-(p-nitrofenyl)etyl)ester

- 1-metylimino-2-(N'-tert-butoksykarbonylamino)etan (trimer) (eksempel 54a) ble omsatt analogt eksempel 1f) med di(2-(4-nitrofenyl)etyl)fosfitt (eksempel 1e). For rensing ble
- 20 det kromatografert over kiselgel (først toluen/EE/TEA 20/80/0,2; deretter EE/TEA 100/0,2, deretter EE/metanol/TEA 0,5/5/0,2). Utbytte: 25%.

MS (ES+/LiCl): 553,3 [M+H]⁺, 559,3 [M+Li]⁺.

- 25 ¹H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS): δ = 1,37 (s, 9H, tBu-H); 2,83 (d, J=12 Hz, 2H, P-CH₂); 2,55 (t, 4H, Ar-CH₂); 2,90-3,09 (m, 4H, N-CH₂-CH₂-N); 4,16 (dt, 4H, PO-CH₂); 7,52 & 8,15 (hver d, 8H, Ar-H).

55) N-thymin-1-yl-acetyl-N-(2-N'-tert-butyloksykarbonyl-amino)etylaminometanfosfonsyredi(2-(p-nitrofenyl)etyl)ester

Syntese analogt eksempel 8 fra 2-(N'-tert-butyloksykarbonyl-amino)etylaminometanfosfonsyredi(2-(p-nitrofenyl)etyl)ester (eksempel 54b) og
5 thymidin-1-yl-eddiksyre. Utbytte: 86%

MS (FAB/LiCl): 725,3 [M+Li]⁺.

¹H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS): δ = 1,42 (s, 9H, tBu-H); 1,91 (s, 3H, T-CH₃);
2,99-3,58 (m, 8H, P-O-CH₂-CH₂-Ar & N-CH₂-CH₂-N); 3,75 (d, J=12Hz,
10 2H, P-CH₂); 4,06-4,38 (m, 4H, PO-CH₂); 7,37 & 8,15 (hver d, 8H, Ar-H).

56) Vekselvirkning med DNA: UV-smeltekurve

Vekselvirkningen av forbindelsene ifølge oppfinnelsen med komplementære
nukleinsyrer ble som eksempel demonstrert ved opptegnelsen av UV-smeltekurven for
15 "5'-HO-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-
T-P(OEt)₂" (eksempel 53b) med (dA)₉. For dette formålet ble en i ethvert tilfelle 0,3
OD av "5'-HO-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-T-
P(OH)-T-P(OEt)₂" og (dA)₉ fremstilt i en buffer (1M NaCl, 20 mM MgCl₂, 10 mM
Hepes, pH 7,5) og endringen av ekstinksjonen ved 260 nm ble opptegnet avhengig av
20 temperaturen (0 til). Resultatet fremgår i figur 1. Fra den oppnådde smeltekurven ble det
bestemt en T_m-verdi på ca. 23°C.

57) Vekselvirkning med DNA: Gelskift-forsøk

Vekselvirkningen av forbindelsene ifølge oppfinnelsen med komplementære
25 nukleinsyrer ble som eksempel demonstrert ved hybridiseringen av "5'-HO-T-P(OH)-T-
P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OEt)₂"
(eksempel 53b) med (dA)₉ i et gelskift-forsøk. For dette formålet ble "5'-HO-T-P(OH)-
T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OEt)₂"
(eksempel 53b) og (dA)₉ i hvert tilfelle påført alene og blandet i forhold 1:1, 1:2, 1:5 og
30 1:10 på en ikke-denaturerende polyakrylamidgel (20%, løpebuffer 1xTBE, 10 mM
MgCl₂) og løpeoppførselen ble bestemt. Resultatet fremgår i figur 2: (dA)₉ løper
raskere enn "5'-HO-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-T-
P(OH)-T-P(OH)-T-P(OEt)₂", i en 1:1-blanding er begge bare svakt observerbare, det
er derfor oppstått langsommere bånd som tilsvarer et kompleks mellom de to
35 komponentene. I 2:1-blanding er det ikke lenger noe se av (dA)₉, derimot er det nye
båndet desto tydeligere. Det samme gjelder for 5:1— hhv. 10:1-blanding, hvori i
tillegg det tydelige overskuddet av "5'-HO-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-T-

P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OEt)₂" kan erkjennes.

58) 5'-MMTr-T-P(ONPE)-T-P-(O-etyl)₂ (se også eksempel 21, alternative synteser)

5 a) 8,44 mg (10 µmol) N-thymin-1-yl-acetyl-N-(4-metoksytri-
fenylmetoksy)etylaminometanfosfonsyredietyler (eksempel 10) og 64,6 mg (500 µmol)
N-etyldiisopropylamin (DIPEA) ble oppløst i 0,3 ml abs. DMF. For dette formålet ble
44,2 mg (100 µmol) benzotriazol-yloksy)tris(dimetylamino)fosfoniumheksafluorofosfat
10 (BOP) tilsatt. Det ble omrørt i 24 timer ved romtemperatur. Etter DC (EE/metanol/TEA
100/20/2; R_f = 0,5) ca. 70% utbytte.

b) Analogt eksempel 58a), imidlertid med 30 µmol HATU (O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-
N,N,N',N'-tetrametyluroniumheksafluorofosfat) istedenfor 100 µmol BOP. Etter DC ca.
15 65% utbytte.

**59) N-thymin-1-yl-acetyl-N-(4-metoksytrifenylnitro)etyl-
aminometanfosfonsyre-[2-p-nitrofenyl)etyl]-[5'(3'-levuloyl-thymidin]diester**

Syntese analogt eksempel 17 fra N-thymin-1-yl-acetyl-N-
(4-metoksytrifenylnitro)etylaminometanfosfonsyre-(4-nitrofenyletyl)monoester
20 (trietylammoniums salt, eksempel 15) og 3'-levuloyl-thymidin. For rensing ble det
kromatografert over kiselgel (DCM/metanol/TEA 98/2/0,25). Utbyttet utgjorde 46%.
MS (FAB/LiCl): 1071,4 [M+Li]⁺.

**60) N-thymin-1-yl-acetyl-N-(4-metoksytrifenylnitro)etyl-
aminometanfosfonsyre-[2-(p-nitrofenyl)etyl]-[5'-thymidin]diester**

25 64 mg (0,06 mmol) N-thymin-1-yl-acetyl-N-(4-metoksytrifenylnitro)
metoksy)etylaminometanfosfonsyre-[2-(p-nitrofenyl)etyl]-[5'-(3'-levuloyl-
thymidin]diester (eksempel 59) ble oppløst i 0,5 ml dioksan. 9 mg (0,23 mmol) NaBH₄
ble tilsatt i 0,12 ml vann og det ble omrørt i 20 minutter ved romtemperatur. Oppløsnings-
30 midlet ble inndampet i vakuum, resten ble opptatt DCM, ekstrahert med vann og
tørket. For rensing ble det kromatografert over kiselgel (DCM/metanol/TEA 92/8/0,5).
Utbyttet utgjorde 72%.

MS (FAB/LiCl): 973,4 [M+Li]⁺, 979,4 [M+2Li+H]⁺, 985,4 [M+3Li-2H]⁺.

61) **N-thymin-1-yl-acetyl-N-(4-metoksytrifenylmetoksy)etyl-aminometanfosfonsyre-[2-(p-nitrofenyl)etyl]-[5'-thymidin-(3'-(cyanoetyl-N,N-diisopropylfosforamiditt)]diester**

31 mg (0,032 mmol) N-thymin-1-yl-acetyl-N-(4-metoksytrifenyl-
5 metoksy)etylaminometanfosfonsyre-[2-(p-nitrofenyl)etyl]-[5'-thymidin]diester (eksempel 60) ble koevaporert to ganger med abs. CH₃CN, oppløst i 0,4 ml THF. For dette formålet ble først 12,4 mg (0,096 mmol) diisopropyletylamin, deretter 9,8 mg (0,045 mmol) cyanoetyl-klor-diisopropylfosforamiditt tilsatt. Det ble omrørt i 3 timer, frafiltrert og inndampet i vakuum. Utbyttet utgjorde 63%.

10

MS (FAB/LiCl): 1173,3 [M+Li]⁺, 1180,4 [M+2Li-H]⁺, 1186,4 [M+3Li-2H]⁺.

62) **N-[N9-(O6-difenylkarbamoyl-N2-acetylguanin]acetyl-N-(4-metoksytrifenylmetoksy)etylaminometanfosfonsyredi(2-(p-nitrofenyl)etyl)ester**

15

Syntese analogt eksempel 2 fra N-(4-metoksytrifenylmetoksy)-etylaminometanfosfonsyredi(2-(p-nitrofenyl)etyl)ester (eksempel 1f) og O6-difenylkarbamoyl-N2-acetylguanin-eddiksyre. For rensing ble det kromatografert over kiselgel (EE/TEA 98/2). Utbytte: 87%.

20

MS (FAB/LiCl): 1154,8 [M+H]⁺, 1160,7 [M+Li]⁺.

63) **N-[N9-(N4-anisovladenin]acetyl-N-(4-metoksytrifenylmetoksy)etylaminometanfosfonsyredi(2-(p-nitrofenyl)etyl)ester**

25

Syntese analogt eksempel 2 fra N-(4-metoksytrifenylmetoksy)-etylaminometanfosfonsyredi(2-(p-nitrofenyl)etyl)ester (eksempel 1f) og N4-anisovladenineddiksyre. For rensing ble det kromatografert over kiselgel (DCM/metanol/TEA 95/4/1). Utbytte: 82%;

30

MS (ES⁺): 1035,7 [M+H]⁺.

¹H-NMR (200 MHz, DMSO, TMS): δ = 2,93 (t, 4H, P-O-CH₂-CH₂-Ar); 3,09 (t, 2H, MMTr-O-CH₂); 3,23-3,75 (m, 4H, P-CH₂ + N-CH₂-Ar); 3,09 (t, 2H, MMTr-O-CH₂); 3,23-3,75 (m, 4H, P-CH₂ + N-CH₂); 3,75 (s, 3H, OCH₃); 3,87 (s, 3H, OCH₃); 4,08 (dt, 4H, P-O-CH₂); 5,28-5,42 (m, 2H, CO-CH₂);
35 6,81-8,20 (m, 28H, Ar-H, A-H); 11,00 (s bred, 1H, NH).

64) **N-[N9-(N4-anisoyladenin)]acetyl-N-(4-metoksytrifenyl-metoksy)etylaminometanfosfonsyremono(2-(p-nitrofenyl)etyl)ester**

Syntese analogt eksempel 3 fra N-[N9-(N4-anisoyladenin)]acetyl-N-(4-metoksytrifenylmetoksy)etylaminometanfosfonsyredi(2-(p-nitrofenyl)etyl)ester

5 (eksempel 63). For rensing ble det kromatografert over kiselgel (EE/metanol/TEA 65/35/2). Utbyttet utgjorde 52%.

MS (FAB/LiCl): 874,3 [M+2Li-H]⁺.

65) **N-thymin-1-yl-acetyl-N-(2-metoksy)etylaminometanfosfonsyredi(2-(p-nitrofenyl)etyl)ester**

10

Syntese analogt eksempel 2 fra N-(2-metoksy)etylaminometanfosfonsyredi(2-(p-nitrofenyl)etyl)ester (fremstilt analogt eksempel 1 med utgangspunkt fra 2-metoksyetylamin ved omsetning med formaldehyd og di(2-(4-nitrofenyl)etyl)fosfitt og thymidin-1-yl-eddiksyre. For rensing ble det kromatografert over kiselgel (EE/metanol

15 90/10). Utbytte: 64%

MS (FAB/LiCl): 640,3 [M+Li]⁺.

66) **5'-MMTr-C^{An}-P(ONPE)-C^{An}-P(ONPE)(O-allyl)**

20

Syntese analogt eksempel 17 fra N-(N⁶-anisoyl)cytosin-1-yl-acetyl-N-(4-metoksytrifenylmetoksy)etylaminometanfosfonsyre-(2-(p-nitrofenyl)etyl)monoester (trietylammoniumsalt) (eksempel 3) og N-(N⁶-anisoyl)cytosin-1-yl-acetyl-N-

25 (2-hydroksy)etylaminometanfosfonsyre-allyl-(2-(p-nitrofenyl)etyl)diester (eksempel 34). For rensing ble det kromatografert over kiselgel (EE/metanol/TEA 85/14/1).

Utbytte: 36%.

MS (FAB): 1474 [M+H]⁺; 1496 [M+Na]⁺.

67) **5'-HO-C^{An}-P(ONPE)-C^{An}-P(ONPE)(O-allyl)**

30

Syntese analogt eksempel 4 fra "5'-MMTr-C^{An}-P(ONPE)-C^{An}-P(ONPE)(O-allyl)" (eksempel 66). For rensing ble det kromatografert over kiselgel (EE/metanol/TEA 80/19/1). Utbyttet utgjorde 55%.

35 MS (FAB: 1201,3 [M+H]⁺; 1223,3 [M+Na]⁺.

68) 5'-MMTr-C^{An}-P(ONPE)-C^{An}-P(ONPE)-C^{An}-P(ONPE)(O-allyl)

Syntese analogt eksempel 17 fra N-(N⁶-anisoyl)cytosin-1-yl-acetyl-N-(4-metoksytrifenylmetoksy)etylaminometanfosfonsyre(2-(p-nitrofenyl)etyl)monoester (trietylammoniums salt) (eksempel 3) og 5'-HO-C^{An}-P(ONPE)-C^{An}-P(ONPE)(O-allyl)

5 (eksempel 67). For rensing ble det kromatografert over kiselgel (EE/metanol/TEA 80/20/1). Utbytte: 58%.

MS (FAB): 2046 [M+H]⁺; 2068 [M+Na]⁺.

10 69) 5'-MMTr-C^{An}-P(ONPE)-C^{An}-P(ONPE)-C^{An}-P(ONPE)(OH)

Syntese analogt eksempel 42 fra 5'-MMTr-C^{An}-P(ONPE)-C^{An}-P(ONPE)-C^{An}-P(ONPE)(O-allyl) (eksempel 68). For rensing ble det kromatografert over kiselgel (EE/metanol/TEA 60/38/2). Utbytte: 66%.

15 MS (FAB): 2027 [M+Na]⁺; 2049 [M+2Na-H]⁺.

70) 5'-MMTr-C^{An}-P(ONPE)-C^{An}-P(ONPE)-C^{An}-P(ONPE)-C^{An}-P(ONPE)-C^{An}-P(ONPE)-C^{An}-P(ONPE)₂

20 Syntese analogt eksempel 17 fra "5'-MMTr-C^{An}-P(ONPE)-C^{An}-P(ONPE)-C^{An}-P(ONPE)(OH)" (eksempel 69) og "5'-HO-C^{An}-P(ONPE)-C^{An}-P(ONPE)-C^{An}-P(ONPE)₂" (eksempel 32). For rensing ble det kromatografert over kiselgel (EE/metanol/TEA 70/30/2). Utbytte: 58%.

25 MS (FAB): 3892 [M+Na]⁺; 3914 [M+2Na-H]⁺.

71) 5'-MMTr-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-C^{An}-P(ONPE)-C^{An}-P(ONPE)-C^{An}-P(ONPE)₂

30 Syntese analogt eksempel 17 fra "5'-MMTr-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)(OH)" (eksempel 45) og "5'-HO-C^{An}-P(ONPE)-C^{An}-P(ONPE)-C^{An}-P(ONPE)₂" (eksempel 32). For rensing ble det kromatografert over kiselgel (EE/metanol/TEA 60/40/2). Produktfraksjonen ble inndampet i vakuum, og renses ved preparat HPLC (høytrykksvæskekromatografi): "RP8 LiChrosper60", vann/acetoneitril: 1/1; 0,1% ammoniumacetat; 1 ml/min.) R_f = 16,6 min.

35 MS (FAB): 3534 [M+Na]⁺; 3556 [M+2Na-H]⁺.

72) 5'-MMTr-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-C^{An}-P(OH)-C^{An}-P(OH)-C^{An}-
-(OH)₂

Syntese analogt eksempel 40 fra "5'-MMTr-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-C^{An}-
P(ONPE)-C^{An}-P(ONPE)-C^{An}-P(ONPE)₂" (2 mg) (eksempel 71).

5

MS (ES-): 2466,4 [M-H].

73) 5'-MMTr-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-C-P(OH)-C-P(OH)-C-P(OH)₂

Ca. 1 mg "5'-MMTr-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-C^{An}-P(OH)-C^{An}-P(OH)-C^{An}-
10 P(OH)₂" (eksempel 72) ble blandet med 3 ml 33% vandig NH₄OH og omrørt 24 timer
ved romtemperatur. Reaksjonsblandingen ble inndampet i vakuum. Utbytte: ca. 0,6 mg
(19 OD).

MS (ES-): 2064,5 [M-H]⁻.

15

74) 5'-HO-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-C-P(OH)-C-P(OH)-C-P(OH)₂

8 OD av "5'-MMTr-T-P(OH)-T-P(OH)-T-P(OH)-C-P(OH)-C-P(OH)-C-P(OH)₂"
(eksempel 73) ble oppløst i 0,5 ml vann og påført på en "PolyPak" (Glen Research, #60-
1100-10). MMTr-gruppen ble avspaltet i henhold til fabrikantens angivelser (Glen
20 Research User Guide). Utbytte: ca. 0,35 mg (11 OD).

MS (ES-): 1792,6 [M-H]⁻.

25

75) 5'-MMTr-C^{An}-P(ONPE)-C^{An}-P(ONPE)-C^{An}-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-
P(ONPE)-T-P(ONPE)₂

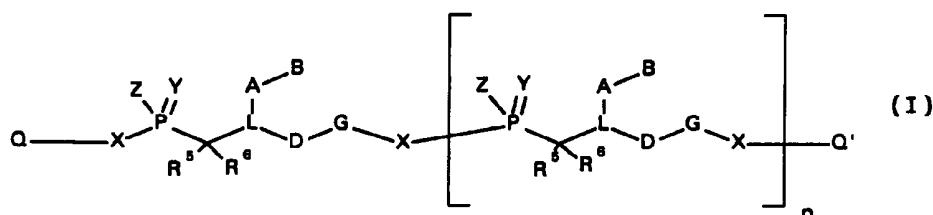
Syntese analogt eksempel 17 fra "5'-MMTr-C^{An}-P(ONPE)-C^{An}-P(ONPE)-C^{An}-
P(ONPE)(OH)" (eksempel 69) og "5'-HO-T-P(ONPE)-T-P(ONPE)-T-P(OEt)₂"
(eksempel 26). For rensing ble det kromatografert over kiselgel (EE/metanol/TEA
80/20/2, deretter 70/30/2). Produktfraksjonen ble koevaporert med toluen, inndampet i
30 vakuum og triturerert med pentan.
Utbytte: 48%.

MS (FAB): 3744 [M+Na]⁺; 3766 [M+2Na-H]⁺.

P a t e n t k r a v

1.

Forbindelse, karakterisert ved at den er gitt ved formel (I)



hvor

n betyr et tall fra 0 til 100;

B betyr uavhengig av hverandre hydrogen, hydrokso, (C₁–C₂₀)-alkyl, (C₁–C₂₀)-alkoksy, (C₁–C₂₀)-alkyltio, (C₆–C₂₀)-aryl, (C₆–C₂₀)-aryl-(C₁–C₆)-alkyl, (C₆–C₂₀)-aryl-(C₁–C₆)-alkoksy, (C₆–C₂₀)-aryl-(C₁–C₆)-alkyltio, en aromatisk gruppe eller en heterocyklisk gruppe, hvorved alkyl, aryl og/eller de aromatiske eller heterocykliske gruppene eventuelt kan være substituert en eller flere ganger med hydrokso, (C₁–C₄)-alkoksy, -NR⁹R¹⁰, -C(O(OH)), okso, -C(O)OR⁸, -C(O)NR⁹R¹⁰, -CN, -F, -Cl, -Br, -NO₂, (C₂–C₆)-alkoksyalkyl, -S(O)_mR⁸, -(C₁–C₆)-alkyl-S(O)_mR⁸, -NHC(=NH)NHR⁸, -C(=NH)NHR⁸, -NR⁹C(=O)R⁸, =NOR⁸, NR⁹C(=O)OR¹⁰, -OC(=O)NR⁹R¹⁰ og -NR⁹C(=O)NR⁹R¹⁰, eller

B står uavhengig av hverandre for en naturlig nukleobase, en unaturlig nukleobase eller en reporterligand;

A-B kan også stå for en over karboksylgruppen påkondensert D- eller L-aminosyre eller for peptider bestående av disse aminosyrene med inntil en lengde på 5 aminosyrerester,

L står uavhengig av hverandre for N eller R¹N⁺, og

R¹ står for hydrogen eller (C₁–C₆)-alkyl, som kan være substituert med hydrokso, (C₁–C₆)-alkoksy, (C₁–C₆)-alkyltio eller amino, fortrinnsvis hydrogen eller metyl;

R^8 betyr hydrogen, (C₁–C₁₈)-alkyl, (C₂–C₁₈)-alkenyl, (C₃–C₁₈)-alkinyl, (C₆–C₁₂)-aryl, (C₆–C₁₂)-aryl-(C₁–C₆)-alkyl, hvorved alkyl kan være substituert en eller flere ganger med hydroksy, (C₁–C₄)-alkoksy, F, Cl, Br og aryl kan være substituert 1-3 ganger med hydroksy, (C₁–C₄)-alkoksy, (C₁–C₄)-alkyl, F, Cl, Br, NO₂, -NR⁹R¹⁰, -C(O)OH, -C(O)O-(C₁–C₈)-alkyl, -C(O)NR⁹R¹⁰, men står fortrinnsvis for hydrogen, (C₁–C₆)-alkyl, (C₆–C₁₂)-aryl eller (C₆–C₁₂)-aryl-(C₁–C₆)-alkyl, hvorved aryl kan være enkelt substituert med (C₁–C₄)-alkoksy, (C₁–C₄)-alkyl, F, Cl, Br, NO₂, spesielt foretrukket for hydrogen, (C₁–C₆)-alkyl, fenyl eller 2-(4-nitrofenyl)etyl;

R^9 og R^{10} står uavhengig av hverandre for hydrogen, (C₁–C₁₈)-alkyl, (C₁–C₁₈)-alkenyl, (C₁–C₁₈)-alkinyl, (C₆–C₁₂)-aryl, (C₆–C₁₂)-aryl-(C₁–C₆)-alkyl, hvorved alkyl kan være substituert en eller flere ganger med hydroksy, (C₁–C₄)-alkoksy, F, Cl, Br, eller R^9 og R^{10} kan sammen med N-atomet som bærer dem danne en 4- til 7-leddet ring;

Q og Q' betyr uavhengig av hverandre hydrogen eller R^8 , eller står for konjugater som gunstig påvirker egenskapene for antisens-oligonukleotider eller av trippelheliks-dannende oligonukleotider eller tjener som merking av en DNA-probe eller ved hybridiseringen av oligonukleotidanalogen til targetnukleinsyren angriper denne med binding eller tverrbinding, eller betyr oligonukleotider som kan være umodifiserte eller modifiserte;

hvorved aromatiske grupper og C₆-C₂₀-arylgrupper er valgt fra gruppen bestående av: fenyl, naftyl, pyrenyl, antracenyl, fenantryl, bifenyl, binaftyl, tetracenyl, pentacenyl, heksacenyl, trifenylenyl, krysenyl eller benzopyrenyl.

2.

Forbindelse med formel (I) ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t
v e d a t

n betyr et tall fra 0 til 50;

B står uavhengig av hverandre for en naturlig nukleobase eller en unaturlig nukleobase;

L betyr N;

A betyr en gruppe med formel (IIb), hvori
 $r = 1$ og $s = 0$, og R^2 , $R^3 = H$ og $Y^* = O$ og M betyr en enkeltbinding;

D og G betyr avhengig av hverandre CHR^5 ;

R^5 står for hydrogen;

X betyr -O-;

Y betyr =O;

Z står for hydroksy, metoksy, etoksy, (4-nitrofenol)etoksy, propoksy, isopropoksy, butoksy, pentoksy, fenoksy eller allyloksy;

Q og Q' står uavhengig av hverandre for hydrogen, R^8 eller for oligonukleotider som kan være umodifiserte og modifiserte, hvorved

- a) 3'- og/eller 5'-fosforsyrediester-broene er helt eller delvis erstattet med fosforotioat-, fosforoditioat-, NR^4R^4 -fosforamidat-, fosfat-O-metylester-, fosfat-O-etyler-, fosfat-O-isopropylester-, metylfosfonat- eller fenylfosfonat-broer;
- b) en, to eller tre 3'- eller 5'-fosforsyrediester-broer ved pyrimidin-posisjonene og ved 5'-enden og/eller ved 3'-enden kan være erstattet med formacetal og/eller 3'-tioformacetal;
- c) sukkerfosfat-ryggraden er helt eller delvis erstattet med "PNA'er" eller PNA-DNA-hybrider;
- d) β -D-2'-desoksyribose-enhetene er helt eller delvis erstattet med 2'-F-2'-desoksyribose, 2'-O-(C_1-C_6)-alkyl-ribose, 2'-O-(C_2-C_6)-alkenyl-ribose, 2'-NH₂-2'-desoksyribose;
- e) de naturlige nukleosid-basene er helt eller delvis erstattet med 5-(C_1-C_6)-alkyl-uracil, 5-(C_2-C_6)-alkenyl-uracil, 5-(C_2-C_6)-alkinyl-uracil, 5-(C_1-C_6)-alkyl-cytosin, 5-(C_2-C_6)-alkenyl-cytosin, 5-(C_2-C_6)-alkinyl-cytosin, 5-fluor-

uracil, 5-fluorcytosin, 5-kloruracil, 5-klorcytosin, 5-bromuracil, 5-bromcytosin, 7-deaza-7-(C₂-C₇)-alkinylguanin, 7-deaza-7-(C₂-C₇)-alkinyladenin, 7-deaza-7-(C₂-C₇)-alkenylguanin, 7-deaza-7-(C₂-C₇)-alkenyladenin, 7-deaza-7-(C₁-C₇)-alkylguanin, 7-deaza-7-(C₁-C₇)-alkyladenin, 7-deaza-7-bromguanin, 7-deaza-7-bromadenin.

3.

Forbindelse med formel (I) ifølge kravene 1 eller 2, k a r a k t e r i -
s e r t v e d a t

n betyr et tall fra 0 til 30;

Q og Q' står uavhengig av hverandre for hydrogen, R⁸, hvor R⁸ står for H, (C₁-C₆)-alkyl, fenylyl eller 2-(4-nitrofenyletyl), eller står for oligonukleotider som kan være umodifiserte og modifiserte, hvorved

- a) 3'- og/eller 5'-fosforsyrediester-broene er helt eller delvis erstattet med fosfortioat-, fosforoditioat- eller metylfosfonat-broer;
- b) en, to eller tre 3'- eller 5'-fosforsyrediester-broer ved 5'-enden og ved 3'-enden er erstattet;
- c) sukkerfosfat-ryggraden er helt eller delvis erstattet med "PNA'er" eller PNA-DNA-hybrider;
- d) β-D-2'-desoksyribose-enhetene er helt eller delvis erstattet med 2'-F-2'-desoksyribose, 2'-O-(C₁-C₄)-alkyl-ribose, 2'-O-(C₂-C₄)-alkenyl-ribose, 2'-NH₂-2'-desoksyribose;
- e) de naturlige nukleosid-basene er helt eller delvis erstattet med 5-(C₃-C₆)-alkyl-uracil, 5-(C₂-C₆)-alkenyl-uracil, 5-(C₂-C₆)-alkinyl-uracil, 5-(C₁-C₆)-alkyl-cytosin, 5-(C₂-C₆)-alkenyl-cytosin, 5-(C₂-C₆)-alkinyl-cytosin, 7-deaza-7-(C₂-C₇)-alkinylguanin, 7-deaza-7-(C₂-C₇)-alkinyladenin, 7-deaza-7-(C₂-C₇)-alkenylguanin, 7-deaza-7-(C₂-C₇)-alkenyladenin, 7-deaza-7-(C₁-C₇)-alkylguanin, 7-deaza-7-(C₁-C₇)-alkyladenin, 7-deaza-7-bromguanin, 7-deaza-7-bromadenin.

4.

Forbindelse med formel (I) ifølge kravene 1 til 3, k a r a k t e r i -
s e r t v e d a t

n betyr et tall fra 0 til 25;

B står uavhengig av hverandre for en naturlig nukleobase;

Z står for hydroksy, etoksy, (4-nitrofenol)etoksy eller fenoksy;

Q og Q' står uavhengig av hverandre for hydrogen, R⁸, hvor R⁸ står for H, (C₁—C₆)-
alkyl, fenyl eller 2-(4-nitrofenyletyl), eller står for oligonukleotider som kan være
umodifiserte og modifiserte, hvorved

- a) 3'- og/eller 5'-fosforsyrediester-broene er helt eller delvis erstattet med
fosforotioat-broer;
- c) sukkerfosfat-ryggraden er helt eller delvis erstattet med "PNA'er" eller PNA-
DNA-hybrider;
- d) β-D-2'-desoksyribose-enhetene er helt eller delvis erstattet med 2'-O-metyl-, 2'-O-
allyl-, 2'-O-butylribose;
- e) de naturlige nukleosid-basene er helt eller delvis erstattet med 5—heksinylcytosin,
5—heksinyluracil, 5—heksinylcotylin, 7-deaza-7-propinylguanin, 7-deaza-
7-propinyladenin, 7-deaza-7-metylguanin, 7-deaza-7-metyladenin, 7-deaza-7-
bromguanin, 7-deaza-7-bromadenin;

5.

Fremgangsmåte for fremstilling av forbindelse med formel (I) ifølge kravene 1-4,

k a r a k t e r i s e r t v e d a t m a n

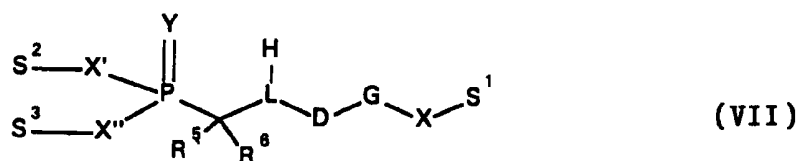
a₁) omsetter forbindelser med formel (III)



hvor

D, G, L og X er som definert i kravene 1-4, og

i et egnet organisk oppløsningsmiddel, ved temperaturer fra 0°C til 100°C, eventuelt under tilsats av baser, komplekse baser eller uladete, peralkylerte polyamino-fosfazen-baser til forbindelser med formel (VII)



hvor

D, G, L, R⁵, R⁶, S¹, S², S³, X, X', X'' og Y er som definert i kravene 1-4;

c1) omsetter forbindelser med formel (VII) med forbindelser med formel (VIII)



2

hvor

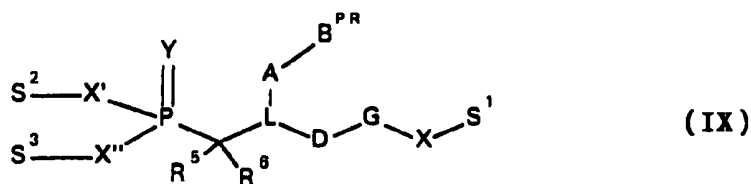
A er som definert i kravene 1-4,

B^{PR} har samme betydning som B, men foreligger eventuelt i beskyttet form, og

L² står for en for fagmannen kjent avspaltbar gruppe, kan dersom A har

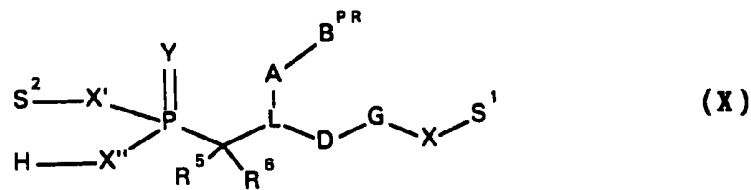
betydningen av formel (IIb) også stå for OH;

i et egnet organisk oppløsningsmiddel, ved temperaturer fra -20°C til 100°C, eventuelt under tilsats av baser, komplekse baser eller uladete, peralkylerte polyaminofosfazen-baser eller uten basetilsats og under tilsats av et for tilkobling av peptid-bindinger vanlig koblingsreagens, til forbindelser med formel (IX)



hvor $A, B^{PR}, D, G, L, R^5, R^6, S^1, S^2, S^3, X, X', X''$ og Y er som definert ovenfor;

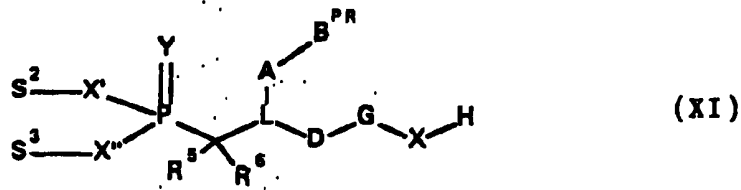
- d₁) fra forbindelser med formel (IX) avspaltes beskyttelsesgruppen S^3 ved kjente fremgangsmåter, hvorved man oppnår forbindelser med formel (X)



hvor

$A, B^{PR}, D, G, L, R^5, R^6, S^1, S^2, X, X', X''$ og Y er som definert ovenfor;

- e₁) fra forbindelser med formel (IX) avspaltes beskyttelsesgruppen S^1 ved kjente fremgangsmåter, hvorved man oppnår forbindelser med formel (XI)



hvor

$A, B^{PR}, D, G, L, R^5, R^6, S^2, S^3, X, X', X''$ og Y er som definert ovenfor;

- f₁) omsetter forbindelser med formel (XI) med forbindelser med formel (X= ifølge den fra oligonukleotidkjemien kjente "fosfortriester-fremgangsmåten" i et egnet organisk oppløsningsmiddel, ved temperaturer fra -20°C til 100°C , under tilsats av en koblingsreagens, eller en forbindelse med formel (XII)



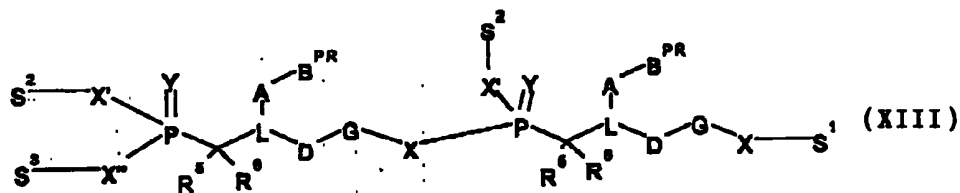
hvor

R^{15} står for (C_6-C_{12})-aryl, eventuelt substituert en til fire ganger med (C_1-C_6)-alkyl, (C_1-C_6)-alkoksy, nitro, klor, brom, og hvorved eventuelt 1 til 3 C-atomer er substituert med N, S eller O, hvorved (C_6-C_{12})-aryl er valgt fra gruppen omfattende fenyl, naftyl, pyrenyl, bifenyl eller binaftyl;

R^{16} står for en avspaltbar gruppe,

eventuelt under tilsats av en katalysator, hvorved fremstillingen av koblingsreagensene kan foregå in situ, eller kan foregå separat og oppløsningen av de aktive spesier kan tilsettes i et egnet oppløsningsmiddel,

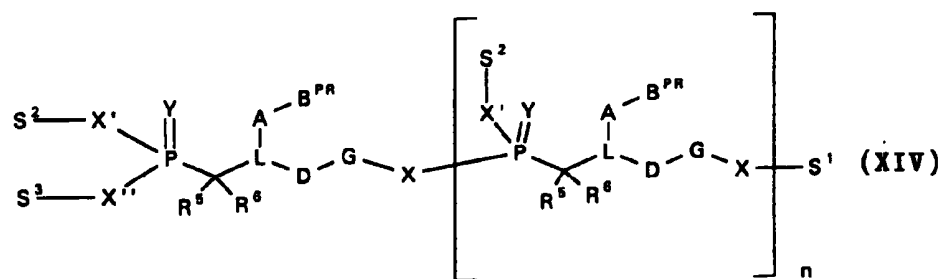
til forbindelser med formel (XIII)



hvor

A, B^{PR} , D, G, L, R^5 , R^6 , S^1 , S^2 , S^3 , X, X', X'' og Y er som definert ovenfor;

- g1) med utgangspunkt fra forbindelser med formel (XIII) gjentas trinnene e₁) og f₁) inntil ønsket kjedelengde, hvorved det oppnås forbindelser med formel (XIV)

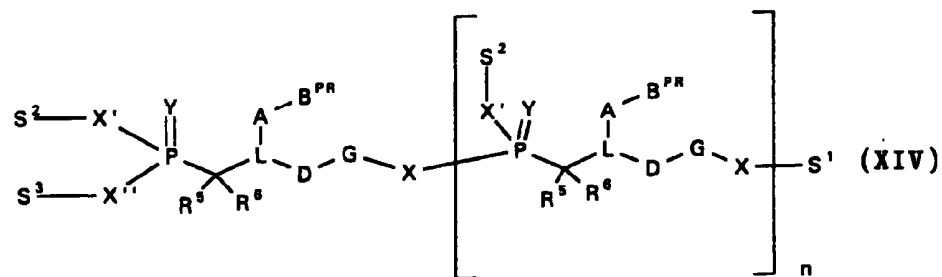


hvor

A, B^{PR} , D, G, L, R^5 , R^6 , S^1 , S^2 , S^3 , X, X', X'' og Y er som definert ovenfor; og

n er som definert i kravene 1-4;

- c₂) de dannede forbindelsene kobles med hverandre som beskrevet i krav 5 under f₁), hvorved det oppstår forbindelser med formel (XIV)



hvor

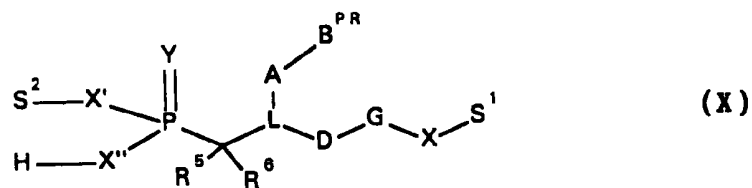
A, B^{PR}, D, G, L, R⁵, R⁶, S¹, S², S³, X, X', X'', Y og n er som definert ovenfor,

- d₂) og disse omsettes som beskrevet i krav 5 under h₁) til forbindelser med formel (I).

7.

Fremgangsmåte for fremstilling av forbindelse med formel (I) ifølge kravene 1-4, karakterisert ved at man

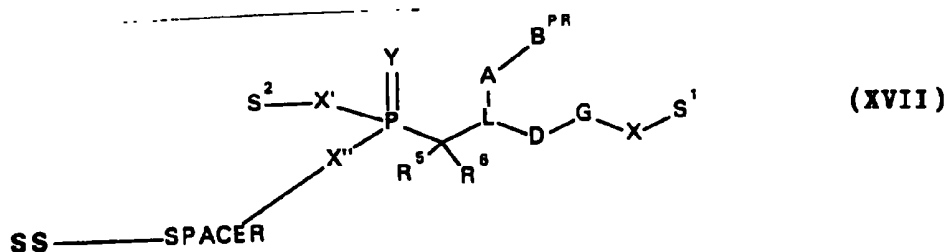
- a₃) kobler forbindelser med formel (X)



hvor

A, B^{PR}, D, G, L, R⁵, R⁶, S¹, S², X, X', X'' og Y er som definert i kravene 1-4,

ved kjente fremgangsmåter over en SPACER til en fast bærer, til forbindelser med formel (XVII)



hvor

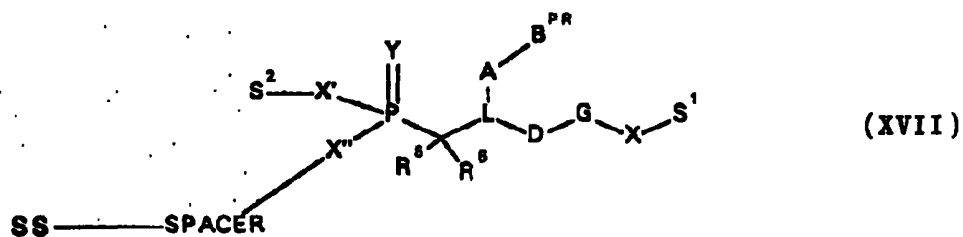
A, B^{PR}, D, G, L, R⁵, R⁶, S¹, S², X, X', X'' og Y er som definert ovenfor;

SS står for en for fastfasesyntese egnet fast bærer, og

SPACER står for en fra bæreren etter foretatt syntese avspaltbar gruppe, som

kjent for fagmannen, eller SPACER står for bisfunksjonelle konjugatmolekyler Q, som tilknyttes via kjente avspaltbare grupper til den faste bæreren;

b3) fra forbindelser med formel (XVII)

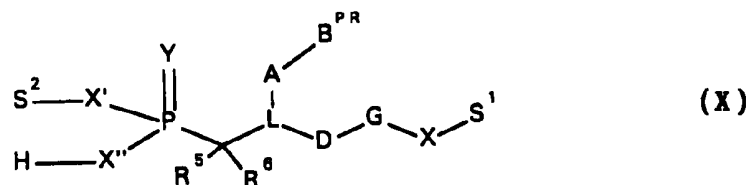


hvor

A, B^{PR}, D, G, L, R⁵, R⁶, S¹, S², SS, SPACER, X, X', X'' og Y er som definert ovenfor;

avspaltes beskyttelsesgruppen S¹ som beskrevet i krav 5 under e₁);

c3) den resulterende forbindelsen omsettes med forbindelser med formel (X)



hvor

A, B^{PR}, D, G, L, R⁵, R⁶, S¹, S², X, X', X'' og Y er som definert ovenfor, som beskrevet i krav 5 under f₁);

d3) trinnene b3) og c3) gjentas inntil ønsket kjedelengde;

e3) eventuelt påkobles konjugater Q' ved kjente fremgangsmåter;

f3) de derved fremstilte forbindelsene avspaltes ved kjente fremgangsmåter fra fast bærer, og beskyttelsegruppene avspaltes som beskrevet i trinn h₁), hvorved avspaltningen av beskyttelsesgruppene også kan foregå før spaltningen fra bæreren, og eventuelt påkobles konjugater Q ved kjente fremgangsmåter, hvorved rekkefølgen for påkoblingen av Q hhv. Q' (e₃) (f₃) også kan endres, og eventuelt ringsluttet de oppnådde forbindelsene.

8.

Anvendelse av forbindelse med formel (I) ifølge kravene 1 til 4 som inhibitorer for genekspressjon.

9.

Anvendelse av forbindelser med formel (I) ifølge kravene 1 til 4 som diagnostikum, for behandling av sykdommer som fremkalles av vira, som påvirkes av integriner eller celle-celle-adhesjonsreseptorer eller utløses ved faktorer som TNF—, for behandling av kreft eller restenose.

10.

Forbindelse, k a r a k t e r i s e r t v e d følgende formler:

5'-OLIGO-PMENA;

5'-PMENA-OLIGO;

5'-OLIGO-PMENA-OLIGO;

5'-OLIGO-(PMENA-OLIGO)_a;

5'-PMENA-OLIGO-PMENA; eller

5'-PMENA-(OLIGO-PMENA)_a

hvor i a er 1-20, OLIGO står for et eventuelt modificert oligonukleotid og PMENA betyr en forbindelse med formel (I) ifølge kravene 1-4, hvori Q og Q' er hydrogen.

Fig. 1

UV-absorbansprofil som funksjon av temperatur for [PMENA-t9] i nærvær av 1 ekv. (dA)₉

10 mM HEPES, 20 mM MgCl₂; 1M NaCl; pH 7,5

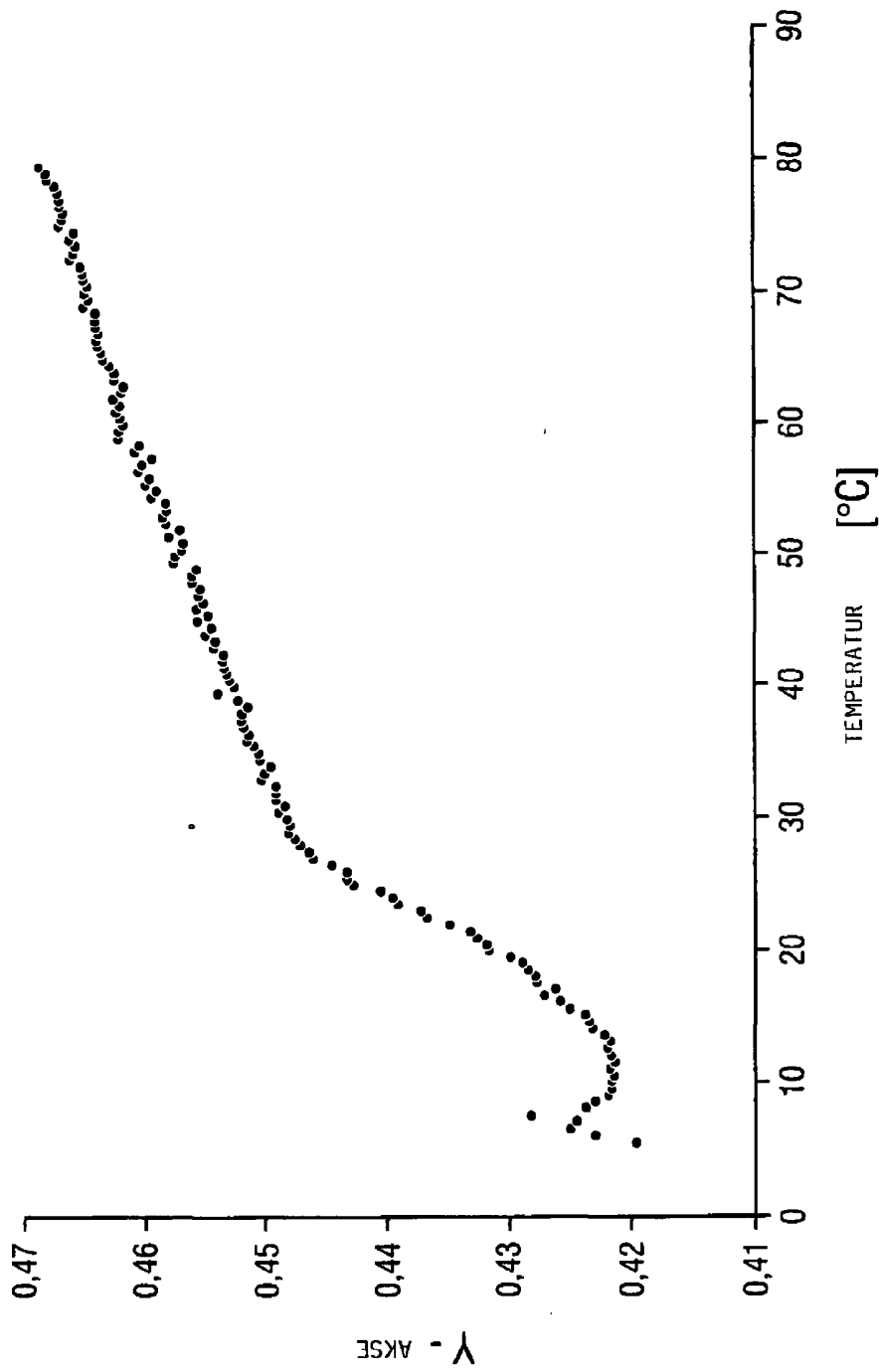


Fig. 2

Påvisning av P/MENa-DNA-binding ved Gel-Skift

