



NORGE

(12) PATENT

(19) NO

(51) Int Cl⁷

(11) 320441

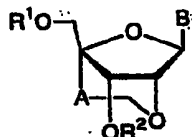
C 07 H 19/067

(13) B1

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20013899	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2000.02.10 PCT/JP00/00725
(22)	Inng.dag	2001.08.10	(85)	Videreføringdag	2001.08.10
(24)	Løpedag	2000.02.10	(30)	Prioritet	1999.02.12, JP, 33863/99
(41)	Alm.tilgj	2001.10.10			
(45)	Meddelt	2005.12.05			
(73)	Innehaver	Sankyo Company Ltd , 5-1, Nihonbashi Honcho 3-chome, Chuo-ku, 103-8426 TOKYO, JP			
(72)	Oppfinner	Sankyo Lifetech Company Ltd , 23-14, Hongo 4-chome, Bunkyo-ku, 113-0033 TOKYO, JP Takeshi Imanishi, Nara-shi, Nara, JP Koji Morita, c/o Sankyo Co Ltd, 2-58, Hiromachi 1-chome, Shinagawa-ku, 140-8710 TOKYO, JP Masakatsu Kaneko,, Tokyo, JP			
(74)	Fullmektig	Tandbergs Patentkontor AS , Postboks 7085 Majorstua, 0306 OSLO, NO			
(54)	Benevnelse	Nukleosider, oligonukleotidanaloger, farmasøytiske preparater, prober for gener, primere for amplifikasjon og anvendelse av oligonukleotidanaloger til fremstilling av medikamenter			
(56)	Anførte publikasjoner	WO A 98 39352			
(57)	Sammendrag				

Forbindelser representert ved den generelle formel (1) og salter derav, og nye oligonukleotidanaloger fremstilt ved å anvende den samme som mellomprodukt, og som utviser stabile og utmerkede antisense-aktiviteter og så videre, hvor R^2 og R^2 uavhengig av hverandre er hydrogen, en hydroksylbeskyttelsesgruppe, en fosforsyregruppe eller $-P(R^3)R^4$, hvor R^3 og R^4 uavhengig av hverandre er C_1 - C_5 -cyan-alkoksy, amino substituert med C_1 - C_4 -alkyl eller lignende, A er C_1 - C_4 -alkylen, og B er eventuelt substituert purin-9-yl eller 2-oksopyrimidin-1-yl.



Teknisk område

Foreliggende oppfinnelse vedrører nye oligonukleotid-analoger som utviser antisense- eller antigenaktivitet med utmerket stabilitet, eller utviser utmerket aktivitet som et påvisningsmiddel (en probe) for et bestemt gen, eller som en primer for å starte amplifikasjon, og nye nukleosidanaloger som er mellomprodukter for deres fremstilling. Oppfinnelsen vedrører også farmasøytiske preparater og anvendelse av oligonukleotid-analoger til fremstilling av medikamenter.

Teknikkens stand

Oligonukleotidanaloger som har utmerket antisense- eller antigenaktivitet og som er stabile i kroppen, forventes å være nyttige farmasøytika. I tillegg er oligonukleotidanaloger som har en høy grad av stabil komplementær kjededannelsesevne med DNA eller mRNA, anvendbare som påvisningsmidler for et bestemt gen, eller som primere for å starte amplifikasjon.

I motsetning til dette er naturlig forekommende oligonukleotider kjent for å bli hurtig dekomponert av forskjellige nukleaser som er til stede i blodet og cellene. I noen tilfeller kan naturlig forekommende oligonukleotider ikke ha tilstrekkelig følsomhet for anvendelse som påvisningsmidler for bestemte gener, eller som primere for å starte amplifikasjon, på grunn av begrensninger på deres affinitet med komplementære basesekvenser.

For å overvinne disse manglene, er det blitt fremstilt forskjellige ikke-naturlig forekommende oligonukleotidanaloger, og de er blitt forsøkt utviklet for anvendelse som farmasøytika eller påvisningsmidler for bestemte gener. Således omfatter kjente eksempler på slike ikke-naturlig forekommende oligonukleotidanaloger de hvor et oksygenatom bundet til et fosforatom i en fosfodiesterbinding i et oligonukleotid er erstattet med et svovelatom, de hvor oksygenatomet er erstattet med en metylengruppe, de hvor oksygenatomet er erstattet med et boratom, og de hvor en sukkerrest eller baserest i et oligonukleotid er modifisert kjemisk. For eksempel har ISIS Corp. utviklet tioat-type oligonukleotid ISIS2922 (Vitravene) som et terapeut-

isk middel for human cytomegalovirus-retinitt, og ISIS2922 har kommet i handelen i USA.

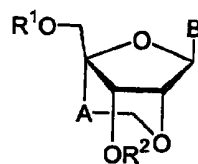
Ved vurdering av styrken på antisense- eller antigenaktivitet i de ovenfor nevnte, ikke-naturlig forekommende oligonukleotidanaloger, nemlig evnen til å danne en stabil komplementær kjede med DNA eller mRNA, stabilitet med hensyn til forskjellige nukleaser, og manifestasjonen av ugunstige bivirkninger på grunn av ikke-spesifikk binding med forskjellige proteiner i kroppen, har det imidlertid vært et behov for en ikke-naturlig forekommende oligonukleotid analog som har bedre stabilitet i kroppen, en lav forekomst av ugunstige bivirkninger og en høy evne til å danne komplementære kjeder.

Beskrivelse av oppfinnelsen

Oppfinnerne av foreliggende oppfinnelse utførte intensiv forskning over et langt tidsrom på ikke-naturlig forekommende oligonukleotidanaloger som har utmerket antisense- eller antigenaktivitet, utmerket stabilitet i kroppen og en lav forekomst av ugunstige bivirkninger. Som et resultat av denne forskningen fant de at oligonukleotidanaloger eller nukleosidanaloger som har en eterbinding i molekylene, kan anvendes som et antisense- eller antigenfarmasøytikum med utmerket stabilitet, et påvisningsmiddel (en probe) for et bestemt gen, en primer for å starte amplifikasjon, eller som mellomprodukter for deres fremstilling, og utførte foreliggende oppfinnelse.

I det etterfølgende vil foreliggende oppfinnelse bli nærmere beskrevet.

De nye nukleosidanalogene ifølge foreliggende oppfinnelse er forbindelser med formel (1):



(1)

hvor:

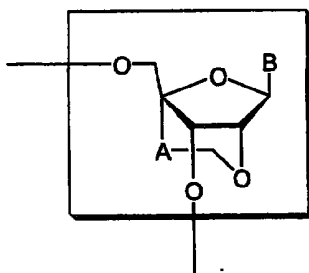
R^1 og R^2 er et hydrogenatom, benzyl, 4,4'-dimetoksytrityl eller $-P(R^3)R^4$, hvor R^3 og R^4 er diisopropylamino eller 2-cyanetyloksy,

5 A er metylen og

B er 2-okso-pyrimidin-1-yl eller purin-9-yl substituert med substituenten valgt fra hydroksylgruppe, aminogruppe, benzoylamino, isobutyrylamino og metyl, eller salter derav.

10 Oligonukleotidanalogene ifølge foreliggende oppfinnelse er oligonukleotidanaloger som har én eller to eller flere strukturer med formel (2):

15



20

(2)

25 hvor:

A er metylen og

B er en purin-9-yl-gruppe, en 2-okso-pyrimidin-1-yl-gruppe eller en substituert purin-9-yl-gruppe eller en substituert 2-okso-pyrimidin-1-yl-gruppe med minst én substituent valgt fra hydroksylgruppe, aminogruppe, benzoylamino, isobutyrylamino og metyl, eller et farmakologisk akseptabelt salt derav.

"Nukleosidanalogen" henviser til en ikke-naturlig type av "nukleosid" hvor en purin- eller pyrimidingruppe er bundet til sukker.

35 "Oligonukleotidanalogen" henviser til en ikke-naturlig type av "oligonukleotid"-derivat hvor 2-50 "nukleosider" som kan være like eller forskjellige, er bundet gjennom en fosforsyre-diesterbinding, og slike analoger kan fortrinnsvis omfatte sukkerderivater hvor sukkerresten er modifisert; tioatderivater

hvor fosforsyrediesterbindingsresten er tioert; esterprodukter hvor en terminal fosforsyrerest er forestret; og amidprodukter hvor en aminogruppe på en purinbase er amidert, mest foretrukket sukkerderivatene hvor sukkerresten er modifisert og tioatderivatene hvor fosforsyrediesterresten er tioert.

"Saltet derav" henviser til salter av forbindelsen (1) ifølge foreliggende oppfinnelse ettersom de kan omdannes til salter, og slike salter kan fortrinnsvis omfatte uorganiske salter, f.eks. metallsalter, slik som alkalimetallsalter, f.eks. natriumsalter, kaliumsalter og litiumsalter, jordalkalimetallsalter, f.eks. kalsiumsalter og magnesiumsalter, aluminiumsalter, jernsalter, sinksalter, kopparsalter, nikkelsalter og koboltsalter; slike aminsalter som uorganiske salter, f.eks. ammoniumsalter, organiske salter, f.eks. t-oktylaminsalter, dibenzylaminsalter, morfolinsalter, glukosaminsalter, fenylglysinalkylestersalter, etylendiaminsalter, N-metylglukaminsalter, guanidinsalter, dietylaminsalter, trietylaminsalter, disykloheksylaminsalter, N,N'-dibenzyletylendiaminsalter, klorprokainsalter, prokainsalter, dietanolaminsalter, N-benzylfenetylaminsalter, piperazinsalter, tetrametylammoniumsalter og tris(hydroksymetyl)aminometansalter; slike uorganiske salter som hydrohalogensyresalter, f.eks. flussyresalter, saltsyresalter, hydrobromsyresalter og hydrojodsyresalter, salpetersyresalter, perklorisyresalter, svovelsyresalter og fosforsyresalter; slike organiske syresalter som lavere alkanulfonsyresalter, f.eks. metansulfonsyresalter, trifluormetansulfonsyresalter og etansulfonsyresalter, arylsulfonylsyresalter, f.eks. benzensulfonsyresalter og p-toluensulfonsyresalter, eddiksyresalter, eplesyresalter, fumarsyresalter, ravsyresalter, sitronsyresalter, vinsyresalter, oksalsyresalter og maleinsyresalter; og slike aminosyresalter som glysinsalter, lysinsalter, argininsalter, ornitinsalter, glutaminsyresalter og asparaginsyresalter.

Ettersom de modifiserte oligonukleotidene eller polynukleotidanalogene ifølge foreliggende oppfinnelse kan omdannes til et salt, henviser "de farmakologisk akseptable salter derav" til et salt derav, og slike salter kan fortrinnsvis omfatte uorganiske salter, f.eks. metallsalter, slik som alkalimetallsalter, f.eks. natriumsalter, kaliumsalter og litiumsalter,

jordalkalimetallsalter, f.eks. kalsiumsalter og magnesiumsalter, aluminiumsalter, jernsalter, sinksalter, kobbersalter, nikkel-
 salter og koboltsalter; slike aminsalter som uorganiske salter,
 f.eks. ammoniumsalter, organiske salter, f.eks. t-oktylamin-
 5 salter, dibenzylaminsalter, morfolinsalter, glukosaminsalter,
 fenylglysinalkylestersalter, etylendiaminsalter, N-metylgluk-
 aminsalter, guanidinsalter, dietylaminsalter, trietylaminsalter,
 disykloheksylaminsalter, N,N'-dibenzyletylendiaminsalter, klor-
 prokainsalter, prokainsalter, dietanolaminsalter, N-benzylfen-
 10 etylaminsalter, piperazinsalter, tetrametylammoniumsalter og
 tris(hydroksymetyl)aminometansalter; uorganiske syresalter, slik
 som hydrohalogensyresalter, f.eks. flussyresalter, saltsyre-
 salter, hydrobromsyresalter og hydrojodsalter, salpetersyre-
 salter, perklorisyresalter, svovelsyresalter og fosforsyresalter;
 15 slike organiske syresalter som lavere alkansulfonsyresalter,
 f.eks. metansulfonsyresalter, trifluormetansulfonsyresalter og
 etansulfonsyresalter, arylsulfonsyresalter, f.eks. benzensulfon-
 syresalter og p-toluensulfonsyresalter, eddiksyresalter, eple-
 syresalter, fumarsyresalter, ravsyresalter, sitronsyresalter,
 20 vinsyresalter, oksalsyresalter og maleinsyresalter; og slike
 aminosyresalter som glysinsalter, lysinsalter, argininsalter,
 ornitinsalter, glutaminsyresalter og asparaginsyresalter.

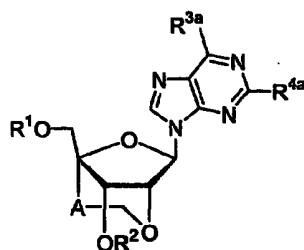
Av forbindelsene (1) og saltene derav ifølge fore-
 liggende oppfinnelse er forbindelsene valgt fra den følgende
 25 gruppe særlig foretrukket:

2'-O,4'-C-etylenguanosin,
 2'-O,4'-C-etylenadenosin,
 3',5'-di-O-benzyl-2'-O,4'-C-etylen-6-N-benzoyladenosin,
 30 3',5'-di-O-benzyl-2'-O,4'-C-etylen-2-N-isobutyrylguanosin,
 5'-O-dimetoksytrityl-2'-O,4'-C-etylen-6-N-benzoyladenosin,
 5'-O-dimetoksytrityl-2'-O,4'-C-etylen-2-N-isobutyrylguanosin,
 2'-O,4'-C-etylen-2-N-isobutyrylguanosin,
 2'-O,4'-C-etylen-6-N-benzoyladenosin,
 35 5'-O-dimetoksytrityl-2'-O,4'-C-etylen-6-N-benzoyladenosin-3'-O-
 (2-cyanetyl-N,N-diisopropyl) fosforamiditt,
 5'-O-dimetoksytrityl-2'-O,4'-C-etylen-2-N-isobutyrylguanosin-3'-
 O-(2-cyanetyl-N,N-diisopropyl) fosforamiditt,
 2'-O,4'-C-etylenuridin,

- 2'-O,4'-C-etylen-5-metyluridin,
2'-O,4'-C-etylencytidin,
2'-O,4'-C-etylen-5-metylcytidin,
3',5'-di-O-benzyl-2'-O,4'-C-etylenuridin,
5 5'-O-dimetoksytrityl-2'-O,4'-C-etylenuridin,
3',5'-di-O-benzyl-2'-O,4'-C-etylen-5-metyluridin,
5'-O-dimetoksytrityl-2'-O,4'-C-etylen-5-metyluridin,
3',5'-di-O-benzyl-2'-O,4'-C-etylen-4-N-benzoylcytidin,
5'-O-dimetoksytrityl-2'-O,4'-C-etylen-4-N-benzoylcytidin,
10 3',5'-di-O-benzyl-2'-O,4'-C-etylen-4-N-benzoyl-5-metylcytidin,
5'-O-dimetoksytrityl-2'-O,4'-C-etylen-4-N-benzoyl-5-metylcyti-
din,
2'-O,4'-C-etylen-4-N-benzoylcytidin,
2'-O,4'-C-etylen-4-N-benzoyl-5-metylcytidin,
15 5'-O-dimetoksytrityl-2'-O,4'-C-etylenuridin-3'-O-(2-cyanetyl-
N,N-diisopropyl) fosforamiditt,
5'-O-dimetoksytrityl-2'-O,4'-C-etylen-5-metyluridin-3'-O-(2-
cyanetyl-N,N-diisopropyl) fosforamiditt,
5'-O-dimetoksytrityl-2'-O,4'-C-etylen-4-N-benzoylcytidin-3'-O-
20 (2-cyanetyl-N,N-diisopropyl) fosforamiditt og
5'-O-dimetoksytrityl-2'-O,4'-C-etylen-4-N-benzoyl-5-metylcyti-
din-3'-O-(2-cyanetyl-N,N-diisopropyl) fosforamiditt.

Bestemte forbindelser som er inkludert i forbindelsen
med formel (1) ovenfor ifølge foreliggende oppfinnelse, er
25 illustrert i tabellene 1 og 2.

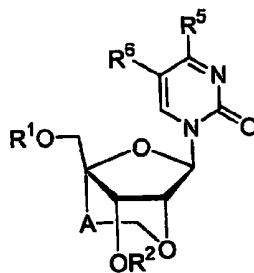
I tabell 1 og tabell 2 er Eks.-num. eksemplifiserings-
forbindelsesnummer, Bn er en benzylgruppe, Bz er en benzoyl-
gruppe og DMTr er en 4,4'-dimetoksytrifenylmetyl- (dimetoksy-
trityl) gruppe.



(1')

Tabell 1

Eks. - num.	A	R ¹	R ²	R ^{3a}	R ^{4a}
1-5	CH ₂	H	H	OH	NH ₂
1-7	CH ₂	H	H	NH ₂	H
1-23	CH ₂	Bn	Bn	NHBz	H
1-24	CH ₂	Bn	Bn	OH	NHCOCH(CH ₃) ₂
1-31	CH ₂	DMTr	H	NHBz	H
1-35	CH ₂	DMTr	H	OH	NHCOCH(CH ₃) ₂
1-177	CH ₂	H	H	OH	NHCOCH(CH ₃) ₂
1-178	CH ₂	H	H	NHBz	H
1-185	CH ₂	DMTr	P(N(iPr) ₂)(OC ₂ H ₄ CN)	OH	NHCOCH(CH ₃) ₂
1-186	CH ₂	DMTr	P(N(iPr) ₂)(OC ₂ H ₄ CN)	NHBz	H



(1'')

Tabell 2

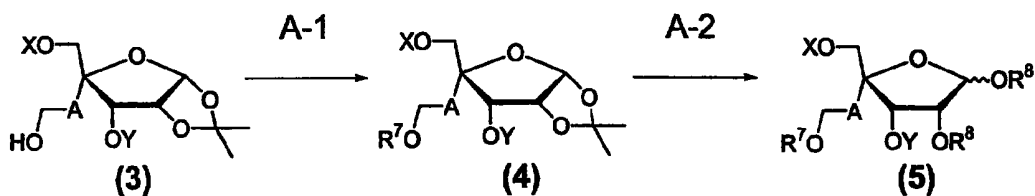
15

Eks. - num.	A	R ¹	R ²	R ⁵	R ⁶
2-1	CH ₂	H	H	OH	H
2-2	CH ₂	H	H	OH	CH ₃
2-3	CH ₂	H	H	NH ₂	H
2-4	CH ₂	H	H	NH ₂	CH ₃
2-10	CH ₂	Bn	Bn	OH	H
2-15	CH ₂	DMTr	H	OH	H
2-22	CH ₂	Bn	Bn	OH	CH ₃
2-27	CH ₂	DMTr	H	OH	CH ₃
2-34	CH ₂	Bn	Bn	NHBz	H
2-39	CH ₂	DMTr	H	NHBz	H
2-46	CH ₂	Bn	Bn	NHBz	CH ₃
2-51	CH ₂	DMTr	H	NHBz	CH ₃
2-225	CH ₂	H	H	NHBz	H
2-226	CH ₂	H	H	NHBz	CH ₃
2-233	CH ₂	DMTr	P(N(iPr) ₂)(OC ₂ H ₄ CN)	OH	H
2-234	CH ₂	DMTr	P(N(iPr) ₂)(OC ₂ H ₄ CN)	OH	CH ₃
2-235	CH ₂	DMTr	P(N(iPr) ₂)(OC ₂ H ₄ CN)	NHBz	H
2-236	CH ₂	DMTr	P(N(iPr) ₂)(OC ₂ H ₄ CN)	NHBz	CH ₃

Forbindelsen (1) ifølge foreliggende oppfinnelse kan fremstilles i henhold til fremgangsmåte A beskrevet nedenunder.

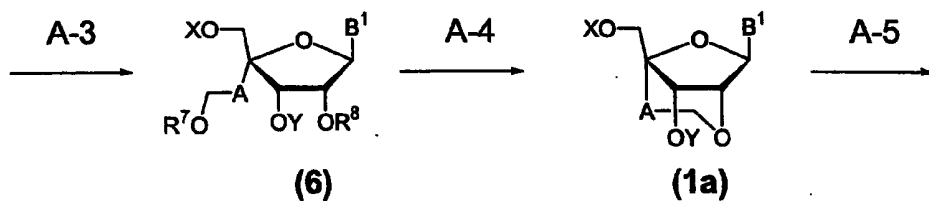
Fremgangsmåte A

10

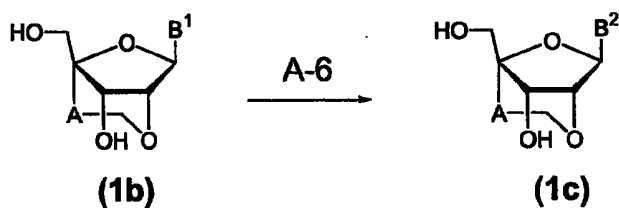


15

20



25



30

I fremgangsmåte A er X en beskyttelsesgruppe, Y er en beskyttelsesgruppe, A har den samme betydning som definert ovenfor, mens B¹ er en purin-9-yl-gruppe, en substituert purin-9-yl-gruppe eller en substituert 2-okso-pyrimidin-1-yl-gruppe,

35

hvor substituentene er valgt fra de ovenfor nevnte substituenten α , men med utelukkelse av en ubeskyttet aminogruppe i "en aminogruppe som kan være beskyttet", mens B^2 er en purin-9-yl-gruppe, en substituert purin-9-yl-gruppe eller en substituert 2-okso-pyrimidin-1-yl-gruppe, hvor substituentene er valgt fra de ovenfor nevnte substituenten α , men med utelukkelse av de beskyttede aminogruppene i "en aminogruppe som kan være beskyttet", R^7 er en gruppe som danner en uttredende gruppe, og R^8 er en alifatisk acylgruppe med 1-4 karbonatomer.

Beskyttelsesgruppen X er den samme gruppe som "hydroksylbeskyttelsesgruppen" i R^1 ovenfor.

Beskyttelsesgruppen Y er den samme gruppe som "hydroksylbeskyttelsesgruppen" i R^2 ovenfor.

"Gruppen som danner en uttredende gruppe" R^7 , kan omfatte en lavere alkylsulfonylgruppe, slik som metansulfonyl og etansulfonyl; en halogensubstituert lavere alkylsulfonylgruppe, slik som trifluormetansulfonyl; og en arylsulfonylgruppe, slik som p-toluensulfonyl; fortrinnsvis en metansulfonylgruppe eller en p-toluensulfonylgruppe.

"Den alifatiske acylgruppe som har fra 2 til 4 karbonatomer" hvor R^8 kan omfatte acetyl-, propionyl-, butyrylgrupper og lignende, fortrinnsvis en acetylgruppe.

I det etterfølgende vil hvert trinn i fremgangsmåte A bli beskrevet nærmere.

Trinn A-1

Det foreliggende trinn er å fremstille en forbindelse (4) ved å omsette en forbindelse (3) som kan fremstilles ved hjelp av fremgangsmåtene B-D beskrevet senere, med et reagens for å innføre en uttredende gruppe, i nærvær av en basekatalysator i et inert oppløsningsmiddel.

Oppløsningsmidlet som kan anvendes her, kan omfatte alifatiske hydrokarboner, slik som heksan, heptan, ligroin og petroleter; aromatiske hydrokarboner, slik som benzen, toluen og xylene; halogenerte hydrokarboner, slik som metylenklorid, kloroform, karbontetraklorid, dikloretan, klorbenzen og diklorbenzen; estere, slik som etylformiat, etylacetat, propylacetat, butylacetat og dietylkarbonat; etere, slik som dietyleter, diisopropyleter, tetrahydrofuran, dioksan, dimetoksyetan og

dietylenglykoldimetyleter; ketoner, slik som aceton, metyletylketon, metylisobutylketon, isoforon og sykloheksanon; nitroforbindelser, slik som nitroetan og nitrobenzen; nitriler, slik som acetonitril og isobutyronitril; amider, slik som
5 formamid, N,N-dimetylformamid, N,N-dimetylacetamid, N-metyl-2-pyrrolidon, N-metylpyrrolidinon og heksametylfosforsyretriamid; sulfoksider, slik som sulfolan; og pyridinderivater; fortrinnsvis pyridin.

Basekatalysatoren som kan anvendes her, kan fortrinnsvis omfatte en slik base som trietylamin, pyridin og dimetylaminopyridin.
10

Reagenset for innføring av en uttredende gruppe kan omfatte alkylsulfonylhalogenider, slik som metansulfonylklorid og etansulfonylbromid; og arylsulfonylhalogenider, slik som p-toluensulfonylklorid, fortrinnsvis metansulfonylklorid og p-toluensulfonylklorid.
15

Reaksjonstemperaturen varierer avhengig av utgangsmaterialet, oppløsningsmidlet, reagenset for innføring av en uttredende gruppe og basekatalysatoren, men er vanligvis fra 0
20 til 50 °C, fortrinnsvis fra 10 til 40 °C.

Reaksjonstiden varierer avhengig av utgangsmaterialet, oppløsningsmidlet, reagenset for innføring av en uttredende gruppe, basekatalysatoren og reaksjonstemperaturen, men er vanligvis fra 10 minutter til 24 timer, fortrinnsvis fra 1 til
25 10 timer.

Etter reaksjonen fås den ønskede forbindelse (4) ifølge foreliggende omsetning f.eks. ved å nøytralisere reaksjonsoppløsningen, konsentrere reaksjonsblandingen, tilsette et organisk oppløsningsmiddel som er ublandbart med vann, slik som etylacetat, vaske med vann, fraskille et organisk lag som inneholder
30 den ønskede forbindelse, tørke over vannfritt magnesiumsulfat og avdestillere oppløsningsmidlet.

Det derved erholdte, ønskede produkt kan, om nødvendig, renses videre ved hjelp av en vanlig metode, f.eks. rekrystallasjon og silikagelkolonnekromatografi.
35

Trinn A-2

Det foreliggende trinn er å fremstille forbindelsen (5) ved å omsette forbindelsen (4) fremstilt i trinn A-1, med et

syreanhydrid i nærvær av en syrekatalysator i et oppløsningsmiddel.

Oppløsningsmidlet som kan anvendes her, kan omfatte etere, slik som dietyleter, dioksan og tetrahydrofuran; nitriler, slik som acetonitril og isobutyronitril; amider, slik som formamid, N,N-dimetylformamid, N,N-dimetylacetamid, N-metyl-2-pyrrolidon, N-metylpyrrolidinon og heksametylfosforsyretriamid; og organiske syrer, slik som eddiksyre; fortrinnsvis eddiksyre.

Syrekatalysatoren som kan anvendes her, kan omfatte uorganiske syrer, slik som saltsyre, svovelsyre og salpetersyre, fortrinnsvis svovelsyre (særlig konsentrert svovelsyre).

Syreanhydridet som kan anvendes her, kan omfatte et anhydrid av en lavere alifatisk karboksylsyre, slik som eddiksyreanhydrid og propionsyreanhydrid, fortrinnsvis eddiksyreanhydrid.

Reaksjonstemperaturen varierer avhengig av utgangsmaterialet, oppløsningsmidlet, den sure katalysatoren og syreanhydridet, og er vanligvis fra 0 til 50 °C, fortrinnsvis fra 10 til 40 °C.

Reaksjonstiden varierer avhengig av utgangsmaterialet, oppløsningsmidlet, den sure katalysatoren, syreanhydridet og reaksjonstemperaturen, men er vanligvis fra 10 minutter til 12 timer, fortrinnsvis fra 30 minutter til 3 timer.

Etter reaksjonen fås den ønskede forbindelse (5) ifølge foreliggende omsetning f.eks. ved å konsentrere reaksjonsblandingen, tilsette et organisk oppløsningsmiddel som ikke er blandbart med vann, slik som etylacetat, vaske med vann, f.eks. skille et organisk lag som inneholder den ønskede forbindelse, tørke over vannfritt magnesiumsulfat og avdestillere oppløsningsmidlet.

Det derved erholdte, ønskede produkt kan, om nødvendig, renses videre ved hjelp av en vanlig metode, f.eks. rekrySTALLISASJON, silikagelkolonnekromatografi og lignende.

Trinn A-3

Det foreliggende trinn er å fremstille forbindelsen (6) ved å omsette forbindelsen (5) fremstilt i trinn A-2, med en trimetylsilylert forbindelse som tilsvarer purinet eller pyri-

midinet som kan ha en ønsket substituent fremstilt i henhold til en litteraturhenvisning (H. Vorbruggen, K. Krolikiewicz og B. Bennua, Chem. Ber., 114, 1234-1255 (1981)) i nærvær av en sur katalysator i et inert oppløsningsmiddel.

5 Oppløsningsmidlet som kan anvendes her, kan omfatte slike aromatiske hydrokarboner som benzen, toluen og xylene; slike halogenerte hydrokarboner som metylenklorid, kloroform, karbontetraklorid, 1,2-dikloretan, klorbenzen og diklorbenzen; slike nitriler som acetonitril og isobutyronitril; slike amider
10 som formamid, N,N-dimetylformamid, N,N-dimetylacetamid, N-metyl-2-pyrrolidon, N-metylpyrrolidinon og heksametylfosforsyretriamid; karbonsulfid; fortrinnsvis 1,2-dikloretan.

Den sure katalysatoren som kan anvendes her, kan omfatte Lewis-syrekatalysatorer, slik som AlCl_3 , SnCl_4 , TiCl_4 ,
15 ZnCl_2 , BF_3 , trimetylsilyltrifluormetansulfonat; fortrinnsvis trimetylsilyltrifluormetansulfonat.

Reaksjonstemperaturen varierer avhengig av utgangsmaterialet, oppløsningsmidlet og den sure katalysatoren, men er vanligvis fra 0 til 100 °C, fortrinnsvis fra 50 til 80 °C.

20 Reaksjonstiden varierer avhengig av utgangsmaterialet, oppløsningsmidlet, den sure katalysatoren og reaksjonstemperaturen, men er vanligvis fra 1 time til 24 timer, fortrinnsvis fra 1 time til 8 timer.

Etter reaksjonen fås den ønskede forbindelse (6) ifølge
25 foreliggende omsetning f.eks. ved å konsentrere reaksjonsblandingen, tilsette et organisk oppløsningsmiddel som ikke er blandbart med vann, slik som etylacetat, vaske med vann, fraskille et organisk lag som inneholder den ønskede forbindelse, tørke over vannfritt magnesiumsulfat og avdestillere oppløsningsmidlet.
30

Det derved erholdte, ønskede produkt kan, om nødvendig, renses videre ved hjelp av en vanlig metode, f.eks. rekrystallasjon, silikagelkolonnekromatografi og lignende.

35 Trinn A-4

Det foreliggende trinn er å fremstille forbindelsen (1a) ifølge foreliggende oppfinnelse ved ringslutning av forbindelsen (6) fremstilt ved hjelp av trinn A-3 i nærvær av en basekatalysator i et inert oppløsningsmiddel.

Oppløsningsmidlet som kan anvendes her, kan omfatte vann; pyridinderivater; acetonitriler, slik som acetonitril og isobutyronitril; amider, slik som formamid, N,N-dimetylformamid, N,N-dimetylacetamid, N-metyl-2-pyrrolidon, N-metylpyrrolidinon og heksametylfosforsyretriamid; og en blanding derav, fortrinnsvis en blanding av vann og pyridin.

Basekatalysatoren som kan anvendes her, kan omfatte slike alkalimetallhydroksider som natriumhydroksid og kaliumhydroksid; slike alkalimetallkarbonater som natriumkarbonat og kaliumkarbonat; slike alkalimetallalkoksider som natriummetoksid og natriumetoksid; og vandig ammoniakk; fortrinnsvis alkalimetallhydroksider (særlig natriumhydroksid).

Reaksjonstemperaturen varierer avhengig av utgangsmaterialet, oppløsningsmidlet og basekatalysatoren, men er vanligvis fra 0 til 50 °C, fortrinnsvis fra 10 til 30 °C.

Reaksjonstiden varierer avhengig av utgangsmaterialet, oppløsningsmidlet, den sure katalysatoren og reaksjonstemperaturen, men er vanligvis fra 1 minutt til 5 timer, fortrinnsvis fra 1 minutt til 30 minutter.

Etter reaksjonen fås den ønskede forbindelse (1a) ifølge foreliggende omsetning f.eks. ved å konsentrere reaksjonsblandingen, tilsette et organisk oppløsningsmiddel som ikke er blandbart med vann, slik som etylacetat, vaske med vann, fraskille et organisk lag som inneholder den ønskede forbindelse, tørke over vannfritt magnesiumsulfat og avdestillere oppløsningsmidlet.

Det derved erholdte, ønskede produkt kan, om nødvendig, renses videre ved hjelp av en vanlig metode, f.eks. rekrystallasjon, silikagelkolonnekromatografi og lignende.

Trinn A-5

Det foreliggende trinn er å fremstille forbindelsen (1b) ved å omsette forbindelsen (1a) erholdt ved hjelp av trinn A-4 med et avbeskyttelsesreagens i et inert oppløsningsmiddel.

Avbeskyttelsesmetoden varierer avhengig av typen av beskyttelsesgruppe og er ikke spesielt begrenset med mindre den forårsaker andre bireaksjoner og kan utføres f.eks. ved hjelp av en metode beskrevet i "Protective Groups in Organic Synthesis"

(Theodora W. Greene og Peter G.M. Wuts, 1999, publisert av A. Wiley-Interscience Publication).

Avbeskyttelsesmetoden kan særlig utføres ved hjelp av de følgende fremgangsmåter i tilfellet hvor beskyttelsesgruppen er (1) "en alifatisk acylgruppe eller en aromatisk acylgruppe", (2) "en metylgruppe substituert med fra 1 til 3 arylgrupper" eller "en metylgruppe substituert med 1 til 3 arylgrupper, hvor arylringen er substituert med lavere alkyl, lavere alkoksy, halogen eller cyangruppe" eller (3) "en silylgruppe".

(1) I tilfellet hvor beskyttelsesgruppen er en alifatisk acylgruppe eller en aromatisk acylgruppe, utføres avbeskyttelsesreaksjonen vanligvis ved å behandle den med en base i et inert oppløsningsmiddel.

Oppløsningsmidlet som kan anvendes her, er ikke spesielt begrenset så lenge som det blandes lett med vann, ikke inhiberer reaksjonen og oppløser utgangsmaterialet i en viss utstrekning, og kan omfatte vandige eller vannfrie amider, slik som dimetylformamid og dimetylacetamid; halogenerte hydrokarboner, slik som metylenklorid, kloroform, 1,2-dikloretan eller karbontetraklorid; og etere, slik som tetrahydrofuran, dietyl-eter og dioksan; fortrinnsvis etere, mest foretrukket tetrahydrofuran.

Basen som kan anvendes her, kan omfatte alkalimetallhydroksider, slik som litiumhydroksid, kaliumhydroksid og natriumhydroksid; alkalimetallkarbonater, slik som natriumkarbonat og kaliumkarbonat; alkalimetallalkoksider, slik som natriummetoksid og natriumetoksid; og en ammoniakkoppløsning, slik som vandig ammoniakk og en oppløsning og ammoniakk og metanol.

Reaksjonstemperaturen er fra 0 til 60 °C, fortrinnsvis fra 20 til 40 °C.

Reaksjonstiden er fra 10 minutter til 24 timer, fortrinnsvis fra 1 time til 3 timer.

Etter reaksjonen fås den ønskede forbindelse (1b) ifølge foreliggende omsetning f.eks. ved å konsentrere reaksjonsblandingen, tilsette et organisk oppløsningsmiddel som ikke er blandbart med vann, slik som etylacetat, vaske med vann, fraskille et organisk lag som inneholder den ønskede forbind-

else, tørke over vannfritt magnesiumsulfat og avdestillere oppløsningsmidlet.

Det derved erholdte, ønskede produkt kan, om nødvendig, renses videre ved hjelp av en vanlig metode, f.eks. rekrystallisasjon, silikagelkolonnekromatografi og lignende.

(2) I det tilfellet hvor beskyttelsesgruppen er "en metylgruppe substituert med fra 1 til 3 arylgrupper" eller "en metylgruppe substituert med fra 1 til 3 arylgrupper, hvor arylringen er substituert med en lavere alkyl, lavere alkoksy, halogen eller cyangruppe", utføres reaksjonen i et inert oppløsningsmiddel under anvendelse av et reduksjonsmiddel.

Oppløsningsmidlet som kan anvendes her, kan fortrinnsvis omfatte slike alkoholer som metanol, etanol og isopropanol; slike etere som dietyleter, tetrahydrofuran og dioksan; slike aromatiske hydrokarboner som toluen, benzen og xylen; slike alifatiske hydrokarboner som heksan og sykloheksan; slike estere som etylacetat og propylacetat; slike organiske syrer som eddiksyre; eller en blanding av disse organiske oppløsningsmidlene og vann.

Reduksjonsmidlet som kan anvendes her, er ikke spesielt begrenset så lenge som det er vanlig brukt for en katalytisk reduksjon, og kan fortrinnsvis omfatte palladium-på-karbon, Raney-nikkel, platinaoksid, platina-sort, rhodium-aluminiumoksid, trifenylfosfin-rhodiumklorid og palladium-bariumsulfat.

Trykket er ikke spesielt begrenset, men er vanligvis fra 1 til 10 atm.

Reaksjonstemperaturen er fra 0 til 60 °C, fortrinnsvis fra 20 til 40 °C.

Reaksjonstiden er fra 10 minutter til 24 timer, fortrinnsvis fra 1 time til 3 timer.

Etter reaksjonen fås den ønskede forbindelse (1b) av den foreliggende omsetning f.eks. ved å fjerne reduksjonsmidlet fra reaksjonsblandingen, tilsette et organisk oppløsningsmiddel som er ublandbart med vann, slik som etylacetat, vasking med vann, fraskillelse av et organisk lag som inneholder den ønskede forbindelse, tørking over vannfritt magnesiumsulfat og avdestillering av oppløsningsmidlet. Det derved erholdte, ønskede produkt kan, om nødvendig, renses videre ved hjelp av en vanlig

metode, f.eks. rekrystallisasjon, silikagelkolonnekromatografi og lignende.

I det tilfellet hvor beskyttelsesgruppen er "en metylgruppe substituert med tre arylgrupper", dvs. en tritylgruppe, kan avbeskyttelsesreaksjonen også utføres ved å anvende en syre.

I dette tilfellet kan oppløsningsmidlet som kan anvendes her, omfatte slike aromatiske hydrokarboner som benzen, toluen og xylen; slike halogenerte hydrokarboner som metylenklorid, kloroform, karbontetraklorid, 1,2-dikloretan, klorbenzen og diklorbenzen; slike alkoholer som metanol, etanol, isopropanol og tert.-butanol; slike nitriler som acetonitril og isobutyronitril; slike amider som formamid, N,N-dimetylformamid, N,N-dimetylacetamid, N-metyl-2-pyrrolidon, N-metylpyrrolidinon og heksametylfosforsyretriamid; og slike organiske syrer som eddiksyre; fortrinnsvis organiske syrer (særlig eddiksyre) eller alkoholer (særlig tert.-butanol).

Syren som kan anvendes her, kan fortrinnsvis omfatte eddiksyre eller trifluoreddiksyre.

Reaksjonstemperaturen er fra 0 til 60 °C, fortrinnsvis fra 20 til 40 °C.

Reaksjonstiden er fra 10 minutter til 24 timer, fortrinnsvis fra 1 til 3 timer.

Etter omsetningen fås den ønskede forbindelse (1b) av den foreliggende reaksjon f.eks. ved å nøytralisere reaksjonsblandingen, tilsette et organisk oppløsningsmiddel som er ublandbart med vann, slik som etylacetat, vasking med vann, fraskillelse av et organisk lag som inneholder den ønskede forbindelse, tørking over vannfritt magnesiumsulfat og avdestillering av oppløsningsmidlet.

Det derved erholdte, ønskede produkt kan, om nødvendig, renses videre ved hjelp av en vanlig metode, f.eks. rekrystallisasjon, silikagelkolonnekromatografi og lignende.

(3) I det tilfellet hvor beskyttelsesgruppen er "en silylgruppe", kan den vanligvis fjernes ved å behandle med en forbindelse som gir et fluoranion, slik som tetrabutylammoniumfluorid, flussyre, flussyre-pyridin og kaliumfluorid, eller organiske syrer, slik som eddiksyre, metansulfonsyre, para-

toluensulfonsyre, trifluoreddiksyre og trifluormetansulfonsyre, eller slike uorganiske syrer som saltsyre.

I det tilfellet hvor beskyttelsesgruppen fjernes ved hjelp av et fluoranion, fremmes reaksjonen noen ganger ved å tilsette slike organiske syrer som maursyre, eddiksyre og propionsyre.

Oppløsningsmidlet som kan anvendes her, er ikke spesielt begrenset så lenge som det ikke inhiberer reaksjonen og oppløser utgangsmaterialet i en viss utstrekning, og kan fortrinnsvis omfatte slike etere som dietyleter, diisopropyleter, tetrahydrofuran, dioksan, dimetoksyetan og dietylenglykoldimetyleter; slike nitriler som acetonitril og isobutyronitril; vann; slike organiske syrer som eddiksyre; og en blanding derav.

Reaksjonstemperaturen er fra 0 til 100 °C, fortrinnsvis fra 20 til 70 °C.

Reaksjonstiden er fra 5 minutter til 48 timer, fortrinnsvis fra 1 time til 24 timer.

Etter reaksjonen fås den ønskede forbindelse (1b) av den foreliggende omsetning f.eks. ved å konsentrere reaksjonsblandingen, tilsette et organisk oppløsningsmiddel som er ublandbart med vann, slik som etylacetat, vaske med vann, ferskille et organisk lag som inneholder den ønskede forbindelse, tørke over vannfritt magnesiumsulfat og avdestillere oppløsningsmidlet. Det derved erholdte, ønskede produkt kan, om nødvendig, renses videre ved hjelp av en vanlig metode, f.eks. rekrySTALLISASJON, silikagelkolonnekromatografi og lignende.

Trinn A-6

Det foreliggende trinn er å fremstille forbindelsen (1c) ifølge foreliggende oppfinnelse ved å omsette forbindelsen (1b) erholdt i trinn A-5 med et avbeskyttelsesreagens i et inert oppløsningsmiddel.

Avbeskyttelsesmetoden varierer avhengig av typen av beskyttelsesgruppe og er ikke spesielt begrenset så lenge som den ikke forårsaker andre bireaksjoner, og kan f.eks. utføres ved hjelp av en metode beskrevet i "Protective Groups in Organic Synthesis" (av Theodora W. Greene, 1981, publisert av A, Wiley-Interscience Publication).

Avbeskyttelsesmetoden kan særlig utføres ved hjelp av den følgende metode i det tilfellet hvor beskyttelsesgruppen er en alifatisk acylgruppe eller en aromatisk acylgruppe.

Avbeskyttelsesmetoden utføres således vanligvis ved å omsette med en base i et inert oppløsningsmiddel i det tilfellet hvor beskyttelsesgruppen er en alifatisk acylgruppe eller en aromatisk acylgruppe.

Oppløsningsmidlet som kan anvendes her, er ikke spesielt begrenset så lenge som det blandes lett med vann, ikke inhiberer reaksjonen og oppløser utgangsmaterialet i en viss utstrekning, og kan omfatte vandige og vannfrie alkoholer, slik som metanol og etanol; slike amider som dimetylformamid og dimetylacetamid; slike halogenerte hydrokarboner som metylenklorid, kloroform, 1,2-dikloretan eller karbontetraklorid; og slike etere som tetrahydrofuran, dietyleter og dioksan; fortrinnsvis alkoholer, mest foretrukket metanol.

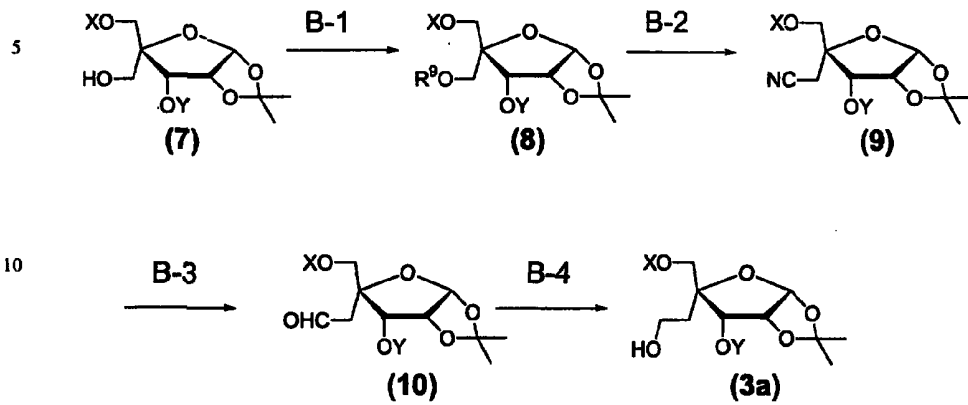
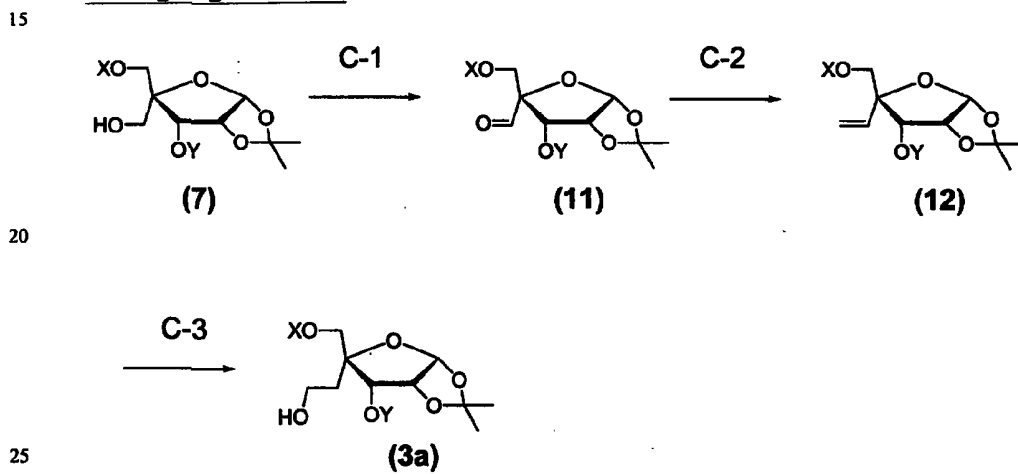
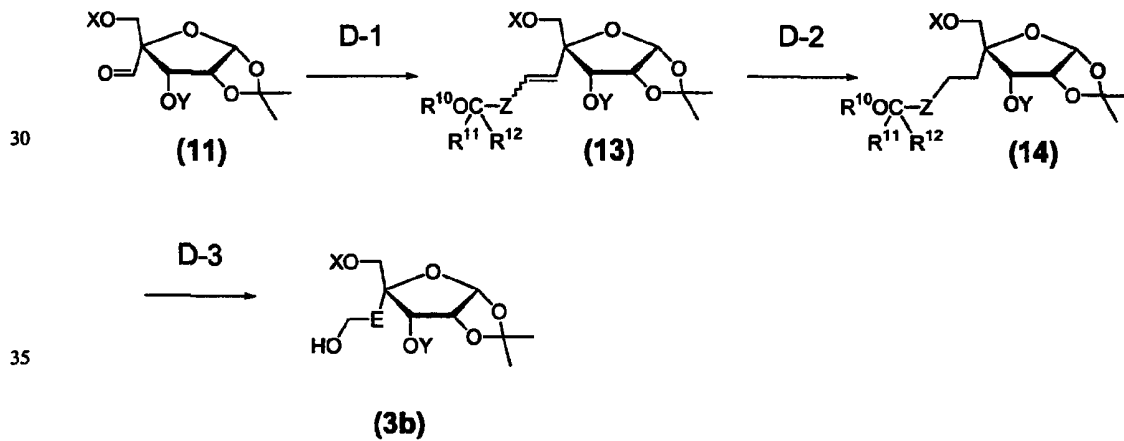
Basen som kan anvendes her, kan omfatte alkalimetallhydroksider, slik som litiumhydroksid, kaliumhydroksid og natriumhydroksid; slike alkalimetallkarbonater som natriumkarbonat og kaliumkarbonat; slike alkalimetallalkoksider som natriummetoksid og natriumetoksid; og ammoniakk; fortrinnsvis ammoniakk.

Reaksjonstemperaturen er fra 0 til 50 °C, fortrinnsvis fra 10 til 40 °C.

Reaksjonstiden er fra 10 minutter til 24 timer, fortrinnsvis fra 10 minutter til 15 timer. Etter omsetningen fås den ønskede forbindelse (1c) av den foreliggende reaksjon f.eks. ved å konsentrere reaksjonsblandingen, tilsette et organisk oppløsningsmiddel som er ublandbart med vann, slik som etylacetat, vaske med vann, fraskille et organisk lag som inneholder den ønskede forbindelse, tørke over vannfritt magnesiumsulfat og avdestillere oppløsningsmidlet.

Det derved erholdte, ønskede produkt kan, om nødvendig, renses videre ved hjelp av en vanlig metode, f.eks. rekrystallasjon, silikagelkolonnekromatografi og lignende.

Mellomproduktet (3) beskrevet ovenfor, kan fremstilles ved hjelp av fremgangsmåtene B-D beskrevet nedenunder.

Fremgangsmåte BFremgangsmåte CFremgangsmåte D

I fremgangsmåtene B-D har X og Y de samme betydningene som definert ovenfor; R^9 er en gruppe som danner en uttredende gruppe; E er en etylen-, trimetylen- eller tetrametylengruppe; og Z er en enkeltbinding, en metylen- eller etylengruppe.

5 Gruppen som danner en uttredende gruppe R^9 , kan omfatte gruppen beskrevet under R^7 ovenfor, fortrinnsvis en trifluor-
metansulfonylgruppe.

R^{11} og R^{12} er like og er et hydrogenatom eller danner til sammen et oksygenatom.

10 I det tilfellet hvor R^{11} og R^{12} til sammen danner oksygenatomet, er R^{10} en alkylgruppe med 1-4 karbonatomer, slik som metyl, etyl, propyl, isopropyl, butyl, isobutyl, s-butyl og tert.-butyl, fortrinnsvis en metylgruppe. I det tilfellet hvor R^{11} og R^{12} er like og er et hydrogenatom, kan R^{10} omfatte en
15 aralkylgruppe, slik som en benzylgruppe; en alkoksyalkylgruppe, slik som en metoksymetylgruppe; en arylkarbonyloksymetylgruppe, slik som en benzoyloksymetylgruppe, en aralkyloksymetylgruppe, slik som en benzyloksymetylgruppe; en alkoksyalkoksyalkylgruppe, slik som en metoksyetoksymetylgruppe; en silylgruppe, slik som
20 trimetylsilyl, t-butyldimetylsilyl, difenylmetylsilyl, difenylbutylsilyl, difenylisopropylsilyl og fenyldiisopropylsilyl.

Forbindelsen (7), dvs. utgangsmaterialet brukt i fremgangsmåte B eller fremgangsmåte C, kan fremstilles ved hjelp av den følgende fremgangsmåte.

25 En forbindelse som tilsvareer forbindelsen (6), hvor "X"-resten er et hydrogenatom, fremstilles således fra kommersielt tilgjengelig 1,1,5,6-diisopropyliden-D-glukose ifølge fremgangsmåten i litteraturen (R.D. Youssefyeh, J.P.H. Verheyden, J.G. Moffatt, J. Org. Chem., 44, 1301-1309 (1979)), og deretter
30 kan forbindelsen (6) fremstilles i henhold til fremgangsmåten ifølge litteraturen (T. Waga, T. Nishizaki, I. Miyakawa, H. Ohruai, H. Meguro, Biosci. Biotechnol. Biochem., 57, 1433-1438 (1993)) (i tilfellet med X = Bn).

35 Fremgangsmåte B

Trinn B-1

Det foreliggende trinn er å fremstille forbindelsen (8) ved å omsette forbindelsen (7) fremstilt ved hjelp av den ovenfor nevnte fremgangsmåte med et reagens for innføring av en

uttredende gruppe i nærvær av en basekatalysator i et inert oppløsningsmiddel.

Oppløsningsmidlet som kan anvendes her, kan omfatte slike amider som dimetylformamid og dimetylacetamid; slike halogenerte hydrokarboner som metylenklorid, kloroform, 1,2-dikloretan eller karbontetraklorid; og slike etere som tetrahydrofuran, dietyleter og dioksan; fortrinnsvis metylenklorid.

Basekatalysatoren som kan anvendes her, kan fortrinnsvis omfatte en slik base som trietylamin, pyridin og dimetylaminopyridin.

Reagenset som kan anvendes for innføring av en uttredende gruppe, kan fortrinnsvis omfatte trifluormetansulfonsyreklorid eller trifluormetansulfonsyreanhydrid.

Reaksjonstemperaturen varierer avhengig av utgangsmaterialet, oppløsningsmidlet og den sure katalysatoren, men er vanligvis fra -100 til -50 °C, fortrinnsvis fra -100 til -70 °C.

Reaksjonstiden varierer avhengig av utgangsmaterialet, oppløsningsmidlet, den sure katalysatoren og reaksjonstemperaturen, men er vanligvis fra 30 minutter til 12 timer, fortrinnsvis fra 30 minutter til 3 timer.

Etter omsetningen fås den ønskede forbindelse (8) fra den foreliggende reaksjon f.eks. ved å konsentrere reaksjonsblandingen, tilsette et organisk oppløsningsmiddel som er ublandbart med vann, slik som etylacetat, vaske med vann, fraskille et organisk lag som inneholder den ønskede forbindelse, tørke over vannfritt magnesiumsulfat og avdestillere oppløsningsmidlet.

Det derved erholdte, ønskede produkt kan, om nødvendig, renses videre ved hjelp av en vanlig metode, f.eks. rekrySTALLISASJON, silikagelkolonnekromatografi og lignende.

Trinn B-2

Det foreliggende trinn er å fremstille forbindelsen (9) ved å omsette forbindelsen (8) fremstilt ved hjelp av trinn B-1, med et cyaneringsreagens i et inert oppløsningsmiddel.

Oppløsningsmidlet som kan anvendes her, kan omfatte slike amider som dimetylformamid og dimetylacetamid; slike halogenerte hydrokarboner som metylenklorid, kloroform, 1,2-

dikloretan eller karbontetraklorid; slike etere som tetrahydrofuran, dietyleter og dioksan; acetonitril; dimetylsulfoksid og lignende; fortrinnsvis amider (dimetylformamid).

Cyaneringsreagenser som kan anvendes her, kan omfatte 5 KCN, NaCN og trimetylsilancyanid, fortrinnsvis NaCN.

Reaksjonstemperaturen varierer avhengig av utgangsmaterialet, oppløsningsmidlet og cyaneringsreagenset, men er vanligvis fra 0 til 100 °C, fortrinnsvis fra 30 til 70 °C.

Reaksjonstiden varierer avhengig av utgangsmaterialet, 10 oppløsningsmidlet, cyaneringsreagenset og reaksjonstemperaturen, men er vanligvis fra 30 minutter til 12 timer, fortrinnsvis fra 1 til 3 timer.

Etter omsetningen fås den ønskede forbindelse (9) fra den foreliggende reaksjon f.eks. ved å konsentrere reaksjons- 15 blandingen, tilsette et organisk oppløsningsmiddel som er ublandbart med vann, slik som etylacetat, vaske med vann, fraskille et organisk lag som inneholder den ønskede forbindelse, tørke over vannfritt magnesiumsulfat og avdestillere oppløsningsmidlet.

20 Det således erholdte, ønskede produkt kan, om nødvendig, renses videre ved hjelp av en vanlig metode, f.eks. rekrySTALLISASJON, silikagelkolonnekromatografi og lignende.

Trinn B-3

25 Det foreliggende trinn er å fremstille forbindelsen (10) ved å omsette forbindelsen (9) fremstilt i trinn B-2 med et reduksjonsmiddel i et inert oppløsningsmiddel.

Oppløsningsmidlet som kan anvendes her, kan omfatte halogenerte hydrokarboner, slik som metylenklorid, kloroform, 30 1,2-dikloretan eller karbontetraklorid; slike alifatiske hydrokarboner som heksan, heptan, ligroin og petroleter; slike aromatiske hydrokarboner som benzen, toluen og xylen; slike etere som dietyleter, diisopropyleter, tetrahydrofuran, dioksan, dimetoksyetan og dietylenglykoldietyleter; og slike ketoner som 35 aceton, metyletylketon, metylisobutylketonisofofon og sykloheksanon; fortrinnsvis halogenerte hydrokarboner (særlig metylenklorid).

Reduksjonsmidlet som kan anvendes her, kan omfatte diisobutylaluminiumhydrid og trietoksyaluminiumhydrid, fortrinnsvis diisobutylaluminiumhydrid.

Reaksjonstemperaturen varierer avhengig av utgangsmaterialet, oppløsningsmidlet og reduksjonsmidlet, men er vanligvis fra -100 til -50 °C, fortrinnsvis fra -90 til -70 °C.

Reaksjonstiden varierer avhengig av utgangsmaterialet, oppløsningsmidlet, reduksjonsmidlet og reaksjonstemperaturen, men er vanligvis fra 30 minutter til 12 timer, fortrinnsvis fra 1 time til 5 timer.

Etter omsetningen fås den ønskede forbindelse (10) fra foreliggende reaksjon f.eks. ved å konsentrere reaksjonsblandingen, tilsette et organisk oppløsningsmiddel som er ublandbart med vann, slik som etylacetat, vaske med vann, fraskille et organisk lag som inneholder den ønskede forbindelse, tørke over vannfritt magnesiumsulfat og avdestillere oppløsningsmidlet.

Det således erholdte, ønskede produkt kan, om nødvendig, renses videre ved hjelp av en vanlig metode, f.eks. rekrySTALLISASJON, silikagelkolonnekromatografi og lignende.

Trinn B-4

Det foreliggende trinn er for å fremstille forbindelsen (3a), et av utgangsmaterialene for fremgangsmåte A, ved å omsette forbindelsen (10) fremstilt i trinn B-3 med et reduksjonsmiddel i et inert oppløsningsmiddel.

Oppløsningsmidlet som kan anvendes her, kan omfatte slike alkoholer som metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol, isobutanol, t-butanol, isoamylalkohol, dietylenglykol, glyserol, oktanol, sykloheksanol og metylcellosolve; og eddiksyre; fortrinnsvis alkoholer (særlig etanol).

Reduksjonsmidlet som kan anvendes her, kan omfatte alkalimetallborhydrid, slik som natriumborhydrid og litiumborhydrid; aluminiumhydridforbindelser, slik som litiumaluminiumhydrid og litiumtrietoksidaluminiumhydrid; og boran; fortrinnsvis natriumborhydrid.

Reaksjonstemperaturen varierer avhengig av utgangsmaterialet, oppløsningsmidlet og reduksjonsmidlet, men er vanligvis fra 0 til 50 °C, fortrinnsvis fra 10 til 40 °C.

Reaksjonstiden varierer avhengig av utgangsmaterialet, oppløsningsmidlet, reduksjonsmidlet og reaksjonstemperaturen, men er vanligvis fra 10 minutter til 12 timer, fortrinnsvis fra 30 minutter til 5 timer.

5 Etter omsetningen fås den ønskede forbindelse (3a) fra den foreliggende reaksjon f.eks. ved å dekomponere reduksjonsmidlet, konsentrere reaksjonsblandingen, tilsette et organisk oppløsningsmiddel som er ublandbart med vann, slik som etylacetat, vaske med vann, fraskille et organisk lag som inneholder
10 den ønskede forbindelse, tørke over vannfritt magnesiumsulfat og avdestillere oppløsningsmidlet.

Det således erholdte, ønskede produkt kan, om nødvendig, renses videre ved hjelp av en vanlig metode, f.eks. rekrySTALLISASJON, silikagelkolonnekromatografi og lignende.

15

Fremgangsmåte C

Trinn C-1

Det foreliggende trinn er for å fremstille forbindelsen (11) ved å omsette forbindelsen (7) fremstilt i fremgangsmåten
20 ovenfor med et oksidasjonsmiddel i et inert oppløsningsmiddel.

Oppløsningsmidlet som kan anvendes her, kan omfatte slike alifatiske hydrokarboner som heksan, heptan, ligroin og petroleter; slike aromatiske hydrokarboner som benzen, toluen og xylen; slike halogenerte hydrokarboner som metylenklorid, kloroform, karbontetraklorid, dikloretan, klorbenzen og diklorbenzen;
25 slike estere som etylformiat, etylacetat, propylacetat, butylacetat og dietylkarbonat; slike etere som dietyleter, diisopropyleter, tetrahydrofuran, dioksan, dimetoksyetan, dietylenglykoldimetyleter; og slike ketoner som aceton, metyletylketon,
30 metylisobutylketon, isoforon og sykloheksanon; fortrinnsvis halogenerte hydrokarboner (særlig metylenklorid).

Oksidasjonsmidlet som kan anvendes her, kan omfatte Swern-reagenset for oksidasjon, Dess-Martin-reagenset for oksidasjon, et kromtrioksidkompleks, slik som pyridinhydroklorid/kromtrioksid-kompleks (pyridiniumklorkromat og pyridiniumdikromat), fortrinnsvis Swern-reagenset for oksidasjon
35 (nemlig dimetylsulfoksid-oksalyklorid).

Reaksjonstemperaturen varierer avhengig av utgangsmaterialet, oppløsningsmidlet og oksidasjonsmidlet, men er vanligvis fra -100 til -50 °C, fortrinnsvis fra -100 til -70 °C.

Reaksjonstiden varierer avhengig av utgangsmaterialet, oppløsningsmidlet, oksidasjonsmidlet og reaksjonstemperaturen, men er vanligvis fra 30 minutter til 12 timer, fortrinnsvis fra 1 time til 5 timer.

Etter omsetningen fås den ønskede forbindelse (11) fra foreliggende reaksjon f.eks. ved å dekomponere oksidasjonsmidlet, konsentrere reaksjonsblandingen, tilsette et organisk oppløsningsmiddel som er ublandbart med vann, slik som etylacetat, vaske med vann, fraskille et organisk lag som inneholder den ønskede forbindelse, tørke over vannfritt magnesiumsulfat og avdestillere oppløsningsmidlet.

Det således erholdte, ønskede produkt kan, om nødvendig, renses videre ved hjelp av en vanlig metode, f.eks. rekrySTALLISASJON, silikagelkolonnekromatografi og lignende.

Trinn C-2

Det foreliggende trinn er for å fremstille forbindelsen (12) ved å omsette forbindelsen (11) fremstilt i trinn C-1 med et karbonøkende reagens i et inert oppløsningsmiddel.

Oppløsningsmidlet som kan anvendes her, kan omfatte slike alifatiske hydrokarboner som heksan, heptan, ligroin og petroleter; slike aromatiske hydrokarboner som benzen, toluen og xylen; slike halogenerte hydrokarboner som metylenklorid, kloroform, karbontetraklorid, dikloretan, klorbenzen og diklorbenzen; slike estere som etylformiat, etylacetat, propylacetat, butylacetat og dietylkarbonat; slike etere som dietyleter, diisopropyleter, tetrahydrofuran, dioksan, dimetoksyetan, dietylenglykoldimetyleter; og slike ketoner som aceton, metyletylketon, metylisobutylketon, isoforon og sykloheksanon; fortrinnsvis halogenerte hydrokarboner (særlig metylenklorid).

Reagenset som kan anvendes her, kan omfatte Wittig-reagenset, Horner-Emmons-reagenset, Peterson-reaksjonsreagenset, $TiCl_4-CH_2Cl_2-Zn$ -system-reaksjonsmidlet og Tebbe-reagenset, fortrinnsvis Wittig-reagenset, Horner-Emmons-reagenset og Tebbe-reagenset.

Reaksjonstemperaturen varierer avhengig av utgangsmaterialet, oppløsningsmidlet og det karbonøkende reagens, men er vanligvis fra -20 til 20 °C, fortrinnsvis 0 °C.

Reaksjonstiden varierer avhengig av utgangsmaterialet, oppløsningsmidlet, det karbonøkende reagens og reaksjonstemperaturen, men er vanligvis fra 30 minutter til 12 timer, fortrinnsvis fra 1 time til 5 timer.

Etter omsetningen fås den ønskede forbindelse (12) fra den foreliggende reaksjon f.eks. ved å konsentrere reaksjonsblandingen, tilsette et organisk oppløsningsmiddel som er ublandbart med vann, slik som etylacetat, vaske med vann, fraskille et organisk lag som inneholder den ønskede forbindelse, tørke over vannfritt magnesiumsulfat og avdestillere oppløsningsmidlet.

Det således erholdte, ønskede produkt kan, om nødvendig, renses videre ved hjelp av en vanlig metode, f.eks. rekrySTALLISASJON, silikagelkolonnekromatografi og lignende.

Trinn C-3

Det foreliggende trinn er for å fremstille forbindelsen (3a) ved selektivt å innføre en hydroksylgruppe på et terminalt olefinkarbonatom i forbindelsen (12) fremstilt i trinn C-2, i et inert oppløsningsmiddel.

Oppløsningsmidlet som kan anvendes her, kan omfatte slike alifatiske hydrokarboner som heksan, heptan, ligroin og petroleter; slike aromatiske hydrokarboner som benzen, toluen og xylen; slike halogenerte hydrokarboner som metylenklorid, kloroform, karbontetraklorid, dikloretan, klorbenzen og diklorbenzen; slike estere som etylformiat, etylacetat, propylacetat, butylacetat og dietylkarbonat; slike etere som dietyleter, diisopropyleter, tetrahydrofuran, dioksan, dimetoksyetan og dietylenglykoldimetyleter; og slike ketoner som aceton, metyletylketon, metylisobutylketon, isoforon og sykloheksanon; fortrinnsvis etere (særlig tetrahydrofuran).

Reaksjonsreagenset som kan anvendes her, kan omfatte boran, disiamylboran, theksylboran, 9-BBN (9-borabisyklo[3.3.1]nonan), fortrinnsvis 9-BBN.

Reaksjonstemperaturen varierer avhengig av utgangsmaterialet, oppløsningsmidlet og reagenset, men er vanligvis fra 0 til 50 °C, fortrinnsvis fra 10 til 40 °C.

Reaksjonstiden varierer avhengig av utgangsmaterialet, oppløsningsmidlet, reagenset og reaksjonstemperaturen, men er vanligvis fra 6 timer til 48 timer, fortrinnsvis fra 12 timer til 24 timer.

Etter omsetningen fås den ønskede forbindelse (3a) fra den foreliggende reaksjon f.eks. ved å konsentrere reaksjonsblandingen, tilsette et organisk oppløsningsmiddel som er ublandbart med vann, slik som etylacetat, vaske med vann, f.eks. skille et organisk lag som inneholder den ønskede forbindelse, tørke over vannfritt magnesiumsulfat og avdestillere oppløsningsmidlet.

Det således erholdte, ønskede produkt kan, om nødvendig, renses videre ved hjelp av en vanlig metode, f.eks. rekrySTALLISASJON, silikagelkolonnekromatografi og lignende.

Fremgangsmåte D

20 Trinn D-1

Det foreliggende trinn er for å fremstille forbindelsen (13) ved å omsette forbindelsen (11) fremstilt i trinn C-1 med et karbonøkende reagens i et inert oppløsningsmiddel.

Oppløsningsmidlet som kan anvendes her, kan omfatte slike alifatiske hydrokarboner som heksan, heptan, ligroin og petroleter; slike aromatiske hydrokarboner som benzen, toluen og xylen; slike halogenerte hydrokarboner som metylenklorid, kloroform, karbontetraklorid, dikloretan, klorbenzen og diklorbenzen; slike estere som etylformiat, etylacetat, propylacetat, butylacetat og dietylkarbonat; slike etere som dietyl-eter, diisopropyleter, tetrahydrofuran, dioksan, dimetoksyetan og dietylenglykoldimetyleter; og slike ketoner som aceton, metyletylketon, metylisobutylketon, isoforon og sykloheksanon; fortrinnsvis etere (særlig tetrahydrofuran), mer foretrukket halogenerte hydrokarboner (særlig metylenklorid).

Det karbonøkende reagens som kan anvendes her, kan omfatte Wittig-reagenset og Horner-Emmons-reagenset.

Reaksjonstemperaturen varierer avhengig av utgangsmaterialet, oppløsningsmidlet og reagenset, men er vanligvis fra -20 til 40 °C, fortrinnsvis fra 0 til 20 °C.

Reaksjonstiden varierer avhengig av utgangsmaterialet, oppløsningsmidlet, reagenset og reaksjonstemperaturen, men er vanligvis fra 30 minutter til 12 timer, fortrinnsvis fra 1 time til 5 timer.

Etter reaksjonen fås den ønskede forbindelse (13) fra den foreliggende omsetning f.eks. ved å konsentrere reaksjonsblandingen, tilsette et organisk oppløsningsmiddel som er ublandbart med vann, slik som etylacetat, vaske med vann, fraskille et organisk lag som inneholder den ønskede forbindelse, tørke over vannfritt magnesiumsulfat og avdestillere oppløsningsmidlet.

Det således erholdte, ønskede produkt kan, om nødvendig, renses videre ved hjelp av en vanlig metode, f.eks. rekrySTALLISASJON, silikagelkolonnekromatografi og lignende.

Trinn D-2

Det foreliggende trinn er for å fremstille forbindelsen (14) ved å omsette forbindelsen (13) fremstilt i trinn D-1, med et reduksjonsmiddel i et inert oppløsningsmiddel.

Det foreliggende trinn kan utføres i henhold til (2) i trinn A-5. I det tilfellet hvor R^{10} er en eventuelt substituert benzylgruppe og R^{11} og R^{12} er hydrogenatomer, kan forbindelsen (3b) fremstilles direkte i det neste trinn.

Trinn D-3

Det foreliggende trinn er for å fremstille forbindelsen (3b), et av utgangsmaterialene for fremgangsmåte A, ved å omsette forbindelsen (14) fremstilt i trinn D-2 med et reduksjonsmiddel.

(a) I det tilfellet hvor R^{11} og R^{12} til sammen danner et oksygenatom.

Oppløsningsmidlet som kan anvendes her, kan omfatte slike alkoholer som metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol, isobutanol, t-butanol, isoamylalkohol, dietylglykol,

glyserol, oktanol, sykloheksanol og metylcellosolve; og eddiksyre; fortrinnsvis alkoholer (særlig etanol).

Reduksjonsmidlet som kan anvendes her, kan omfatte slike alkalimetallborhydrider som litiumborhydrid; slike aluminiumhydridforbindelser som litiumaluminiumhydrid og litiumtrietoksidaluminiumhydrid; og boran; fortrinnsvis boran og litiumaluminiumhydrid.

Reaksjonstemperaturen varierer avhengig av utgangsmaterialet, oppløsningsmidlet og reduksjonsmidlet, men er vanligvis fra 0 til 50 °C; fortrinnsvis fra 10 til 40 °C.

Reaksjonstiden varierer avhengig av utgangsmaterialet, oppløsningsmidlet, reduksjonsmidlet og reaksjonstemperaturen, men er vanligvis fra 10 minutter til 12 timer, fortrinnsvis fra 30 minutter til 5 timer.

Etter omsetningen fås den ønskede forbindelse (3b) fra den foreliggende reaksjon f.eks. ved å dekomponere reduksjonsmidlet, konsentrere reaksjonsblandingen, tilsette et organisk oppløsningsmiddel som er ublandbart med vann, slik som etylacetat, vaske med vann, fraskille et organisk lag som inneholder den ønskede forbindelse, tørke over vannfritt magnesiumsulfat og avdestillere oppløsningsmidlet.

Det således erholdte, ønskede produkt kan, om nødvendig, renses videre ved hjelp av en vanlig metode, f.eks. rekrySTALLISASJON, silikagelkolonnekromatografi og lignende.

(b) I det tilfellet hvor R^{11} og R^{12} er hydrogenatomer og R^{10} er en annen gruppe enn en benzylgruppe.

I det tilfellet hvor R^{10} er en silylgruppe, kan det foreliggende trinn utføres ifølge fremgangsmåte (3) i trinn A-5.

I det tilfellet hvor R^{10} er en slik aralkylgruppe som en benzylgruppe; en slik alkoksyalkylgruppe som en metoksymetylgruppe; en slik arylkarbonyloksymetylgruppe som en benzoyloksymetylgruppe; eller en slik aralkyloksymetylgruppe som en benzyl-oksymetylgruppe; og en slik alkoksyalkoksyalkylgruppe som en metoksyetoksymetylgruppe, anvendes en sur katalysator, og den sure katalysator anvendt i dette tilfellet, kan omfatte en slik organisk syre som p-toluensulfonsyre, trifluoreddiksyre og dikloreddiksyre, og en slik Lewis-syre som BF_3 og $AlCl_3$.

Oppløsningsmidlet som kan anvendes her, kan omfatte slike aromatiske hydrokarboner som benzen, toluen og xylen; slike halogenerte hydrokarboner som metylenklorid, kloroform, karbontetraklorid, 1,2-dikloretan, klorbenzen og diklorbenzen; 5 slike nitriler som acetonitril og isobutyronitril; slike amider som formamid, N,N-dimetylformamid, N,N-dimetylacetamid, N-metyl-2-pyrrolidon, N-metylpyrrolidinon og heksametylfosforsyretriamid; og karbonsulfid.

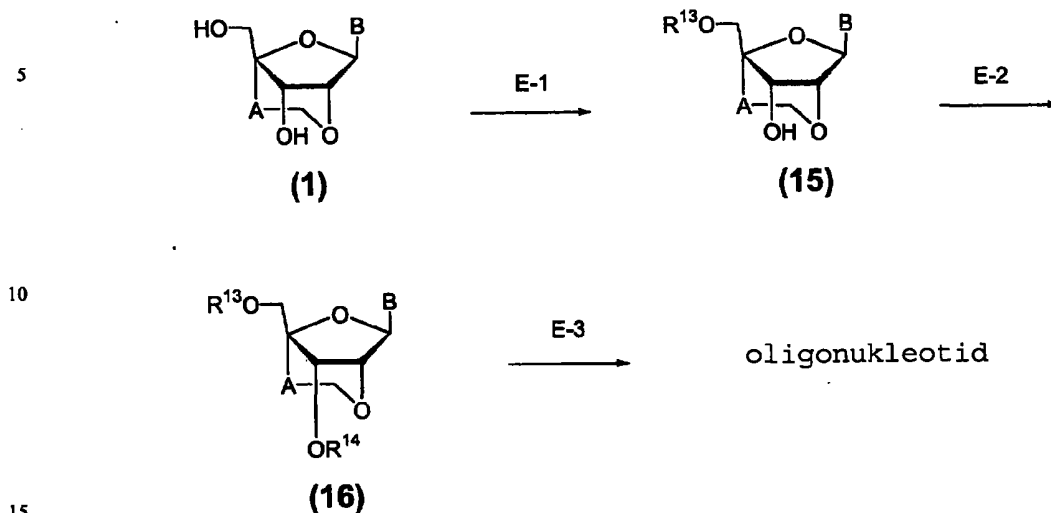
Reaksjonstemperaturen varierer avhengig av utgangsmaterialet, oppløsningsmidlet og den sure katalysator, men er 10 vanligvis fra 0 til 50 °C, fortrinnsvis fra 10 til 40 °C.

Reaksjonstiden varierer avhengig av utgangsmaterialet, oppløsningsmidlet, den sure katalysator og reaksjonstemperaturen, og er vanligvis fra 10 minutter til 12 timer, fortrinnsvis fra 30 minutter til 5 timer. 15

Etter omsetningen fås den ønskede forbindelse (3b) fra den foreliggende reaksjon f.eks. ved å nøytralisere reaksjonsblandingen, tilsette et organisk oppløsningsmiddel som er ublandbart med vann, slik som etylacetat, vaske med vann, 20 fraskille et organisk lag som inneholder den ønskede forbindelse, tørke over vannfritt magnesiumsulfat og avdestillere oppløsningsmidlet.

Det således erholdte, ønskede produkt kan, om nødvendig, renses videre ved hjelp av en vanlig metode, f.eks. 25 rekrySTALLISASJON, silikagelkolonnekromatografi og lignende.

Oligonukleotider som inneholder et modifisert nukleosid eller et tioatderivat derav, kan fremstilles ved hjelp av fremgangsmåte E beskrevet nedenunder under anvendelse av forbindelsen (1) ifølge foreliggende oppfinnelse.

Fremgangsmåte E

I fremgangsmåte E har A og B den samme betydning som definert ovenfor; R^{13} er en hydroksylbeskyttelsesgruppe (særlig en tritylgruppe som kan være substituert med en metoksygruppe); R^{14} er en fosfonylgruppe eller en gruppe dannet ved å omsette monosubstituerte klor(alkoksy)fosfiner eller disubstituerte alkoksyfosfiner beskrevet senere.

Fremgangsmåte E25 Trinn E-1

Det foreliggende trinn er for å fremstille forbindelsen (15) ved å omsette forbindelsen (1) fremstilt i fremgangsmåte A med et beskyttelsesreagens i et inert oppløsningsmiddel.

Oppløsningsmidlet som kan anvendes her, kan fortrinnsvis omfatte slike aromatiske hydrokarboner som benzen, toluen og xylene; slike halogenerte hydrokarboner som metylenklorid, kloroform, karbontetraklorid, dikloretan, klorbenzen og diklorbenzen; slike estere som etylformiat, etylacetat, propylacetat, butylacetat og dietylkarbonat; slike etere som dietyleter, diisopropyleter, tetrahydrofuran, dioksan, dimetoksyetan og dietylglykoldimetyleter; slike ketoner som aceton, metyletylketon, metylisobutylketon, isoforon og sykloheksanon; slike nitrerte forbindelser som nitroetan og nitrobenzen; slike nitriler som acetonitril og isobutyronitril; slike amider som

formamid, dimetylformamid (DMF), dimetylacetamid og heksametyl-
fosforsyretriamid; slike sulfoksider som dimetylsulfoksid og
sulfolan; slike alifatiske tertiære aminer som trimetylamin,
trietylamin og N-metylmorfolin; og slike aromatiske aminer som
5 pyridin og pikolin; mest foretrukket halogenerte hydrokarboner
(særlig metylenklorid) og aromatiske aminer (særlig pyridin).

Beskyttelsesreagenset som kan anvendes her, er ikke
spesielt begrenset så lenge som bare 5'-stillingen kan beskyttes
selektivt, og det kan fjernes under sure eller nøytrale beting-
10 elser, men kan fortrinnsvis omfatte triarylmetylhalogenider,
slik som tritylklorid, monometoksytritylklorid og dimetoksy-
tritylklorid.

I det tilfellet hvor triarylmetylhalogenider anvendes
som beskyttelsesreagenset, anvendes det vanligvis en base.

15 I et slikt tilfelle kan basen som kan anvendes her,
omfatte slike heterosykliske aminer som pyridin, dimetylamino-
pyridin og pyrrolidinopyridin; og slike alifatiske, tertiære
aminer som trimetylamin og trietylamin; fortrinnsvis pyridin,
dimetylaminopyridin og pyrrolidinopyridin.

20 I det tilfellet hvor en flytende base brukes som
oppløsningsmiddel, er det, ettersom basen selv virker som en
syrefelle, ikke nødvendig å tilsette en annen base.

Reaksjonstemperaturen varierer avhengig av utgangs-
materialet, reagenset og oppløsningsmidlet, men er vanligvis fra
25 0 til 150 °C, fortrinnsvis fra 20 til 100 °C. Reaksjonstiden
varierer avhengig av utgangsmaterialet, oppløsningsmidlet og
reaksjonstemperaturen, men er vanligvis fra 1 time til
100 timer, fortrinnsvis fra 2 timer til 24 timer.

Etter omsetningen fås den ønskede forbindelse (15) fra
30 den foreliggende reaksjon f.eks. ved å konsentrere reaksjons-
blandingen, tilsette et organisk oppløsningsmiddel som er
ublandbart med vann, slik som etylacetat, vaske med vann, fra-
skille et organisk lag som inneholder den ønskede forbindelse,
tørke over vannfritt magnesiumsulfat og avdestillere oppløs-
35 ningsmidlet.

Det således erholdte, ønskede produkt kan, om nød-
vendig, renses videre ved hjelp av en vanlig metode, f.eks.
rekrySTALLISASJON, silikagelkolonnekromatografi og lignende.

Trinn E-2

Det foreliggende trinn er for å fremstille forbindelsen (16) ved å omsette forbindelsen (15) fremstilt i trinn E-1 med monosubstituerte klor(alkoksy)fosfiner eller disubstituerte 5 alkoksyfosfiner som vanligvis anvendes til amidering i et inert oppløsningsmiddel.

Oppløsningsmidlet som kan anvendes her, er ikke spesielt begrenset så lenge som det ikke påvirker reaksjonen, og kan fortrinnsvis omfatte slike etere som tetrahydrofuran, dietyleter 10 og dioksan; og slike halogenerte hydrokarboner som metylenklorid, kloroform, karbontetraklorid, dikloretan, klorbenzen og diklorbenzen.

De monosubstituerte klor(alkoksy)fosfiner som kan anvendes her, kan omfatte slike fosfinderivater som klor(morfolino)metoksyfosfin, klor(morfolino)cyanetoksyfosfin, klor- 15 (dimetylamino)metoksyfosfin, klor(dimetylamino)cyanetoksyfosfin, klor(diisopropylamino)metoksyfosfin og klor(diisopropylamino)cyanetoksyfosfin, fortrinnsvis klor(morfolino)metoksyfosfin, klor(morfolino)cyanetoksyfosfin, klor(diisopropylamino)metoksy- 20 fosfin og klor(diisopropylamino)cyanetoksyfosfin.

I det tilfellet hvor de monosubstituerte klor(alkoksy)fosfiner anvendes, brukes en syrefelle, og i et slikt tilfelle kan syrefellen som kan anvendes her, omfatte slike hetero- 25 sykliske aminer som pyridin og dimetylaminyridin; og slike alifatiske aminer som trimetylamin, trietylamin og diisopropylamin; fortrinnsvis alifatiske aminer (særlig diisopropylamin).

De disubstituerte alkoksyfosfiner som kan anvendes her, kan omfatte slike fosfinderivater som bis(diisopropylamino)cyanetoksyfosfin, bis(dietylamino)metansulfonyletoksyfosfin, 30 bis(diisopropylamino)(2,2,2-trikloretoksy)fosfin og bis(diisopropylamino)(4-klorfenylmetoksy)fosfin, fortrinnsvis bis(diisopropylamino)cyanetoksyfosfin.

I det tilfellet hvor de disubstituerte alkoksyfosfiner anvendes, brukes det en syre, og i slike tilfeller kan syren som 35 kan anvendes, fortrinnsvis omfatte tetrazol, eddiksyre eller p-toluensulfonsyre.

Reaksjonstemperaturen er ikke spesielt begrenset, men er vanligvis fra 0 til 80 °C, fortrinnsvis romtemperatur.

Reaksjonstiden varierer avhengig av utgangsmaterialet, reagenset og reaksjonstemperaturen, men er vanligvis fra 5 minutter til 30 timer, fortrinnsvis fra 30 minutter til 10 timer i det tilfellet hvor reaksjonen utføres ved romtemperatur.

5 Etter omsetningen fås den ønskede forbindelse (16) fra den foreliggende reaksjon f.eks. ved hjelp av passende nøytralisering av reaksjonsblandingen, fjerning av oppløselige stoffer ved filtrering i det tilfellet hvor slike foreligger, tilsetning av et organisk oppløsningsmiddel som er ublandbart med vann, 10 slik som etylacetat, vasking med vann, fraskillelse av et organisk lag som inneholder den ønskede forbindelse, tørking over vannfritt magnesiumsulfat og avdestillering av oppløsningsmidlet. Det derved erholdte, ønskede produkt kan om nødvendig renses videre ved hjelp av en vanlig metode, f.eks. rekrySTALLISASJON, nyutfelling eller kromatografi og lignende. 15

Alternativt er det foreliggende trinn for å fremstille forbindelsen (16) ved å omsette forbindelsen (15) fremstilt i trinn E-1 med tris-(1,2,4-triazolyl)fosfitt i et inert oppløsningsmiddel (fortrinnsvis slike halogenerte hydrokarboner som 20 metylenklorid), etterfulgt av tilsetning av vann for å bevirke H-fosfonering.

Reaksjonstemperaturen er ikke spesielt begrenset, men er vanligvis fra -20 °C til 100 °C, fortrinnsvis fra 10 til 40 °C.

25 Reaksjonstiden varierer avhengig av utgangsmaterialet, reagenset og reaksjonstemperaturen, og er vanligvis fra 5 minutter til 30 timer, fortrinnsvis 30 minutter i det tilfellet hvor reaksjonen utføres ved romtemperatur.

Etter omsetningen fås den ønskede forbindelse (16) fra 30 den foreliggende reaksjon f.eks. ved passende nøytralisering av reaksjonsblandingen, fjerning av uoppløselige stoffer ved filtrering i slike tilfeller hvor de foreligger, tilsetning av et organisk oppløsningsmiddel som er ublandbart med vann, slik som etylacetat, vasking med vann, fraskillelse av et organisk lag 35 som inneholder den ønskede forbindelse, tørking over vannfritt magnesiumsulfat og avdestillering av oppløsningsmidlet. Det derved erholdte, ønskede produkt kan, om nødvendig, renses videre ved hjelp av en vanlig metode, f.eks. rekrySTALLISASJON, nyutfelling eller kromatografi og lignende.

Trinn E-3

I dette trinnet fremstilles måloligonukleotidanalogen ved hjelp av et automatisert DNA-synteseapparat under anvendelse av minst én forbindelse (16) fremstilt i trinn E-2 og kommersielt tilgjengelige fosforamidittreagenser som trengs for å fremstille en oligonukleotidanalogue til en ønsket nukleotidsekvens i overensstemmelse med vanlige metoder.

En oligonukleotidanalogue som har en ønsket nukleotidsekvens, kan syntetiseres ved hjelp av et DNA-synteseapparat, slik som Perkin-Elmer modell 392, under anvendelse av fosforamidittmetoden i overensstemmelse med metoden beskrevet i litteraturen (Nucleic Acids Research, 12, 4539 (1984)).

I tilfellet med omdannelse til et tioat etter ønske, kan i tillegg et tioatderivat erholdes i overensstemmelse med metoden beskrevet i litteraturen (Tetrahedron Letters, 32, 3005 (1991), J. Am. Chem. Soc., 112, 1253 (1990)) under anvendelse av, ved siden av svovel, et reagens som danner et tioat ved å omsette med treverdig fosforsyre, slik som tetraetyltiuramdisulfid (TETD, Applied Biosystems Inc.) eller Beaucage-reagens (Millipore Corp.).

Den resulterende, urensede oligonukleotidanalogue kan renses ved hjelp av OligoPak (reversfase-kromatokolonne), og renheten til produktet kan bekreftes ved hjelp av HPLC-analyse.

Kjedelengden til den resulterende oligonukleotidanalogue er normalt 2-50 enheter, og fortrinnsvis 10-30 enheter, i nukleosidenheter.

Evnen til komplementær kjededannelse og nukleaseenzymresistens til den resulterende oligonukleotidanalogue kan bestemmes ifølge fremgangsmåtene som er beskrevet nedenunder.

Testmetode 1

Evnen til hybriddannelse hos oligonukleotidanalogen ifølge foreliggende oppfinnelse når det gjelder komplementær DNA og RNA, kan bestemmes ved å annealere de forskjellige resulterende oligonukleotidanalogue med en oligonukleotidanalogue sammensatt av naturlig forekommende DNA eller RNA, som har en komplementær sekvens, og måle smeltetemperaturen (T_m -verdi).

En prøveoppløsning som inneholder like mengder oligonukleotidanalogue og naturlig forekommende komplementært oligo-

nukleotid i natriumfosfatbufferopløsning, ble plassert i et kokende vannbad og så sakte avkjølt til romtemperatur over tid (annealering). Temperaturen i oppløsningen ble så økt litt etter litt fra 20 til 90 °C i cellekammeret til et spektrofotometer (f.eks. Shimadzu UV-2100PC), etterfulgt av måling av ultrafiolett absorpsjon ved 260 nm.

Testmetode 2 Måling av nukleaseenzymresistens

Til oligonukleotidet i en bufferopløsning ble det tilsatt en nuklease, og blandingen ble varmet opp. Eksempler på nukleaser som anvendes, omfatter slangegift-fosfodiesterase, endonuklease P1 og endonuklease S1. Selv om det ikke er noen bestemte restriksjoner på bufferopløsningen, forutsatt at det er en bufferopløsning som er egnet for enzymer, anvendes Tris-HCl-buffer i tilfellet med slangegift-fosfodiesterase, mens natriumacetatbuffer brukes i tilfellet med endonuklease P1. I tillegg tilsettes om nødvendig metallioner til bufferopløsningen. Eksempler på metallioner som anvendes, omfatter Mg^{2+} i tilfellet med slangegift-fosfodiesterase, og Zn^{2+} i tilfellet med endonuklease. Reaksjonstemperaturen er fortrinnsvis 0-100 °C, og mest foretrukket 30-50 °C.

Etylendiamintetraeddiksyre (EDTA) tilsettes etter et forutbestemt tidsforløp, etterfulgt av oppvarming ved 100 °C i 2 minutter for å stanse reaksjonen.

Eksempler på metoder brukt til å analysere mengden av oligonukleotid som er tilbake, omfatter en metode hvor oligonukleotidet merkes med en radioisotop, etc., etterfulgt av analysering av spaltingsreaksjonsproduktet med et bildeanalyseapparat osv., en fremgangsmåte hvor spaltingsreaksjonsproduktet analyseres ved hjelp av reversfase-væskekromatografi med høy yteevne (HPLC), og en fremgangsmåte hvor spaltingsreaksjonsproduktet farges med et fargestoff (slik som etidiumbromid) og analyseres ved hjelp av billedprosessering under anvendelse av en datamaskin.

Doseringsformer for oligonukleotidanalogen som har én, eller to eller flere strukturer med formel (2) ifølge foreliggende oppfinnelse, kan være tabletter, kapsler, granulater, pulvere eller sirup for oral administrering, eller injeksjoner eller suppositorier for parenteral administrering. Disse doser-

ingsformene fremstilles ved hjelp av velkjente metoder under anvendelse av slike additiver som eksipienser (f.eks. slike organiske eksipienser som sukkerderivater, f.eks. laktose, sukrose, glukose, mannitol og sorbitol; stivelsesderivater, f.eks. maisstivelse, potetstivelse, α -stivelse og dekstrin; cellulosederivater, f.eks. krystallinsk cellulose; gummi arabicum; dekstran; og "Pullulan"; og slike uorganiske eksipienser som silikatderivater, f.eks. lett kiselsyreanhydrid, syntetisert aluminiumsilikat, kalsiumsilikat og magnesiumaluminatmetasilikat; fosfater, f.eks. kalsiumhydrogenfosfat; karbonater, f.eks. kalsiumkarbonat; og sulfater, f.eks. kalsiumsulfat), smøremidler (f.eks. stearinsyre, stearinsyremetallsalter, slik som kalsiumstearat og magnesiumstearat; talkum; kolloidal silika; slike vokser som bigummi og spermasett; borsyre; adipinsyre; sulfater, f.eks. natriumsulfat; glykol; fumarsyre; natriumbenzoat; DL-leucin; fettsyrenatriumsalt; laurylsulfater, slik som natriumlaurylsulfat og magnesiumlaurylsulfat; slike kiselsyrer som kiselsyreanhydrid og kiselsyrehydrat; og de ovenfor nevnte stivelsesderivater), bindemidler (f.eks. hydroksypropylcellulose, hydroksypropylmetylcellulose, polyvinylpyrrolidon, "Macrogol" og lignende forbindelser som de ovenfor nevnte eksipienser), desintegrasjonsstoffer (f.eks. cellulosederivater, slik som lavsubstituert hydroksypropylcellulose, karboksymetylcellulose, kalsiumkarboksymetylcellulose og internt brodannet natriumkarboksymetylcellulose; og kjemisk modifiserte stivelsescelluloser, slik som karboksymetylstivelse, natriumkarboksymetylstivelse og brodannet polyvinylpyrrolidon), stabiliseringsmidler (paraoksybenzoater, slik som metylparaben og propylparaben; slike alkoholer som klorbutanol, benzylalkohol og fenyletylalkohol; benzalkoniumklorid; fenolderivater, slik som fenol og kresol; thimerosal; dehydroeddiksyre; og sorbinsyre), forbedringsmidler (f.eks. søtningsstoffer, syrningsmidler, smaksstoffer, etc. som vanligvis anvendes), fortynningsmidler, etc.

Selv om dosen vil variere avhengig av sykdomstilstanden, pasientens alder, administreringsmetoder, etc., er det for eksempel i tilfellet med oral administrering ønskelig å administrere en aktiv bestanddel i en mengde fra 0,01 mg/kg kroppsvekt (fortrinnsvis 0,1 mg/kg kroppsvekt) til 1 000 mg/kg

kroppsvekt (fortrinnsvis 100 mg/kg kroppsvekt), og i tilfellet med intravenøs administrering er det ønskelig å administrere en aktiv bestanddel i en mengde fra 0,001 mg/kg kroppsvekt (fortrinnsvis 0,01 mg/kg kroppsvekt) til 100 mg/kg kroppsvekt (fortrinnsvis 10 mg/kg kroppsvekt), hhv. som en enkeltdose pr. dag eller i oppdelt dose flere ganger for dagen.

Eksempel

Eksempel 1

10 3',5'-di-O-benzyl-2'-O,4'-C-etylen-4-N-benzoylcytidin
(eksemplifiseringsforbindelse nr. 2-34)

En vandig 2 N natriumhydroksidoppløsning (68 ml) ble tilsatt til en oppløsning av forbindelsen erholdt i referanse-
eksempel 11 (6,80 g, 8,86 mmol) i pyridin (136 ml) ved 0 °C, og
15 blandingen ble omrørt ved romtemperatur i 1 time. Reaksjons-
blandingen ble nøytralisert ved dråpevis tilsetning av vandig
20% eddiksyre og ekstrahert med kloroform. Kloroformlaget ble
vasket med mettet, vandig natriumkloridoppløsning og konsentrert
under vakuum. Resten ble rensert ved hjelp av kromatografi på en
20 silikagelkolonne (under anvendelse av diklormetan:metanol =
100:3 som elueringsmiddel), hvorved man fikk tittelforbindelsen
(3,3 g, 6,02 mmol, 68%).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 8,64 (2H, brs), 7,89 (2H, d, 7,6Hz),
7,64-7,60 (1H, m), 7,54-7,51 (2H, m), 7,48-7,37 (3H, m), 7,36-
25 7,26 (8H, m), 6,18 (1H, s), 4,70 (1H, d, 11Hz), 4,60 (1H, d,
11Hz), 4,55 (1H, d, 11Hz), 4,46 (1H, d, 2,9Hz), 4,42 (1H, d,
11Hz), 4,10-4,02 (2H, m), 3,89 (1H, d, 2,9Hz), 3,75 (1H, d,
11Hz), 3,62 (1H, d, 11Hz), 2,34-2,26 (1H, m), 1,39-1,36 (1H, m).
FAB-MAS (mNBA): 554 (M+H)⁺.

30

Eksempel 2

2'-O,4'-C-etylen-4-N-benzoylcytidin
(eksemplifiseringsforbindelse nr. 2-225)

En oppløsning (31,7 ml) av 1,0 M triklorboran i diklor-
35 metan ble tilsatt dråpevis til en oppløsning av forbindelsen
erholdt i eksempel 1 (2,06 g, 3,72 mmol) i vannfritt metylen-
klorid (317 ml) ved -78 °C, og blandingen ble omrørt ved -78 °C i
1 time. Reaksjonsblandingen ble sakte varmet opp til -20 °C, og
reaksjonsbeholderen ble plassert i et is-natriumkloridbad, og

blandingen ble omrørt ved mellom -20 °C og -10 °C i 2 timer. Metanol (12 ml) ble sakte tilsatt til blandingen, og blandingen ble omrørt i 10 minutter. pH-verdien i reaksjonsblandingen ble regulert til 7-8 ved dråpevis tilsetning av mettet, vandig
5 natriumhydrogenkarbonatoppløsning. Blandingen ble varmet opp til romtemperatur og konsentrert under vakuum. Resten ble rensert ved hjelp av kromatografi på en silikagelkolonne (under anvendelse av diklormetan:metanol = 100:5 som elueringsmiddel), hvorved man fikk tittelforbindelsen (1,21 g, 3,24 mmol, 87%) som et hvitt,
10 fast stoff.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): 11,23 (1H, brs), 8,70 (1H, d, 7,2Hz), 8,00 (2H, d, 7,5Hz), 7,3-6 (4H, m), 5,97 (1H, s), 5,35 (1H, dd, 5 og 10Hz), 4,10 (1H, dd, 5 og 10Hz), 4,03 (1H, d, 3,2Hz), 3,95-3,85 (2H, m), 3,83 (1H, d, 3,2Hz), 3,65-3,51 (2H, m), 2,06-1,98
15 (1H, m), 1,26 (1).

FAB-MAS (mNBA): 374 (M+H)⁺.

Eksempel 3

2'-O,4'-C-etylen-cytidin

20 (eksemplifiseringsforbindelse nr. 2-3)

En oppløsning av forbindelsen erholdt i eksempel 2 (0,1 g, 0,268 mmol) i metanol mettet med ammoniakk (12 ml), fikk stå over natten. Blandingen ble konsentrert til tørrhet, hvorved man fikk tittelforbindelsen (0,054 g, 75%) som et hvitt, fast
25 stoff.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆): 8,18 (1H, d, 7,4Hz), 7,10 (2H, br), 5,84 (1H, s), 5,69 (1H, d, 7,6Hz), 5,27-5,24 (2H, m), 3,86 (1H, d, 3,2Hz), 3,90-3,78 (2H, m), 3,76 (1H, d, 3,2Hz), 3,56 (1H, dd, 5,5 og 12Hz), 3,49 (1H, dd, 5,5 og 12Hz), 2,01-1,93 (1H, dt, 7,5
30 og 12Hz), 1,22 (1H, dd, 3,6 og 13Hz).

FAB-MAS (mNBA): 270 (M+H)⁺.

Eksempel 4

5'-O-dimetoksytrityl-2'-O,4'-C-etylen-4-N-benzoylcytidin

35 (eksemplifiseringsforbindelse nr. 2-39)

En oppløsning av forbindelsen erholdt i eksempel 2 (1,29 g, 3,46 mmol) i vannfritt pyridin ble azeotropdestillert under reflux for å fjerne vann. Produktet ble oppløst i vannfritt pyridin (26 ml) under nitrogenatmosfære, og 4,4'-dimet-

oksytritylklorid (1,76 g, 5,18 mmol) ble tilsatt til oppløsningen, og blandingen ble omrørt ved romtemperatur over natten. En liten mengde metanol ble tilsatt til reaksjonsblandingen, og så ble oppløsningsmidlet avdampet under vakuum. Resten ble

5 fordelt mellom vann og kloroform, og det organiske lag ble vasket med mettet, vandig natriumhydrogenkarbonatoppløsning og mettet, vandig natriumkloridoppløsning, og det ble konsentrert under vakuum. Resten ble rensset ved hjelp av kromatografi på en silikagelkolonne (under anvendelse av diklormetan:metanol =

10 100:5 som elueringsmiddel), hvorved man fikk tittelforbindelsen (2,10 g, 3,11 mmol, 90%) som et fargeløst, amorft, fast stoff. ¹H-NMR (270 MHz, DMSO-d₆): 11,27 (1H, brs), 8,59 (1H, m), 6,92-8,01 (19H, m), 6,03 (1H, s), 5,56 (1H, m), 4,17 (1H, m), 4,08 (1H, m), 3,86 (2H, m), 3,77 (6H, s), 3,24 (2H, m), 1,98 (1H, m),

15 1,24 (1H, m).
 FAB-MAS (mNBA): 676 (M+H)⁺.

Eksempel 5

20 5'-O-dimetoksytrityl-2'-O,4'-C-etylen-4-N-benzoylcytidin-3'-O-(2-cyanetyl-N,N-diisopropyl)fosforamiditt
(eksemplifiseringsforbindelse nr. 2-235)

En oppløsning av forbindelsen erholdt i eksempel 4 (6,53 g, 9,66 mmol) i vannfritt pyridin ble azeotropdestillert under reflux for å fjerne vann. Produktet ble oppløst under

25 nitrogenatmosfære i vannfritt diklormetan (142 ml). N,N-diisopropylamin (2,80 ml, 16,1 mmol) ble tilsatt til oppløsningen, og så ble 2-cyanetyl-N,N-diisopropylklorfosforamiditt (2,16 ml, 9,66 mmol) tilsatt dråpevis i et isbad. Blandingen ble omrørt ved romtemperatur i 6 timer. Reaksjonsblandingen ble vasket med

30 mettet, vandig natriumhydrogenkarbonatoppløsning og mettet, vandig natriumkloridoppløsning, og det ble konsentrert under vakuum. Resten ble rensset ved hjelp av kromatografi på en silikagelkolonne (under anvendelse av diklormetan:trietylamin =

35 50:1 - diklormetan:etylacetat:trietylamin = 60:30:1 som elueringsmiddel), hvorved man fikk tittelforbindelsen (7,10 g, 8,11 mmol, 84%) som en blekhvit forbindelse.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 1,1-1,2 (12H, m), 1,35 (1H, m), 2,11 (1H, m), 2,3 (2H, m), 3,35-3,7 (6H, m), 3,8 (6H, m), 3,9-4,1

(2H, m), 4,33 (1H, m), 4,45 (1H, m), 6,23 (1H, s), 6,9 (4H, m), 7,3-7,9 (15H, m), 8,7-8,8 (1H, m).

Eksempel 6

5 3',5'-di-O-benzyl-2'-O,4'-C-etylen-5-metyluridin
(eksemplifiseringsforbindelse nr. 2-22)

En vandig 2 N natriumhydroksidoppløsning og blandingsoppløsning (5 ml), hvor blandingsoppløsningen besto av pyridin:metanol:vann = 65:30:5, ble tilsatt til forbindelsen erholdt i referanseeksempel 10 (418 mg, 0,62 mmol) i pyridin:metanol:vann = 65:30:5 (5 ml) ved 0 °C, og blandingen ble omrørt ved romtemperatur i 15 minutter. Reaksjonsblandingen ble nøytralisert med 1 N saltsyre og ekstrahert med etylacetat (ca. 30 ml). Det organiske lag ble vasket med mettet, vandig natriumhydrogenkarbonatoppløsning (ca. 30 ml) og mettet, vandig natriumkloridoppløsning (ca. 30 ml), tørket over vannfritt magnesiumsulfat og så konsentrert under vakuum. Resten ble rensert ved hjelp av kromatografi på en silikagelkolonne (under anvendelse av heksan:etylacetat = 1:1 som elueringsmiddel), hvorved man fikk et fargeløst, amorf, fast stoff (228 mg, 0,49 mmol, 79%).
1H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 1,35 (1H, d, 13Hz), 1,41 (3H, s), 2,28 (1H, dt, 9,4 og 13Hz), 3,60 (1H, d, 11Hz), 3,76 (1H, d, 11Hz), 3,94 (1H, d, 3,0Hz), 4,10 (1H, d, 7,0Hz), 4,14 (1H, d, 7,0Hz), 4,31 (1H, d, 3,0Hz), 4,51 (1H, d, 12Hz), 4,54 (1H, d, 12Hz), 4,58 (1H, d, 12Hz), 4,75 (1H, d, 12Hz), 6,06 (1H, s), 7,3 (10H, m), 7,91 (1H, s), 8,42 (1H, brs).
FAB-MAS (mNBA): 465 (M+H)⁺.

Eksempel 7

30 2'-O,4'-C-etylen-5-metyluridin
(eksemplifiseringsforbindelse nr. 2-2)

En oppløsning av forbindelsen erholdt i eksempel 6 (195 mg, 0,42 mmol) i metanol (10 ml), ble omrørt under hydrogenatmosfære ved atmosfæretrykk i nærvær av en hydrogeningskatalysator i 5 timer. Reaksjonsblandingen ble filtrert for å fjerne katalysatoren, og filtratet ble konsentrert under vakuum. Resten ble rensert ved hjelp av kromatografi på en silikagelkolonne (under anvendelse av diklormetan:metanol = 10:1

som elueringsmiddel), hvorved man fikk et fargeløst pulver (76 mg, 0,268 mmol, 64%).

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): 1,33 (1H, dd, 3,8 og 13Hz), 1,86 (3H, d, 0,9Hz), 1,94 (1H, ddd, 7,5, 11,7 og 13Hz), 3,68 (1H, d, 12Hz),
 5 3,75 (1H, d, 12Hz), 3,9-4,0 (2H, m), 4,05 (1H, d, 3,2Hz), 4,09 (1H, d, 3,2Hz), 6,00 (1H, s), 8,28 (1H, d, 1,1Hz).

FAB-MAS (mNBA): 285 (M+H)⁺.

Eksempel 8

10 5'-O-dimetoksytrityl-2'-O,4'-C-etylen-5-metyluridin
 (eksemplifiseringsforbindelse nr. 2-27)

En oppløsning av forbindelsen erholdt i eksempel 7 (1,45 g, 5,10 mmol) i vannfritt pyridin, ble azeotropdestillert under reflux for å fjerne vann. Produktet ble oppløst i vann-
 15 fritt pyridin (44 ml) under nitrogenatmosfære, og 4,4'-dimetoksytritylklorid (2,59 g, 7,65 mmol) ble tilsatt til oppløsningen, og blandingen ble omrørt ved romtemperatur over natten. En liten mengde metanol ble tilsatt til reaksjonsblandingen, og så ble oppløsningsmidlet avdampet under vakuum. Resten ble
 20 fordelt mellom vann og kloroform, og det organiske lag ble vasket med mettet, vandig natriumhydrogenkarbonatoppløsning og mettet, vandig natriumkloridoppløsning, og det ble konsentrert under vakuum. Resten ble renset ved hjelp av kromatografi på en
 silikagelkolonne (under anvendelse av diklormetan:metanol =
 25 100:10 som elueringsmiddel), hvorved man fikk tittelforbindelsen (2,42 g, 4,13 mmol, 81%) som fargeløst, amorft, fast stoff.

¹H-NMR (270 MHz, DMSO-d₆): 11,36 (1H, s), 7,68 (1H, s), 6,90-7,44 (13H, m), 5,89 (1H, s), 5,55 (1H, d), 4,09 (1H, m), 4,04 (1H, d), 3,82 (2H, m), 3,74 (6H, s), 3,19 (2H, m), 1,99 (1H, m), 1,36
 30 (1H, m), 1,17 (3H, s).

FAB-MAS (mNBA): 587 (M+H)⁺.

Eksempel 9

35 5'-O-dimetoksytrityl-2'-O,4'-C-etylen-5-metyluridin-3'-O-(2-cyanetyl-N,N-diisopropyl)fosforamiditt
 (eksemplifiseringsforbindelse nr. 2-234)

En oppløsning av forbindelsen erholdt i eksempel 8 (4,72 g, 8,05 mmol) i vannfritt pyridin, ble azeotropdestillert under reflux for å fjerne vann. Produktet ble oppløst under

nitrogenatmosfære i vannfritt diklormetan (142 ml). N,N-diisopropylamin (2,80 ml, 16,1 mmol) ble tilsatt til oppløsningen, og så ble 2-cyanetyl-N,N-diisopropylklorfosforamiditt (2,16 ml, 9,66 mmol) tilsatt dråpevis i et isbad. Blandingen ble
 5 omrørt ved romtemperatur i 6 timer. Reaksjonsblandingen ble vasket med mettet, vandig natriumhydrogenkarbonatoppløsning og mettet, vandig natriumkloridoppløsning, og det ble konsentrert under vakuum. Resten ble rensset ved hjelp av kromatografi på en silikagelkolonne (under anvendelse av heksan:etylacetat:trietylamin = 50:50:1 - heksan:etylacetat:trietylamin = 30:60:1 som elueringsmiddel), hvorved man fikk tittelforbindelsen (5,64 g, 7,17 mmol, 89%) som et fargeløst, amorft, fast stoff.
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 1,1-1,2 (15H, m), 1,4 (1H, m), 2,08 (1H, m), 2,4 (2H, m), 3,2-4,0 (14H, m), 4,38 (2H, m), 4,47 (1H, m),
 15 6,06 (1H, s), 6,8-6,9 (4H, m), 7,2-7,5 (9H, m), 7,91 (1H, m).
 FAB-MAS (mNBA): 787 (M+H)⁺.

Eksempel 10

3',5'-di-O-benzyl-2'-O,4'-C-etylen-6-N-benzoyladenosin

20 (eksemplifiseringsforbindelse nr. 1-23)

En vandig 2 N natriumhydroksidoppløsning og blandingsoppløsning (5 ml), hvor blandingsoppløsningen besto av pyridin:metanol:vann = 65:30:5, ble tilsatt til forbindelse erholdt i referanseeksempel 12 (238 mg, 0,30 mmol) i pyridin:metanol:vann = 65:30:5 (5 ml) ved 0 °C, og blandingen ble omrørt ved
 25 romtemperatur i 15 minutter. Reaksjonsblandingen ble nøytralisert med 1 N saltsyre og ekstrahert med etylacetat (ca. 30 ml). Det organiske lag ble vasket med mettet, vandig natriumhydrogenkarbonatoppløsning (ca. 30 ml) og mettet, vandig natriumkloridoppløsning (ca. 30 ml), tørket over vannfritt magnesiumsulfat og så konsentrert under vakuum. Resten ble rensset ved
 30 hjelp av kromatografi på en silikagelkolonne (under anvendelse av diklormetan:metanol = 50:1 som elueringsmiddel), hvorved man fikk et fargeløst, amorft, fast stoff (133 mg, 0,23 mmol, 78%).
 35 ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 1,44 (1H, d, 13Hz), 2,31 (1H, dd, 13 og 19Hz), 3,56 (1H, d, 11Hz), 3,70 (1H, d, 11Hz), 4,10 (2H, m), 4,24 (1H, s), 4,45 (1H, d, 12Hz), 4,53-4,67 (4H, m), 6,52 (1H, s), 7,3 (10H, m), 7,53 (2H, m), 7,62 (1H, m), 8,03 (2H, d, 7,6Hz), 8,66 (1H, s), 8,78 (1H, s), 9,00 (1H, brs).

FAB-MAS (mNBA): 578 (M+H)⁺.

Eksempel 11

2'-O,4'-C-etylen-6-N-benzoyladenoin

5 (eksemplifiseringsforbindelse nr. 1-178)

En 1 M bortrikloridoppløsning (1,5 ml, 1,5 mmol) i diklormetan ble sakte tilsatt dråpevis til en oppløsning av forbindelsen erholdt i eksempel 10 (116 mg, 0,20 mmol) i vannfritt metylenklorid (5 ml) ved -78 °C, og blandingen ble 10 omrørt ved -78 °C i 3 timer. Til reaksjonsblandingen ble det tilsatt en 1 M bortrikloridoppløsning (1,5 ml, 1,5 mmol) i diklormetan, og blandingen ble omrørt i 2 timer. Blandingen ble sakte varmet opp til romtemperatur og så hurtig avkjølt til -78 °C, og så ble metanol (5 ml) tilsatt til blandingen. Reak-

15 sjonsblandingen ble sakte varmet opp til romtemperatur og konsentrert under vakuum. Resten ble rensset ved hjelp av kromatografi på en silikagelkolonne (under anvendelse av diklormetan:metanol = 9:1 som elueringsmiddel), hvorved man fikk et hvitt pulver (49 mg, 0,17 mmol, 84%).

20 ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): 1,45 (1H, dd, 4,3 og 13Hz), 2,12 (1H, m), 3,72 (1H, d, 12Hz), 3,79 (1H, d, 12Hz), 4,04 (1H, dd, 7,3 og 12Hz), 4,15 (1H, dt, 4,3 og 9,4Hz), 4,36 (1H, d, 3,2Hz), 4,43 (1H, d, 3,2Hz), 6,57 (1H, s), 7,57 (2H, m), 7,66 (1H, m), 8,09 (2H, d, 8,0Hz), 8,72 (1H, s), 8,85 (1H, s).

25 FAB-MAS (mNBA): 398 (M+H)⁺.

Eksempel 12

2'-O,4'-C-etylenadenoin

(eksemplifiseringsforbindelse nr. 1-7)

30 En oppløsning av forbindelsen erholdt i eksempel 11 (14 mg, 0,035 mmol) i metanol mettet med ammoniakk (1 ml), fikk stå over natten. Blandingen ble konsentrert, og resten ble rensset ved hjelp av kromatografi på en silikagelkolonne (under anvendelse av diklormetan:metanol = 10:1 som elueringsmiddel), 35 hvorved man fikk et hvitt pulver (10 mg, 0,034 mmol, 98%).

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): 1,32 (1H, dd, 4 og 13Hz), 2,04 (1H, dt, 7,4 og 12Hz), 3,53 (1H, dd, 5 og 12Hz), 3,61 (1H, dd, 5,2 og 12Hz), 3,90 (1H, dd, 7,4 og 12Hz), 3,97 (1H, dt, 4 og 12Hz), 4,15 (1H, d, 3,1Hz), 4,21 (1H, d, 3,1Hz), 5,27 (1H, t, 5,2Hz),

5,39 (1H, d, 3,1Hz), 6,33 (1H, s), 7,29 (2H, s), 7,66 (1H, m), 8,14 (1H, s), 8,42 (1H, s).

FAB-MAS (mNBA): 294 (M+H)⁺.

UV (λmaks.): 260 (pH7), 260 (pH1), 258 (pH13).

5

Eksempel 13

5'-O-dimetoksytrityl-2'-O,4'-C-etylen-6-N-benzoyladenoin
(eksemplifiseringsforbindelse nr. 1-31)

En oppløsning av forbindelsen erholdt i eksempel 11
10 (14 mg, 0,035 mmol) i vannfritt pyridin ble azeotropdestillert under reflux for å fjerne vann. Produktet ble oppløst i vannfritt pyridin (1 ml) under nitrogenatmosfære, og 4,4'-dimetoksytritylklorid (18 mg, 0,053 mmol) ble tilsatt til oppløsningen, og blandingen ble omrørt ved 40 °C i 5 timer. En liten mengde
15 metanol ble tilsatt til reaksjonsblandingen, og så ble oppløsningsmidlet avdampet under vakuum. Resten ble fordelt mellom vann og kloroform, og det organiske lag ble vasket med mettet, vandig natriumhydrogenkarbonatoppløsning og mettet, vandig natriumkloridoppløsning, og det ble konsentrert under vakuum.
20 Resten ble rensert ved hjelp av kromatografi på en silikagelkolonne (under anvendelse av diklormetan:metanol = 100:5 som elueringsmiddel), hvorved man fikk tittelforbindelsen (18 mg, 0,026 mmol, 73%) som et fargeløst, fast stoff.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 1,63 (1H, m), 2,14 (1H, 7,5, 12 og
25 13Hz), 3,37 (1H, d, 11Hz), 3,41 (1H, d, 11Hz), 3,79 (6H, s), 4,10 (2H, m), 4,48 (1H, d, 3,3Hz), 4,59 (1H, d, 3,3Hz), 6,54 (1H, s), 6,85 (4H, m), 7,2-7,6 (12H, m), 8,02 (2H, m), 8,45 (1H, s), 8,82 (1H, s), 9,02 (1H, brs).

FAB-MAS (mNBA): 700 (M+H)⁺.

30

Eksempel 14

5'-O-dimetoksytrityl-2'-O,4'-C-etylen-6-N-benzoyladenoin-3'-O-
(2-cyanetyl-N,N-diisopropyl)fosforamiditt
(eksemplifiseringsforbindelse nr. 1-186)

35 En oppløsning av forbindelsen erholdt i eksempel 13 (16 mg, 0,023 mmol) i vannfritt pyridin ble azeotropdestillert under reflux for å fjerne vann. Produktet ble oppløst under nitrogenatmosfære i vannfritt diklormetan (0,5 ml). Tetrazol-N,N-diisopropylaminsalt (10 mg) ble tilsatt til oppløsningen, og

så ble 2-cyanetyl-N,N,N',N'-tetraisopropylfosforamiditt (ca. 20 µl) ble tilsatt dråpevis i et isbad. Blandingen ble omrørt ved romtemperatur over natten. Reaksjonsblandingen ble vasket med mettet, vandig natriumhydrogenkarbonatoppløsning og mettet, vandig natriumkloridoppløsning, og det ble konsentrert under vaku-
 5 vaku-
 um. Resten ble rensert ved hjelp av kromatografi på en silikagelkolonne (under anvendelse av diklormetan:etylacetat = 2:1 som elueringsmiddel), hvorved man fikk tittelforbindelsen (20 mg, 0,022 mmol, 97%) som et hvitt, fast stoff.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 1,0-1,2 (12H, m), 1,54 (1H, m), 2,15 (1H, m), 2,33 (2H, m), 3,3-3,6 (6H, m), 3,80 (6H, s), 4,08 (2H, m), 4,65 (1H, m), 4,75 (1H, m), 6,53 (1H, s), 6,84 (4H, m), 7,2-7,6 (12H, m), 8,01 (2H, m), 8,53 (1H, s), 8,83 (1H, s), 9,01 (1H, brs).

FAB-MAS (mNBA): 900 (M+H)⁺.

Eksempel 15

3',5'-di-O-benzyl-2'-O,4'-C-etylenuridin (eksemplifiseringsforbindelse nr. 2-10)

En vandig 1 N natriumhydroksidoppløsning (2 ml) ble tilsatt til en oppløsning av forbindelsen erholdt i referanse-
 eksempel 13 (194 mg, 0,292 mmol) i pyridin (3 ml) ved 0 °C, og
 blandingen ble omrørt ved romtemperatur i 30 minutter. Reak-
 sjonsblandingen ble nøytralisert med 1 N saltsyre og ekstrahert
 med etylacetat (10 ml). Det organiske lag ble vasket med mettet,
 vandig natriumhydrogenkarbonatoppløsning og mettet, vandig
 natriumkloridoppløsning, tørket over vannfritt magnesiumsulfat
 og så konsentrert under vaku-
 um. Resten ble rensert ved hjelp av
 kromatografi på en silikagelkolonne (under anvendelse av diklor-
 30 metan:metanol = 100:3 som elueringsmiddel), hvorved man fikk en
 fargeløs olje (105 mg, 0,233 mmol, 80%).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 1,36 (1H, m), 2,29 (1H, m), 3,63 (1H, d, 11Hz), 3,74 (1H, d, 11Hz), 3,87 (1H, d, 2,9Hz), 4,03 (2H, m), 4,29 (1H, d, 2,9Hz), 4,49 (1H, d, 12Hz), 4,50 (1H, d, 11Hz), 4,53 (1H, d, 11Hz), 4,73 (1H, d, 12Hz), 5,20 (1H, dd, 2 og 8Hz), 6,04 (1H, s), 7,2-7,4 (10H, m), 8,13 (1H, d, 8,2Hz), 8,57 (1H, brs).

FAB-MAS (mNBA): 451 (M+H)⁺.

Eksempel 162'-O,4'-C-etylenuridin(eksemplifiseringsforbindelse nr. 2-1)

En oppløsning av forbindelsen erholdt i eksempel 15
5 (100 mg, 0,222 mmol) i metanol (4 ml), ble omrørt under hydro-
genatmosfære ved atmosfæretrykk i nærvær av en hydrogenerings-
katalysator i 5 timer. Reaksjonsblandingen ble filtrert for å
fjerne katalysator, og filtratet ble konsentrert under vakuum.
Resten ble rensert ved hjelp av kromatografi på en silikagel-
10 kolonne (under anvendelse av diklormetan:metanol = 10:1 som
elueringsmiddel), hvorved man fikk en fargeløs olje (45 mg,
0,167 mmol, 75%).

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): 1,35 (1H, dd, 4 og 13Hz), 2,13 (1H, ddd,
7,11 og 13Hz), 3,66 (1H, d, 12Hz), 3,73 (1H, d, 12Hz), 3,91-4,08
15 (2H, m), 4,01 (1H, d, 3,2Hz), 4,12 (1H, d, 3,2Hz), 5,66 (1H, d,
8,2Hz), 6,00 (1H, s), 8,37 (1H, d, 8,2Hz).

FAB-MAS (mNBA): 271 (M+H)⁺.

Eksempel 175'-O-dimetoksytrityl-2'-O,4'-C-etylenuridin(eksemplifiseringsforbindelse nr. 2-15)

En oppløsning av forbindelsen erholdt i eksempel 16
(28 mg, 0,104 mmol) i vannfritt pyridin, ble azeotropdestillert
under reflux for å fjerne vann. Produktet ble oppløst i vann-
25 fritt pyridin (3 ml) under nitrogenatmosfære, og 4,4'-dimetoksy-
tritylklorid (50 mg, 0,15 mmol) ble tilsatt til oppløsningen, og
blandingen ble omrørt ved romtemperatur over natten. En liten
mengde metanol ble tilsatt til reaksjonsblandingen, og så ble
oppløsningsmidlet avdampet under vakuum. Resten ble fordelt
30 mellom vann og kloroform, og det organiske lag ble vasket med
mettet, vandig natriumhydrogenkarbonatoppløsning og mettet,
vandig natriumkloridoppløsning, og det ble konsentrert under
vakuum. Resten ble rensert ved hjelp av kromatografi på en
silikagelkolonne (under anvendelse av diklormetan:metanol =
35 100:3 som elueringsmiddel), hvorved man fikk tittelforbindelsen
(25 mg, 0,044 mmol, 42%) som en fargeløs olje.

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): 1,35 (1H, dd, 3 og 14Hz), 2,03 (1H, ddd,
8,11 og 14Hz), 2,46 (1H, d, 8Hz), 3,36 (1H, d, 11Hz), 3,41 (1H,
d, 11Hz), 3,80 (3H, s), 3,81 (3H, s), 3,97 (2H, m), 4,21 (1),

4,33 (1H, brm), 5,31 (1H, m), 6,10 (1H, s), 6,86 (4H, m), 7,2-7,5 (9H, m), 8,27 (1H, d, 8,2Hz), 8,43 (1H, brs).

FAB-MAS (mNBA): 573 (M+H)⁺.

5 Eksempel 18

5'-O-dimetoksytrityl-2'-O,4'-C-etylenuridin-3'-O-(2-cyanetyl-N,N-diisopropyl)fosforamiditt
(eksemplifiseringsforbindelse nr. 2-233)

En oppløsning av forbindelsen erholdt i eksempel 17
10 (6 mg, 0,0105 mmol) i vannfritt pyridin ble azeotropdestillert under reflux for å fjerne vann. Produktet ble oppløst under nitrogenatmosfære i vannfritt diklormetan (0,5 ml). Tetrazol-N,N-diisopropylaminsalt (3 mg) ble tilsatt til oppløsningen, og så ble 2-cyanetyl-N,N,N',N'-tetraisopropylfosforamiditt (ca.
15 5 µl) tilsatt dråpevis i et isbad. Blandingen ble omrørt ved romtemperatur over natten. Reaksjonsblandingen ble vasket med mettet, vandig natriumhydrogenkarbonatoppløsning og mettet, vandig natriumkloridoppløsning, og det ble konsentrert under vakuum. Resten ble rensert ved hjelp av kromatografi på en
20 silikagelkolonne (under anvendelse av diklormetan:etylacetat = 2:1 som elueringsmiddel), hvorved man fikk tittelforbindelsen (8 mg) som et hvitt, fast stoff.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 1,1-1,2 (13H, m), 2,09 (1H, m), 2,4 (2H, m), 3,3-3,6 (6H, m), 3,81 (6H, m), 3,94 (2H, m), 4,35 (1H, m),
25 4,47 (1H, m), 5,18 (1H, d, 8,2Hz), 6,08 (1H, s), 6,86 (4H, m), 7,2-7,4 (9H, m), 8,31 (1H, d, 8,2Hz).

FAB-MAS (mNBA): 773 (M+H)⁺.

Eksempel 19

30 3',5'-di-O-benzyl-2'-O,4'-C-etylen-4-N-benzoyl-5-metylcytidin
(eksemplifiseringsforbindelse nr. 2-46)

En vandig 1 N natriumhydroksidoppløsning (5 ml) ble tilsatt til en oppløsning av forbindelsen erholdt i referanse-
eksempel 14 (310 mg, 0,396 mmol) i pyridin (5 ml) ved 0 °C, og
35 blandingen ble omrørt ved romtemperatur i 20 minutter. Reaksjonsblandingen ble nøytralisert ved hjelp av dråpevis tilsetning av vandig 20% eddiksyre, og det ble ekstrahert med diklormetan. Diklormetanlaget ble vasket med mettet, vandig natriumkloridoppløsning og konsentrert under vakuum. Resten ble

renset ved hjelp av kromatografi på en silikagelkolonne (under anvendelse av diklormetan:metanol = 100:2 som elueringsmiddel),

hvorved man fikk tittelforbindelsen (190 mg, 0,334 mmol, 84%).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 1,37 (1H, m), 1,58 (3H, s), 2,30 (1H, dt, 10 og 13Hz), 3,64 (1H, d, 11Hz), 3,79 (1H, d, 11Hz), 3,95 (1H, d, 3,0Hz), 4,04 (2H, dd, 2,3 og 10Hz), 4,37 (1H, d, 3,0Hz), 4,50 (1H, d, 12Hz), 4,56 (1H, d, 11Hz), 4,61 (1H, d, 11Hz), 4,76 (1H, d, 12Hz), 6,11 (1H, s), 7,2-7,5 (13H, m), 8,09 (1H, s), 8,29 (2H, m).

10 FAB-MAS (mNBA): 568 (M+H)⁺.

Eksempel 20

2'-O,4'-C-etylen-4-N-benzoyl-5-metylcytidin

(eksemplifiseringsforbindelse nr. 2-226)

15 En 1 M bortrikloridoppløsning (1,6 ml) i diklormetan ble tilsatt dråpevis til en oppløsning av forbindelsen erholdt i eksempel 19 (120 mg, 0,211 mmol) i vannfritt diklormetan (5 ml) ved -78 °C, og blandingen ble omrørt ved -78 °C i 4 timer.

Metanol (1 ml) ble sakte tilsatt dråpevis til blandingen, og 20 blandingen ble omrørt i 10 minutter. pH-verdien i reaksjonsblanding ble regulert til 7-8 ved hjelp av dråpevis tilsetning av vandig natriumhydrogenkarbonatoppløsning. Reaksjonsblanding ble varmet opp til romtemperatur og konsentrert under vakuum. Resten ble renset ved hjelp av kromatografi på en silikagel- 25 kolonne (under anvendelse av diklormetan:metanol = 100:6 som elueringsmiddel), hvorved man fikk tittelforbindelsen (29 mg, 0,075 mmol, 36%) som et hvitt, fast stoff.

¹H-NMR (400 MHz, d-DMSO): 1,24 (1H, m), 2,01 (3H, s), 2,0 (1H, m), 3,54 (1H, dd, 5,4 og 12Hz), 3,64 (1H, dd, 5,4 og 12Hz), 3,88 30 (3H, m), 4,10 (1H, m), 5,36 (1H, d, 5,4Hz), 5,49 (1H, t, 5,0Hz), 5,95 (1H, s), 7,4-7,6 (3H, m), 8,21 (2H, m), 8,49 (1H, s), 13,17 (1H, brs).

FAB-MAS (mNBA): 388 (M+H)⁺.

35 Eksempel 21

5'-O-dimetoksytrityl-2'-O,4'-C-etylen-4-N-benzoyl-5-metylcytidin (eksemplifiseringsforbindelse nr. 2-51)

En oppløsning av forbindelsen erholdt i eksempel 20 (44 mg, 0,114 mmol) i vannfritt pyridin ble azeotropdestillert

under reflux for å fjerne vann. Produktet ble oppløst i vannfritt pyridin (1 ml) under nitrogenatmosfære, og 4,4'-dimetoksytritylchlorid (60 mg, 0,177 mmol) ble tilsatt til oppløsningen, og blandingen ble omrørt ved romtemperatur over natten. En liten
5 mengde metanol ble tilsatt til reaksjonsblandingen, og så ble oppløsningsmidlet avdampet under vakuum. Resten ble fordelt mellom vann og kloroform. Det organiske lag ble vasket med mettet, vandig natriumhydrogenkarbonatoppløsning og mettet, vandig natriumkloridoppløsning, og det ble konsentrert under
10 vakuum. Resten ble renset ved hjelp av kromatografi på en silikagelkolonne (under anvendelse av diklormetan:metanol = 100:4 som elueringsmiddel), hvorved man fikk tittelforbindelsen (73 mg, 0,106 mmol, 93%) som en fargeløs olje.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 1,46 (1H, m), 1,49 (3H, s), 2,06 (1H, m), 2,59 (1H, d, 8,6Hz), 3,36 (1H, d, 11Hz), 3,39 (1H, d, 11Hz),
15 3,80 (3H, s), 3,81 (3H, s), 3,99 (2H, m), 4,30 (1H, d, 3,3Hz), 4,39 (1H, m), 6,12 (1H, s), 6,85 (4H, m), 7,2-7,5 (12H, m), 8,03 (1H, s), 8,28 (2H, m).

FAB-MAS (mNBA): 573 (M+H)⁺.

20

Eksempel 22

5'-O-dimetoksytrityl-2'-O,4'-C-etylen-4-N-benzoyl-5-metylcytidin-3'-O-(2-cyanetyl-N,N-diisopropyl) fosforamiditt
(eksemplifiseringsforbindelse nr. 2-236)

25 En oppløsning av forbindelsen erholdt i eksempel 21 (35 mg, 0,0507 mmol) i vannfritt pyridin ble azeotropdestillert under reflux for å fjerne vann. Produktet ble oppløst under nitrogenatmosfære i vannfritt diklormetan (1 ml). Tetrazol-N,N-diisopropylaminsalt (17 mg) ble tilsatt til oppløsningen, og så
30 ble 2-cyanetyl-N,N,N',N'-tetraisopropylfosforamiditt (32 μl , 0,1 mmol) tilsatt dråpevis i et isbad. Blandingen ble omrørt ved romtemperatur over natten. Reaksjonsblandingen ble vasket med mettet, vandig natriumhydrogenkarbonatoppløsning og mettet, vandig natriumkloridoppløsning, og det ble konsentrert under
35 vakuum. Resten ble renset ved hjelp av kromatografi på en silikagelkolonne (under anvendelse av diklormetan:etylacetat = 2:1 som elueringsmiddel), hvorved man fikk tittelforbindelsen (40 mg, 0,0445 mmol, 89%) som et hvitt, fast stoff.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 1,1-1,2 (12H, m), 1,36 (3H, s), 1,37 (1H, m), 2,10 (1H, m), 2,36 (2H, m), 3,3-3,6 (6H, m), 3,81 (6H, m), 3,98 (2H, m), 4,42 (1H, m), 4,49 (1H, m), 6,11 (1H, s), 6,88 (4H, m), 7,2-7,5 (12H, m), 8,14 (1H, s), 8,28 (2H, m).

5 FAB-MAS (mNBA): 890 (M+H)⁺.

Eksempel 23

2'-O,4'-C-etylen-5-metylcytidin

(eksemplifiseringsforbindelse nr. 2-4)

10 En oppløsning av forbindelsen erholdt i eksempel 20 (11,6 mg, 0,030 mmol) i metanol mettet med ammoniakk (2 ml), fikk stå over natten. Blandingen ble konsentrert, hvorved man fikk et hvitt, fast stoff (8,5 mg, 0,030 mmol).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, d-DMSO): 1,20 (1H, m), 1,82 (3H, s), 1,97 (1H, m), 3,49 (1H, dd, 5 og 12Hz), 3,58 (1H, dd, 5 og 12Hz), 3,85 (2H, m), 5,23 (1H, d, 5Hz), 5,32 (1H, t, 5Hz), 5,84 (1H, s), 6,7 (1H, brs), 7,2 (1H, brs), 8,08 (1H, s).

FAB-MAS (mNBA): 284 (M+H)⁺.

UV ($\lambda_{\text{maks.}}$): 279 (pH7), 289 (pH1), 279 (pH13).

20

Eksempel 24

3',5'-di-O-benzyl-2'-O,4'-C-etylen-2-N-isobutyrylguanodin

(eksemplifiseringsforbindelse nr. 1-24)

25 En vandig 1 N natriumhydroksidoppløsning (2 ml) ble tilsatt til en oppløsning av forbindelsen erholdt i referanse-eksempel 15 (ca. 200 mg) i pyridin (2 ml), og blandingen ble omrørt ved romtemperatur i 15 minutter. Reaksjonsblandingen ble nøytralisert med 1 N saltsyre og ekstrahert med etylacetat. Det organiske lag ble vasket med mettet, vandig natriumhydrogenkarbonatoppløsning og mettet, vandig natriumkloridoppløsning, 30 tørket over vannfritt magnesiumsulfat og så konsentrert under vakuum. Resten ble rensert ved hjelp av kromatografi på en silikagelkolonne (under anvendelse av diklormetan:metanol = 50:1 som elueringsmiddel), hvorved man fikk et fargeløst, amorft, 35 fast stoff (20 mg, 0,036 mmol, 6%, 2 trinn).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 1,27 (3H, s), 1,29 (3H, s), 1,43 (1H, dd, 3 og 13Hz), 2,28 (1H, m), 2,59 (1H, kvi, 6,9Hz), 3,54 (1H, d, 11Hz), 3,68 (1H, d, 11Hz), 4,03 (2H, m), 4,15 (1H, d, 3,0Hz), 4,31 (1H, d, 3,0Hz), 4,45 (1H, d, 12), 4,56 (1H, d, 12Hz), 4,61

(1H, d, 12Hz), 4,63 (1H, d, 12Hz), 6,18 (1H, s), 7,2-7,4 (10H, m), 8,19 (1H, s), 11,93 (1H, brs).

FAB-MAS (mNBA): 560 (M+H)⁺.

5 Eksempel 25

2'-O,4'-C-etylen-2-N-isobutyrylguanodin

(eksemplifiseringsforbindelse nr. 1-177)

En oppløsning av forbindelsen erholdt i eksempel 24 (10 mg, 0,018 mmol) i metanol (2 ml), ble omrørt under hydrogenatmosfære ved atmosfæretrykk i nærvær av en hydrogeneringskatalysator i 5 timer. Reaksjonsblandingen ble filtrert for å fjerne katalysator, og filtratet ble konsentrert under vakuum. Resten ble rensset ved hjelp av kromatografi på en silikagelkolonne (under anvendelse av diklormetan:metanol = 10:2 som elueringsmiddel), hvorved man fikk en fargeløs olje (5 mg, 0,013 mmol, 72%).

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): 1,21 (3H, s), 1,22 (3H, s), 1,41 (1H, dd, 4 og 13Hz), 2,18 (1H, m), 2,69 (1H, kvi, 6,9Hz), 3,69 (1H, d, 12Hz), 3,76 (1H, d, 12Hz), 4,0 (2H, m), 4,26 (1H, d, 3,2Hz), 4,30 (1H, d, 3,2Hz), 6,30 (1H, s), 8,40 (1H, s).

FAB-MAS (mNBA): 380 (M+H)⁺.

Eksempel 26

5'-O-dimetoksytrityl-2'-O,4'-C-etylen-2-N-isobutyrylguanodin

25 (eksemplifiseringsforbindelse nr. 1-35)

En oppløsning av forbindelsen erholdt i eksempel 25 (5 mg, 0,013 mmol) i vannfritt pyridin ble azeotropdestillert under reflux for å fjerne vann. Produktet ble oppløst i vannfritt pyridin (1 ml) under nitrogenatmosfære, og 4,4'-dimetoksytritylklorid (14 mg, 0,04 mmol) ble tilsatt til oppløsningen, og blandingen ble omrørt ved 40 °C i 3 timer. En liten mengde metanol ble tilsatt til reaksjonsblandingen, og så ble oppløsningsmidlet avdampet under vakuum. Resten ble rensset ved hjelp av kromatografi på en silikagelkolonne (under anvendelse av diklormetan:metanol = 100:6 som elueringsmiddel), hvorved man fikk tittelforbindelsen (4 mg, 0,0059 mmol, 45%) som fargeløst, fast stoff.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 1,26 (3H, d, 1,4Hz), 1,28 (3H, d, 1,4Hz), 1,66 (1H, m), 2,15 (1H, m), 2,59 (1H, kvi, 6,9Hz), 3,65

(1H, m), 3,78 (1H, m), 4,06 (2H, m), 4,35 (1H, m), 4,38 (1H, d, 3,2Hz), 6,23 (1H, s), 6,8 (4H, m), 7,2-7,5 (9H, m), 8,01 (1H, s), 8,19 (1H, brs).

FAB-MAS (mNBA): 682 (M+H)⁺.

5

Eksempel 27

5'-O-dimetoksytrityl-2'-O,4'-C-etylen-2-N-isobutyrylguanodin-3'-O-(2-cyanetyl-N,N-diisopropyl)fosforamiditt
(eksemplifiseringsforbindelse nr. 1-185)

10

En oppløsning av forbindelsen erholdt i eksempel 26 (4 mg, 0,0058 mmol) i vannfritt pyridin ble azeotropdestillert under reflux for å fjerne vann. Produktet ble oppløst under nitrogenatmosfære i vannfritt diklormetan (0,5 ml). Tetrazol-N,N-diisopropylaminsalt (5 mg) ble tilsatt til oppløsningen, og så ble 2-cyanetyl-N,N,N',N'-tetraisopropylfosforamiditt (9 µl, 0,03 mmol) tilsatt dråpevis i et isbad. Blandingen ble omrørt ved romtemperatur i 1 time. Reaksjonsblandingen ble vasket med mettet, vandig natriumhydrogenkarbonatoppløsning og mettet, vandig natriumkloridoppløsning, og det ble konsentrert under vakuu. Resten ble rensert ved hjelp av kromatografi på en silikagelkolonne (under anvendelse av diklormetan:etylacetat = 2:1 som elueringsmiddel), hvorved man fikk tittelforbindelsen (4 mg) som et hvitt, fast stoff.

15

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 1,1-1,4 (19H, m), 2,1 (1H, m), 2,4 (2H, m), 2,6 (1H, m), 3,3-3,6 (6H, m), 3,8 (6H, s), 4,0-4,6 (4H, m), 6,2 (1H, s), 6,8 (4H, m), 7,2-7,5 (9H, m), 8,1 (1H, s).

25

Eksempel 28

2'-O,4'-C-etylenguanodin

30 (eksemplifiseringsforbindelse nr. 1-5)

En oppløsning av forbindelsen erholdt i eksempel 25 (0,5 mg) i metanol mettet med ammoniakk (0,5 ml), fikk stå ved 60 °C i 5 timer. Blandingen ble konsentrert, hvorved man fikk et hvitt pulver (0,4 mg).

35

FAB-MAS (mNBA): 310 (M+H)⁺.

UV (λmaks.): 255 (pH7), 256 (pH1), 258-266 (pH13).

Eksempel 29Syntese av oligonukleotidderivat

Syntese av et oligonukleotidderivat ble utført ved å bruke et mekanisk nukleinsyresynteseapparat (ABI modell 392 DNA/RNA-synteseapparat: et produkt fra Perkin-Elmer Corporation) på en skala på 1,0 μmol . Oppløsningsmidlene, reagensene og konsentrasjonene av fosforamiditt i hver syntesesyklus er de samme som de i syntesen av naturlige oligonukleotider. Oppløsningsmidler, reagenser og fosforamiditter av den naturlige type nukleosider er produkter fra PE Biosystems Corporation. Hver modifisert oligonukleotidderivatsekvens ble syntetisert ved gjentakelse av kondensasjon av forbindelsen erholdt i eksempel 9 eller amiditter som inneholder de 4 typene nukleinsyrebase, for nukleotidsyntese med 5'-hydroksythymidin fremstilt ved avbeskyttelse av DMTr-gruppen i 5'-O-DMTr-thymidin (1,0 μmol) under anvendelse av trikloreddiksyre, idet 3'-hydroksygruppen i thymidinet er bundet til en CGP-bærer. Syntesesyklusen er som følger:

- 1) detritylering av trikloreddiksyre/diklormetan: 35 sekunder
- 2) kobling av fosforamiditt (ca. 20 ekv.), tetrazol/acetonitril: 25 sekunder eller 10 minutter
- 3) "capping" med 1-metylimidazol/tetrahydrofuran, eddiksyreanhydrid/pyridin/tetrahydrofuran: 15 sekunder
- 4) oksidasjon med jod/vann/pyridin/tetrahydrofuran: 15 sekunder

I syklus 2) ovenfor var, når forbindelsen erholdt i eksempel 9 ble brukt, reaksjonstiden 10 minutter, og når fosforamiditter ble brukt, var reaksjonstiden 25 sekunder.

Etter syntese av en ønsket oligonukleotidderivatsekvens ble 5'-DTMr-gruppen fjernet, og så ble bæreren som inneholder det ønskede produkt, behandlet på vanlig måte med konsentrert, vandig ammoniakkoppløsning for å løsne oligomeren fra bæreren, og for å avbeskytte cyanetylgruppen som beskytter fosforsyregruppen. Aminobeskyttelsesgruppen i adenin, guanin og cytosin ble fjernet fra oligomeren. Oligonukleotidderivatet ble rensset ved hjelp av reversfase-HPLC (HPLC: LC-VP: et produkt fra Shimazu Corp.; kolonne: Wakopak WS-DNA: et produkt fra Wako Pure Chemical Industry Ltd.), hvorved man fikk det ønskede oligonukleotid.

Ifølge denne syntesemetoden ble den følgende oligonukleotidsekvens (hvor oligonukleotidet heretter er henvist til som "oligonukleotid 1") erholdt (0,23 μmol , utbytte 23%).

5'-gcggttttttgct-3' (eksemplifisering av sekvens nr. 2 i sekvenslisten), hvor sukkerresten i thymidinene i basenumrene 4-8 er 2'-O,4'-C-etylen.

Referanseeksempel 1

3,5-di-O-benzyl-4-trifluormetansulfonyloksymetyl-1,2-O-isopropyliden- α -D-erytropentofuranose

Vannfritt pyridin (0,60 ml, 7,5 mmol) ble tilsatt til en oppløsning av 3,5-di-O-benzyl-4-hydroksymetyl-1,2-O-isopropyliden- α -D-erytropentofuranose (2 000 mg, 5,0 mmol) i vannfritt diklormetan (50 ml) og trifluormetansulfonsyreanhydrid (1 010 mg, 6,0 mmol) under nitrogenatmosfære ved $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, og blandingen ble omrørt i 40 minutter. Reaksjonsblandingen ble fordelt mellom metylenkloridet og oppløsningen av mettet, vandig natriumhydrogenkarbonat (ca. 100 ml). Det organiske lag ble vasket med mettet, vandig natriumhydrogenkarbonatoppløsning (ca. 100 ml) og mettet, vandig natriumkloridoppløsning (ca. 100 ml), tørket over vannfritt magnesiumsulfat og så konsentrert under vakuum, hvorved man fikk et hvitt pulver (2 520 mg, 4,73 mmol, 95%) som ble brukt i den neste reaksjon uten ytterligere rensing.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 1,34 (3H, s), 1,63 (3H, s), 3,48 (1H, d, 10Hz), 3,53 (1H, d, 10Hz), 4,21 (1H, d, 5,0Hz), 4,5 (4H, m), 4,74 (1H, d, 12Hz), 4,80 (1H, d, 12Hz), 5,01 (1H, d, 12Hz), 5,73 (1H, d, 4,6Hz), 7,3 (10H, m).

Referanseeksempel 2

3,5-di-O-benzyl-4-cyanmetyl-1,2-O-isopropyliden- α -D-erytropentofuranose

Forbindelsen erholdt i referanseeksempel 1 (2 520 mg, 4,73 mmol), ble oppløst i dimetylsulfoksid (50 ml) ved $90\text{ }^{\circ}\text{C}$. Til oppløsningen ble det tilsatt natriumcyanid (463 mg, 9,46 mmol) ved romtemperatur, og blandingen ble omrørt ved $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 3 timer. Reaksjonsblandingen ble fordelt mellom vann (ca. 100 ml) og etylacetat (ca. 100 ml). Det organiske lag ble vasket med mettet, vandig natriumkloridoppløsning (ca. 100 ml), tørket over

vannfritt magnesiumsulfat og så konsentrert under vakuum. Resten ble rensset ved hjelp av kromatografi på silikagel (under anvendelse av heksan:etylacetat = 4:1), hvorved man fikk en fargeløs olje (1 590 mg, 3,89 mmol, 82%).

5 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 1,34 (3H, s), 1,62 (3H, s), 2,88 (1H, d, 17Hz), 3,15 (1H, d, 17Hz), 3,50 (1H, d, 10Hz), 3,58 (1H, d, 10Hz), 4,08 (1H, d, 5,1Hz), 4,52 (1H, d, 12Hz), 4,56 (1H, d, 12Hz), 4,57 (1H, m), 4,58 (1H, d, 12Hz), 4,76 (1H, d, 12Hz), 5,73 (1H, d, 3,7Hz), 7,3 (10H, m).

10

Referanseeksempel 3

3,5-di-O-benzyl-4-formylmetyl-1,2-O-isopropyliden- α -D-erythro-pentofuranose

En 1,5 M toluenoppløsning av isobutylaluminiumhydrid
15 (2 ml, 3,0 mmol) ble sakte tilsatt dråpevis til en oppløsning av forbindelsen erholdt i referanseeksempel 2 (610 mg, 1,49 mmol) i diklormetan (10 ml) under nitrogenatmosfære ved $-78\text{ }^\circ\text{C}$, og blandingen ble omrørt i 1 time ved $-78\text{ }^\circ\text{C}$ og så varmet opp til romtemperatur. Til reaksjonsblandingen ble det tilsatt metanol
20 (5 ml) og mettet, vandig ammoniumkloridoppløsning (ca. 20 ml), og denne blandingen ble omrørt i 30 minutter. Reaksjonsblandingen ble ekstrahert med etylacetat (ca. 30 ml). Det organiske lag ble vasket med mettet, vandig natriumhydrogenkarbonatoppløsning (ca. 30 ml) og mettet, vandig natriumkloridoppløsning (ca.
25 30 ml), tørket over vannfritt magnesiumsulfat og så konsentrert under vakuum, hvorved man fikk et produkt som ble brukt i den neste reaksjon uten ytterligere rensing.

Referanseeksempel 4

3,5-di-O-benzyl-4-hydroksyetyl-1,2-O-isopropyliden- α -D-erythro-pentofuranose

NaBH_4 (7,6 mg, 0,2 mmol) ble tilsatt til en oppløsning av forbindelsen erholdt i referanseeksempel 3 (154 mg, 0,377 mmol) i etanol (5 ml), og blandingen ble omrørt ved
35 romtemperatur i 1 time. Reaksjonsblandingen ble fordelt mellom etylacetat (ca. 10 ml) og vann (ca. 10 ml), og det organiske lag ble vasket med mettet, vandig natriumkloridoppløsning (ca. 10 ml), tørket over vannfritt magnesiumsulfat og så konsentrert under vakuum. Resten ble rensset ved hjelp av kromatografi på

silikagel (under anvendelse av heksan:etylacetat = 2:1), hvorved man fikk en fargeløs olje (117 mg, 0,284 mmol, 75%).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 1,33 (3H, s), 1,66 (3H, s), 1,78 (1H, ddd, 4,0, 8,5, 15Hz); 2,51 (1H, ddd, 3,4, 6,4, 15Hz), 3,31 (1H, d, 10Hz), 3,54 (1H, d, 10Hz), 3,80 (2H, m), 4,13 (1H, d, 5,3Hz), 4,43 (1H, d, 12Hz), 4,52 (1H, d, 12Hz), 4,55 (1H, d, 12Hz), 4,65 (1H, dd, 4,0, 5,3Hz), 4,77 (1H, d, 12Hz), 5,77 (1H, d, 4,0Hz), 7,3 (10H, m).

FABMS (mNBA): 415 (M+H)⁺, [α]_D +57,4° (0,91, metanol).

10

Referanseeksempel 5

3,5-di-O-benzyl-4-formyl-1,2-O-isopropyliden-α-D-erytropentofuranose

Oksalylklorid (6,02 ml, 69,0 mmol) ble tilsatt til metylenklorid (200 ml) avkjølt ved -78 °C. En oppløsning av dimetylsulfoksid (7,87 ml, 110 mmol) i vannfritt metylenklorid (100 ml) ble dråpevis tilsatt til denne oppløsning. Etter omrøring i 20 minutter ble en oppløsning av 3,5-di-O-benzyl-1,2-O-isopropyliden-α-D-erytropentofuranose (9 210 mg, 23,02 mmol) i vannfritt diklormetan (100 ml) tilsatt dråpevis til denne blandingen, og blandingen ble omrørt i 30 minutter. Trietylamin (28 ml, 200 mmol) ble tilsatt til denne reaksjonsblanding, og blandingen ble sakte varmet opp til romtemperatur. Reaksjonsblanding ble fordelt mellom diklormetan og vann (ca. 300 ml). Det organiske lag ble vasket med vann (ca. 300 ml) og mettet, vandig natriumkloridoppløsning (ca. 300 ml), tørket over vannfritt magnesiumsulfat og så konsentrert under vakuum. Resten ble rensset ved hjelp av kromatografi på silikagel (under anvendelse av heksan:etylacetat = 5:1), hvorved man fikk en fargeløs olje (8 310 mg, 20,88 mmol, 91%).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 1,35 (3H, s), 1,60 (3H, s), 3,61 (1H, d, 11Hz), 3,68 (1H, d, 11Hz), 4,37 (1H, d, 4,4Hz), 4,46 (1H, d, 12Hz), 4,52 (1H, d, 12Hz), 4,59 (1H, d, 12Hz), 4,59 (1H, dd, 3,4, 4,4Hz), 4,71 (1H, d, 12Hz), 5,84 (1H, d, 3,4Hz), 7,3 (10H, m), 9,91 (1H, s).

FABMS (mNBA): 397 (M-H)⁺, 421 (M+Na)⁺, [α]_D +27,4° (0,51, metanol).

Referanseeksempel 63,5-di-O-benzyl-4-vinyl-1,2-O-isopropyliden- α -D-erytropa-
furanose

En 0,5 M toluenoppløsning av Tebbe-reagens (44 ml, 22 mmol) ble tilsatt til en oppløsning av forbindelsen erholdt i referanseeksempel 5 (8 310 mg, 20,88 mmol) i vannfritt tetrahydrofuran (300 ml) under nitrogenatmosfære ved 0 °C, og blandingen ble omrørt ved 0 °C i 1 time. Dietyleter (300 ml) ble tilsatt til reaksjonsblandingen, og så ble det sakte tilsatt 0,1 N vandig natriumhydroksidoppløsning (20 ml). Blandingen ble filtrert gjennom celitt for å fjerne utfellinger, og utfellingene ble vasket med dietyleter (ca. 100 ml). Det organiske lag ble tørket over vannfritt magnesiumsulfat og så konsentrert under vakuum. Resten ble renset ved hjelp av kromatografi på basisk alumina under anvendelse av diklormetan, hvorved man fikk råprodukt som ble renset videre ved hjelp av kromatografi på silikagel (under anvendelse av heksan:etylacetat = 8:1 - 5:1), hvorved man fikk en fargeløs olje (5 600 mg, 14,14 mmol, 68%).
 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 1,28 (3H, s), 1,52 (3H, s), 3,31 (1H, d, 11Hz), 3,34 (1H, d, 11Hz), 4,25 (1H, d, 4,9Hz), 4,40 (1H, d, 12Hz), 4,52 (1H, d, 12Hz), 4,57 (1H, dd, 3,9, 4,9Hz), 4,59 (1H, d, 12Hz), 4,76 (1H, d, 12Hz), 5,25 (1H, dd, 1,8, 11Hz), 5,52 (1H, dd, 1,8, 18Hz), 5,76 (1H, d, 3,9Hz), 6,20 (1H, dd, 11, 18Hz), 7,3 (10H, m).
FABMS (mNBA): 419 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$.

Referanseeksempel 73,5-di-O-benzyl-4-hydroksyetyl-1,2-O-isopropyliden- α -D-erytropa-
pentofuranose

En 0,5 M tetrahydrofuranoppløsning av 9-BBN (9-borabisyklo[3.3.1]nonan) (80 ml, 40 mmol) ble dråpevis tilsatt til en oppløsning av forbindelsen erholdt i referanseeksempel 6 (5 500 mg, 13,89 mmol) i vannfritt tetrahydrofuran (200 ml) under nitrogenatmosfære, og blandingen ble omrørt ved romtemperatur over natten. Vann ble tilsatt til reaksjonsblandingen inntil utvikling av gass stanset, 3 N vandig natriumhydroksidoppløsning (30 ml) ble tilsatt, og så ble det sakte tilsatt 30% vandig hydrogenperoksidoppløsning mens temperaturen ble holdt mellom 30 og 50 °C. Denne blanding ble omrørt i 30 minutter og

fordelt mellom mettet, vandig natriumkloridoppløsning (ca. 200 ml) og etylacetat (200 ml). Det organiske lag ble vasket med nøytral fosforsyrebufferoppløsning (ca. 200 ml) og mettet, vandig natriumkloridoppløsning (ca. 200 ml), og det ble tørket

5 over vannfritt magnesiumsulfat og så konsentrert under vakuum. Resten ble rensset ved hjelp av kromatografi på silikagel (under anvendelse av heksan:etylacetat = 2:1 - 1:1), hvorved man fikk en fargeløs olje (5 370 mg, 12,97 mmol, 93%).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 1,33 (3H, s), 1,66 (3H, s), 1,78 (1H, ddd, 4,0, 8,5, 15Hz), 2,51 (1H, ddd, 3,4, 6,4, 15Hz), 3,31 (1H, d, 10Hz), 3,54 (1H, d, 10Hz), 3,80 (2H, m), 4,13 (1H, d, 5,3Hz), 4,43 (1H, d, 12Hz), 4,52 (1H, d, 12Hz), 4,55 (1H, d, 12Hz), 4,65 (1H, dd, 4,0, 5,3Hz), 4,77 (1H, d, 12Hz), 5,77 (1H, d, 4,0Hz), 7,3 (10H, m).

15 FABMS (mNBA): 415 (M+H)⁺, [α]_D +57,4° (0,91, metanol).

Referanseeksempel 8

3,5-di-O-benzyl-4-(p-toluensulfonyloksyetyl)-1,2-O-isopropyliden-α-D-erytropentofuranose

20 Trietylamin (1,8 ml, 13 mmol), dimetylaminopyridin (30 mg, 0,25 mmol) og p-toluensulfonylchlorid (858 mg, 4,5 mmol) ble tilsatt til en oppløsning av forbindelsen erholdt i referanseeksempel 4 som var azeotropdestillert under reflux med toluen (1 035 mg, 2,5 mmol) i vannfritt diklormetan (35 ml)

25 under nitrogenatmosfære ved 0 °C, og blandingen ble omrørt ved romtemperatur over natten. Reaksjonsblandingen ble fordelt mellom diklormetanet og den mettede, vandige natriumhydrogenkarbonatoppløsning (ca. 100 ml). Det organiske lag ble vasket med mettet, vandig natriumhydrogenkarbonatoppløsning (ca.

30 100 ml) og mettet, vandig natriumkloridoppløsning (ca. 100 ml), og det ble tørket over vannfritt magnesiumsulfat og så konsentrert under vakuum. Resten ble rensset ved hjelp av kromatografi på silikagel (under anvendelse av heksan:etylacetat = 3:1), hvorved man fikk en fargeløs olje (1 340 mg, 2,6 mmol, 94%).

35 ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 1,33 (3H, s), 1,49 (3H, s), 1,99 (1H, dt, 7,6 og 15Hz), 2,47 (3H, s), 2,60 (1H, ddd, 5,7, 7,6, 15Hz), 3,28 (1H, d, 10Hz), 3,45 (1H, d, 10Hz), 4,11 (1H, d, 5,3Hz), 4,32 (2H, m), 4,42 (1H, d, 12Hz), 4,50 (1H, d, 12Hz), 4,54 (1H,

d, 12Hz), 4,62 (1H, dd, 4,0, 5,2Hz), 4,76 (1H, d, 12Hz), 5,74 (1H, d, 4,0Hz), 7,3 (12H, m), 7,78 (2H, d, 8,3Hz).
 FAB-MAS (mNBA): 569 (M+H)⁺.

5 Referanseeksempel 9

1,2-di-O-acetyl-3,5-di-O-benzyl-4-(p-toluensulfonyloksyetyl)- α -D-erytropentofuranose

Eddiksyreanhydrid (1,88 ml, 20 mmol) og konsentrert svovelsyre (0,01 ml) ble tilsatt til en oppløsning av forbindelsen 10 erholdt i referanseeksempel 8 (1 340 mg, 2,36 mmol) i eddiksyre (15 ml), og blandingen ble omrørt ved romtemperatur i 1 time. Reaksjonsblandingen ble helt over i vann (60 ml) i et isbad, og det ble omrørt i 30 minutter og så fordelt mellom mettet, vandig natriumkloridoppløsning (ca. 100 ml) og etylacetat 15 (ca. 100 ml). Det organiske lag ble vasket med nøytral fosforsyrebufferoppløsning, mettet, vandig natriumhydrogenkarbonatoppløsning og mettet, vandig natriumkloridoppløsning, og det ble tørket over vannfritt magnesiumsulfat og så konsentrert. Resten ble rensert ved hjelp av kromatografi på silikagel (under 20 anvendelse av heksan:etylacetat = 2:1), hvorved man fikk en fargeløs olje (1 290 mg, 2,11 mmol, 89%, α : β = 1:5).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): (β -derivat) 1,86 (3H, s), 2,05 (3H, s), 2,08 (1H, m), 2,18 (1H, m), 2,42 (3H, s), 3,30 (1H, d, 10Hz), 3,33 (1H, d, 10Hz), 4,23 (1H, d, 5,1Hz), 4,24 (2H, m), 4,42 (2H, 25 s), 4,45 (1H, d, 12Hz), 4,55 (1H, d, 12Hz), 5,28 (1H, d, 5,1Hz), 6,01 (1H, s), 7,3 (12H, m), 7,73 (2H, d, 8,3Hz).

FAB-MAS (mNBA): 613 (M+H)⁺.

Referanseeksempel 10

30 2'-O-acetyl-3',5'-di-O-benzyl-4'-p-toluensulfonyloksyetyl-5-metyluridin

Trimetylsilylert thymin (500 mg, ca. 2 mmol), som ble fremstilt i henhold til en metode til H. Vorbruggen, K. Krolikiewicz og B. Bennua (Chem. Ber., 114, 1234-1255 (1981)), ble 35 tilsatt til en oppløsning av forbindelsen erholdt i referanseeksempel 9 (650 mg, 1,06 mmol) i vannfritt 1,2-dikloretan (15 ml) ved romtemperatur under nitrogenatmosfære. Trimetylsilyltrifluormetansulfonat (0,36 ml, 2 mmol) ble tilsatt dråpevis til blandingen, og blandingen ble omrørt ved 50 °C i 1 time.

Mettet, vandig natriumhydrogenkarbonatoppløsning (ca. 50 ml) ble tilsatt til reaksjonsblandingen, og blandingen ble filtrert gjennom celitt. Diklormetan (ca. 50 ml) ble tilsatt til filtratet. Det organiske lag ble vasket med mettet, vandig natriumhydrogenkarbonatoppløsning (ca. 50 ml) og mettet, vandig natriumkloridoppløsning (ca. 50 ml), og det ble tørket over vannfritt magnesiumsulfat og så konsentrert under vakuum. Resten ble renset ved hjelp av kromatografi på silikagel (under anvendelse av heksan:etylacetat = 1,2:1), hvorved man fikk et fargeløst, fast stoff (432 mg, 0,64 mmol, 60%).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 1,52 (3H, d, 0,9Hz), 1,94 (1H, dt, 7,5 og 15Hz), 2,06 (3H, s), 2,23 (1H, dt, 6,0 og 15Hz), 2,42 (3H, s), 3,38 (1H, d, 10Hz), 3,67 (1H, d, 10Hz), 4,17 (2H, m), 4,36 (1H, d, 6,0Hz), 4,41 (1H, d, 12Hz), 4,44 (1H, d, 12Hz), 4,48 (1H, d, 12Hz), 4,58 (1H, d, 12Hz), 5,39 (1H, dd, 5,1 og 6,0Hz), 6,04 (1H, d, 5,1Hz), 7,3 (12H, m), 7,73 (2H, dt, 1,8 og 8,3Hz), 8,18 (1H, s).

FAB-MAS (mNBA): 679 (M+H)⁺.

20 Referanseeksempel 11

2'-O-acetyl-3',5'-di-O-benzyl-4'-p-toluensulfonyloksyetyl-4-N-benzoylcytidin

Trimetylsilylert benzoylcytosin (300 mg, ca. 1,0 mmol), som ble fremstilt i henhold til en metode til H. Vorbruggen, K. Krolikiewicz og B. Bennua (Chem. Ber., 114, 1234-1255 (1981)), ble tilsatt til en oppløsning av forbindelsen erholdt i referanseeksempel 9 (383 mg, 0,626 mmol) i vannfritt 1,2-dikloretan (4 ml). Trimetylsilyltrifluormetansulfonat (0,18 ml, 0,995 mmol) ved 0 °C ble tilsatt til blandingen, og blandingen ble omrørt ved 50 °C i 1 time. Mettet, vandig natriumhydrogenkarbonatoppløsning (ca. 10 ml) og metylenklorid (ca. 20 ml) ble tilsatt til blandingen, og så ble blandingen omrørt. De resulterende hvite utfellinger ble frafiltrert gjennom celitt. Det organiske lag i filtratet ble vasket med mettet, vandig natriumkloridoppløsning (ca. 20 ml) og tørket over vannfritt magnesiumsulfat, og så ble det konsentrert under vakuum, hvorved man fikk et fargeløst, amorf, fast stoff (397 mg, 83%).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): 8,70 (1H, br), 8,18 (1H, d, 7,4Hz), 7,87 (2H, d, 7,5Hz), 7,72 (2H, d, 8,3Hz), 7,61-7,57 (1H, m), 7,51-

7,48 (2H, m), 7,43-7,21 (13H, m), 6,02 (1H, d, 2,9Hz), 5,40 (1H, dd, 5,8, 2,9Hz), 4,57 (1H, d, 11Hz), 4,39 (1H, d, 11Hz), 4,32-4,28 (3H, m), 4,19-4,16 (2H, m), 3,69 (1H, d, 11Hz), 3,31 (1H, d, 11Hz), 2,40 (3H, s), 2,30-2,23 (1H, m), 2,06 (3H, s), 1,95-1,89 (1H, m).

FAB-MAS (mNBA): 768 (M+H)⁺.

Referanseeksempel 12

2'-O-acetyl-3',5'-di-O-benzyl-4'-p-toluensulfonyloksyetyl-6-N-benzoyladenosin

Trimetylsilylert benzoyladenosin (500 mg, ca. 2,0 mmol) som ble fremstilt i henhold til en metode til H. Vorbruggen, K. Krolikiewicz og B. Bennua (Chem. Ber., 114, 1234-1255 (1981)), ble tilsatt til en oppløsning av forbindelsen erholdt i referanseeksempel 9 (600 mg, 0,98 mmol) i vannfritt 1,2-dikloretan (15 ml) ved romtemperatur under nitrogenatmosfære. Etter dråpevis tilsetning av trimetylsilyltrifluormetansulfonat (0,36 ml, 2 mmol) til blandingen ble blandingen omrørt ved 50 °C i 4 timer. Mettet, vandig natriumhydrogenkarbonatoppløsning (ca. 50 ml) og diklormetan (50 ml) ble tilsatt til reaksjonsblandingen, og blandingen ble fordelt mellom disse to lagene. Det organiske lag ble vasket med mettet, vandig natriumhydrogenkarbonatoppløsning (ca. 50 ml) og mettet, vandig natriumkloridoppløsning (ca. 50 ml), og det ble tørket over vannfritt magnesiumsulfat og så konsentrert under vakuum. Resten ble rensert ved hjelp av kromatografi på silikagel (under anvendelse av diklormetan:metanol = 50:1), hvorved man fikk et fargeløst, amorft, fast stoff (405 mg, 0,51 mmol, 52%).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 2,0 (1H, m), 2,06 (3H, s), 2,32 (1H, dt, 6,0 og 15Hz), 2,40 (3H, s), 3,36 (1H, d, 10Hz), 3,58 (1H, d, 10Hz), 4,22 (2H, m), 4,39 (1H, d, 12Hz), 4,45 (1H, d, 12Hz), 4,47 (1H, d, 12Hz), 4,59 (1H, d, 12Hz), 4,62 (1H, d, 5,6Hz), 5,94 (1H, dd, 4,5 og 5,6Hz), 6,21 (1H, d, 4,5Hz), 7,2-7,3 (12H, m), 7,54 (2H, m), 7,62 (1H, dt, 1,2 og 6,2Hz), 7,72 (2H, d, 8,3Hz), 8,02 (2H, m), 8,21 (1H, s), 8,75 (1H, s), 8,97 (1H, brs).

FAB-MAS (mNBA): 792 (M+H)⁺.

Referanseeksempel 132'-O-acetyl-3',5'-di-O-benzyl-4'-p-toluensulfonyloksyetyluridin

Trimetylsilylert uracil (200 mg, ca. 0,8 mmol), som ble fremstilt ifølge en fremgangsmåte til H. Vorbrggen, K. Krolikiewicz og B. Bennua (Chem. Ber., 114, 1234-1255 (1981)), ble tilsatt til en oppløsning av forbindelsen erholdt i referanseeksempel 9 (200 mg, 0,327 mmol) i vannfritt 1,2-dikloretan (8 ml) ved romtemperatur under nitrogenatmosfære. Etter dråpevis tilsetning av trimetylsilyltrifluormetansulfonat (0,145 ml, 0,8 mmol) til blandingen ble blandingen omrørt ved 70 °C i 1 time. Mettet, vandig natriumhydrogenkarbonatoppløsning (ca. 10 ml) ble tilsatt til reaksjonsblandingen, blandingen ble filtrert gjennom celitt, og diklormetan (ca. 10 ml) ble tilsatt til filtratet. Det organiske lag ble vasket med mettet, vandig natriumhydrogenkarbonatoppløsning og mettet, vandig natriumkloridoppløsning og tørket over vannfritt magnesiumsulfat og så konsentrert under vakuum. Resten ble rensert ved hjelp av kromatografi på silikagel (under anvendelse av diklormetan:metanol = 100:2), hvorved man fikk en fargeløs olje (199 mg, 0,299 mmol, 92%).

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 1,94 (1H, dt, 7,4 og 15Hz), 2,07 (3H, s), 2,23 (1H, dt, 5,9 og 15Hz), 2,43 (3H, s), 3,36 (1H, d, 10Hz), 3,65 (1H, d, 10Hz), 4,17 (2H, dd, 6 og 7Hz), 4,31 (1H, d, 5,9Hz), 4,38 (1H, d, 11Hz), 4,39 (1H, d, 11Hz), 4,40 (1H, d, 11Hz), 4,58 (1H, d, 11Hz), 5,29 (1H, dd, 2,4 og 8,2Hz), 5,33 (1H, dd, 4,5 og 6Hz), 6,00 (1H, d, 4,5Hz), 7,2-7,4 (12H, m), 7,61 (1H, d, 8,2Hz), 7,74 (1H, d, 8,3Hz), 8,14 (1H, brs).

FAB-MAS (mNBA): 665 (M+H)⁺.

Referanseeksempel 142'-O-acetyl-3',5'-di-O-benzyl-4'-p-toluensulfonyloksyetyl-4-N-benzoyl-5-metylcytidin

Trimetylsilylert benzoyl-5-metylcytosin (400 mg, ca. 1,2 mmol), som ble fremstilt ifølge en fremgangsmåte til H. Vorbrggen, K. Krolikiewicz og B. Bennua (Chem. Ber., 114, 1234-1255 (1981)), ble tilsatt til en oppløsning av forbindelsen erholdt i referanseeksempel 9 (400 mg, 0,653 mmol) i vannfritt 1,2-dikloretan (6 ml). Etter tilsetning av trimetylsilyltrifluormetansulfonat (0,180 µl, 1,0 mmol) til blandingen ved 0 °C

ble blandingen omrørt ved 50 °C i 1 time. Reaksjonsblandingen ble varmet opp til romtemperatur. Mettet, vandig natriumhydrogenkarbonatoppløsning (ca. 5 ml) og metylenklorid (ca. 10 ml) ble tilsatt til reaksjonsblandingen, og blandingen ble omrørt.

5 Blandingen ble filtrert gjennom celitt for å fjerne hvite utfellinger. Det organiske lag i filtratet ble vasket med mettet, vandig natriumkloridoppløsning og tørket over vannfritt magnesiumsulfat og så konsentrert under vakuum, hvorved man fikk et fargeløst, amorft, fast stoff (320 mg, 0,409 mmol, 63%).

10 ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): 1,68 (3H, s), 1,95 (1H, dt, 7,3 og 15Hz), 2,07 (3H, s), 2,25 (1H, dt, 6 og 15Hz), 2,43 (3H, s), 3,40 (1H, d, 10Hz), 3,71 (1H, d, 10Hz), 4,18 (2H, m), 4,37 (1H, d, 5,8Hz), 4,42 (1H, d, 12Hz), 4,46 (1H, d, 12Hz), 4,51 (1H, d, 12Hz), 4,61 (1H, d, 12Hz), 5,42 (1H, dd, 4,9 og 5,8Hz), 6,07
15 (1H, d, 4,9Hz), 7,2-7,6 (17H, m), 7,74 (2H, d, 8,3Hz), 8,28 (2H, d, 7,0Hz).

FAB-MAS (mNBA): 782 (M+H)⁺.

Referanseeksempel 15

20 2'-O-acetyl-3',5'-di-O-benzyl-4'-p-toluensulfonyloxyetyl-2-N-isobutyrylguanosin

Trimetylsilylert isobutyrylguanosin (650 mg, ca. 1,5 mmol), som ble fremstilt ifølge en fremgangsmåte til H. Vorbruggen, K. Krolikiewicz og B. Bennua (Chem. Ber., 114, 1234-
25 1255 (1981)), ble tilsatt til en oppløsning av forbindelsen erholdt i referanseeksempel 9 (400 mg, 0,65 mmol) i vannfritt 1,2-dikloretan (10 ml) ved romtemperatur under nitrogenatmosfære. Etter tilsetning av trimetylsilyltrifluormetansulfonat (0,2 ml, 1,2 mmol) til blandingen ble blandingen omrørt ved 50 °C
30 i 4 timer. Mettet, vandig natriumhydrogenkarbonatoppløsning (ca. 5 ml) ble tilsatt til reaksjonsblandingen, og det organiske lag ble vasket med mettet, vandig natriumhydrogenkarbonatoppløsning og mettet, vandig natriumkloridoppløsning, og tørket over vannfritt magnesiumsulfat og så konsentrert under vakuum, hvorved
35 man fikk et produkt som ble brukt i den neste reaksjon uten ytterligere rensing.

Testeksempel 1T_m-målingstest

En prøveoppløsning (1 000 µl) med en sluttkonsentrasjon av NaCl på 100 mM, natriumfosfatbufferoppløsning (pH 7,2) på 5 10 mM, oligonukleotid (1) på 4 µM, og komplementært DNA (heretter henvist til som oligonukleotid (2)), som har en sekvens som indikert ved dens komplementære kjede (sekvens: 5'-agcaaaaaacgc-3' (sekvens nr. 1 i sekvenslisten) eller komplementært RNA (heretter henvist til som oligonukleotid (3)) som 10 har en sekvens indikert ved sekvensen 5'-agcaaaaaacgc-3' (sekvens nr. 1 i sekvenslisten), på 4 µM, ble varmet opp i et kokende vannbad og sakte avkjølt til romtemperatur i løpet av ca. 2 timer. Prøveoppløsningen ble så varmet opp og målt ved å anvende et spektrofotometer (UV-3100PC: et produkt fra Shimadzu 15 Corp.). Prøven ble varmet opp i en celle (celletykkelse: 1,0 cm, sylindrisk kappetype) ved å sirkulere vann varmet opp med en inkubator (Haake FE2: et produkt fra EKO Corp.), og temperaturen ble overvåket ved å anvende et digitalt termometer (SATO SK1250MC). Temperaturen ble økt fra 20 °C til 95 °C, og styrken 20 på ultrafiolett absorpsjonsbølglengde i nærheten av 260 nm ble målt for hver 1 °C økning i temperatur. Naturlig forekommende DNA (heretter henvist til som oligonukleotid (4)) som har sekvensen indikert ved hjelp av sekvensen 5'-gcgttttttgct-3' (sekvens nr. 2 i sekvenslisten), 25 som er den samme sekvens som oligonukleotid (1) (forbindelse ifølge eksempel 29), ble brukt som kontroll, og den samme fremgangsmåten ble utført.

Den temperaturen hvor endringsmengden pr. 1 °C nådde et maksimum, ble regnet for å være T_m (smeltepunkt), og evnen til 30 komplementær kjededannelse for oligonukleotidanalogen ble evaluert ved denne temperatur.

Det etterfølgende viser resultatene av måling av T_m-verdiene for oligonukleotid (4) (naturlig forekommende DNA) og oligonukleotid (1) (forbindelse ifølge eksempel 29) i forhold 35 til oligonukleotid (2) (komplementært DNA) og oligonukleotid (3) (komplementært RNA).

Tabell 3

T _m (°C)		
Forbindelse	Oligonukleotid (2)	Oligonukleotid (3)
Oligonukleotid (4)	48	44
Oligonukleotid (1)	61	75

5 Som det klart fremgår av tabellen ovenfor, oppviste oligonukleotidanalogen ifølge foreliggende oppfinnelse et bemerkelsesverdig høyere T_m samt bemerkelsesverdig høyere komplementær kjededannelsesevne sammenlignet med naturlig forekommende DNA.

10

Testeksempel 2

Måling av nukleaseenzymresistens

Eksonuklease eller endonuklease ble blandet i en bufferoppløsning av oligonukleotid holdt ved 37 °C i 15 minutter. Den blandede oppløsning ble så holdt ved 37 °C i et forutbestemt tidsrom. Etylendiamintetraeddiksyre (EDTA) ble tilsatt til en porsjon av den blandede oppløsning, og blandingen ble varmet opp ved 100 °C i 2 minutter for å stanse reaksjonen. Mengden av oligonukleotid som er tilbake i blandingen, ble bestemt ved hjelp av reversfase-væskekolonnekromatografi med høy yteevne, og de tidsbaserte endringene i oligonukleotidmengden i nærvær av nuklease ble målt.

25

Industriell anvendbarhet

Den nye oligonukleotidanalogue og nukleosidanalogue ifølge foreliggende oppfinnelse kan anvendes som antisense- eller antigenfarmasøytika med utmerket stabilitet, som påvisningsmidler (prober) for et spesifikt gen, som primere for å starte amplifikasjon, eller som mellomprodukter for deres fremstilling.

SEKVENSLISTE

<110> Sankyo Company, Limited

<120> Novel Nucleoside and Nucleotide Derivatives

<130> FP200013

<140>

<141>

<150> JP HEI11-33863

<151> 1999-02-12

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthesized oligonucleotide for testing Tm value

<400> 1

agcaaaaaac gc

12

<210> 2

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthesized oligonucleotide for testing Tm value

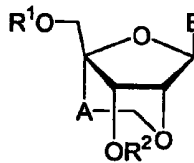
<400> 2

gcgtttttg ct

12

P a t e n t k r a v

- 5 1. Forbindelse,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den har formel (1):



(1)

15 hvor:

R¹ og R² er et hydrogenatom, benzyl, 4,4'-dimetoksytrityl eller
-P(R³)R⁴, hvor R³ og R⁴ er diisopropylamino eller 2-cyanetyloksy,
A er metylen og

20 B er 2-okso-pyrimidin-1-yl eller purin-9-yl substitueret med
substituenten valgt fra hydroksylgruppe, aminogruppe,
benzoylamino, isobutyrylamino og metyl,
eller et salt derav.

2. Forbindelse eller et salt derav,

25 k a r a k t e r i s e r t v e d at den er valgt fra den
følgende gruppe:

2'-O,4'-C-etylunganosin,

2'-O,4'-C-etylenadenosin,

3',5'-di-O-benzyl-2'-O,4'-C-etylen-6-N-benzoyladenosin,

30 3',5'-di-O-benzyl-2'-O,4'-C-etylen-2-N-isobutyrylguanosin,

5'-O-dimetoksytrityl-2'-O,4'-C-etylen-6-N-benzoyladenosin,

5'-O-dimetoksytrityl-2'-O,4'-C-etylen-2-N-isobutyrylguanosin,

2'-O,4'-C-etylen-2-N-isobutyrylguanosin,

2'-O,4'-C-etylen-6-N-benzoyladenosin,

35 5'-O-dimetoksytrityl-2'-O,4'-C-etylen-6-N-benzoyladenosin-3'-O-
(2-cyanetyl-N,N-diisopropyl) fosforamiditt,

5'-O-dimetoksytrityl-2'-O,4'-C-etylen-2-N-isobutyrylguanosin-3'-

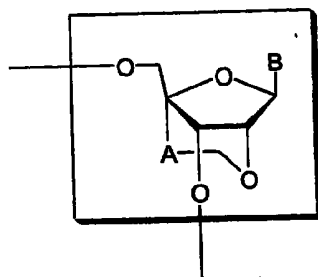
O-(2-cyanetyl-N,N-diisopropyl) fosforamiditt,

2'-O,4'-C-etylenuridin,

2'-O,4'-C-etylen-5-metyluridin,
 2'-O,4'-C-etylencytidin,
 2'-O,4'-C-etylen-5-metylcytidin,
 3',5'-di-O-benzyl-2'-O,4'-C-etylenuridin,
 5 5'-O-dimetoksytrityl-2'-O,4'-C-etylenuridin,
 3',5'-di-O-benzyl-2'-O,4'-C-etylen-5-metyluridin,
 5'-O-dimetoksytrityl-2'-O,4'-C-etylen-5-metyluridin,
 3',5'-di-O-benzyl-2'-O,4'-C-etylen-4-N-benzoylcytidin,
 5'-O-dimetoksytrityl-2'-O,4'-C-etylen-4-N-benzoylcytidin,
 10 3',5'-di-O-benzyl-2'-O,4'-C-etylen-4-N-benzoyl-5-metylcytidin,
 5'-O-dimetoksytrityl-2'-O,4'-C-etylen-4-N-benzoyl-5-metylcyti-
 din,
 2'-O,4'-C-etylen-4-N-benzoylcytidin,
 2'-O,4'-C-etylen-4-N-benzoyl-5-metylcytidin,
 15 5'-O-dimetoksytrityl-2'-O,4'-C-etylen-uridin-3'-O-(2-cyanetyl-
 N,N-diisopropyl) fosforamiditt,
 5'-O-dimetoksytrityl-2'-O,4'-C-etylen-5-metyluridin-3'-O-(2-
 cyanetyl-N,N-diisopropyl) fosforamiditt,
 5'-O-dimetoksytrityl-2'-O,4'-C-etylen-4-N-benzoylcytidin-3'-O-
 20 (2-cyanetyl-N,N-diisopropyl) fosforamiditt og
 5'-O-dimetoksytrityl-2'-O,4'-C-etylen-4-N-benzoyl-5-metylcyti-
 din-3'-O-(2-cyanetyl-N,N-diisopropyl) fosforamiditt.

3. Oligonukleotidanalogs,

25 k a r a k t e r i s e r t v e d at den har én eller to eller
 flere strukturer med formel (2):



(2)

35 hvor:

A er metylen og

B er en purin-9-yl-gruppe, en 2-okso-pyrimidin-1-yl-gruppe eller
 en substitueret purin-9-yl-gruppe eller en substitueret 2-okso-

pyrimidin-1-yl-gruppe med minst én substituent valgt fra hydrok-
sylgruppe, aminogruppe, benzoylamino, isobutyrylamino og metyl,
eller et farmakologisk akseptabelt salt derav.

5 4. Farmasøytisk preparat,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter en effektiv
mengde av en farmakologisk aktiv forbindelse sammen med en bærer
eller fortynner, hvor den farmakologisk aktive forbindelse er en
oligonukleotidanalogue ifølge krav 3 eller et farmakologisk
10 akseptabelt salt derav.

5. Probe for et gen,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter en oligo-
nukleotidanalogue ifølge krav 3.

15

6. Primer for starting av amplifikasjon,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter en oligo-
nukleotidanalogue ifølge krav 3.

20 7. Anvendelse av en oligonukleotidanalogue ifølge krav 3
eller et farmakologisk akseptabelt salt derav ved fremstilling
av et medikament for forhindring eller behandling av sykdommer
som lar seg forhindre eller behandle gjennom evnen til
oligonukleotidanalogen når det gjelder å utvise farmakologisk
25 anvendbar antisense-aktivitet i kroppen til pasienten etter
administrering derav.

8. Anvendelse av en oligonukleotidanalogue ifølge krav 3
eller et farmakologisk akseptabelt salt derav ved fremstillingen
30 av et medikament for forhindring eller behandling av sykdommer
som lar seg forhindre eller behandle gjennom evnen til
oligonukleotidanalogen når det gjelder å utvise farmakologisk
anvendbar antigenaktivitet i kroppen til pasienten etter
administrering derav.

35

9. Oligonukleotidanalogue ifølge krav 3 eller et farma-
kologisk akseptabelt salt derav for anvendelse som et medika-
ment.