

**α -Hydroxy-2-nitrobenzylphosphonat modifizierte
Oligonucleotide.
Synthese, Eigenschaften und neue Synthesekonzepte**

**Dissertation
zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Universität Hamburg**

von
Andreas Hohlfeld



vorgelegt dem Fachbereich Chemie

Hamburg
2004

1. Gutachter: Prof. Dr. Chris Meier

2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. Wittko Francke

Datum der Disputation: 04.02.2005

Meiner Mutter

„Schlechtem Wetter
musst du mit Geduld begegnen,
mach es wie die Schöppenstedter:
regnet es, so lass es regnen!“

Wilhelm Busch

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 2000 bis Oktober 2004 bei Professor Dr. Chris Meier am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg angefertigt.

Allen voran möchte ich meinem Doktorvater Professor Dr. Chris Meier für die Möglichkeit zur Bearbeitung des interessanten und abwechslungsreichen Themas danken. Er hat mir den nötigen kreativen Spielraum gelassen, um selbstständig und eigenverantwortlich experimentieren zu können, stand mir andererseits stets mit fachlichen Hilfestellungen und Diskussionen zur Seite. Für die hervorragenden experimentellen Bedingungen und die fortwährende Unterstützung bedanke ich mich bei Ihnen.

Ich danke meinen Schwerpunktpraktikanten Ümit Gün, Maryam Bahaji, Zeynep Yunt und Sabrina Trtica. Sie haben durch ihren Einsatz und ihr experimentelles Geschick wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Besonders möchte ich meinem Arbeitskreis und der Arbeitsgruppe Maison für die tolle Atmosphäre und Zusammenarbeit, die zahlreichen chemischen (und vor allem nichtchemischen) Diskussionen danken. Meinem Laborkollegen Wolfgang Fendrich danke ich für die überaus vielfältigen Diskussionen, die wir führen konnten. Alexander Prenzel und Jens Thomann vielen Dank für die Korrektur des Manuskriptes.

Ich danke Herrn Dr. Stefan Franke für die Einweisung und exzellente Hilfestellung bei der Arbeit auf dem ESI-Massenspektrometer. Frau Annegret Meiners danke ich für die Messung der FAB-Massenspektren.

Herrn Dr. Volker Sinnwell und seinem Team danke ich für die Messung der zahlreichen NMR-Spektren und für das Engagement während der ein oder anderen Spezialmessung.

Frau Dr. Tina Knispel hat mich über weite Teile meiner Doktorarbeit begleitet und unterstützt. Hierfür, für die schöne Zeit und die kritische Durchsicht dieser Arbeit möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

Nicht zuletzt danke ich meiner Mutter und meiner Familie, deren Unterstützung und Hilfestellung in der abwechslungsreichen Zeit meines Studiums und meiner Doktorarbeit ich mir immer sicher sein konnte. Danke, dass Ihr für mich da seid.

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	VII
ABKÜRZUNGEN.....	XIII
1 EINLEITUNG	1
2 KENNTNISSTAND	6
2.1 Antisense.....	6
2.2 Modifikationen von Oligonucleotiden.....	9
2.3 Pro-Oligonucleotide	13
2.4 Hydroxybenzylphosphonat-Pro-Oligonucleotide.....	16
3 AUFGABENSTELLUNG.....	19
4 RESULTATE UND DISKUSSION.....	22
4.1 Synthese α -Hydroxybenzylphosphonat-modifizierter dimerer Bausteine	22
4.1.1 Syntheseplanung.....	22
4.1.2 Synthese α -Hydroxybenzylphosphonat-modifizierter Dinucleotidbausteine (Variante A).....	25
4.1.3 Syntheseplanung α -Hydroxybenzylphosphonat-modifizierter Dinucleotidbausteine (Variante B).....	37
4.1.4 Synthese von α -Hydroxybenzylphosphonat-Bausteinen (Variante B).....	39
4.1.4.1 Synthese über Phosphonsäurediphenylester	39
4.1.4.2 Synthese über Phosphonsäurechloride	44
4.1.4.3 Synthese über Phosphonigsäure	48
4.1.4.4 Synthese über Phosphinate.....	50
4.1.5 Weitere Untersuchungen an α -Hydroxybenzylphosphonatinucleotiden.....	58
4.2 Synthese α -Hydroxybenzyl modifizierter Phosphonamiditbausteine.....	62
4.2.1 Syntheseplanung.....	63
4.2.2 Syntheseversuch des monomeren Phosphonamiditbausteines (Variante A1).....	65

4.2.3	Syntheseversuch des monomeren Phosphonamiditbausteines (Variante A2).....	67
4.2.4	Synthese des monomeren Phosphonamiditbausteines (Variante B).....	71
4.3	Synthese von 1-(2-Fluorphenyl)-4-methoxy-1,2,3,6-tetrahydropyridin 14	77
4.4	α -Hydroxybenzylphosphonat-modifizierte Oligonucleotide.....	78
4.4.1	Festphasen DNA-Synthese.....	79
4.4.2	Synthese modifizierter Oligonucleotide.....	81
4.4.3	Entschützung der modifizierten Oligonucleotide.....	88
4.4.4	Bestimmung thermodynamischer Daten.....	90
4.4.5	Bestimmung der Nucleasestabilitäten.....	94
5	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	97
5.1	Zusammenfassung.....	97
5.2	Summary.....	101
5.3	Ausblick.....	103
6	EXPERIMENTELLER TEIL.....	105
6.1	Allgemeines.....	105
6.1.1	Chromatographie.....	105
6.1.1.1	Dünnschichtchromatographie.....	105
6.1.1.2	Zirkulare, zentrifugale Dünnschichtchromatographie (CCTLC).....	105
6.1.1.3	Präparative Säulenchromatographie.....	105
6.1.1.4	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).....	106
6.1.2	Kernresonanzspektroskopie (NMR).....	106
6.1.3	Ultraviolett-spektroskopie (UV).....	107
6.1.4	Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (FT-IR).....	107
6.1.5	Massenspektrometrie (MS).....	107
6.1.6	Geräte.....	108
6.2	Nomenklatur.....	108
6.3	Synthese von 1-(2-Fluorphenyl)-4-methoxy-1,2,5,6-tetrahydropyridin 14	109
6.3.1	Synthese von 1,5-Dichlorpentan-3-on 87	109
6.3.2	Synthese von 1,5-Dichlorpentan-3-ol 88	110
6.3.3	Synthese von 1-(2-Fluorphenyl)-piperidin-4-ol 90	110

6.3.4	Synthese von 1-(2-Fluorphenyl)-piperidin-4-on 91	111
6.3.5	Synthese von von 1-(2-Fluorphenyl)-4,4-dimethoxypiperidin 92	112
6.3.6	Synthese von 1-(2-Fluorphenyl)-4-methoxy-1,2,5,6-tetrahydropyridin 14	113
6.4	Adenosyl-Thymidyl-Phosphonatdinucleotid 1-4	115
6.4.1	Synthese von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-thymidin 20	115
6.4.2	Synthese von 3'-O-Levulinylthymidin 16	116
6.4.3	Synthese von N ⁶ -Benzoyl-2'-desoxyadenosin 24b	117
6.4.4	Darstellung von N ⁶ -Benzoyl-5'-O- <i>tert</i> -butyldiphenylsilyl-2'- desoxyadenosin 25	119
6.4.5	Synthese von N ⁶ -Benzoyl-5'-O- <i>tert</i> -butyldiphenylsilyl-2'-desoxyadenosyl- 3'-triethylammonium-H-phosphonat 15	120
6.4.6	Synthese von N ⁶ -Benzoyl-5'-O- <i>tert</i> -butyldiphenylsilyl-2'-desoxyadenos- 3'-yl-phosphonsäurephenylester 17	122
6.4.7	Synthese von (N ⁶ -Benzoyl-5'-O-(<i>tert</i> -butyldiphenylsilyl)-2'- desoxyadenos-3'-yl)-(3'-O-levulinylthymid-5'-yl)-H-phosphonatediester 12 ...	124
6.4.8	Synthese von [Hydroxy-(2-nitrophenyl)-methyl]-phosphonsäure- [(N ⁶ -benzoyl-5'-O- <i>tert</i> -butyldiphenylsilyl-2'-desoxyadenos-3'-yl)-(3'-O- levulinylthymid-5'-yl)]-diester 27	127
6.4.9	Synthese von {[1-(2-Fluorphenyl)-4-methoxypiperidin-4-yloxy]-(2- nitrophenyl)-methyl}-phosphonsäure-[(N ⁶ -benzoyl-5'-O-(<i>tert</i> - butyldiphenylsilyl)-2'-desoxyadenos-3'-yl)-(3'-O-levulinylthymid-5'-yl)]- diester 28	130
6.4.10	Synthese von {[1-(2-Fluorphenyl)-4-methoxypiperidin-4-yloxy]-(2- nitrophenyl)-methyl}-phosphonsäure-[(N ⁶ -benzoyl-2'-desoxyadenos-3'- yl)-(3'-O-levulinylthymid-5'-yl)]-diester 30	134
6.4.11	Synthese von {[1-(2-Fluorphenyl)-4-methoxypiperidin-4-yloxy]-(2- nitrophenyl)-methyl}-phosphonsäure-[(N ⁶ -benzoyl-5'-O-(4,4'- dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyadenos-3'-yl)-(3'-O- levulinylthymid-5'-yl)]-diester 1	137

6.4.12	Synthese von {[1-(2-Fluorphenyl)-4-methoxypiperidin-4-yloxy]-(2-nitrophenyl)-methyl}-phosphonsäure-[(N ⁶ -benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyadenos-3'-yl)-(thymid-5'-yl)]-diester 2	140
6.4.13	Synthese von {[1-(2-fluorphenyl)-4-methoxypiperidin-4-yloxy]-(2-nitrophenyl)-methyl}-phosphonsäure-[(N ⁶ -Benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyadenos-3'-yl)-(3'-O-(2-cyanoethylphosphor-(di- <i>iso</i> -propyl)-amidit)-thymid-5'-yl)]-diester 3	144
6.4.14	Synthese von {[1-(2-Fluorphenyl)-4-methoxypiperidin-4-yloxy]-(2-nitrophenyl)-methyl}-phosphonsäure-[(N ⁶ -benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyadenos-3'-yl)-((3'-O-succinamidopropyl-CPG)-thymid-5'-yl)]-diester 4	146
6.5	α -Hydroxybenzylphosphonat-Precursor	147
6.5.1	Synthese von [Hydroxy-(2-nitrophenyl)-methyl]-phosphonsäure-diphenylester 6a	147
6.5.2	Synthese von [(2-Nitrophenyl)-(tetrahydropyran-2-yloxy)-methyl]-phosphonsäurediphenylester 8a	148
6.5.3	Synthese von [(2-Nitrophenyl)-(tetrahydropyran-2-yloxy)-methyl]-phosphonsäuredimethylester 8e	150
6.5.4	Synthese von [(2-Nitrophenyl)-(tetrahydropyran-2-yloxy)-methyl]-phosphonsäure- <i>iso</i> -propylphenylester 38b	151
6.5.5	Synthese von {[1-(2-Fluorphenyl)-4-methoxypiperidin-4-yloxy]-(2-nitrophenyl)-methyl}-phosphonsäurediphenylester 7a	153
6.5.6	Synthese von (Hydroxy-2-nitrophenyl-methyl)-phosphonsäure-diethylester 6b	154
6.5.7	Synthese von (Methoxy-2-nitrophenyl-methyl)-phosphonsäure-diethylester 57	155
6.5.8	Synthese von (2-Nitrophenyl-(tetrahydropyran-2-yloxy)-methyl)-phosphonsäurediethylester 8b	157
6.5.9	Synthese von {[1-(2-Fluorphenyl)-4-methoxypiperidin-4-yloxy]-(2-nitrophenyl)-methyl}-phosphonsäurediethylester 7b	158
6.5.10	Synthese von Hydroxy-2-nitrophenylmethyl-phosphonsäure 6c	160

6.5.11	Synthese von {[1-(2-Fluorphenyl)-4-methoxypiperidin-4-yloxy]-(2-nitrophenyl)-methyl}-bis-(triethylammonium)-phosphonat 7c	161
6.5.12	Synthese von (<i>tert</i> -Butyldiphenylsilyloxy-2-nitrophenylmethyl)-phosphonsäure- <i>iso</i> -propylester-chloridat 53	162
6.5.13	Synthese von (<i>tert</i> -Butyldiphenylsilyloxy-2-nitrophenylmethyl)-phosphonsäuremethyl- <i>iso</i> -propylester 54	163
6.5.14	Synthese von (<i>tert</i> -Butyldiphenylsilyloxy-2-nitrophenylmethyl)-phosphonsäure-(5'- <i>O</i> -(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-thymid-3'-yl)-(3'- <i>O</i> -levulinylthymid-5'-yl)-ester 32b	165
6.6	Synthese modifizierter [Hydroxy-(2-nitrobenzyl)-methyl]-nucleosylphosphonamidit-Bausteine.....	165
6.6.1	Synthese von Methyl-(2-nitrobenzyl)-ether 61d	165
6.6.2	Synthese von 2-(2-Nitrobenzyloxy)-tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran 61c	166
6.6.3	Synthese von 4-(2-Nitrobenzyloxy)-1-(2-fluorphenyl)-4-methoxypiperidin 61b	167
6.6.4	Versuch der Synthese von 1-(1-Methoxyethyl)-2-nitrobenzol 67	168
6.6.5	Synthese von [Hydroxy-(2-nitrophenyl)-methyl]-phosphonigsäure 60a	169
6.6.6	Synthese von [(<i>tert</i> -Butyldiphenylsilyloxy)-(2-nitrophenyl)-methyl]-triethylammonium-phosphinat 60c	170
6.6.7	Synthese von [(<i>tert</i> -Butyldiphenylsilyloxy)-(2-nitrophenyl)-methyl]-phosphonigsäuremethylester 76a	171
6.6.8	Synthese von [(<i>tert</i> -Butyldiphenylsilyloxy)-(2-nitrophenyl)-methyl]-phosphonigsäure- <i>iso</i> -propylester 76b	172
6.6.9	Synthese von [(<i>tert</i> -Butyldiphenylsilyloxy)-(2-nitrophenyl)-methyl]-phosphonigsäure-[5'- <i>O</i> -(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-thymidin-3'-yl]-ester 51b	174
6.6.10	Synthese von [(<i>tert</i> -Butyldiphenylsilyloxy)-(2-nitrophenyl)-methyl]- <i>iso</i> -propyloxy-di- <i>iso</i> -propyl-phosphonamidit 85b	175
6.6.11	Versuch der Synthese von [(<i>tert</i> -Butyldiphenylsilyloxy)-(2-nitrophenyl)-methyl]-[5'- <i>O</i> -(4,4'-dimethoxytriphenylmethylthymid-3'-yl)-di- <i>iso</i> -propylphosphonamidit 5c	177

6.6.12	Synthese von [(2-Nitrophenyl)-(tetrahydropyran-2-yloxy)-methyl]-triethylammonium-phosphinat 60d	178
6.6.13	Synthese von {[1-(2-Fluorphenyl)-4-methoxypiperidin-4-yloxy]-(2-nitrophenyl)-methyl}-triethylammonium-phosphinat 60b	179
6.6.14	Synthese von {[1-(2-Fluorphenyl)-4-methoxypiperidin-4-yloxy]-(2-nitrophenyl)-methyl}-phosphonigsäure-[5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-thymidin-3'-yl]-ester 51a	181
6.6.15	Synthese von [(2-nitrophenyl)-(triphenylmethoxy)-methyl]-triethylammonium-phosphinat 60e	182
6.7	Synthese der Oligonucleotide	183
6.7.1	Verwendete Reagenzien	183
6.7.2	Bestimmung der Trägerbeladung.....	184
6.7.3	Festphasensynthese von Oligonucleotiden.....	184
6.7.3.1	Trityl Assay	185
6.7.3.2	Abspaltung vom Träger, Entschützung und Probenvorbereitung	185
6.7.3.3	Quantifizierung	186
6.7.3.4	Analytische HPLC	187
6.7.3.5	Reinigung der Oligonucleotide mittels HPLC.....	187
6.7.3.6	Abspaltung der Fpmp-Schutzgruppe.....	187
6.7.3.7	T _m -Wert Bestimmung	187
6.7.3.8	Bestimmung der Nucleasestabilität	188
7	LITERATUR	189
8	GEFAHRSTOFFVERZEICHNIS	205
9	ANHANG	208
10	VERBINDUNGSLISTE	214

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1	A: Watson-Crick und Hoogsteen Basenpaarungen; B: DNA-Doppelhelixstruktur	2
Abbildung 2	Angriffsmöglichkeiten von Wirkstoffen in die Genexpression	4
Abbildung 3	Proteinbiosynthese	7
Abbildung 4	Proteinbiosynthese und Antisense	8
Abbildung 5	Modifikationen von Oligonucleotiden	10
Abbildung 6	Pro-Oligonucleotidkonzept.....	14
Abbildung 7	Pro-Oligonucleotide von IMBACH et al.	15
Abbildung 8	Pro-Oligonucleotid Konzept von IYER et al.	16
Abbildung 9	Abbau der α -Hydroxybenzylphosphonat-5',5'-dinucleotide	16
Abbildung 10	Abbaumechanismen der 5',5'-Dinucleosyl- α -hydroxybenzylphosphonate	18
Abbildung 11	Zielsequenzen und dimere Synthesebausteine.....	19
Abbildung 12	A: Monomerer α -Hydroxybenzylphosphonamidit Baustein 5 B: Dimerer α -Hydroxy-2-nitrobenzylphosphonat Precursor 6-9 und α -Hydroxy-2-nitrobenzylphosphinat Precursor 10,11	20
Abbildung 13	„Quasimonomerer“ α -Hydroxybenzylphosphonat-Baustein 3,4 für den Einsatz in der automatisierten DNA-Festphasensynthese	22
Abbildung 14	Synthesepfung des dimeren α -Hydroxybenzylphosphonat- Bausteines 1-4 (Variante A).....	24
Abbildung 15	Synthese von 3'-O-Lev-dT 16	25
Abbildung 16	Darstellung von 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid 10	26
Abbildung 17	Versuch der Synthese von (5'-O-TBDPS-dA ^{Bz})- Triethylammoniumphosphonat 15	26
Abbildung 18	¹ H-NMR eines Reaktionsgemisches von 15 und 26	27
Abbildung 19	Synthese von (5'-O-TBDPS-dA ^{Bz})- Triethylammoniumphosphonat 15	28
Abbildung 20	Synthese von (5'-O-TBDPS-dA ^{Bz})-(3'-O-Lev-dT)-H- phosphonatdiester 12	28

Abbildung 21	Alkylierung von Aminen, Phosphonaten und Alkoholen durch H-Phosphonate.....	29
Abbildung 22	³¹ P-NMR der H-Phosphonatdinucleotide A) Entkoppelt B) Gekoppelt.....	30
Abbildung 23	Synthese von (NO ₂ BnFpmpO)-Phosphonsäure-(5'-O-TBDPS-dA ^{Bz})-(3'-O-Lev-dT)-diester 28R_P,S_P	32
Abbildung 24	Phosphonat-Phosphat Umlagerung.....	33
Abbildung 25	Versuch der sauerkatalysierten PUDOVIC-Addition an 5'-O-TBDPS-dA ^{Bz} -3'-O-Lev-dT-H-Phosphonatediester 12	34
Abbildung 26	Synthese von (NO ₂ BnFpmpO)-Phosphonsäure-(5'-O-DMTr-dA ^{Bz})-(3'-O-Lev-dT)-ester 1R_P,S_P	35
Abbildung 27	Synthese von (NO ₂ BnFpmpO)-phosphonsäure-(5'-O-DMTr-dA ^{Bz})-(3'-OH-dT)-diester 2R_P,S_P	36
Abbildung 28:	Synthese der Succinyl-AP-CPG 4R_P,S_P und Phosphoramidit Bausteine 3R_P,S_P	37
Abbildung 29	Syntheseplanung des dimeren α-Hydroxybenzylphosphonat-Bausteines 32 (Variante B)	38
Abbildung 30	Syntheseplan: α-Hydroxybenzylphosphonatdinucleotidsynthese über den Diphenylphosphonatprecursor 32	39
Abbildung 31	Synthese von (NO ₂ BnOH)-Phosphonsäurediphenylester 6a	40
Abbildung 32	Phosphonat-Phosphat-Umlagerung von (NO ₂ BnOH)-phosphonsäure-diphenylester 47	40
Abbildung 33	Synthese von NO ₂ BnFpmpO-phosphonsäurediphenylester 7a und NO ₂ BnFpmpO-phosphonsäurediphenylester 8a	41
Abbildung 34	³¹ P-NMR Spektren der Synthese von NO ₂ BnTHPO-phosphonsäurediphenylester 8a	41
Abbildung 35	Versuche zur Darstellung von (NO ₂ BnTHPO)-phosphonsäure-(5'-O-DMTr-dT)-phenylester 36	42
Abbildung 36	Versuche zur Umesterung der Diphenylphosphonate 7a und 8a	43
Abbildung 37	Umesterung von Diphenylphosphonaten nach KAFARSKI et al.	43

Abbildung 38	Umesterung von NO ₂ BnTHPO-phosphonsäurediphenylester 48 mit Methanol, bzw. <i>iso</i> -Propanol in Gegenwart von KF/[18]-Krone-6.....	44
Abbildung 39	Versuch der Darstellung von NO ₂ BnTHPO-(5'-O-DMTr-dT)-phenyl-phosphonsäureester 36	44
Abbildung 40	A) SHUM et al. B) Syntheseplan: Synthese über Diethylphosphonatprecursor.....	45
Abbildung 41	Synthese von (NO ₂ BnOH)-phosphonsäurediethylester 6b , (NO ₂ BnFpmpO)-phosphonsäurediethylester 7b und (NO ₂ BnTHPO)-phosphonsäurediethylester 8b	46
Abbildung 42	Säure- und basenkatalysierte PUDOVIC-Addition.....	46
Abbildung 43:	Mechanismus der säure-und basenkatalysieren PUDOVIC-Reaktion.....	47
Abbildung 44	Synthese von (NO ₂ BnFpmpO)-phosphonsäuredimethylester 7e	48
Abbildung 45	A) LIN et al. B) Syntheseplan: Synthese über Phosphonsäureprecursor.....	48
Abbildung 46	Synthese der (NO ₂ BnOSG)-Bis-(triethylammonium)-phosphonate 7c und 8c . Versuch der Synthese von (NO ₂ BnOSG)-phosphonsäuredimethylester 7e und 8e	49
Abbildung 47	Mechanismen der PivCl aktivierten Veresterung A) Modifizierte Phosphonsäure, Addition-Eliminierung. B) Phosphonsäure, S _N P.....	50
Abbildung 48	Syntheseplanung des α -Hydroxybenzylphosphonat-modifizierten Dinucleotides mittels oxidativer Chlorierung nach ATHERTON-TODD.....	51
Abbildung 49	Phosphinat-ATHERTON-TODD Reaktion von <i>iso</i> -Propylphosphinsäureester 52a,b zum Phosphonsäure-methyl- <i>iso</i> -propylester 54a,b	52
Abbildung 50	³¹ P-NMR Studie zur Phosphinat-ATHERTON-TODD Reaktion.....	53
Abbildung 51	Kinetik der Phosphinat-ATHERTON-TODD Reaktion.....	54
Abbildung 52	Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten A) Bildung von 53a,b B) Bildung von 54a,b	55
Abbildung 53	Mechanismus der ATHERTON-TODD Reaktion.....	56

Abbildung 54	Zwischenstufen (A: $R_P S_{\alpha C}$, B: $S_P S_{\alpha C}$) aus der Phosphinat-ATHERTON-TODD Reaktion berechnet mit Hyper Chem 5, AM1.	57
Abbildung 55	Phosphinat-ATHERTON-TODD Reaktion zum (NO ₂ BnTBDPSO)-Phosphonsäure-(5'-O-DMTr-dT)-(3'-O-Lev-dT)-diester 32b	57
Abbildung 56	Umsetzung des Phosphinatprecursors 51b zum Phosphonamidit 5b	58
Abbildung 57	Synthese des (5'-O-TBDPS-dA ^{Bz})-(3'-O-Lev-dT)-H-Phosphonates 12 über (5'-O-TBDPS-dA ^{Bz})-Phosphonsäurephenylester 17	59
Abbildung 58	Versuch der Methylierung der α -Hydroxybenzylphosphonat-Gruppe.....	60
Abbildung 59	Methylierung von Hydroxy-2-nitrophenylmethyl-phosphonsäurediethylester 6b	61
Abbildung 60	³¹ P-NMR Verfolgung der Methylierung von Hydroxy-2-nitrophenylmethyl-phosphonsäurediethylester 6b	61
Abbildung 61	Alkylphosphonamiditsynthese nach ENGELS et al.	62
Abbildung 62	Syntheseplanung des monomeren α -Hydroxybenzyl-nucleosyl-phosphonamidit Bausteines 5a-c (Variante A)	64
Abbildung 63	Syntheseplanung des monomeren α -Hydroxybenzyl-nucleosyl-phosphonamidit Bausteines 5 (Variante B)	65
Abbildung 64:	Synthese von Fmp- und THP-geschütztem 2-Nitrobenzylalkohol 61b,c	66
Abbildung 65	Versuch der Phosphitylierung von geschütztem 2-Nitrobenzylalkohol 61b,c	66
Abbildung 66	Versuch der Methylierung von Methyl-(2-nitrobenzyl)-ether 61d	67
Abbildung 67	Butylierung von Methyl-(2-nitrobenzyl)-ether 61d	67
Abbildung 68	α -Hydroxybenzylphosphonigsäure 70 nach ALBOUY et al.	68
Abbildung 69	Synthese von [Hydroxy-(2-nitrophenyl)-methyl]-phosphonigsäure 60a	68
Abbildung 70	Synthese der acetalgeschützten Phosphinate 60b und 60d	69
Abbildung 71	³¹ P-NMR-Spektren von 60a und 60b	69

Abbildung 72	Versuch der Chlorierung vom geschützten Phosphinat 60b,d	70
Abbildung 73	³¹ P-NMR Spektrum des Versuches der Chlorierung von Phosphonigsäure 60b	70
Abbildung 74	Synthese der DMTr, TBDPS, Fpmp und THP geschützten Phosphinate 60b-e	71
Abbildung 75	DCC-Veresterung der Phosphonigsäure 60d mit 5'-O-DMTr-dT	72
Abbildung 76	Pivalylchlorid aktivierte Kupplung von Phosphinat 60c mit Alkoholen	72
Abbildung 77	Pivalinsäurechlorid aktivierte Veresterung von NO ₂ BnTBDPSO-Phosphinat 60b-e mit 5'-O-DMTr-dT 20	73
Abbildung 78	³¹ P-NMR der Veresterung von 60b zu 51a	73
Abbildung 79	Chlorierungen nach A) HATA et al. B) HAMMER et al.	74
Abbildung 80	Umsetzung von NO ₂ BnTBDPSO-Phosphinsäuremethylester 76a mit Ph ₃ PCl ₂ und DIPA	74
Abbildung 81	³¹ P-NMR Verfolgung der Chlorierung von (NO ₂ BnTBDPSO)-Phosphonigsäure-methylester 76a und Umsetzung mit DIPA zum (NO ₂ BnTBDPSO)- Methylphosphonamidit 85a	75
Abbildung 82	Synthese von (NO ₂ BnTBDPSO)- <i>iso</i> Propyl-di- <i>iso</i> -propylphosphonamidit 85b und ³¹ P-NMR Spektren	76
Abbildung 83	Synthese von (NO ₂ BnTBDPSO)-(5'-O-DMTr-dT)-Di- <i>iso</i> -propylphosphonamidit 5b	76
Abbildung 84	Synthese von 1-(2-Fluorphenyl)-4-methoxy-1,2,3,6- tetrahydropyridin 14	77
Abbildung 85	Synthese von 1-(2-Fluorphenyl)-4-methoxy-1,2,3,6- tetrahydropyridin 14	78
Abbildung 86	Syntheszyklus der automatisierten Festphasensynthese von Oligonucleotiden nach der Phosphoramiditmethode	80
Abbildung 87	Tryl-Assay der Synthese von ODN3	82
Abbildung 88	HPLC-Roh-Chromatogramm α -Hydroxybenzylphosphonat- modifizierter DNA am Beispiel von ODN3 nach Behandlung mit 25 % Ammoniak bei 55 °C für 8 h.	83

Abbildung 89	Hydrolyse von Phosphonatdinucleotid 30 in 25 % Ammoniak	84
Abbildung 90	³¹ P-NMR der Hydrolyse von 30 mit Ammoniak	85
Abbildung 91	HPLC-Roh-Chromatogramm α -Hydroxybenzylphosphonat- modifizierter DNA am Beispiel von ODN3 nach Schutzgruppenabspaltung mit modifizierten Bedingungen und gereinigtes ODN 3	86
Abbildung 92	Trityl-Assay und Roh-HPLC-Chromatogramm von ODN4	87
Abbildung 93	HPLC-Chromatogramm vom gereinigten ODN 4	88
Abbildung 94	Oligonucleotid nach Fpmp-Entschützung A: vor B: nach dem Einengen.....	89
Abbildung 95	VAN'T HOFF Kurvenanalyse am Beispiel vom ODN1/ODN2 - Duplex	91
Abbildung 96	T _m -Werte der gemessenen Oligonucleotide gegen DNA xx und gegen RNA (bl als gemessener T _m -Wert (Balken) und als Differenz zum Referenzstrang (DNA ▲RNA■).....	92
Abbildung 97	Bestimmung des T _m -Wertes nach der Ableitungsmethode am Beispiel vom ODN1/ODN2 -Duplex (Vgl. Abbildung 95).....	93
Abbildung 98	T _m -Werte der gemessenen anti Influenza ODNs gegen DNA als gemessener T _m -Wert (Balken) und als Differenz zum Referenzstrang.	94
Abbildung 99	Messung der Nucleasestabilitäten gegen EN I.....	95
Abbildung 100	Synthese der α -Hydroxybenzylphosphonatdinucleotide 3 und 4	98
Abbildung 101	Syntheseversuche über Phosphonatprecursor.....	100
Abbildung 102	Universeller Phosphinatprecursor zur Synthese von monomeren α -Hydroxybenzylphosphonamiditen und dimeren α -Hydroxybenzylphosphonaten	101
Abbildung 103	Chirale Oxazaphosphlidine zur stereoselektiven Synthese von Dinucleotiden nach JUST et al.....	104
Abbildung 104	Nummerierung der Verbindungen.....	109

ABKÜRZUNGEN

Als Abkürzungen in der Nomenklatur der Verbindungen werden als Teilnamen verwendet:

5'-O-TBDPS-dA ^{Bz}	N ⁶ -Benzoyl-5'-O- <i>tert</i> -butyldiphenylsilyl-2'-desoxyadenos-3'-yl
5'-O-DMTr-dA ^{Bz}	N ⁶ -Benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyadenos-3'-yl
5'-OH-A ^{Bz}	N ⁶ -Benzoyl-2'-desoxyadenos-3'-yl
3'-O-Lev-dT	3'-O-Levulinyl-thymid-5'-yl
3'-OH-dT	Thymid-5'-yl
5'-O-DMTr-dT	5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-thymidin-3'-yl
NO ₂ BnOH	Hydroxy-2-nitrophenyl-methyl
NO ₂ BnTBDPSO	2-Nitrophenyl- <i>tert</i> -butyldiphenylsilyloxy-methyl
NO ₂ BnFpmpO	[1-(2-Fluorphenyl)-4-methoxypiperidin-4-yloxy]-(2-nitrophenyl)-methyl
NO ₂ BnTHPO	2-Nitrophenyl-(tetrahydropyran-2-yloxy)-methyl
NO ₂ BnMeO	2-Nitrophenyl-methoxy-methyl

Abkürzungen

δ	Chemische Verschiebung [ppm]
A	Adenin
ACN	Acetonitril
AIDS	Acquired Immuno Deficiency Syndrome
AP	3-Aminopropyl
Ar.	aromatisch
AZT	3'-Azido-2',3'-dideoxythymidin
B	Nucleobase (Thymin, Adenin, Cytosin oder Guanin)
Bn	Benzyl
BSA	Benzolsulfonsäure
Bt	Benzotriazol
Bu	Butyl
BuLi	Butyllithium

Bz	Benzoyl
CMV	Cytomegalie Virus
d	Dublett
d4T	2',3'-Didesoxy-2',3'-didehydrothymidin
dA	2'-Desoxyadenosin
dA ^{Bz}	N ⁶ -Benzoyl-2'-desoxyadenosin
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	N,N-Dicyclohexylcarbodiimid
DCI	Dicyanoimidazol
ddT	2',3'-Didesoxythymidin
ddU	2',3'-Didesoxyuridin
DHP	3,4-Dihydro-2H-pyran
DIPA	Diisopropylamin
DIPEA	Diisopropylethylamin(<i>Hünigs</i> Base)
DMAP	4-N,N-Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMTr	4,4'-Dimethoxythriphenylmethyl
DMTrCl	4,4'-Dimethoxythriphenylmethylchlorid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dT	Thymidin
ϵ	molarer Extinktionskoeffizient [$\text{cm}^2/\mu\text{mol}$]
EC	Enzyme Commission
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EE	Essigsäureethylester
EN	Exonuclease
ESI-MS	Elektronenspray Massenspektrometrie
Et	Ethyl
FAB-MS	Fast Atom Bombardment Massenspektrometrie
Fpmp	1-(2-Fluorphenyl)-4-methoxypiperidin-4-yl
Fpmp-Enol	1-(2-Fluorphenyl)-4-methoxy-1,2,5,6-tetrahydropyridin

h	Stunde(n)
HIV	Human Immuno Deficiency Virus
HMDS	1,1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazan
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IGC ₅₀	50% Inhibitory Growth Goncentration
Im	Imidazol
<i>i</i> Pr	<i>iso</i> Propyl
IR	Infrarotspektroskopie
<i>J</i>	skalare Kern-Kern Kopplungskonstante [Hz]
kat.	katalytisch
λ	Wellenlänge [nm]
LDA	Lithiumdi <i>iso</i> propylamid
Lev	Levulinyl
LevOH	Levulinsäure
LNA	Locked Nucleic Acid
Lsm.	Lösungsmittel
<i>m</i>	metha
m	Multiplett
Me	Methyl
MeOH	Methanol
MHz	Megahertz
Min.	Minute(n)
Mio	Millionen
MOE	2-Methoxyethyl
mRNA	messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
<i>n</i> BuLi	<i>n</i> Butyllithium
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NO ₂ Bn	2-Nitrobenzyl
Nuc	Nucleosid
<i>o</i>	ortho
OD ₂₆₀	Optische Dichte bei $\lambda = 260$ nm

ODN	Oligodesoxyribonucleinsäure
<i>p</i>	para
PE	Petrolether (60-70)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration
Ph	Phenyl
Piv	Pivaloyl
PNA	Peptide Nucleic Acid
POM	Pivaloyloxymethyl
PP	Phosphatpuffer
prim.	primär
q	Quartett
quin.	Quintett
R	Rest, Substituent
R _f	Retentionsfaktor
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
rRNA	ribosomale RNA
Rt.	Raumtemperatur
SATE	<i>S</i> -Acylthioethyl
SATM	<i>S</i> -Acylthiomethyl
sek.	sekundär
SG	Schutzgruppe
snRNA	small nuclear RNA
T	Temperatur
T	Thymin
t	Triplett
TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TBDPS	<i>tert</i> -Butyldiphenylsilyl
TBDPSCI	<i>tert</i> -Butyldiphenylsilylchlorid
<i>t</i> -Bu	<i>tert</i> -Butyl
TBTU	O-(1H-Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethylharnstoff-tetrafluorborat
TCA	Trichloressigsäure

tert.	tertiär
TEAA	Triethylammonium
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
THP	Tetrahydropyran-4-yl
T _m -Wert	Schmelzpunkt eines Oligonucleotidduplexes
TMS	Trimethylsilyl
TMSCl	Trimethylsilylchlorid
tRNA	transfer RNA
TsOH	Toluol-4-sulfonsäure
UV	Ultraviolett
X	Halogen, Heteroatom
Y	Heteroatom

1 EINLEITUNG

Bei zahlreichen Erkrankungen, wie viralen und bakteriellen Infektionen, Krebs oder Entzündungen spielen fehlerhafte, bzw. körperfremde Proteine eine entscheidende Rolle. So benutzen Viren die Zelle als Wirt, um ihre eigene genetische Information einzubauen und sich zu vermehren. Hierfür produziert die infizierte Zelle Virusproteine, welche in einer gesunden Zelle nicht gebildet werden. Diese Proteine sind für die Vermehrung des Virus essentiell. Gelingt es, die Bildung dieser spezifischen Virusproteine zu unterbinden, so wird auch die Vermehrung des Virus verhindert.

Für die Entstehung und das Wachstum von Tumoren sind oftmals Proteine verantwortlich, die dafür sorgen, dass sich Zellen ungehindert vermehren können (Onkogene). In gesundem Gewebe liegen diese Proteine in ihrer natürlichen Form als Proto-Onkogene vor. Ihre Aufgabe ist es, das Zellwachstum zu regulieren. Durch Mutation oder Überexpression werden die Proto-Onkogene zu Onkogenen und können ihre normale Funktion nicht mehr erfüllen. Gelingt es die Bildung der Onkogene zu verhindern, so kann die Bildung und Vermehrung von Tumoren unterbunden werden.

1,2,3,4

Auch Bakterien benötigen spezifische Proteine, ohne die sie sich nicht vermehren können. Bei entzündlichen Prozessen und einer Vielzahl weiterer Erkrankungen ist ebenfalls die Bildung von Proteinen verantwortlich welche spezifisch für die jeweiligen Erkrankungen sind.⁵

Durch intensive Forschungsarbeit in den letzten 70 Jahren ist man den molekularen Grundlagen solcher Krankheiten auf die Spur gekommen und versteht es dadurch immer besser, diese zu therapieren. Seit 1940 OSWALD T. AVERY an Bakterien belegt hatte, dass ein bestimmter, zu der Zeit noch unbekannter Zellbestandteil (und nicht wie lange gedacht die Proteine) für die Übertragung der Erbinformation verantwortlich ist,^{6,7,8} wurden viele Versuche unternommen die Vorgänge der Vererbung, der Bildung von Proteinen und der Zellteilung zu verstehen. Erst JAMES B. WATSON und FRANCIS H.C. CRICK haben 1953 die dreidimensionale Struktur der doppelhelikalen Desoxyribonucleinsäure (DNA) entdeckt und daraus unmittelbar den Mechanismus ihrer

Replikation abgeleitet.⁹ Seitdem verstehen wir immer mehr über die Funktionsweise des Lebens.

Die DNA besteht aus drei Grundbausteinen: Desoxyribosezuckereinheiten, welche durch Phosphatbrücken miteinander zum DNA-Rückgrat verknüpft sind und den vier Nucleobasen Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin, welche in ihrer Abfolge den genetischen Code darstellen. Über Wasserstoffbrückenbindungen können jeweils Adenin (A) und Thymin (T), bzw. Guanin (G) und Cytosin (C) durch Watson-Crick-Basenpaarung miteinander in Wechselwirkung treten und dadurch einen in der Basenabfolge komplementären Duplexstrang bilden. Diese zwei gegenläufigen Polynucleotidstränge sind helikal um eine gemeinsame Achse gewunden (Abbildung 1).

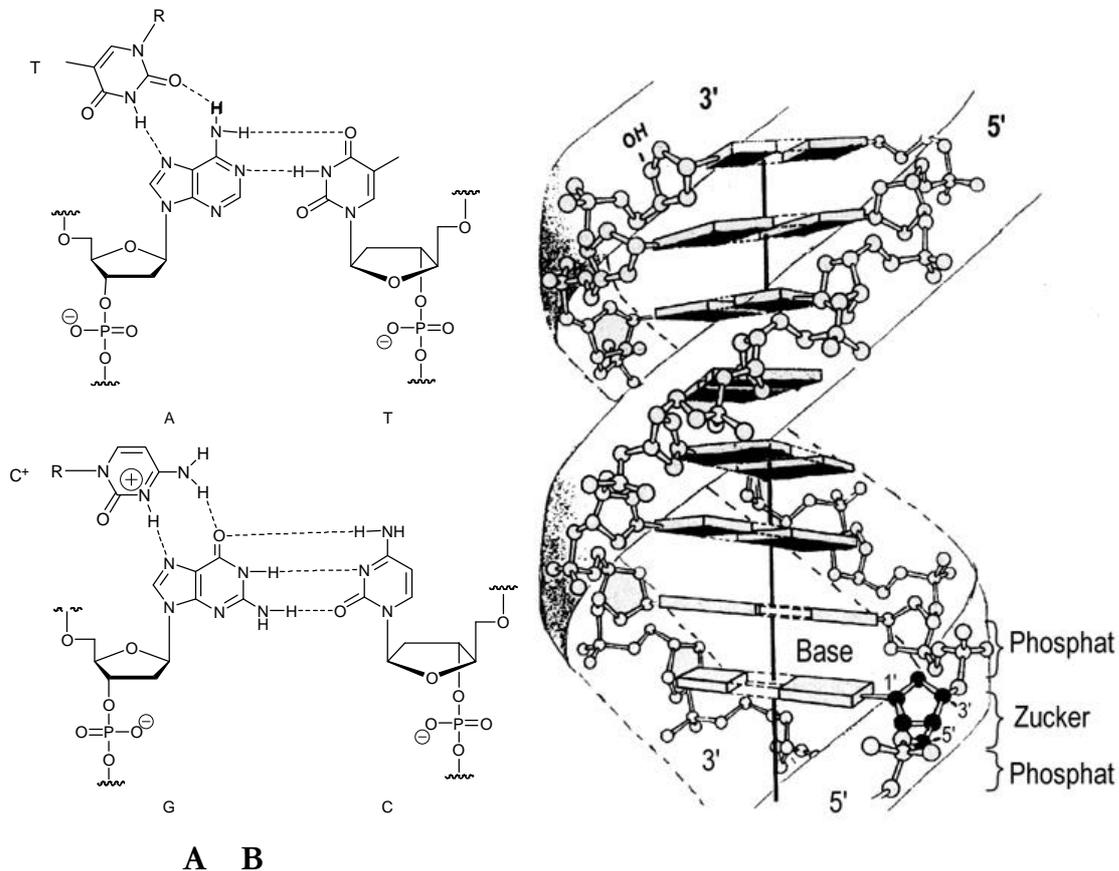


Abbildung 1 **A:** Watson-Crick und Hoogsteen Basenpaarungen; **B:** DNA-Doppelhelixstruktur

Für die Proteinbiosynthese wird diese Doppelhelix aufgewunden und es entstehen zwei einzelsträngige Bereiche der DNA. Komplementär zu einem dieser DNA-Stränge wird

der Teil des gerade aktiven Gens, welcher das zu bildende Protein codiert, durch Enzyme in eine messenger-RNA (mRNA) übersetzt (Transkription). Diese stellt eine Arbeitskopie eines Teils der Information des DNA-Stranges dar und dient als Matritze für die Bildung von Proteinen. Die mRNA wird nun in Abschnitten von drei Nucleobasen, dem Codon, von der tRNA (transfer RNA) abgelesen und am ribosomalen Komplex ein bestimmtes Protein gebildet. Ein solches zweistufiges System auf Transkription und Translation beruhend hat den Vorteil, dass pro Zelleinheit nur kleine Segmente der DNA genutzt werden müssen. Außerdem werden von einem gerade aktiven Gen ca. 1000 Moleküle mRNA produziert und von diesen jeweils wiederum 1000 Moleküle des Proteins. Ein Gen (DNA-Abschnitt) dient also als Vorlage für die Synthese von Millionen Proteinmolekülen. In diesem Abschnitt der Proteinbiosynthese einzugreifen, um die Bildung von Krankheiten erzeugenden Proteinen zu verhindern scheint also ein lohnenswerter Ansatz zu sein.

Konventionelle Wirkstoffe wechselwirken direkt mit den fertigen Proteinen und inhibieren deren Wirkung. Dadurch kann es zu zahlreichen unspezifischen Nebenwirkungen kommen. Auch werden bei dieser Art von Wirkstoffen relativ hohe Konzentrationen benötigt, was ungewollte Neben- und Wechselwirkungen fördert. Triplexbildende Oligonucleotide, die über Hoogsteen-Basenpaarungen (Abbildung 1A) in der großen Furche an den DNA-Doppelstrang binden, können das Aufwinden der DNA und Ablesen durch Polymerasen verhindern und so die Transkription inhibieren (Abbildung 2).^{10,11,12}

Auf der Ebene der Proteintranslation wirkende und so die Proteinsynthese inhibierende synthetische Oligonucleotide (Antisense-Oligonucleotide) wurden bereits 1978 von ZAMECNIK und STEPHENSON als eine neue Klasse potentieller Therapeutika vorgeschlagen und untersucht.^{13,14} Der Vorteil dieses Konzeptes liegt in erster Linie in der Unterdrückung der Bildung eines bestimmten Proteins bereits auf der Ebene der RNA (Translationsinhibierung) und dem damit verbundenen rationalen Design eines Wirkstoffes (Kapitel 2.1).

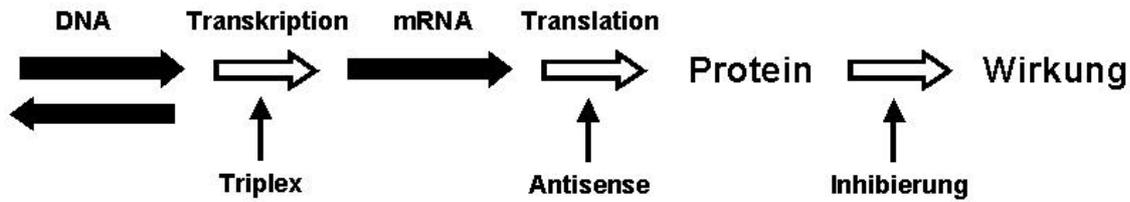


Abbildung 2 Angriffsmöglichkeiten von Wirkstoffen in die Genexpression

Zur Zeit sind vielfältige therapeutische Anwendungen der Antisense-Technik, wie z.B. auf den Gebieten der Onkologie, Hematopathologie, cardiovasculärer Erkrankungen und viraler Infektionen in klinischer Erprobung (Tabelle 1).^{15,16} Der seit 1998 auf dem amerikanischen Markt erhältliche und seit 1999 in Europa zugelassene Wirkstoff Formivirsen (VITRAVENE®, ISIS Pharmaceuticals) zur Inhibierung des Cytomegalie Virus (CMV) zeigt, dass mit der Antisense-Technologie einige grundlegende Fortschritte erzielt werden können.¹⁷ VITRAVENE®, ein aus 21 Nucleotiden bestehendes Phosphorthioat-modifiziertes Oligonucleotid, weist eine hohe Wirksamkeit und Spezifität gegen das Cytomegalie Virus (CMV) auf und wirkt auch bei multiresistenten CMV-Stämmen. Zur Behandlung der CMV Retinitis muss das Medikament allerdings in den Glaskörper des Auges injiziert werden.¹⁸ Neue Methoden, um diese unangenehme Prozedur zu umgehen, sind Gegenstand der aktuellen Forschung.

Weitere Phosphorthioat-Oligonucleotide haben derzeit klinische Studien in der Phase III erreicht. So führte AFFINITAC™ (ISIS 3521), zur Behandlung von Lungenkrebs, zu einem 200 Mio US\$ Vertrag zwischen Eli Lilly und ISIS Pharmaceuticals,¹⁹ nachdem die Phase III Studie von ALICAFORSEN™ (ISIS 2302) gegen Morbus Crohn wegen fehlender Aktivität abgebrochen werden musste.²⁰ Genta entwickelte GENASENSE™ (Oblimerson),²¹ welches in verschiedenen Phasen und Anwendungen getestet wird und bereits zur Zulassung eingereicht wurde. Die meisten der Antisense-Oligonucleotide werden intravenös oder subkutan injiziert. EpiGenesis Pharmaceuticals entwickelte den ersten respirierbaren Antisense-Wirkstoff (EPI 2010) zur Behandlung von Asthma.²² Nicht nur Phosphorthioat-Oligonucleotide der ersten Generation sind in klinischen Untersuchungen anzutreffen, auch Oligonucleotide der zweiten (z.B. 2'-O-Me-RNA) und inzwischen auch dritten Generation (z.B. Oligonucleotide mit einem Morpholin-Rückgrat anstelle des Ribosephosphat-Rückgrates) werden getestet (Siehe Kapitel 2.2). So gibt es

bereits fortgeschrittene klinische Untersuchungen an Morpholin-modifizierten Oligonucleotiden von Avi BioPharma.²³

Stadium	Indikation	Target	Bezeichnung	Firma
Zugelassen	CMV-Retinitis	CMV-Protein	Vitravene® (Formivirsen) ^{24,25}	ISIS, Novartis
Phase III	Morbus Crohn,	ICAM-1	ISIS 2302, Alicaforsen	ISIS
	Chronische lymphotische Leukämie	<i>bcl-2</i>	Genasense™ (Oblimerson), G3139	Genta
	Lungenkrebs	PKC- α	ISIS 3521, Affinitac™,	ISIS, Lilly
Phase II	Ulcerative Colitis	ICAM-1	ISIS 2302, Alicaforsen	ISIS
	Hepatitis-C		ISIS 14803	ISIS
	Pankreaskrebs	<i>H-ras</i>	ISIS 2503	ISIS
	Darmkrebs, Tumore	<i>bcl-2</i>	Genasense™ Oblimerson, G3139	Genta
	Metastatic Renal Cell Carcinoma	R2-RNR	GTI-2040	Lorus Therapeutics
	Asthma	Adenosin A ₁ Rezeptor	EPI 2010	EpiGenesis
	Rheumatische Arthritis	TNF- α	ISIS 104838	ISIS
	Onkologie	DNA-Methyltransferase	MG 98	MethylGene
Phase I	Krebs	Clusterin	ISIS 112989	ISIS, OncogeneX
	AIDS	HIV-1	GEM 92	Hybridon

Tabelle 1 Klinische Studien mit Antisense-Oligonucleotiden^{15,16,26}

2 KENNTNISSTAND

Das Potential von Oligonucleotiden, in einem Antisense-Mechanismus zur Inhibierung der viralen Replikation zu agieren, wurde 1978 von ZAMECNIK und STEPHENSON an dem Rous Sarcoma Virus gezeigt.^{13,14} Bereits 1967 wurden erste synthetische Oligonucleotide komplementär zu definierten Gensequenzen von BELIKOVA et al. synthetisiert,²⁷ aber erst 10 Jahre später konnte durch PATERSON et al. an einem zellfreien Proteintranslationssystem die Inhibierung der mRNA-Translation durch ein synthetisches Oligonucleotid gezeigt werden.²⁸ Obwohl elegant und einfach in der Theorie, bietet das Antisense-Konzept zahlreiche praktische Herausforderungen.

2.1 Antisense

In der Proteinbiosynthese (Abbildung 3) wird zunächst der Abschnitt der DNA, welcher für ein bestimmtes Protein codiert zum Primärtranskript (*pre*-mRNA) umgeschrieben (Transkription). Durch Spleißen werden nicht-codierende Abschnitte (Introns) herausgeschnitten und die fertig prozessierte mRNA wandert ins Cytoplasma (Translokation). Die mRNA bindet an Ribosome (ribosomaler Komplex) und die benötigten Aminosäuren werden mittels tRNA auf das entstehende Protein übertragen (Translation). Die mRNA dient als Vorlage für viele Proteine und die Inhibierung des Translationsschrittes ist somit ein effizienter Ansatzpunkt, um proteinogene Krankheiten zu behandeln. Angriffspunkte von Antisense-Oligonucleotiden (kurze DNA-Sequenzen, komplementär zu einem RNA-Abschnitt) können sowohl die *pre*-mRNA im Zellkern, als auch die prozessierte mRNA im Cytoplasma sein. Hierbei bilden die Basen des Oligonucleotids mit der RNA Watson-Crick Basenpaarungen aus, und es entsteht sequenzspezifisch ein DNA/RNA-Hybrid. Da aber nur einzelsträngige RNA an Ribosomen translatiert werden kann, wird die Translation durch die Duplexbildung mit dem Oligonucleotid vollständig unterdrückt. (Abbildung 4)

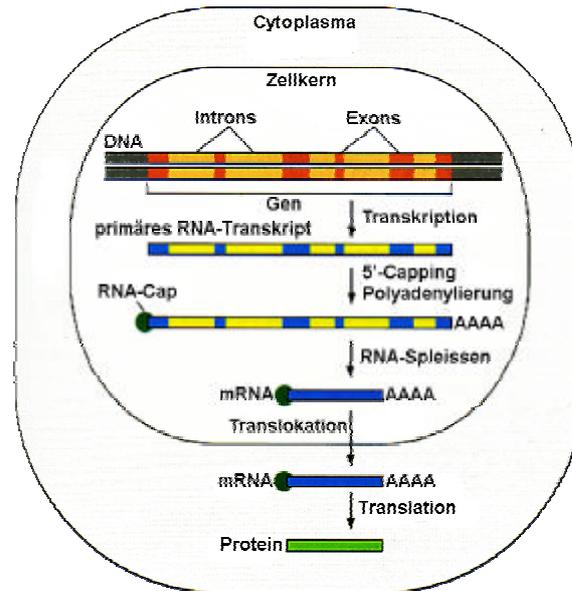


Abbildung 3 Proteinbiosynthese

Derzeit werden vier verschiedene Mechanismen der Antisense-Inhibierung der Genexpression diskutiert. Zum Einen können Oligonucleotide direkt die codierende Region der mRNA zum Ziel haben und so die Proteinkettenverlängerung durch sterische Blockade des ribosomalen Komplexes stoppen. Zum Anderen besteht die Möglichkeit, die Initiierung der Proteintranslation zu inhibieren, indem das Oligonucleotid die Promoterregion oder die Initiierungsregion zum Ziel hat. Zusätzlich zu diesen Mechanismen ist das Enzym RNase H in der Lage DNA/RNA-Hybride zu erkennen und selektiv die mRNA zu spalten, während die DNA intakt bleibt. Die RNase H bindet an das DNA/RNA-Hybrid und spaltet selektiv den Sense-Strang (mRNA) durch Hydrolyse einer oder mehrerer Phosphatdiesterbindungen.²⁹ Das Antisense-Oligonucleotid dissoziiert anschließend vom hydrolysierten Sense-Strang ab und kann an ein weiteres RNA-Molekül binden. RNase H Aktivität ist deshalb bei Antisense-Oligonucleotiden wünschenswert und trägt zur Effizienz dieser Therapieform entscheidend bei. Nicht abgebildet ist die Möglichkeit, die Reifung der *pre*-mRNA zur RNA zu unterbinden, bzw. den Transport ins Cytoplasma zu verhindern. Bevor die Translokation ins Cytoplasma stattfindet, wird die *pre*-mRNA durch Spleißen in die bioaktive Form überführt. Antisense-Oligonucleotide, welche die *pre*-mRNA zum Ziel haben, inhibieren die Polyadenylierung und damit den Transport ins Cytoplasma. Oligonucleotide, welche komplementär zu den Spleißstellen sind, stören die Reifung der RNA durch Inhibierung des Spleißens.³⁰

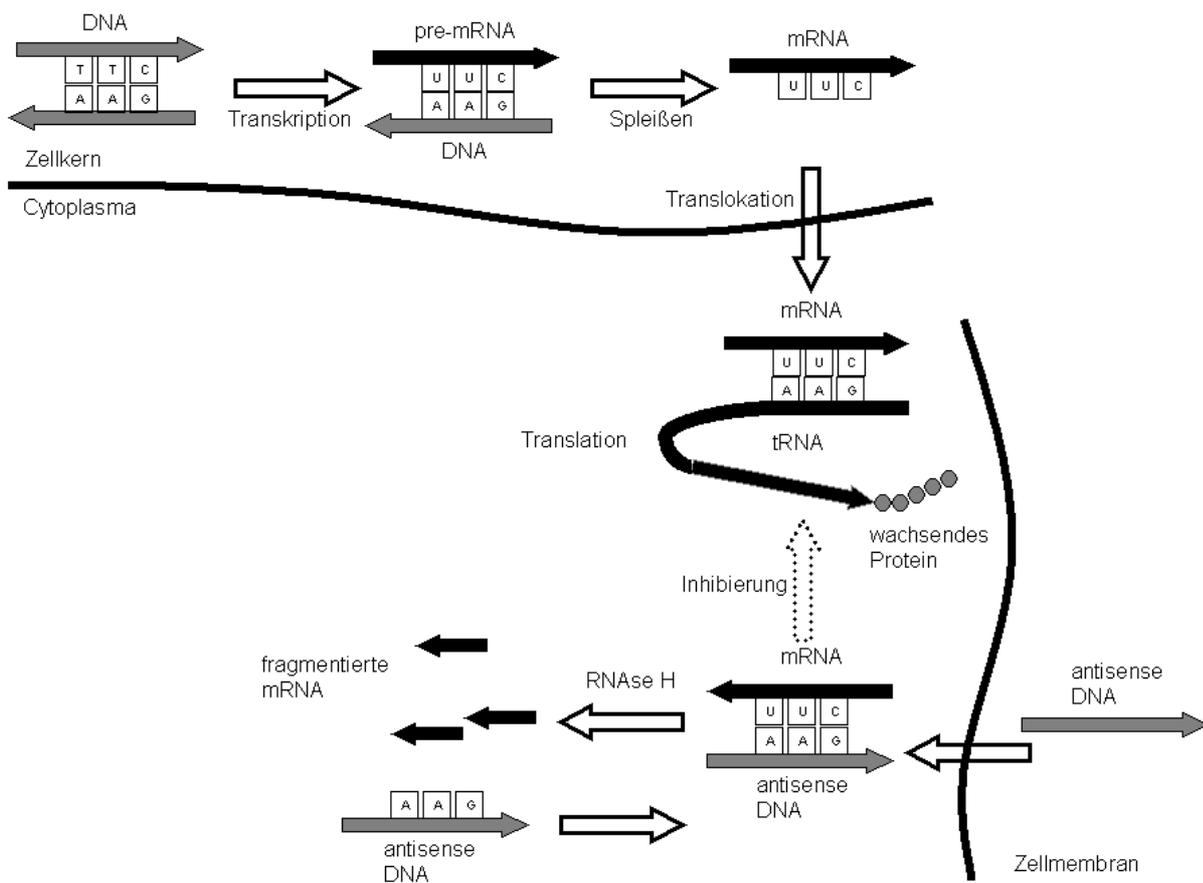


Abbildung 4 Proteinbiosynthese und Antisense

Die Länge des Oligonucleotids muss so gewählt sein, dass unter physiologischen Bedingungen eine gute Sequenzspezifität und eine ausreichende Bindungsenergie zwischen Sense- und Antisense-Strang gewährleistet ist. Die Länge des Oligonucleotids die benötigt wird, um diese Kriterien zu erfüllen, resultiert aus verschiedenen Faktoren. Eine Sequenz von 11 bis 15 Basen ist statistisch einmalig in der mRNA-Zusammensetzung höherer Eukaryoten und eine Sequenz aus 17 Basen kommt statistisch einmalig im kompletten menschlichen Genom vor. Mit kürzerer Kettenlänge nimmt zwar die Spezifität ab, aber Fehlpaarungen haben mit steigender Kettenlänge einen immer geringeren Einfluss auf die Bindungsenergie. Außerdem müssen die Oligonucleotide zuerst zu ihrem eigentlichen Wirkort in die Zelle gelangen. Dabei ist der Transport des Oligonucleotids durch die Zellmembran abhängig von dessen Länge. Kurze Oligonucleotide treten durch passiven Membrantransport schneller durch die Membran als lange. Aus diesen Gründen ergibt sich eine optimale Länge für ein synthetisches Oligonucleotid von 10 bis 17 Nucleotiden.

Lange RNA-Moleküle bilden eine komplexe Sekundär- und Tertiärstruktur und zur Auswahl einer geeigneten Antisense-Sequenz muss zunächst eine erreichbare Zielsequenz auf der mRNA identifiziert werden. Computergestütztes Modellieren langer RNA-Moleküle repräsentiert nur unzureichend die RNA-Struktur in der lebenden Zelle. Somit ist dieser Zugang für diesen Zweck heutzutage noch von eingeschränktem Nutzen.³¹ Der Zugang mittels kombinatorischer Oligonucleotidbibliotheken, RNase H und anschließender Primerverlängerung zur Selektion geeigneter Sequenzen liefert ein gutes Bild der freien und zugänglichen Sequenzabschnitte auf der RNA.^{32,33,34,35}

Beim Design der Antisense-Sequenzen sind noch weitere Kriterien zu beachten.³⁶ Ein Oligonucleotid, welches vier aufeinanderfolgende Guanosine enthält ist in der Lage über Hoogsteen Basenpaarungen Strukturen zu bilden, bei denen vier DNA-Stränge als Quadruplex angeordnet sind (G-Quartet Strukturen).³⁷ Dieses Strukturelement ist thermodynamisch sehr stabil, setzt die effektive Konzentration herab und kann unerwünschte Nebenwirkungen hervorrufen. Sequenzen, welche aufeinander folgende Cytidin und Guanin-Basen aufweisen (CpG-Motive) sind dafür bekannt, Immunantworten zu stimulieren. CG-Dinucleotide sind häufiger in viraler und bakterieller als in menschlicher DNA zu finden und dienen als Marker für das Immunsystem, um eine Infektion zu erkennen.³⁸

Ein weiteres wichtiges Kriterium ist die Stabilität der Oligonucleotide gegenüber zellulären Enzymen, den Nucleasen. Endo- und Exonucleasen bauen DNA im Cytoplasma ab, indem diese Phosphatdiesterbindungen erkennen und hydrolysieren. Die Oligonucleotide müssen, um wirken zu können stabil gegen solche Nucleasen sein. Es wurden in der Vergangenheit verschiedene Modifikationen des Rückgrates entwickelt, die keine Phosphatdiesterbindungen enthalten und somit stabil gegen Nucleasen sind. Insbesondere haben sich Phosphorothioate und Morpholinderivate durchgesetzt, welche eine signifikante Resistenz gegen Nucleasen aufweisen.

2.2 Modifikationen von Oligonucleotiden

Prinzipiell gibt es drei Ansatzpunkte, um eine Modifikation in das Oligonucleotid einzubringen. Da Exo- und Endonucleasen das Phosphatdiesterrückgrat des Oligonucleotids spalten, ist die einfachste Möglichkeit zur Erhöhung der Resistenz gegen

Nucleasen sicherlich eine Modifikation dieser Gruppe. Deshalb wurden in der Vergangenheit unterschiedliche Modifikationen an der Phosphatdiestergruppe entwickelt (Abbildung 5A), von denen die Methylphosphonat-, Phosphorthioat- und Phosphordithioat-Modifikationen die am besten untersuchten Verbindungsklassen sind.

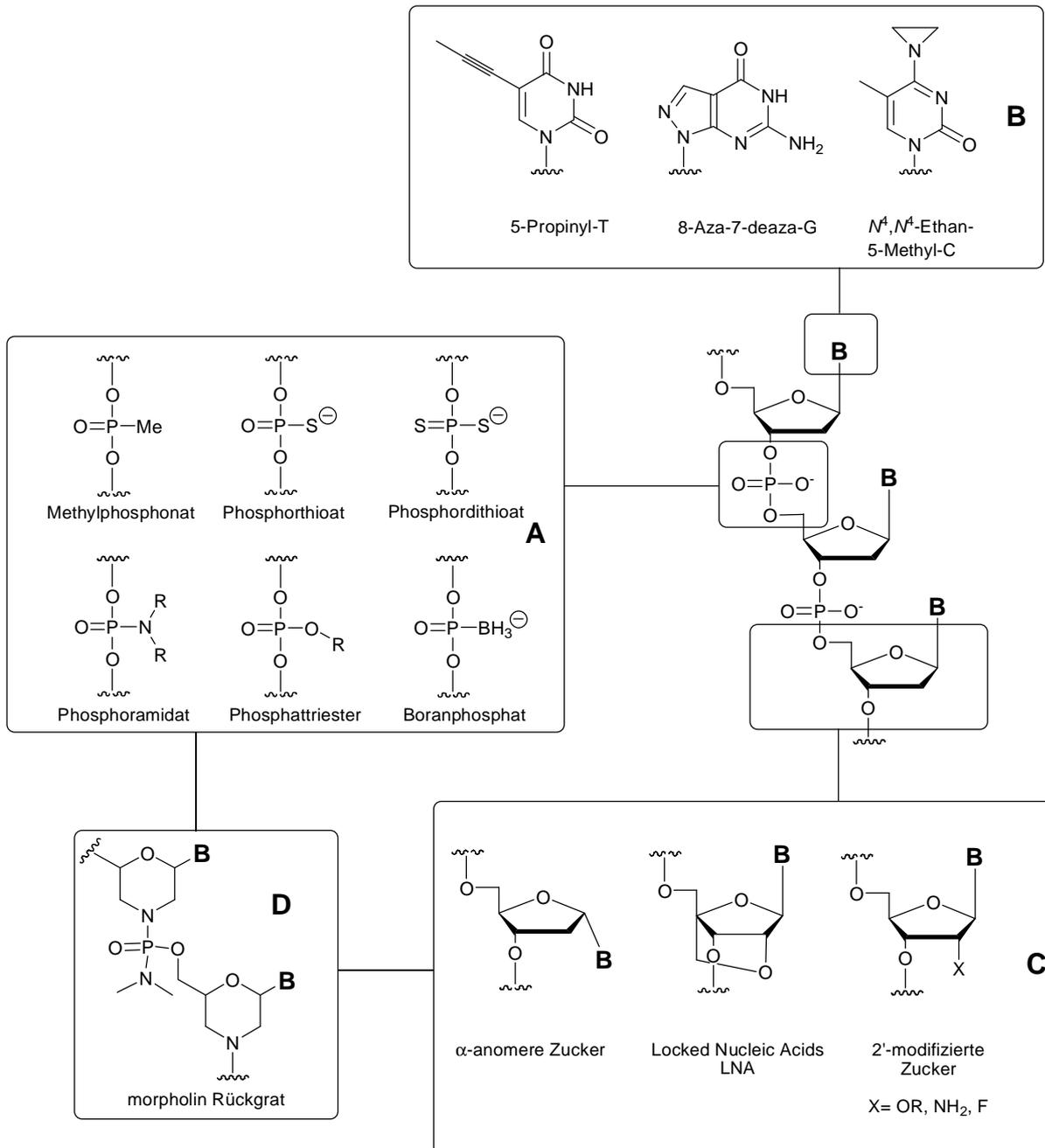


Abbildung 5 Modifikationen von Oligonucleotiden

Bei Methylphosphonat-Oligonucleotiden ist ein negativ geladener Sauerstoff durch eine Methylgruppe ersetzt. Sie sind durch Verwendung von Methylphosphonamiditen bei der

Oligonucleotidsynthese einfach zugänglich.³⁹ Durch das Entfernen der negativen Ladung wird die Lipophilie erhöht, was einen besseren passiven Membrantransport zur Folge hat. Außerdem liegt in dem Oligonucleotid keine Phosphatdiesterbrücke mehr vor, so dass das Oligonucleotid nicht mehr von den Nucleasen abgebaut werden kann. Allerdings haben vollständig Methylphosphonat-modifizierte Oligonucleotide Nachteile: Sie sind schlecht wasserlöslich und zeigen keine RNase H Aktivität.

Ersetzt man ein Sauerstoff- durch ein Schwefelatom, so erhält man Phosphorthioat-modifizierte Oligonucleotide. Sie sind mit der Standardoligonucleotidsynthese zugänglich, wenn anstelle wässriger Iodlösung während des Oxidationsschrittes ein Schwefelreagenz (z.B. Beaucage Reagenz) verwendet wird. Diese Modifikation weist sowohl eine sehr hohe Resistenz gegen den Abbau durch Nucleasen, als auch gegen chemischen Abbau auf. Dies hat aber zur Folge, dass die Oligonucleotide bei wiederholter Gabe im Körper akkumulieren können. Da die Phosphorthioat-modifizierten Oligonucleotide außerdem eine sehr hohe Affinität zu Proteinen aufweisen, kann es bei Akkumulation zu starken unspezifischen und toxischen Nebenwirkungen kommen. Insbesondere stellen Wechselwirkungen mit Membranproteinen während des Eintritts in die Zelle und die Fähigkeit an Serumproteine zu binden ein großes Problem dar.^{40,41,42}

Bei der herkömmlichen Synthese von modifizierten Oligonucleotiden tritt ein weiteres Problem auf. Sowohl Methylphosphonate als auch Phosphorthioate besitzen an jedem Phosphoratom ein stereogenes Zentrum, so dass man ein Stereoisomerengemisch aus 2ⁿ Diastereomeren erhält. Hybridisierungsversuche haben gezeigt, dass R_p-stereoisomerenreine Methylphosphonat-Oligonucleotide bzw. Phosphorthioat-Oligonucleotide einen deutlich höheren Schmelzpunkt (Kapitel 4.4.4) aufweisen als S_p-stereoisomerenreine Oligonucleotide. Es gibt verschiedene Methoden im Labormaßstab, um diastereoselektive Kupplungen zu Phosphorthioaten durchzuführen, die alle ein chiral modifiziertes Phosphoramidit als aktivierte P(III)-Spezies einsetzen.^{43,44} Durch Substitution beider Sauerstoffatome einer Phosphatbrücke durch ein Schwefelatom gelangt man zu den Phosphordithioaten. Diese haben den Vorteil, dass sie kein stereogenes Zentrum besitzen. Eine wichtige Rolle spielen Phosphatriester-modifizierte Oligonucleotide, z.B. bei der Entwicklung von Pro-Oligonucleotiden (Kapitel 2.3). Eine

nicht so große Rolle spielen Phosphoramidat- und Boranphosphat-modifizierte Oligonucleotide (Abbildung 5A).

Durch die Modifikation der Nucleobasen (Abbildung 5B) wird versucht, die Bindungsaffinität zum Zielstrang zu erhöhen, die Bindungsspezifität zu verändern oder die Nucleaseresistenz zu erhöhen. Durch Verwendung von 5-Propinylpyrimidinen wird eine höhere Bindungsaffinität der Oligonucleotide erreicht, wobei gleichzeitig die Spezifität verbessert wird. Wird anstelle des natürlichen 2'-Desoxyguanosins das modifizierte 8-Aza-7-desaza-2'-desoxyguanosin in das Oligonucleotid eingebaut, weist das Hybrid mit diesem Oligonucleotid eine höhere Schmelztemperatur auf, als das unmodifizierte Analogon.

Der natürliche DNA-Strang enthält ein Rückgrat aus phosphatverknüpften 2'-Desoxy- β -D-ribofuranose Einheiten, welche auch Ziel chemischer Modifikation sind (Abbildung 5C). Bisher sind 2'-O-Methyl-Ribonucleotide die am weitesten verbreiteten 2'-modifizierten Oligonucleotide. Diese Modifikation kommt in natürlichen tRNAs, rRNAs (ribosomale RNA) und snRNAs (small nuclear RNA) vor und erhöht die Duplexstabilität mit komplementärer RNA um 0.5 bis 1.0 °C pro Modifikation. Weitere 2'-Modifikationen wie Fluor, 2-Methoxyethyl (MOE) und 3-Aminopropyl (AP) führen sogar zu noch größeren Bindungsaffinitäten.⁴⁵ Diese Modifikationen drängen die Pentafuranose in eine C3'-endo Konformation was zu einer Bevorzugung der stabileren Typ A Doppelhelixstruktur im Hybrid mit RNA führt. Bei den vollständig in der C3'-endo Konformation eingefrorenen „locked nucleic acids“ (LNA) findet man einen enormen Anstieg der T_m -Werte von 4 bis 8 °C pro Modifikation. Außerdem ist LNA sehr stabil gegen den Abbau durch Nucleasen, jedoch sind LNA/RNA-Duplices kein Substrate für die RNase H.^{46,47}

Morpholin-modifizierte Oligonucleotide (Abbildung 5D) binden mit höherer Affinität an RNA als unmodifizierte DNA. Sie sind sehr resistent gegen Nucleasen, jedoch sind ihre Duplices mit RNA keine Substrate für die RNase H. In einem β -Globin Splicing Assay wiesen Morpholin-Oligonucleotide unter Oligonucleotiden mit verschiedenen Rückgratmodifikationen eine 20fach höhere Aktivität als entsprechende Phosphorthioat-2'-O-methyl-modifizierte Oligonucleotide auf.⁴⁸ Trotz fehlender RNase H Aktivität zeigt sich, dass bei Wahl einer geeigneten Region der mRNA-Zielsequenz Oligonucleotide mit

einem RNase H unabhängigen Wirkmechanismus effektiv mit RNase H aktiven Oligonucleotiden konkurrieren können.⁴⁹ Inzwischen befinden sich Morpholin-modifizierte Oligonucleotide der Firma Avi BioPharma in klinischen Untersuchungen.¹⁵

2.3 Pro-Oligonucleotide

Wichtige Kriterien für die Entwicklung von Antisense-Oligonucleotiden sind eine hinreichende Stabilität sowohl im extrazellulären Medium als auch im Cytoplasma. Unmodifizierte Oligonucleotide werden sehr schnell durch Endo- und Exonucleasen abgebaut. Außerdem muss das zu applizierende Oligonucleotid lipophil genug sein, um durch passiven Membrantransport ins Cytoplasma zu gelangen oder so beschaffen sein, dass es durch aktive Transportmechanismen ins Zellinnere gelangt.⁵⁰

Lipophile Modifikationen wurden hauptsächlich entwickelt, um die passive Aufnahme von Oligonucleotiden in Zellen und deren Gewebeverteilung zu verbessern. In der Arbeitsgruppe um ESTHER CHANG wurde das 3'-Ende mit 1-O-Hexadecylglycerol konjugiert und es konnte eine verbesserte Aufnahme in Tumorzellen erreicht werden. Es konnten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Tumore in Kombination mit einer Strahlentherapie behandelt werden.¹ 3'-Konjugation von Cholesterol an Oligonucleotide verändert nicht dessen Bindungsaffinität zu RNA, aber Studien über die Gewebeverteilung zeigten, dass dieses Konjugat im Vergleich zum unmodifizierten Oligonucleotid deutlich in der Leber angereichert wurde.⁵¹

Ein Pro-Oligonucleotid trägt eine temporäre Schutzgruppe (Pro), welche die negative Ladung des Phosphatrückgrates maskiert und durch enzymatische oder chemische Hydrolyse innerhalb der Zelle entfernt werden kann. Selbstverständlich darf die abgespaltene Maske nicht toxisch sein. Im Idealfall wird so ein unmodifiziertes Oligonucleotid freigesetzt, welches dann abgebaut werden kann. Die Modifikation sorgt weiterhin dafür, dass das Pro-Oligonucleotid selbst nicht durch Nucleasen abgebaut wird und es ins Cytoplasma gelangen kann. Außerdem wird die Verweil- und Wirkdauer in der Zelle erhöht, so dass idealerweise schon das Pro-Oligonucleotid Antisense-Aktivität aufweisen sollte. (Abbildung 6)

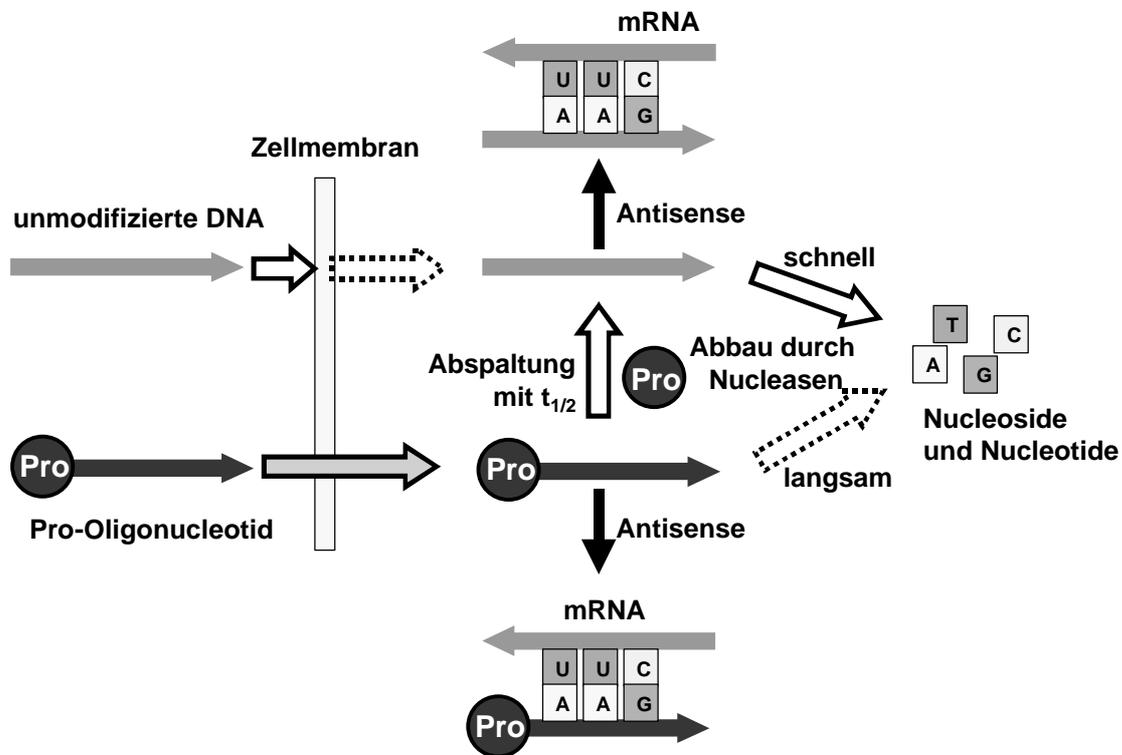
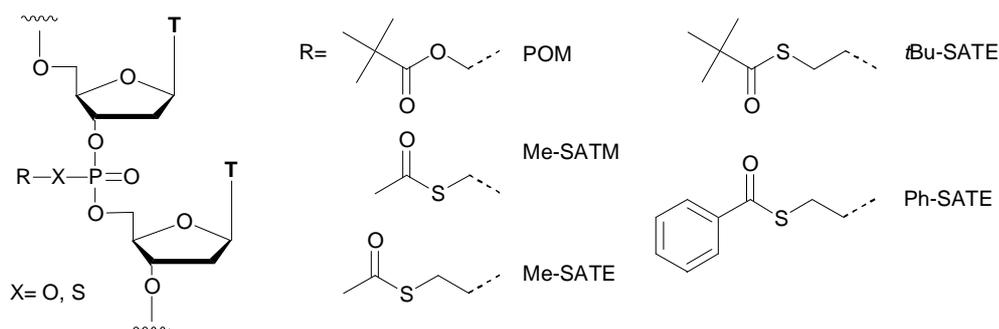


Abbildung 6 Pro-Oligonucleotidkonzept

In der Literatur finden sich im wesentlichen zwei Ansätze in Arbeiten von IMBACH et al. und IYER et al., die durch Anbringen einer enzymlabilen „Maske“ an das Schwefelatom des Phosphorthioat-Rückgrates zu verbesserten Transporteigenschaften und zu einer Verringerung der Nebenwirkungen des Antisense-Wirkstoffes gelangen wollen.

IMBACH et al. haben in den letzten Jahren eine Reihe Publikationen zu ihrem Pro-Oligonucleotid Ansatz veröffentlicht. Dabei ist eine lipophile Estergruppe an das Phosphorthioat-Rückgrat des Nucleinsäurestranges (Abbildung 7) gebunden. Als enzymatisch abspaltbare Masken kommen die Estergruppen Pivaloyloxymethyl-(POM), *S*-Acetylthiomethyl (Me-SATM), *S*-Acetylthioethyl-(Me-SATE), *tert*-Butyl-*S*-acetylthioethyl (*t*Bu-SATE) und Phenyl-*S*-acetylthioethyl (Ph-SATE) zum Einsatz.^{52 - 60}

Abbildung 7 Pro-Oligonucleotide von IMBACH et al.⁶¹

In neueren Arbeiten wurde dieses Konzept auch auf phosphattriester Oligonucleotide übertragen und erste Tests zur Zellaufnahme konnten mit 5'-fluoreszenzmarkierten Thymidindodecanucleotiden durchgeführt werden.⁶² Der Ansatz der SATE-modifizierten Pro-Oligonucleotide basiert auf einem Prodrugkonzept, welches ursprünglich für die Freisetzung cyclischer und acyclischer Nucleosidanaloga entwickelt wurde. Dabei wird die endständige Carboxyestergruppe der neutralen Phosphattriester nach der Zellaufnahme durch Carboxyesterase enzymatisch gespalten. Es entsteht der instabile Thioethylphosphattriester, welcher spontan nach einem S_Ni -Mechanismus Thiiran (Episulfid) abspaltet und das unmodifizierte Oligonucleotid freisetzt. Der wesentliche Nachteil dieser Schutzgruppe besteht darin, dass es sich bei dem freigesetzten Episulfid um ein stark toxisches Molekül handelt.⁶³ Ausserdem verläuft die initiierende enzymatische Spaltung der Ester mit steigender Ladung im Oligonucleotid (und damit mit jeder Spaltung der SATE-Gruppen) immer langsamer und wird somit ineffizient.

Ein ähnliches Konzept über Carboxyesterase spaltbare Schutzgruppen verwendet auch die Arbeitsgruppe um R.P. IYER et al.. In früheren Studien fanden sie, dass die zelluläre Aufnahme durch Einführung von nicht-ionischen Nucleotidverbrückungen erhöht wird. So ist, neben einer verbesserten Zellaufnahme, auch eine erhöhte Stabilität gegen die Oligonucleotid abbauenden Nucleasen zu erwarten. Zunächst haben auch sie den Einbau der SATM-Schutzgruppen wie Imbach et al. vorgenommen, sind dann aber zu Acyloxyarylderivaten übergegangen. Diese besitzen einen vergleichbaren Mechanismus der enzymatischen Spaltung mit anschließender chemischer Spaltung der *p*-Hydroxybenzylgruppe. Im Gegensatz zur SATE-Modifikation wird aber ein wesentlich weniger toxisches Chinonmethid als Spaltprodukt freigesetzt (Abbildung 8).⁶⁴⁻⁶⁶

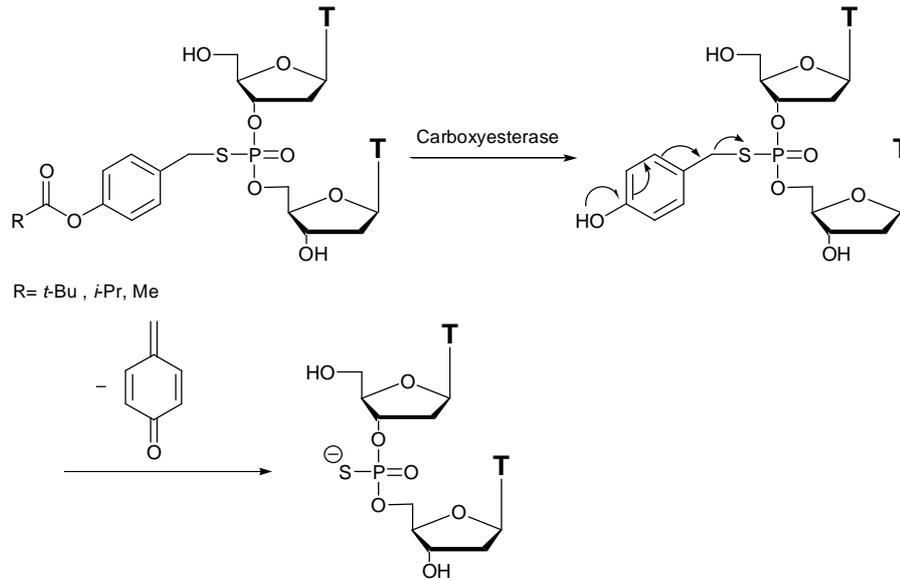
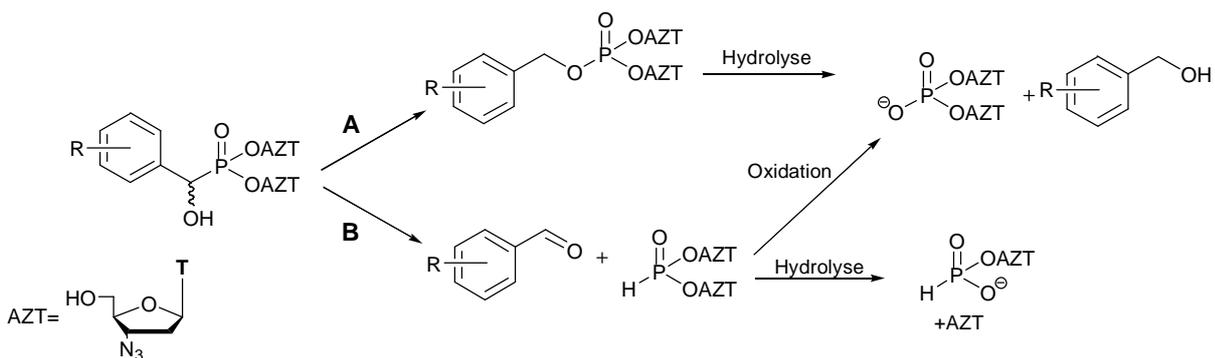


Abbildung 8 Pro-Oligonucleotid Konzept von IYER et al.

2.4 Hydroxybenzylphosphonat-Pro-Oligonucleotide

Ein gänzlich anderes Konzept eines Prodrugsystems wurde in der Arbeitsgruppe von C. MEIER entwickelt. Schon vor einiger Zeit wurden dabei α -Hydroxybenzylphosphonat-5',5'-dinucleotide als Prodrugs der anti-HIV-aktiven Nucleosidanaloga 2',3'-Didesoxythymidin (ddT), 3'-Azido-2',3'-didesoxythymidin (AZT, Zidovudin, Retrovir®), 2',3'-Dideoxy-2',3'-didehydrothymidin (d4T, Stavudin, Zerit®) und 2',3'-Dideoxyuridin (ddU) eingesetzt.^{67,68,69}



R	t _{1/2} PP (pH 7.5)	H-Phosphonat (B)	Triester (A)
2-NO ₂	8	20 %	80 %
2,4-NO ₂	0.23	1 %	99 %
4-(OCH ₃)	6	100 %	0 %
4-CH ₃	7.5	100 %	0 %

Abbildung 9 Abbau der α -Hydroxybenzylphosphonat-5',5'-dinucleotide

Die α -Hydroxybenzylphosphonat-modifizierten Prodrugs unterliegen einem chemischen Abbau und setzen dabei nicht-toxische Benzylalkohole bzw. Benzaldehyde frei. Wie in früheren Arbeiten gezeigt werden konnte, unterliegen α -Hydroxybenzylphosphonate in wässrigen, alkalischen Medien zwei unterschiedlichen Abbauwegen.^{67,70} Welcher Reaktionsweg eingeschlagen wird, hängt von den elektronischen Eigenschaften des Substituenten R am Aromaten ab. Akzeptorsubstituenten (z.B. NO₂) begünstigen die Phosphonat-Phosphat-Umlagerung (**A**), während Donorsubstituenten (z.B. OMe, Me) eine Rückspaltung (**B**) begünstigen (Abbildung 9).

Eine Erklärung für die unterschiedlichen Abbauewege liefert der in Abbildung 10 dargestellte Abbaumechanismus. Bei der Phosphonat-Phosphat-Umlagerung (**A**) wird zunächst die α -Hydroxybenzylgruppe deprotoniert und das freie Elektronenpaar des negativ geladenen Sauerstoffatoms greift nucleophil unter Bildung eines Oxaphosphirans am Phosphoratom an. Nach heterolytischem Bruch der P-C-Bindung entsteht ein Benzylcarbanion, welches durch Akzeptorsubstituenten im Arylrest, wie z.B. NO₂, in *ortho*-oder *para*-Position stabilisiert wird. Durch diese Stabilisierung liegt das Gleichgewicht auf der Seite des Benzylphosphattriester. Die anschließende Reprotonierung ist irreversibel und führt zum Benzylphosphattriester. Der Benzylrest stellt die labilste Phosphatestergruppe dar und wird durch wässrige Hydrolyse zum entsprechenden Benzylalkohol und Phosphatdiester gespalten.

Eine Konkurrenzreaktion zur Phosphonat-Phosphat-Umlagerung ist die Hydrolyse über die Rückspaltungsreaktion (**B**). Dabei wird das α -Hydroxybenzylphosphonat zunächst wieder an der α -Hydroxybenzylgruppe deprotoniert. Anschließend zerfällt das Intermediat durch heterolytischen P-C-Bindungsbruch in ein Benzaldehyd und das Anion des Phosphonatdiesters. Reprotonierung führt zum H-Phosphonatdiester. Dieser ist unter den alkalischen Bedingungen instabil und die nachfolgende Hydrolyse führt zur Bildung des H-Phosphonatmonoesters. Möglicherweise kann der H-Phosphonatdiester auch zum Phosphatdiester oxidiert werden. Diese Rückspaltung sollte bevorzugt ablaufen, wenn der Arylrest Carbanionen destabilisiert, also donorsubstituiert ist.

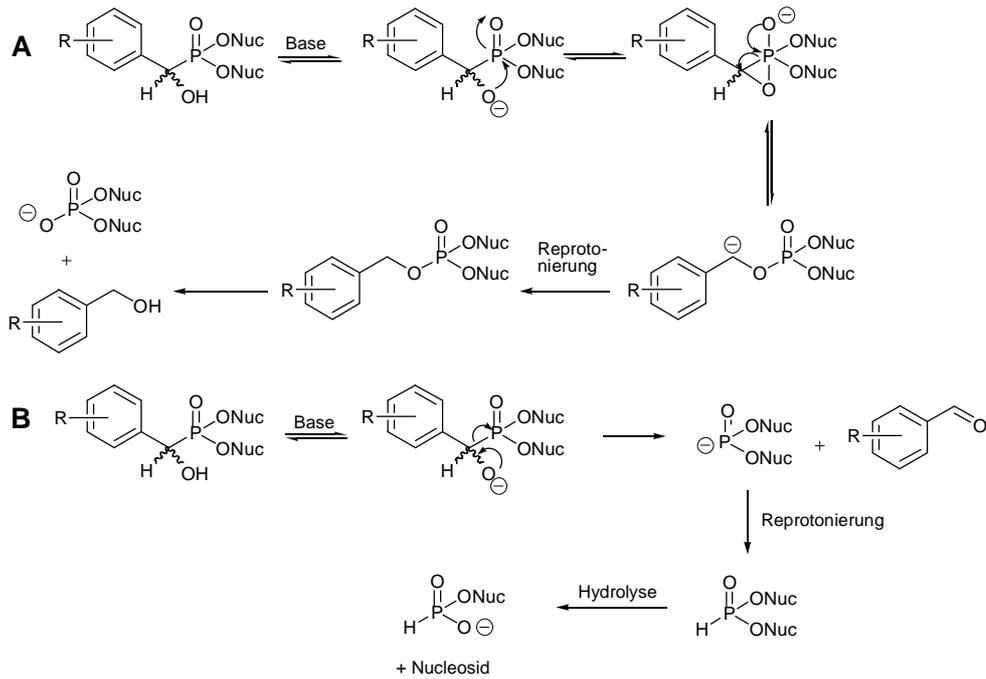


Abbildung 10 Abbaumechanismen der 5',5'-Dinucleosyl- α -hydroxybenzylphosphonate

Die Idee des Pro-Oligonucleotid Konzeptes bestand nun darin, diese Eigenschaften auf Antisense-Oligonucleotide zu übertragen. Durch Einfügen der α -Hydroxybenzylgruppe in das Phosphatrückgrat eines DNA-Stranges ist es gelungen, einen neuen Ansatz für Pro-Oligonucleotide zu entwickeln.^{71,72-74} Eine Variation des Arylrestes erlaubt die Halbwertszeit der angestrebten Umlagerung des α -Hydroxybenzylrestes und des anschließenden Zerfalls des Benzylphosphatrestes zu beeinflussen. In früheren Arbeiten ist es gelungen, dieses Konzept erfolgreich auf Thymidin-Oligonucleotide (dT)₁₅ anzuwenden und deren Eigenschaften zu untersuchen.⁷² Tests dieser Oligonucleotide gegen Exonucleasen zeigten, dass bereits durch die Einführung von nur einer α -Hydroxybenzylphosphonat-Einheit in das Rückgrat eines Oligonucleotids eine deutliche Stabilitätserhöhung im Vergleich zu den unmodifizierten Oligonucleotiden erreicht wird. Eine α -Hydroxybenzylphosphonat-Modifikation am 5'-Ende erhöhte die Resistenz gegen 5'-Exonucleasen um das 30-fache während eine Modifikation am 3'-Ende die Stabilität gegen 3'-Exonucleasen um das 6-bis 18-fache erhöhte. Bei Einbau stereoisomerenreiner α -Hydroxybenzylphosphonat-Einheiten (bezüglich des Phosphoratoms) wurde für das R_P-Isomer eine größere Stabilität gefunden als für das S_P-Isomer.

3 AUFGABENSTELLUNG

In vorangegangenen Arbeiten von R.P. MAURITZ wurde das α -Hydroxybenzylphosphonat-Pro-Oligonucleotidkonzept für Thymidinoligonucleotide als Modellsystem entwickelt und erste Untersuchungen zu deren Eigenschaften konnten durchgeführt werden.

Ziel dieser Arbeit war es nun Konzepte zu entwickeln, um diese Modifikation in biologisch relevante, also gemischte Sequenzen, einzubauen. Hierfür sollten zunächst für eine anti H-*ras* **ODN 1**^{3,75} und eine anti Influenza Sequenz **ODN 2**⁷⁶ (ODN= Oligo-2'-desoxyribonucleinsäure) dimere Adenosyl-Thymidyl-Bausteine **1& 2R_P,S_P** synthetisiert werden, welche anschließend als 3'-Phosphoramidit **3R_P,S_P**, bzw. an eine feste Phase (CPG) gebunden **4R_P,S_P** in der automatisierten Festphasensynthese eingesetzt werden sollten (Abbildung 11).

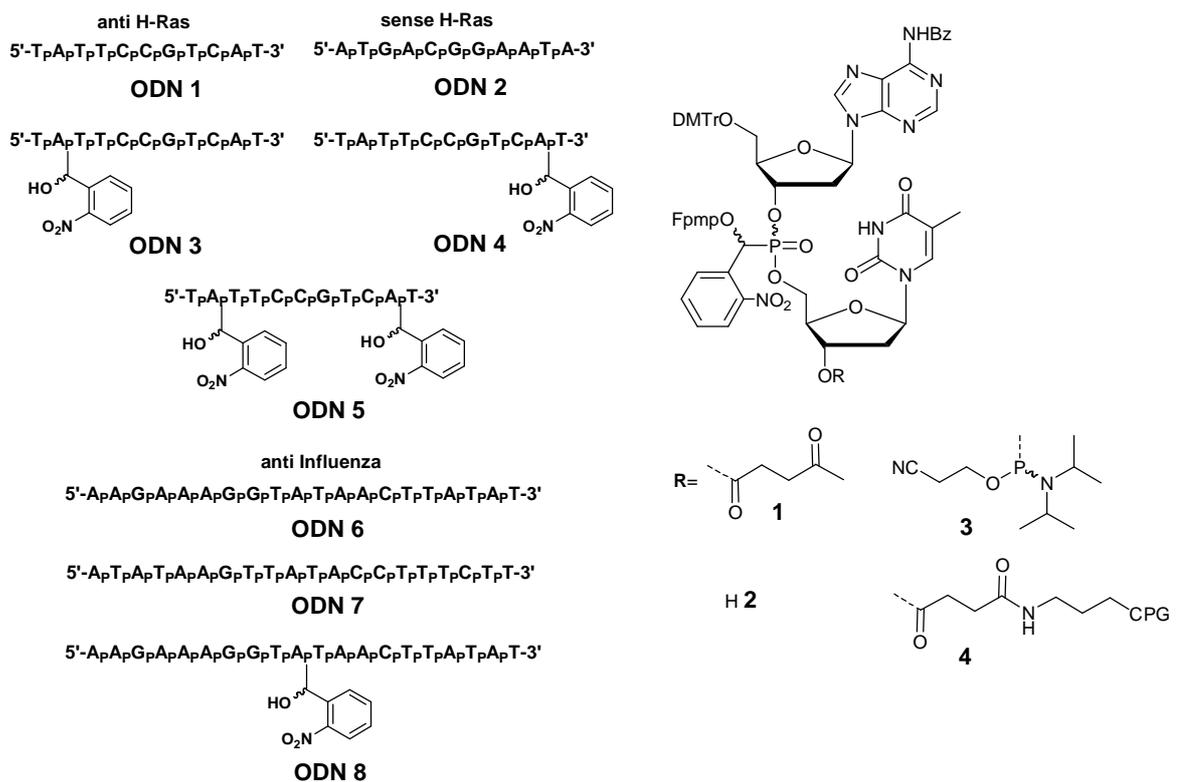


Abbildung 11 Zielsequenzen und dimere Synthesebausteine

Die so synthetisierten α -Hydroxybenzylphosphonat-Oligonucleotide **ODN 3-4,8 R_P,S_P** sollten auf Ihre chemischen Eigenschaften, wie thermodynamische Daten (T_m -Wert, ΔG ,

ΔH , ΔS) untersucht und deren Stabilität gegenüber Nucleasen bestimmt werden. In Abhängigkeit von der Stereochemie des Phosphonatzentrums wurden unterschiedliche T_m -Werte der modifizierten ODN gefunden. Diese Beobachtung sollte auch in dieser Arbeit an gemischten Sequenzen untersucht werden, so dass die Diastereomere bezüglich des Phosphonates getrennt erhalten und eingesetzt werden mussten.

Die Modifikation über modifizierte dimere Bausteine in die ODN einzubringen bietet den entscheidenden Vorteil, die Stereochemie bezüglich des Phosphonates kontrollieren zu können. Sollen allerdings eine Vielzahl biologisch relevanter Sequenzen synthetisiert und getestet werden, so wären 16 verschiedene Bausteine notwendig, deren Synthese lang, aufwendig, unflexibel und kostenintensiv ist. Außerdem ist nur jede 2. Position in potentiellen Antisense-Pro-Oligonucleotiden modifizierbar. Daher war ein weiteres Ziel dieser Arbeit einen Syntheseweg zu modifizierten monomeren α -Hydroxybenzylphosphonamiditen der Struktur **5** (Abbildung 12A) zu finden, um diese analog zu den Standardphosphoramiditen in der DNA-Synthese einsetzen zu können.⁷⁷ Mit dieser Methode wäre die Synthese von nur 4 modifizierten Bausteinen notwendig, welche flexibel in jede beliebige DNA-Sequenz eingebaut werden könnten.

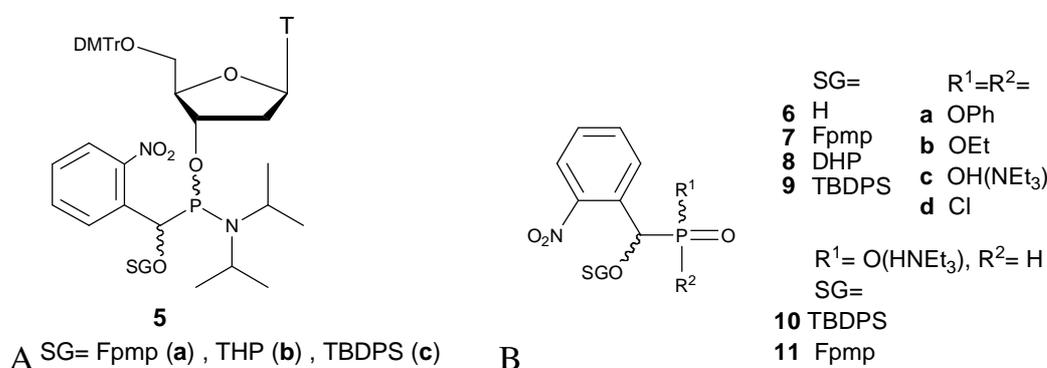


Abbildung 12 A: Monomerer α -Hydroxybenzylphosphonamidit Baustein **5** B: Dimerer α -Hydroxy-2-nitrobenzylphosphonat Precursor **6-9** und α -Hydroxy-2-nitrobenzylphosphinat Precursor **10,11**

Die Synthese der modifizierten dimeren Bausteine ist langwierig, aufwendig und unflexibel. Man ist bereits zu Beginn der Synthese auf eine bestimmte Nucleosidkombination festgelegt und muß fast alle Syntheseschritte am Phosphonatinucleotid durchführen. Es sollten neue Synthesemöglichkeiten zu diesen

Dinucleotidbausteinen gefunden werden, welche nicht wie die herkömmliche Synthese ausgehend von den Nucleosiden die Verbindung aufbaut, sondern über Hydroxy-2-nitrophenylmethyl-phosphonat Precursor **6-9**, bzw. Hydroxy-2-nitrophenylmethyl-phosphinat Precursor **10,11** in zwei abschließenden Schritten mit den Nucleosiden gekuppelt werden können. Hierfür müssen verschiedene geschützte α -Hydroxy-2-nitrobenzylphosphonat und -phosphinatdiester synthetisiert und auf Ihre Reaktivität untersucht werden. Für diese Reaktionen sollten verschiedene für H-Phosphonate entwickelte Reaktionen (Kupplungsreaktionen, Pudovic-Addition, Atherton-Todd-Reaktion) auf deren Übertragbarkeit auf Phosphinate untersucht und so erweiterte Möglichkeiten in der Phosphonat-, bzw. Phosphinatchemie geschaffen werden.

4 RESULTATE UND DISKUSSION

4.1 Synthese α -Hydroxybenzylphosphonat-modifizierter dimerer Bausteine

α -Hydroxybenzylphosphonat-modifizierte Oligonucleotide wurden mittels automatisierter DNA-Festphasensynthese (Kapitel 4.4.1) erhalten. Hierfür ist die Synthese eines Dinucleotides notwendig, welches die α -Hydroxybenzylphosphonat-Modifikation trägt notwendig und ist im folgenden beschrieben. Die Grundlagen für die Synthese von α -Hydroxybenzylphosphonat-modifizierten Dinucleotiden wurden bereits in meiner Diplomarbeit beschrieben.⁷⁸ In dieser Arbeit konnte dieser Syntheseweg (Variante A) näher untersucht und optimiert werden.

4.1.1 Syntheseplanung

Zur Einführung der α -Hydroxybenzylphosphonat-Einheit in Oligonucleotide ist die Synthese eines Dinucleosylphosphonatesters **2** notwendig, welcher analog zu den Standardphosphoramiditen als „Quasimonomer“ entweder als Phosphoramidit **3**, oder an eine feste Phase gebunden (**4**) eingesetzt werden kann (Abbildung 13).

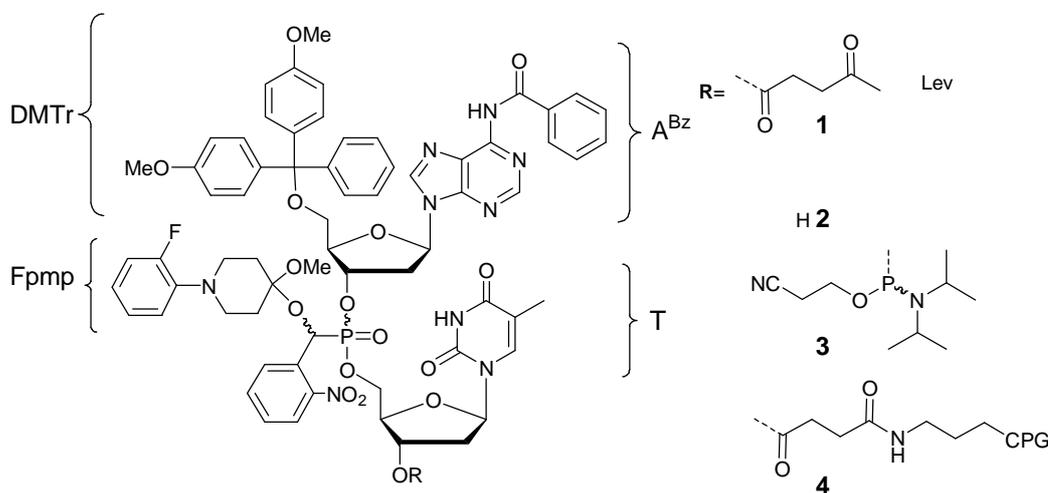


Abbildung 13 „Quasimonomerer“ α -Hydroxybenzylphosphonat-Baustein **3,4** für den Einsatz in der automatisierten DNA-Festphasensynthese

Um dem Standardprotokoll der Oligonucleotidsynthese zu entsprechen, wurde für die Blockierung der 5'-Hydroxygruppe die 4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl Schutzgruppe (DMTr) gewählt. Die säurelabile Schutzgruppe wird bereits unter milden sauren

Bedingungen (3 % Trichloressigsäure (TCA) in Acetonitril) innerhalb kurzer Zeit quantitativ abgespalten.⁷⁹ Für die α -Hydroxygruppe wird eine im sauren abspaltbare Schutzgruppe benötigt, da unter basischen Bedingungen die Phosphonat-Phosphat-Umlagerung oder die Rückspaltung eingeleitet wird (Kapitel 2.4). Die Wahl fiel hier auf die acetalische Schutzgruppe Fpmp (1-(2-Fluorphenyl)-4-methoxypiperidin-4-yl), die aus der RNA-Chemie zur Blockierung der 2'-Hydroxygruppe des Ribosids bekannt ist und unter sauren wässrigen Bedingungen (HCl/Glycin/NaCl pH 3.0) abspaltbar ist.^{72,73} Die Maskierung der Hydroxy-Funktion mit 1-(2-Fluorphenyl)-4-methoxy-1,2,5,6-tetrahydropyridin (Fpmp-Enol) **14** ist in Anwesenheit von Trifluoressigsäure beschrieben.^{80-82,83}

Die 3'-Hydroxygruppe muss während der gesamten Synthese mit einer Schutzgruppe versehen sein und diese im letzten Schritt der Synthese selektiv abgespalten werden. Außerdem muss sie stabil gegen alle verwendeten Reaktionsbedingungen sein. Um die Orthogonalität der Schutzgruppenstrategie zu erfüllen, wurde hier die Levulinyllgruppe (Lev) gewählt. Die Levulinyllgruppe lässt sich unter milden Bedingungen mit Levulinsäure mittels *N,N*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) aktivierter Veresterung einführen und schnell mit Hydrazinhydrat entfernen und kann somit selektiv gegenüber Schutzgruppen für die exocyclischen Aminogruppen der Nucleobasen (z.B. Benzoyl, *iso*-Butyryl) abgespalten werden.^{84,85}

Als α -Hydroxybenzylphosphonatmodifikation wurde die 2-Nitrobenzylgruppe gewählt. In Studien zum Hydrolyseverhalten von α -Hydroxybenzylphosphonatdinucleotiden konnte gezeigt werden, dass die 2-NO₂-Benzylmodifikation zum Phosphatriester umlagert, um anschließend zum Phosphat zu hydrolysieren. Zwar ist es möglich, mit Hilfe der 2,4-Dinitrobenzylphosphonatgruppe zu einem höheren Umsatz an Triester zu gelangen, jedoch ist die Halbwertszeit mit 10 Minuten deutlich zu kurz für eine sinnvolle Anwendung (Kapitel 2.4, Abbildung 9). Nitroaromaten sind pharmakologisch prinzipiell bedenklich, da sie akute Toxizitäten aufweisen können, wie neurale Störungen (nonpolar narcosis),⁸⁶ Mutagenität⁸⁷ und Hautsensibilisierung.^{88,89} QSAR-Studien zeigen für 2-Nitrobenzylalkohol (dem Spaltprodukt nach der Hydrolyse) jedoch einen hohen IGC₅₀-Wert (50% Inhibitory Growth Concentration als Maß für die Toxizität) von 1.4 mM (im

Vergleich: 2-Nitrotoluol $IGC_{50}=0.3$ mM, 1-Butoxy-4-nitrobenzol $IGC_{50}=0.03$ mM),⁹⁰ so dass 2-Nitrobenzylalkohol als Pro-Oligonucleotid-Maske geeignet sein sollte.

Prinzipiell gibt es zwei verschiedene Möglichkeiten, den dimeren Baustein aufzubauen. In Variante A (Abbildung 14) erfolgt die Modifizierung der Phosphonateinheit nach dem Aufbau des H-Phosphonatdinucleotides **12**. Zum anderen können erst in einem letzten Schritt die Nucleoside an einen modifizierten Phosphonatprecursor **7-9a-d** (Variante B, Kapitel 4.1.3, Abbildung 29) oder auch Phosphinatprecursor **10,11** (Variante C, Kapitel 4.1.4.4, Abbildung 48) gekuppelt werden.

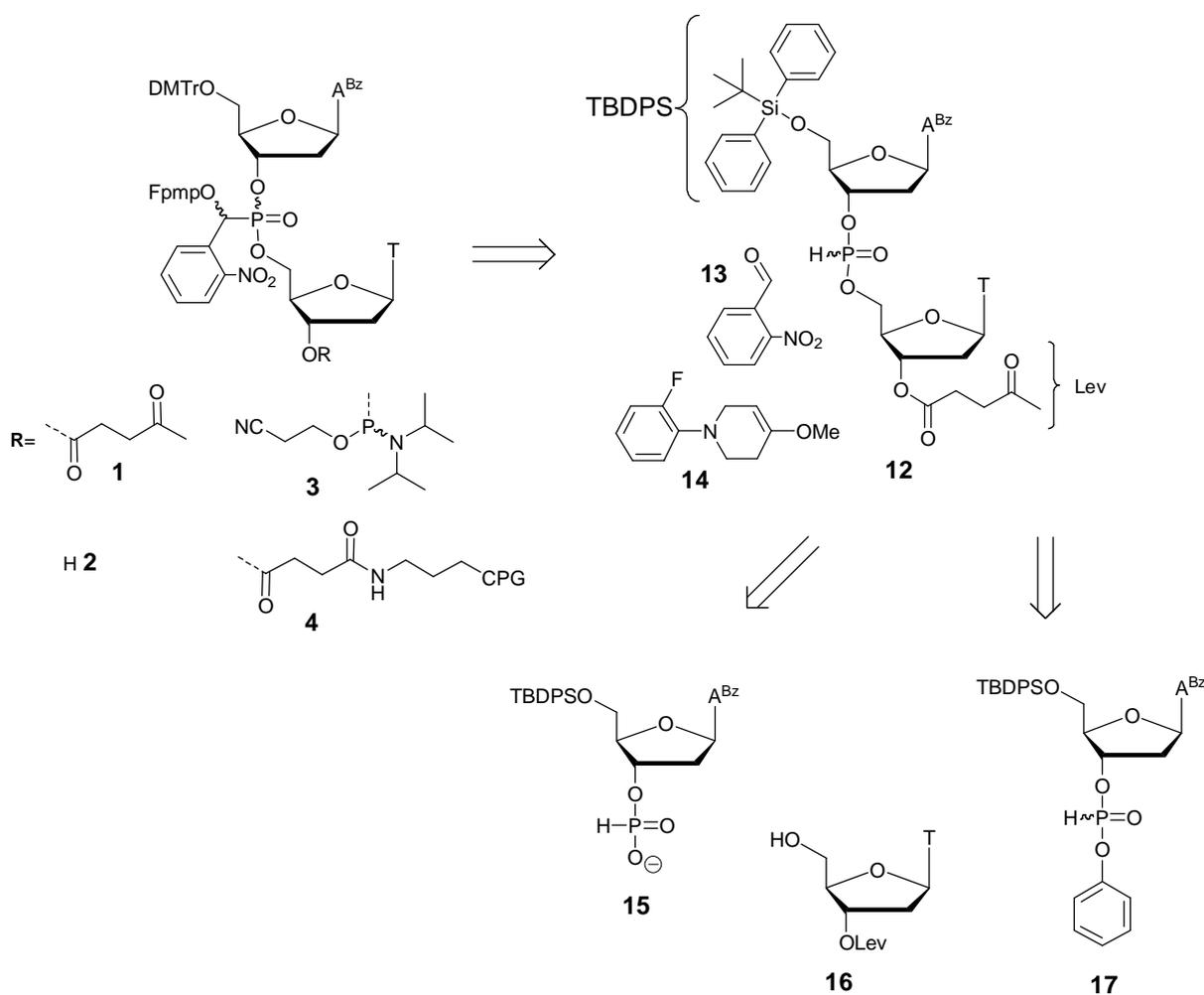


Abbildung 14 Synthesepfad des dimeren α -Hydroxybenzylphosphonat-Bausteines **1-4** (Variante A)

Würde nach Variante A zunächst das H-Phosphonatdinucleotid 5'-O-DMTr-**12** aufgebaut, würde unter den Bedingungen der Fpmp-Schutzgruppeneinführung an der

α -Hydroxygruppe die 5'-O-DMTr-Schutzgruppe abgespalten. Die 5'-Hydroxyfunktion muss daher während der Synthese durch eine andere Schutzgruppe blockiert sein. Die Wahl fiel hierbei auf die sterisch anspruchsvolle *tert*-Butyldiphenylsilyl-Schutzgruppe (TBDPS), die unter milden Bedingungen durch das entsprechende Silylchlorid eingeführt und unter milden basischen oder sauren Bedingungen mit Fluorid-Ionen abgespalten werden kann.⁹¹⁻⁹⁴ Erst am Ende der Synthese wird die Silylschutzgruppe gegen die DMTr-Gruppe ausgetauscht.

Das H-Phosphonatdinucleotid kann durch Kupplung eines 3'-O-H-Phosphonates **15** mit einem an der 5'-OH-Gruppe ungeschützten Nucleosid **16** erhalten werden. Diese durch Pivalinsäurechlorid aktivierte Kupplungsreaktion wurde ausführlich von STAWINSKI et al.⁹⁵⁻¹⁰⁰ beschrieben. Auch die Darstellung von H-Phosphonaten wurde von STAWINSKI et al. entwickelt und ist mit verschiedenen Reagenzien möglich.¹⁰¹

4.1.2 Synthese α -Hydroxybenzylphosphonat-modifizierter Dinucleotidbausteine (Variante A)

Thymidin **18** wurde an der 5'-Position mit 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid (DMTrCl) **19** geschützt und DCC-aktiviert mit Levulinsäure verestert. Nach Abspaltung der säurelabilen DMTr-Schutzgruppe wurde 3'-O-Levulinylthymidin (3'-O-Lev-dT) **16** erhalten.¹⁰²

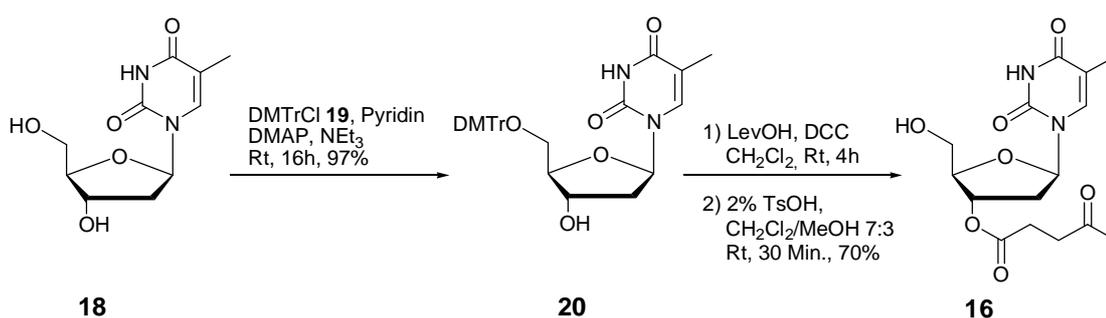
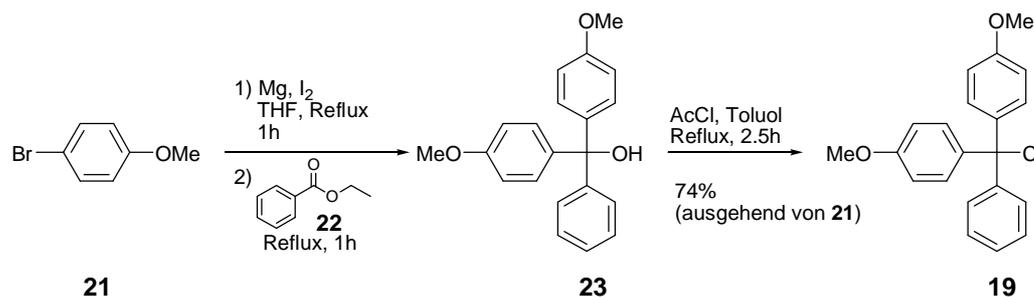
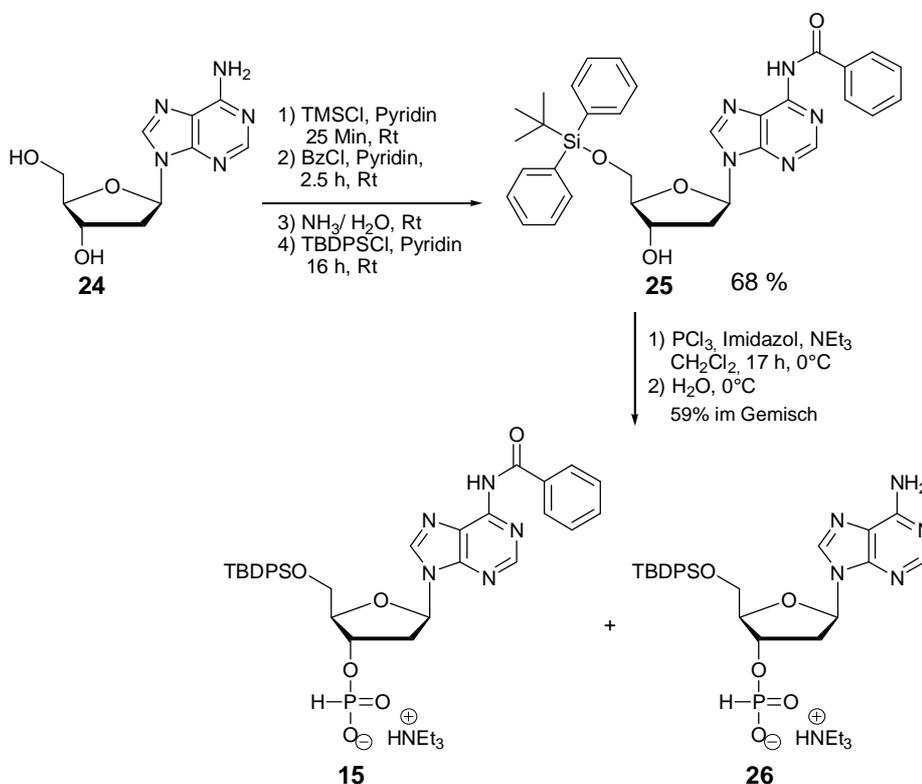


Abbildung 15 Synthese von 3'-O-Lev-dT **16**

4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid **19** kann einfach über eine Grignardreaktion von *p*-Bromanisol **21** mit Ethylbenzoat **22** zum Carbinol **23** und anschließender Chlorierung mit Acetylchlorid in großen Mengen dargestellt werden (Abbildung 16).

Abbildung 16 Darstellung von 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid **19**

*N*⁶-Benzoyl-5'-*O*-*tert*-butyldiphenylsilyl-2'-desoxyadenosin (5'-*O*-TBDPS-dA^{Bz}) **25** wurde ausgehend von 2'-Desoxyadenosin **24** über die „transient protection“-Methode nach Ti et al.^{103,104} mit Benzoylchlorid an der exocyclischen Aminogruppe geschützt und die 5'-OH-Gruppe anschließend mit TBDPSCI silyliert. Die anschließende Umsetzung mit PCl₃/Imidazol und Triethylamin in Dichlormethan zum H-Phosphonat **15** nach STAWINSKI et al.⁹⁵ erwies sich für das benzoylgeschützte 5'-*O*-TBDPS-dA^{Bz} **25** nicht als praktikabel. Es wurde stets eine Entschützung der Aminogruppe beobachtet und ein Gemisch aus TBDPS-dA^{Bz}-H-Phosphonat **15** und TBDPS-dA-H-Phosphonat **26** erhalten (Abbildung 17).

Abbildung 17 Versuch der Synthese von (5'-*O*-TBDPS-dA^{Bz})-Triethylammonium-phosphonat **15**

In Abbildung 18 ist ein ^1H -NMR Spektrum des Gemisches aus **15** und **26** dargestellt mit Ausschnittsvergrößerungen der $\text{H1}'$ - ($\delta = 6.60\text{--}6.49$ ppm), PH- ($\delta = 6.18, 6.20, 7.72, 7.75$ ppm) und *o*-Benzoyl-Protonen ($\delta = 8.02\text{--}8.01$). Aus den Integrationen der einzelnen Peaks lässt sich der Grad der Debenzoylierung bestimmen, der in Versuchsreihen aus dem Roh-NMR bestimmt wurde und nicht reproduzierbar zwischen 40 % und 70 % lag. Versuche, diese Reaktion zu optimieren (Variation der Konzentrationen, Zeit, Temperatur), schlugen fehl.

Chromatographisch ließ sich dieses Gemisch nicht trennen und auch eine anschließende nachträgliche Benzoylierung der Aminogruppe sowohl mit Benzoylchlorid als auch mit Benzoesäureanhydrid führte nicht zum Erfolg.

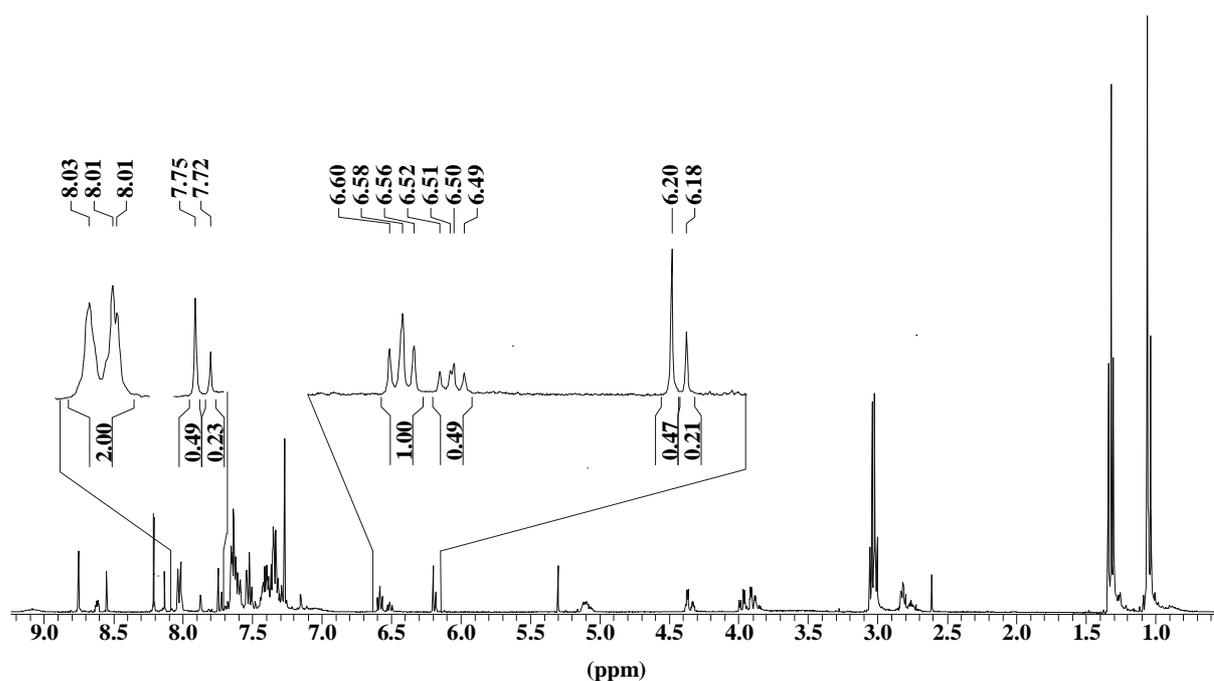


Abbildung 18 ^1H -NMR eines Reaktionsgemisches von **15** und **26**

Erst die Anwendung einer neueren Methode zur Darstellung von H-Phosphonaten durch Umsetzung mit Diphenylphosphit **33a** und anschließender Hydrolyse mit Triethylamin/Wasser erwies sich als synthetisch praktikabel.¹⁰⁵ Zusätzlich zu den sehr milden Reaktionsbedingungen ist diese Methode wesentlich einfacher und schneller in der Durchführung, Aufarbeitung der Reaktionsführung und Isolierung des H-Phosphonates. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung konnte für diese Reaktion eine sehr gute

Ausbeute von 95 % erreicht werden. Diphenylphosphit **33a** scheint ein geeignetes Syntheseäquivalent für Phosphonate zu sein und weitere methodische Ansätze zur Synthese dimerer Bausteine wurden in dieser Arbeit untersucht (Kapitel 4.1.4 & 4.1.5).

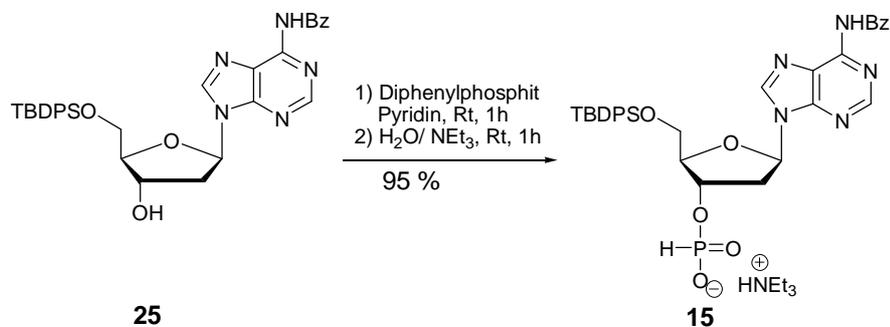


Abbildung 19 Synthese von (5'-O-TBDPS-dA^{Bz})-Triethylammoniumphosphonat **15**

Die anschließende Kupplung der Bausteine **15** und **16** gelang nach einer Methode von STAWINSKI et al, bei der Pivalinsäurechlorid als Kupplungsreagenz eingesetzt wurde.⁹⁵⁻¹⁰¹

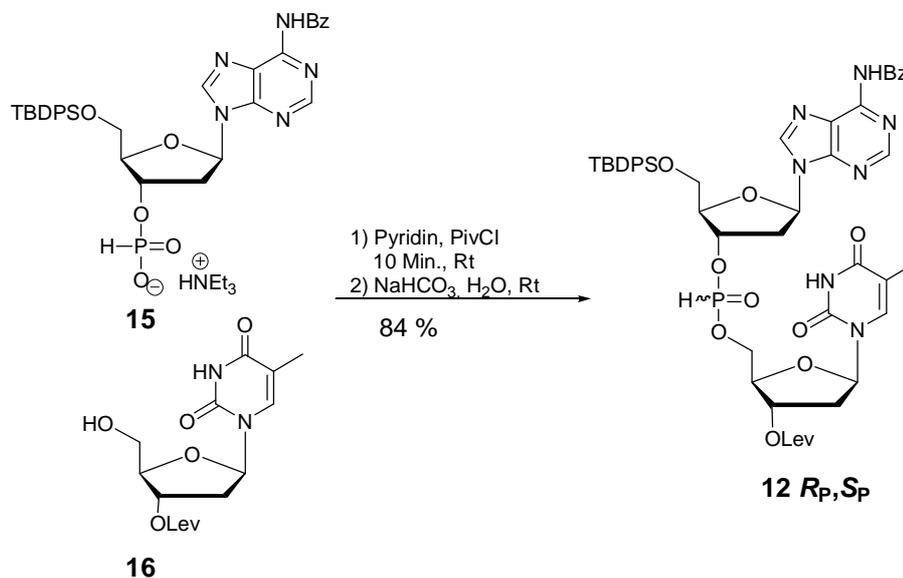


Abbildung 20 Synthese von (5'-O-TBDPS-dA^{Bz})-(3'-O-Lev-dT)-H-phosphonatdiester **12**

Untersuchungen zeigen, dass diese auf den ersten Blick einfache Reaktion sehr empfindlich gegenüber den verwendeten Reaktionsbedingungen ist. So ist es notwendig, zunächst die beiden Nucleoside zu lösen und erst anschließend das Kupplungsreagenz zuzugeben. Die Ausbeuten sinken beträchtlich, wenn die H-Phosphonatmonoester mit

dem Kupplungsreagenz voraktiviert werden, da es dann zu einer Überacylierung des H-Phosphonates kommt und keine Kupplungsreaktion mehr stattfinden kann.^{100,101} Ferner ist unter absolut wasserfreien Bedingungen zu arbeiten. So hat sich gezeigt, dass der gebildete H-Phosphonatdiester mit Wasser in Pyridin vollständig zum H-Phosphonatmonoester hydrolysiert. Ein weiterer entscheidender Punkt ist die Abwesenheit von Triethylamin aus der Reaktion zum H-Phosphonatmonoester. Es wurde für Aryl-H-phosphonatdiester gezeigt, dass diese dazu neigen, in Anwesenheit von Triethylamin eine Disproportionierung zum entsprechenden Phosphitriester und zum H-Phosphonatmonoester einzugehen.¹⁰⁶ Auch können H-Phosphonatdiester nach Deprotonierung eine Alkylgruppe auf Amine, Phosphonate und Alkohole übertragen (Abbildung 21).^{107,108,109} Neuere Veröffentlichungen behandeln den Lösungsmiteleinfluss auf die verschiedenen Nebenreaktionen.¹¹⁰

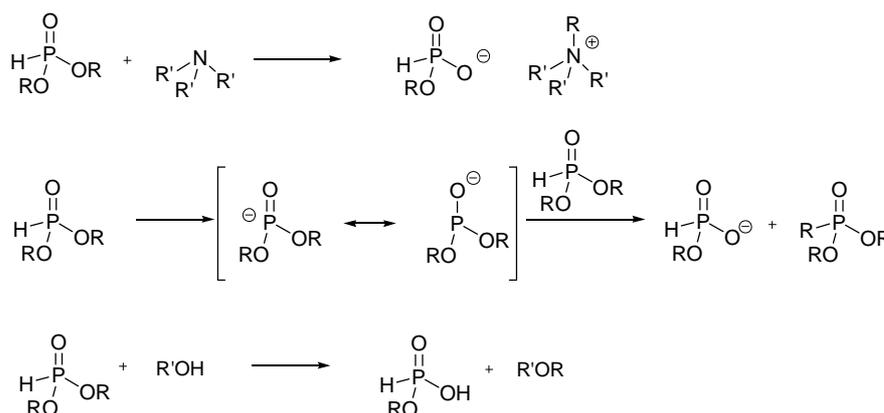


Abbildung 21 Alkylierung von Aminen, Phosphonaten und Alkoholen durch H-Phosphonate

In dieser Arbeit konnte die Kupplung von 5'-O-TBDPS-dA^{Bz}-Phosphonat **15** mit 3'-O-Lev-dT **16** in 84 %iger Ausbeute durchgeführt werden. Eine Ausbeuteminderung lässt sich zum einen durch die oben genannten Nebenreaktionen begründen. Aber auch eine Acylierung der geschützten exocyclischen Aminogruppe konnte beobachtet werden, was die Ausbeute erneut erniedrigte.

Durch die Kupplung wird am Phosphoratom ein neues Stereozentrum generiert, wodurch zwei zueinander diastereomere H-Phosphonatdinucleotide entstehen. Mittels ³¹P-NMR-Spektroskopie am Rohprodukt konnte gezeigt werden, dass bei der Reaktion kaum

Diastereoselektivität zu beobachten ist. Die Diastereomere **12R_P,S_P** entstehen im Verhältnis 1:1.27 (R_P:S_P) (55 % de), so dass eine leichte Induktion anzunehmen ist. Dies konnte aus dem Roh-³¹P-NMR entnommen werden, welches vor der chromatographischen Aufreinigung nach wässriger Aufarbeitung aufgenommen wurde (Abbildung 22). Die Diastereomere konnten mittels mehrfacher Säulenchromatographie an Kieselgel und stufenweiser Anreicherung voneinander getrennt und in reiner (de > 98 %) Form erhalten werden. Die Reinheit wurde über ³¹P-NMR-Spektroskopie bestimmt. Für die folgenden Synthesen wurden die getrennten Diastereomere eingesetzt.

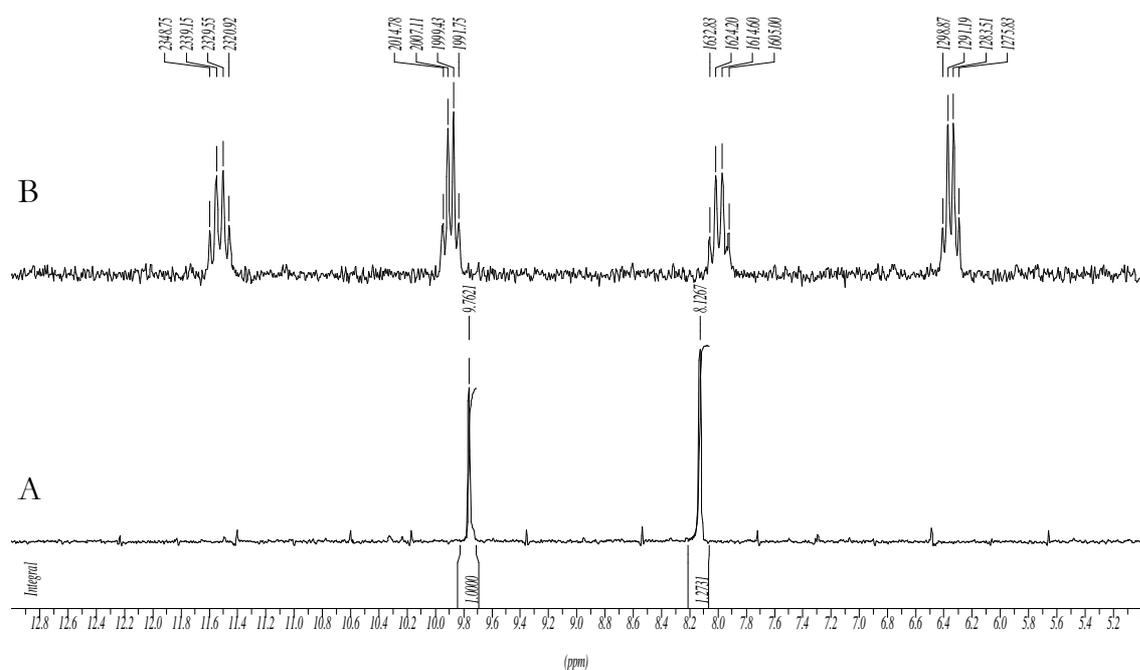


Abbildung 22 ³¹P-NMR der H-Phosphonatdinucleotide A) Entkoppelt B) Gekoppelt

Die absolute Konfiguration am Phosphorzentrum kann durch Methylierung des Phosphonates und anschließender ROE-Spektroskopie bestimmt werden. So haben SEELA et al. verschiedene H-Phosphonatdinucleotide synthetisiert, die Diastereomere getrennt und mit Butyllithium und Methyljodid in die entsprechenden Methylphosphonate überführt. Bei diesen diastereomerenreinen Methylphosphonaten wurden die absolute Konfiguration am Phosphor, die chemische ³¹P-NMR Verschiebung

und der R_f -Wert miteinander korreliert. Alle R_P -Isomere wiesen im Vergleich zu den S_P -Isomeren im ^{31}P -NMR eine Verschiebung zu höherem Feld und einen höheren R_f -Wert auf.^{111,112} Diese Beobachtungen wurden auch an von W. FENDRICH synthetisierten Verbindungen belegt.^{113,114}

In Anlehnung an diese Ergebnisse konnten die in dieser Arbeit getrennten H-Phosphonatdiester in Hinblick auf die absolute Konfiguration am P-Atom zugeordnet werden. So fand sich auch bei den (5'-O-TBDPS-dA^{Bz})-(3'-O-Lcv-dT)-H-Phosphonaten **12R_P,S_P** bei dem Diastereomer mit dem größeren R_f -Wert eine Verschiebung zu höherem Feld. Das ^{31}P -NMR-Signal des P_{fast} -Diastereomers hatte eine chemische Verschiebung von 9.8 ppm, während das P_{slow} -Diastereomer ein Signal bei 8.2 ppm aufwies. Im Kopplungsmuster der ^{31}P - ^1H -gekoppelten Spektren lassen sich die Kopplungen zu dem Proton H3' des dA^{Bz} ($^3J=7.8$ Hz) und zu den H5'a- und H5'b-Protonen des dT ($^3J=9.8$ Hz), sowie zu dem Proton des H-Phosphonates mit einer typischen Kopplungskonstante von $^1J_{P(\text{fast})}=716$ Hz, bzw. $^1J_{P(\text{slow})}=715$ Hz erkennen.

Diese Diastereomere werden im folgenden als $R_P(P_{\text{fast}})$ und das entsprechende Isomer als $S_P(P_{\text{slow}})$ bezeichnet. Bei dem hier synthetisierten H-Phosphonatdiester handelt es sich jedoch nicht um die Verbindungen die in den Arbeiten von SEELA et al. oder W. FENDRICH beschrieben wurden¹¹¹⁻¹¹⁴, da andere Schutzgruppen verwendet worden sind. In diesen Arbeiten wurde jedoch gezeigt, dass die Schutzgruppen an der 3'-O- und der 5'-O-Position keinen Einfluss auf die relativen Zuordnungen der Diastereomere haben.

Die basenkatalysierte Addition von H-Phosphonatdiestern an Aldehyde ist als PUDOVIC-Reaktion nach PATEL^{115,116} oder in einer ABRAMOV-Reaktion¹¹⁷ beschrieben. Im ersten reversiblen Schritt wird das Dialkylphosphit-Anion gebildet, welches das Carbonylkohlenstoff angreift und nach Reprotonierung das Hydroxybenzylphosphonat bildet. Bereits 1987 wurden für diese Reaktion Berechnungen der möglichen Übergangszustände angefertigt. Diese zeigten, dass überraschenderweise die Reaktion zur Bildung der PC-Bindung gegenüber der Bildung der PO-Bindung zum Phosphatriester begünstigt ist. Nachdem eine pentakovalente, verzerrte trigonal-bipyramidale Zwischenstufe aus der Addition des Phosphits an das Aldehyd durchlaufen wird, ist die Spaltung der PO-Bindung energetisch begünstigt. Für die Addition des

H-Phosphonatdinucleotides an 2-Nitrobenzaldehyd **13** zum α -Hydroxybenzylphosphonat **27_{R_P,S_P}** wurde die Variante nach PATEL gewählt.

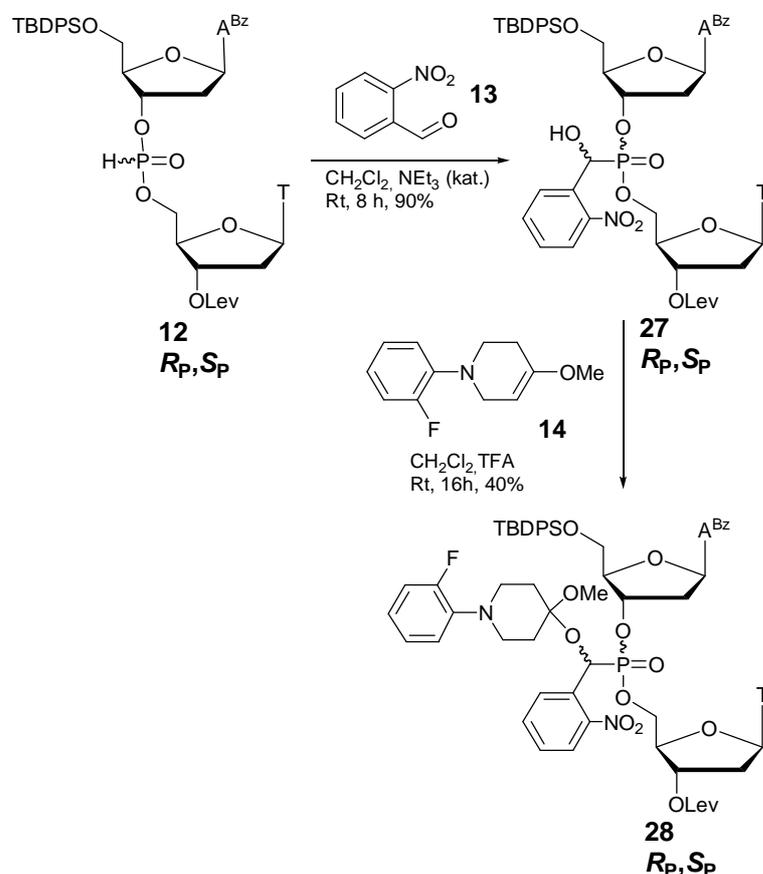


Abbildung 23 Synthese von (NO₂BnFpmpO)-Phosphonsäure-(5'-O-TBDPS-dA^{Bz})-(3'-O-Lev-dT)-diester **28_{R_P,S_P}**

Unter absolut wasserfreien Bedingungen wurde das H-Phosphonatdinucleotid **12_{R_P,S_P}** mit 2-Nitrobenzaldehyd **13** unter Basenkatalyse zur Reaktion gebracht und das resultierende α -Hydroxybenzylphosphonatdinucleotid **27_{R_P,S_P}** konnte in einer Ausbeute von 90% isoliert werden (Abbildung 23). Mit der Einführung der P-C-Bindung entsteht ein neues stereogenes Zentrum am α -C-Atom. Die so entstehenden Stereoisomere können mittels ³¹P-NMR nachgewiesen werden. Für jeden, bezüglich des Phosphoratoms stereoisomerenreinen α -Hydroxybenzylphosphonatdiestern **27_{R_P}**, bzw. **27_{S_P}** als Ausgangsverbindung wurden bei den α -Hydroxybenzylphosphonatdiestern **27** zwei Signale beobachtet. Dies ist ein Beleg für den Erhalt des Stereozentrums am Phosphoratom bei der Deprotonierung, da bei einer Racemisierung vier Signale im ³¹P-NMR-Spektrum beobachtbar sein müssten. Im Gegensatz zu den

H-Phosphonatdiestern **12R_P**,**S_P** weisen die (*R_P*)- α -Hydroxybenzylphosphonatdiester **27R_P** (21.8 ppm und 22.0 ppm) im Vergleich zu den (*S_P*)-Isomeren **27S_P** (22.31 ppm und 22.34 ppm) eine Hochfeldverschiebung auf. Zur Unterscheidung der Diastereomere, die durch das Stereozentrum am α -Kohlenstoff entstehen, wird im folgenden der R_f -Wert herangezogen. Die Diastereomere mit dem höheren R_f -Wert werden α -C_{fast} und die mit dem kleineren R_f -Wert α -C_{slow} genannt. Die Untersuchung des Stereozentrums am α -C-Atom sind Gegenstand weiterer Arbeiten im Arbeitskreis von C. MEIER.

Die anschließende Schützung der OH-Gruppe mit dem Fpmp-Enolether **14** gelang unter TFA-Katalyse nur in 40%iger Ausbeute (Abbildung 23). Die Ausbeute der Reaktion ließ sich trotz Variation der Äquivalente des Fpmp-Enolethers **14**, der Konzentration und Temperatur, sowie der Reaktionsführung unter Ultraschallbedingungen nicht steigern. Wird *p*-Toluolsulfonsäure eingesetzt so sinken die Ausbeuten weiter und auch die chromatographische Aufarbeitung ist erschwert. Auf der Stufe der α -Hydroxy-2-nitrobenzylphosphonate **27R_P**,**S_P** und der Fpmp-geschützten Phosphonate **28R_P**,**S_P** ließ sich dünnschichtchromatographisch keine Trennung der Diastereomere erkennen, so dass diese als Diastereomeregemische weiter umgesetzt wurden.

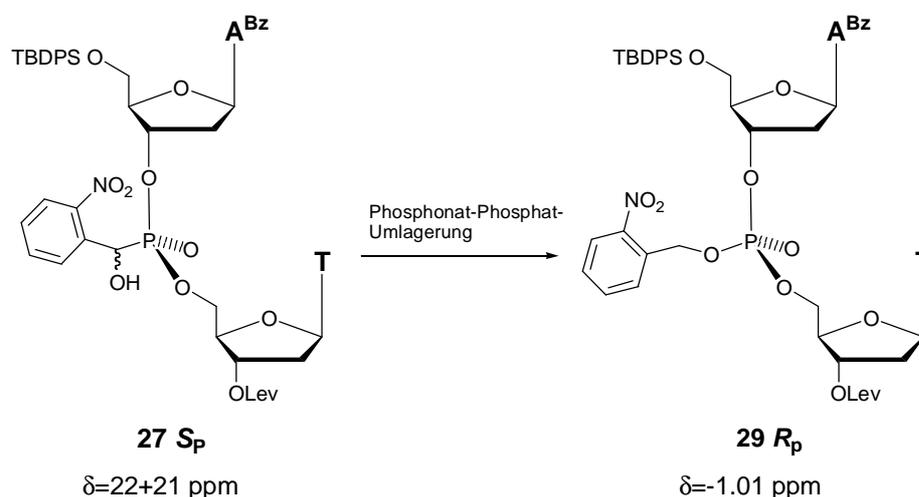


Abbildung 24 Phosphonat-Phosphat Umlagerung

α -Hydroxy-2-nitrobenzyl-phosphonate gehen im Basischen bei Anwesenheit katalytischer Mengen Wasser eine sehr schnelle Phosphonat-Phosphat-Umlagerung zum Phosphatriester ein (Kapitel 2.4, Abbildung 9). Als Nebenreaktion wurde stets diese Umlagerungsreaktion beobachtet und der Phosphatriester **29R_P**,**S_P** konnte in minimalen Mengen isoliert werden. Durch ³¹P-NMR-Spektroskopie wurde der Phosphatriester

29R_P,S_P bei einer für die Substanzklasse typischen chemischen Verschiebung von $\delta = -1.01$ ppm detektiert und auch das ¹H-NMR-Spektrum weist bei 5.5 ppm ein Dublett, dessen Integral auf zwei benzyliche Protonen schließen lässt. Durch ein einziges Singulett im ³¹P-NMR-Spektrum konnte gezeigt werden, dass ein stereochemisch einheitlicher Benzylphosphatdiester isoliert werden konnte. Im Vorläufermolekül, dem α -Hydroxybenzylphosphonat **28R_P,S_P**, war nur die Stereochemie am Phosphoratom einheitlich, während bezüglich des α -C-Atoms ein racemisches Gemisch vorlag. Der Phosphatdiester muss aber durch die oben erwähnte Phosphonat-Phosphat Umlagerung gebildet worden sein. Bei der Umlagerung spielt folglich die Konfiguration am α -C-Atom keine Rolle. Der stereochemische Verlauf dieser Umlagerung ist in Abbildung 24 dargestellt. Da bei dieser Reaktion keine Racemisierung am Phosphorzentrum auftritt, stellt diese Reaktion einen neuen Zugang zu stereochemisch einheitlichen Phosphatdiestern dar. Ähnliche Befunde über die Stereoselektivität dieser Phosphonat-Phosphat Umlagerung haben bereits HAMMERSCHMIDT et al. gefunden.¹¹⁸

Aufgrund der auftretenden Umlagerungsreaktion wurde versucht, die PUDOVIC-Addition säurekatalysiert durchzuführen. Auch wäre so direkt ein weiterer Umsatz mit Fpmp-Enolether **14** in einer Eintopfreaktion möglich. Eine säurekatalysierte PUDOVIC-Addition an Diphenylphosphit **33a** wurde erfolgreich in dieser Arbeit durchgeführt (Kapitel 4.1.4.1) konnte jedoch nicht auf den (5'-O-TBDPS-dA^{Bz})-(3'-O-Lev-dT)-H-Phosphonatester **12** übertragen werden (Abbildung 25).

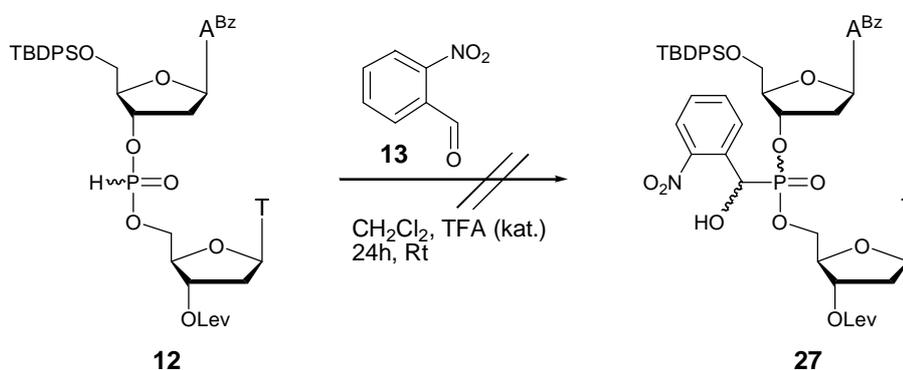


Abbildung 25 Versuch der säurekatalysierten PUDOVIC-Addition an 5'-O-TBDPS-dA^{Bz}-3'-O-Lev-dT-H-Phosphonatester **12**

Die 2-Nitrobenzylgruppe stellt eine von PFLEIDERER et al. entwickelte photolabile Schutzgruppe dar.¹¹⁹ Beim Umgang mit den so modifizierten Dinucleotiden ist eine zu lange Exposition gegenüber Licht, oder gar UV-Licht zu vermeiden. Unter der UV-Lampe wurde sowohl in DC-Experimenten, als auch bei chromatographischen Aufreinigungen am Chromatotron und längerem Stehen im Kolben an Licht eine Zersetzung beobachtet, so dass alle 2-Nitrobenzylphosphonat modifizierten Dinucleotide und im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Bausteine ausschließlich säulenchromatographisch gereinigt und unter Lichtausschluss aufbewahrt werden mussten.

Die temporäre Silylschutzgruppe an 5'-Position wurde mit Triethylamin-Trihydrofluorid in sehr guter 91 %iger Ausbeute entfernt, um im Anschluss daran diese Position mit der für die Oligonucleotidsynthese benötigten DMTr-Schutzgruppe mit 90 % -98 % Ausbeute zu versehen (Abbildung 26).

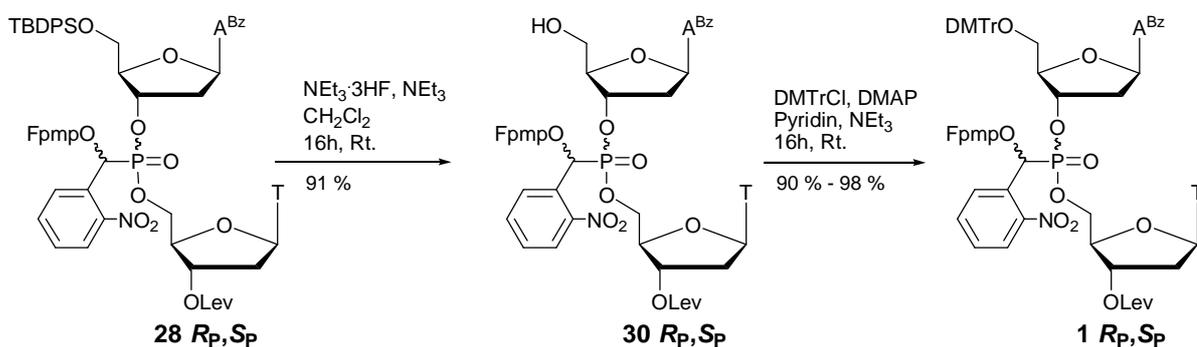


Abbildung 26 Synthese von (NO₂BnFpmpO)-Phosphonsäure-(5'-O-DMTr-dA^{Bz})-(3'-O-Lev-dT)-ester **1_{R_P,S_P}**

Levulinylester können selektiv und unter sehr milden Bedingungen mit Hydrazinhydrat in Pyridiniumacetat-Puffer entfernt werden. Hierbei wird zunächst der 5-Hydrazonopentansäureester gebildet, welcher dann in einer intramolekularen Reaktion den Ester zum 6-Methyl-4,5-dihydro-2H-pyridazin-3-one spalten kann. Dies gelang in einer 5-minütigen Reaktion und das Phosphonatdinucleotid **2_{R_P,S_P}** konnte in excellenter 99%iger Ausbeute erhalten werden (Abbildung 27). Diese Bausteine konnten bezüglich des Stereozentrums am Phosphor diastereomerenrein erhalten und zu den Bausteinen für die DNA-Synthese umgesetzt werden.

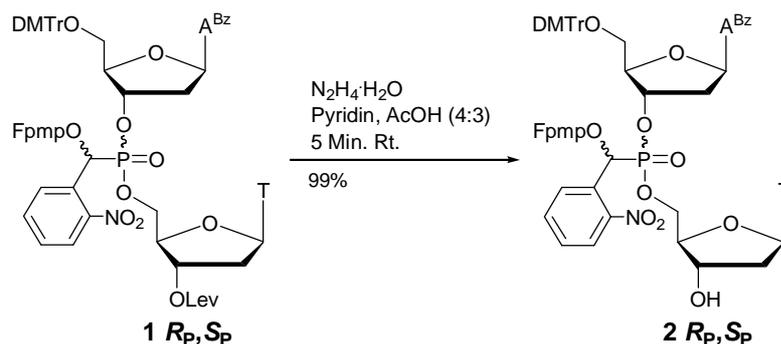


Abbildung 27 Synthese von (NO₂BnFpmpO)-phosphonsäure-(5'-O-DMTr-dA^{Bz})-(3'-OH-dT)-diester **2R_P,S_P**

Die Phosphonatdinucleotide **2R_P,S_P** wurden mit Bernsteinsäureanhydrid zum 3'-O-Bernsteinsäureester **31R_P,S_P** und anschließend mit Aminopropyl-CPG (550 Å), Benzotriazol-1-yl-*N,N,N',N'*-tetramethylharnstoff-tetrafluoroborat (TBTU) und *N*-Ethylmorpholin zu den succinylverbrückten, festphasengebundenen Startbausteinen **4R_P,S_P** für die DNA-Synthese umgesetzt. Es wurden Belegungen der Festphase zwischen 16 μmol/g und 26 μmol/g erhalten. Der Einsatz an 3'-O-Bernsteinsäureester **31R_P,S_P** konnte auf 20 μmol pro 100 mg 550 Å CPG-Support reduziert werden um eine optimale Belegungsrate pro eingesetzter Menge an Dinucleotid zu erreichen. Kommerziell verfügbare unmodifizierte CPG-gebundene Nucleoside sind mit einer Belegung von ca. 40 μmol/g erhältlich. Es wurde auf eine höhere Trägerbeladung verzichtet, um einen großen Überschuss an dem langwierig zu synthetisierenden (NO₂BnFpmpO)-phosphonsäure-(5'-O-DMTr-dA^{Bz})-(3'-OH-dT)-diester **2** zu vermeiden. In Reaktionen von 5'-O-DMTr-dT mit 550 Å CPG-Support wurden mit der hier vorgestellten Methode Belegungsraten von 38 μmol/g bei einem Verhältnis von 1 mmol pro 100 mg CPG-Support erreicht.

Durch Reaktion mit Bis-(diisopropylamin)-2-cyanoethyl-phosphit und Aktivierung durch Dicyanoimidazol wurden nach chromatographischer Aufreinigung an Aluminiumoxid die Phosphoramidit-Bausteine **3R_P,S_P** erhalten (Abbildung 28). Die Reaktion wurde mit der 2.5 molaren DCI Lösung des DNA-Syntheseautomaten durchgeführt und bereits nach 20 Minuten konnte kein Edukt mehr detektiert werden. Nach chromatographischer Reinigung an Aluminiumoxid wurden keine H-Phosphonate mehr detektiert.

Die so synthetisierten, bezüglich des Phosphors stereoisomerenreinen, Bausteine wurden in der automatisierten DNA-Festphasensynthese eingesetzt und Oligonucleotide mit R_P , bzw. S_P -Modifikationen erhalten (Kapitel 4.4)

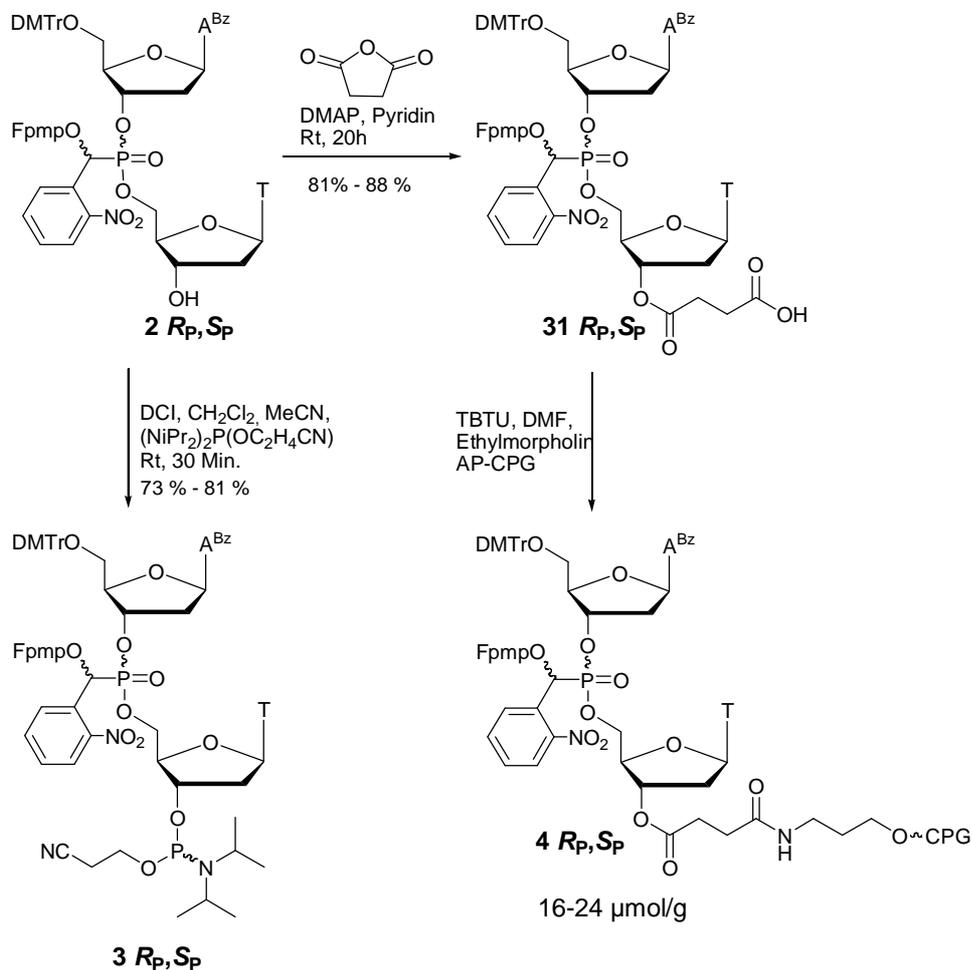


Abbildung 28: Synthese der Succinyl-AP-CPG **4 R_P, S_P** und Phosphoramidit Bausteine **3 R_P, S_P**

4.1.3 Syntheseplanung α -Hydroxybenzylphosphonat-modifizierter Dinucleotidbausteine (Variante B)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neben der Synthese modifizierter Adenosyl-Thymidyl dinucleotide (Kapitel 4.1.2) konzeptionelle Untersuchungen für neue Synthesemöglichkeiten α -Hydroxybenzylphosphonat-modifizierter Dinucleotidbausteine durchgeführt. Für einen universellen Einsatz in einer Vielzahl biologisch relevanter Sequenzen ist die Synthese 16 verschiedener α -Hydroxybenzylphosphonat-modifizierter Dinucleotide als Bausteine für die DNA Synthese notwendig. Ein großer Nachteil der bisherigen Syntheseroute ist deren Linearität. Die Nucleosidkombination ist durch den

Aufbau des H-Phosphonatdinucleotides **12** bereits zu Beginn der Synthesesequenz festgelegt und dieses Dinucleotid muss die ganze folgende Synthese bearbeitet werden. Ein weiterer Nachteil dieser Synthese ist die Notwendigkeit, die 5'-O-Position im Laufe der Synthese umzuschützen und eine Silylschutzgruppe gegen eine DMTr-Schutzgruppe auszutauschen. Die Gesamtausbeute über alle 10 Synthesestufen ausgehend von *N*⁶-Benzoyl-2'-desoxyadenosin **24a** und 3'-O-Levulinylthymidin **16** zum 5'-O-DMTr und 3'-O-Levulinyl geschützten α -Hydroxybenzylphosphonatdinucleotid **2** beträgt lediglich 15 %. Für jedes Dinucleotid muss die gesamte Synthese durchgeführt werden, was sehr aufwendig, langwierig und letztlich sehr kostenintensiv ist. Sollen eine Vielzahl modifizierter Oligonucleotide synthetisiert und untersucht werden, so ist ein schneller und effizienter Zugang zu allen 16 möglichen Dinucleotiden notwendig. Gelingt es einen Precursor zu synthetisieren, der die α -Hydroxybenzylphosphonatmodifizierung trägt und sich in zwei Kupplungsschritten selektiv mit den gewünschten Nucleosiden verknüpfen lässt, so lässt sich ein universelles und flexibles Synthesekonzept entwickeln.

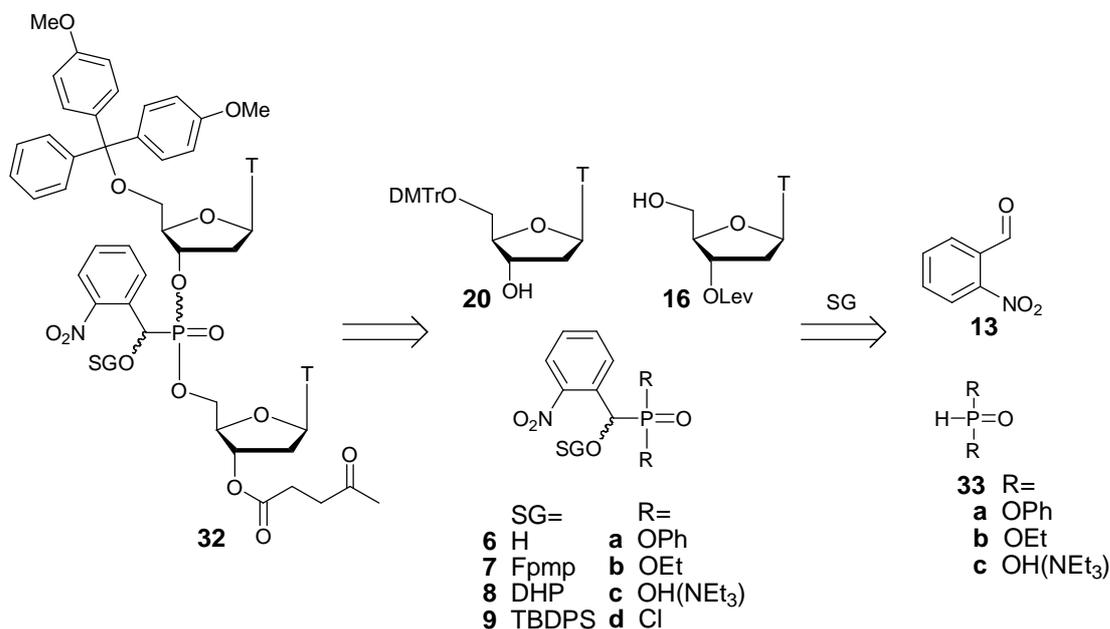


Abbildung 29 Syntheseplanung des dimeren α -Hydroxybenzylphosphonat-Bausteines **32** (Variante B)

Die Grundidee der neuen Synthesvariante (Abbildung 29) besteht darin, einen aktivierten Phosphonat-Baustein synthetisieren, bei dem gute Austrittsgruppen vorhanden sind (z.B. Chlorid, Oxybenzotriazol, Phenoxy) oder generiert werden können (z.B. aus der Säure, aus dem Ethylester), welche abschließend idealerweise selektiv substituiert werden.

Auch hier soll das Phosphonatdinucleotid an 5'-Position mit der DMTr-Schutzgruppe und an 3'-Position mit der Levulinylschutzgruppe versehen werden (vgl. Kapitel 4.1.1). Dieser Baustein sollte analog zur PUDOVIC-Reaktion in Abbildung 23 durch säure- oder basenkatalysierte Addition der entsprechenden H-Phosphonate zugänglich sein.

4.1.4 Synthese von α -Hydroxybenzylphosphonat-Bausteinen (Variante B)

4.1.4.1 Synthese über Phosphonsäurediphenylester

Wie bereits in Kapitel 4.1.2 gezeigt wurde, kann Diphenylphosphit **33a** sehr leicht und nahezu quantitativ mit Nucleosiden umgeestert werden, um das gewünschte H-Phosphonatnucleotid zu erhalten. Eine vorherige Modifizierung und anschließende Umesterung durch Substitution der Phenole (R= OPh) sollte einen vielversprechenden Zugang darstellen (Abbildung 30)

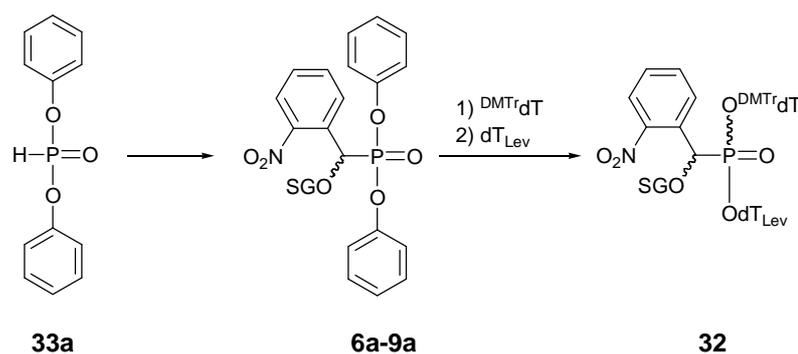


Abbildung 30 Synthesepfad: α -Hydroxybenzylphosphonatdinucleotidsynthese über den Diphenylphosphonatprecursor **32**

Wie bei der Synthese des modifizierten Adenosyl-Thymidyl Dinucleotides bereits dargelegt wurde, können H-Phosphonate unter Basenkatalyse in einer PUDOVIC-Reaktion mit 2-Nitrobenzaldehyd **13** zum (Hydroxy-(2-nitrophenyl)-methyl)-phosphonat **6a** umgesetzt werden (Kapitel 4.1.2). Ferner wurde gezeigt, dass sich Nucleoside mit Diphenylphosphit **33a** zum Dinucleosyl-H-Phosphonat kuppeln lassen. Ein modifizierter α -Hydroxybenzylphosphonat Baustein **7a-9a** sollte sich auch mit Alkoholen in einer entsprechenden Kupplungsreaktion umsetzen lassen. Bei der Umsetzung von Diphenylphosphit **33a** mit 2-Nitrobenzaldehyd **13** unter Basenkatalyse besteht allerdings die Gefahr von Nebenreaktionen durch Kupplung der entstehenden Hydroxygruppe mit dem Diphenylphosphit. Außerdem disproportionieren Aryl-H-phosphonate unter

Basenkatalyse zum entsprechenden Phosphitriester und zum H-Phosphonatmonoester und können als Alkylierungs-/Arylierungsagenzien wirken.^{106,108} Es musste daher ein Reaktionsweg nach einer modifizierten PUDOVIC-Reaktion unter Säurekatalyse gefunden werden. Diphenylphosphit **33a** wurde mit 2-Nitrobenzaldehyd **13** in Toluol und katalytischen Mengen Trifluoressigsäure (TFA) zum (NO₂BnOH)-Phosphonsäurediphenylester ($\delta = 13.8$ ppm) **6a** umgesetzt (Abbildung 31, Abbildung 34A). Mit Dichlormethan oder THF als Lösungsmittel und Toluol-4-sulfonsäure war sowohl der Umsatz als auch die Aufarbeitung schlechter.

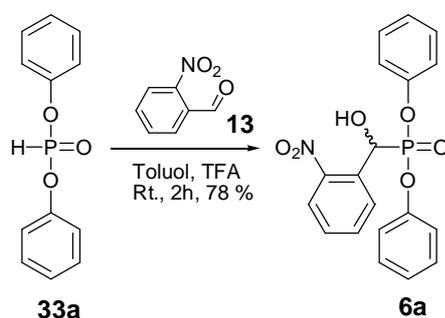


Abbildung 31 Synthese von (NO₂BnOH)-Phosphonsäurediphenylester **6a**

Die anschließende Schützung der Hydroxygruppe mit 3,4-Dihydro-2H-pyran (DHP) **35** und TFA in Dichlormethan und anderen Lösungsmitteln verlief zunächst erfolglos. Es konnte keinerlei Umsatz beobachtet werden. Um eine eventuelle Abspaltung der Schutzgruppe unter sauren Bedingungen zu verhindern wurde die Reaktion mit Triethylamin abgebrochen. Es kam jedoch zur Phosphonat-Phosphat-Umlagerung des α -Hydroxybenzylphosphonates **6a** (Abbildung 32), wobei ausschließlich 2-Nitrobenzyl-diphenylphosphattriester **34** mit einer chemischen Verschiebung von $\delta = -10.5$ ppm gebildet wurde (Abbildung 34B).

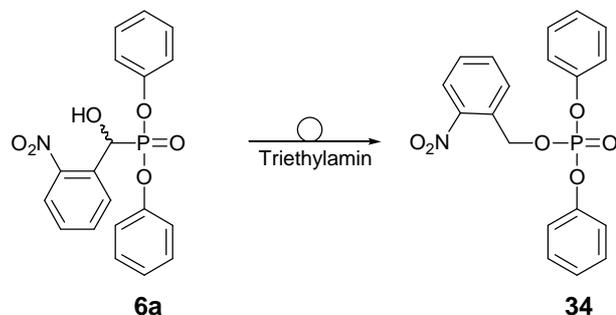


Abbildung 32 Phosphonat-Phosphat-Umlagerung von (NO₂BnOH)-phosphonsäurediphenylester **47**

Erst unter Ultraschallbedingungen konnte das α -Hydroxybenzylphosphonat **6a** mit DHP **35** und Fpmp-Enoether **14** zu den Acetalen **7a** (Abbildung 34C) und **8a** in sehr guten Ausbeuten umgesetzt werden (Abbildung 33). Bei dem THP-geschütztem Derivat sind im ^{31}P -NMR-Spektrum die beiden Diastereomerenpaare bei chemischen Verschiebungen von $\delta=12.1$ ppm und 12.0 ppm zu erkennen.

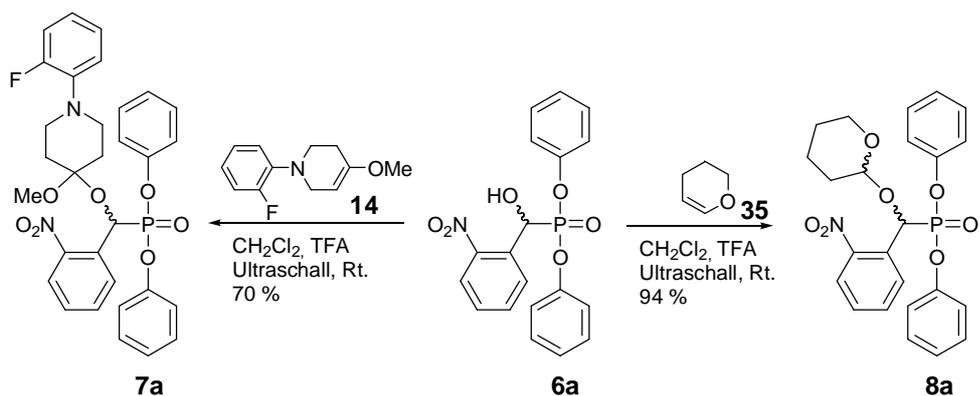


Abbildung 33 Synthese von $\text{NO}_2\text{BnFpmpO}$ -phosphonsäurediphenylester **7a** und $\text{NO}_2\text{BnFpmpO}$ -phosphonsäurediphenylester **8a**

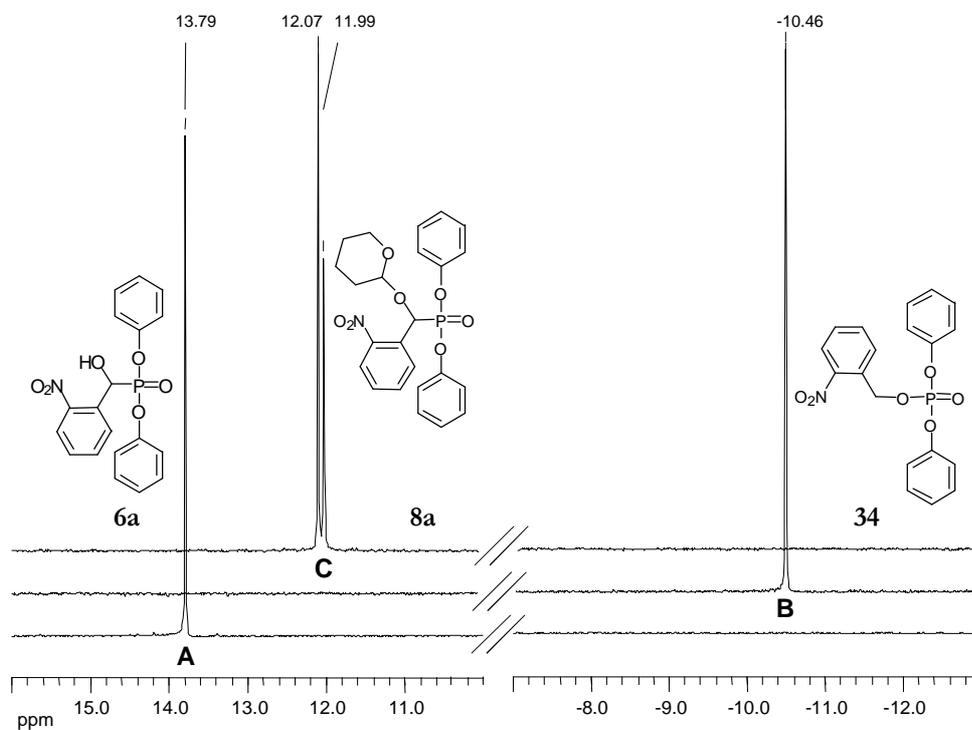
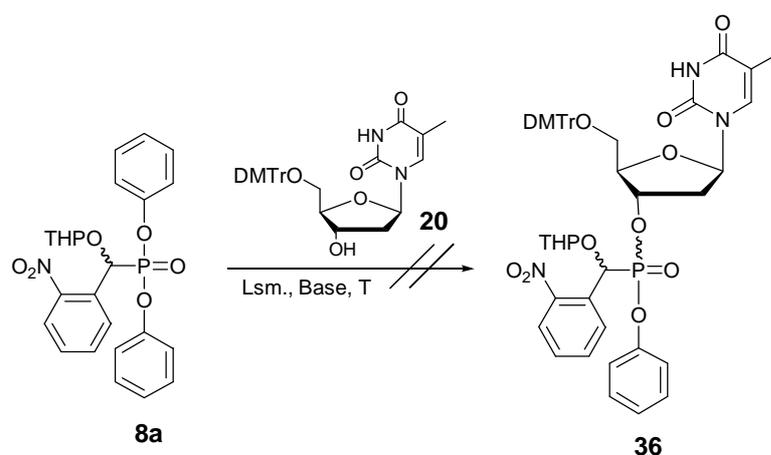


Abbildung 34 ^{31}P -NMR Spektren der Synthese von NO_2BnTHPO -phosphonsäurediphenylester **8a**

Anschließende Versuche den geschützten Hydroxybenzylphosphonatdiphenylester **7a,8a** mit 5'-O-DMTr-dT **20** umzusetzen schlugen jedoch fehl (Abbildung 35). In der Literatur sind vereinzelt Bedingungen zum Umestern von Diphenylphosphonaten beschrieben.^{120,121} Ausgehend von den Standardbedingungen zur Kupplung von Alkoholen mit Diphenylphosphit in Pyridin wurden verschiedene Basen und Lösungsmittel verwendet, jedoch konnte keine Reaktion beobachtet werden und das Edukt wurde reisoliert, bzw. ein nicht identifizierbares Reaktionsgemisch erhalten.



Base	Lösungsmittel	Temperatur	Reaktion
Pyridin	Pyridin /Triethylamin	Rt /Ultraschall	keine
Triethylamin	Dichlormethan	Rt /Ultraschall	keine
DBU	Dichlormethan	Rt /Ultraschall	keine
LDA	THF	Rt	keine
NaH	THF	0°C-Rt	Reaktionsprodukt(e) nicht identifizierbar
<i>n</i> BuLi	THF /Hexan	-40°C	keine
<i>n</i> BuLi	THF/Hexan	Rt	Reaktionsprodukt(e) nicht identifizierbar
Lewisäure			
MgBr ₂	DMF + Dioxan	Rt	keine

Abbildung 35 Versuche zur Darstellung von (NO₂BnTHPO)-phosphonsäure-(5'-O-DMTr-dT)-phenylester **36**

Es wurde außerdem versucht, unter oben genannten Bedingungen, eine Umsetzung mit Methanol, bzw. *iso*-Propanol zu erreichen, jedoch gelang eine Reaktion des (NO₂BnTHPO)-phosphonsäurediphenylesters **8a** ausschließlich mit Natriummethylat in

THF zum (NO₂BnTHPO)-phosphonsäuredimethylester **8e**. Eine Umsetzung mit einem zuvor generierten Thymidinalkoholat gelang nicht.

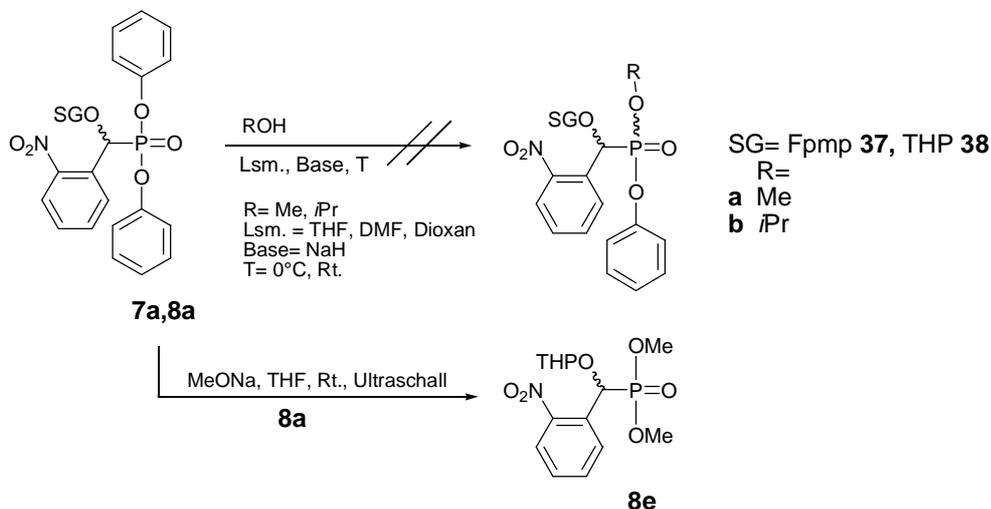


Abbildung 36 Versuche zur Umesterung der Diphenylphosphonate **7a** und **8a**

Aufgrund der Erniedrigung der p_{π} - d_{π} -Wechselwirkung durch die Phenylgruppen müsste die Reaktion nach einem S_NP-Mechanismus verlaufen.^{108,109} Da hier kein Tautomerengleichgewicht zur trivalenten Phosphitform vorliegen kann, ist die Substitution sehr ungünstig (vgl. auch Kapitel 4.1.4.3, Seite 49).

KAFARSKI et al. haben eine Methode zur Umesterung von Diphenylphosphonaten beschrieben, bei der KF/[18]-Krone-6 mit Alkoholen eingesetzt wird (Abbildung 37).^{122,123,124}

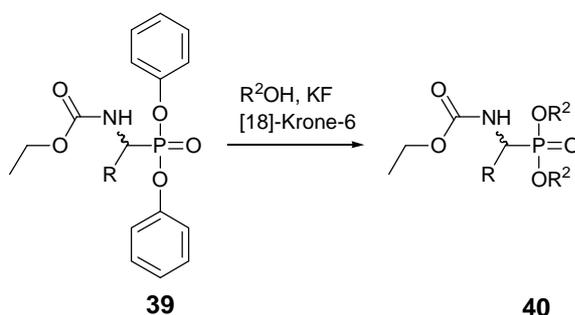


Abbildung 37 Umesterung von Diphenylphosphonaten nach KAFARSKI et al.

Analog zu diesen Arbeiten wurde (NO₂BnTHPO)-phosphonsäurediphenylester **8a** in Methanol, bzw. *iso*-Propanol in Gegenwart von KF/[18]-Krone-6 umgesetzt. Es konnte

das Dimethylphosphonat **8e**, bzw. das Phenyl-*iso*-propyl-phosphonat **38b** isoliert werden. (Abbildung 38).

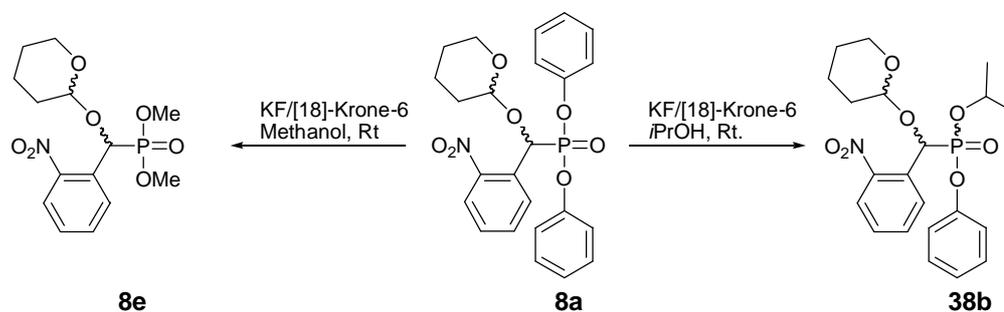


Abbildung 38 Umesterung von NO₂BnTHPO-phosphonsäurediphenylester **48** mit Methanol, bzw. *iso*-Propanol in Gegenwart von KF/[18]-Krone-6

Eine Umsetzung mit 5'-O-DMTr-dT in Gegenwart von KF/[18]-Krone-6 gelang jedoch nicht und dieser Ansatz zur Synthese modifizierter Dinucleotide wurde nicht weiter verfolgt.

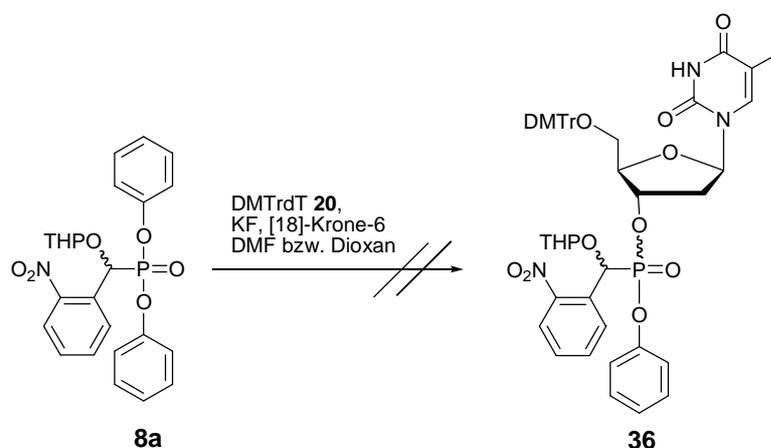


Abbildung 39 Versuch der Darstellung von NO₂BnTHPO-(5'-O-DMTr-dT)-phenylphosphonsäureester **36**

4.1.4.2 Synthese über Phosphonsäurechloride

In einer Arbeit von BERGSTROM und SHUM wurden Fluoralkylphosphonsäurediethylester mit Thionylchlorid chloriert und zu Bis-(oxybenzotriazol) (OBt) Estern umgesetzt, welche als aktivierte Phosphonate nacheinander mit zwei verschiedenen Nucleosiden zum Phosphonatdinucleotid umgesetzt wurden (Abbildung 40A).¹⁰² Gelingt es

Diethylphosphit als α -Hydroxybenzylphosphonat zu modifizieren und anschließend zu chlorieren (R=Cl) ist dies eine Möglichkeit zu einer neuen Synthese (Abbildung 40B).

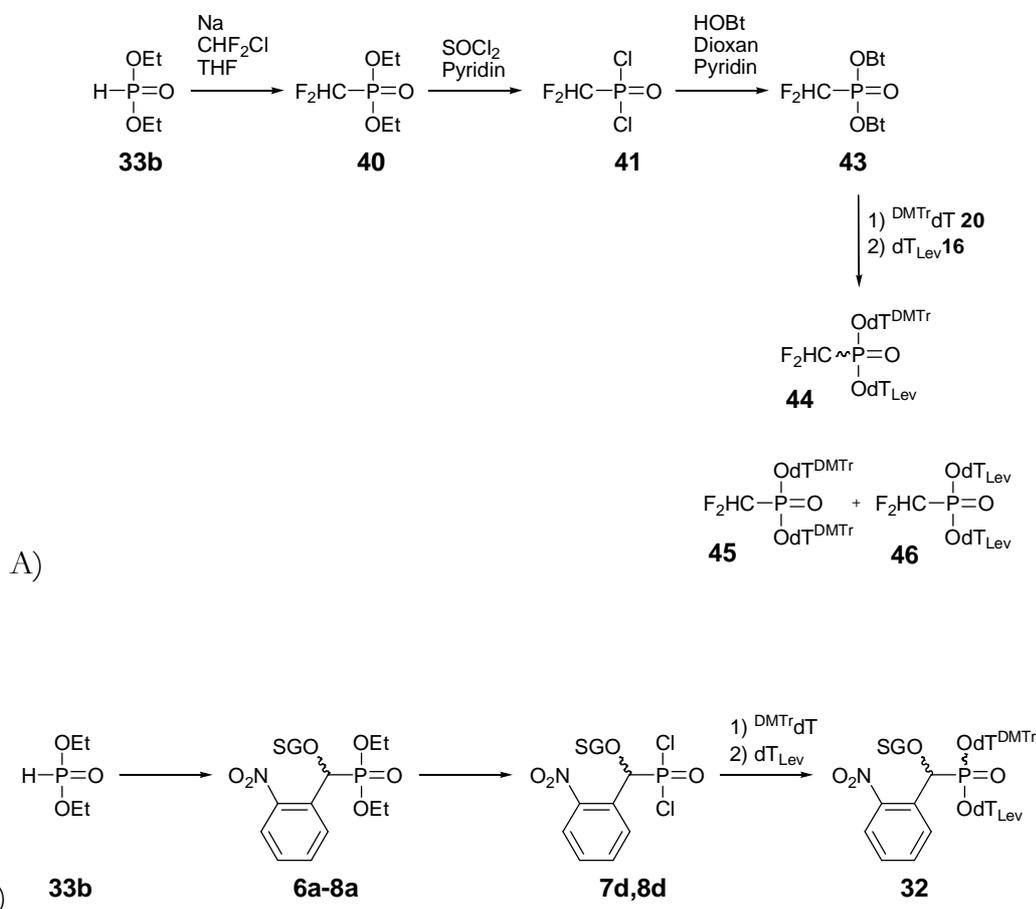


Abbildung 40 A) SHUM et al. B) Syntheseplan: Synthese über Diethylphosphonatprecursor

Eine direkte Chlorierung mit Oxalylchlorid, SOCl_2 , PCl_3 oder PCl_5 ist nicht sehr erfolgversprechend, da hierbei immer HCl entsteht, welches die acetalische Schutzgruppe, bzw. die säurelabile DMTr-Schutzgruppe spalten könnte. Eine elegante Methode ist von NEIDLEIN et al. 1993 beschrieben worden, bei der ein Phosphonsäurediethylester zunächst mit Trimethylsilylbromid (TMSBr) in den entsprechenden Phosphonsäurebis(trimethylsilyl)-ester und Ethylbromid überführt und anschließend mit PCl_5 chloriert wird, wobei TMSCl und POCl_3 als Reaktionsprodukte entstehen.¹²⁵

Zunächst wurde (NO_2BnOH) -diethylphosphonat **6b** aus Diethylphosphit **33b** und 2-Nitrobenzaldehyd **13** unter Triethylaminkatalyse synthetisiert und anschließend die Hydroxyfunktion säurekatalytisch unter Ultraschallbedingungen als THP-**8b**, bzw. Fpmp-

Acetal **7b** geschützt. Auch hier gelang die Umsetzung mit den Enolethern Fpmp-Enolether **14** und DHP **35** unter TFA-Katalyse nur unter Ultraschallbedingungen.

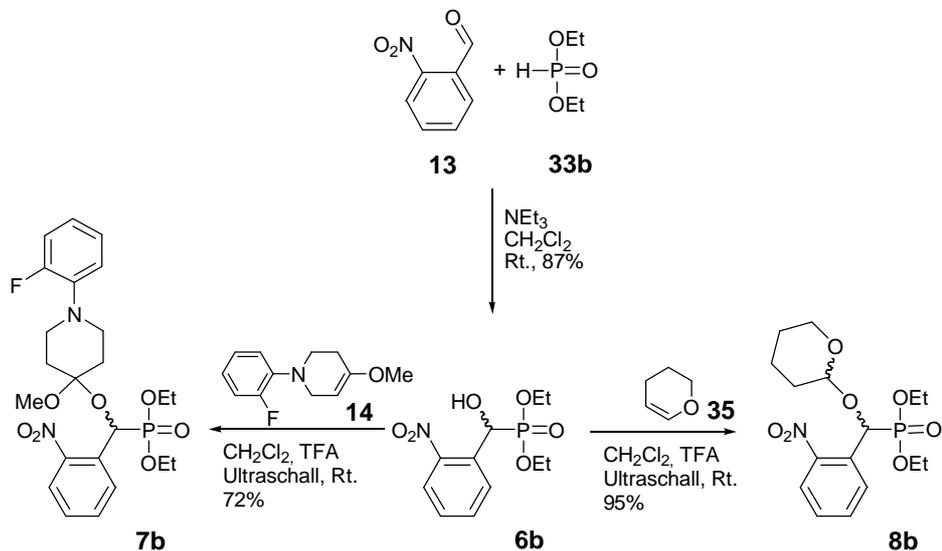


Abbildung 41 Synthese von (NO₂BnOH)-phosphonsäurediethylester **6b**, (NO₂BnFpmpO)-phosphonsäurediethylester **7b** und (NO₂BnTHPO)-phosphonsäurediethylester **8b**

Im Gegensatz zur säurekatalysierten Variante der PUDOVIC Reaktion von 2-Nitrobenzaldehyd **13** mit Diphenylphosphit **33a** (Kapitel 4.1.4.1) gelingt die Phosphitaddition mit Dialkylphosphiten (Diethyl, Dinucleosyl) nur unter basenkatalysierten Reaktionsbedingungen (Abbildung 42).

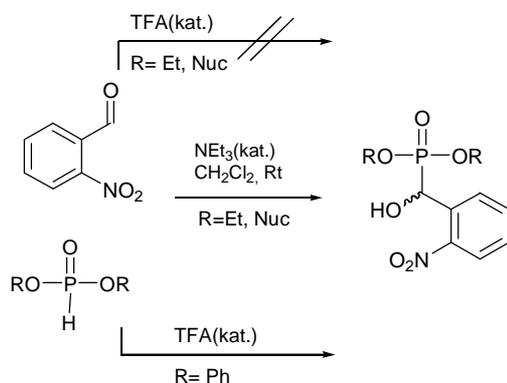


Abbildung 42 Säure- und basenkatalysierte PUDOVIC-Addition

Der Grund ist in den unterschiedlichen Mechanismen der Phosphitaddition zu finden (Abbildung 43). H-Phosphonate können deprotoniert werden und ein gutes C-Nucleophil

wird generiert, welches sich an Aldehyde addieren kann. Unter sauren Bedingungen wird die Tautomerisierung zum Phosphit katalysiert, welches dann an den protonierten Aldehyd addieren kann. Die Lage des Tautomerengleichgewichtes hängt von der Basizität des Phosphites ab. Elektronenschiebende Alkylreste erhöhen die Basizität des Phosphors und ermöglichen so eine Protonierung und die Verschiebung des Gleichgewichtes auf die Seite des Phosphonates. Elektronenziehende oder aromatische Reste verringern die Elektronendichte am Phosphoratom und verschieben so das Gleichgewicht auf die Seite des Phosphites. Der Einfluss des Restes auf die Basizität konnte in Untersuchungen an Trialkylphosphiten gezeigt werden.¹²⁶

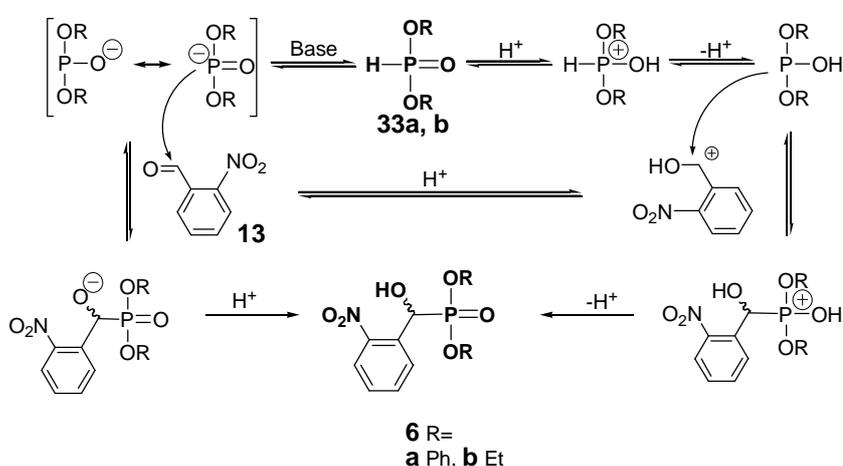


Abbildung 43: Mechanismus der säure- und basenkatalysierten PUDOVIC-Reaktion

Die folgende Umsetzung mit TMSBr in Dichlormethan führt zum Disilylester **7f** und entstehendes Bromethan kann im Vakuum zusammen mit dem Lösungsmittel entfernt werden. Nach Zugabe von PCl₅ in Dichlormethan und Entfernen des entstandenen TMSCl und POCl₃ konnte eine Umsetzung zum Chlorid **7d** und mit Methanol zum Dimethylester **7e** erreicht werden.

Es wurde gezeigt, dass dieser Ansatz funktioniert und eine Umesterung des Diethylphosphonates möglich ist. In folgenden Arbeiten müsste diese Syntheseroute, mit deren Hilfe in einer schnellen und einfachen Reaktionsfolge eine zweifache Umesterung durchzuführen sein könnte, auf die Synthese gemischter Dinucleotide angewandt werden. Dabei dürfte die Selektivität bei der Umsetzung zu gemischten Dinucleotiden das größte Problem darstellen. Auf die weitere Entwicklung dieser Synthesemöglichkeit wurde in dieser Arbeit zugunsten der Untersuchung anderer Möglichkeiten verzichtet.

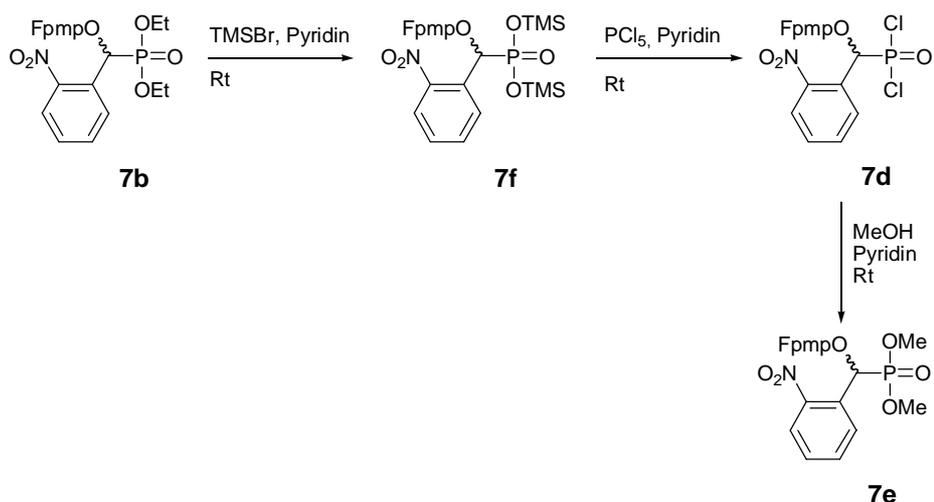


Abbildung 44 Synthese von (NO₂BnFmpO)-phosphonsäuredimethylester **7e**

4.1.4.3 Synthese über Phosphonigsäure

In Arbeiten von LIN et al.¹²⁷ wurde Phosphonigsäure direkt mittels Pivalinsäurechlorid aktivierten Kupplungen nacheinander mit einem Nucleosid und einem Alkohol verestert (Abbildung 45A). Gelingt dies auch bei der zuvor modifizierten und geschützten α -Hydroxybenzylphosphonsäure, so stellt dies eine dritte Möglichkeit zur Synthese modifizierter Dinucleotide dar (Abbildung 45B).

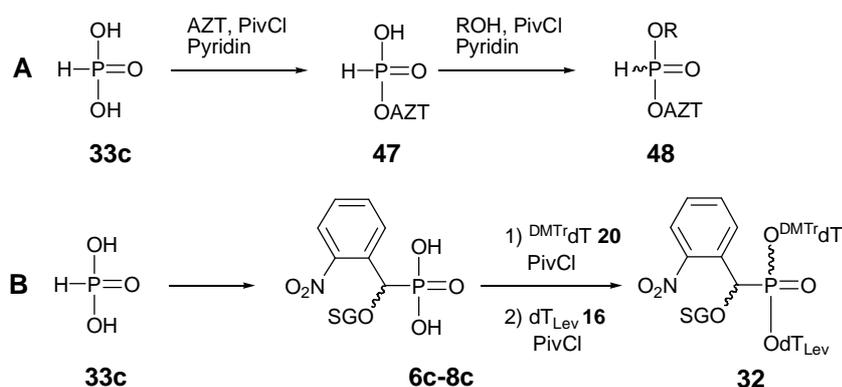


Abbildung 45 A) LIN et al. B) Syntheseplan: Synthese über Phosphonsäureprecursor

Es gelang die Synthese von Hydroxy-2-nitrophenylmethyl-phosphonsäure **6c** über eine modifizierte PUDOVIC-Reaktion durch Addition von Phosphonigsäure **33c** an 2-Nitrobenzaldehyd **13**. Die Reaktion wurde in Dioxan unter Rückfluss über mehrere Tage durchgeführt und anschließendes Auskristallisieren des Produktes durch Zugabe von Diethylether führte zur Isolierung des reinen Produktes in 55 %iger Ausbeute. Trotz

unvollständiger Reaktion wurde an dieser Stelle abgebrochen, da bereits Zersetzungsprodukte zu beobachten waren. Die Synthese der Hydroxy-2-nitrophenylmethyl-phosphonsäure **6c** erwies sich zunächst als schwierig. Sowohl eine HCl-als auch NEt_3 -katalysierte Reaktionsführung bei Raumtemperatur zeigte keine Reaktion; die Behandlung des Reaktionsgemisches unter Ultraschallbedingungen blieb ebenfalls ohne Erfolg. Ebenso ließ die Veresterung mit TMSCl , Addition an 2-Nitrobenzaldehyd **13** und anschließender Hydrolyse keine Reaktion erkennen. Die anschließende Schützung der α -Hydroxygruppe mit Fpmp-Enolether **14** gelang unter Ultraschallbedingungen und TFA-Katalyse in 30 %iger und mit DHP in 34 %iger Ausbeute. Die Pivalinsäurechlorid aktivierte Kupplung mit Methanol führte nicht zum gewünschten Diester sondern zu einer Vielzahl von Reaktionsprodukten (Abbildung 46). Bei der Fpmp geschützten Phosphonigsäure **7c** konnte der Monoester **49** als einziges phosphorhaltiges Reaktionsprodukt durch NMR-Spektroskopie nachgewiesen werden.

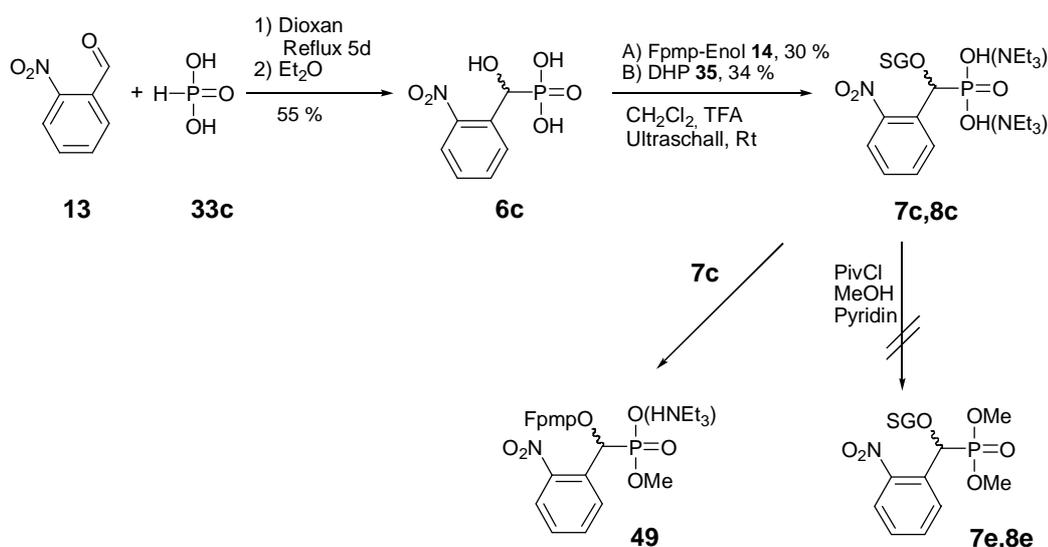


Abbildung 46 Synthese der $(\text{NO}_2\text{BnOSG})$ -Bis-(triethylammonium)-phosphonate **7c** und **8c**. Versuch der Synthese von $(\text{NO}_2\text{BnOSG})$ -phosphonsäuredimethylester **7e** und **8e**.

Substitutionen an H-Phosphonaten können entweder nach einem Additions-Eliminierungsmechanismus oder nach Tautomerisierung zur Phosphitform (säure- oder basenkatalysiert) in einem $\text{S}_{\text{N}}2$ -artigen $\text{S}_{\text{N}}\text{P}$ -Mechanismus verlaufen. Nucleophile Substitutionen am Phosphor bei Phosphonsäurediestern hängen vom Grad der Besetzung

der d-Orbitale am Phosphor ab. Phenylgruppen (vgl. Kapitel 4.1.4.1) erniedrigen die $p\pi$ - $d\pi$ -Wechselwirkung des Sauerstoffatoms und des Phosphors, im Gegensatz dazu erhöhen Alkylester die $p\pi$ - $d\pi$ -Wechselwirkung. Das hat unter anderem zur Folge, dass Phosphonsäurediphenylester aus der trivalenten Phosphitform heraus in einer S_NP Reaktion substituiert werden. Phosphonsäuredialkylester reagieren in einer Additions-Eliminierungs-Reaktion, welche grundsätzlich wesentlich langsamer verläuft. Bei der beschriebenen Veresterung der Phosphonsäure **7c,8c** treten gemischte Anhydride der Phosphonsäure auf und es existiert aufgrund der Modifikation kein Gleichgewicht zur Phosphitform. Die Anhydridmodifizierung sorgt für eine Erniedrigung der $p\pi$ - $d\pi$ -Wechselwirkung, wodurch die Reaktion nach einem S_NP -Mechanismus verlaufen müßte.^{107,108,109} Wahrscheinlich kann eine Additions-Eliminierungs-Reaktion durch die Erniedrigung der $p\pi$ - $d\pi$ -Wechselwirkung nicht ablaufen (Abbildung 47A). Bei der zweifachen aktivierten Veresterung von LIN et al. wurde hingegen Phosphorigsäure **33c** eingesetzt, welche in ihrer aktivierten Esterform im Tautomerengleichgewicht zum Phosphitester steht und somit in einer S_NP -Reaktion reagieren kann (Abbildung 47B).

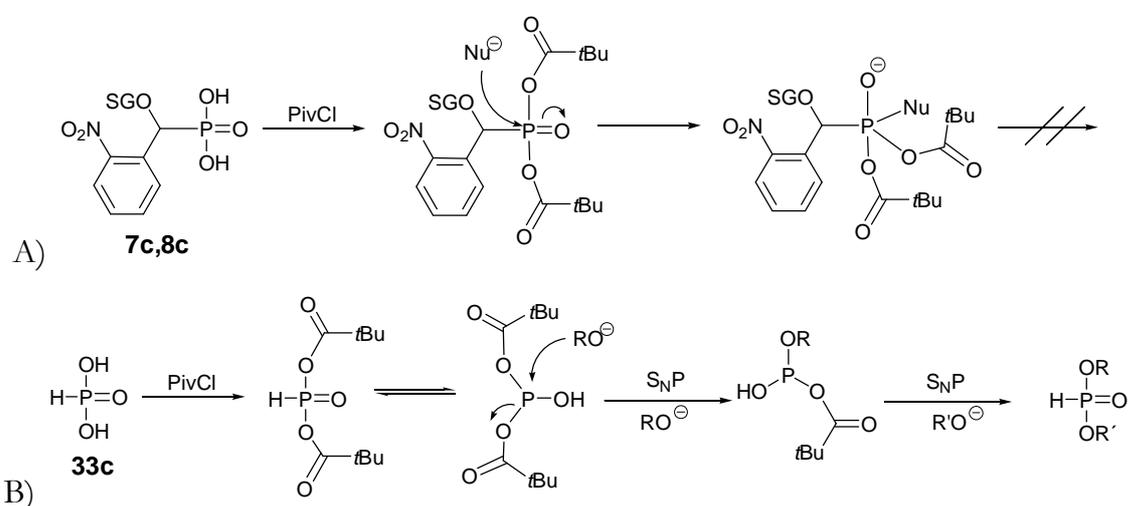


Abbildung 47 Mechanismen der PivCl aktivierten Veresterung A) Modifizierte Phosphonsäure, Addition-Eliminierung. B) Phosphonsäure, S_NP

4.1.4.4 Synthese über Phosphinate

In einer 1945 von F.R. ATHERTON und A.R. TODD entwickelten Reaktion können H-Phosphonatester mit Tetrachlorkohlenstoff unter Basenkatalyse zu

Chlorphosphatester oxidativ chloriert werden.^{128,129} Hierbei wird zunächst das H-Phosphonat deprotoniert und durch Insertion in die C-Cl-Bindung von Tetrachlorkohlenstoff und Bildung von Chloroform zum Phosphorchloridat oxidativ chloriert. Probleme bei dieser Chlorierung sind einige Nebenreaktionen, wie z.B. die intermediäre Bildung von Dichlorcarben und die Fähigkeit von Phosphonatestern unter Basenkatalyse zu disproportionieren, bzw. alkylierend auf Phosphonate, Amine und Alkohole zu wirken. Zwar gibt es einige Veröffentlichungen, in der diese Reaktion untersucht und der Mechanismus aufgeklärt wurde,¹³⁰⁻¹³² jedoch hat diese sehr milde Chlorierungsmethode zu Phosphorchloriden keine breite Anwendung gefunden und eine Übertragung auf andere Phosphorverbindungen, wie z.B. Phosphate wurde noch nicht beschrieben. Gelingt es, die Phosphinatsynthesestufe aus der Synthese des Phosphonamidites (Kapitel 4.2.4) unter ATHERTON-TODD-Bedingungen oxidativ zu chlorieren und anschließend mit einem 5'-OH-freien Nucleosid umzusetzen, so stellt dies einen schnellen und effizienten Zugang zu einer neuen Synthese von α -Hydroxybenzylphosphonat-modifizierten Dinucleotiden dar (Abbildung 48)

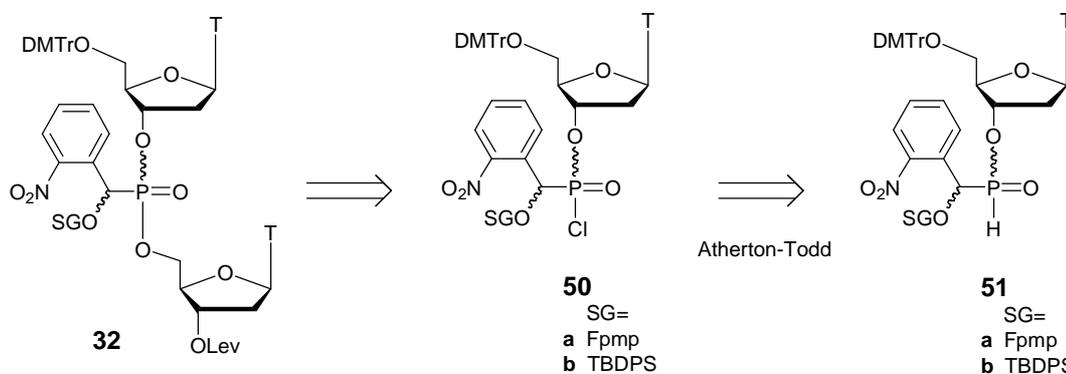


Abbildung 48 Syntheseplanung des α -Hydroxybenzylphosphonat-modifizierten Dinucleotides mittels oxidativer Chlorierung nach ATHERTON-TODD

Bei der Umsetzung von Phosphinat **52** mit Tetrachlorkohlenstoff, Triethylamin und Methanol findet binnen weniger Minuten eine vollständige Reaktion statt (Abbildung 49A). Dieses Produkt konnte isoliert und als die Zwischenstufe, das Phosphonsäurechlorid **53**, identifiziert werden. Das Phosphonsäurechlorid **53** ist sehr reaktionsträge und lässt sich chromatographisch an Kieselgel aufreinigen, ohne dass auf absolut wasserfreie Bedingungen geachtet werden muss. Das Phosphonsäurechlorid

konnte auch durch 10 minütige Umsetzung des Phosphonsäureesters mit CCl_4 und Triethylamin erhalten werden (B). Wird keine Base dem Reaktionsgemisch zugegeben (D), so lässt sich genauso wenig eine Reaktion feststellen, wie nur mit Methanol und Triethylamin (E). Das Zwischenprodukt wurde mit Methanol und Triethylamin umgesetzt (C).

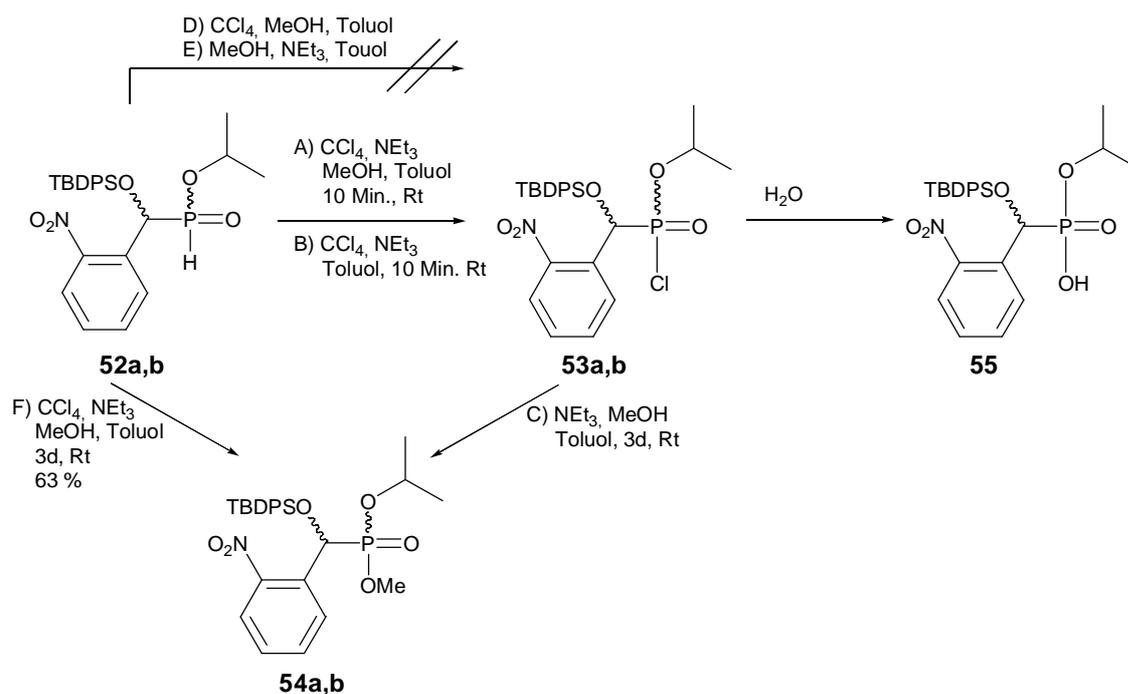


Abbildung 49 Phosphinat-ATHERTON-TODD Reaktion von *iso*-Propylphosphinsäureester **52a,b** zum Phosphonsäure-methyl-*iso*-propylester **54a,b**

Wird die Reaktion mehrere Tage gerührt, so lässt sich eine langsame Umsetzung des Phosphonsäurechlorids zum Phosphonsäure-methyl-*iso*-propylester **54** beobachten. Die Synthese des (NO₂BnTBDPSO)-Phosphonsäure-methyl-*iso*-propylesters **54** gelang schließlich durch mehrtägige Reaktion unter ATHERTON-TODD Bedingungen (F).

Diese Reaktion wurde analog zu Abbildung 49F im NMR-Rohr durchgeführt und mittels ³¹P-NMR Spektroskopie verfolgt (Abbildung 50). Hierfür wurde ein 4 : 1 Diastereomergemisch von **52a,b** in einer Gesamtkonzentration von 1 mM in Toluol mit 10 % Benzol-d₆ mit 1.2 Äquivalenten CCl_4 und Methanol und 2 Äquivalenten Triethylamin umgesetzt. Die chemische Verschiebung der Phosphonigsäureester **52a,b** liegt bei $\delta=28.7$ ppm, bzw. 29.5 ppm und die Kopplungskonstanten für die P-H-Kopplung betragen $^1J=555$ Hz, bzw. 558 Hz. Da zwei Stereozentren (α -C und P) vorhanden sind,

liegen zwei diastereomere Enantiomerenpaare vor, welche durch wiederholte chromatographische Aufreinigung an Kieselgel bis zu einem Diastereomerenverhältnis von 4 : 1 (80 % de) angereichert werden können.

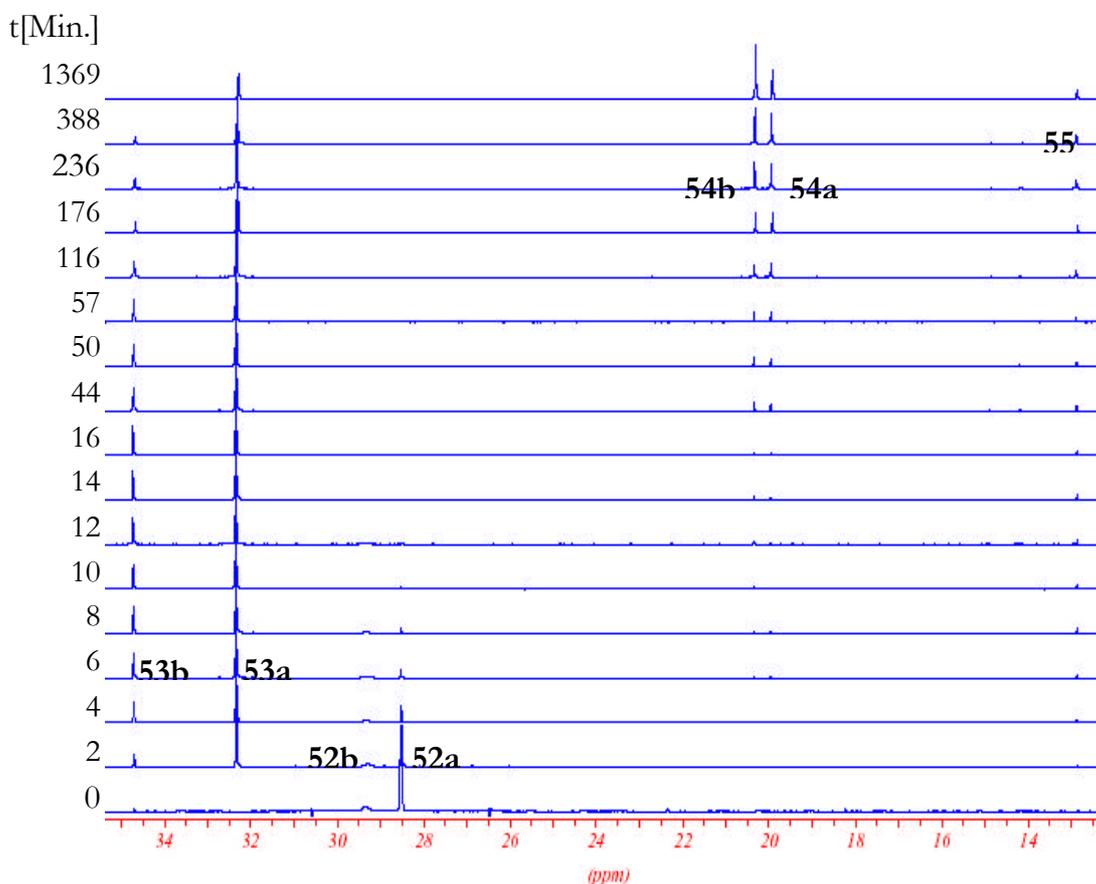


Abbildung 50 ^{31}P -NMR Studie zur Phosphinat-ATHERTON-TODD Reaktion

Zunächst wird ein schneller Umsatz der beiden Diastereomere **52a,b** zu den Zwischenprodukten **53a,b** bei $\delta = 32.3$ ppm, bzw. 34.7 ppm beobachtet und bereits nach 12 Min. ist das Edukt zu 99 % umgesetzt. Nach 16 Minuten ist kein Edukt mehr vorhanden. Das Verhältnis der Diastereomere **52a : 52b** von 4 : 1 bleibt bei der Chlorierung erhalten. Nach 12 Minuten wurden 1 % Produkt bei $\delta = 19.9$ ppm, bzw. $\delta = 20.3$ ppm detektiert. Bei der Bildung des Produktes **54a : 54b** findet man ein Integralverhältnis von 1 : 1. Das Hydrolyseprodukt **55** bei $\delta = 12.9$ ppm wird zu 6.5 % gebildet, da das NMR-Experiment unter nicht wasserfreien Bedingungen durchgeführt wurde. Der Reaktionsverlauf ist in Abbildung 51 wiedergegeben. Durch Integration der einzelnen ^{31}P -NMR-Spektren ergeben sich die Mengenverhältnisse der phosphorhaltigen

Substanzen und damit deren Konzentrationen ($c[\mu\text{mol/l}]$), welche gegen die Zeit ($t[\text{Min.}]$) aufgetragen werden.

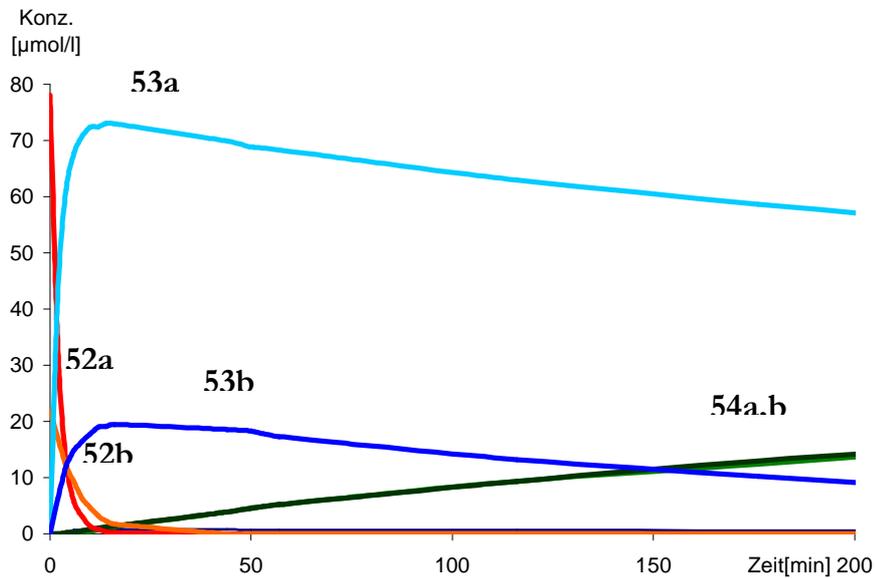
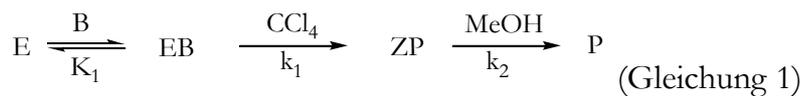


Abbildung 51 Kinetik der Phosphinat-ATHERTON-TODD Reaktion

Reaktionskinetische Berechnungen mit vorgelagertem Gleichgewicht und der Annahme, dass die Bildung des Zwischenproduktes ZP sehr schnell gegenüber der Folgereaktion ist ($k_1 \gg k_2$) ergeben folgende kinetische Grundgleichungen:



mit $E = 52a+b$, $ZP = 53a+b$, $P = 54a+b$

für das vorgelagerte Gleichgewicht gilt:

$$K_1 = \frac{EB}{E \cdot B} \quad (\text{Gleichung 2})$$

die Weiterreaktion sei vernachlässigbar

Für die Weiterreaktion gilt:

$$d[ZP]/dt = k_1 \cdot [EB] \cdot [CCl_4] - k_2 \cdot [ZP] \cdot [MeOH] \quad (\text{Gleichung 3})$$

mit $k_1 \gg k_2$, da die Bildung des Säurechlorides viel schneller ist als die Folgereaktion, gilt:

$$d[ZP]/dt = k_1[EB] \cdot [CCl_4] \quad (\text{Gleichung 4})$$

mit $[CCl_4]_{t=0} = [MeOH]_{t=0} = 1.2[E]_{t=0}$, $[CCl_4] = [CCl_4]_{t=0} - [ZP]$ und $[E] = [E]_{t=0} - [ZP]$ (Gleichung 5)

ergibt sich :

$$d[ZP]/dt = k_1 \cdot K_1 \cdot [B] \cdot \{[E]_{t=0} - [ZP]\} \cdot \{1.2[E]_{t=0} - [ZP]\} \\ = K_{ges} \cdot \{1.2[E]_{t=0}^2 - 2.2[E]_{t=0} \cdot [ZP] + [ZP]^2\}$$

$$d[ZP] / \{1.2[E]_{t=0}^2 - 2.2[E]_{t=0} \cdot [ZP] + [ZP]^2\} = K_{ges} dt \quad (\text{Gleichung 6})$$

Für die Substitution des Chlorides durch Methanol kann wegen $[E] = [EB] = 0$ Gleichung 3 zu $d[ZP]/dt = -k_2 [ZP] \cdot [MeOH]$ (Gleichung 7) vereinfacht werden.

Somit gilt

$$d[ZP] / \{[ZP] \cdot [MeOH]_{t=0} - [ZP] \cdot [ZP]_{t=16} + [ZP]^2\} = -k_2 dt \quad (\text{Gleichung 8})$$

Nach Integration mit Hilfe von Mathematica 5.0 kann das Integral gegen die Zeit aufgetragen werden und aus der Steigung ergibt sich die Geschwindigkeitskonstante K_{ges} die der Chlorierungsreaktion entspricht, da das vorgelagerte Säure-Base-Gleichgewicht viel schneller ist als die Reaktion.

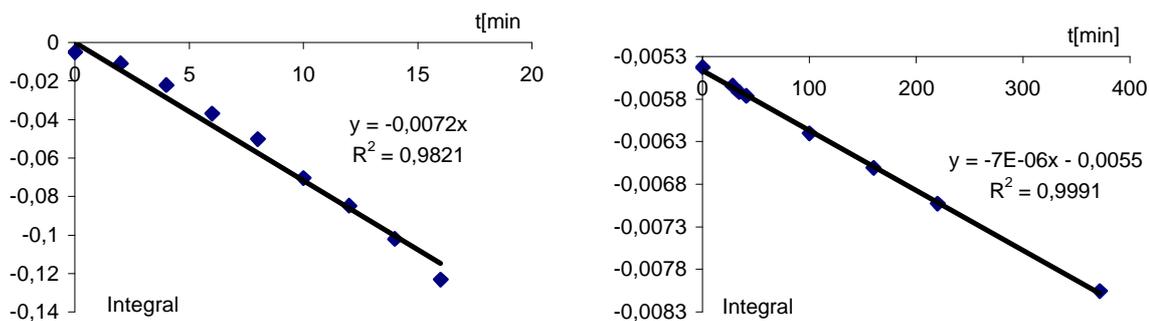


Abbildung 52 Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten A) Bildung von **53a,b** B) Bildung von **54a,b**

Für die in Abbildung 49 dargestellte Reaktion ergeben sich die Geschwindigkeitskonstanten zu $K_{ges} = 7 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l min}$ und $k_2 = 7 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l min}$. Die Veresterung mit Methanol an dem Phosphorsäurechlorid **53a,b** ist also um den Faktor 1000 langsamer als die Chlorierung mit Triethylamin und Tetrachlorkohlenstoff.

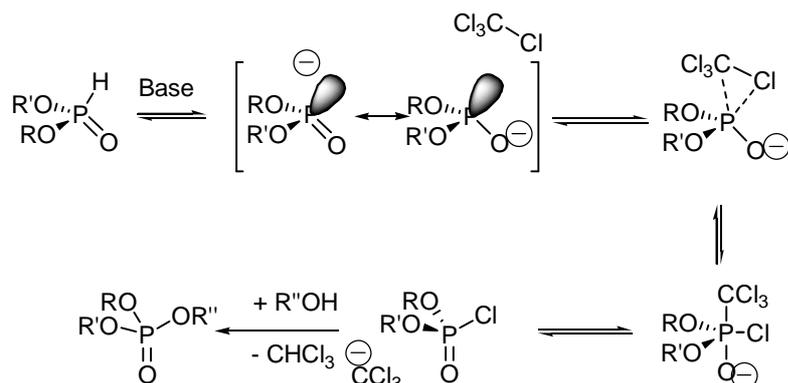


Abbildung 53 Mechanismus der ATHERTON-TODD Reaktion

Der Mechanismus der ATHERTON-TODD Reaktion wird im Allgemeinen als eine Insertion des deprotonierten Phosphors in die C-Cl Bindung des Tetrachlorkohlenstoff mit anschließender Eliminierung von -CCl_3 aus der trigonalen Bipyramide diskutiert (Abbildung 53).¹³⁰⁻¹³² Sowohl die Deprotonierung als auch die Eliminierung sind stereospezifische Vorgänge.

Bei der Insertion von CCl_4 gibt es zwei mögliche Orientierungen des Angriffs, die zu unterschiedlichen Stereoisomeren führen würden. Semiempirische Berechnungen nach AM1 (Hyper Chem 5.0) und Moleküldynamikberechnungen mit Hyper Chem 5.0 (Monte Carlo) an der deprotonierten Spezies zeigen, dass eine Seite durch die großen Gruppen (*iso*-Propyl und TBDPSO-benzylmethyl) abgeschirmt ist und so der Angriff nur von einer Seite erfolgen kann. In Abbildung 54 sind zwei mögliche Diastereomere des deprotonierten Phosphinates **52** dargestellt. Es ist zu erkennen, dass der hintere Bereich für einen Angriff auf den Phosphor (gelb) abgeschirmt ist und Tetrachlorkohlenstoff nur mit dem Chlorid in die so gebildete Tasche passt - CCl_3 ist zu groß um zwischen TBDPS- und *iso*-Propyl-Gruppe Platz für einen Angriff zu finden. Die Addition des Tetrachlorkohlenstoffs verläuft somit stereospezifisch. Die Substitution des Chlorides durch Methanol führt allerdings zu einem 1:1 Diastereomerenmisch und ist damit nicht stereospezifisch. Diese Reaktion verläuft nach einem Additions-Eliminierungs-Mechanismus und die Seite des Angriffs von Methanol wird durch die beiden großen Gruppen nicht unterschieden. Somit ist ein Angriff von beiden Seiten und damit eine Racemisierung möglich.

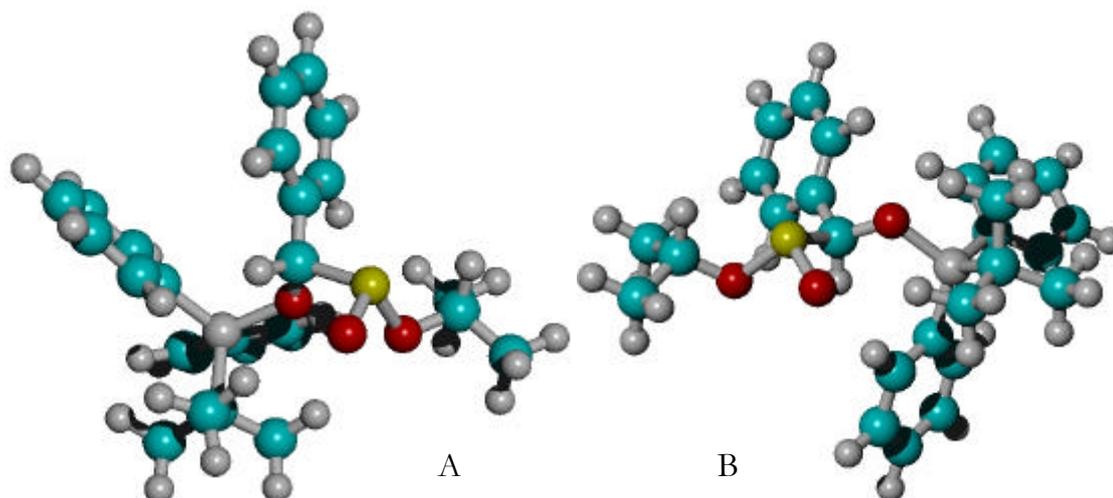


Abbildung 54 Zwischenstufen (A: $R_P S_{\alpha C}$, B: $S_P S_{\alpha C}$) aus der Phosphinat-ATHERTON-TODD Reaktion berechnet mit Hyper Chem 5, AM1.

Diese Reaktion sollte nun auf α -Hydroxybenzylphosphonat-modifizierte Phosphonatdinucleotide übertragen werden. (NO₂BnTBDPSO)-Phosphonigsäure-(5'-O-DMTr-dT)-ester **51b** (Kapitel 4.2.4) wurde in Toluol mit Tetrachlorkohlenstoff und Triethylamin umgesetzt und der Phosphonatdinucleosylester **32b** konnte in mäßigen 28 % isoliert werden (Abbildung 55).

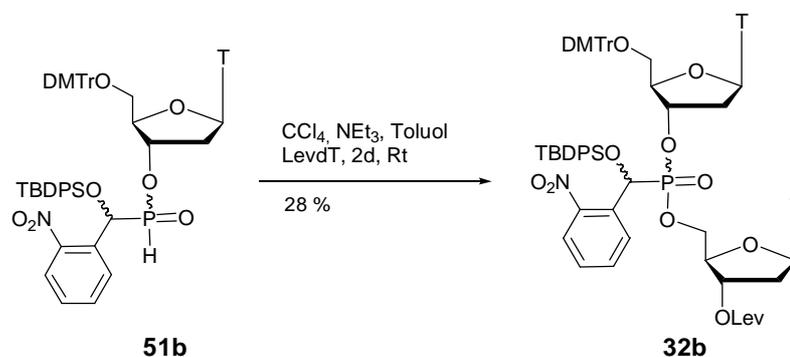


Abbildung 55 Phosphinat-ATHERTON-TODD Reaktion zum (NO₂BnTBDPSO)-Phosphonsäure-(5'-O-DMTr-dT)-(3'-O-Lev-dT)-diester **32b**

Mit dieser Reaktion ist es gelungen einen Precursor zu entwickeln, welcher in zwei orthogonalen Schritten selektiv mit einem 3'-OH-Nucleosid und anschließend mit einem 5'-OH-Nucleosid zum α -Hydroxybenzylphosphonatdinucleotid umgesetzt werden kann.

Diese Reaktion muss in zukünftigen Arbeiten optimiert werden. Arbeiten von PERICH et al.¹³³ und STAWINSKI et al.¹³⁴ zeigen, dass sich oxidative Kupplungsreaktionen von

H-Phosphonaten zu Phosphatriestern durch den Einsatz von Pyridin, bzw. DMAP katalysieren lassen. Chlorphosphatdiester reagieren zu den hochreaktiven Pyridiniumphosphaten welche anschließend mit Alkoholen zu Phosphatriestern umgesetzt werden.^{135,136}

Überdies kann dieser Precursor, wird anstelle einer oxidativen Chlorierung eine Chlorierung zum Phosphorchloridit vorgenommen, als Baustein für ein weiteres Synthesekonzept, den monomeren Phosphonamiditbausteinen dienen (Abbildung 56 & Kapitel 4.2.4).

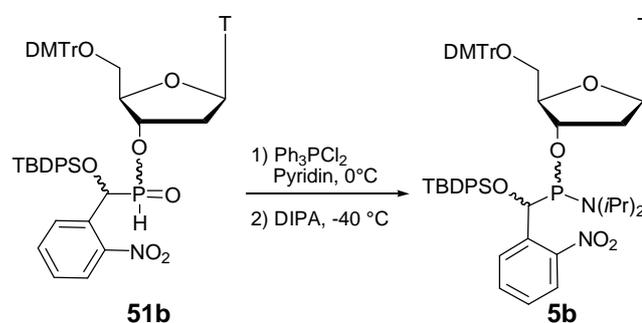


Abbildung 56 Umsetzung des Phosphinatprecursors **51b** zum Phosphonamidit **5b**

4.1.5 Weitere Untersuchungen an α -Hydroxybenzylphosphonatdinucleotiden

Bei der Synthese des (5'-O-TBDPS-dA^{Bz})-H-Phosphonates **15** (Kapitel 4.1.2, Abbildung 19) tritt intermediär der (5'-O-TBDPS-dA^{Bz})-Phosphonsäurephenylester **17** auf, welcher zum H-Phosphonat hydrolysiert wird. Dieser intermediäre Phosphonsäurephenylester **17** konnte isoliert werden und direkt weiter mit 3'-O-Lev-dT umgesetzt werden. Die Ausbeute beträgt lediglich 21 %, was an der schlechten Handhabbarkeit der sehr empfindlichen Zwischenstufe liegt. Versuche, den H-Phosphonatdiester **12** in einer Eintopfreaktion durch sukzessive Veresterung zunächst mit 5'-O-TBDPS-dA^{Bz} **25** und 3'-O-Lev-dT **16** umzusetzen waren nicht erfolgreich. Diphenylphosphit **33a** ist stets mit Phenol und Phosphoniger Säure verunreinigt und es gelang nicht dieses rein zu erhalten. So ist notwendig einen Überschuss an Diphenylphosphit **33a** einzusetzen und die anschließende Veresterung mit 3'-O-Lev-dT **16** ist dann nicht mehr möglich. Versuche unterschiedliche Äquivalente an Diphenylphosphit einzusetzen und der Versuch einer Hochverdünnungsreaktion führte stets zu Gemischen an Estern, die jedoch nicht explizit nachgewiesen wurden. Weitere Versuche zum gemischten H-Phosphonatdiester zu

gelingen wurden nicht unternommen. Gelingt es, reines Diphenylphosphit einzusetzen, so sollte dieser Syntheseweg prinzipiell möglich sein.

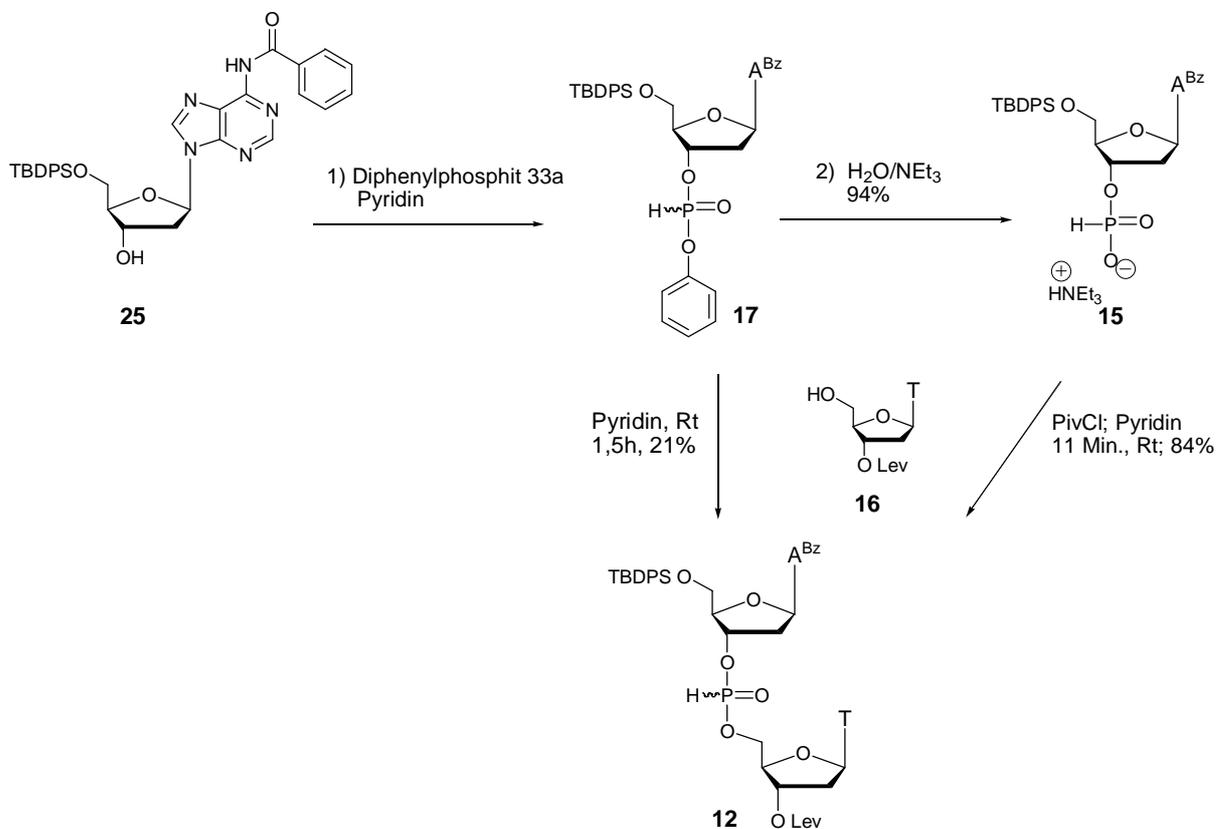


Abbildung 57 Synthese des (5'-O-TBDPS-dA^{Bz})-(3'-O-Lev-dT)-H-Phosphonates **12** über (5'-O-TBDPS-dA^{Bz})-Phosphonsäurephenylester **17**

WEISZ et al. untersuchen die Wasserstoffbrückenbindungen von Nucleosiden mittels Tieftemperatur-NMR-Experimenten.^{137,138,139} Das modifizierte α -Hydroxybenzylphosphonat-Adenosyl-Thymidyl-Dimer ist selbstkomplementär und mit Hilfe von Tieftemperatur-NMR-Studien sollte es möglich sein, die Wasserstoffbrückenbindungen in Bezug auf die Stereochemie am Phosphor zu untersuchen. Um die Stabilität der Modifikation zu gewährleisten, ist eine Schützung der α -Hydroxygruppe notwendig, die große Fmp- Schutzgruppe hätte jedoch einen großen Einfluss auf die Konformation des Dinucleotides. Deshalb sollte die α -Hydroxygruppe mit einer Methylgruppe geschützt werden. Versuche das α -OH-AT-Dimer **27** mit verschiedenen Basen (Natriumhydrid, Hexamethyldisilazan, Silberoxid) und Methyljodid in unterschiedlichen Lösungsmitteln führte stets in der Phosphonat-Phosphat-Umlagerung zum Phosphattriester **29**.

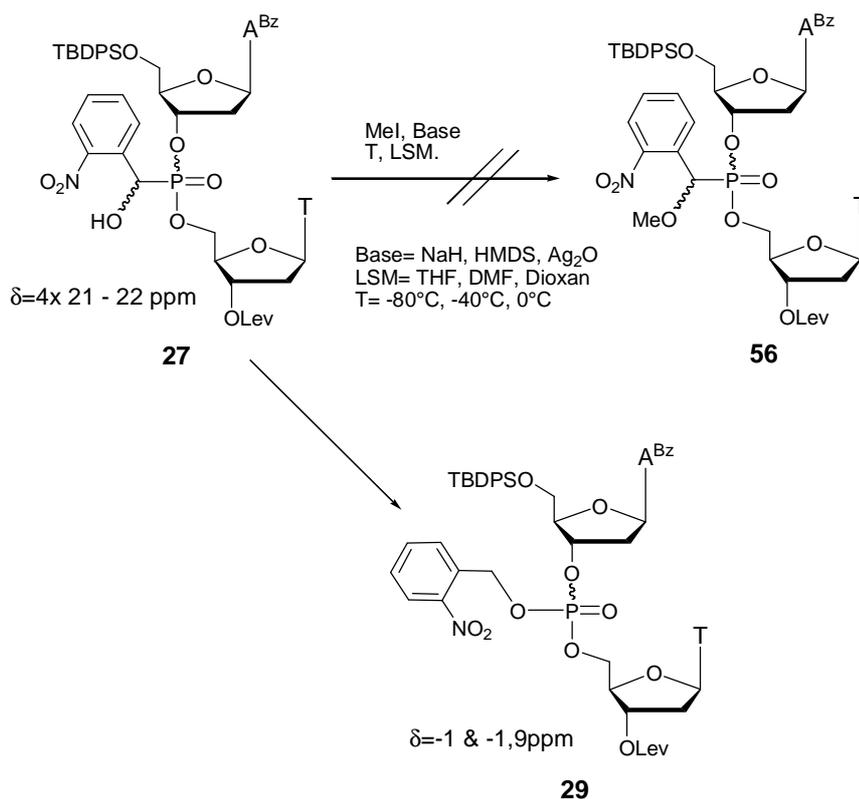


Abbildung 58 Versuch der Methylierung der α -Hydroxybenzylphosphonat-Gruppe

Die Reaktion wurde an dem α -Hydroxy-phosphonsäurediethylester mit Dimethylsulfat und Natriumhydrid in DMF durchgeführt. Hierbei wurden die eingesetzten Äquivalente, die Temperaturen und die Geschwindigkeit der Zugabe von Natriumhydrid variiert, sowie eine inverse Reaktionsführung untersucht. Eine Reaktionsführung bei $-40 \text{ }^\circ\text{C}$ und einer langsamen Zugabe von Natriumhydrid in DMF führt nahezu zu einem quantitativen Umsatz zum (NO₂BnMeO)-Phosphonsäurediethylester **57**, bei einer Verschiebung von $\delta = 18.4 \text{ ppm}$ (Abbildung 60A); die isolierte Ausbeute betrug 57 %. Weniger als 4 Äquivalente an Dimethylsulfat führen zu einem unvollständigen Umsatz (Edukt **6b**, $\delta = 21.5 \text{ ppm}$) und vermehrt zum Umlagerungsprodukt **58** bei $\delta = -0.08 \text{ ppm}$ (Abbildung 60B). Eine Reaktionsführung bei 0°C oder bei inverser Zugabe führt fast ausschließlich zum Umlagerungsprodukt **58** (Abbildung 60C). Zusätzlich ist noch das Produkt der Phosphonatrückspaltung **33b** bei $\delta = 8.8 \text{ ppm}$ zu detektieren.

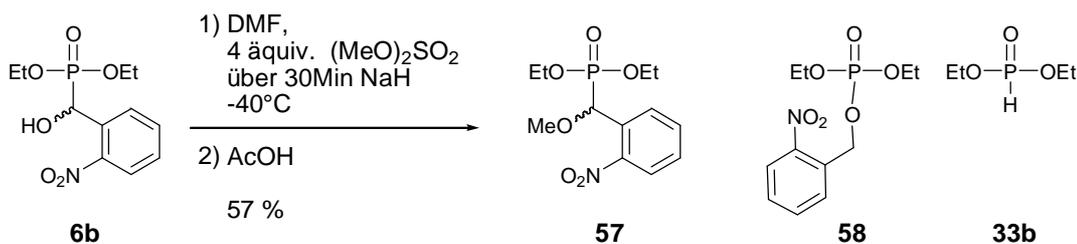


Abbildung 59 Methylierung von Hydroxy-2-nitrophenylmethyl-phosphonsäure-diethylester **6b**

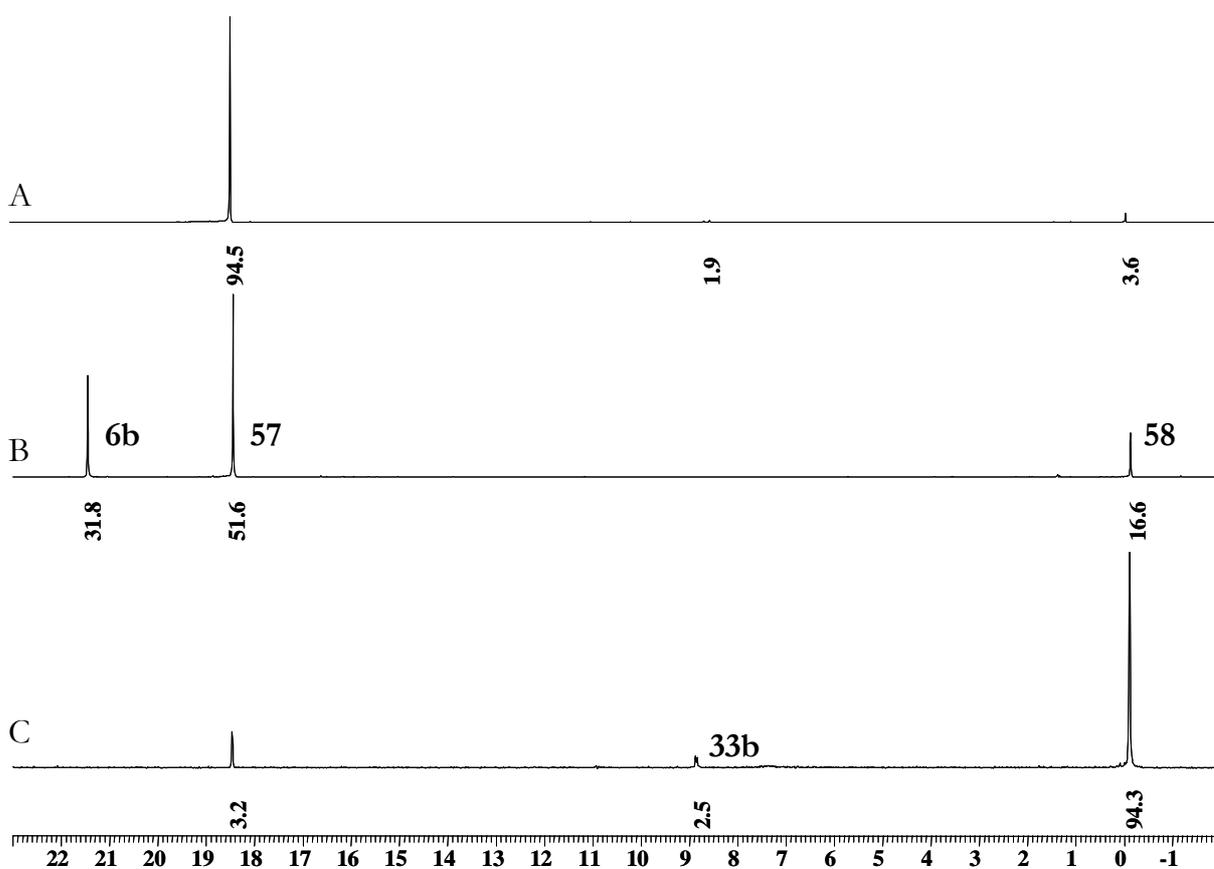


Abbildung 60 ³¹P-NMR Verfolgung der Methylierung von Hydroxy-2-nitrophenylmethyl-phosphonsäurediethylester **6b**

Die abschließende Übertragung dieser Reaktionsbedingungen auf die Methylierung des (NO₂BnOH)-Phosphonsäure-(5'-O-TBDPS-dA^{Bz})-(3'-O-Lev-dT)-diesters **27** war jedoch nicht erfolgreich und ausschließlich das Umlagerungsprodukt **29** konnte detektiert werden.

4.2 Synthese α -Hydroxybenzyl modifizierter Phosphonamiditbausteine

Mit Hilfe der dimeren α -Hydroxybenzylphosphonat Bausteine lässt sich wie oben beschrieben die Stereochemie am Phosphorzentrum der Modifikation, sowie auch am α -C-Atom durch Diastereomerentrennung einstellen und somit mögliche Einflüsse der Konfiguration auf biophysikalische und biologische Eigenschaften der Antisense-Oligonucleotide untersuchen. Allerdings lässt sich mit oben beschriebener Methode nur jede zweite Phosphatgruppe durch die α -Hydroxybenzylphosphonatgruppe modifizieren. Ferner wäre zur Untersuchung verschiedener, beliebiger biologisch relevanter Antisense-Sequenzen die Synthese 16 verschiedener dimerer Bausteine notwendig. Die Synthese dieser 16 Bausteine gestaltet sich auch unter Verwendung der Methode aus Kapitel 4.1.4.4 sehr aufwendig, zeit- und kostenintensiv. Um schnell und effizient beliebige DNA-Sequenzen untersuchen zu können, ist ein monomerer Phosphonamiditbaustein notwendig, welcher analog zur Standardphosphoramiditmethode mittels festphasengebundener, automatisierter Oligonucleotidsynthese in DNA eingebaut werden kann.

In der Literatur sind bereits einige Phosphonamiditbausteine und deren Kupplungsbedingungen in der DNA-Synthese beschrieben. So hat die Arbeitsgruppe um J.W. ENGELS unter anderem Benzylphosphonamiditbausteine synthetisiert, um die Eigenschaften der entsprechend modifizierten Oligonucleotide zu untersuchen (Abbildung 61).¹⁴⁰

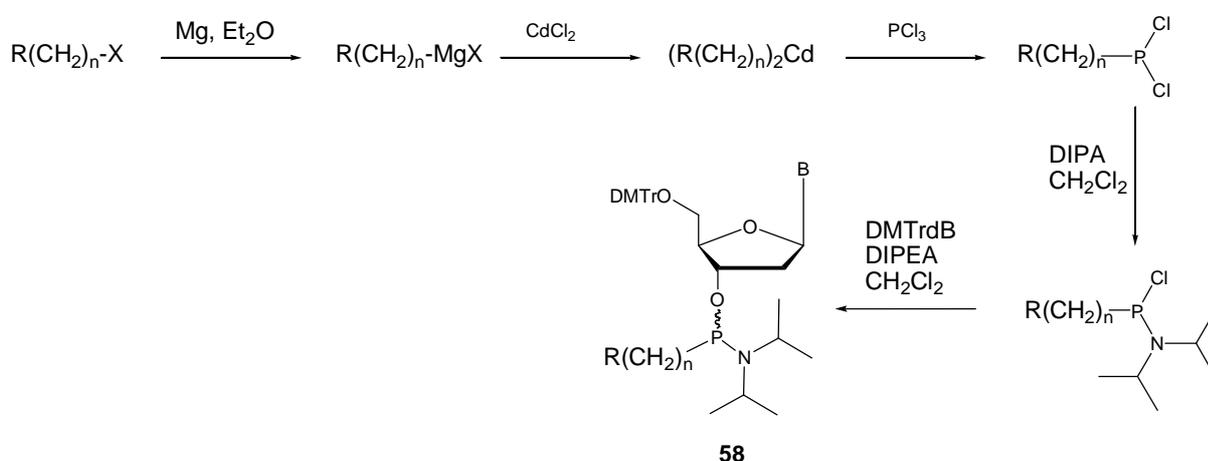


Abbildung 61 Alkylphosphonamiditsynthese nach ENGELS et al.

Aufgrund der α -Hydroxygruppe kann jedoch nicht der sehr einfache Reaktionsweg über ein Benzylgrignardreagenz, welches mit Phosphortrichlorid zur Reaktion gebracht wird, beschrieben werden. Es war notwendig, analog zu diesen Bausteinen, die Synthese für α -Hydroxybenzylphosphonamidit modifizierte Nucleoside **5** zu entwickeln.

4.2.1 Syntheseplanung

Um dem Standardprotokoll der Oligonucleotidsynthese zu entsprechen, wurde auch für den monomeren Phosphonamiditbaustein für die Blockierung der 5'-Hydroxygruppe die säurelabile DMTr-Schutzgruppe und für die α -Hydroxyfunktion ebenfalls die acetalische Fpmp-Schutzgruppe gewählt (vgl. Kapitel 4.1.1). Neben der Fpmp-Schutzgruppe wurden für die Versuche die verschiedenen Synthesestrategien umzusetzen weitere Schutzgruppen wie THP, TBDPS, und Triphenylmethyl (Tr) eingesetzt. Zwar eignen sich diese Schutzgruppen nicht für den Einsatz in einer späteren DNA-Festphasensynthese, jedoch ist der Fpmp-Enolether **14** aufwendig in der Synthese und für die Reaktionsoptimierungen ist insbesondere die TBDPS-Schutzgruppe aufgrund der Stabilität gegenüber den gewählten Reaktionsbedingungen am besten geeignet.

Der Monomere Baustein **5** lässt sich prinzipiell in zwei verschiedenen Wegen aufbauen. In Variante A (Abbildung 62) wird in einem letzten Schritt das Nucleosid mit dem aktivierten Phosphit **59** gekuppelt. Dies sollte sowohl mittels Phosphorchloriden ($X=Cl$) als auch Amiditen ($X= N\text{Pr}_2$) möglich sein. Diese analog zu den 2-Cyanoethyl-phosphor-monochlor-(di-*iso*-propylamidit) **62a**, bzw. 2-Cyanoethylphosphor-bis(di-*iso*-propylamidit) **62b** konzipierten Bausteine könnten in einem vorhergehenden Syntheseschritt, ausgehend von einem geschützten 2-Nitrobenzylalkohol **61** synthetisiert werden. Der geschützte 2-Nitrobenzylalkohol **61** könnte hierfür nach Deprotonierung in Benzylposition mit dem Phosphorchloridit **62** zur Reaktion gebracht werden (Variante A1). Eine weitere Möglichkeit die Synthesezwischenstufe **59** zu erhalten, wäre eine Chlorierung der Phosphonigsäure **60** und anschließende Umsetzung mit Di-*iso*-propylamin (Variante A2).

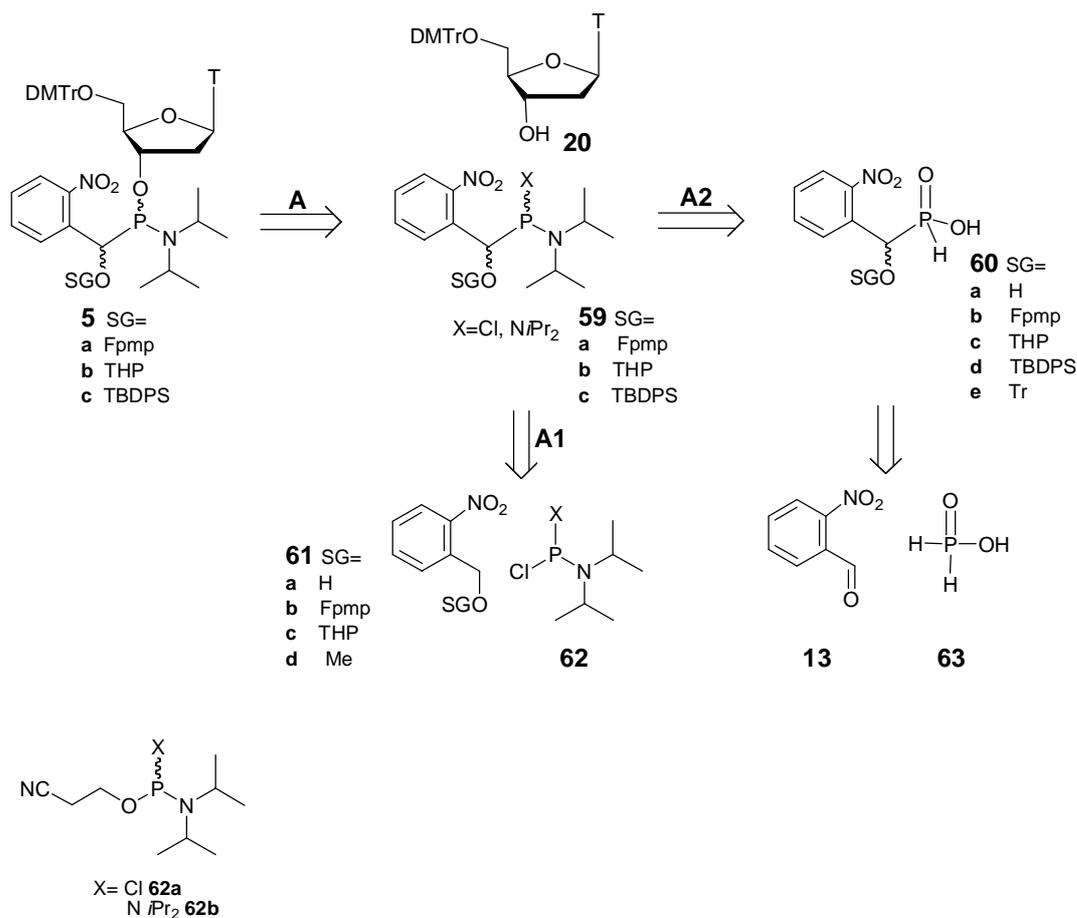


Abbildung 62 Synthesepfung des monomeren α -Hydroxybenzyl-nucleosylphosphonamidit Bausteines **5a-c** (Variante A)

Eine weitere Mfglichkeit das monomere Phosphonamidit **5** zu generieren ist in Variante B (Abbildung 63) dargestellt. Hier wird in einem letzten Schritt der Phosphonigsurethymidylester **51** chloriert und anschlieBend mit Diisopropylamin umgesetzt. Dieser Ester lieBe sich in Variante B1 durch Veresterung mit dem geschutzten Thymidin und der Phosphonigsure **60** erhalten, welche durch Addition von Unterphosphoriger Ssure **63** an 2-Nitrobenzaldehyd **13** und anschlieBender Schutzung der entstehenden OH-Gruppe gewonnen werden kfgnte. Eine weitere Mfglichkeit an den Thymidylester **51** zu gelangen, wAre eine Addition mit anschlieBender Schutzung vom Thymidylphosphonigester **62** an 2-Nitrobenzylaldehyd **13** (Variante B2). Bei dieser Variante kfgnte allerdings nicht die Fpmp-Schutzgruppe eingesetzt werden, da die α -OH-Gruppe sauer katalysiert an den Fpmp-Enolether **14** addiert werden mfgste und unter diesen Bedingungen die 5'-DMTr-Schutzgruppe abgespalten wfgde.

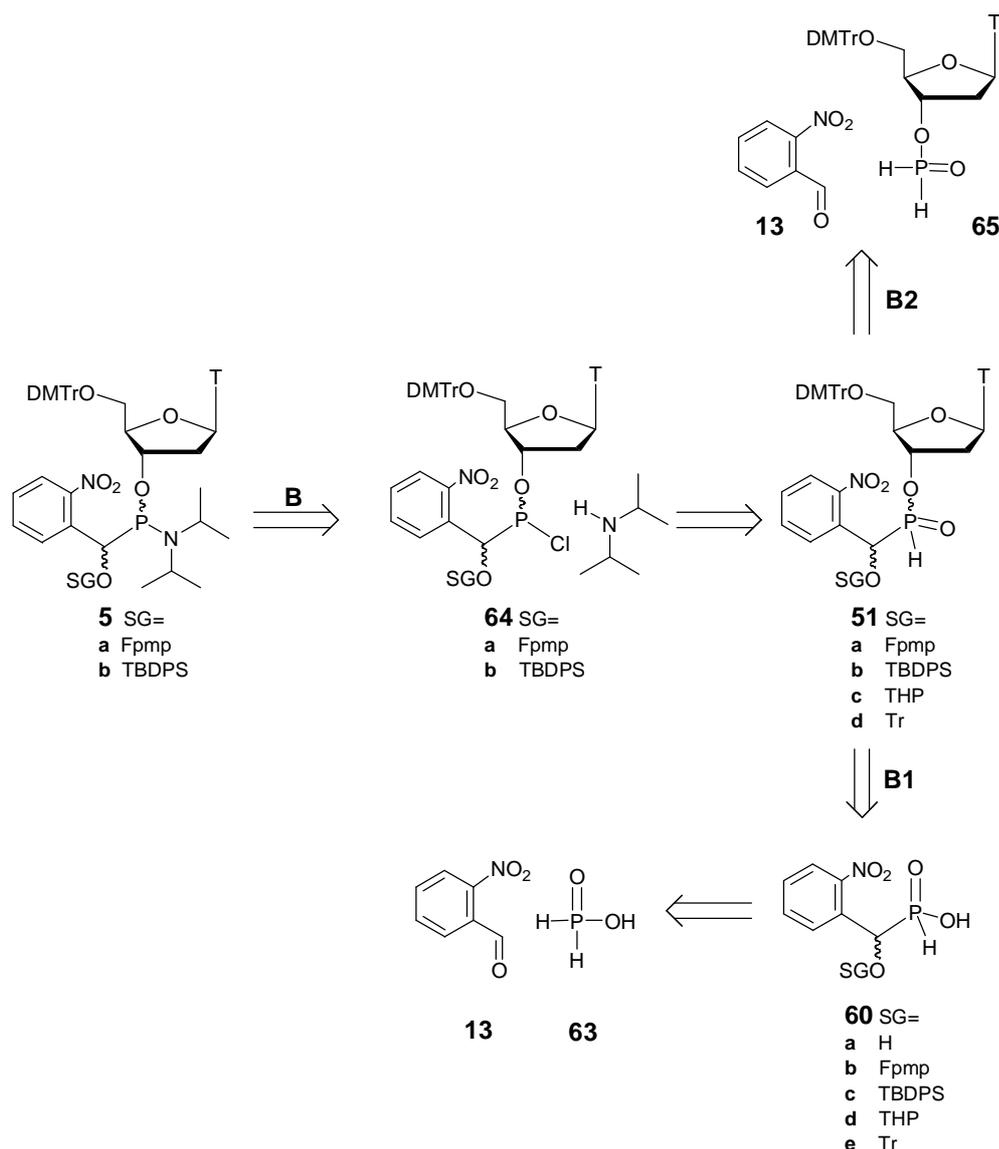


Abbildung 63 Syntheseplanung des monomeren α -Hydroxybenzyl-nucleosyl-phosphonamidit Bausteines **5** (Variante B)

4.2.2 Syntheserversuch des monomeren Phosphonamiditbausteines (Variante A1)

Ausgehend von geschützten 2-Nitrobenzylalkoholderivaten **61** soll durch Deprotonierung der Benzylposition, anschließender Umsetzung mit einem Phosphor-(III)-chlorid und abschließender Kupplung mit 5'-O-DMTr-dT **20** der monomere Phosphonamiditbaustein **5** erhalten werden. Hierfür wurde zunächst 2-Nitrobenzylalkohol **61a** mit verschiedenen Schutzgruppen versehen. Die säurekatalysierte Reaktion mit 3,4-Dihydro-2H-pyran **35** zum (Tetrahydropyran-4-yl)-(2-nitrobenzyl)-ether **61c** gelang in einer sehr guten Ausbeute von 97 %. In einer analogen Reaktion wurde der Fpmp-geschützte 2-Nitrobenzylalkohol **61b** mit 67 %iger Aubeute erhalten.

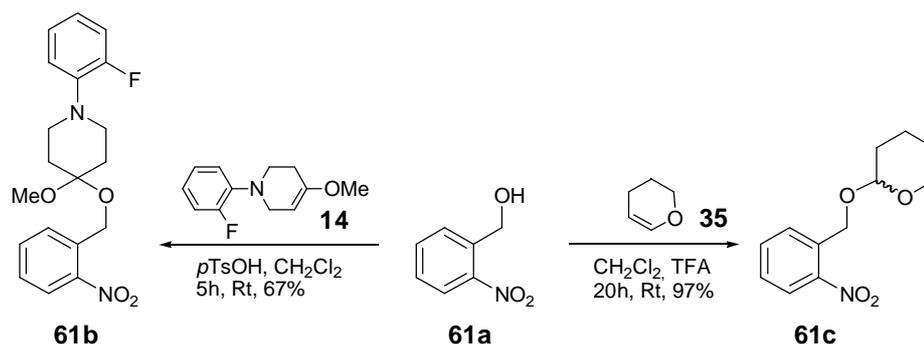


Abbildung 64: Synthese von Fpmp- und THP-geschütztem 2-Nitrobenzylalkohol **61b,c**

Sowohl der Fpmp- **61b** als auch der THP-2-Nitrobenzylalkohol **61c** wurden mit verschiedenen Basen (1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU), Lithiumdiisopropylamid (LDA), NaH, Ag₂O, 1,1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazan (HMDS)) und anschließend mit Bis-(diisopropylamin)-chlorphosphit **62** umgesetzt, jedoch konnte kein definiertes Produkt erhalten werden (Abbildung 65).

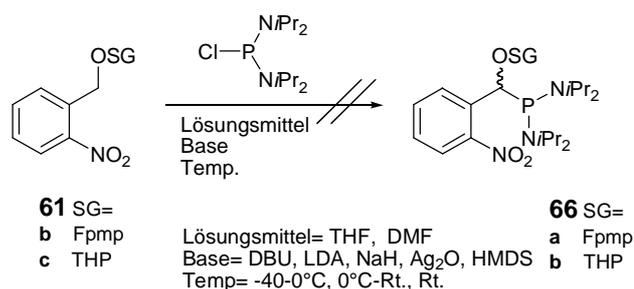
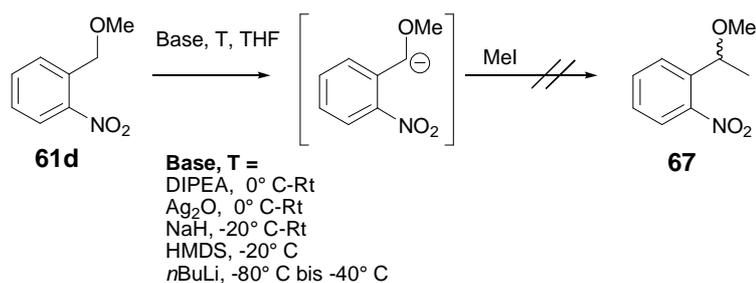
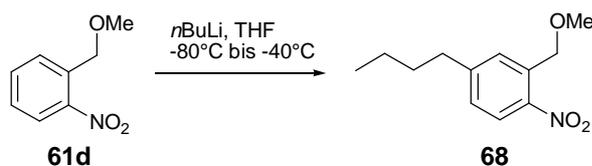


Abbildung 65 Versuch der Phosphitylierung von geschütztem 2-Nitrobenzylalkohol **61b,c**

Um zunächst Modellreaktionen an einem einfacheren 2-Nitrobenzylalkoholderivat durchzuführen, wurde nach Deprotonierung von 2-Nitrobenzylalkohol **61a** mit NaH bei Raumtemperatur und Umsetzung mit Methyljodid der Methyl-(2-nitrobenzyl)-ether **61d** erhalten. Dieser wurde unter verschiedenen Bedingungen mit unterschiedlichen Basen zur Reaktion gebracht und anschließend mit Methyljodid umgesetzt. Allerdings konnte unter keiner der angewandten Reaktionsbedingungen 1-(1-Methoxyethyl)-2-nitrobenzol **67** identifiziert werden.

Abbildung 66 Versuch der Methylierung von Methyl-(2-nitrobenzyl)-ether **61d**

Nur bei der Umsetzung mit *n*-Butyllithium wurde eine Reaktion beobachtet. Jedoch wurde nicht eine Deprotonierung der Benzylposition, oder des Aromaten mit anschließender Methylierung, sondern eine Butylierung des Aromaten in 5-Position (*para* zur Nitrogruppe) beobachtet. Es konnte (5-Butyl-2-nitrobenzyl)-methylether **68** isoliert und spektroskopisch nachgewiesen werden.

Abbildung 67 Butylierung von Methyl-(2-nitrobenzyl)-ether **61d**

Eine Deprotonierung der Benzylposition und anschließende Methylierung mit Methyljodid scheint nicht möglich. Es wurde daher von weiteren Versuchen, die geschützten 2-Nitrobenzylalkohole zu deprotonieren und anschließend mit Bis-(*diisopropylamin*)-chlorphosphit **62** umzusetzen abgesehen.

4.2.3 Syntheseversuch des monomeren Phosphonamiditbausteines (Variante A2)

ALBOUY et al. berichteten von Phosphonylierungsreaktionen von rotem Phosphor mit Aldehyden die sowohl in alkalischen als auch sauren Medien ablaufen.^{141,142} Sie haben gezeigt, dass unter verschiedenen Bedingungen durch Reaktion von rotem Phosphor mit Benzaldehyd **65** Benzylhydroxyphosphonigsäure **66** und Dibenzylhydroxyphosphonigsäure **67** entstehen. Sie konnten zeigen, dass die phosphonylierenden Spezies PH₃, bzw. Hypophosphorige Säure sind, welche im Basischen aus rotem Phosphor entstehen. Ausgehend von hypophosphoriger Säure **63** konnten ebenfalls diese

Phosphonylierungsreaktionen durchgeführt werden und auch in sauren Medien fand eine Reaktion statt. (Abbildung 68)

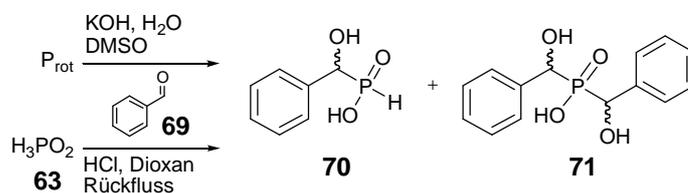


Abbildung 68 α -Hydroxybenzylphosphonigsäure **70** nach ALBOUY et al.

Im ersten Schritt für die Darstellung des α -Hydroxybenzylphosphonamidites **5** nach Variante A2 und B2 ist es notwendig [Hydroxy-(2-nitrophenyl)-methyl]-phosphonigsäure **60a** zu synthetisieren. Hierbei wird hypophosphorige Säure **63**, welche im tautomeren Gleichgewicht zur entsprechenden Phosphinsäure steht, säurekatalysiert an 2-Nitrobenzaldehyd **13** addiert. Eine Reaktionsführung unter Rückflußbedingungen hat sich als nicht erfolgreich herausgestellt. Wenn 2-Nitrobenzaldehyd **13** allerdings unter Ultraschallbedingungen mit hypophosphoriger Säure **63** zur Reaktion gebracht wird, so verläuft die Reaktion glatt, in guten Ausbeuten und mit einfacher Aufarbeitung durch Umkristallisation des Rohproduktes aus Dichlormethan/Dioxan (Abbildung 69). Das Additionsprodukt **60a** kann mit einer chemischen Verschiebung von $\delta = 29$ ppm und einer P-H-Kopplungskonstante von $^1J = 547$ Hz nachgewiesen werden.

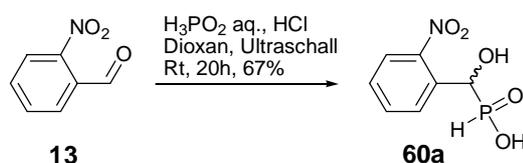


Abbildung 69 Synthese von [Hydroxy-(2-nitrophenyl)-methyl]-phosphonigsäure **60a**

Die OH-Gruppe wurde mit der acetalischen THP-Schutzgruppe in sehr guter Ausbeute von 97% mit 3,4-Dihydro-2H-pyran und katalytisch *p*-Toluolsulfonsäure in THF geschützt. Auch die Synthese des Fpmp-geschützten Derivates gelang in guten 67 % Ausbeute durch Umsetzung mit dem Fpmp-Enolether **14** und *p*-Toluolsulfonsäure in THF. Bedingt durch die Aufarbeitung (Zugabe von Triethylamin) wurden die Triethylammonium-Salze isoliert. Diese sind aufgrund der negativen Ladung im Vergleich

zu **60a** hochfeldverschoben und können bei $\delta = 23$ ppm (**60b**) und $\delta = 27 + 23$ ppm (**60d**) mit P-H-Kopplungskonstanten von $^1J = 520$ - 526 Hz detektiert werden

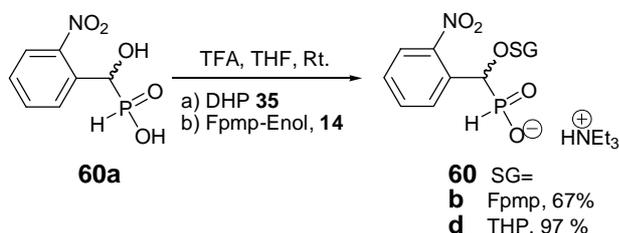


Abbildung 70 Synthese der acetalgeschützten Phosphinate **60b** und **60d**

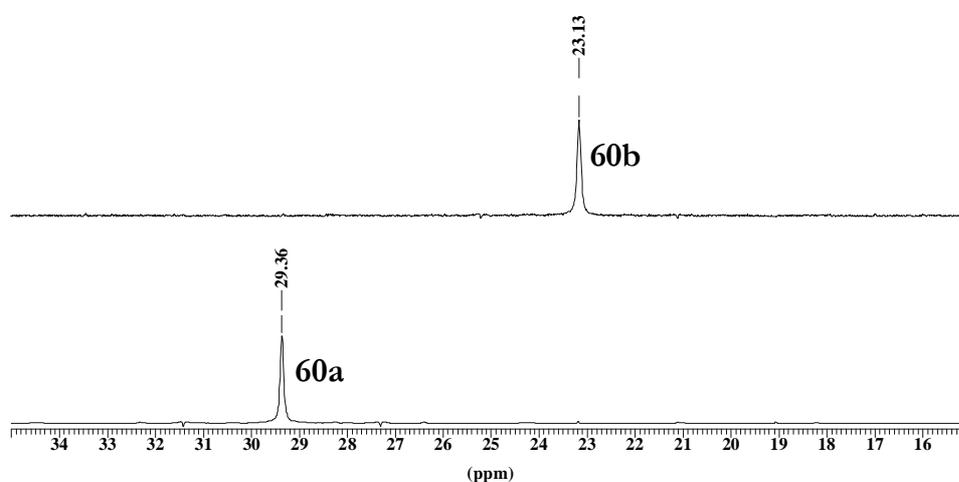


Abbildung 71 ^{31}P -NMR-Spektren von **60a** und **60b**

Die anschließende Chlorierung erwies sich allerdings als nicht erfolgreich. Hierzu wurden die acetalgeschützten Phosphinate mit verschiedenen Chlorierungsmitteln (PCl_3 , SOCl_2 , $(\text{COCl})_2$) umgesetzt und anschließend die Reaktion mit Methanol, bzw. Di-*iso*-propylamin abgebrochen (Abbildung 72). Hierbei wurden jedoch entweder kein definiertes Produkt erhalten oder im Falle des THP-geschützten Derivates **60d** eine Abspaltung der THP-Gruppe beobachtet. Die Fpmp-Schutzgruppe verbleibt an der α -Hydroxygruppe.

Die Umsetzung von Phosphonigsäure **60b** ($\text{R} = \text{Fpmp}$) mit PCl_3 in Pyridin, anschließender Reaktionsabbruch mit DIPA und wässrige Aufarbeitung ist exemplarisch als Roh- ^{31}P -NMR in Abbildung 73A dargestellt. Das Edukt wurde vollständig umgesetzt, jedoch sind eine Vielzahl an Reaktionsprodukten, unter anderem bei $\delta = 22$ ppm und $\delta = 23$ ppm das oxidierte Di-*iso*-propyl-phosphonamidat **75a** und das Bis(di-*iso*-propyl)phosphonamidat **75b**, zu sehen. Bei Phosphindichloriditen, bzw. Phosphindiamiditen ist eine chemische Verschiebung in der Region um 150 ppm zu erwarten. Bei dem Versuch der Chlorierung

im NMR-Rohr ist ein fast vollständiger Umsatz zu einer Verbindung mit einer chemischen Verschiebung von $\delta = 47.4$ ppm zu beobachten, was der Verschiebung eines Phosphordichloridates **74b** entspricht (Abbildung 73B). Bei einer Verschiebung von $\delta = 35.9$ ppm findet sich das Monochlorphosphonat **74a** zu 14%. Offensichtlich findet bei der Chlorierung des Phosphinates eine Oxidation zum Dichloridat statt.

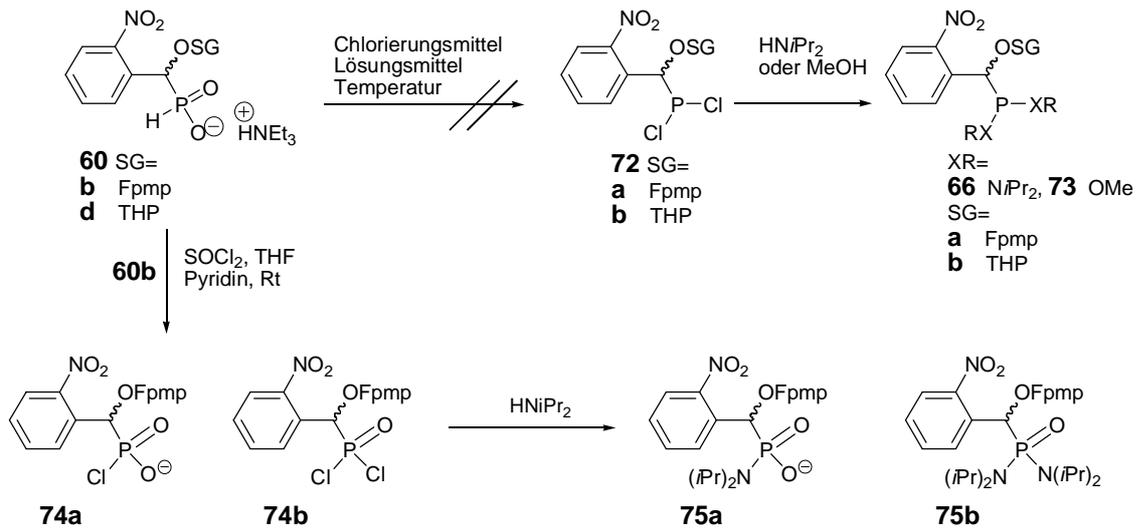


Abbildung 72 Versuch der Chlorierung vom geschützten Phosphinat **60b,d**

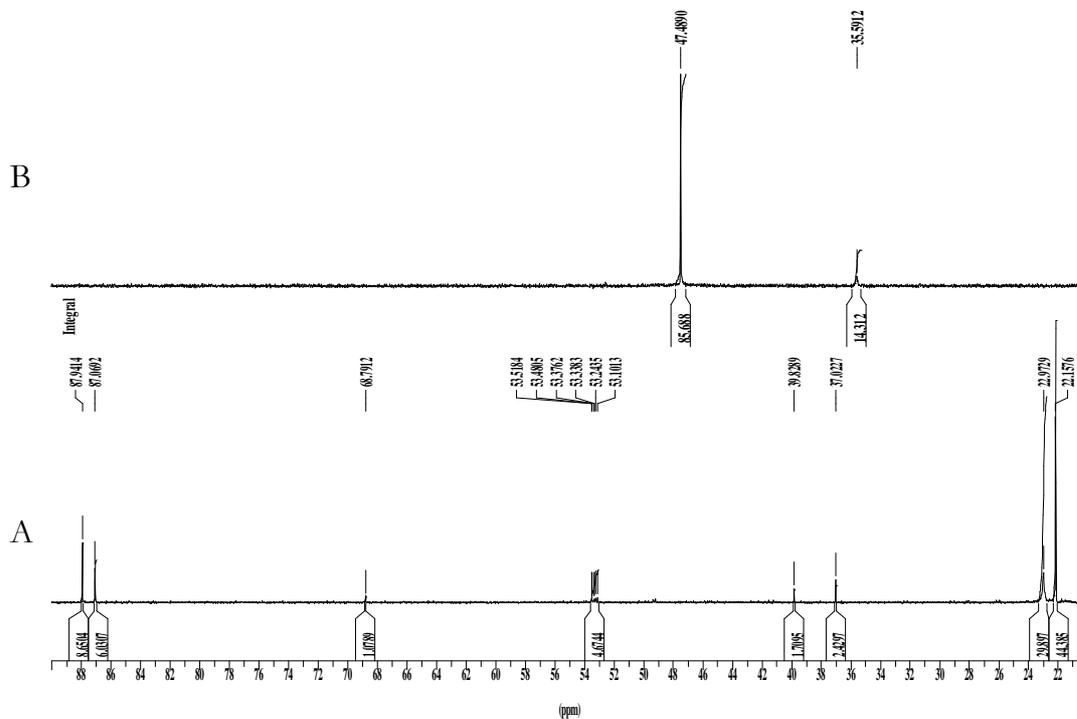


Abbildung 73 ^{31}P -NMR Spektrum des Versuches der Chlorierung von Phosphonigsäure **60b**

4.2.4 Synthese des monomeren Phosphonamiditbausteines (Variante B)

Die entstandene Hydroxygruppe konnte mit verschiedenen Schutzgruppen versehen werden. Die Schützung der OH-Gruppe mit der säurelabilen Triphenylmethyl-Schutzgruppe erwies sich als nicht sonderlich erfolgreich und das DMTr-geschützte Phosphinat **60e** konnte guten Ausbeuten von 80 % erhalten werden. Eine Blockierung der OH-Funktion mit der *tert*-Butyldiphenylsilyl-Gruppe gelang in guter 66 %iger Ausbeute in THF mit Triethylamin als Base und zum Puffern des HCl als Triethylammonium-Salz. Nach chromatographischer Aufreinigung mit Dichlormethan und 1 % Triethylamin kann das Triethylammoniumphosphinat **60c** am Vakuum aus Triethylamin auskristallisiert werden.

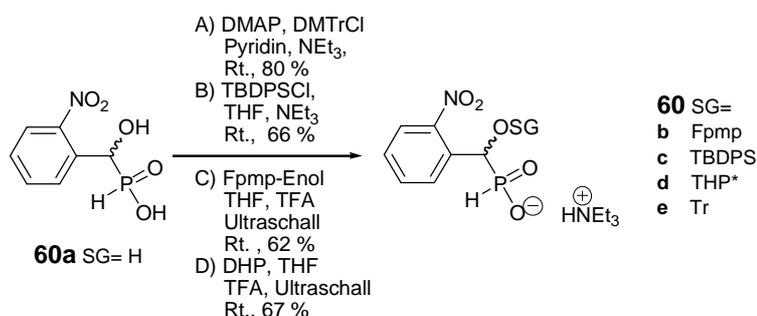


Abbildung 74 Synthese der DMTr, TBDPS, Fpmp und THP geschützten Phosphinate **60b-e**

Die geschützten [(2-Nitrophenyl)-methyl]-phosphonsäure Derivate **60b-e** wurden sowohl mit DCC als auch Pivalinsäurechlorid aktiviert und mit verschiedenen Alkoholen verestert. Mit dem NO₂BnTHPO-Phosphonsäure Derivat **60d** gelang zwar die Veresterung mit DCC, allerdings konnte der Phosphonsäureester **51c** nur in schlechten Ausbeuten erhalten werden (Abbildung 75).

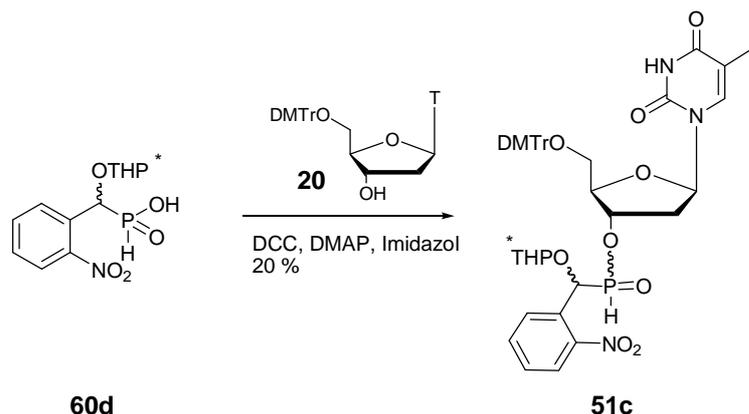


Abbildung 75 DCC-Veresterung der Phosphonigsäure **60d** mit 5'-O-DMTr-dT

Im folgenden wurde zur Untersuchung der Reaktionen die TBDPS-Schutzgruppe verwendet, da diese eine ausreichende Stabilität aufweist, einfach an die α -Hydroxygruppe anzubringen ist und, im Gegensatz zur aufwendig zu synthetisierenden Fpmp-Schutzgruppe, leicht verfügbar ist. Aus der Phosphonat-Chemie ist, wie bereits in Kapitel 4.1.2 erläutert, die Aktivierung mit Pivalinsäurechlorid und Veresterung mit einem Alkohol bereits gut untersucht und auch im Rahmen dieser Arbeit angewandt worden. Für Phosphinate wurde diese Veresterungsmethode bislang noch nicht beschrieben, sollte aber auch hier erfolgreich sein. Es gelang die Übertragung dieser Methode auf Phosphinate und eine Veresterung konnte in guten Ausbeuten erreicht werden. Zur Optimierung der Reaktion wurden zunächst einfache Alkohole wie Methanol und *iso*-Propanol verwendet und konnten in sehr guten Ausbeuten mit dem Phosphinat zur Reaktion gebracht werden (Abbildung 76).

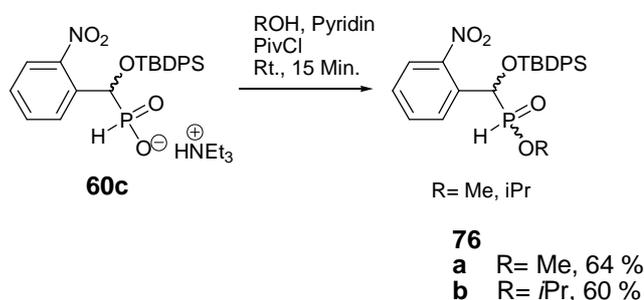


Abbildung 76 Pivaloylchlorid aktivierte Kupplung von Phosphinat **60c** mit Alkoholen

Unter diesen Reaktionsbedingungen gelang auch die Synthese des Thymidylesters **51b** in guten 55 % Ausbeute. Die Aufreinigung gelang zunächst nicht, da sich der

Phosphinatester stets zersetzte. Es ist auf unbedingte Abwesenheit von Base bei der chromatographischen Aufreinigung zu achten und dem Laufmittel sind 0.1 % Essigsäure hinzuzufügen, um eine Zersetzung zu verhindern. Ebenso gelang die Veresterung mit dem Fmpm-geschützten Phosphinat **51a** (Abbildung 77). Nicht erfolgreich war diese Reaktion allerdings zu den Trityl-**51d** und THP-Derivaten **51c**.

Bei der Bildung des Fmpm geschützten Thymidyl-phosphinates **51a** entsteht durch die Veresterung ein neues stereogenes Zentrum am Phosphoratom. Durch die Einführung von Thymidin, entstehen somit aus den zwei Enantiomeren **60b** vier Diastereomere, die im ^{31}P -NMR vier Signale mit chemischen Verschiebungen von $\delta = 32.6\text{--}31.8$ ppm ergeben (Abbildung 78). Durch den Wegfall der negativen Ladung ist der Ester um ca. 10 ppm Tieffeld-verschoben. Gleiches gilt für die Reaktion von **60c** zu **51b**.

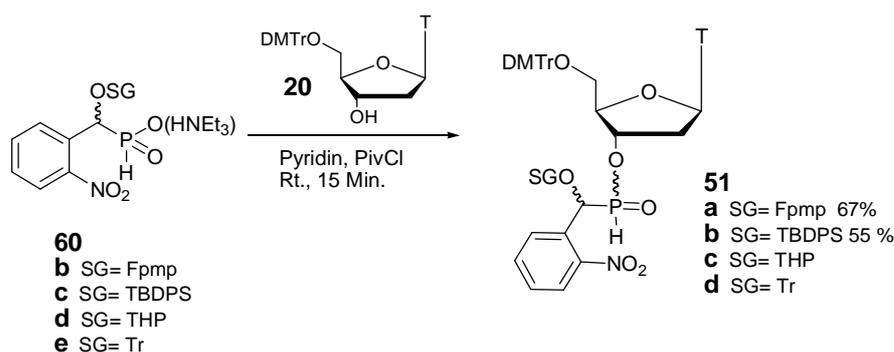


Abbildung 77 Pivalinsäurechlorid aktivierte Veresterung von $\text{NO}_2\text{BnTBDPSO}$ -Phosphinat **60b-e** mit 5'-O-DMTr-dT **20**

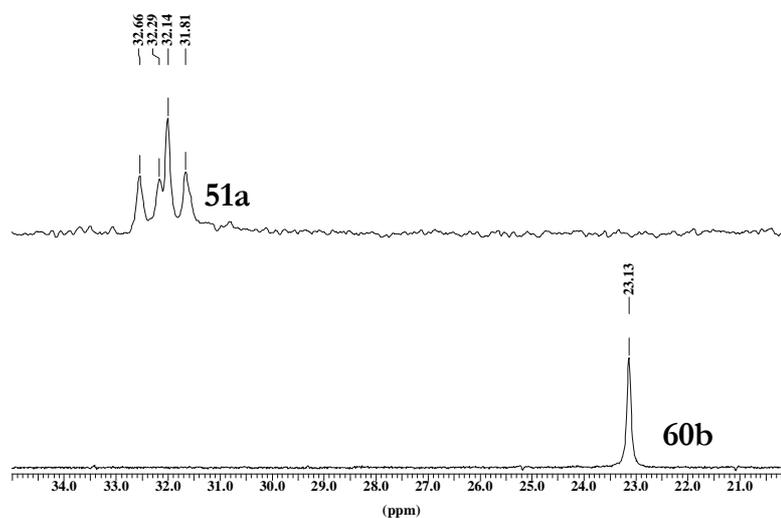


Abbildung 78 ^{31}P -NMR der Veresterung von **60b** zu **51a**

Eine interessante Darstellungsmöglichkeit von Phosphonamiditen wurde in Arbeiten von HATA et al.¹⁴³ berichtet. Sie haben Nucleosyl-H-phosphonatester **77** mit Triaryloxydichlorphosphanen zu Phosphorchloriditen **78** und diese anschließend mit Nucleosiden **79** zu Phosphittriestern **80** umgesetzt. HAMMER et al. verfolgen einen ähnlichen Zugang zu Phosphonamiditen **83**, indem sie H-Phosphinatester **81** mit Triphenyldichlorphosphin und anschließend mit Aminen (R_2NH) umsetzten (Abbildung 79).¹⁴⁴

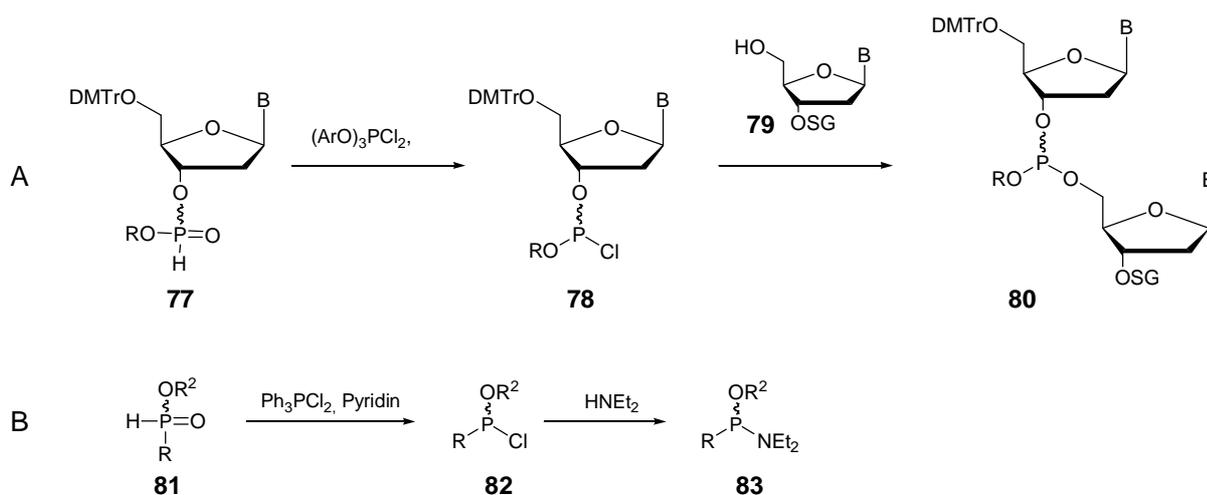


Abbildung 79 Chlorierungen nach A) HATA et al. B) HAMMER et al.

Die Reaktion von Methylphosphinsäureester **76a** zum Phosphonamidit **85a** wurde mittels Chlorierung mit Ph_3PCl_2 in Pyridin (33 % Pyridin- d_5) bei $-40\text{ }^\circ\text{C}$ und anschließender Umsetzung mit DIPA (Abbildung 80) durchgeführt.

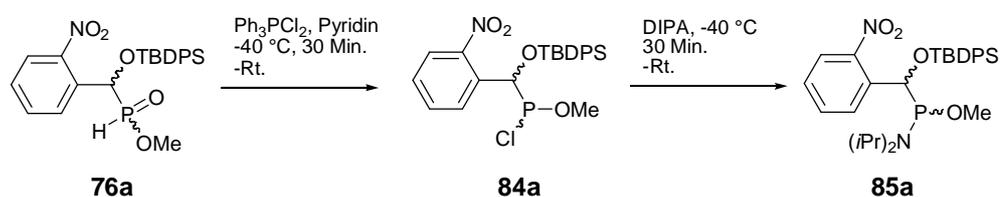


Abbildung 80 Umsetzung von $NO_2BnTBDSO$ -Phosphinsäuremethylester **76a** mit Ph_3PCl_2 und DIPA

Bei Untersuchungen im NMR-Rohr konnte die Reaktion mittels ^{31}P -NMR verfolgt werden und es wurde zunächst ein Umsatz zum Phosphorchloridit **84a** ($\delta = 155\text{ ppm}$) und nach Zugabe von DIPA zum Phosphoramidit **85a** ($\delta = 144\text{ ppm}$) beobachtet (Abbildung 81).

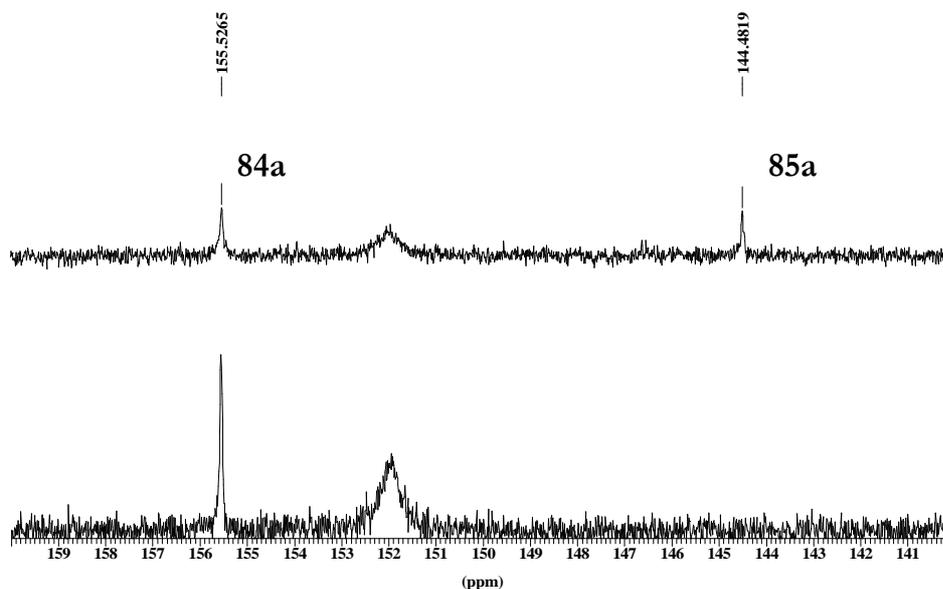


Abbildung 81 ^{31}P -NMR Verfolgung der Chlorierung von $(\text{NO}_2\text{BnTBdPSO})$ -Phosphonigsäure-methylester **76a** und Umsetzung mit DIPA zum $(\text{NO}_2\text{BnTBdPSO})$ -Methylphosphonamidit **85a**

Die synthetische Umsetzung erwies sich zunächst als schwierig konnte aber letztlich durch Abwesenheit von Wasser und Sauerstoff und anschließender chromatographischer Aufreinigung an Aluminiumoxid unter Zusatz von 0.1 % Triethylamin erfolgreich in einer akzeptablen 46 %igen Ausbeute zum Di-*iso*-propylamidit **85b** umgesetzt werden.

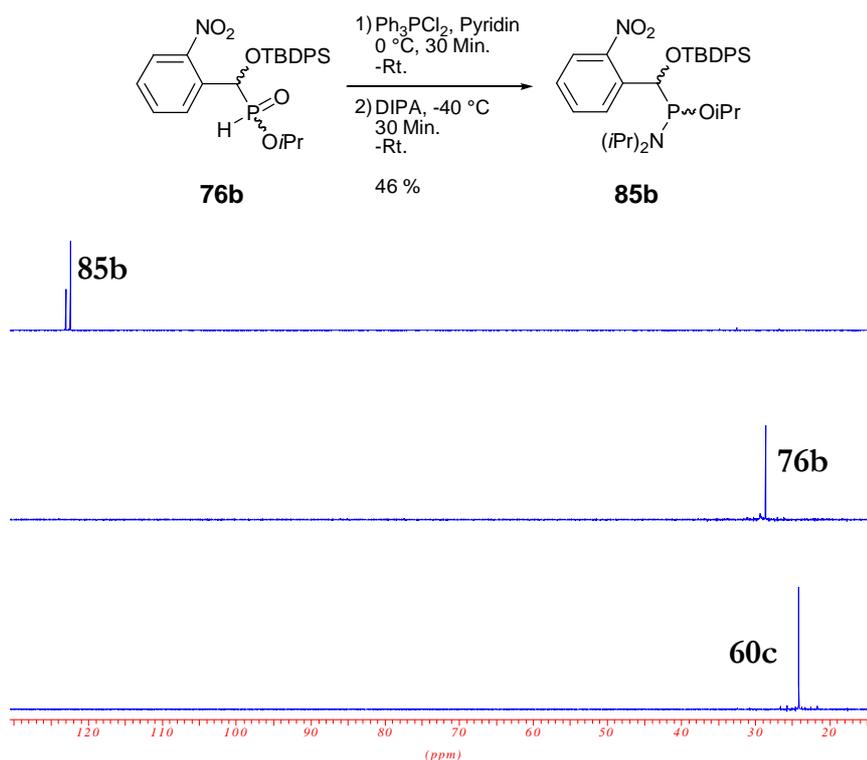


Abbildung 82 Synthese von (NO₂BnTBDPSO)-*iso*Propyl-di-*iso*-propylphosphonamidit **85b** und ^{31}P -NMR Spektren

Abschließend ist auch die Synthese des (NO₂BnTBDPSO)-(5'-O-DMTr-dT)-Di-*iso*-propyl-phosphonamidites **5b** gelungen (Abbildung 83). Die schlechte Ausbeute von lediglich 15 % beruht auf der Zersetzung des Reaktionsproduktes während der Aufreinigung. Weitere Untersuchungen zur Optimierung dieser Reaktion und der Aufreinigung des Produktes sind noch notwendig, um diese Methodik auf die Anwendbarkeit in der automatisierten DNA-Festphasensynthese zu prüfen.

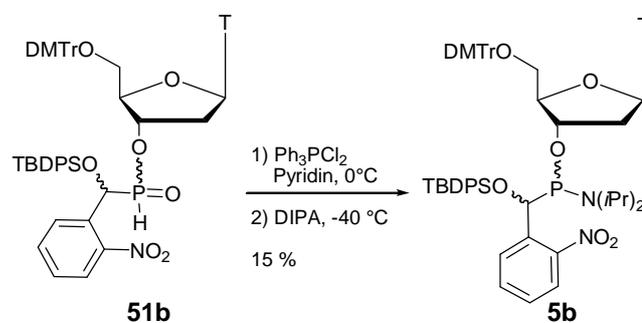


Abbildung 83 Synthese von (NO₂BnTBDPSO)-(5'-O-DMTr-dT)-Di-*iso*-propyl-phosphonamidit **5b**

4.3 Synthese von 1-(2-Fluorphenyl)-4-methoxy-1,2,3,6-tetrahydropyridin **14**

Analog zu der literaturbekannten Synthese von REESE et al. wurde 1-(2-Fluorphenyl)-4-methoxy-1,2,3,6-tetrahydropyridin (Fpmp-Enolether) **14** synthetisiert.⁸⁰ 3-Chlorpropionylchlorid wurde in einer FRIEDELS-CRAFT analogen Reaktion mit Ethen und Aluminiumchlorid umgesetzt und anschließend mit NaBH₄ in Ethanol/Wasser reduziert. Hierbei konnte die Ausbeute im Vergleich zu vorherigen Versuchen verdoppelt werden, indem darauf geachtet wurde, die Ethenkonzentration in der Reaktionslösung konstant niedrig zu halten, um eine Polymerisierung zu verhindern. Die Polymerisierung ausgehend von dem reaktiven 5-Chlorpentan-3-on-carbokation, ist in höherer Ordnung von der Ethenkonzentration abhängig und eine Polymerisierung kann durch eine geringe Ethenkonzentration in der Lösung und vorsichtige Reaktionsführung verhindert werden.

Das 1,5-Dichlorpentan-3-ol wurde mit 2-Fluoranilin und NaI in DMF zum 1-(2-Fluorphenyl)-piperidin-4-ol **28** umgesetzt und anschließend in einer PFITZNER-MOFFAT-Oxidation zum 1-(2-Fluorphenyl)-piperidin-4-on **29** oxidiert. Nach Acetalisierung mit Methanol wurde bei 150 °C Methanol im Ölpumpenvakuum eliminiert und 1-(2-Fluorphenyl)-4-methoxy-1,2,3,6-tetrahydropyridin **31** lediglich in einer Gesamtausbeute von 17 % erhalten.

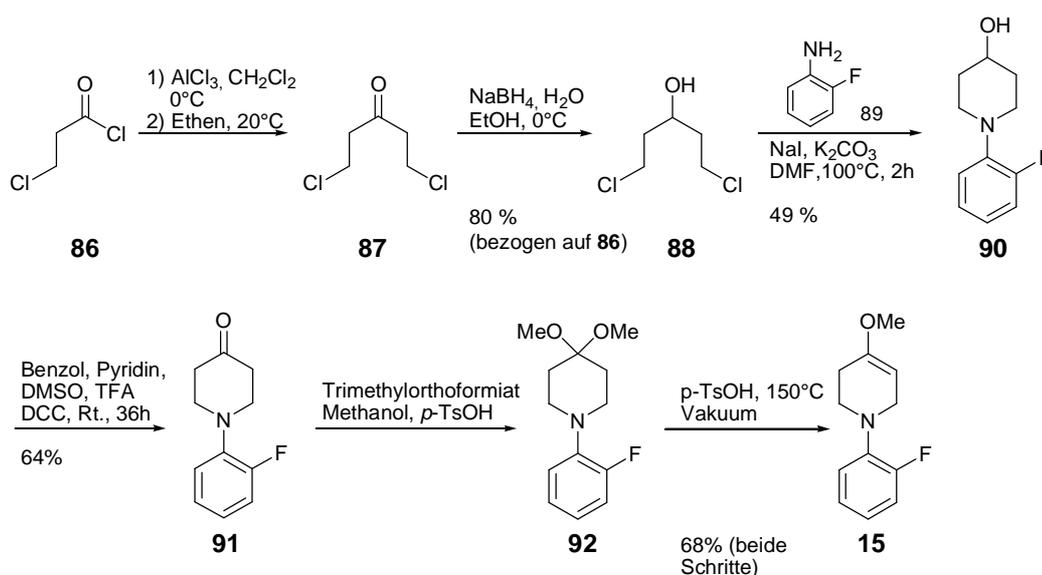


Abbildung 84 Synthese von 1-(2-Fluorphenyl)-4-methoxy-1,2,3,6-tetrahydropyridin **14**

Bei einer deutlich effizienteren Methode zur Synthese des Fmp-Enolethers **14** ebenfalls nach RESSE et al.¹⁴⁵ wurde das 1,5-Dichlorpentan-3-on **87** direkt mit 2-Fluoranilin **89** umgesetzt, in situ mit Methanol zum 1-(2-Fluorphenyl)-4,4-dimethoxypiperidin **92** umgesetzt und in einem letzten Schritt *p*-Toluolsulfonsäure katalysiert bei 150°C im Ölpumpenvakuum Methanol eliminiert (Abbildung 85). Das 1-(2-Fluorphenyl)-4-methoxy-1,2,3,6-tetrahydropyridin **14** konnte in einer Gesamtausbeute von 56 % erhalten werden. Sowohl die Ausbeuten, als auch die Reaktionsführung sind bei dieser Methode erheblich verbessert.

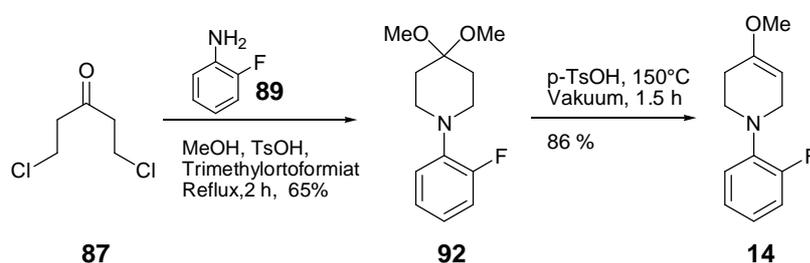


Abbildung 85 Synthese von 1-(2-Fluorphenyl)-4-methoxy-1,2,3,6-tetrahydropyridin **14**

4.4 α -Hydroxybenzylphosphonat-modifizierte Oligonucleotide

Das α -Hydroxybenzylphosphonat-Pro-Oligonucleotidkonzept wurde bislang an Thymidinoligonucleotiden untersucht. Sowohl die T_m -Werte als auch Nucleasestabilitäten dieser Modelloligonucleotide weisen vielversprechende Eigenschaften auf. In dieser Arbeit wurde das Konzept auf biologisch relevante Antisense-Sequenzen übertragen und die Eigenschaften untersucht. Als Beispielsequenzen wurden eine anti *H-ras* Sequenz (5'-TATTCGTCAT-3')^{3,75} aus der *H-ras* Initiierungsregion und eine anti Influenzasequenz (5'-ATATAAGTTATACCTTTCTT-3')⁷⁶ aus der Initiierungsregion des P2-Proteins, ein Protein welches für die virale mRNA-Synthese verantwortlich ist, gewählt. Die synthetisierten α -Hydroxybenzylphosphonat-Dinucleotide **3&4** (Kapitel 4.1.2) wurden an den markierten Stellen in die Oligonucleotide eingebaut. Die in Tabelle 2 abgebildeten Oligonucleotide wurden nach der Phosphoramiditmethode (Abbildung 86) synthetisiert.

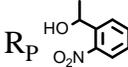
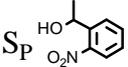
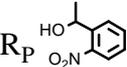
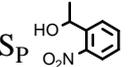
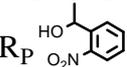
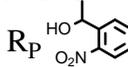
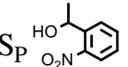
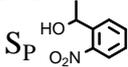
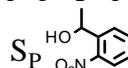
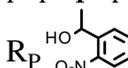
ODN	Sequenz	ODN	Sequenz
1	5'-T _P A _P T _P T _P C _P C _P G _P T _P C _P A _P T-3'	2	5'-A _P T _P G _P A _P C _P G _P G _P A _P A _P T _P A-3'
3R_P	5'-T _P A _P T _P T _P C _P C _P G _P T _P C _P A_P T-3'	3S_P	5'-T _P A _P T _P T _P C _P C _P G _P T _P C _P A_P T-3'
			
4R_P	5'-T _P A_P T _P T _P C _P C _P G _P T _P C _P A _P T-3'	4S_P	5'-T _P A_P T _P T _P C _P C _P G _P T _P C _P A _P T-3'
			
5R_P	5'-T _P A_P T _P T _P C _P C _P G _P T _P C _P A_P T-3'	5S_P	5'-T _P A_P T _P T _P C _P C _P G _P T _P C _P A_P T-3'
	 		 
6	5'-A _P T _P A _P T _P A _P A _P G _P T _P T _P A _P T _P A _P C _P C _P T _P T _P T _P C _P T _P T-3'		
7	5'-A _P A _P G _P A _P A _P A _P G _P G _P T _P A _P T _P A _P A _P C _P T _P T _P A _P T _P A _P T-3'		
8S_P	5'-A _P A _P G _P A _P A _P A _P G _P G _P T _P A_P T _P A _P A _P C _P T _P T _P A _P T _P A _P T-3'		
			
8R_P	5'-A _P A _P G _P A _P A _P A _P G _P G _P T _P A_P T _P A _P A _P C _P T _P T _P A _P T _P A _P T-3'		
			

Tabelle 2 Synthetisierte Oligonucleotide

4.4.1 Festphasen DNA-Synthese

Die Phosphoramiditmethode ist die bislang effizienteste Methode zur Synthese von Oligonucleotiden. Sie ist eine Weiterentwicklung der von LETSINGER 1975 vorgestellten Phosphittriestermethode^{146,147} die sich Phosphorchloriditen und -imidazoliden als reaktive Spezies bediente. Die in Arbeiten von BEAUCAGE und CARUTHERS¹⁴⁸ vorgestellten Phosphoramidite lassen sich bei vergleichbarer Reaktivität im Gegensatz zu den Phosphorchloriditen als Feststoffe isolieren und sind lange lagerfähig. Zur bedeutendsten Verbesserung der Methode zur Anpassung an die Bedürfnisse der automatisierten Festphasensynthese¹⁴⁹ gehörte die Einführung der Cyanoethyl-Schutzgruppe am Phosphor-Atom durch H. KÖSTER.¹⁵⁰⁻¹⁵² Die Cyanoethyl-Gruppe kann bereits unter sehr milden Bedingungen durch β -Eliminierung abgespalten werden. Dies ist durch wässrige Ammoniumhydroxid-Lösung möglich, also unter den Bedingungen, unter denen auch die Aminoschutzgruppen der Basen abgespalten werden.

Ein typischer Synthesezyklus zur Verlängerung um ein Nucleotid besteht aus vier Teilschritten (Abbildung 86). Zunächst wird die säurelabile 5'-O-DMTr Schutzgruppe, des über einen Linker an makroporöse Glaskügelchen mit definierter Porengröße (Controlled Pored Glass – CPG) gebundenen Startnucleosides **93**, mit wasserfreien organischen

Säuren (TCA, DCA) abgespalten (1). Das abgespaltene Tritylkation färbt die austretende Lösung intensiv rot und die Menge an abgespaltener Schutzgruppe lässt sich durch Messung der Absorption bei 490 nm bestimmen. Mit einem Trityl-Assay lässt sich der Verlauf der Synthese quantifizieren (Kapitel 6.7.3.1).

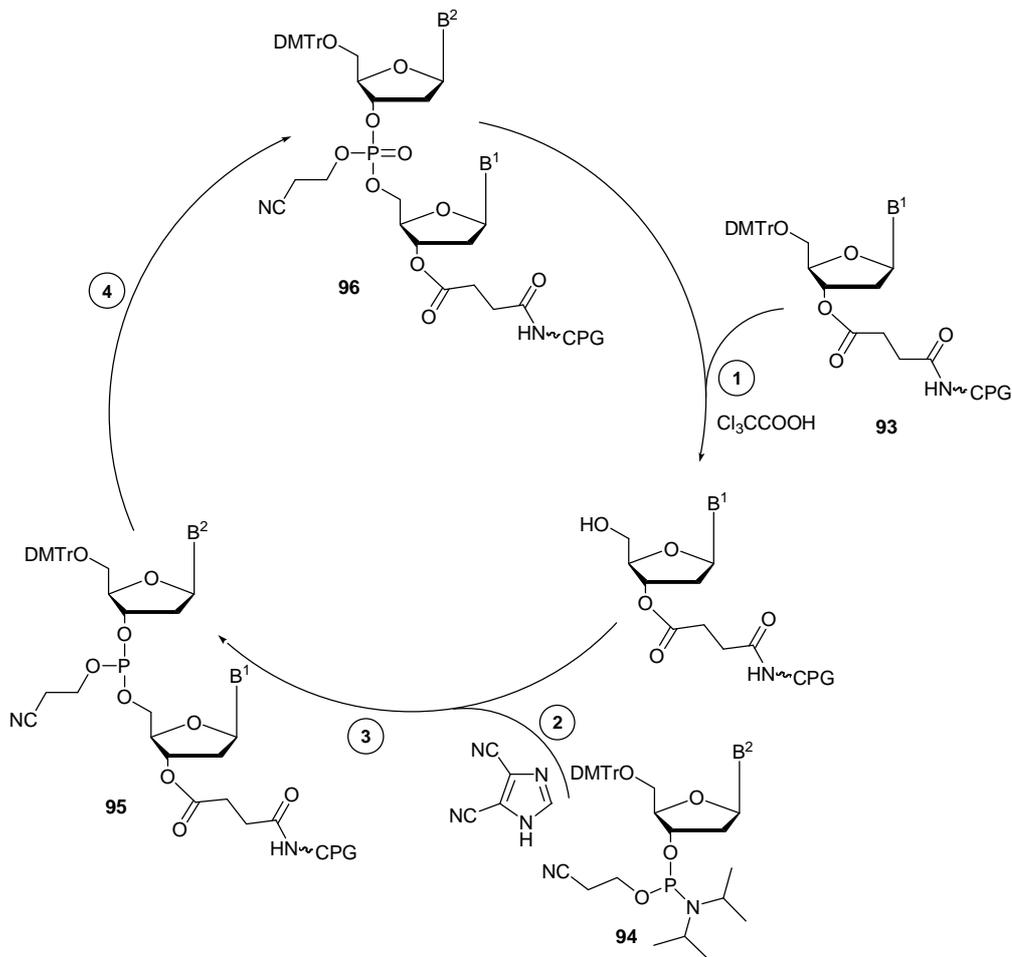


Abbildung 86 Syntheszyklus der automatisierten Festphasensynthese von Oligonucleotiden nach der Phosphoramiditmethode

In der anschließenden Kondensationsreaktion wird das Nucleosyl-3'- β -cyanoethylphosphoramidit **94** mit Tetrazol oder neuerdings Dicyanoimidazol aktiviert und an die 5'-OH-Gruppe des entstehenden Oligonucleotides gekuppelt (2 & 3). Nach Capping der nicht umgesetzten Hydroxygruppen mit Acetanhydrid und einem Aktivator (DMAP, *N*-Methylimidazol oder Lutidin) sind diese als Acetester geschützt und stehen für eine weitere Kettenverlängerung nicht mehr zur Verfügung (4). Anschließend wird der reaktivere Phosphittriesther **95** mit wässriger Iodlösung zum Phosphattriesther **96** oxidiert

(4). Nach einer Entschützung der 4,4'-Dimethoxythriphenylmethyl (DMTr-) Schutzgruppe mit Trichloressigsäure kann der Syntheszyklus erneut durchlaufen werden (1) bis die gewünschte Sequenz synthetisiert wurde. Nach Abspaltung des Oligonucleotides von Träger mit wässriger ammoniakalischer Lösung und Entschützung der Nucleobasen (5) kann das Oligonucleotid chromatographisch gereinigt werden.

4.4.2 Synthese modifizierter Oligonucleotide

Die Oligonucleotide wurden nach der Phosphoramiditmethode an einem DNA Synthesizer (Eppendorf Biotronic ECOSYN DNA 300+) synthetisiert. Die bezüglich des Phosphoratoms stereoisomerenreinen CPG-gebundenen Bausteine **4R_P,S_P** und Phosphoramidite **3R_P,S_P** (Kapitel 4.1.2) wurden nach einem modifizierten Standard-Kupplungsprotokoll (Anhang A) in DNA eingebaut. Hierbei wurden die Kupplungszeiten verlängert und anstelle von 3× 15 Sekunden 5× 60 Sekunden gekuppelt. Außerdem wurde vor und nach dem Oxidieren ein Cappingsschritt eingefügt. Der Oxidationsschritt ist verkürzt um mögliche Zersetzungen der α -Hydroxybenzylphosphonat-Modifikation zu vermeiden.

Syntheseschritt	unmodifizierte ODN	modifizierte ODN
Entschützung	detr02	detr02
Waschen	wash02	wash02
Kuppeln	coupop02	coupop02/cofpmp
Capping	-	capfpmp
Oxidieren	oxid02	oxifpmp
Capping	cap02	capfpmp
Waschen	wash02	wash02

Tabelle 3 DNA-Synthesesyklus

Nach der Synthese wurde mit 25% Ammoniak vom Träger abgespalten und die Schutzgruppen während 8 Stunden bei 55 °C entfernt (Kapitel 6.7.3.2). Die wässrige Ammoniaklösung wurde am Vakuum-Probenkonzentrator entfernt, in 750 μ l Wasser aufgenommen und an Sephadex Entsalzersäulen (Pharmacia Biosystems NAP-10) entsalzt. Es wurden 3 x 1 mL Fraktionen aufgefangen und von den Fraktionen HPLC-Chromatogramme aufgenommen (Kapitel 6.7.3.4). Die Fraktionen wurden am Vakuum-Probenkonzentrator eingengt, mit 100 μ l Wasser vereinigt und in zwei Läufen an der HPLC aufgereinigt (Kapitel 6.7.3.5, Angang B). Gleiche Fraktionen wurden vereinigt, am

Vakuum-Probenkonzentrator eingengt, in 200 μ l Wasser aufgenommen und die Menge an Oligonucleotid mittels UV bei 260 nm bestimmt (Kapitel 6.7.3.3).

Während der Synthese wurde zur Reaktionskontrolle ein Trityl-Assay durchgeführt (Kapitel 6.7.3.1). Dabei wird von jedem Entschützungs-schritt die abgespaltene DMTr-Schutzgruppe aufgefangen und deren Gehalt UV-spektrometrisch bei 490 nm bestimmt (Anhang C). Der Trityl-Assay liefert eine Aussage über die Effizienz der jeweiligen Kupplungsschritte, hier exemplarisch für **ODN3** (Abbildung 87). Als festphasengebundener Startbaustein wurde hier ein modifizierter Baustein **4** eingesetzt. Aus dem Trityl-Assay lässt sich entnehmen, dass die Modifikation in der Nähe der Kupplungsstelle einen Einfluss auf die Kupplungseffizienz hat. So beträgt die Kupplungsausbeute für den 1. Schritt lediglich 90%. Auch die Kupplung mit 2'-Desoxyguanosin-3'-phosphoramidit liefert lediglich eine 84%ige Kupplungsausbeute, für die weiteren Schritte sind die Kupplungen nahezu quantitativ.

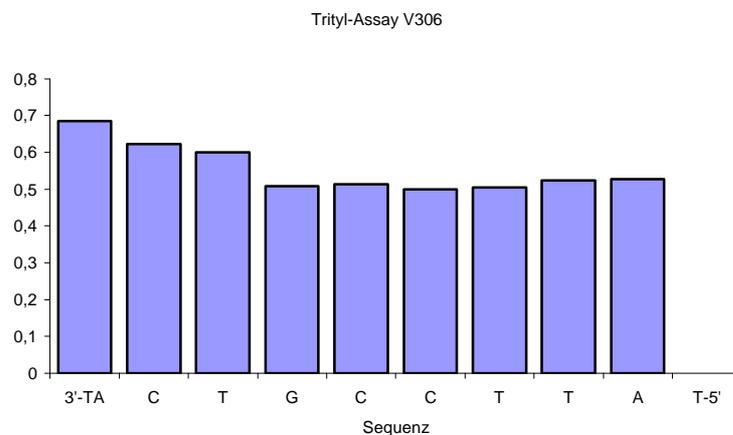


Abbildung 87 Trityl-Assay der Synthese von **ODN3**

Die Roh-Chromatogramme der modifizierten, Fpmp geschützten Oligonucleotide wiesen eine erhebliche Menge an zusätzlichen Verbindungen auf (Abbildung 88 und Anhang C), unter anderem das in dem aufgeführten Beispiel bei 9.52 Minuten eluierende unmodifizierte Oligonucleotid **ODN1**. Dies war unerwartet, da die Synthese selber gut verlaufen ist.

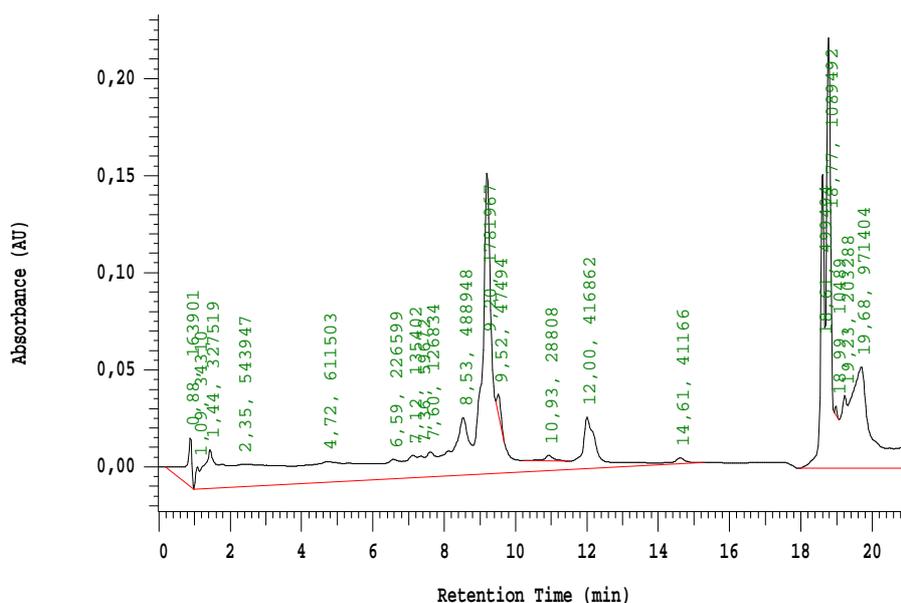
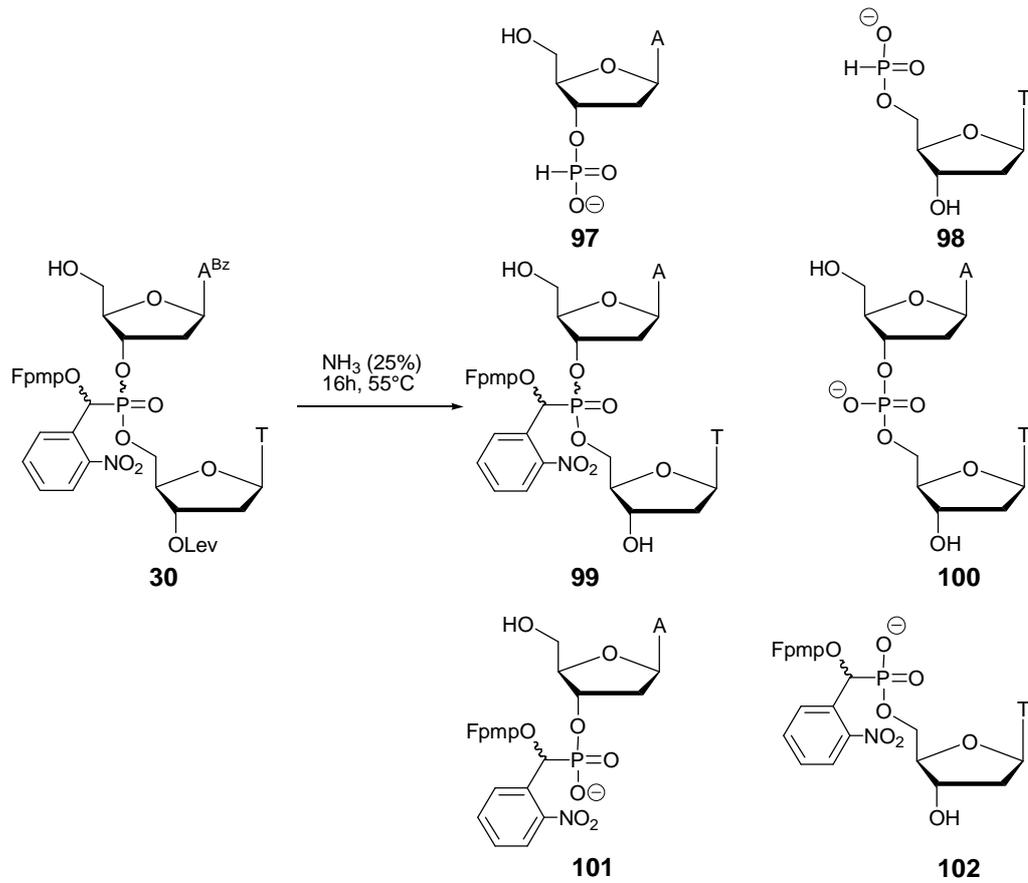
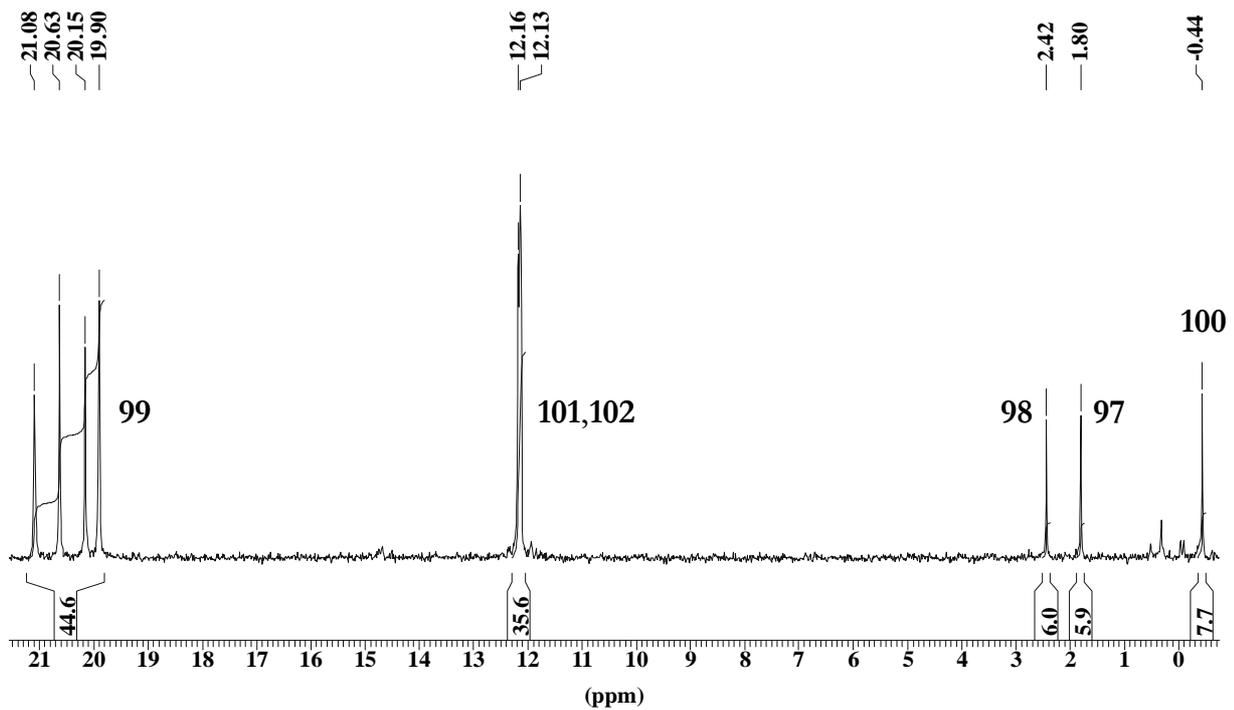


Abbildung 88 HPLC-Roh-Chromatogramm α -Hydroxybenzylphosphonat-modifizierter DNA am Beispiel von **ODN3** nach Behandlung mit 25 % Ammoniak bei 55 °C für 8 h.

Bei einer Behandlung von α -Hydroxybenzylphosphonat-Dinucleotid **30** mit 25% Ammoniak bei 55 °C für 16 h, lassen sich mittels ^{31}P -NMR-Spektroskopie ebenso eine Vielzahl an Hydrolyseprodukten nachweisen (Abbildung 89, Abbildung 90). Die vier Diastereomere des entschützten Phosphonatdinucleotides **99** lassen sich zwischen $\delta = 19.9$ ppm und $\delta = 21.1$ ppm nachweisen, allerdings nur zu einem Anteil von 45 %. Mit 35 % findet man bei $\delta = 12.2$ ppm und $\delta = 12.1$ ppm die Hauptabbauprodukte **101** und **102**, welche durch Hydrolyse einer Phosphonatdiesterbindung entstehen. Bei $\delta = 2.4$ ppm und $\delta = 1.8$ ppm finden sich mit je 6 % die entsprechenden H-Phosphonate **97,98** welche mit Hilfe des Kopplungsmusters identifiziert werden konnten. Das Signal bei $\delta = 2.5$ ppm konnte als ddd der Verbindung **98** mit der P-H-Kopplung $^1J = 583.5$ Hz, und den Kopplungen zu H5' mit $J = 7.6$ Hz, $J = 7.6$ Hz, und das Signal bei $\delta = 1.8$ ppm als dd der Verbindung **97** mit der P-H-Kopplung $^1J = 587.3$ Hz und der Kopplung zu H3' mit $J = 9.6$ Hz zugeordnet werden. Bei einer chemischen Verschiebung von $\delta = -0.44$ ppm mit einem ddd Kopplungsmuster ($3 \times J = 6.0$ Hz) das Dinucleotid **100** zu 8 %.

Abbildung 89 Hydrolyse von Phosphonatdinucleotid **30** in 25 % Ammoniak

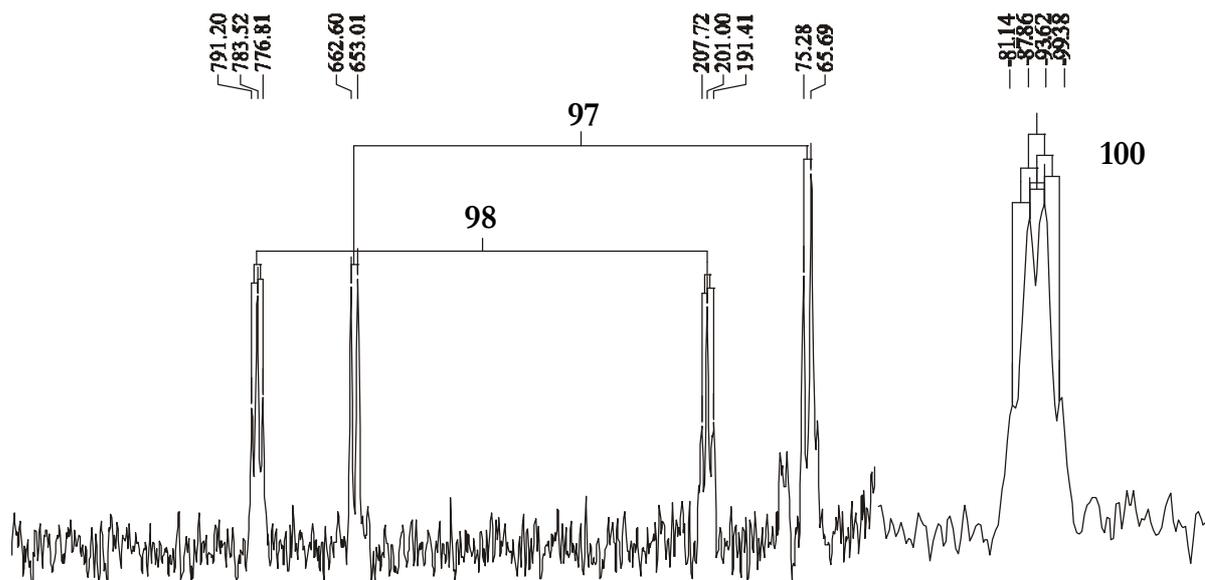


Abbildung 90 ³¹P-NMR der Hydrolyse von **30** mit Ammoniak

Für zukünftige Arbeiten an gemischten modifizierten Sequenzen ist es notwendig, die Bedingungen zur Abspaltung der Schutzgruppen in Betracht auf eine hinreichende Stabilität der α -Hydroxybenzylphosphonat-Modifikation zu optimieren. Auch ist eine Variation der Schutzgruppen für die exocyclischen Aminogruppen der Nucleobasen in Betracht zu ziehen. So ließen sich z.B. Pac (Phenoxyacetyl) geschützte Nucleobasen einsetzen, die sich unter sehr milden Bedingungen mit Kaliumcarbonat in Methanol entfernen lassen.¹⁵³ Auch sind Photolytisch oder Hydrogenolytisch spaltbare Schutzgruppen denkbar. Für eine milde Abspaltung des Oligonucleotids von der festen Phase kommen z.B. der Oxalyl-Linker¹⁵⁴ oder auch photolytisch spaltbare Trägermaterialien¹⁵⁵ zum Einsatz.

Aufgrund dieser Beobachtungen wurden modifizierte Entschützungsbedingungen untersucht, welche bereits für die Entschützung von Alkylphosphonaten beschrieben wurde.¹⁵⁶ Wird das Oligonucleotid mit 25 % Ammoniak bei Raumtemperatur für zwei mal 15 Minuten vom Träger abgespalten, anschließend sofort am Vakuum-Probenkonzentrator zur Trockene eingengt, mit Ethanol koevaporiert und anschließend die Schutzgruppen mit einem Gemisch aus Ethylendiamin, Ethanol, Acetonitril, Wasser (50 : 23.75 : 23.75 : 2.5 v/v/v/v) mit abschließenden mehrfachem Kodestillieren mit Ethanol abgespalten, so treten keine Hydrolyseprodukte durch die Entschützung auf (Abbildung 91).

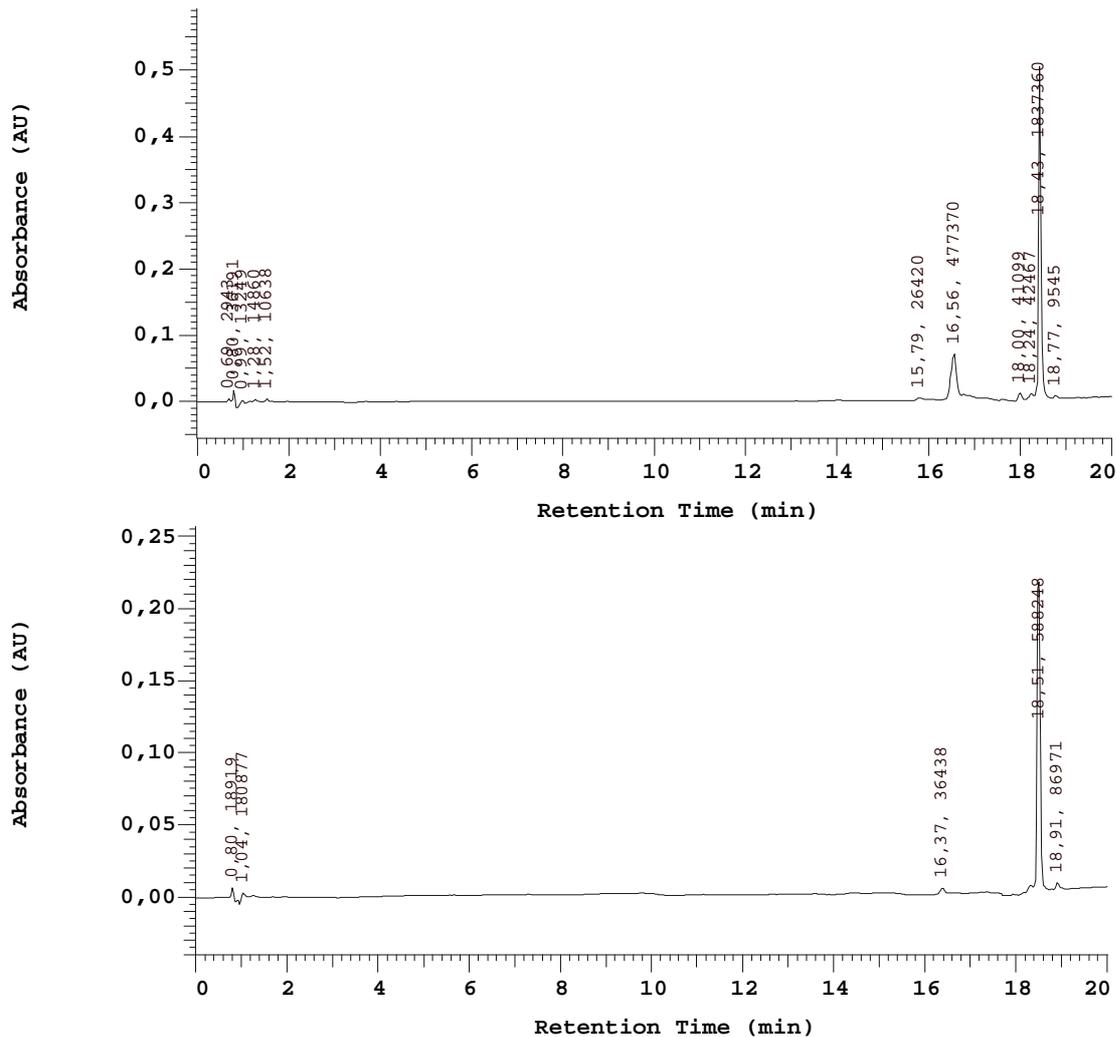


Abbildung 91 HPLC-Roh-Chromatogramm α -Hydroxybenzylphosphonat-modifizierter DNA am Beispiel von **ODN3** nach Schutzgruppenabspaltung mit modifizierten Bedingungen und gereinigtes **ODN3**

Schon im Trityl-Assay (Kapitel 6.7.3.1, Anhang C) zeigte sich, dass die modifizierte Synthesemethode gute Kupplungsausbeuten mit den modifizierten CPG-gebundenen Startbausteinen **4** liefert. Lediglich die Kupplung mit 2'-Desoxyguanosin verläuft schlechter als mit den übrigen Nucleosiden. Im Gegensatz zu den Kupplungen mit den Standardamiditen verläuft die Kupplung mit den modifizierten α -Hydroxybenzylphosphonat-dinucleotid phosphoramiditen sehr viel schlechter. Trotz verlängerter Kupplungszeiten und mehr Kupplungsschritten konnte lediglich eine Ausbeute von 28 % erzielt werden (Abbildung 92). Aufgrund dieser schlechten Ausbeute ist das

Hauptprodukt dieser Synthese das vor dem Einbau der Modifikation abgebrochene und unmodifizierte Oligonucleotid 5'-TCCGTCAT-3'.

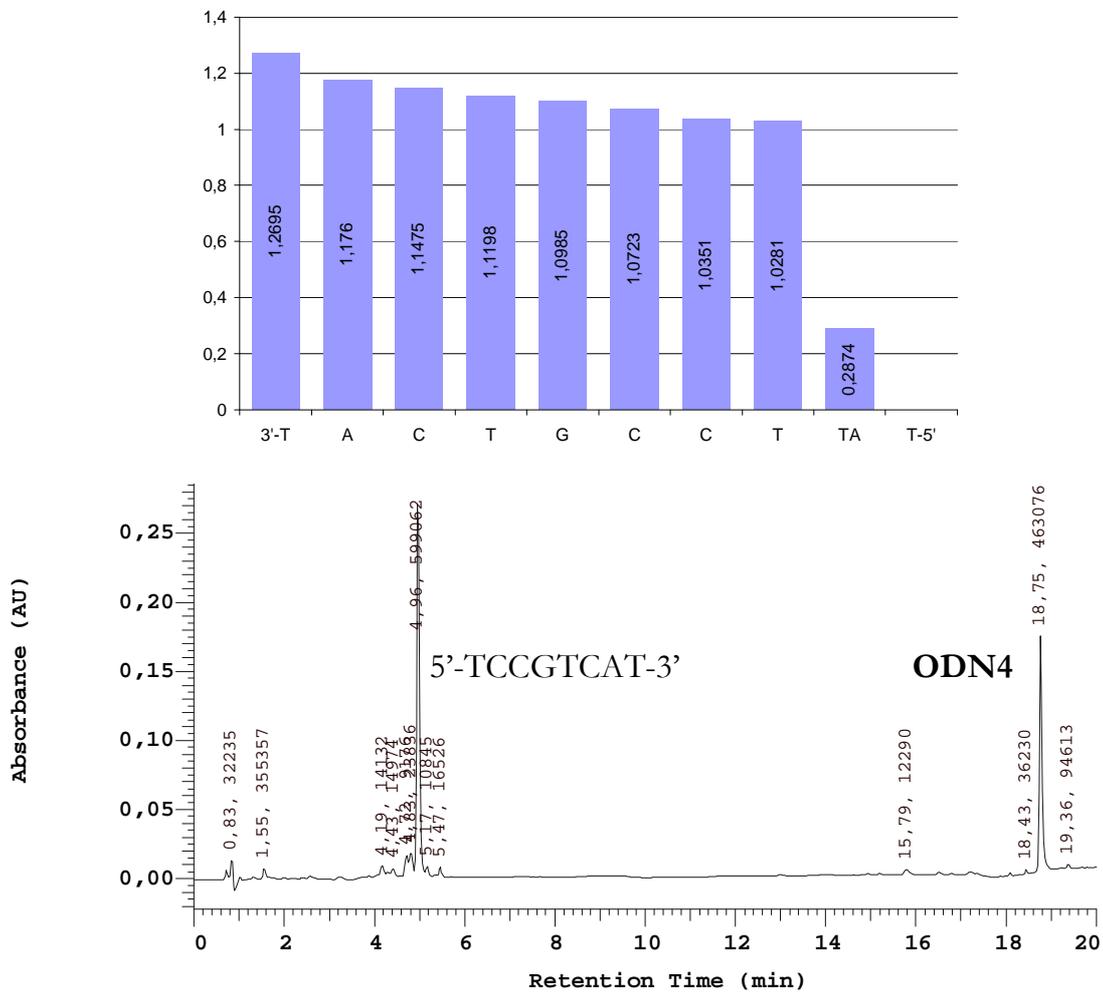


Abbildung 92 Trityl-Assay und Roh-HPLC-Chromatogramm von **ODN4**

Die so erhaltenen vom Träger abgespaltenen und entschützten Oligonucleotide wurden in Wasser aufgenommen, auf NAP-10 Entsalzerkartuschen gegeben und mit Wasser eluiert. In der Regel befand sich die gesamte Menge an Oligonucleotid in den ersten beiden Millilitern des Eluates. Die aufgefangenen Fraktionen wurden per HPLC analysiert und am Vakuum-Probenkonzentrator zur Trockene eingengt. Die Fraktionen wurden in Wasser vereinigt und in zwei Läufen auf die HPLC injiziert und gereinigt. Die Fraktionen wurden erneut per HPLC auf Reinheit geprüft, am Vakuum-Probenkonzentrator zur Trockene eingengt, vereinigt und erneut eingengt.

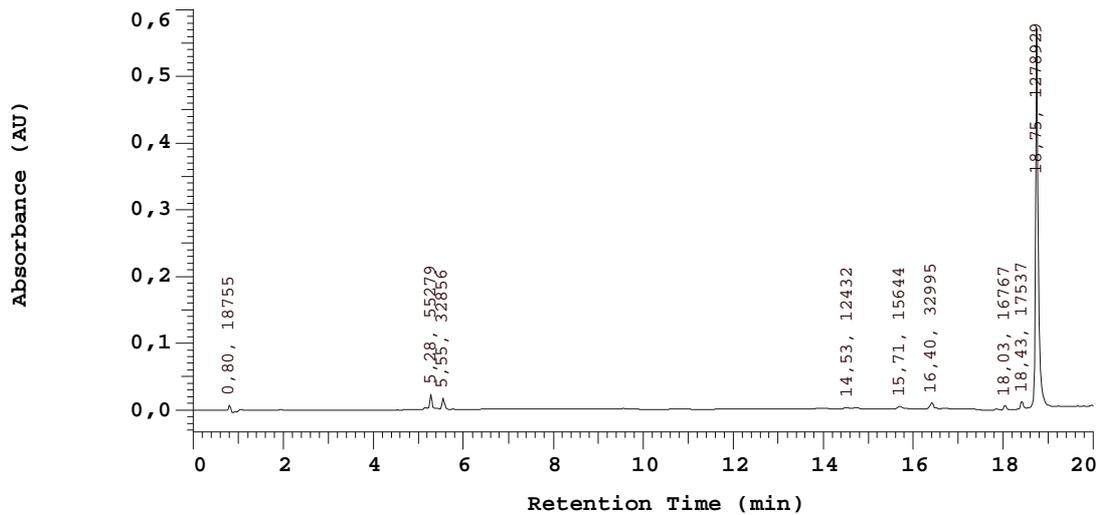


Abbildung 93 HPLC-Chromatogramm vom gereinigten **ODN 4**

Vom gereinigten Oligonucleotid wurde bei $\lambda=260$ nm am UV-Spektrometer die Menge an Oligonucleotid gemessen (Kapitel 6.7.3.3). Es wurden für die Bestimmung thermodynamischer Parameter und für die Massenspektrometrie 1 nmol Aliquote entnommen und die restliche Lösung am Vakuum-Probenkonzentrator bis zur Trockene eingengt.

4.4.3 Entschützung der modifizierten Oligonucleotide

Die Abspaltung der Nucleobasenschutzgruppen (*iso*-Butyryl, Benzoyl) und der β -Cyanoethyl-Schutzgruppen wurde in Kapitel 4.4.2 erläutert. Die nun noch an der 5'-Position DMTr- und α -O-Fpmp-geschützten Oligonucleotide wurden in einem 1.4 M Glycin/HCl Puffer (pH 3.0) für 36 Stunden bei 37 °C inkubiert um die säurelabilen Schutzgruppen zu entfernen. Anschließend wurde die Lösung auf NAP-10 Entsalzersäulen gegeben und 500 μ l Fraktionen aufgefangen. Von den Fraktionen wurden jeweils 20 μ l auf die HPLC injiziert und Oligonucleotid beinhaltende Fraktionen am Vakuum-Probenkonzentrator eingengt und vereinigt. Nach ca. 1.5 mL war die aufgefangene Lösung sauer und eine erneute Entsalzung der Fraktion musste durchgeführt werden. Wird nicht auf eine pH-neutrale Oligonucleotidlösung geachtet, so zersetzt sich das Oligonucleotid beim Aufkonzentrieren wie in den HPLC-Chromatogrammen in Abbildung 94 gezeigt ist. Die Chromatogramme zeigen das Chromatogramm nach Entschützung und Entsalzung vor (A) (analytischer Lauf), nach dem Einengen (B) (Trennung). Im Vergleich dazu findet bei den pH-neutralen

Oligonucleotidlösungen weniger Zersetzung statt. Jedoch wird auch hier ein signifikanter Anteil zersetzt, so dass die Aufreinigung sich erschwerte und die Ausbeute sich merklich verringerte. So konnten nach Fpmp-Abspaltung und Aufreinigung je Oligonucleotid jeweils nur wenige nmol isoliert werden, obgleich von den Oligonucleotiden vor Entfernung der Fpmp-Schutzgruppen zwischen 50 und 150 nmol vorhanden waren. Gründe für diesen hohen Verlust konnten auch bei einer Wiederholung der Synthese-/Entschützungs-/ Aufreinigungssequenz nicht gefunden werden.

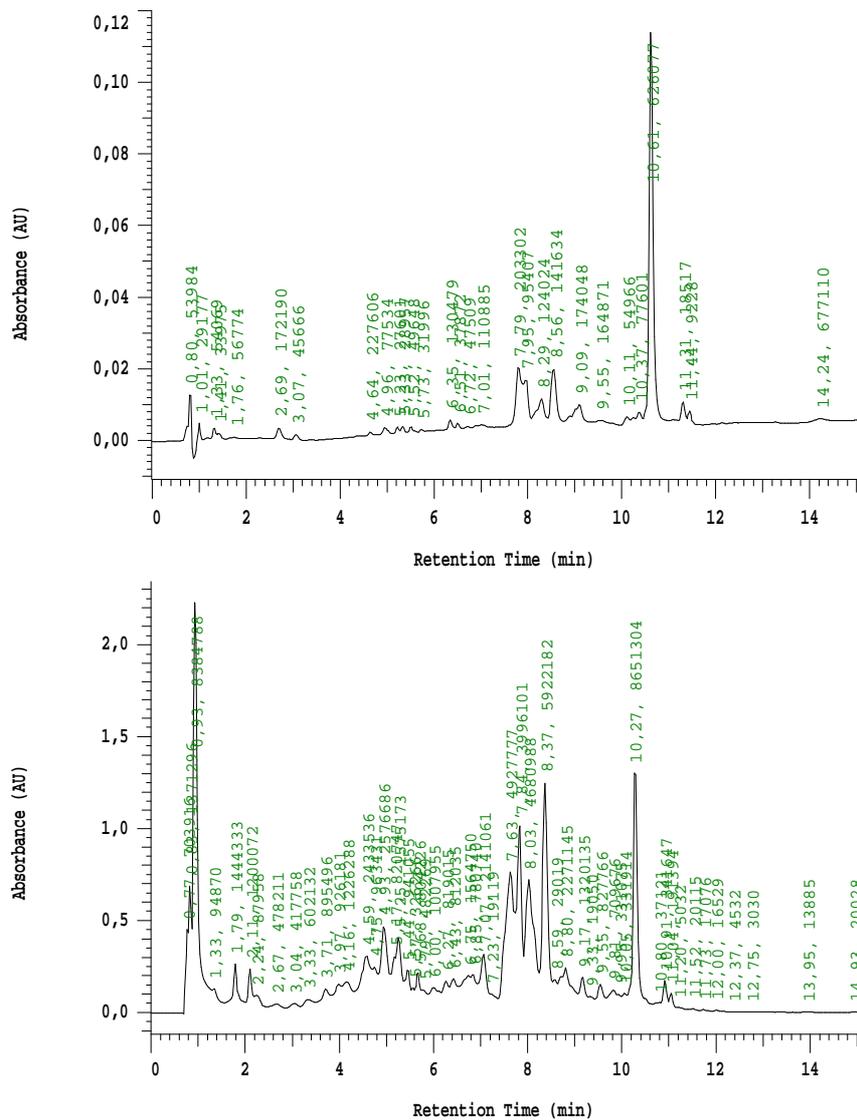


Abbildung 94 Oligonucleotid nach Fpmp-Entschützung A: vor B: nach dem Einengen

4.4.4 Bestimmung thermodynamischer Daten

Ein wichtiger Aspekt des Antisense-Konzeptes sind die Hybridisierungseigenschaften des Antisense-Stranges an den Sense-Strang. Diese werden beschrieben durch den Schmelzpunkt (T_m -Wert) des Doppelstranges und die thermodynamischen Werte ΔH , ΔS und ΔG , sowie der Bindungskonstante $K(T)$.

Die T_m -Wert Bestimmungen wurden in wässrigem 140 mM NaCl-Puffer durchgeführt. Dieser wurde an einem UV-Spektralphotometer (Varian Cary) bei 260 nm mit einem Temperaturgradienten gemessen. Duplexgebundene DNA liegt in helikaler Form vor, in der die Nucleobasen senkrecht zur Achse stehen und so durch π - π -Wechselwirkungen Basenstapelungen eingehen können. Dies sorgt dafür, dass der Extinktionskoeffizient bei 260 nm niedriger ist als bei dissoziierter DNA (Hyperchromizität), welche durch die fehlende Organisation keine Basenstapelungen eingehen kann. Mit zunehmender Temperatur steigt der Anteil an dissoziierter DNA und somit die Extinktion ebenso und die Bildung und das Aufbrechen der Doppelhelix kann beobachtet werden. Da Duplex-DNA in einem relativ kleinen Temperaturbereich wegen des kooperativen Verhaltens plötzlich dissoziiert, kann aus dem Anstieg der Absorption der T_m -Wert bestimmt werden.¹⁵⁷

Thermodynamische Daten (T_m -Wert, ΔH , ΔS , ΔG , $K(T)$) können aus der Form der Schmelzkurven mittels der VAN'T HOFF Analyse ermittelt werden.¹⁵⁸⁻¹⁶¹ Zunächst werden die linearen Bereiche der Schmelzkurve (vollständig hybridisiert und vollständig dissoziiert) ermittelt und mittels linearer Regression die Steigung bestimmt. Aus der Differenz des Kurvenwertes zur Dissoziationsgeraden (x) und zur Hybridisierungsgeraden (y) kann das Verhältnis von dissoziierter zu undissoziierter DNA

ermittelt ($\alpha(T) = x/(x+y)$) oder auch $\mathbf{a}(T) = 1 + \frac{1 - \sqrt{2C_T e^{(-\Delta H + T\Delta S)/RT} + 1}}{C_T e^{(-\Delta H + T\Delta S)/RT}}$ (Gleichung 9)¹⁶⁰

und gegen die Temperatur aufgetragen werden (Alpha-Kurve). Der Schmelzpunkt ergibt sich aus $\alpha(T) = 0.5$. In einem bimolekularen System ergibt sich die Bindungskonstante zu

$$K(T) = \frac{\mathbf{a}(T)}{\left(\frac{C_t}{2}\right)(1 - \mathbf{a}(T))^2} \quad \text{Gleichung 10 und nach ARRHENIUS gilt}$$

$$\ln(K(T)) = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad \text{Gleichung 11}$$

Wird nun $\ln(K(T))$ gegen $1/T$ aufgetragen, so ergibt sich die Bindungsenthalpie aus der Steigung und die Entropie aus dem Achsenabschnitt der Regressionsgeraden des linearen Bereiches (Abbildung 95).

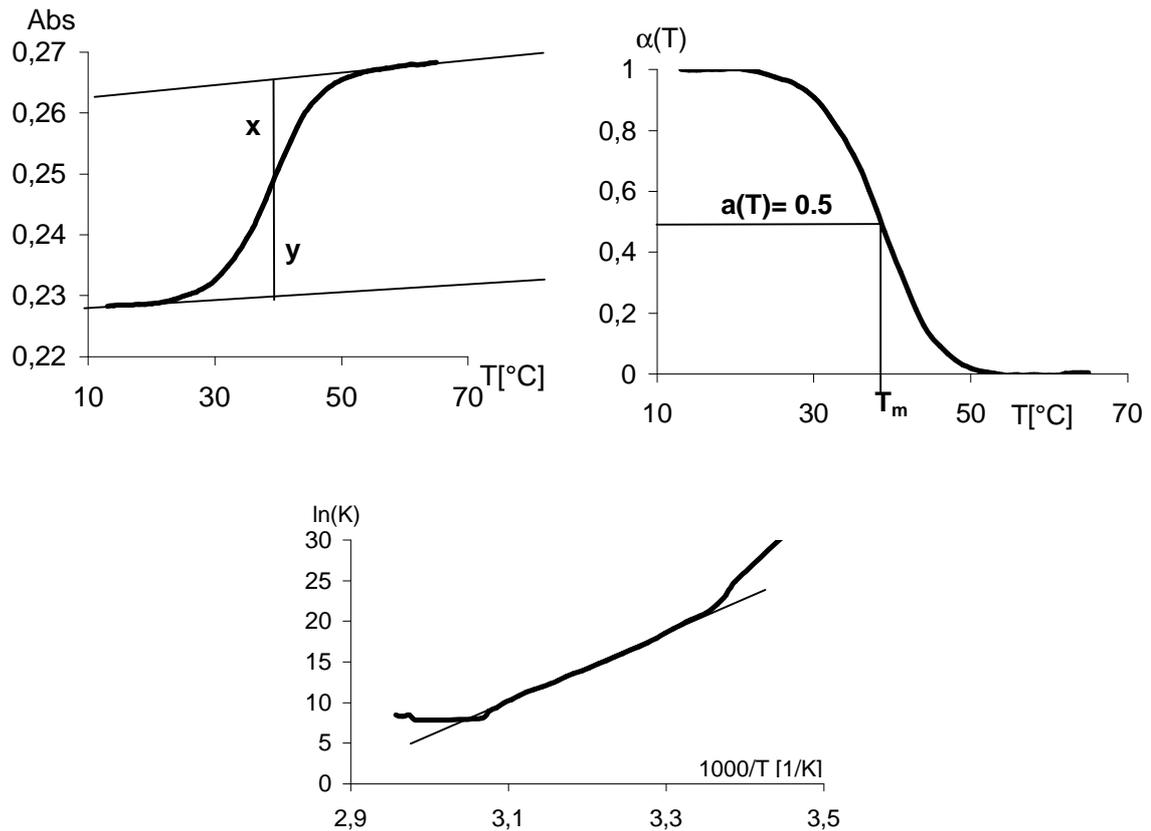


Abbildung 95 VAN'T HOFF Kurvenanalyse am Beispiel vom **ODN1/ODN2-Duplex**

Die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Oligonucleotide wurden in wässrigem Phosphatpuffer (10 mM Phosphat, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA) gegen den komplementären DNA, bzw. RNA-Strang gemessen. Die gemessenen T_m -Werte der anti *H-ras* Sequenzen sind in Abbildung 96 dargestellt. Besonderes Augenmerk ist auf das in 5'-Position S_P -modifizierte Oligonucleotid zu legen. Dies ist das einzige ODN, welches gegen den komplementären DNA-Strang einen erhöhten T_m -Wert aufwies. Auch mit RNA als Gegenstrang wurde der höchste T_m -Wert dieser Serie gemessen. Alle anderen Modifikationen erniedrigen den T_m -Wert um ein bis zwei Grad. Die gemessenen

thermodynamischen Parameter sind in Tabelle 4 wiedergegeben. Das **ODN3Rp** konnte nicht erhalten werden

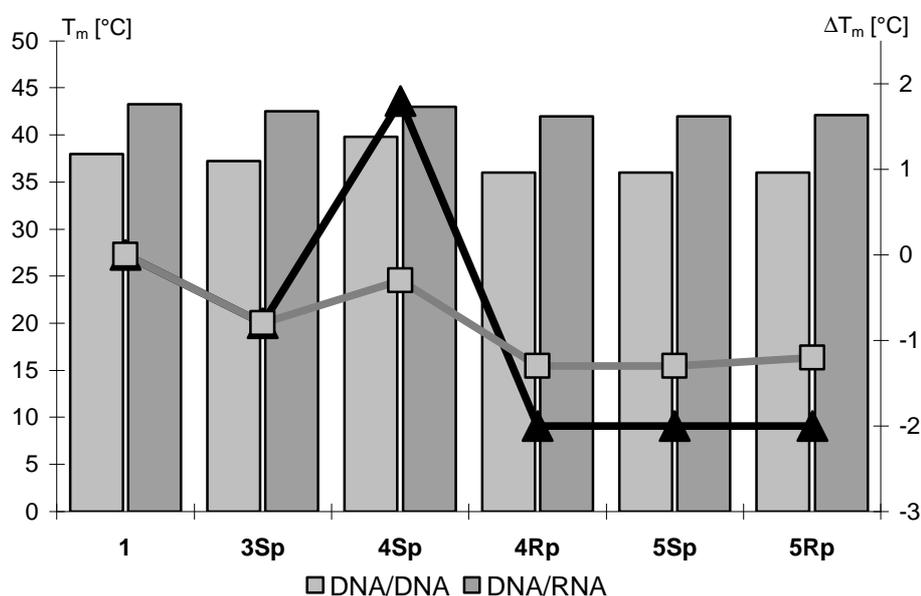


Abbildung 96 T_m -Werte der gemessenen Oligonucleotide gegen DNA  und gegen RNA  als gemessener T_m -Wert (Balken) und als Differenz zum Referenzstrang (DNA  RNA )

ODN	T_m [°C]	ΔG 25° /K [kJ/mol]	ΔG 37° /K [kJ/mol]	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/molK]
1	38	-50.8	-39.3	-337.4	-961.2
		$8 \cdot 10^8$	$4 \cdot 10^6$		
3Sp	37.2	-50.7	-37.7	-372.1	-1078
		$7.5 \cdot 10^8$	$2.5 \cdot 10^6$		
4Rp	35	-44.6	-35.7	-265.5	-741.0
4Sp	39.8	-54.9	-41.1	-396.2	-1145
		$4 \cdot 10^9$	$8 \cdot 10^6$		
5Rp	35.9	-48.8	-36.6	-311.3	-885.9
		$4 \cdot 10^8$	$1.5 \cdot 10^6$		
5Sp	36.1	-46.1	-36.8	-274.2	-765.1
		$1.2 \cdot 10^8$	$1.6 \cdot 10^6$		

Tabelle 4 Thermodynamische Parameter der DNA/DNA Duplices der modifizierten H-*ras* ODNs

ODN	T _m [°C]	ΔG 25° /K [kJ/mol]	ΔG 37° /K [kJ/mol]	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/molK]
1	43.2	-58.0 1.5·10 ¹⁰	-45.1 4·10 ⁷	-379.4	-1078
3Sp	42.5	-56.2 7·10 ⁹	-44.2 2.7·10 ⁷	-356.7	-1008
4Rp	43	-57.4 1.1·10 ¹⁰	-44.3 2.9·10 ⁷	-390.4	-1116
4Sp	42	-	-	-	-
5Rp	42	-	-	-	-
5Sp	42.1	-58.3 1.6·10 ¹⁰	-44.2 2.8·10 ⁷	-408.9	-1176

Tabelle 5 Thermodynamische Parameter der DNA/RNA Duplices der modifizierten H-*ras* ODNs

Die Van't Hoff-Methode ist für die Bestimmung der T_m-Werte gut geeignet. Der Fehler, der durch falsche Wahl der Bereiche für die lineare Regressionsanalyse (Abbildung 95) zustande kam lag zwischen ± 0.1 °C und ±0.3 °C. Der Fehler für ΔG lag zwischen ±1 kJ/mol und ±2 kJ/mol. Diese Methode ist der Methode über die Bestimmung der Ableitung der Schmelzkurve und damit des Wendepunktes deutlich überlegen, da sie unabhängig von kleinen Absorptionsschwankungen während der Messung ist. Eine typische Bestimmung des T_m-Wertes über die Ableitung ist in Abbildung 97 dargestellt.

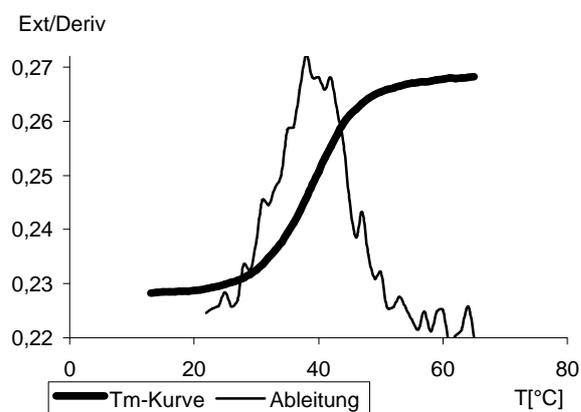


Abbildung 97 Bestimmung des T_m-Wertes nach der Ableitungsmethode am Beispiel vom **ODN1/ODN2**-Duplex (Vgl. Abbildung 95)

Die T_m -Werte der anti Influenza-ODNs sind bei Einbau der α -Hydroxybenzylphosphonat-Modifikation ebenfalls leicht erniedrigt (Abbildung 98). Auch hier zeigt sich kein Einfluss der Stereochemie am Phosphonat-Zentrum. Eine Modifikation inmitten eines Oligonucleotides sollte einen stärkeren Einfluss auf den Schmelzpunkt haben, als eine Modifikation einer Endposition. Die beiden Sequenzen lassen sich allerdings aufgrund ihrer unterschiedlichen Sequenzen und Längen nicht direkt miteinander vergleichen. Für detailliertere Studien ist es notwendig eine Vielzahl verschiedener Sequenzen, welche an unterschiedlichen Positionen modifiziert sind zu synthetisieren. Die Bestimmung der thermodynamischen Parameter sollte es dann möglich machen, quantitative Aussagen über den Einfluss einer Modifizierung in der DNA zu treffen.

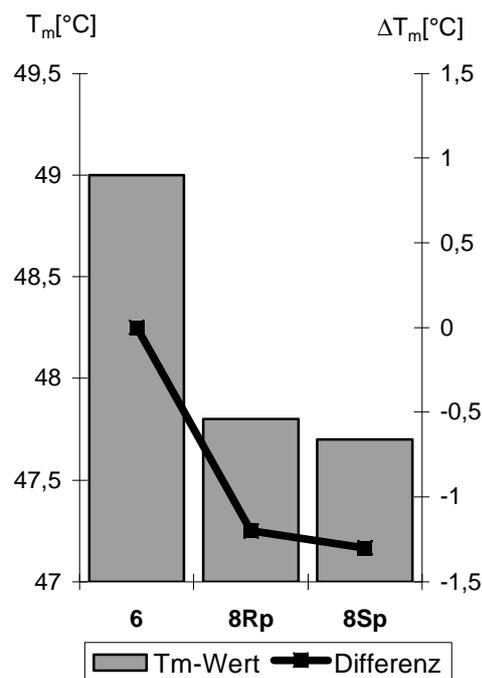


Abbildung 98 T_m -Werte der gemessenen anti Influenza ODNs gegen DNA als gemessener T_m -Wert (Balken) und als Differenz zum Referenzstrang.

4.4.5 Bestimmung der Nucleasestabilitäten

In Kapitel 2.2 wurden die Anforderungen beschrieben, die an Antisense-Oligonucleotide gestellt werden. Hierzu gehört unter anderem eine ausreichende Stabilität gegenüber einem zellulären enzymatischen Abbau, welche durch Tests gegen isolierte Exonucleasen in

dieser Arbeit untersucht wurde. Hierzu wurden die modifizierten Oligonucleotide in wässrigem Puffer der Exonuclease I (EN I), EC 3.1.4.1 versetzt und der Abbau UV-spektrometrisch bei 260 nm verfolgt. Durch den hyperchromen Effekt steigt die Extinktion bei Spaltung der Phosphordiesterbindungen zu einzelnen Nucleotiden. Dieser Anstieg kann bei 260 nm verfolgt werden und mittels Kurvenregression die Kinetik und Halbwertszeit des Abbaus bestimmt werden.

Die Untersuchungen wurden mit jeweils 1 nmol des Oligonucleotides in 1 mL Puffer (100 mM TRIS/HCl, pH 6.5) unter Zugabe von 0.016 u der EN I gelöst und der Abbau bei 37 °C verfolgt. Die gemessenen Extinktionswerte wurden auf den Startwert normiert.

In den abgebildeten Diagrammen wurden die Extinktionswerte gegen die Zeit [Min.] aufgetragen.

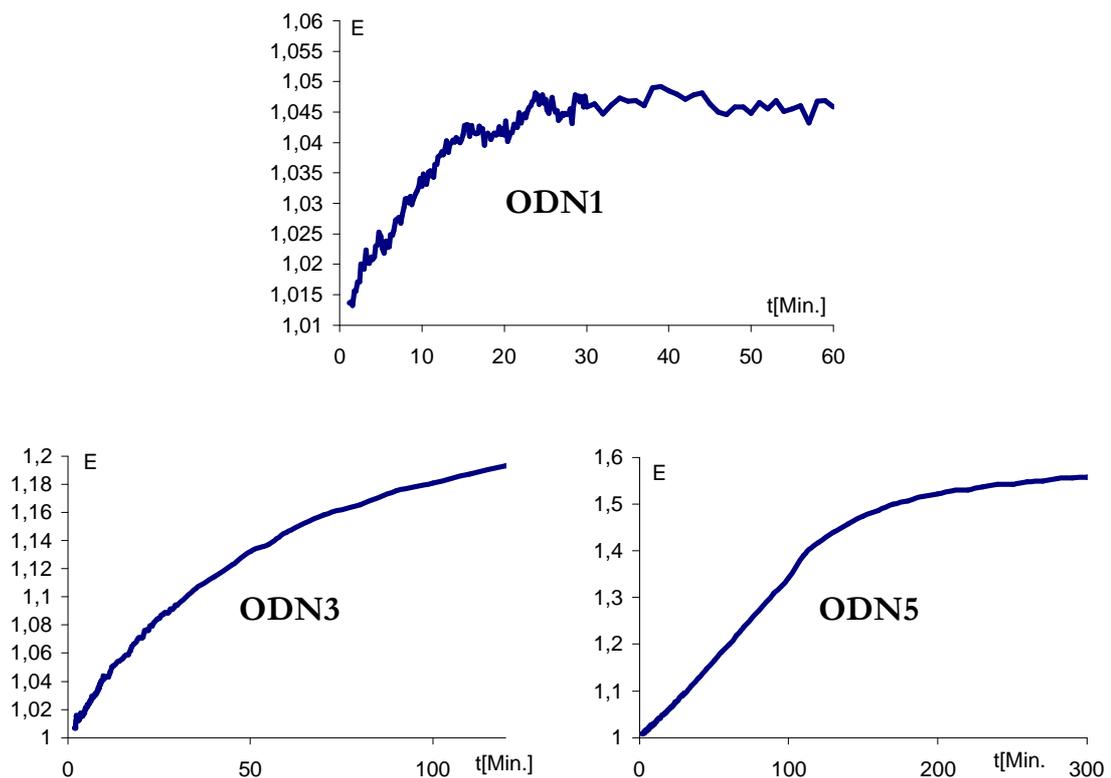


Abbildung 99 Messung der Nucleasestabilitäten gegen EN I

Auf den ersten Blick deutlich zu erkennen, ist die signifikante Erhöhung der Nucleasestabilitäten. Bei der unmodifizierten Referenz **ODN1** ist bereits nach 15 Minuten ein nahezu vollständiger Abbau zu beobachten. Das am 3'-Ende modifizierte

ODN3 zeigt nach ca. 120 Minuten eine Abflachung der Extinktionssteigerung und das zweifach modifizierte **ODN5** nach ca. 150 Minuten. Durch den Einbau von nur einer α -Hydroxybenzylphosphonat-Modifikation ist es also gelungen die Nucleasestabilität signifikant zu erhöhen. Es bleiben allerdings weitere modifizierte Oligonucleotide zu untersuchen, um den Einfluss verschiedener Sequenzen, Position der Modifikation und Anzahl der Modifikationen auf die Stabilität gegenüber Exonucleasen evaluieren zu können. Auffallend ist die deutliche Extinktionssteigerung bei Freisetzung eines modifizierten Bausteines. So beträgt die Extinktionsdifferenz zwischen 1 nmol Oligonucleotid und vollständig abgebautem Oligonucleotid bei **ODN1** lediglich 0.005, beim einfach modifizierten **ODN3** schon 0.025 und beim zweifach modifizierten **ODN5** 0.044. Ein Fehler bezüglich der Startkonzentrationen kann ausgeschlossen werden, da die Absorptionen zur Zeit $t=0$ Min. nahezu identisch sind. Auch wurde jeder Probe die gleiche Menge an Nucleaselösung der selben Stammlösung zugefügt.

Die sehr starke Exktinktionsänderung durch die α -Hydroxy-2-nitrobenzylphosphonat Modifikation könnte durch ein Quenchen der UV-Aktivität der 2-Nitrobenzyl Gruppe im Oligonucleotid oder durch einen verstärkten hyperchromen Effekt zustande kommen. Weitere Untersuchungen dieses Effektes an verschiedenen Sequenzen könnten eine sinnvolle Ergänzung zur Analytik dieser Verbindungen liefern.

5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

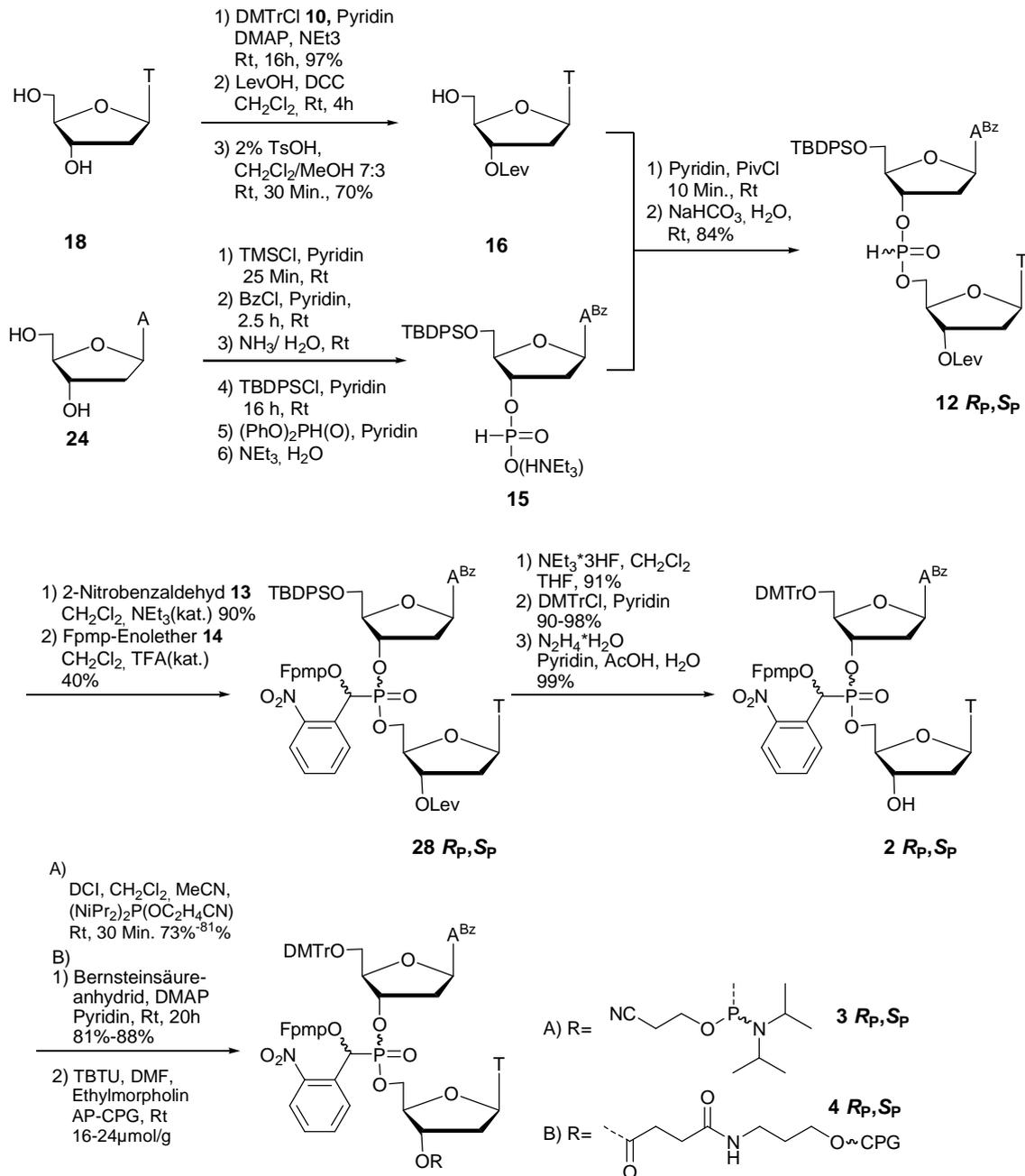
In dieser Arbeit wurde das α -Hydroxybenzylphosphonat-Oligonucleotidkonzept erweitert, indem neue Synthesemöglichkeiten für modifizierte Bausteine und Oligonucleotide gefunden wurden. In bisherigen Arbeiten wurden Thymidinoligonucleotide modifiziert und deren Eigenschaften untersucht. Bei der Anwendung auf gemischte, biologisch relevante Antisense-Sequenzen treten neue Herausforderungen, z.B. bezüglich der Schutzgruppen und der Aufarbeitung auf. Mit dieser Arbeit wurden neue Möglichkeiten zur Synthese von α -Hydroxybenzylphosphonat-modifizierten Bausteinen geschaffen und dabei die Reaktionsmöglichkeiten zu Hydroxy-2-Nitrophenylmethyl-phosphonaten und -phosphinaten erweitert.

5.1 Zusammenfassung

Das Synthesekonzept über dimere α -Hydroxybenzylphosphonatdinucleotide wurde auf ein gemischtes Dinucleotid angewandt. Die Wahl fiel hier auf das Adenosyl-Thymidyl-Dimer **1-4**, welches in 3'-und 5'-Position einer anti *H-ras* Sequenz **ODN3-5** und in die mittlere Position einer anti Influenza Sequenz **ODN8** eingebaut wurde.

Die Synthese der dimeren AT-Bausteine **3** und **4** ist in (Abbildung 100) zusammengefasst. Ausgehend von Thymidin **18** und 2'-Desoxyadenosin **24** konnten die Bausteine in einer insgesamt 13 Stufigen Synthese synthetisiert werden. Im Laufe dieser Synthese wurden einige synthetische Verbesserungen eingeführt (z.B. H-Phosphonatbildung mittels Diphenylphosphit und Synthese des Phosphoramidites mittels Phosphor-bis(di-*iso*-propylamidit) und DCI) und Synthesestufen konnten optimiert werden (Kapitel 4.1.2).

In früheren Arbeiten wurden unterschiedliche T_m -Werte für die R_P -, bzw. S_P -diastereomeren Oligonucleotide gefunden. Um mögliche unterschiedliche Eigenschaften der Diastereomere zu untersuchen, wurden die Diastereomere bezüglich des Phosphonates getrennt erhalten und in Oligonucleotide eingebaut. Es konnte bereits in meiner Diplomarbeit gezeigt werden, dass es auch möglich ist, die Diastereomere bezüglich des α -C-Atoms getrennt zu erhalten,⁷⁸ was Gegenstand einer anderen Arbeit in diesem Arbeitskreis ist.

Abbildung 100 Synthese der α -Hydroxybenzylphosphonatdinucleotide **3** und **4**

Durch Einsatz dieser dimeren Bausteine **3&4** als „Quasimonomer“ in der automatisierten DNA-Festphasensynthese wurden nach Entschützung der α -Hydroxygruppe die modifizierten anti H-*ras*-Onkogen Oligonucleotide **ODN3-5** und anti Influenza Oligonucleotide **ODN7&8** erhalten (Kapitel 4.4). Von diesen Oligonucleotiden wurden die thermodynamischen Eigenschaften im Duplex mit einem DNA-, bzw. RNA-Gegenstrang bestimmt. Die Schmelzpunkte (T_m -Wert) liegen ein bis zwei Grad unter dem unmodifizierten Referenzstrang, mit Ausnahme des am 3'-Ende- S_P modifizierten

ODN4S_P (Kapitel 4.4.4). Außerdem wurden Stabilitätsuntersuchungen gegen die Exonuclease I durchgeführt (Kapitel 4.4.5). Es konnte eine deutliche Erhöhung der Nucleasestabilitäten festgestellt werden, was eine mögliche Anwendbarkeit dieses Konzeptes gewährleisten sollte. Um bessere Aussagen zu den Einflüssen der α -Hydroxybenzylphosphonat-Modifikation liefern zu können, ist es notwendig eine Reihe verschiedener Sequenzen zu modifizieren und in Bezug zur Sequenz, der Position und der Anzahl der Modifikationen zu untersuchen.

Für die Modifizierung beliebiger DNA-Sequenzen mit den phosphonatmodifizierten Bausteinen ist es notwendig 16 verschiedene Bausteine zu synthetisieren. Mit der in Abbildung 100 dargestellten Syntheseroute ist man bereits zu Beginn der Synthese auf eine Dinucleotidkombination festgelegt und muss alle Syntheseschritte an diesem Dinucleotid vollziehen. Um eine Vielzahl verschiedener Sequenzen untersuchen zu können, ist es daher notwendig einen kürzeren und flexibleren Syntheseweg zu diesen Dinucleotiden zu finden.

Eine neue Synthesestrategie für α -Hydroxybenzylphosphonatdinucleotide wurde entwickelt (Kapitel 4.1.4 & 4.1.4.4). Die Syntheserversuche über einen Phosphonat-Precursor sind in Abbildung 101 dargestellt. Ziel war es einen Precursor zu entwickeln, welcher die Modifikation trägt und erst abschließend mit den Nucleosiden gekuppelt wird. Als mögliche Synthesestrategien kamen α -Hydroxybenzylphosphonsäurediphenylester, -phosphordichloridat und -phosphonsäure in Betracht. Die entsprechenden Precursor **6-9 a-d** wurden synthetisiert und Kupplungsversuche wurden unternommen. Aufgrund stark verringerter Reaktivität und der fehlenden Orthogonalität der abschließenden Kupplungsschritte wurden diese Synthesestrategien letztlich verworfen.

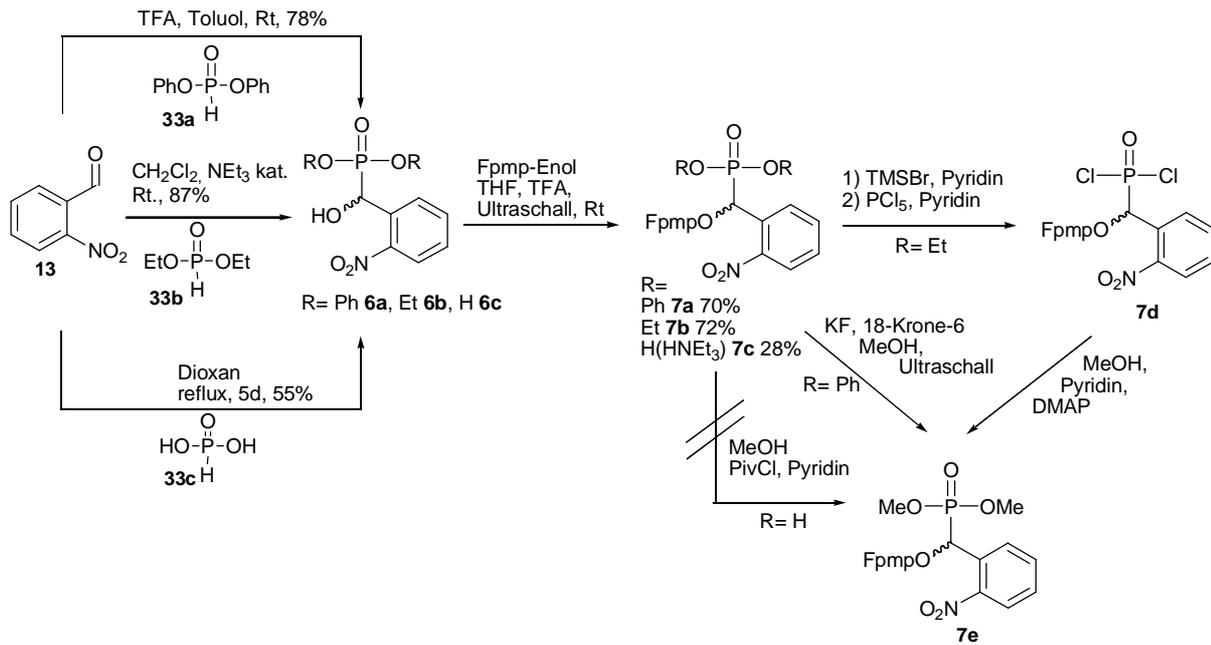


Abbildung 101 Syntheseveruche über Phosphonatprecursor

Die Synthese über einen universellen α -Hydroxybenzylphosphinat Precursor sind in Abbildung 102 dargestellt. Es gelang einen Precursor zu entwickeln, welcher in zwei zueinander orthogonalen Kupplungsschritten mit Nucleosiden zum modifizierten α -O-Benzylphosphonatdinucleotid umgesetzt werden kann. Hierbei gelang es, Reaktionen, welche aus der Phosphonatchemie bekannt sind, auf Phosphinate zu übertragen (Pudovic-, Atherton-Todd-Reaktion, Piv-Cl-Kupplung). Hierfür wurden kinetische Untersuchungen durchgeführt und der stereochemische Verlauf dieser Reaktion wurde untersucht. Der Phosphinatbaustein wurde in dieser Arbeit ursprünglich für die Synthese eines monomeren α -O-Benzylphosphonamiditbausteines entwickelt. Die dimeren Bausteine haben den großen Vorteil, dass die Stereochemie am Phosphor durch Diastereomerentrennung während der Synthese definiert ist. Allerdings sind für die Modifikation beliebiger Sequenzen 16 verschiedene Bausteine notwendig deren Synthese auch mit der neuen Synthesemethode lang und aufwendig ist. Ausserdem ist so nur jede zweite Position der DNA modifizierbar. Um beliebige Sequenzen an beliebigen Positionen zu modifizieren, ist die Entwicklung monomerer Phosphonamidit Bausteine notwendig, die analog zu den Standardamiditen in der automatisierten Festphasensynthese eingesetzt werden können. So sind nur vier Bausteine notwendig. Die Synthese eines solchen Phosphonamidit Bausteines wurde entwickelt (Abbildung 102 & Kapitel 4.2).

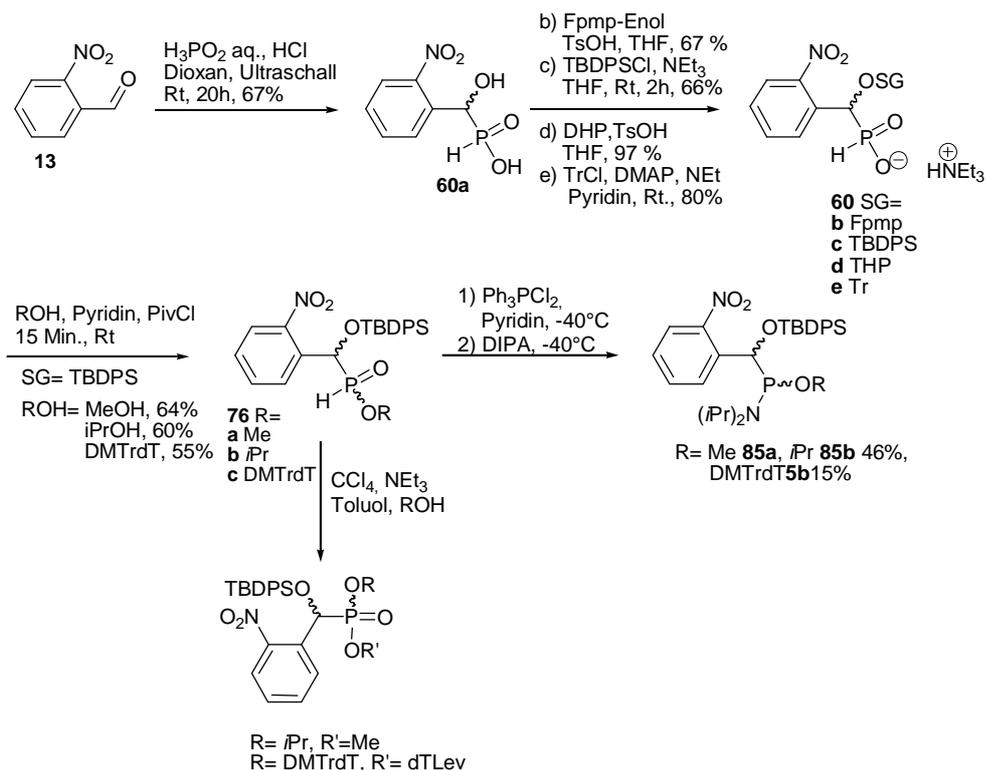


Abbildung 102 Universeller Phosphinatprecursor zur Synthese von monomeren α -Hydroxybenzylphosphonamiditen und dimeren α -Hydroxybenzylphosphonaten

Mit der Synthese des α -O-Benzylphosphinatprecursors ist es gelungen einen universellen Baustein zu entwickeln, mit Hilfe dessen es möglich ist, sowohl die Strategie über monomere Phosphonamidite als auch über dimere Bausteine zu verfolgen.

Problematisch bleibt die Synthese der modifizierten Oligonucleotide und deren Aufarbeitung. Sowohl Synthese als auch Aufarbeitung und Analytik dieser α -Hydroxy-2-nitrobenzylphosphonat Oligonucleotide müssen weiterhin verbessert werden. Der Einsatz von dimeren Bausteinen in der Oligonucleotidsynthese hat sich bewährt und liefert einigermaßen zuverlässige Ergebnisse. Zu überprüfen bleibt, ob auch die α -Hydroxybenzylphosphonamidit-Bausteine in der automatisierten DNA-Synthese eingesetzt werden können.

5.2 Summary

α -Hydroxybenzylphosphonate modified oligonucleotides have been developed as possible antisense oligonucleotides in previous works and model thymidine oligonucleotides have

been studied extensively. It was shown that the melting points with their complementary DNA and RNA strand respectively are in the range of an unmodified reference strand. Also the high stability towards exonucleases (SVP and CSP) is promising for a potential application as antisense drugs. These modified oligonucleotides were synthesized via automated DNA synthesis using modified dimer α -hydroxybenzylphosphonate building blocks.

Aim of this work was to find novel synthetic strategies towards these modified oligonucleotides for the application in mixed biologically relevant sequences.

First of all adenine-thymidine dimer building blocks **1-4** were prepared and diastereoisomers with respect to the phosphorus center were separated (chapter 4.1.2, scheme 100). They were applied to automated DNA synthesis as a phosphoramidite **3** and a solid supported building block **4**. Anti *H-ras* sequences from the initiation region were 3'-end and 5'-end modified and an anti influenza sequence was modified in the middle. The thermodynamic data (T_m , ΔG , ΔH , ΔS) of these sequences were determined as well as their stability toward exonuclease I (chapter 4.4).

For the synthesis of a wide range of biologically relevant sequences the synthesis of 16 different dimer building blocks are necessary. The conventional synthesis of these dimer building blocks is long (13 steps) and inflexible. One is fixed to a nucleoside combination right at the beginning of the synthesis and it is necessary to modify the dimer in the course of the following steps. Novel synthetic pathways to dimer building blocks via α -hydroxybenzylphosphonate precursors were evolved (scheme 101 and chapter 4.1.4) and a universal phosphinate building block was found that could be used as a universal precursor as well for the synthesis of the dimer phosphonate building blocks (chapter 4.1.4.4) and monomer phosphoramidites (scheme 102).

Modifying any biologically relevant sequences would mean the synthesis of 16 different dimer building blocks. Besides it is only possible to modify every second position in the oligonucleotide. The synthesis of a monomer α -hydroxybenzylphosphoramidite was developed which can be used analogous to the standard phosphoramidites in DNA synthesis (chapter 4.2). The advantage of the dimer building blocks is the possibility to

control the stereo centres of the modification, whereas the use of monomer building blocks is the flexibility in the synthesis of different sequences.

5.3 Ausblick

In dieser Arbeit konnten alternative Synthesemöglichkeiten von α -Hydroxybenzylphosphonat-modifizierten Bausteinen präsentiert und damit die Grundlage für effizientere Synthesen von modifizierten Antisense-Pro-Oligonucleotiden geschaffen werden. Der nächste Schritt besteht in der Optimierung der hier dargestellten Syntheseverfahren und deren anschließende Anwendung auf literaturbekannte Antisense-Sequenzen, mit Hilfe derer unser Pro-Oligonucleotidsystem mit den vorhandenen Antisense-Konzepten verglichen werden kann. Insbesondere sind neben den bisher in unserem Labor durchgeführten Tests, wie der Bestimmung thermodynamischer Daten und der Nucleasestabilitäten, *in vitro* Tests notwendig. Die zelluläre Aufnahme der α -Hydroxybenzylphosphonat-Oligonucleotide kann z.B. mittels *in vitro* MALDI-MS, oder Einsatz fluoreszenter Nucleobasen und anschließender konfokaler Fluoreszenzmikroskopie untersucht werden. Auch bleibt die Fähigkeit unserer Antisense-Pro-Oligonucleotide tatsächlich die Proteintranslation zu inhibieren an konkreten literaturbekannten Targets zu untersuchen. Ein weiterer Aspekt ist, ob die α -OH-ODN/RNA Duplices Substrate für die RNase H darstellen und so eine effektivere Antisense-Wirkung ermöglichen.

Für einen Einsatz dieser Methoden ist es notwendig, die Synthese der Dinucleotide über die Phosphinat-Atherton-Todd Reaktion zu optimieren und auf verschiedene Nucleosidkombinationen anzuwenden. So muss versucht werden, die sehr langsame Reaktion des Phosphonchloridates z.B. durch Lewissäurekatalyse zu beschleunigen. Es konnte gezeigt werden, dass die oxidative Chlorierung stereospezifisch, die anschließende Umsetzung mit einem Alkohol jedoch unter Racemisierung bezüglich des Stereozentrums am Phosphor verläuft. Der Einsatz stereoselektiver Methoden, wie der Einsatz chiraler Auxilliare oder Lewissäuren könnte zu einer stereoselektiven Phosphinat-Atherton-Todd Reaktion führen.

Neben der hier verwendeten nicht stereoselektiven Pudovic Reaktion, welche durch Triethylamin, bzw. TFA katalysiert wird, werden in der Literatur auch enantioselektive

Synthesen von α -Hydroxyphosphonaten mittels asymmetrischer Pudovic-Reaktion beschrieben. Zum Einsatz kommen hier sowohl chirale Base wie Chinin ^{162,163}, aber auch moderne Methoden wie chirale Katalyse mittels Titan- und Lanthanoidenalkoxiden sind beschrieben.¹⁶⁴ Diese Methoden könnten auch auf die Synthese α -Hydroxybenzylphosphonat-modifizierter Dinucleotide und Phosphonamidite übertragen werden, um so bezüglich des α -C-Atoms stereoisomerenreine Bausteine zu erhalten. Auch sind stereoselektive Methoden zur Synthese modifizierter Oligonucleotide beschrieben, die anstatt des β -Cyanoethyl-di-*iso*-propylamidites chirale Auxilliare wie Oxazaphospholidine aus Tryptophan oder anderen chiralen Hydroxylaminen benutzen (Abbildung 103).^{43,44} Ähnliche Ansätze sollten auch auf stereoselektive Kupplungen von α -Hydroxybenzylphosphonamiditen übertragbar sein, so dass die Entwicklung der Synthese diastereomerenreiner α -Hydroxybenzylphosphonat-Oligonucleotide möglich sein sollte.

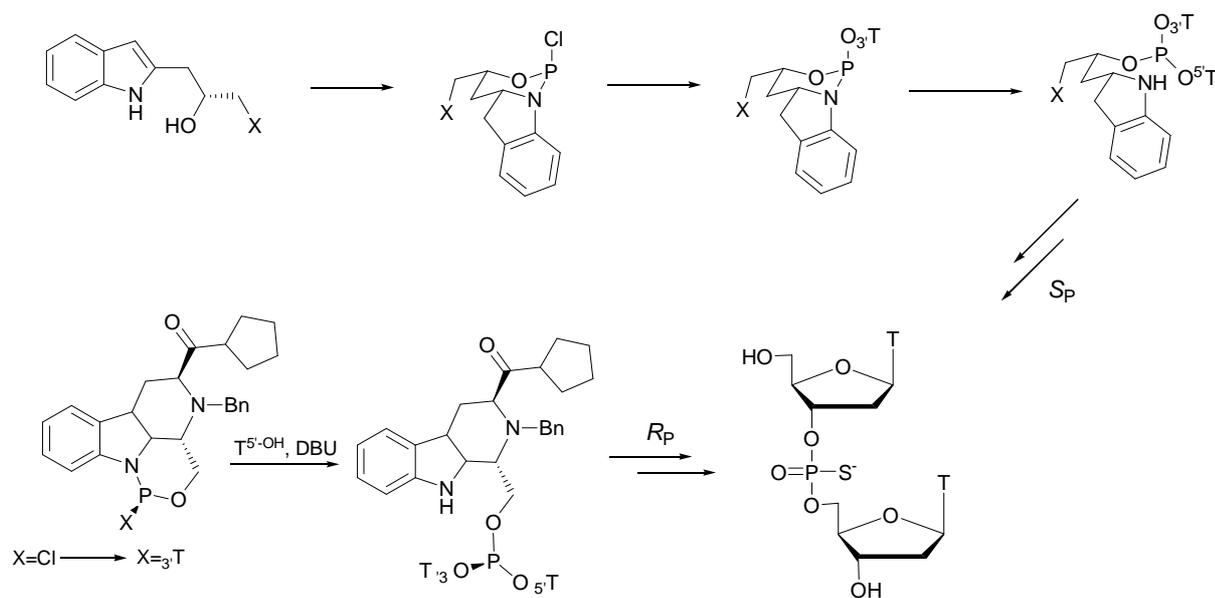


Abbildung 103 Chirale Oxazaphospholidine zur stereoselektiven Synthese von Dinucleotiden nach JUST et al.

6 EXPERIMENTELLER TEIL

6.1 Allgemeines

6.1.1 Chromatographie

6.1.1.1 Dünnschichtchromatographie

Es wurden mit Kieselgel 60 beschichtete Aluminiumfolien mit Fluoreszenzindikator (Merck Nr. 5554; Schichtdicke 0.2 mm) verwendet. Die Platten wurden auf eine Größe von $3\text{-}5 \times 10$ cm zugeschnitten; die Laufstrecke betrug 8-9 cm. Alle R_f -Werte wurden bei Kammersättigung ermittelt. Die Detektion UV-aktiver Verbindungen erfolgte mit einer UV-Lampe bei einer Wellenlänge von 254 nm. Desoxyribose-Zucker konnten mit Hilfe eines Sprühreagenzes nachgewiesen werden, das aus 90 mL 75 %igem Ethanol, 10 mL konzentrierter Essigsäure, 5.0 mL Anisaldehyd und 5.0 mL konzentrierter Schwefelsäure bestand. Dazu wurden DC-Karten mit dem Reagenz bestrichen und anschließend mit einem Heißluftfön erhitzt. Die Zuckerverbindungen färbten sich hierdurch braun. Weiterhin wurden DCs in einer Iodkammer entwickelt, Substanzflecken färbten sich braun. Säurelabile Schutzgruppen (z.B. 4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl, Triphenylmethyl) konnten durch überblasen mit konzentrierter HCl als intensiv rote, bzw. gelbe Flecken sichtbar gemacht werden.

6.1.1.2 Zirkulare, zentrifugale Dünnschichtchromatographie (CCTLC)

Substanzgemische mit Rohausbeuten bis zu 4.0 g wurden an einem Chromatotron der Firma Harris-on Research, Modell 7924 T getrennt. Als Trennmateriale diente gipshaltiges Kieselgel 60 PF₂₅₄ (Merck Nr. 7749), das in Schichtdicken von 1, 2 und 4 mm auf Glasplatten (\varnothing 20 cm) aufgetragen wurde. Die Detektion UV-aktiver Substanzen erfolgte mit einer UV-Lampe der Firma Konrad Benda bei einer Wellenlänge von 254 nm

6.1.1.3 Präparative Säulenchromatographie

Substanzgemische mit mehr als 4.0 g Rohausbeute, sowie Nitrobenzyl-Derivate wurden über eine Säule mit leichtem Überdruck aufgereinigt. Als Trennmateriale wurde Kieselgel mit einer Korngröße von 63-200 μm verwendet.

6.1.1.4 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie wurde an Merck-Hitachi-Anlagen durchgeführt.

Software: Chromatographie Data Station Software HPLC Manager Version 2, HPLC System Manager Version 3.1.1

Interface: Model D-6000, L-7000

Pumpe: L-6200 Intelligent Pump, L-7100

Automatischer Probenwechsler: AS 2000A, AS L-7200

Detektion: UV, 260 nm, DAD L-7455

Säule: Waters XTerra (2.5 μm , 4.6x50 mm)
Flußgeschwindigkeit= 1.5 mL/Min.

6.1.2 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

^1H -NMR

Bruker AMX 400 (400 MHz), Bruker DRX 500 (500 MHz).

Die Standardisierung erfolgte gegen CDCl_3 ($\delta = 7.27$ ppm), $\text{DMSO-}d_6$ ($\delta = 2.50$ ppm), $\text{Benzol-}d_6$ ($\delta = 7.25$ ppm) bzw. gegen das Referenzsignal des deuterierten Lösungsmittels oder TMS ($\delta = 0.00$ ppm) als internem Standard.

^{13}C -NMR

Bruker AMX 400 (100.9 MHz). Die Standardisierung erfolgte gegen CDCl_3 ($\delta = 77.0$ ppm), $\text{DMSO-}d_6$ ($\delta = 39.7$ ppm), $\text{Benzol-}d_6$ ($\delta = 128.1$ ppm) bzw. gegen das Referenzsignal des deuterierten Lösungsmittels.

^{31}P -NMR

Bruker DRX 500 (202 MHz). Die Standardisierung erfolgte gegen das Referenzsignal des deuterierten Lösungsmittels.

^{19}F -NMR

Bruker DRX 500 (470 MHz). Die Standardisierung erfolgte gegen das Referenzsignal des deuterierten Lösungsmittels.

2-D-Experimente

HH-COSY, TOCSY, HMQC und HMBC – Spektren wurden auf einem Bruker DRX 500 aufgenommen.

Die chemischen Verschiebungen (δ) wurden in ppm angegeben. Die Kopplungen (J) wurden in Hertz (Hz) angegeben. Alle Spektren wurden bei Raumtemperatur aufgenommen, Messfrequenz und Lösungsmittel wurden in Klammern angegeben. Die Feinstruktur der Signale wurden mit „s“ für Singulett, „d“ für Dublett, „t“ für Triplett, „q“ für Quartett, „m“ für Multiplett, „dd“ für Doppeldublett, „ddd“ für Dublett von Doppeldublett, „dddd“ Doppeldublett von Doppeldublett, „dt“ Dublett von Triplett und „tt“ für Triplett von Triplett als zentrierte Signale angegeben. Alle Spektren wurden mit der Software Bruker WinNMR 1D, die 2-dimensionalen Spektren mit Bruker WinNMR 2D bearbeitet.

6.1.3 Ultraviolettspektroskopie (UV)

Die UV-Spektren wurden an einem UV-Spektralphotometer (Cary 1E) der Firma Varian aufgenommen. Angegeben wurden die Maxima (λ_{\max} [nm]), sowie in Klammern die relativen Intensitäten (normiert auf eins) der Absorption.

6.1.4 Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (FT-IR)

Die Infrarotspektren wurden auf einem ATI Mattson Genesis Series FTIR aufgenommen. Angegeben wurden die Wellenzahlen ($\tilde{\nu}$ [cm^{-1}]) der intensivsten Schwingungsbanden (>70 %).

6.1.5 Massenspektrometrie (MS)

Die Massenspektren wurden auf einem Elektrospray-Gerät der Firma Finnigan MAT95, TSQ 7000 gemessen und mit der Software ISIS 8.1 nachbearbeitet. Als Kalibrierungsstandard für die hochaufgelöste ESI-Massenspektrometrie wurde ein Polypropylenglycol-Gemisch mit definierten Molmassen verwendet. Angegeben wurde

die Masse als m/z mit $z=1$ als Mittelwert über 5 Messungen. Die Massenpeaks traten entweder als Natriumaddukt ($+Na^+$) oder protoniert auf ($+H^+$).

Die FAB-Massenspektren wurden mit einem doppelfokussierenden Spektrometer VG/70-250 F der Firma VG Analytical gemessen, mit *m*-Nitrobenzylalkohol als Matrix

6.1.6 Geräte

Gefriertrocknung

Wässrige Lösungen wurden an einer Amsco/Finn-Aqua Lyovac gT2 Gefriertrocknungsanlage und an einer Christ Alpha 2-4 Gefriertrocknungsanlage lyophilisiert.

DNA

Oligonucleotide wurden mittels Festphasensynthese an einem DNA-Synthesizer der Firma Eppendorf/Biotronic, Modell DNA 300+. Die Synthesen wurden nach der Phosphoramiditmethode durchgeführt. (Anhang A)

Vakuum-Probenkonzentrator

Wässrige Lösungen wurden in Eppendorf-Caps an einem Uniequip UNIVAPO 150H Vakuum-Probenkonzentrator unter Ölpumpenvakuum eingeengt.

6.2 Nomenklatur

Im folgenden werden für die Kennzeichnung der Verbindungen folgende Abkürzungen und Nummerierungen verwendet:

dA= 2'-Desoxyadenosyl, dT= Thymidyl, Ade= Adenin, Thy= Thymin, TBDPS= *tert*-Butyldiphenylsilyl, DMTr= 4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl, Fpmp= 1-(2-Fluorphenyl)-4-methoxypiperidin-4-yl, Lev= Levulinyll, Bz= Benzoyl, Ar.= Aromat, Ph= Phenyl, Me= Methyl, Et= Ethyl, *t*-Bu= *tert*-Butyl, *i*-Pr= *iso*-Propyl, THP= Tetrahydropyran-2-yl

Die Nummerierung der Verbindungen erfolgt nach den Regeln der IUPAC:

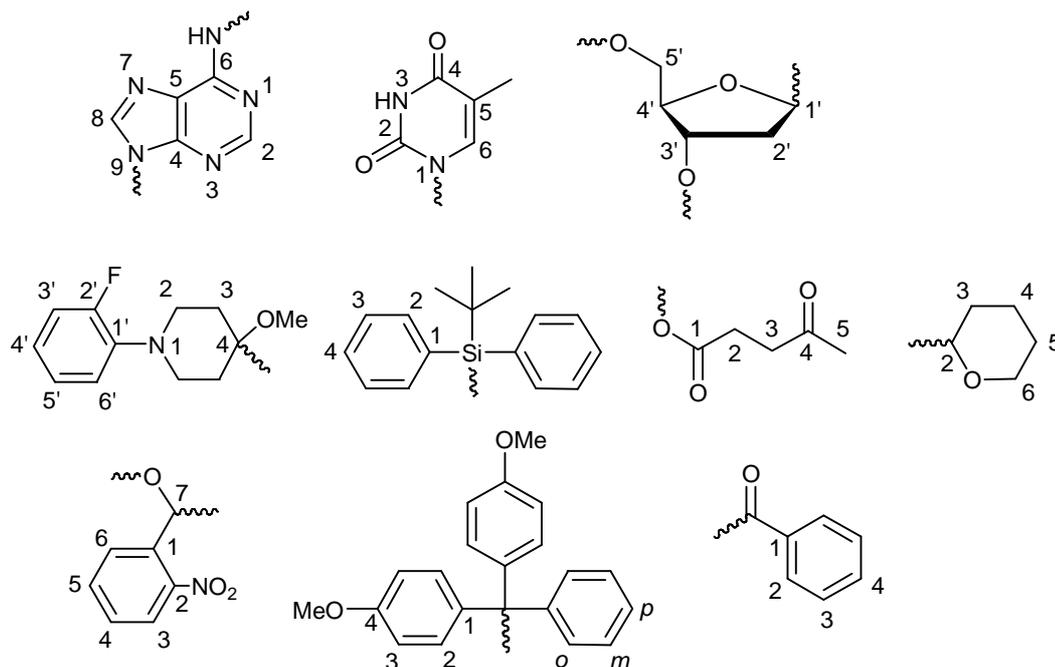
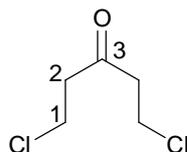


Abbildung 104 Nummerierung der Verbindungen

6.3 Synthese von 1-(2-Fluorphenyl)-4-methoxy-1,2,5,6-tetrahydropyridin 14

1-(2-Fluorphenyl)-4-methoxy-1,2,5,6-tetrahydropyridin (Fpmp-Enolether) **14** wurde analog zu Arbeiten von REESE et al. synthetisiert.¹⁴⁵

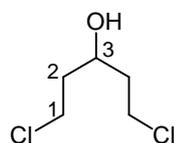
6.3.1 Synthese von 1,5-Dichlorpentan-3-on **87**



Die Reaktion wurde mit wasserfreien Lösungsmitteln und in einer Inertgasatmosphäre unter Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt. 133 g (1 mol) Aluminiumtrichlorid wurden in 150 mL Dichlormethan suspendiert und bei 5° C langsam 50 mL (0.52 mol) 3-Chlorpropionsäurechlorid **86** zugetropft. Über ein Gaseinleitungsrohr wurden bei 20° C unter kräftigem Rühren 30 g (1 mol) Ethen sehr langsam eingeleitet, so dass das Ethen vollständig absorbiert wurde. Die Lösung wurde vorsichtig auf 400 mL Eiswasser und 20 mL 37 %iger HCl gegeben und extrahiert. Nach Abtrennen der organischen Phase wurde die wässrige Phase mehrfach mit je 200 mL Dichlormethan extrahiert bis die organische Phase farblos blieb. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄

getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde nicht weiter gereinigt und direkt weiter umgesetzt.

6.3.2 Synthese von 1,5-Dichlorpentan-3-ol **88**



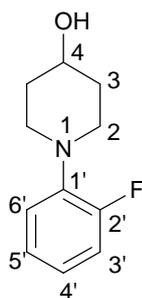
Das braune, ölige Rohprodukt von 1,5-Dichlorpentan-3-on **87** wurde in 390 mL Ethanol aufgenommen und bei -5°C vorsichtig unter starkem Rühren mit einer gekühlten Suspension aus 9.50 g (0.25 mol) Natriumborhydrid (NaBH_4) in 40 mL Wasser versetzt. Nach zweistündigem Rühren wurden 390 mL Eiswasser hinzugegeben und mehrfach mit Chloroform extrahiert, bis die organische Phase farblos blieb. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt bei $8 \cdot 10^{-1}$ mbar und 80°C destilliert.

Ausbeute: 57 g (0.36 mol, 70 % ausgehend von 3-Chlorpropionsäurechlorid) eines rötlich braunen Öles

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3) = 4.12 (quin., 1H, $J_{\text{H,H}} = 6.2$ Hz, H3), 3.73 (dt, $J_{\text{H,H}} = 11.2$ Hz, $J_{\text{H,H}} = 7.1$ Hz, 2H, H1a), 3.68 (dt, 2H, $J_{\text{H,H}} = 11.2$ Hz, $J_{\text{H,H}} = 5.6$ Hz, H1b), 2.20 (bs, 1H, OH), 1.92 (dt, 4H, $J_{\text{H,H}} = 7.1$ Hz, $J_{\text{H,H}} = 6.2$ Hz, H4)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (100 MHz, CDCl_3) = 66.37 (C3), 41.98 (C1), 39.96 (C2)

6.3.3 Synthese von 1-(2-Fluorphenyl)-piperidin-4-ol **90**



60.8 g (387 mmol) 1,5-Dichlorpentan-3-ol **88**, 43 mL (49.5 g, 445 mmol) 2-Fluoranilin **89**, 123 g (890 mmol) Kaliumcarbonat (K_2CO_3) und 33 g (220 mmol) Natriumjodid (NaI) wurden in 300 mL trockenem Dimethylformamid (DMF) suspendiert, auf 100° C erhitzt 2 Stunden gerührt bis keine Gasentwicklung mehr beobachtet wurde. Zu der abgekühlten Suspension wurden 100 mL Wasser gegeben und das Gemisch drei mal mit je 100 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden drei mal mit je 60 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, die wässrige Phase mit Diethylether extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde als gelbes Öl durch Vakuumdestillation ($5 \cdot 10^{-1}$ mbar, 120° C) erhalten

Ausbeute: 28.4 g (146 mmol, 38 %) eines gelben Öls.

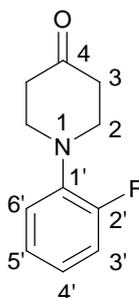
DC: R_f (PE/EE 2:1 v/v) = 0.4

1H -NMR: δ [ppm] (400 MHz, $CDCl_3$) = 7.06-6.89 (m, 4H, Ar.), 3.94-3.80 (m, 1H, H4), 3.50-3.30 (m, 2H, H2a), 3.00-2.80 (m, 2H, H2b), 2.15-2.00 (m, 2H, H3a), 1.84-1.71 (m, 2H, H3b)

^{13}C -NMR: δ [ppm] (100 MHz, $CDCl_3$) = 156.20 (d, $^1J_{C,F}$ = 245.1 Hz, C2-Ar.), 124.77 (d, $J_{C,F}$ = 3.5 Hz, C5-Ar.), 122.75 (d, $J_{C,F}$ = 7.7 Hz, C4/C6-Ar.), 119.74 (d, $J_{C,F}$ = 3.0 Hz, C6/C4-Ar.), 116.45 (d, $J_{C,F}$ = 20.8 Hz, C3-Ar.), 68.07 (C4), 48.92 (d, $^4J_{C,F}$ = 3.1 Hz, C2), 35.08 (C3)

^{19}F -NMR: δ [ppm] (470 MHz, $CDCl_3$) = -123.1

6.3.4 Synthese von 1-(2-Fluorphenyl)-piperidin-4-on **91**



28.4 g (146 mmol) 1-(2-Fluorphenyl)-piperidin-4-ol **90** wurden in 113 mL Benzol gelöst, 60.2 g (292 mmol) N,N' -Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und mit 85.2 mL (1.2 mol) trockenem Dimethylsulfoxid (DMSO) und 11.2 mL trockenem Pyridin versetzt. Zu der

im Eiswasser gekühlten Lösung wurden 11.2 mL (16.7 g, 147 mmol) Trifluoressigsäure innerhalb von 10 Min. zugetropft. Anschließend wurde 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Der bei der Reaktion ausfallende *N,N'*-Dicyclohexylharnstoff wurde filtriert und mit Diethylether gewaschen. Die organische Phase wurde dreimal mit je 80 mL 4 N HCl gewaschen und die wässrige Phase anschließend unter Eiskühlung mit 2 N NaOH neutralisiert. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 110 mL Diethylether extrahiert, die vereinigten organischen Phasen fünfmal mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde an Kieselgel mit Petrolether (60-70)/Ethylacetat (4:1 v/v) filtriert und die Fraktion bei R_f (PE/EE 4:1)= 0.2 wurde aus Di-*iso*-propylether umkristallisiert.

Ausbeute: 17.9 g (9.30 mmol, 64 %) eines rötlichen Feststoffes.

DC: R_f (Petrolether/Ethylacetat 4:1 v/v)= 0.2

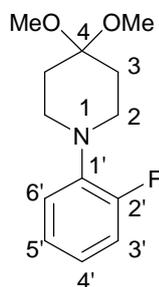
¹H-NMR: δ[ppm] (400 MHz, CDCl₃)= 7.10-6.95 (m, 4H, Ar.), 3.41 (t, 4H, J_{H,H}= 6.1 Hz, H2), 2.63 (t, 4H, J_{H,H}= 6.1 Hz, H3)

¹³C-NMR: δ[ppm] (100 MHz, CDCl₃)= 207.28 (C4), 156.10 (d, ¹J_{C,F}= 245.9 Hz, C2-Ar.), 139.54 (d, ²J_{C,F}= 8.4 Hz, C1-Ar.), 124.90 (d, ³J_{C,F}= 3.7 Hz, C6-Ar.), 123.53 (d, ³J_{C,F}= 8.5 Hz, C4-Ar.), 120.08 (d, ⁴J_{C,F}= 2.4 Hz, C5-Ar.), 116.72 (d, ²J_{C,F}= 20.8 Hz, C3-Ar.), 51.15 (d, ⁴J_{C,F}= 6.6 Hz, C2), 42.08 (C3)

¹⁹F-NMR: δ[ppm] (470 MHz, CDCl₃)= -123.3

T_m: 66° C

6.3.5 Synthese von von 1-(2-Fluorphenyl)-4,4-dimethoxypiperidin **92**



55.5 g (0.5 mol) 2-Fluoranilin **89** wurden in 500 mL wasserfreiem Methanol gelöst, das 1,5-Dichlorpentanon-Rohprodukt **86** (Kapitel 6.3.1) und 105 g (0.55 mol) P-Toluolsulfonsäure Monohydrat hinzugegeben, für 2 h unter Rückfluss erhitzt und 165 g (1.5 mol) Trimethylorthoformiat hinzugegeben. Nach weiteren 2 h Erhitzen unter

Rückfluss wurde auf 0 °C gekühlt, 150 mL (1.65 mol) Triethylamin hinzugegeben und das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde in Petrolether aufgenommen, mit gesättigter NaHCO₃-Lsg. gewaschen und die wässrige Phase mit Petrolether extrahiert, bis die organische Phase farblos blieb. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt mehrfach mit Methanol kodestilliert und erneut in 1 l Methanol gelöst. Unter Rühren wurden über eine Stunde 750 mL Wasser hinzugegossen. Die beginnende Kristallisation wurde über Nacht im Kühlschrank vervollständigt und der Feststoff filtriert, mit Methanol/Wasser (1:1 v/v) gewaschen und im Vakuum getrocknet.

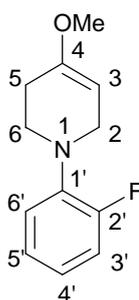
Ausbeute: 76 g (64 % ausgehend von 3-Chlorpropionsäurechlorid) eines ockerfarbenen Feststoffes

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃)= 7.07-6.89 (m, 4H, Ar.H), 3.24 (s, 6H, OMe), 3.09 (t, 4H, $J_{H,H}$ = 5.6 Hz, H2), 1.94 (t, 4H, $J_{H,H}$ = 5.6 Hz, H3)

¹³C-NMR: δ [ppm] (100 MHz, CDCl₃)= 124.76 (d, $J_{H,H}$ = 3.6 Hz, C6'), 122.70 (d, $J_{H,H}$ = 8.1 Hz, C4'), 119.78 (d, $J_{H,H}$ = 3.0 Hz, C5'), 116.45 (d, $J_{H,H}$ = 20.9 Hz, C3'), 48.33 (d, $J_{H,H}$ = 3.5 Hz, C2), 47.97 (OMe), 33.11 (C3)

¹⁹F-NMR: δ [ppm] (470 MHz, CDCl₃)= -123.01

6.3.6 Synthese von 1-(2-Fluorphenyl)-4-methoxy-1,2,5,6-tetrahydropyridin **14**



Variante A:

7.50 g (36.2 mmol) 1-(2-Fluorphenyl)-piperidin-4-on **91** und 10 g (52.5 mmol) *p*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat wurden in 40 mL wasserfreiem Methanol gelöst. Nach Zugabe von 13.5 mL (120.0 mmol) Trimethylorthoformiat wurde die Lösung 40 Min. unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch mit einer Suspension von Natriummethanolat in Methanol auf pH 8 - 9 gebracht und mit 200 mL Diethylether und 80 mL Wasser extrahiert. Die wässrige

Phase wurde mehrfach mit 80 mL Diethylether rückextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden anschließend zweimal mit gesättigter NaHCO₃-Lsg. gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Das Rohprodukt wurde in Dichlormethan aufgenommen und nach Zugabe von 60 mg (0.40 mmol) *p*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde 90 Min. bei 150 °C im Ölpumpenvakuum unter Rückfluss erhitzt. Das Produkt konnte durch Destillation (4 · 10⁻¹ mbar, 90° C) erhalten werden

Ausbeute: 5.00 g (24 mmol, 68 %) eines gelben Öls

Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der Rückstand erneut in Dichlormethan aufgenommen und die Lösung mit Natriummethanolat neutralisiert. Die organische Phase wurde zweimal mit je 40 mL Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Zwischenprodukt (Dimethylacetal) **92** konnte säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt werden

Ausbeute: 1.7 g (7.2 mmol, 20 %) eines gelben Öles

Variante B:

10 g (41 mmol) 1-(2-Fluorphenyl)-4,4-dimethoxypiperidin **92** wurden mit einer Spatelspitze *p*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat 90 Min. bei 150 °C im Ölpumpenvakuum unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen wurde das Rohprodukt in Dichlormethan aufgenommen, und mit Triethylamin neutralisiert, mit 5 % NaHCO₃-Lsg. gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit Petrolether/Ethylacetat (10-20 % v/v) gereinigt.

Ausbeute: 7.30 g (35 mmol, 86 %) eines gelben Öls

DC: R_f (Petrolether/Ethylacetat 4:1 v/v) = 0.38

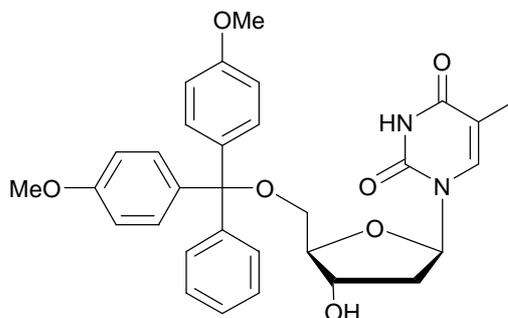
¹H-NMR: δ[ppm] (400 MHz, C₆D₆) = 6.74-6.64 (m, 2H, Ar.), 6.58-6.45 (m, 2H, Ar.), 4.12 (tt, 1H, J_{H,H} = 3.5 Hz, J_{H,H} = 1.1 Hz, H3), 3.35 (dt, 2H, J_{H,H} = 3.4 Hz, J_{H,H} = 2.2 Hz, H2), 2.99 (s, 3H, OMe), 2.87 (t, 2H, J_{H,H} = 5.8 Hz, H6), 2.06 (dtt, 2H, J_{H,H} = 1.1 Hz, J_{H,H} = 2.2 Hz, J_{H,H} = 5.7 Hz, H5)

¹³C-NMR: δ[ppm] (400 MHz, C₆D₆) = 157.46 (d, J_{C,F} = 240.7 Hz, C2'), 154.72 (C4), 141.28 (d, J = 7.3 Hz, C1'), 125.33 (d, J = 3.4 Hz, C5'), 122.49 (d, J = 7.6 Hz, C4'), 120.15 (d, J = 3.1 Hz, C6'), 117.58 (d, J = 20.2 Hz, C3'), 91.64 (C2), 54.32 (OMe), 49.11 (C3/C5), 48.78 (C3/C5), 28.43 (C6)

^{19}F -NMR: δ [ppm] (470 MHz, C_6D_6) = -122.89

6.4 Adenosyl-Thymidyl-Phosphonatdinucleotid 1-4

6.4.1 Synthese von 5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-thymidin **20**



Die Reaktion wurde unter Feuchtigkeitsausschluss in einer Argonatmosphäre durchgeführt. 10.0 g (41.3 mmol) Thymidin **18**, 150 mg (1.60 mmol) 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) wurden mit Pyridin kdestilliert und in 70 mL Pyridin gelöst. Es wurden 16.8 g (61.2 mmol) 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid (DMTrCl) **19** und 7.50 g (10.5 mL, 20.8 mmol) Triethylamin hinzugegeben. Nach 21 h Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 mL Methanol abgebrochen. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand mit Toluol sowie mit Dichlormethan kdestilliert und in 100 mL Dichlormethan aufgenommen. Nach zweimaligem Waschen mit Wasser, Reextrahieren der wässrigen Phase mit Dichlormethan und Trocknen der vereinigten organischen Phasen über Na_2SO_4 wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in 400 mL Benzol aufgenommen und der Niederschlag unter Rückfluss und portionsweiser Zugabe von Ethylacetat (ca. 40 mL) umkristallisiert.

Ausbeute: 22.0 g (40.4 mmol, 98 %) eines farblosen Feststoffs

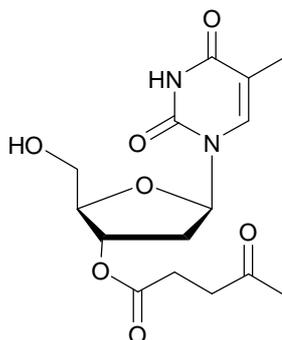
DC: R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 10 % v/v) = 0.58

^1H -NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3) = 8.93 (s, 1H, NH Thy), 7.50 (d, 1H, $^4J_{\text{H,H}} = 1.3$ Hz, H6), 7.31-7.14 (m, 10H, (H2+H3'+H4'+H2') DMTr), 6.74 (d, 4H, $^3J_{\text{H,H}} = 9.6$ Hz, H3 DMTr), 6.34 (dd, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.6$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 6.0$ Hz, H1'), 4.48 (ddd, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 5.6$, $^3J_{\text{H,H}} = 2.7$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 2.7$ Hz, H3'), 3.98 (ddd, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 2.9$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 2.9$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 2.9$ Hz, H4'), 3.69 (s, 6H, OCH_3 DMTr), 3.38

(dd, 1H, $^2J_{\text{H,H}} = 10.6$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 3.2$ Hz, H5'a), 3.27 (dd, 1H, $^2J_{\text{H}^b, \text{H}^a} = 10.4$ Hz, $^3J_{\text{H}^b, \text{H}} = 3.1$ Hz, H5'b), 2.33 (ddd, 1H, $^2J_{\text{H,H}} = 13.7$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 5.8$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 2.7$ Hz, H2'a), 2.22 (ddd, 1H, $^2J_{\text{H,H}} = 13.7$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 7.7$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 6.0$ Hz, H2'b), 1.37 (d, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 1.0$ Hz, H7)

^{13}C -NMR: δ [ppm] (100 MHz, CDCl_3) = 163.82 (C4), 158.67 (C4 DMTr), 150.51 (C2), 144.28 (C1' DMTr), 135.66 (C6), 135.36+135.30 (C1 DMTr), 130.04 (C2 DMTr), 128.08 (C3' DMTr), 127.97 (C2' DMTr), 127.11 (C4' DMTr), 113.24 (C3 DMTr), 111.27 (C5), 86.90 (C4'), 86.21 ($\text{C}_{\text{quart.}}$ DMTr), 84.72 (C1'), 72.48 (C3'), 63.56 (C5'), 55.23 (OCH_3 DMTr), 40.93 (C2'), 11.79 (C7)

6.4.2 Synthese von 3'-O-Levulinylthymidin **16**



Die Reaktion wurde mit wasserfreien Lösungsmitteln und in einer Inertgasatmosphäre unter Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt. 10.0 g (18.4 mmol) DMTr-dT **20** und 470 mg (3.7 mmol) DMAP wurden in 150 mL Dichlormethan gelöst, 2.50 g (22.0 mmol) Levulinsäure und 4.55 g (22.0 mmol) DCC hinzugegeben. Nach 5 h Rühren bei Raumtemperatur wurde der entstandene Niederschlag filtriert, das Filtrat im Vakuum eingengt und an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 2 % filtriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Rückstand in 200 mL 2 % *p*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 30 % v/v) aufgenommen. Nach 30 Min. Rühren bei Raumtemperatur wurde das Gemisch mehrfach mit gesättigter NaHCO_3 -Lsg. gewaschen. Die organische Phase über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an

Kieselgel mit Dichlormethan und einem Methanolgradienten von 0-6 % gereinigt und kann aus Petrolether/Ethylacetat 2:1 umkristallisiert werden.

Ausbeute: 4.38 g (12.9 mmol, 70 %) eines farblosen Feststoffes

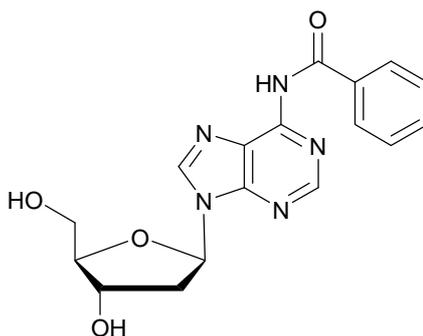
DC: R_f (CH₂Cl₂/MeOH 10 % v/v) = 0.54

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃) = 8.80 (s, 1H, NH Thy), 7.51 (d, 1H, ⁴J_{H,H} = 1.3 Hz, H6), 6.23 (dd, 1H, ³J_{H,H} = 6.1 Hz, ³J_{H,H} = 8.2 Hz, H1'), 5.36 (ddd, ³J_{H,H} = 6.1 Hz, ³J_{H,H} = 2.5 Hz, ³J_{H,H} = 2.5 Hz, H3'), 4.10 (ddd, 1H, ³J_{H,H} = 2.4 Hz, ³J_{H,H+b} = 2.4 Hz, H4'), 3.91-3.87 (m, 2H, H5'), 2.81-2.77 (m, 2H, H2 Lev), 2.61-2.58 (m, 2H, H3 Lev), 2.44 (ddd, 1H, ³J_{H,H} = 14.1 Hz, ³J_{H,H} = 8.3 Hz, ³J_{H,H} = 6.2 Hz, H2'a), 2.38 (ddd, 1H, ³J_{H,H} = 14.1 Hz, ³J_{H,H} = 6.1 Hz, ³J_{H,H} = 2.6 Hz, H2'), 2.21 (s, 3H, H5 Lev), 1.92 (d, 3H, ⁴J_{H,H} = 1.2 Hz, H7)

¹³C-NMR: δ [ppm] (100 MHz, CDCl₃) = 206.59 (C4 Lev), 172.53 (C1 Lev), 163.76 (C4), 150.46 (C2), 136.42 (C6), 111.30 (C5), 86.06 (C1'), 85.00 (C4'), 74.85 (C3'), 62.47 (C5'), 37.79 (C2 Lev), 37.07 (C2'), 29.74 (C5 Lev), 27.91 (C3 Lev), 12.51 (C7)

UV: λ_{\max} [nm](MeCN) = 263

6.4.3 Synthese von *N*⁶-Benzoyl-2'-desoxyadenosin **24b**



Die Reaktion wurde mit wasserfreien Lösungsmitteln und in einer Inertgasatmosphäre unter Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt. 7.50 g (27.9 mmol) 2'-Desoxyadenosin (dA) **24** wurden mit Pyridin kdestilliert und anschließend in 130 mL Pyridin gelöst. Zu dieser Lösung wurden 16.5 g (19.2 mL, 152 mmol) Trimethylsilylchlorid (TMSCl) getropft und 30 Min. bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 21.1 g (17.4 mL, 150 mmol) Benzoylchlorid hinzugefügt und weitere 2.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach

Abkühlen auf 0° C wurden 30 mL Wasser der Reaktionsmischung hinzugefügt und weitere 5 Min. gerührt. Es wurden 80 mL einer 25 %igen Ammoniaklösung hinzugegeben und die Mischung bei Raumtemperatur 30 Min. gerührt. Das Gemisch wurde fast bis zur Trockene eingengt und der Rückstand in 400 mL Wasser aufgenommen. Die wässrige Lösung wurde mit 150 mL Essigsäureethylester gewaschen, die Phasen getrennt und die beginnende Kristallisation aus der wässrigen Phase über Nacht bei Raumtemperatur vervollständigt.

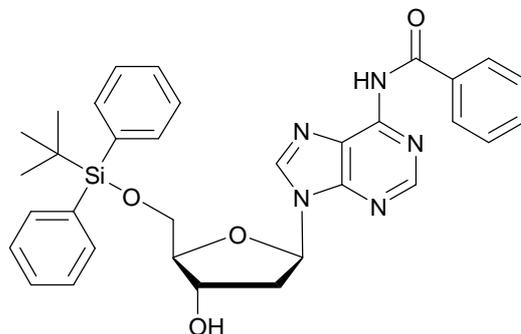
Ausbeute: 8.89 g (25.0 mmol, 89 %) eines farblosen Feststoffes

DC: R_f (CH₂Cl₂/MeOH 30 % v/v) = 0.5

¹H-NMR: δ [ppm] (500 MHz, DMSO-*d*₆) = 10.88 (bs, 0.8H, NH Ade), 8.74 (s, 1H, H2), 8.68 (s, 1H, H8), 8.04 (m, 2H, H2 Bz), 7.63 (m, 1H, H4 Bz), 7.54 (m, 2H, H3 Bz), 6.48 (dd, 1H, ³J_{H,H} = 7.1 Hz, ³J_{H,H} = 6.5 Hz, H1'), 5.38 (d, 1H, ³J_{OH,H} = 4.2 Hz, 3'OH), 5.03 (t, 1H, ³J_{OH,H+b} = 5.5 Hz, 5'OH), 4.46 (dddd, 1H, ³J_{H,H} = 6.0 Hz, ³J_{H,H} = 3.2 Hz, ³J_{H,H} = 3.1 Hz, ³J_{H,H} = 3.1 Hz, H3'), 3.91 (ddd, 1H, ³J_{H,H} = 4.5 Hz, ³J_{H,H} = 3.1 Hz, H4'), 3.64 (ddd, 1H, ²J_{H,H} = 11.7 Hz, ³J_{H,H} = 5.0 Hz, ³J_{H, OH} = 5.1 Hz, H5'a), 3.54 (ddd, 1H, ²J_{H,H} = 11.8 Hz, ³J_{H, OH} = 5.5 Hz, ³J_{H,H} = 4.7 Hz, H5'b), 2.80 (ddd, 1H, ²J_{H,H} = 13.3 Hz, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, ³J_{H,H} = 6.0 Hz, H2'a), 2.36 (ddd, 1H, ²J_{H,H} = 13.3 Hz, ³J_{H,H} = 6.3 Hz, ³J_{H,H} = 3.4 Hz, H2'b)

¹³C-NMR: δ [ppm] (100 MHz, DMSO-*d*₆) = 165.83 (CO Bz), 152.12 (C4), 151.74 (C2), 150.51 (C6), 143.26 (C8), 133.57 (C1 Bz), 132.64 (C4 Bz), 128.70 (C3 Bz), 128.67 (C2 Bz), 126.07 (C5), 88.19 (C4'), 83.94 (C1'), 70.89 (C3'), 61.81 (C5'), 39.23 (C2')

UV: λ_{\max} [nm](MeCN) = 274

6.4.4 Darstellung von *N*⁶-Benzoyl-5'-*O*-*tert*-butyldiphenylsilyl-2'-desoxyadenosin **25**

Die Reaktion wurde mit wasserfreien Lösungsmitteln und in einer Inertgasatmosphäre unter Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt. 2.13 g (6.00 mmol) dA^{Bz} **24b** wurden in 30 mL Pyridin gelöst und 2.05 g (7.45 mmol) *tert*-Butyldiphenylsilylchlorid (TBDPSCl) hinzugegeben. Nach 17 h Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 mL Methanol abgebrochen. Die Lösung wurde eingengt, dreimal mit 10 mL Toluol und einmal mit 10 mL Dichlormethan koevaporiert, der Rückstand in 50 mL Dichlormethan aufgenommen, mit Wasser und 5 %iger NaHCO₃-Lsg. gewaschen. Durch Zugabe von NaCl wurde die Trennung der Phasen beschleunigt. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und eingengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan und einem Methanolgradienten (0 % bis 6 %) gereinigt.

Ausbeute: 2.73 g (4.60 mmol, 77 %) eines farblosen Feststoffes

DC: R_f (CH₂Cl₂/MeOH 10 % v/v) = 0.5

MS: ESI⁺ (m/z + Na⁺) = 616.238 (calc. C₃₃H₃₅N₅O₄SiNa 616.2356)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-*d*₆) = 11.18 (bs, 1H, NH Ade), 8.64 (s, 1H, H2 Ade), 8.57 (s, 1H, H8 Ade), 8.05 (m, 2H, H2 Bz), 7.63 (m, 1H, H4 Bz), 7.60-7.52 (m, 6H, H2 TBDPS, H3 Bz), 7.45-7.30 (m, 6H, (H4+H3) TBDPS), 6.49 (dd, 1H, ³J_{H,H+b} = 6.5 Hz, H1'), 5.45 (d, 1H, ³J_{OH,H} = 4.1 Hz, 3'OH), 4.57 (dddd, ³J_{H,H} = 6.1 Hz, ³J_{H,H} = 4.21 Hz, ³J_{H,H} = 4.19 Hz, ³J_{H,H} = 4.19 Hz, H3'), 4.00 (ddd, 1H, ³J_{H,H} = 4.3 Hz, H4'), 3.91 (dd, 1H, ²J_{H,H} = 11.1 Hz, ³J_{H,H} = 4.5 Hz, H5'a), 3.75 (dd, 1H, ²J_{H,H} = 11.2 Hz, ³J_{H,H} = 5.6 Hz, H5'b), 2.90 (ddd, 1H, ²J_{H,H} = 13.2 Hz, ³J_{H,H} = 6.5 Hz, ³J_{H,H} = 6.5 Hz, H2'a), 2.40 (ddd, ²J_{H,H} = 13.4 Hz, ³J_{H,H} = 6.5 Hz, ³J_{H,H} = 4.6 Hz, H2'b), 0.94 (s, 9H, CH₃ *t*-Bu, TBDPS)

^{13}C -NMR: δ [ppm] (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)= 165.77 (CO Bz), 152.02 (C4), 151.64 (C2), 150.52 (C6), 143.26 (C8), 135.20+135.18 (C2 TBDPS), 133.03 (C1 Bz), 132.9 (C4 Bz), 130.01+129.99 (C4 TBDPS), 128.64 (C3 Bz), 128.61 (C2 Bz), 127.93+128.02 (C3 TBDPS), 126.15 (C5), 87.27 (C4'), 83.81 (C1'), 72.51 (d, $J_{\text{C,P}}= 22.4$ Hz, C3'), 64.41 (C5'), 55.06 (C1 TBDPS), 38.71 (C2'), 26.78 (CH_3 *t*-Bu), 18.94 ($\text{C}_{\text{quart.}}$ *t*-Bu)

IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (KBr)= 3400, 3069, 2954, 2930, 2892, 2856, 1702, 1612, 1581, 1513, 1456, 1427, 1391, 1329, 1297, 1253, 1218, 1184, 1158, 1112, 1085, 1029, 998, 936, 823, 797, 741, 703, 644, 609, 504, 488

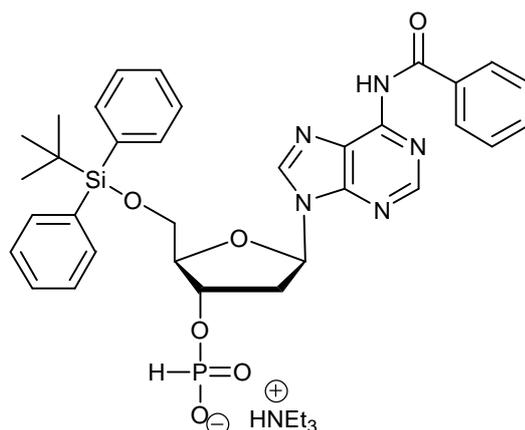
UV: λ_{max} [nm] (MeCN)= 277

T_{m} : 88°C

Zu 10 % wurden 5'-*O*,-3'-*O*-Di-*tert*-butyldiphenylsilyl-*N*⁶-benzoyl-2'-desoxyadenosin erhalten.

MS: ESI⁺ ($m/z + \text{H}^+$)= 832.3711 (calc. $\text{C}_{49}\text{H}_{54}\text{N}_5\text{O}_4\text{Si}_2$ 832.3714)

6.4.5 Synthese von *N*⁶-Benzoyl-5'-*O*-*tert*-butyldiphenylsilyl-2'-desoxyadenosyl-3'-triethylammonium-H-phosphonat **15**



Variante A

Die Reaktion wurde mit wasserfreien Lösungsmitteln und in einer Inertgasatmosphäre unter Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt. 17.5 g (257 mmol) Imidazol wurden in 400 mL Dichlormethan gelöst und bei 0° C wurden 27.6 g (38.0 mL, 273 mmol) Triethylamin langsam hinzugegeben. Anschließend wurden über 1 h bei 0° C 13.4 g

(8.50 mL, 97.0 mmol) Phosphortrichlorid hinzugetropft und das Gemisch 1 h bei 0° C gerührt. 9.69 g (16.3 mmol) 5'-O-TBDPS-dA^{Bz} **25** wurden in 200 mL Dichlormethan gelöst, bei 0° C über 20 Min. zu der Phosphorimidazolid-Lösung getropft und 17 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch langsame Zugabe von 200 mL Wasser bei 0° C beendet. Nach 30 Min. Rühren wurde die Lösung eingeeengt und mit viermal mit je 200 mL Pyridin/NEt₃ (4:1) und viermal mit je 100 mL Toluol koevaporiert. Der Rückstand wurde in 500 mL Dichlormethan aufgenommen und zweimal mit 100 mL Wasser gewaschen, wobei beim zweiten Waschen durch Zugabe von NaCl die Phasentrennung beschleunigt wurde. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das gelbe Rohprodukt wurde mit Dichlormethan (+1 % Triethylamin) und einem Methanolgradienten (0 % bis 10 %) säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt

Ausbeute: 7.31 g (9.63 mmol, 59 %) eines farblosen Feststoffes, der aus dem Produkt und dem entschützten 5'-O-TBDPS-dA-Triethylammonium-H-phosphonat bestand.

Variante B

Die Reaktion wurde mit wasserfreien Lösungsmitteln und in einer Inertgasatmosphäre unter Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt. 7.00 g (11.7 mmol) 5'-O-TBDPS-dA^{Bz} **25** wurden mit Pyridin kdestilliert, in 100 mL Pyridin gelöst und 19.3 g (82.5 mmol) Diphenylphosphit **33a** hinzugegeben. Nach einer halben Stunde Rühren bei Raumtemperatur wurden 30 mL H₂O/NEt₃ (1:1 v/v) hinzugefügt. Nach einer weiteren halben Stunde Rühren wurde im Vakuum eingeeengt und der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen, mit 5 % NaHCO₃-Lsg. gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum zur Trockene eingeeengt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan (+1 % Triethylamin) und einem Methanolgradienten (0 bis 10 % v/v) gereinigt.

Ausbeute: 8.50 g (11.2 mmol, 95 %) eines farblosen Feststoffes

DC: R_f (CH₂Cl₂/MeOH 30 % v/v) = 0.43

MS: ESI⁺ (m/z + H⁺) = 658.2249 (calc. C₃₃H₃₇N₅O₆PSi 658.2245)

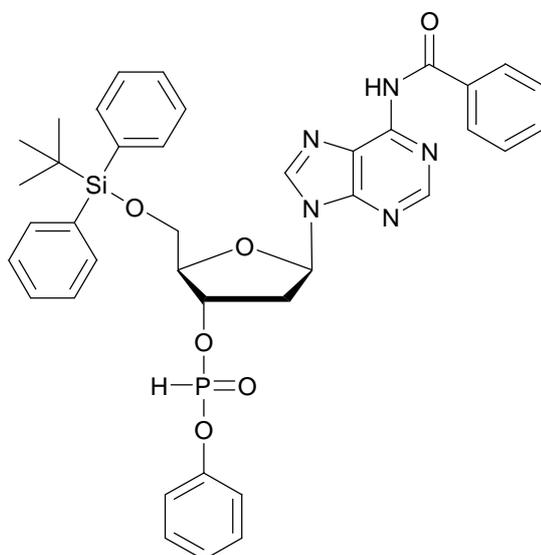
$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3)= 9.06 (bs, 1H, NH), 8.75 (s, 1H, H2), 8.20 (s, 1H, H8), 8.02 (m, 2H, H2 Bz), 7.65-7.58 (m, 5H, H4 Bz, H2 TBDPS), 7.52 (m, 2H, H3 Bz), 7.43-7.37 (m, 2H, H4 TBDPS), 7.36-7.31 (m, 4H, H3 TBDPS), 6.97 (d, 1H, $^1J_{\text{H,P}} = 616.2$ Hz, PH), 6.58 (dd, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.5$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 6.2$ Hz, H1'), 5.10 (dddd, 1H, $^3J_{\text{H,P}} = 9.0$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 5.4$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 2.8$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 2.8$ Hz, H3'), 4.37 (ddd, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 3.1$ Hz, H4'), 3.97 (dd, 1H, $^2J_{\text{H,H}} = 11.1$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 3.5$ Hz, H5'a), 3.89 (dd, 1H, $^2J_{\text{H,H}} = 11.1$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 3.5$ Hz, H5'b), 2.84-2.79 (m, 16H, H2' + HNCH_2CH_3), 1.20 (t, 20H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.2$ Hz, HNCH_2CH_3), 1.06 (s, 9H, CH_3 *t*-Bu, TBDPS)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)= 157.20 (CO Bz), 152.04 (C4), 151.52 (C2), 150.56 (C6), 145.16 (C8), 135.20+135.16 (C2 TBDPS), 132.98 (C1 Bz), 132.96 (C4 Bz), 132.79, 130.00+129.06 (C4 TBDPS), 128.68 (C3 Bz), 128.61 (C2 Bz), 128.02+128.00 (C3 TBDPS), 125.47 (C5), 120.90, 86.50 (C4'), 83.95 (C1'), 72.39 (C3'), 67.26, 63.91 (C5'), 55.17+55.09 (C1 TBDPS), 45.43 (CH_2 NEt₃), 26.76+26.72 (CH_3 *t*-Bu), 18.94 (C_{quart} *t*-Bu), 18.91 (C_{quart} *t*-Bu), 8.5 (CH_3 NEt₃)

$^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, CDCl_3)= 1.84 (dd, $^1J_{\text{H,P}} = 599.6$ Hz, $^3J_{\text{P,H}} = 8.8$ Hz)

UV: λ_{max} [nm](MeCN)= 273

6.4.6 Synthese von *N*⁶-Benzoyl-5'-*O*-*tert*-butyldiphenylsilyl-2'-desoxyadenos-3'-yl-phosphonsäurephenylester **17**



Die Reaktion wurde mit wasserfreien Lösungsmitteln und in einer Inertgasatmosphäre unter Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt. 500 mg (0.84 mmol) 5'-O-TBDPS-dA^{Bz} **25** wurden mit Pyridin kodestilliert, in 7 mL Pyridin gelöst und 1.45 g (6.19 mmol) Diphenylphosphit **33a** hinzugegeben. Nach einer Stunde Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung im Vakuum eingengt und der Rückstand in Dichlormethan aufgenommen und säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan und einem Acetonitrilgradienten (30 %-50 % v/v) gereinigt.

Das Produkt zersetzte sich, so dass keine weiteren Daten als die hier angegebenen gewonnen werden konnten.

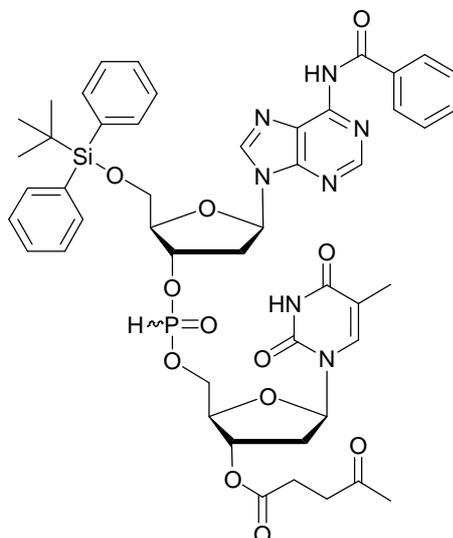
Ausbeute: 240 mg (0.33 mmol, 39 %)

DC: R_f (MeCN/CH₂Cl₂ 1:1 v/v) = 0.46

MS: ESI⁺ (m/z + Na⁺) = 756.4 (calc. C₃₉H₄₀N₅NaO₆PSi 756.24)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, C₆D₆) = 8.76 (bs, 2H, NH), 7.93-7.91 (m, 4H, o-Bz), 7.86-7.80 (m, 10H, Ar.), 7.34-7.29 (m, 15H, Ar.), 7.24-7.07 (m, 12H, Ar.), 7.01-6.93 (m, 3H, Ar.), 6.89 (d, 1H, J = 719.2 Hz, PH), 6.88 (d, 1H, J = 719.2 Hz, PH), 6.14 (dd, 1H, J = 7.7 Hz, J = 6.49 Hz, H1'), 6.11 (dd, 1H, J = 7.6 Hz, J = 6.3 Hz, H1'), 5.613 (dddd, 1H, J = 8.3 Hz, J = 5.6 Hz, J = 2.7 Hz, J = 2.7 Hz, H3'), 5.606 (dddd, 1H, J = 8.4 Hz, J = 5.5 Hz, J = 2.7 Hz, J = 2.7 Hz, H3'), 4.36 (ddd, 1H, J = 4.7 Hz, J = 4.7 Hz, J = 2.7 Hz, H4'), 4.33 (ddd, 1H, J = 4.8 Hz, J = 4.8 Hz, J = 2.6 Hz, H4'), 4.07 (dd, 1H, J = 11.2 Hz, J = 5.3 Hz, H5'a), 4.02 (dd, 1H, J = 11.3 Hz, J = 5.2 Hz, H5'a), 3.95 (dd, 1H, J = 11.4 Hz, J = 4.6 Hz, H5'b), 3.89 (dd, 1H, J = 11.2 Hz, J = 4.5 Hz, H5'b), 2.95 (ddd, 1H, J = 13.2 Hz, J = 6.9 Hz, J = 6.5 Hz, H2'a), 2.90 (ddd, 1H, J = 13.8 Hz, J = 7.6 Hz, J = 6.0 Hz, H2'b), 2.40 (ddd, 1H, J = 14.2 Hz, J = 6.2 Hz, J = 2.7 Hz, H2'a), 2.33 (ddd, 1H, J = 14.2 Hz, J = 6.1 Hz, J = 2.6 Hz, H2'b), 1.24 (s, 9H, *t*Bu), 1.22 (s, 9H, *t*Bu)

6.4.7 Synthese von (*N*⁶-Benzoyl-5'-*O*-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-2'-desoxyadenos-3'-yl)-(3'-*O*-levulinylthymid-5'-yl)-*H*-phosphonatediester **12**



Die Reaktion wurde mit wasserfreien Lösungsmitteln und in einer Inertgasatmosphäre unter Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt.

Variante A

1.00 g (1.30 mmol) 5'-*O*-TBDPS-dA^{Bz}-Triethylammonium-*H*-phosphonat **15** und 0.50 g (1.47 mmol) 3'-*O*-Levulinylthymidin **16** wurden mit Pyridin kdestilliert und anschließend in 22 mL Pyridin gelöst. 0.44 g (450 µL, 3.70 mmol) Pivaloylchlorid wurden schnell hinzugegeben, das Reaktionsgemisch nach 9.5 Min. Rühren bei Raumtemperatur mit 40 mL Dichlormethan verdünnt und sofort mit 40 mL 5 %iger NaHCO₃-Lsg. gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt konnte mit Dichlormethan (+0.1 % Essigsäure) und einem Methanolgradienten (0 % bis 10 %) säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt werden.

Ausbeute: 1.04 g (1.06 mmol, 84 %) eines farblosen Feststoffs

Durch wiederholte chromatographische Reinigung an Kieselgel mit Dichlormethan (+0.1 % AcOH)/Methanol (4 % v/v) konnten die Diastereomere voneinander getrennt werden.

Variante B

240 mg (0.33 mmol) 5'-O-TBDPS-dA^{Bz}-Phenyl-H-Phosphonatdiester **17** und 112 mg (0.33 mmol) 3'-O-Levulinylthymidin **16** wurden getrennt mit Pyridin kodestilliert und in 20 mL Pyridin gelöst. Nach 3-stündigem Rühren wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, mit Dichlormethan kodestilliert und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Acetonitril (50 %-70 % v/v) und anschließend Dichlormethan/Methanol (5 % v/v) gereinigt.

Ausbeute: 210 mg (0.21 mmol, 64 %) eines farblosen Schaums

Sp:

DC: R_f (CH₂Cl₂/MeOH 10 % v/v) = 0.54

MS: ESI⁺ (m/z + Na⁺) = 1002.325 (calc. C₄₈H₅₄N₇O₁₂PSiNa 1002.324)

¹H-NMR: δ [ppm] (500 MHz, DMSO-*d*₆) = 11.35 (s, 1H, NH), 11.17 (s, 1H, NH), 8.59 (s, 1H, H2 dA), 8.58 (s, 1H, H8 dA), 8.03 (d, 2H, *J* = 7.4 Hz, H2 Bz), 7.63 (dd, 1H, *J* = 7.4 Hz, *J* = 1.2 Hz, H4 Bz) 7.59-7.29 (m, 13H, H3 Bz, (H2+H3+H4) TBDPS, H6 Thy), 7.09 (d, 1H, *J* = 718.3 Hz, PH), 6.52 (t, 1H, *J* = 6.9 Hz, H1' dA), 6.20 (dd, 1H, *J* = 8.6 Hz, *J* = 5.9 Hz, H1' dT), 5.40 (dddd, 1H, *J* = 8.7 Hz, *J* = 5.9 Hz, *J* = 2.9 Hz, *J* = 2.9 Hz, H3' dA), 5.20 (ddd, 1H, *J* = 6.6 Hz, *J* = 2.4 Hz, *J* = 2.4 Hz, H3' dT), 4.31-4.28 (m, 3H, H4' dA, H5'a+b dT), 4.16 (ddd, 1H, *J* = 5.6 Hz, *J* = 3.2 Hz, *J* = 2.8 Hz, H4' dT), 3.95 (dd, 1H, *J* = 11.2 Hz, *J* = 5.0 Hz, H5'a dA), 3.80 (dd, 1H, *J* = 11.2 Hz, *J* = 5.4 Hz, H5'b dA), 3.23 (ddd, 1H, *J* = 14.2 Hz, *J* = 6.9 Hz, *J* = 6.9 Hz, H2'a dA), 2.74 (ddd, *J* = 14.3 Hz, *J* = 6.4 Hz, *J* = 3.2 Hz, H2'b dA), 2.71 (t, *J* = 6.5 Hz, H2 Lev), 2.52-2.45 (m, H3 Lev), 2.40 (ddd, 1H, *J* = 14.6 Hz, *J* = 8.2 Hz, *J* = 6.7 Hz, H2'a dT), 2.26 (ddd, 1H, *J* = 14.2 Hz, *J* = 6.0 Hz, *J* = 2.1 Hz, H2'B dT), 2.09 (s, 3H, H5 Lev), 1.78 (d, 3H, *J* = 1.1 Hz, H7 Thy), 0.95 (s, 9H, CH₃ tBu, TBDPS)

¹³C-NMR: δ [ppm] (100 MHz, DMSO-*d*₆) = 207.2 (C4 Lev), 172.40 (C1 Lev+CO Bz), 163.76 (C4 dT), 150.84 (C4 Ade), 150.82 (C2 Ade), 150.80 (C2 Thy), 150.58 (C6 Ade), 143.67 (C8 Ade), 136.16 (C6 Thy), 135.39+135.38 (C2 TBDPS), 134.83, 132.96 (C1 Bz), 132.82 (C4 Bz), 130.25, 129.54+129.46 (C4 TBDPS), 128.86 (C3 Bz), 128.82 (C2 Bz), 128.21+128.14 (C3 TBDPS), 127.87 (C5 Ade), 110.44 (C5 Thy), 84.40 (C4' dA), 83.99 (C1' dT), 82.20, 82.14 (C4' dT +

C1' dA), 75.34+75.39 (C3'dA), 74.01 (C3' dT), 63.51 (C5' dA), 37.79,37.76 (C2 Lev), 35.80+35.79 (C2' dA, C2' dT), 29.83 (C5 Lev), 28.02 (C3 Lev), 26.91 (CH₃ *t*-Bu, TBDPS), 19.10 (C_{quart.} TBDPS), 12.46 (C7 Thy)

³¹P-NMR: δ[ppm] (202 MHz, DMSO-*d*₆)= 10.77 (dddd, *J*= 718.0, *J*= 9.8 Hz, *J*= 7.8 Hz, PH)

UV: λ_{max}[nm](MeCN)= 273

R_p:

DC: R_f (CH₂Cl₂/MeOH 10 % v/v)= 0.57

MS: ESI⁺ (m/z + Na⁺)= 1002.29 (calc. C₄₈H₅₄N₇O₁₂PSiNa 1002.324)

¹H-NMR: δ[ppm] (500 MHz, DMSO-*d*₆)= 11.25 (s, 1H, NH), 11.17 (s, 1H, NH), 8.59 (s, 1H, H2 Ade), 8.57 (s, 1H, H8 Ade), 8.06-8.02 (m, 2H, H2 Bz), 7.69-7.63 (m, 1H, H4 Bz) 7.59-7.29 (m, 13H, H3 Bz, (H2+H3+H4) TBDPS, H6 Thy), 7.07 (d, 1H, *J*= 720.9 Hz, PH), 6.52 (dd, 1H, *J*= 6.9 Hz, H1' dA), 6.18 (dd, 1H, *J*= 8.4 Hz, *J*= 6.1 Hz, H1' dT), 5.41 (dddd, 1H, *J*= 8.4 Hz, *J*= 5.8 Hz, *J*= 2.9 Hz, *J*= 2.9 Hz, H3' dA), 5.23 (ddd, 1H, *J*= 6.7 Hz, *J*= 2.6 Hz, *J*= 2.6 Hz, H3' dT), 4.34 (ddd, 1H, *J*= 11.5 Hz, *J*= 8.2 Hz, *J*= 3.4 Hz, H5'a dT), 4.31-4.28 (m, 1H, H4' dA), 4.28 (ddd, 1H, *J*= 11.2 Hz, *J*= 8.3 Hz, ³*J*_{HT,HT}= 5.4 Hz, H5'b dT), 4.15 (ddd, 1H, *J*= 5.1 Hz, *J*= 3.0 Hz, *J*= 3.0 Hz, H4' dT), 3.95 (dd, 1H, *J*= 11.1 Hz, *J*= 5.1 Hz, H5'a dA), 3.81 (dd, 1H, *J*= 11.0 Hz, *J*= 5.5 Hz, H5'b dA), 3.22 (ddd, 1H, *J*= 14.1 Hz, *J*= 7.0 Hz, *J*= 6.9 Hz, H2'a dA), 2.73 (ddd, *J*= 14.4 Hz, *J*= 6.5 Hz, *J*= 2.9 Hz, H2'b dA), 2.71 (t, *J*= 6.5 Hz, H2 Lev), 2.52-2.45 (m, H3 Lev), 2.40 (ddd, 1H, *J*= 14.6 Hz, *J*= 8.0 Hz, *J*= 7.0 Hz, H2'a dT), 2.26 (ddd, 1H, *J*= 14.2 Hz, *J*= 6.0 Hz, *J*= 2.2 Hz, H2'B dT), 2.08 (s, 3H, C5 Lev), 1.76 (d, 3H, *J*= 1.1 Hz, H7 Thy), 0.95 (s, 9H, CH₃ *t*-Bu, TBDPS)

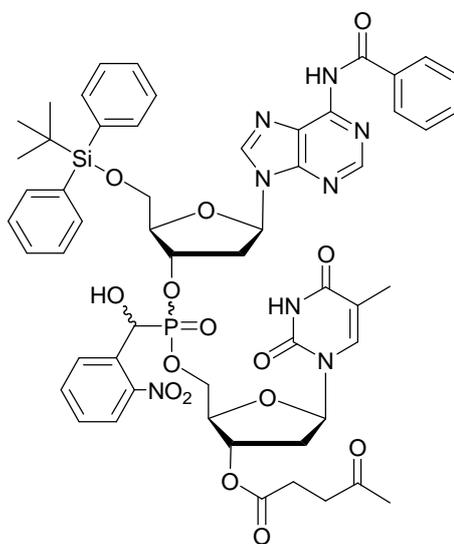
¹³C-NMR: δ[ppm] (100 MHz, DMSO-*d*₆)= 206.99 (C4 Lev), 172.21+172.15 (C1 Lev+CO Bz), 163.76 (C4 Thy), 151.99 (C4 Ade), 151.63 (C2 Ade), 150.62 (C2 Thy), 150.58 (C6 Ade), 143.42 (C8 Ade), 136.52 (C6 Thy), 135.95+135.18 (C2 TBDPS), 134.64, 133.54, 133.46 (C1 Bz), 132.77, 132.63 (C4 Bz), 130.06, 129.33+129.26 (C4 TBDPS), 128.93, 128.74, 128.66 (C3 Bz), 128.62 (C2 Bz),

128.01+127.94 (C3 TBDPS), 127.66, 126.17 (C5 Ade), 110.20 (C5 Thy), 109.88, 85.36 (C4' dA), 85.31, 84.68 (C1' dT), 84.29 (C1' dA), 84.01, 83.83, 81.87 (C4' dT), 81.83, 75.74+75.69 (d, $J= 5.5$ Hz, C3' dA), 74.99, 74.38, 73.83 (C3' dT), 65.19+65.14 (d, $J= 6.1$ Hz, C5' dT), 63.49 (C5' dA), 52.29, 37.59, 37.56 (C2 Lev), 36.80 (C2' dA), 35.64 (C2' dT), 29.65, 29.62 (C5 Lev), 27.83 (C3 Lev), 26.73 (CH_3 *t*-Bu, TBDPS), 18.89 ($\text{C}_{\text{quart.}}$ TBDPS), 12.43, 12.23 (C7 Thy)

^{31}P -NMR: δ [ppm] (202 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)=9.80 (dddd, $J= 721.9$ Hz, $J= 9.8$ Hz, $J= 7.8$ Hz, PH)

UV: λ_{max} [nm](MeCN)= 273

6.4.8 Synthese von [Hydroxy-(2-nitrophenyl)-methyl]-phosphonsäure-[(N^6 -benzoyl-5'-*O*-*tert*-butyldiphenylsilyl-2'-desoxyadenos-3'-yl)-(3'-*O*-levulinylthymid-5'-yl)]-diester **27**



Die Reaktion wurde unter Feuchtigkeitsausschluss in einer Argonatmosphäre und mit wasserfreien Lösungsmitteln durchgeführt. 300 mg (0.31 mmol) des (5'-*O*-TBDPS-dA^{Bz})-(3'-*O*-Lev-dT)-H-Phosphonatdiesters **12** und 160 mg (1.06 mmol) 2-Nitrobenzaldehyd **13** wurden mit wasserfreiem Acetonitril koevaporiert, in 6 ml Dichlormethan gelöst und der Reaktionsmischung wurde 1 Tropfen Triethylamin zugegeben. Nach 8 stündigem Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von drei Tropfen Essigsäure

abgebrochen und das Reaktionsgemisch säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan (+0.1% Essigsäure) und einem Methanolgradienten (0% bis 5%) gereinigt.

Ausbeute: 300 mg (0.27 mmol, 90%) eines farblosen Feststoffs

DC: R_f (CH₂Cl₂/MeOH 10 % v/v) = 0.52

³¹P-NMR: δ [ppm] (202 MHz, DMSO-*d*₆) = 22.34, 22.31, 22.00, 21.82

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (KBr) = 3191, 3070, 2955, 2931, 2857, 1704, 1610, 1581, 1528, 1456, 1427, 1405, 1351, 1251, 1181, 1157, 1112, 1072, 1004, 955, 889, 865, 823, 794, 741, 705, 644, 606, 555, 504, 489

UV: λ_{\max} [nm](MeCN) = 271

Nach obigen Verfahren wurden auch die diastereomerenreinen H-Phosphonate **12S_P** und **12R_P** eingesetzt und zu analytischen Zwecken **27S_P** und **27R_P** als Zwischenprodukt zu **28** isoliert.

S_P:

DC: R_f (CH₂Cl₂/MeOH 10 % v/v) = 0.52

¹H-NMR: δ [ppm] (500 MHz, DMSO-*d*₆) = 11.36 (s, 1H, NH), 11.34 (s, 1H, NH), 11.17 (bs, 1H, NH), 8.61, 8.59, 8.55, 8.51, 8.50 (5×s, H2 Ade, H8 Ade), 8.05-7.26 (m, 48H, Fpmp, Bz, H7, TBDPS, H6 dT), 7.01-6.95 (m, 1H, H7), 6.53-6.36 (m, 2H, H1' dA), 6.22-6.07 (m, 3H, H1' dT, OH-7), 5.35-5.32 (m, 1H, H3' dA), 5.22-5.15 (m, 2H, H3' dA, H3' dT), 5.06-5.03 (m, 1H, H3' dT), 4.30-4.26 (m, 1H, H5' dT), 4.25-4.23 (m, 2H, H4' dA), 4.18-4.12 (m, 3H, H5' dT) 4.07-4.02 (m, 2H, H4' dT), 3.96-3.90 (m, 2H, H5' dA), 3.84-3.78 (m, 2H, H5' dA), 3.16-3.00 (m, 2H, H2'a dA) 2.74-2.60 (m, 6H, H2'b dA, H2 Lev), 2.52-2.46 (m, H3 Lev), 2.36-2.16 (m, 4H, H2'a+b dT), 2.08 (2s, 6H, H5 Lev), 1.79-1.76 (m, 5H, H7 Thy), 0.95 (s, 9H, CH₃ *t*-Bu, TBDPS), 0.94 (s, 9H, CH₃ *t*-Bu, TBDPS)

¹³C-NMR: δ [ppm] (100 MHz, DMSO-*d*₆) = 206.43 (C4 Lev), 172.13 (C1 Lev + CO Bz), 163.80 (C4 Thy), 150.61 (C2 Thy), 150.38 (C6 Ade), 136.52 (C8 Ade), 135.17+135.14+135.11 (C2 TBDPS), 134.63 (C6 Thy), 132.60 (C1 Benzoyl + C4 Benzoyl), 129.25 (C3 Benzoyl), 128.74 (C2 Benzoyl), 128.65+128.62 (C3

TBDPS), 127.98, 127.66, 127.02 (C5 Ade), 110.32 (C5 Thy), 85.10 (C4' dA), 84.00 (C1' dT), 82.28 (C4' dT + C1' dA), 79.07, 77.51 (C3' dA), 68.39 (C3' dT), 66.03 (C5' dT), 65.31 (C5' dA), 37.55 (C2 Lev), 36.51 (C2' dA), 35.50 (C2' dT), 29.63 (C5 Lev), 27.80 (C3 Lev), 26.71 (CH₃ *t*-Bu TBDPS), 21.20, 18.87+18.83 (C_{quart.} TBDPS), 12.25 (C7 Thy)

³¹P-NMR: δ[ppm] (202 MHz, DMSO-*d*₆)= 22.34 (s), 22.31 (s)

R_p:

DC: R_f (CH₂Cl₂/ MeOH 10 % v/v)= 0.52

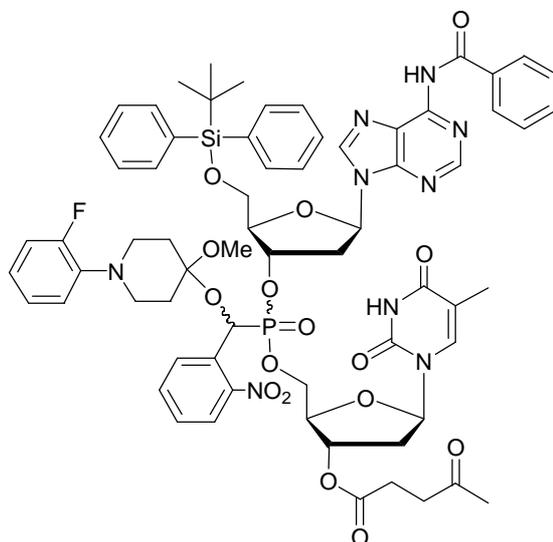
¹H-NMR: δ[ppm] (500 MHz, DMSO-*d*₆): 11.31 (s, 1H, NH), 11.30 (s, 1H, NH), 11.15 (bs, 2H, NH), 8.56 (s, 1H, H2 Ade), 8.55 (s, 1H, H2 Ade), 8.52 (s, 1H, H8 Ade), 8.50 (s, 1H, H8 Ade), 8.04-7.28 (m, 48H, F_{mp}, Benzoyl, Benzyl, TBDPS, H6 dT), 6.97 (dd, 1H, ²J_{H,P}= 15.5 Hz, ³J_{H,H}= 6.1 Hz, Benzyl-H), 6.95 (dd, 1H, ²J_{H,P}= 15.6 Hz, ³J_{H,H}= 6.1 Hz, Benzyl-H), 6.45 (dd, 1H, ³J_{H,H}= 7.8 Hz, ³J_{H,H}= 6.2 Hz, H1' dA I), 6.41 (dd, 1H, ³J_{H,H}= 7.7 Hz, ³J_{H,H}= 6.3 Hz, H1' dA II), 6.14-6.11 (m, 2H, H1' dT I+II), 6.09 (d, 1H, ³J_{H,H}= 6.0 Hz, OH7), 6.05 (d, 1H, ³J_{H,H}= 5.7 Hz, α-OH), 5.32-5.28 (m, 1H, H3' dA), 5.22-5.18 (m, 1H, H3' dA), 5.14-5.11 (m, 2H, H3' dT), 4.29-4.18 (m, 6H, H5'a+b dT), 4.17-4.07 (m, 4H, H4' dA, H4' dT), 3.85 (dd, 1H, ²J_{H,H}= 11.2 Hz, ³J_{H,H}= 4.5 Hz, H5'a dA), 3.80 (dd, 1H, ²J_{H,H}= 11.1 Hz, ³J_{H,H}= 4.2 Hz, H5'a dA), 3.71 (dd, 1H, ²J_{H,H}= 11.2 Hz, ³J_{H,H}= 5.7 Hz, H5'b dA), 3.68 (dd, 1H, ²J_{H,H}= 11.2 Hz, ³J_{H,H}= 5.7 Hz, H5'b dA), 3.16 (ddd, 1H, ²J_{H,H}= 14.2 Hz, ³J_{H,H}= 7.9 Hz, ³J_{H,H}= 6.2 Hz, H2'a dA), 3.09 (ddd, 1H, ²J_{H,H}= 14.2 Hz, ³J_{H,H}= 8.0 Hz, ³J_{H,H}= 6.2 Hz, H2'a dA), 2.74-2.57 (m, 8H, H2'b dA, H2 Lev), 2.51-2.45 (m, H3 Lev), 2.23-2.11 (m, 4H, H2'a+b dT), 2.07 (2s, 6H, H5 Lev), 1.717 (d, 3H, H7 Thy), 1.715 (d, 3H, H7 Thy), 0.93 (s, 18H, CH₃ *t*-Bu, TBDPS)

¹³C-NMR: δ[ppm] (100 MHz, DMSO-*d*₆): 206.95 (C4 Lev), 172.15 (C1 Lev + CO Benzyl), 163.75, 163.73 (C4 Thy), 151.60 (C4 Ade, C2 Ade), 150.59 (C2 Thy), 150.50 (C6 Ade), 147.48, 143.23 (C8 Ade), 135.60 (C6 Thy), 135.16+135.13 (C2 TBDPS), 134.65 (C1 Bz), 132.84, 132.81, 132.63+132.61 (C4 Bz), 129.99, 129.27 (C4 TBDPS), 128.93, 128.66 (C3 Bz), 128.62 (C2 Bz), 127.98+127.92

(C3 TBDPS), 127.66, 126.11 (C5 Ade), 110.26 (C5 Thy), 85.50 (C4' dA, C1' dT), 84.16 (C4' dT), 84.14 (C1' dA), 83.85, 83.78, 82.14, 82.09, 77.13+76.96 (C3' dA), 73.97 (C3' dT), 66.8 (C5' dT), 64.02, 63.96 (C5' dA), 37.53 (C2 Lev), 36.00 (C2' dA), 35.93 (C2' dT), 29.61 (C5 Lev), 27.80 (C3 Lev), 26.72 (CH₃ *t*-Bu TBDPS), 21.21, 18.89 (C_{quart.} TBDPS), 12.11 (C7 Thy)

³¹P-NMR: δ[ppm] (202 MHz, DMSO-*d*₆) = 22.00, 21.82

6.4.9 Synthese von {[1-(2-Fluorphenyl)-4-methoxypiperidin-4-yloxy]-(2-nitrophenyl)-methyl}-phosphonsäure-[*N*⁶-benzoyl-5'-*O*-(*tert*-butyldiphenylsilyl)-2'-desoxyadenos-3'-yl)-(3'-*O*-levulinylthymid-5'-yl)]-diester **28**



Die Reaktion wurde mit wasserfreien Lösungsmitteln und in einer Inertgasatmosphäre unter Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt. 1.25 g (1.28 mmol) (5'-*O*-TBDPS-dA^{Bz})-(3'-*O*-Lev-dT)-H-Phosphonatdiester **12Sp** wurden mit Toluol/Dichlormethan (1:1 v/v) kodestilliert. 533 mg (3.53 mmol) 2-Nitrobenzaldehyd **13** wurden mit Toluol kodestilliert. Beides wurde in 20 mL Dichlormethan gelöst und drei Tropfen Triethylamin hinzugegeben. Nach 8 h Rühren bei Raumtemperatur wurden 50 µL TFA hinzugefügt gefolgt von tropfenweiser Zugabe von 600 mg (2.90 mmol) Fpmp-Enolether **14**. Nach 16 h Rühren bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan und einem Methanolgradienten (0-6 %, v/v) gereinigt.

Ausbeute: 827 mg (0.62 mmol, 49 %) eines gelblichen Schaums.

DC: R_f (CH₂Cl₂/MeOH 10 % v/v) = 0.76

MS: ESI⁺-MS(m/z +Na⁺) = 1360.449 (calc. C₆₇H₇₃FN₉O₁₆PSiNa 1360.4564)

¹H-NMR: δ [ppm] (500 MHz, CDCl₃) = 9.08 (bs, 0.8 H, NH), 8.75 (s, 1H, H2 Ade), 8.71 (s, 1H, H2 Ade), 8.51+8.50 (2s), 8.21 (s, 1H, H8 Ade), 8.14 (s, 1H, H8 Ade), 8.08-6.88 (m, 2 x 21H, TBDPS, Bz, 2-Nitrobenzyl, Fpmp, H6 Thy), 6.55 (d, 1H, J = 19.4 Hz, Benzyl-H), 6.493 (dd, 1H, J = 8.8 Hz, J = 5.4 Hz, H1' dA I), 6.487 (d, 1H, J = 19.4 Hz, Benzyl-H), 6.42 (dd, 1H, J = 8.7 Hz, J = 5.5 Hz, H1' dA II), 6.169 (dd, 1H, J = 8.6 Hz, J = 5.7 Hz, H1' dT I), 6.166 (dd, 1H, J = 8.7 Hz, J = 5.6 Hz, H1' dT II), 5.48-5.45 (m, 1H, H3' dA I), 5.41-3.38 (m, 1H, H3' dA II), 5.18 (ddd, 1H, J = 6.9 Hz, J = 2.4 Hz, J = 2.4 Hz, H3' dT I), 5.17 (ddd, 1H, J = 6.8 Hz, J = 2.2 Hz, J = 2.2 Hz, H3' dT II), 4.37 (ddd, 1H, J = 11.5 Hz, J = 7.4 Hz, J = 4.8 Hz, H5'a dT I), 4.34 (ddd, 1H, J = 4.0 Hz, J = 4.0 Hz, J = 1.6 Hz, H4' dA I), 4.27 (ddd, 1H, J = 11.5 Hz, J = 7.3 Hz, J = 4.9 Hz, H5'a dT II), 4.24 (ddd, 1H, J = 11.3 Hz, J = 7.3 Hz, J = 4.9 Hz, H5'b dT I), 4.23 (ddd, 1H, J = 4.3 Hz, J = 4.4 Hz, J = 1.6 Hz, H4' dA II), 4.11 (ddd, 1H, J = 11.3 Hz, J = 6.9 Hz, J = 3.1 Hz, H5'b dT II), 4.10 (ddd, 1H, J = 5.2 Hz, J = 2.9 Hz, J = 2.9 Hz, H4' dT I), 4.05 (ddd, 1H, J = 4.9 Hz, J = 2.6 Hz, J = 2.7 Hz, H4' dT II), 3.95 (dd, 1H, J = 11.5 Hz, J = 4.2 Hz, H5'a dA I), 3.91 (dd, 1H, J = 11.6 Hz, J = 4.9 Hz, H5'b dA I), 3.90 (dd, 1H, J = 11.4 Hz, J = 3.4 Hz, H5'a dA II), 3.80 (dd, 1H, J = 11.4 Hz, J = 4.0 Hz, H5'b dA II), 3.38-3.30 (m, 2H, CH₂ Fpmp), 3.26+3.23 (2s, 6H, 2 OCH₃ Fpmp), 3.12-3.05 (m, 2H, CH₂ Fpmp), 3.00 (ddd, 1H, J = 14.2 Hz, J = 8.6 Hz, J = 5.7 Hz, H2'a dA II), 2.94-2.78 (m, 6H, H2'a dA I, H2'b dA I, 2 CH₂ Fpmp), 2.76-2.68 (m, 5H, H2'b dA II, 2 CH₂ H2 Lev), 2.57-2.51 (m, 4H, 2CH₂ H3 Lev), 2.37 (ddd, 1H, J = 14.2 Hz, J = 5.8 Hz, J = 2.1 Hz, H2'a dT I), 2.34 (ddd, 1H, J = 14.2 Hz, J = 5.6 Hz, J = 1.8 Hz, H2'a dT II), 2.30-2.16 (m, 3H, H2'b dT I, CH₂ Fpmp), 2.17 (s, 3H, H5 Lev), 2.14 (s, 3H, H5 Lev), 2.14-2.04 (m, 2H, CH₂ Fpmp), 1.99 (ddd, 1H, J = 14.2 Hz, J = 8.7 Hz, J = 6.9 Hz, H2'b dT II), 1.94 (d, 3H, J = 1.1 Hz, H7 Thy), 1.94-1.60 (m, 8H, Fpmp), 1.83 (d, 3H, J = 1.2 Hz, H7 Thy), 1.05 (s, 1H, CH₃ *t*-Bu, TBDPS), 1.03 (s, 1H, CH₃ *t*-Bu, TBDPS)

^{13}C -NMR: δ [ppm] (100 MHz, CDCl_3)= 206.92 (C4 Lev), 176.20, 176.06 (C1 lev, COBz), 161.06 (C4 Thy), 157.32, 146.95, 140.17, 135.52, 135.40, 134.89, 133.68, 132.59, 131.89, 130.01, 128.82, 128.00, 127.91, 127.86, 127.83, 116.26, 108.99, 103.84, 97.26, 93.00, 89.36, 87.53, 85.96, 82.52, 79.30, 77.21, 74.07, 71.24, 61.01, 60.38, 56.76, 53.24, 51.41, 43.82, 41.57 (C2 Lev), 37.77, 35.81, 35.15, 33.15, 29.68 (C5 Lev), 27.82 (C3 Lev), 26.93 (CH_3 *t*-Bu TBDPS), 23.90, 20.56, 19.23 (C_{quart} TBDPS), 15.47, 12.48 (C7 Thy)

^{31}P -NMR: δ [ppm] (202 MHz, CDCl_3)= 21.48, 20.72

^{19}F -NMR: δ [ppm] (470 MHz, CDCl_3)= -123.29, -123.33

UV: λ_{max} [nm] (MeCN)= 255 (1), 273(0.8)

Das andere Diastereomerenpaar wurde analog zur Prozedur für das S_{P} Diastereomerenpaar synthetisiert. 1.72 g (1.76 mmol) (5'-O-TBDPS-dA^{Bz})-(3'-O-Lev-dT)-H-Phosphonatdiester **12R_P**, 700 mg (4.6 mmol) 2-Nitrobenzaldehyd **13**, 30 mL Dichlormethan, 3 Tropfen Triethylamin, 50 μl TFA and 1.00 g (4.83 mmol) Fpmp-Enolether **15**.

Ausbeute: 1.5 g (1.12 mmol, 65 %) eines gelblichen Schaums.

DC: R_{f} ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 10 % v/v)= 0.76

MS: $\text{ESI}^+(\text{m/z} + \text{Na}^+)$ = 1360.457 (calc. $\text{C}_{67}\text{H}_{73}\text{FN}_9\text{O}_{16}\text{PSiNa}$ 1360.4564)

^1H -NMR: δ [ppm] (500 MHz, CDCl_3)= 8.96 (bs, NH), 8.93 (bs, NH), 8.73 (s, 1H, H2 Ade), 8.70 (s, 1H, H2 Ade), 8.21 (s, 1H, H8 Ade), 8.16 (s, 1H, H8 Ade), 8.06-6.90 (m, 2 x 23H, TBDPS, Benzoyl, 2-Nitrobenzyl, Fpmp, H6 Thy), 6.45 (dd, 1H, J = 9.1 Hz, J = 5.0 Hz, H1' dA I), 6.45 (d, 1H, J = 19.2 Hz, Benzyl-H), 6.44 (d, 1H, J = 18.5 Hz, Benzyl-H), 6.33 (dd, 1H, J = 8.7 Hz, J = 5.3 Hz, H1' dA II), 6.19 (dd, 1H, J = 8.4 Hz, J = 5.6 Hz, H1' dT I), 6.18 (dd, 1H, J = 8.8 Hz, J = 5.4 Hz, H1' dT II), 5.41-5.38 (m, 1H, H3' dA I), 5.33-5.30 (m, 1H, H3' dA II), 5.20 (ddd, 1H, J = 6.8 Hz, J = 2.7 Hz, J = 2.6 Hz, H3' dT I), 5.09 (ddd, 1H, J = 6.9 Hz, J = 2.1 Hz, J = 2.0 Hz, H3' dT II), 4.47-4.37 (m, 2H, H5'a+b dT I), 4.36-4.33 (m, 1H, H4' dA), 4.32-4.24 (m, 2H, H5'a+b dT II), 4.21-4.16 (m, 2H, H4' dA II, H4' dT I), 4.10-4.07 (m, 1H, H4'dT), 3.95 (dd, 1H, J = 11.3 Hz,

$J= 3.7$ Hz, H5'a dA I), 3.92 (dd, 1H, $J= 10.8$ Hz, $J= 3.4$ Hz, H5'a dA II), 3.84 (dd, 1H, $J= 11.6$ Hz, $J= 3.6$ Hz, H5'b dA II), 3.79 (dd, 1H, $J=$ Hz, $J=$ Hz, H5'b dA I), 3.40-3.27 (m, 2H, CH_2 Fpmp), 3.25+3.22 (2s, 6H, 2 OCH_3 Fpmp), 3.14-3.03 (m, 2H, CH_2 Fpmp), 2.99-2.90 (m, 3H, 2'a dA I, CH_2 Fpmp), 2.88-2.77 (m, 4H, H2'a dA II, H2'b dA I, CH_2 Fpmp), 2.76-2.70 (m, 5H, H2'b dA II, 2 CH_2 , H2 Lev), 2.58-2.54 (m, 4H, 2 CH_2 , H3 Lev), 2.42 (ddd, 1H, $J= 14.1$ Hz, $J= 5.8$ Hz, $J= 2.3$ Hz, H2'a dT), 2.36 (ddd, 1H, $J= 14.1$ Hz, $J= 5.6$ Hz, $J= 1.6$ Hz, H2'a dT), 2.30-2.22 (m, 2H, CH_2 Fpmp), 2.21-2.17 (m, 2H, H2'b dT I+II), 2.17 (s, 3H, H5 Lev), 2.16 (s, 3H, H5 Lev), 2.15-2.12 (m, 2H, CH_2 Fpmp), 2.04-1.56 (m, 6H, Fpmp), 1.91 (d, 3H, $J= 1.1$ Hz, H7 Thy), 1.77 (d, 3H, $J= 1$ Hz, H7 Thy), 1.06 (s, 9H, CH_3 *t*-Bu, TBDPS), 1.055 (s, 9H, CH_3 *t*-Bu, TBDPS)

^{13}C -NMR: δ [ppm] (100 MHz, $CDCl_3$)= 201.95 (C4 Lev), 171.05 (C1 Lev. CO Benzoyl), 160.87 (C4 dT), 149.80, 135.62, 135.54, 135.50, 135.40, 130.01, 129.56, 129.16, 128.10, 127.98, 127.90, 127.65, 127.23, 125.44, 124.54, 124.50, 123.45, 123.18, 122.78, 121.52, 121.16, 120.92, 120.83, 119.74, 119.32, 119.00, 116.96, 116.43, 116.26, 112.26, 107.36, 104.54, 104.52, 100.88, 92.10, 88.91, 86.25, 85.33, 82.08, 77.20, 77.10, 75.48, 73.35, 70.30, 65.45, 61.91, 52.67, 50.78, 50.76, 50.50, 44.56, 41.66, 40.76, 40.34, 40.24, 37.77, 27.71, 29.69 (C5 Lev), 26.93 (C3 Lev), 26.77.26.74 (CH_3 *t*-Bu. TBDPS), 20.10, 19.99, 19.91, 19.83, 19.22 (C_{quart} TBDPS), 16.61, 16.43, 13.34 (C7 Thy)

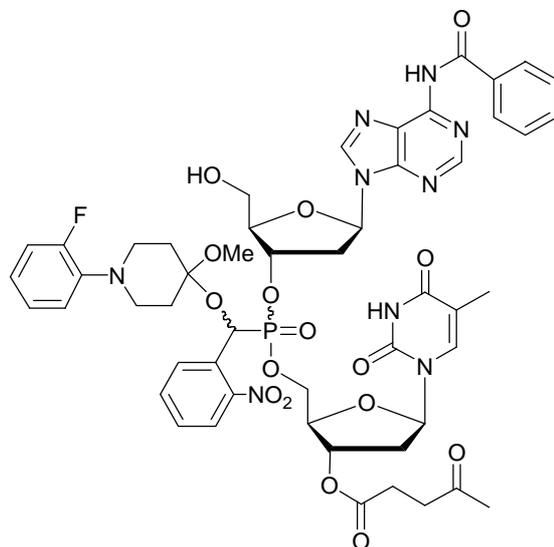
^{31}P -NMR: δ [ppm] (202 MHz, $CDCl_3$)= 20.63, 20.44

^{19}F -NMR: δ [ppm] (470 MHz, $CDCl_3$)= -123.07, -123.14

IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (KBr)= 3192, 3070, 2957, 2929, 2890, 2854, 1735, 1706, 1701, 1696, 1690, 1686, 1655, 1648, 1609, 1578, 1527, 1501, 1490, 1465, 1457, 1452, 1427, 1406, 1389, 1351, 1254, 1230, 1205, 1178, 1156, 1119, 1083, 1030, 951, 930, 888, 873, 794, 751, 704, 688, 668

UV: λ_{max} [nm] (MeCN)= 253(1), 273(0.55)

6.4.10 Synthese von {[1-(2-Fluorphenyl)-4-methoxypiperidin-4-yloxy]-(2-nitrophenyl)-methyl}-phosphonsäure-[(N⁶-benzoyl-2'-desoxyadenos-3'-yl)-(3'-O-levulinylthymid-5'-yl)]-diester **30**



800 mg (0.60 mmol) (NO₂BnFpmpO)-Phosphonsäure-(5'-O-TBDPS-dA^{Bz})-(3'-O-Lev-dT)-diester **28S_p** wurden in 4 mL THF und 4 mL Dichlormethan in einem Kunststoffröhrchen gelöst, 7 mL Triethylamin und 835 mg (1.1 mL, 5.18 mmol) Triethylamin Trihydrofluorid hinzugegeben. Nach 6 h Rühren bei Raumtemperatur wurde mit 50 mL Dichlormethan verdünnt und zweimal mit 5 % NaHCO₃-Lsg. gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan und einem Methanolgradienten (0-6 %, v/v) gereinigt

Ausbeute: 600 mg (0.55 mmol, 91 %) eines gelblichen Schaums.

DC: R_f (CH₂Cl₂/MeOH 10 % v/v) = 0.34, 0.31

MS: ESI⁺(m/z + Na⁺) = 1122.339 (calc. C₅₁H₅₅FN₉O₁₆PNa 1122.3393)

¹H-NMR: δ[ppm] (500 MHz, CDCl₃) = 9.09 (bs, 2H, NH), 8.78 (s, 1H, NH), 8.77 (s, 1H, NH), 8.54 (s, 1H, H2 Ade), 8.44 (s, 1H, H2 Ade), 8.17 (s, 1H, H8 Ade), 8.13 (s, 1H, H8 Ade), 8.08-7.98 (m, 8H, Ar.), 7.74-7.52 (m, 10H, Ar.), 7.25 (d, 1H, ⁴J_{H,H} = 1.2 Hz, H6 Thy), 7.13 (d, 1H, ⁴J_{H,H} = 1.2 Hz, H6 Thy), 7.06-6.89 (m, 8H, Ar.), 6.55 (d, 1H, ²J_{H,P} = 19.1 Hz, 7), 6.48 (d, 1H, ²J_{H,P} = 19.1 Hz, 7), 6.32 (dd, 1H, ³J_{H,H} = 9.3 Hz, ³J_{H,H} = 5.5 Hz, H1' dA), 6.29 (dd, 1H, ³J_{H,H} = 9.4 Hz,

$^3J_{\text{H,H}} = 5.5$ Hz, H1' dA), 6.23 (dd, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 8.5$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 5.8$ Hz, H1' dT), 6.16 (dd, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 8.1$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 6.1$ Hz, H1' dT), 5.83-5.80 (m, 1H, 5'OH), 5.63-5.60 (m, 1H, 5'OH), 5.39-5.34 (m, 2H, H3' dA), 5.23 (ddd, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.9$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 2.4$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 2.2$ Hz, H3' dT), 4.42-4.41 (m, 1H, H4' dA I), 4.41-4.37 (m, 2H, H5'a+b dT), 4.36-4.31 (m, 1H, H5'a dT), 4.30-4.26 (m, 1H, H5'b dT), 4.18 (ddd, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 4.1$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 4.1$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 3.5$ Hz, H4' dT), 4.14 (ddd, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 3.9$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 3.5$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 3.3$ Hz, H4' dT), 4.11-4.09 (m, 1H, H4' dA II), 3.94-3.90 (m, 2H, H5'a dA I), 3.88-3.83 (m, 2H, H5'b dA I, H5'a dA II), 3.74-3.69 (m, 1H, H5'b dA II), 3.39-3.30 (m, 2H, CH₂ Fpmp), 3.25 (2s, 6H, OCH₃ Fpmp), 3.14-3.07 (m, 4H, H2'a dA, CH₂ Fpmp), 2.89-2.82 (m, 4H, CH₂ Fpmp), 2.81-2.77 (m, 4H, H2 Lev), 2.66-2.57 (m, 5H, H2'b dA I, H3 Lev), 2.49-2.40 (m, 3H, H2'b dA II, H2'a dT), 2.35-2.22 (m, 4H, H2'b dT, CH₂ Fpmp), 2.20 (2s, 6H, H5 Lev), 2.14-2.01 (m, 2H, CH₂ Fpmp), 1.93 (d, 3H, $^4J_{\text{H,H}} = 1.0$ Hz, H7 Thy), 1.87 (d, 3H, $^4J_{\text{H,H}} = 1.0$ Hz, H7 Thy), 1.84-1.74 (m, 2H, CH₂ Fpmp), 1.70-1.60 (m, 9H, Fpmp)

^{31}P -NMR: δ [ppm] (202 MHz, CDCl₃) = 20.35, 20.15

^{19}F -NMR: δ [ppm] (470 MHz, CDCl₃) = -123.36, -123.37

UV: λ_{max} [nm](MeCN) = 254(1), 273(1)

Das andere Diastereomerenpaar wurde analog zur Prozedur für das S_{P} Diastereomerenpaar synthetisiert. 1.45 g (1.08 mmol) (NO₂BnFpmpO)-Phosphonsäure-(5'-O-TBDPS-dA^{Bz})-(3'-O-Lev-dT)-diester **28R_P**, 8 mL THF, 8 mL Dichlormethan, 14 mL Triethylamin, 1.60 g (2 mL, 10 mmol) Triethylamin Trihydrofluorid.

Ausbeute: 1.08 g (0.98 mmol, 91 %) eines gelblichen Schaums.

DC: R_{f} (CH₂Cl₂/MeOH 10 % v/v) = 0.35

MS: ESI⁺(m/z + Na⁺) = 1122.342 (calc. C₅₁H₅₅FN₉O₁₆PNa 1122.3393)

^1H -NMR: δ [ppm] (500 MHz, CDCl₃) = 9.22 (s, 1H, NH), 9.21 (s, 1H, NH), 8.94 (s, 1H, NH), 8.92 (s, 1H, NH), 8.75 (s, 1H, H2 Ade), 8.74 (s, 1H, H2 Ade), 8.17 (s, 1H, H8 Ade), 8.12 (s, 1H, H8 Ade), 8.05-7.51 (m, 18H, Bz), 7.47 (d, 1H, $^4J_{\text{H,H}} = 1.3$ Hz, H6 Thy), 7.38 (d, 1H, $^4J_{\text{H,H}} = 1.3$ Hz, H6 Thy), 7.05-6.90 (m,

8H, Fmpm), 6.47 (d, 1H, $^2J_{H,P}$ = 17.7 Hz, H7), 6.44 (d, 1H, $^2J_{H,P}$ = 18.1 Hz, H7), 6.28 (dd, 1H, $^3J_{H,H}$ = 9.5 Hz, $^3J_{H,H}$ = 5.4 Hz, H1' dA), 6.25 (dd, 1H, $^3J_{H,H}$ = 9.1 Hz, $^3J_{H,H}$ = 5.2 Hz, H1' dA), 6.22 (dd, 1H, $^3J_{H,H}$ = 8.7 Hz, $^3J_{H,H}$ = 5.6 Hz, H1' dT), 6.20 (dd, 1H, $^3J_{H,H}$ = 9.8 Hz, $^3J_{H,H}$ = 5.3 Hz, H1' dT), 5.68 (d, 1H, $^3J_{H,H}$ = 10.5 Hz, 5'OH dA), 5.61 (d, 1H, $^3J_{H,H}$ = 10.6 Hz, 5'OH dA), 5.34-5.30 (m, 2H, H3' dA), 5.14-5.09 (m, 2H, H3' dT), 4.42-4.38 (m, 2H, H5'a dT), 4.37-4.35 (m, 1H, H4' dA) = 4.31 (dd, 1H, $^2J_{H,H}$ = 11.1 Hz, $^3J_{H,H}$ = 3.0 Hz, H5'b dT), 4.30 (dd, 1H, $^2J_{H,H}$ = 11.2 Hz, $^3J_{H,H}$ = 3.8 Hz, H5'b dT), 4.18 (ddd, 1H, $^3J_{H,H}$ = 7.0 Hz, $^3J_{H,H}$ = 2.9 Hz, $^3J_{H,H}$ = 2.8 Hz, H4' dT), 4.13-4.10 (m, 2H, H4' dA, H4' dT), 3.91-3.85 (m, 2H, H5'a dA), 3.80-3.74 (m, 1H, H5'b dA), 3.65-3.60 (m, 1H, H5'b dA), 3.39-3.31 (m, 2H, CH₂ Fmpm), 3.27 (s, 3H, OCH₃ Fmpm), 3.25 (s, 3H, OCH₃ Fmpm), 3.13-2.97 (m, 4H, H2'a+b dA), 2.92-2.81 (m, 4H, CH₂ Fmpm), 2.80-2.76 (m, 4H, H2 Lev), 2.60-2.54 (m, 6H, H3 Lev, CH₂ Fmpm), 2.43-2.25 (m, 6H, CH₂ Fmpm), 2.19 (s, 2H, H5 Lev), 2.18 (s, 3H, H5 Lev), 2.16-2.05 (m, 4H, H2' dT), 1.94 (d, 3H, $^4J_{H,H}$ = 1.2 Hz, H7 Thy), 1.92-1.86 (m, 2H, CH₂ Fmpm) 1.85 (d, 3H, $^2J_{H,H}$ = 1.2 Hz, H7 Thy)

¹³C-NMR: δ [ppm] (100 MHz, CDCl₃) = 208.13 (C4 Lev), 179.47, 174.55 (C1 Lev + CO Bz), 168.22, 159.70, 152.00, 150.34, 149.72, 135.87 (C6 Thy), 129.14, 128.78, 128.09: 125.00, 124.52 (Fmpm), 123.18 (Fmpm), 121.78, 119.69 (Fmpm), 116.41 (Fmpm), 112.83, 111.83, 111.81, 111.49, 105.36, 104.56, 104.41, 87.60 (C1' dA, C4' dA), 85.83 (C1' dT), 84.64, 83.60 (C4' dT), 79.11 (C3' dA), 77.20, 75.25 (C3' dT), 67.98 (C5' dT), 64.55 (C5' dA), 59.72, 59.36, 56.84, 55.61, 53.41, 50.77 (OCH₃ Fmpm), 50.74 (OCH₃ Fmpm), 50.36, 41.67, 37.77 (C2 Lev), 31.41, 29.75+29.71 (C5 Lev), 27.89+27.83 (C3 Lev), 12.27 (C7 Thy)

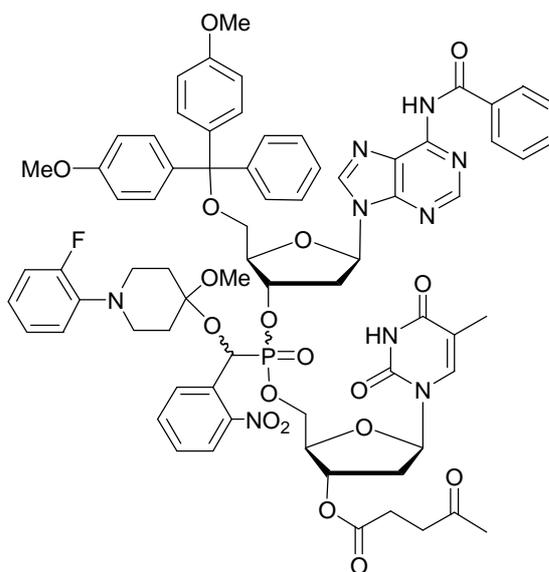
³¹P-NMR: δ [ppm] (202 MHz, CDCl₃) = 20.91, 20.57

¹⁹F-NMR: δ [ppm] (470 MHz, CDCl₃) = -123.39, -123.40

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (KBr) = 3427, 3067, 2962, 1704, 1698, 1610, 1582, 1527, 1501, 1455, 1422, 1406, 1352, 1251, 1231, 1207, 1179, 1157, 1102, 1085, 1073, 1057, 1030, 1006, 951, 930, 889, 809, 796, 754, 729, 709, 644, 611, 560, 553, 527, 514, 501, 490, 480

UV: $\lambda_{\max}[\text{nm}](\text{MeCN}) = 251 (1), 273 (1)$

6.4.11 Synthese von {[1-(2-Fluorphenyl)-4-methoxypiperidin-4-yloxy]-(2-nitrophenyl)-methyl}-phosphonsäure-[(N⁶-benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyadenos-3'-yl)-(3'-O-levulinylthymid-5'-yl)]-diester **1**



Die Reaktion wurde mit wasserfreien Lösungsmitteln und in einer Inertgasatmosphäre unter Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt. 563 mg (0.51 mmol) (NO₂BnFpmpO)-Phosphonsäure-(5'-OH-dA^{Bz})-(3'-O-Lev-dT)-diester **30S_P** wurden in 8 mL Pyridin gelöst und 677 mg (2.0 mmol) DMTTrCl, 20 mg (0.16 mmol) DMAP und 360 µl Triethylamin hinzugegeben. Nach 16 h Rühren bei Raumtemperatur wurde mit 50 mL Dichlormethan verdünnt und mit 5 % NaHCO₃ -Lsg. gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan und einem Methanolgradienten (0-4 %, v/v) gereinigt.

Ausbeute: 703 mg (0.50 mmol, 98 %) eines gelblichen Schaums.

DC: $R_f(\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH } 10 \% \text{ v/v}) = 0.64$

MS: $\text{ESI}^+(\text{m/z} + \text{Na}^+) = 1424.47$ (calc. C₇₂H₇₃FN₉O₁₈PNa 1424.4693)

¹H-NMR: $\delta[\text{ppm}]$ (500 MHz, CDCl₃) = 8.99 (bs, 2H, NH), 8.73 (s, 1H, NH), 8.69 (s, 1H, NH), 8.24 (2s, 2H, H2 Ade), 8.16 (s, 1H, H8 Ade), 8.10 (s, 1H, H8 Ade), 8.06-7.18 (m, 38H, Ar. H), 7.15 (d, 1H, ⁴J_{H,H} = 1.3 Hz, H6 Thy), 7.05 (d, 1H, ⁴J_{H,H} = 1.3 Hz, H6 Ade), 7.03-6.77 (m, 16H, Ar. H), 6.55 (d, 1H, ²J_{H,P} = 19.4 Hz, αH),

6.47 (d, 1H, $^2J_{\text{H,P}} = 19.6$ Hz, αH), 6.47 (dd, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 8.0$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 5.3$ Hz, H1' dA I), 6.40 (dd, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 8.4$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 5.8$ Hz, H1' dA II), 6.15 (dd, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 8.6$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 5.6$ Hz, H1' dT I), 6.14 (dd, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.8$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 5.9$ Hz, H1' dT II), 5.47-5.44 (m, 1H, H3' dA I), 5.42-5.39 (m, 1H, H3' dA II), 5.18–5.15 (m, 1H, H3' dT II), 5.06-5.04 (m, H3' dT I), 4.41 (ddd, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 4.5$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 4.5$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 1.5$ Hz, H4' dA I), 4.35 (ddd, $^3J_{\text{H,H}} = 11.05$ Hz, $^3J_{\text{P,H}} = 7.1$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 4.5$ Hz, H5'a dT II), 4.28-4.22 (m, 3H, H5' dT), 4.13-4.09 (m, 2H, H4' dT), 4.05 (ddd, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 2.1$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 2.1$, $^3J_{\text{H,H}} = 5.2$ Hz, H4' dA II), 3.80-3.78 (m, 2H, H5' dA), 3.77 (bs, 12H, OCH_3 DMTr), 3.38-3.30 (m, 4H, Fpmp, H5' dA), 3.24 (s, 3H, OCH_3 Fpmp), 3.23 (s, 3H, OCH_3 Fpmp), 3.17-3.03 (m, 4H, Fpmp, H2'a dA I), 2.89-2.79 (m, 5H, H2'a dA II, Fpmp), 2.76-2.70 (m, 5H, H2 Lev, Fpmp), 2.56-2.51 (m, 4H, H3 Lev), 2.37-2.31 (m, 2H, H2'b dA I+II), 2.29-2.18 (m, 3H, H2' dT, Fpmp), 2.16 (s, 3H, H5 Lev), 2.15 (s, 3H, H5 Lev), 2.12-2.08 (m, 2H, H2' dT), 2.02-1.94 (m, 2H, Fpmp), 1.93 (d, 3H, $^4J_{\text{H,H}} = 1.2$ Hz, H7 Thy), 1.81 (d, 3H, $^4J_{\text{H,H}} = 1.2$ Hz, H7 Thy)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (100 MHz, CDCl_3) = 157.64, 157.56, 157.47, 155.53, 154.49, 146.51, 146.32, 139.27, 138.97, 138.46, 138.43, 138.31, 138.28, 129.07, 128.20, 128.12, 127.88, 128.86, 126.83, 126.75, 126.06, 123.85, 123.56, 123.05, 115.35, 112.69, 112.17, 112.02, 111.92, 103.60, 103.58, 80.43, 78.61, 78.22, 77.85, 76.88, 74.75, 67.09, 61.19, 54.24, 49.83, 40.63, 36.82, 28.76, 28.69, 26.87, 24.88

$^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, CDCl_3) = 21.25, 20.67

$^{19}\text{F-NMR}$: δ [ppm] (470 MHz, CDCl_3) = -123.30, -123.34

UV: λ_{max} [nm](MeCN) = 235(1), 273 (0.7)

Das andere Diastereomerenpaar wurde analog zur Prozedur für das S_{P} Diastereomerenpaar synthetisiert. 1.00 g (0.91 mmol) ($\text{NO}_2\text{BnFpmpO}$)-Phosphonsäure-(5'-OH-dA^{Bz})-(3'-O-Lev-dT)-diester **30R_P**, 15 mL Pyridin, 1.10 g (3.2 mmol) DMTrCl, 40 mg (0.32 mmol) DMAP and 800 μL Triethylamin.

Ausbeute: 1.15 g (0.82 mmol, 90 %) eines gelblichen Schaums.

DC: R_f (CH₂Cl₂/MeOH 10 % v/v) = 0.67

MS: ESI⁺(m/z + Na⁺) = 1426.45 (calc. C₇₂H₇₃FN₉O₁₈PNa 1424.4693)

¹H-NMR: δ [ppm] (500 MHz, CDCl₃) = 9.11 (s, 2H, NH), 9.03 (s, 1H, NH), 8.98 (s, 1H, NH), 8.70 (s, 2H, H2 Ade), 8.09 (s, 2H, H8, Ade), 8.05-7.90 (m, 10H, Bz), 7.70-6.75 (m, 64H, arom. H), 6.42 (d, 2H, ²J_{H,P} = 19.2 Hz), 6.36 (dd, 2H, ³J_{H,H} = 8.8 Hz, ³J_{H,H} = 5.4 Hz, H1' dA), 6.19 (dd, 2H, ³J_{H,H} = 8.2 Hz, ³J_{H,H} = 5.68 Hz, H1' dT), 5.48-5.38 (m, 1H, H3' dA), 5.31-5.28 (m, 1H, H3' dA), 5.21 (ddd, 2H, ³J_{H,H} = 6.6 Hz, ³J_{H,H} = 2.5 Hz, ³J_{H,H} = 2.5 Hz, H3' dT), 4.46-4.36 (m, 4H, H5'a+b dT), 4.30-4.29 (m, 2H, H4' dA), 4.21-4.19 (m, 2H, H4' dT), 4.12-4.04 (m, 2H, H5'a dA), 3.78 (s, 12H, OCH₃ DMTr), 3.41-3.32 (m, 9H, H5' dA, Fpmp), 3.23 (s, 6H, OCH₃ Fpmp), 3.13-3.05 (m, 4H, Fpmp), 3.00 (ddd, 2H, ³J_{H,H} = 14.18 Hz, ³J_{H,H} = 8.7 Hz, ³J_{H,H} = 5.2 Hz, H2' dA), 2.90-2.81 (m, 8H, Fpmp), 2.79-2.71 (m, 8H, H2 Lev, Fpmp), 2.61-2.51 (m, 6H, H2'b dA, H3 Lev), 2.42 (ddd, 2H, ³J_{H,H} = 14.0 Hz, ³J_{H,H} = 5.7 Hz, ³J_{H,H} = 2.2 Hz, H2'a dT), 2.36-2.30 (m, 2H, H2'b dT), 2.25-2.19 (m, 5H, H3 Lev, Fpmp), 2.16 (s, 6H, H5 Lev), 2.12-2.05 (m, 4H, Fpmp), 1.74 (d, 6H, ⁴J_{H,H} = 1.0 Hz, H7 Thy)¹³C-NMR: δ [ppm] (100 MHz, CDCl₃) = 200.31 (C4 Lev), 161.39, 158.03, 157.43, 157.31, 146.72, 143.48, 143.28, 138.85, 128.62, 127.24, 127.15, 126.47, 123.96, 112.56, 106.19, 54.94, 50.30, 50.26, 50.21, 40.96, 29.12 (C5 Lev), 29.09, 23.08, 8.53,

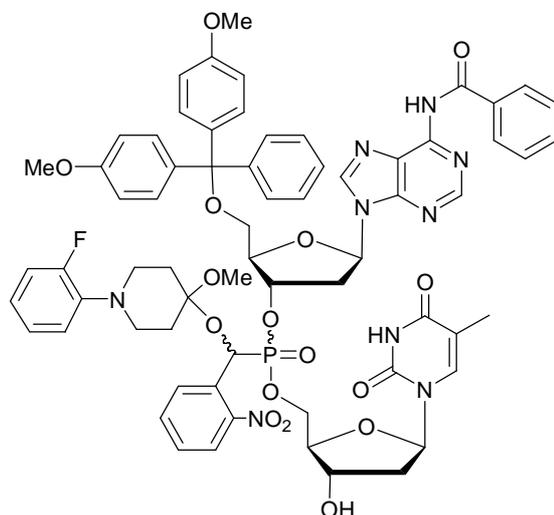
³¹P-NMR: δ [ppm] (202 MHz, CDCl₃) = 20.89, 20.55

¹⁹F-NMR: δ [ppm] (470 MHz, CDCl₃) = -123.26, -123.40

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (KBr) = 3063, 2952, 2835, 1737, 1711, 1693, 1633, 1608, 1580, 1557, 1527, 1505, 1454, 1417, 1351, 1294, 1250, 1177, 1156, 1116, 1083, 1073, 1031, 949, 929, 890, 863, 829, 810, 791, 754, 727, 705, 667, 644, 596, 582, 553, 505, 501, 496, 490, 480

UV: λ_{\max} [nm](MeCN) = 235(1), 273(0.7)

6.4.12 Synthese von {[1-(2-Fluorphenyl)-4-methoxypiperidin-4-yloxy]-(2-nitrophenyl)-methyl}-phosphonsäure-[(N⁶-benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyadenos-3'-yl)-(thymid-5'-yl)]-diester **2**



667 mg (0.48 mmol) (NO₂BnFpmpO)-Phosphonsäure-(5'-O-DMTr-dA^{Bz})-(3'-O-Lev-dT)-diester **1Sp** wurden in 15 mL Pyridin gelöst und eine gekühlte Mischung aus 15 mL Pyridin, 10 mL Essigsäure, 2.4 mL Hydrazinnhydrat und 5 mL Wasser wurden hinzugegeben. Nach 10 Min. starkem Rühren wurde mit 200 mL Ethylacetat verdünnt mit 200 mL Wasser und 5 % NaHCO₃-Lsg. gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan und einem Methanolgradienten (0-6 %, v/v) gereinigt.

Ausbeute: 620 mg (0.475 mmol, 99 %) eines gelblichen Schaums.

DC: R_f (CH₂Cl₂/MeOH 10 % v/v) = 0.60

MS: ESI⁺(m/z + Na⁺) = 1326.43 (calc. C₆₇H₆₇FN₉O₁₆PNa 1326.432)

¹H-NMR: δ[ppm] (500 MHz, DMSO-*d*₆) = 11.3 (s, 2H, NH), 11.18 (s, 1H, NH), 11.17 (s, 1H, NH), 8.58, 8.56, 8.52 (3s, 4H, H2 + H8 dA), 8.09-7.90 (m, 8H, NO₂-Benzyl), 7.83-7.52 (m, 10H, Bz), 7.35 (d, 1H, ⁴J_{H,H} = 1.1 Hz, H6 Thy I), 7.32-7.13 (m, 23H, H6 Thy II, DMTr), 7.08-6.76 (m, 20H, DMTr, Fpmp), 6.48 (dd, 1H, ³J_{H,H} = 7.0 Hz, ³J_{H,H} = 6.9 Hz, H1' dA I), 6.41 (dd, 1H, ³J_{H,H} = 6.9 Hz, ³J_{H,H} = 6.9 Hz, H1' dA), 6.31 (d, 1H, ²J_{H,P} = 18.9 Hz, αH I), 6.24 (d, 1H, ²J_{H,P} = 19.0 Hz, αH II), 6.13 (dd, 1H, ³J_{H,H} = 6.8 Hz, ³J_{H,H} = 6.7 Hz, H1' dT I), 6.08 (dd, 1H, ³J_{H,H} = 7.9 Hz, ³J_{H,H} = 6.2 Hz, H1' dT II), 5.45-5.36 (m, 2H, H3' dA),

5.42 (d, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 4.5$ Hz, 3'OH), 5.36 (d, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 4.3$ Hz, 3'OH), 5.24-5.20 (m, 1H, H3' dA), 4.29-4.15 (m, 6H, H5'a+b dT, H4' dA), 4.09-4.00 (m, 3H, H4' dT, H4' dA), 3.87 (ddd, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.4$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 3.7$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 3.7$ Hz, H5'a dA), 3.77 (ddd, 1H, $^3J_{\text{H,H}} = 3.6$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 2.9$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 2.9$ Hz, H5'b dA), 3.73-3.69 (m, 4H), 3.69, 3.68 (2s, 12H, OCH₃ DMTr), 3.36-3.29 (m, CH₂ Fpmp), 3.28-3.16 (m, 9H, H5'a+b dA, CH₂ Fpmp), 3.14 (s, 3H, OCH₃ Fpmp), 3.10 (s, 3H, OCH₃ Fpmp), 3.01-2.93 (m, 2H, H2'a dA), 2.80-2.68 (m, 5H, H2'b dA, CH₂ Fpmp), 2.58-2.53 (m, 1H, CH₂ Fpmp), 2.27-2.05 (m, 6H, H2'a+b dT I+II, CH₂ Fpmp), 2.00-1.95 (m, 2H, H2'a dT II), 1.82-1.76 (m, 1H, H2'b dT II), 1.75 (d, 3H, $^4J_{\text{H,H}} = 0.7$ Hz, H7 Thy), 1.70 (d, 3H, $^4J_{\text{H,H}} = 0.7$ Hz, H7 Thy), 1.68-1.60 (m, 2H, CH₂ Fpmp), 1.50-1.44 (m, 2H, CH₂ Fpmp)

¹³C-NMR: δ [ppm] (100 MHz, DMSO-*d*₆) = 172.65 (CO Bz), 165.74, 163.81, 158.19, 154.10, 151.59, 150.61, 150.52, 150.46, 144.79, 144.74, 143.66, 139.72, 135.52, 133.50, 132.61, 129.78, 129.75, 129.68, 128.64, 128.61, 127.85, 127.78, 126.79, 126.21, 126.18, 124.86, 119.70, 116.09, 113.21, 112.92, 109.93, 109.90, 101.42, 85.86, 85.81, 85.78, 84.55, 84.10, 83.92, 70.10, 65.48, 64.56, 63.39, 58.94, 55.15, 55.11, 55.06, 48.84, 47.59, 46.04, 41.13, 38.82, 38.66, 34.84, 34.52, 34.29, 33.54, 33.43, 32.57, 32.37, 30.73, 26.32, 25.91, 22.36, 18.87, 18.20, 18.13, 12.38, 12.27 (C7 Thy)

³¹P-NMR: δ [ppm] (202 MHz, DMSO-*d*₆) = 20.10, 20.01, (202 MHz, CDCl₃) = 21.55, 21.29

¹⁹F-NMR: δ [ppm] (470 MHz, DMSO-*d*₆) = -123.18, -123.22, (470 MHz, CDCl₃) = -123.33, -123.34

UV: λ_{max} [nm](MeCN) = 236 (1), 273(0.7)

Das andere Diastereomerenpaar wurde analog zur Prozedur für das *S_P* Diastereomerenpaar synthetisiert. 1.12 g (0.80 mmol) (NO₂BnFpmpO)-Phosphonsäure-(5'-O-DMTr-dA^{Bz})-(3'-O-Lev-dT)-diester **1R_P**, 25 mL Pyridin und eine Mischung aus 25 mL Pyridin, 17 mL Essigsäure, 4 mL Hydrazinhydrat und 9 mL Wasser.

Ausbeute: 1.04 g (0.797 mmol, 99 %) eines gelblichen Schaums.

DC: R_f (CH₂Cl₂/MeOH 10 % v/v) = 0.60, 0.67

MS: ESI⁺-MS(m/z + Na⁺) = 1326.47 (calc. C₆₇H₆₇FN₉O₁₆PNa 1326.432)

³¹P-NMR: δ [ppm] (202 MHz, CDCl₃) = 21.26, 20.78

¹⁹F-NMR: δ [ppm] (470 MHz, CDCl₃) = -123.28, -123.30

UV: λ_{\max} [nm](MeCN) = 236(1), 273 (0.7)

Die Diastereomere αC_{fast} , αC_{slow} konnten säulenchromatographisch an Kieselgel für die Analytik getrennt werden.

$R_p\alpha C_{fast}$

DC: R_f (CH₂Cl₂/MeOH 10 % v/v) = 0.67

¹H-NMR: δ [ppm] (500 MHz, DMSO-*d*₆) = 11.3 (s, 1H, NH), 11.14 (s, 1H, NH), 8.51 (s, 1H, H2 Ade), 8.48 (s, 1H, H8 Ade), 8.09-7.93 (m, 4H, Ar.), 7.75-7.52 (5H, Bz), 7.44 (d, 1H, ⁴J_{H,H} = 0.7 Hz, H6 Thy), 7.34-6.90 (m, 16 H, DMTr, Fpmp), 6.81-6.77 (m, 5H), 6.37 (dd, 1H, ³J_{H,H} = 7.0 Hz, ³J_{H,H} = 7.0 Hz, H1' dA), 6.25 (d, 1H, ²J_{H,P} = 18.9 Hz, α H), 6.10 (dd, 1H, ³J_{H,H} = 7.0 Hz, ³J_{H,H} = 6.6 Hz, H1' dT), 5.17-5.14 (m, 1H, H3' dA), 4.29-4.19 (m, 3H, H5'a dT, H4' dT), 4.17-4.15 (m, 1H, H4' dT), 3.91 (dd, 1H, ³J_{H,H} = 3.5 Hz, ³J_{H,H} = 3.5 Hz, ³J_{H,H} = 3.2 Hz, H4' dA), 3.71 (s, 3H, OCH₃ DMTr), 3.70 (s, 3H, OCH₃ DMTr), 3.25-3.10 (m, 5H, H2'a dA, Fpmp), 3.00-2.96 (m, 1H, Fpmp), 2.84-2.19 (m, 1H, Fpmp), 2.75-2.70 (m, 1H, Fpmp), 2.55-2.50 (m, 1H, H2'b dA), 2.13-1.96 (m, 4H, H2' dT, Fpmp), 1.61 (s, 3H, H7 Thy), 1.53-1.47 (m, 1H, Fpmp)

¹³C-NMR: δ [ppm] (100 MHz, DMSO-*d*₆) = 171.38 (CO Benzoyl), 165.73, 163.77, 158.20, 151.91, 151.54, 150.45, 144.77, 139.81, 135.56, 135.41, 129.78, 128.64, 128.61, 127.85, 127.76, 126.81, 125.14, 124.87, 119.72, 113.24, 112.93, 109.86, 85.79 (C_{quart} DMTr), 84.30, 83.96, 70.00, 63.60, 57.76, 55.13, 55.11, 48.83, 44.99, 41.13, 38.99, 36.84, 34.45, 29.44, 27.82, 26.27, 22.78, 20.30, 12.09 (C7 dT)

³¹P-NMR: δ [ppm] (202 MHz, DMSO-*d*₆) = 20.40

¹⁹F-NMR: δ [ppm] (470 MHz, DMSO-*d*₆) = -123.19

$R_p\alpha C_{slow}$

DC: R_f (CH₂Cl₂/MeOH 10 % v/v) = 0.60

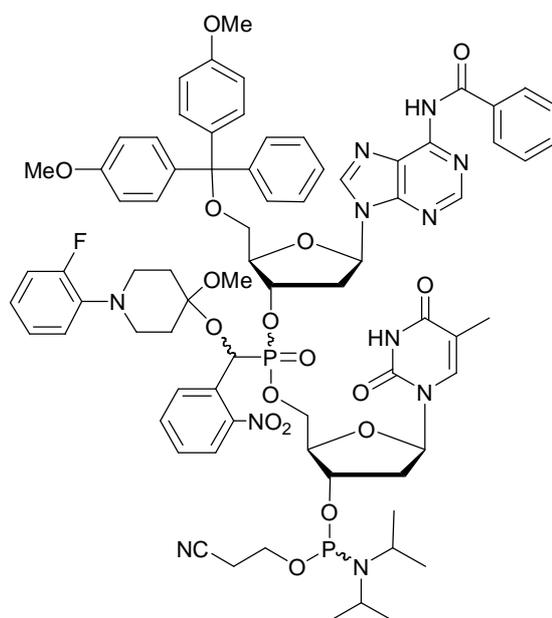
¹H-NMR: δ [ppm] (500 MHz, CDCl₃) = 11.22 (s, 1H, NH), 11.16 (s, 1H, NH), 8.55 (s, 1H, H2 Ade), 8.53 (s, 1H, H8 Ade), 8.07 (d, 1H, ³J_{H,H} = 7.92 Hz, Ar. H), 8.03 (dd, 2H, ³J_{H,H} = 8.30 Hz, ⁴J_{H,H} = 0.97 Hz, Ar. H), 7.65-7.52 (m, 4H, Ar. H), 7.45 (d, 1H, ⁴J_{H,H} = 1.0 Hz, H6 Thy), 7.30 (dd, 2H, ³J_{H,H} = 8.0 Hz, ⁴J_{H,H} = 1.6 Hz, H2 Bz), 7.20-6.75 (m, 18H, Ar. H), 6.45 (dd, 1H, ³J_{H,H} = 7.07, ³J_{H,H} = 7.1, H1' dA), 6.22 (d, 1H, ²J_{H,H} = 19.1, α H), 6.08 (dd, ³J_{H,H} = 7.0 Hz, ³J_{H,H} = 7.0 Hz, H1' dT), 5.33 (d, 1H, ³J_{H,H} = 4.1 Hz, 3'OH), 5.28-5.25 (m, 1H, H3' dA), 4.45 (ddd, 1H, ³J_{H,H} = 6.2 Hz, ³J_{H,H} = 3.5 Hz, ³J_{H,H} = 2.5 Hz, H5' dT), 4.13-4.03 (m, 3H, H5' dT, H4' dT), 3.75 (ddd, 1H, ³J_{H,H} = 6.22 Hz, ³J_{H,H} = 3.3 Hz, ³J_{H,H} = 2.0 Hz, H4' dA), 3.68 (2s, 6H, OCH₃ DMTr), 3.27 (ddd, ²J_{H,H} = 13.3 Hz, ³J_{H,H} = 7.0 Hz, ³J_{H,H} = 6.5 Hz, H2'a dA), 3.21-3.13 (m, 3H, Fpmp), 3.08 (s, 3H, OCH₃ Fpmp), 2.94-2.90 (m, 1H, Fpmp) 2.77-2.69 (m, 2H, Fpmp) 2.63 (ddd, 1H, ²J_{H,H} = 13.9 Hz, ³J_{H,H} = 6.3 Hz, ³J_{H,H} = 2.1 Hz, H2'b dA), 2.01-1.99 (m, 3H, CH₂ Fpmp, H2'a dT), 1.91-1.86 (m, 1H, H2'b dT), 1.7 (d, 3H, ⁴J_{H,H} = 0.7 Hz, H7 Thy), 1.62-1.57 (m, 1H, Fpmp), 1.45-1.40 (m, 1H, Fpmp)

¹³C-NMR: δ [ppm] (100 MHz, CDCl₃) = 163.73, 158.21, 158.19, 154.12, 150.60, 150.45, 144.79, 139.76, 139.70, 135.90, 135.60, 135.43, 132.21, 129.76, 128.65, 128.61, 127.82, 127.73, 124.88, 119.71, 116.13, 113.20, 112.92, 109.87, 101.64, 95.13, 86.42, 85.70, 85.42, 84.51, 84.37, 84.06, 83.31, 81.92, 79.96, 78.64, 70.70, 69.90, 69.09, 67.76, 62.66, 61.45, 60.72, 60.06, 57.56, 55.11, 55.09, 55.06, 53.13, 50.65, 48.79 (OCH₃ Fpmp), 47.59, 41.13, 41.10, 38.90, 36.85 (C2 Lev), 32.60, 32.49, 28.92 (C5 Lev), 27.93 (C3 Lev), 27.17, 24.87, 21.35, 12.03 (C7 Thy)

³¹P-NMR: δ [ppm] (202 MHz, CDCl₃) = 19.50

¹⁹F-NMR: δ [ppm] (470 MHz, CDCl₃) = -123.15

6.4.13 Synthese von {[1-(2-fluorphenyl)-4-methoxypiperidin-4-yloxy]-(2-nitrophenyl)-methyl}-phosphonsäure-[(*N*⁶-Benzoyl-5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyadenos-3'-yl)-(3'-*O*-(2-cyanoethylphosphor-(di-*iso*-propyl)-amidit)-thymid-5'-yl)]-diester **3**



200 mg (0.15 mmol) (NO₂BnFpmpO)-Phosphonsäure-(5'-*O*-DMTr-dA^{Bz})-(3'-OH-dT)-diester **2Sp** wurden mit Acetonitril kdestilliert, in 2 mL Dichlormethan gelöst und 1 mL 2.5 M DCI-Lsg. in Acetonitril hinzugegeben. Nach Zugabe von 75 mg (0.25 mmol) 2-Cyanoethylphosphor-bis(di-*iso*-propylamidit) wurden 30 Min. bei Raumtemperatur gerührt, die Reaktion durch Zugabe von 20 mL Dichlormethan verdünnt und mit 2×5 % NaHCO₃-und gesättigter NaCl-Lsg. gewaschen. Nach Trocknen über Na₂SO₄ wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand an Aluminiumoxid (Akt. 4) mit Dichlormethan (+0.1 % Triethylamin) und einem Acetonitrilgradienten 0-10 % gereinigt.

Ausbeute: 159mg (0.11 mmol, 73 %) eines farblosen Feststoffes

DC: R_f (CH₂Cl₂/MeCN 1:1 v/v)= 0.5

MS: ESI⁺(*m/z* + Na⁺)= 1526.54 (calc. C₇₆H₈₄FN₁₁NaO₁₇P₂ 1526.5404)

³¹P-NMR: δ[ppm] (202 MHz, C₆D₆)= 150.81 (2P), 150.06 (1P), 150.01 (1P) (P (OCE)NiPr₂), 21.20, 21.12, 21.05, 21.03 (Phosphonat)

¹⁹F-NMR: δ[ppm] (470 MHz, C₆D₆)= -122.97, -123.01, -123.03, -123.06

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (KBr)= 3192, 3065, 3035, 2966, 2933, 2836, 1693, 1609, 1581, 1528, 1505, 1455, 1395, 1350, 1250, 1201, 1179, 1156, 1119, 1082, 1031, 977, 929, 891, 830, 809, 791, 754, 726, 707, 582, 561

UV: λ_{\max} [nm](MeCN)= 235(1), 275(0.7)

Das andere Diastereomerenpaar wurde analog zur Prozedur für das *S_P* Diastereomerenpaar synthetisiert. 200 mg (0.15 mmol) (NO₂BnFpmpO)-Phosphonsäure-(5'-O-DMTr-dA^{Bz})-(3'-OH-dT)-diester **2R_P**, 2 mL Dichlormethan, 75 mg (0.25 mmol) 2-Cyanoethylphosphor-bis(di-*iso*-propylamidit), 1 mL 2.5 M DCI-Lsg. in Acetonitril.

Ausbeute: 183mg (0.122 mmol, 81 %) eines farblosen Feststoffes

DC: R_f (CH₂Cl₂/MeCN 1:1 v/v)= 0.5

MS: ESI⁺(m/z + Na⁺)= 1526.538 (calc. C₇₆H₈₄FN₁₁NaO₁₇P₂ 1526.5404)

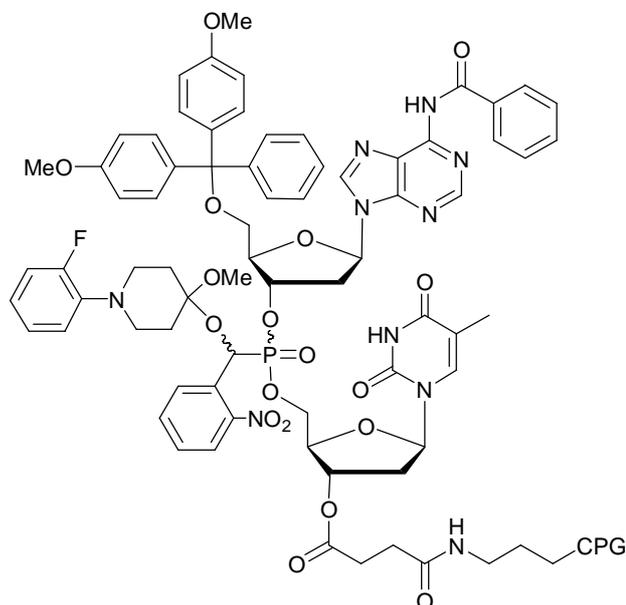
³¹P-NMR: δ [ppm] (202 MHz, C₆D₆)= 151.17, 150.75, 150.21, 149.95 (P(OCE)NiPr₂), 21.18, 20.94, 19.80, 19.71 (Phosphonat)

¹⁹F-NMR: δ [ppm] (470 MHz, C₆D₆)= -122.93 (2F), -123.01 (1F), -123.04 (1F)

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (KBr)= 3197, 3067, 3034, 2966, 2933, 2836, 1693, 1609, 1581, 1528, 1507, 1455, 1396, 1350, 1250, 1202, 1179, 1156, 1122, 1083, 1032, 977, 929, 890, 829, 809, 791, 754, 726, 707, 684, 582, 560

UV: λ_{\max} [nm](MeCN)= 235 (1), 275(0.7)

6.4.14 Synthese von {[1-(2-Fluorphenyl)-4-methoxypiperidin-4-yloxy]-(2-nitrophenyl)-methyl}-phosphonsäure-[(N⁶-benzoyl-5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-2'-desoxyadenos-3'-yl)-((3'-O-succinamidopropyl-CPG)-thymid-5'-yl)]-diester **4**



100 mg (0.77 mmol) (NO₂BnFpmpO)-Phosphonsäure-(5'-O-DMTr-dA^{Bz})-(3'-OH-dT)-diester **2**, 20 mg (0.2 mmol) Bernsteinsäureanhydrid und 18 mg (0.15 mmol) DMAP wurden in 2 mL Pyridin gelöst und 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und die Reaktion durch Zugabe von Wasser abgebrochen, in 20 mL Dichlormethan aufgenommen und mit 1 %iger wässriger Zitronensäure und Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde in 3 mL Dichlormethan aufgenommen und in 25 mL eiskaltes n-Hexan gegeben. Der farblose Niederschlag wurde filtriert und am Vakuum getrocknet. Das Produkt wurde direkt weiter umgesetzt.

Zwischenprodukt: (NO₂BnFpmpO)-Phosphonsäure-(5'-O-DMTr-dA^{Bz})-(3'-O-succ-dT)-diester **31**

MS: ESI (m/z + Na⁺) = 1426.449 (calc. C₇₁H₇₁FN₉O₁₉PNa 1426.4486)

RP: Ausbeute: 95 mg (0.068 mmol, 88 %)

SP: Ausbeute: 84 mg (0.060 mmol, 81 %)

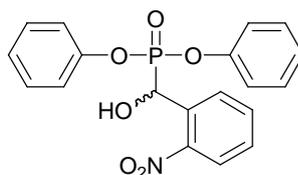
50 mg (35.6 μmol) (NO₂BnFpmpO)-Phosphonsäure-(5'-O-DMTr-dA^{Bz})-(3'-O-succ-dT)-diester **31** wurden zwei mal mit Acetonitril koevaporiert und in 1 mL DMF gelöst. 15 mg (46 μmol) TBTU, 125 mg 550 Å Aminopropyl-CPG wurden hinzugegeben und es wurde für 4 h sachte gerührt. Der CPG-Träger wurde filtriert und mit je 1 mL Methanol, Dichlormethan und Acetonitril gewaschen. Der Träger wurde am Vakuum getrocknet und je 1 mL CAP A und CAP B hinzugegeben. Nach einer halben Stunde Rühren wurde filtriert, mit je 1 mL Methanol, Dichlormethan und Acetonitril gewaschen und am Vakuum getrocknet. Die Trägerbelegung wurde nach Kapitel 6.7.2 bestimmt:

R_P Belegung= 15 $\mu\text{mol/g}$

S_P Belegung= 26 $\mu\text{mol/g}$

6.5 *o*-Hydroxybenzylphosphonat-Precursor

6.5.1 Synthese von [Hydroxy-(2-nitrophenyl)-methyl]-phosphonsäurediphenylester **6a**



Die Reaktion wurde mit wasserfreien Lösungsmitteln und in einer Inertgasatmosphäre unter Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt. 3.00 g (19.9 mmol) 2-Nitrobenzaldehyd **13** wurden mit Toluol kodestilliert, in 50 mL Toluol gelöst und 226 mg (1.98 mmol) Trifluoressigsäure hinzugegeben. Es wurden 9.29 g (39.7 mmol) Diphenylphosphit **33a** und nach einstündigem Rühren bei Raumtemperatur erneut 2.00 g (8.55 mmol) Diphenylphosphit **33a** zur Vervollständigung der Reaktion hinzugegeben. Nach weiteren 30 Min. Rühren bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand aus Petrolether/Ethylacetat (2:1) umkristallisiert.

Ausbeute: 5.97 g (15.5 mmol, 78 %) eines farblosen Feststoffes.

DC: R_f (PE/EE 1:2 v/v)= 0.38

MS: FAB ($m/z + H^+$)= 386.0824 (C₁₉H₁₆NO₆P 386.0793)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃)= 8.01-7.99 (m, 2H, H₃+H₆), 7.62-7.59 (m, 1H, H₄), 7.44-7.41 (m, 1H, H₅), 7.22-7.14 (m, 4H, Ph-Ar.), 7.09-7.00 (m, 4H, Ph-

Ar.), 6.95-6.93 (m, 2H, Ph-Ar.), 6.49 (d, 1H, $J= 13.2$ Hz, H7), 4.85 (bs, 1H, C7-OH)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (100 MHz, CDCl_3)= 150.77 (d, $J_{\text{C,P}}= 9.7$ Hz, C2), 150.42 (d, $J_{\text{C,P}}= 10.9$ Hz, C1-Ph.), 148.01 (d, $J_{\text{C,P}}= 7.3$ Hz, C1-Ph), 134.06 (d, $J_{\text{C,P}}= 2.4$ Hz, C3), 132.25 (C1), 130.15 (Ph), 130.07 (Ph), 129.68 (d, $J_{\text{C,P}}= 4.8$ Hz, C5), 129.41 (d, $J_{\text{C,P}}= 2.4$ Hz, C4), 125.87 (Ph), 125.67 (Ph), 125.41 (d, $J_{\text{C,P}}= 2.4$ Hz, C6), 120.81 (d, $J_{\text{C,P}}= 3.6$ Hz, Ph), 120.66 (d, $J_{\text{C,P}}= 3.6$ Hz, Ph), 66.10 (d, $J_{\text{C,P}}= 162.3$ Hz, C7)

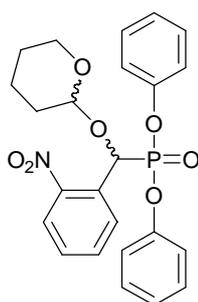
$^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, CDCl_3)= 13.82 (d, $J_{\text{PH}}= 13.4$ Hz)

IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (KBr)= 3241, 1607, 1589, 1526, 1489, 1455, 1420, 1341, 1308, 1260, 1242, 1207, 1187, 1158, 1081, 1068, 1055, 1040, 1024, 1009, 957, 946, 904, 862, 836, 799, 766, 750, 740, 709, 688, 626, 615, 593, 580, 571, 527, 518, 489, 476

UV: λ_{max} [nm](MeCN)= 260

T_m : 128.8

6.5.2 Synthese von [(2-Nitrophenyl)-(tetrahydropyran-2-yloxy)-methyl]-phosphonsäure-diphenylester **8a**



Die Reaktion wurde mit wasserfreien Lösungsmitteln und in einer Inertgasatmosphäre unter Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt. 1.00 g (2.60 mmol) [Hydroxy-(2-nitrophenyl)-methyl]-phosphonsäurediphenylester **6a** wurden in 50 mL Dichlormethan gelöst, 30 mg (0.26 mmol) Trifluoressigsäure und 863 mg (10.3 mmol) 3,4-Dihydro-2H-pyran hinzugegeben und für 15 h im Ultraschallbad zur Reaktion gebracht. Das

Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel mit Petrolether und einem Ethylacetatgradienten von 20-50 % gereinigt.

Ausbeute: 1.15 g (2.45 mmol, 94 %) eines gelblichen Öles.

DC: R_f (PE/EE 1:1) = 0.25

MS: ESI⁺ (m/z + Na⁺) = 492.1191 (C₂₄H₂₄NNaO₇P 492.1188)

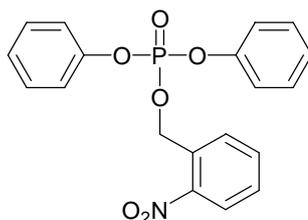
¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, C₆D₆) = 8.45-8.42 (m, 1H, H3), 8.25-8.22 (m, 1H, H3), 7.80-7.78 (m, 1H, H6), 7.76-7.74 (m, 1H, H6), 7.52-7.49 (2xm, 1H, H4), 7.46-7.42 (m, 3H, H5+Ph), 7.34-7.07 (m, 6H, Ph), 6.99-6.93 (m, 2H, Ph), 6.90-6.84 (m, 1H, H7), 5.37-5.36 (m, 1H, H2-THP), 4.79-4.76 (m, 1H, H2-THP), 4.28 (ddd, 0.5H, J = 11.1 Hz, J = 11.1 Hz, J = 2.9 Hz, H6-THP), 3.65-3.31 (m, 1.5H, H6-THP), 1.81-1.29 (m, 6H, CH₂-THP)

¹³C-NMR: δ [ppm] (100 MHz, C₆D₆) = 133.19 (d, $J_{C,P}$ = 2.0 Hz, C3), 130.90 (d, $J_{C,P}$ = 4.6 Hz, C5), 130.49 (d, $J_{C,P}$ = 4.6 Hz, C5), 129.43 (d, $J_{C,P}$ = 3.1 Hz, C4), 129.03 (d, $J_{C,P}$ = 3.1 Hz, C4), 125.47 (d, $J_{C,P}$ = 3.1 Hz, Ph), 125.47 (d, $J_{C,P}$ = 3.1 Hz, Ph), 125.37 (Ph), 125.34 (d, $J_{C,P}$ = 2.0 Hz, C6), 125.09 (d, $J_{C,P}$ = 2.0 Hz, C6), 121.18 (d, $J_{C,P}$ = 4.6 Hz, Ph), 121.04 (d, $J_{C,P}$ = 4.1 Hz, Ph), 120.94 (d, $J_{C,P}$ = 4.1 Hz, Ph), 101.37 (d, $J_{C,P}$ = 7.6 Hz, C2-THP), 96.72 (d, $J_{C,P}$ = 12.2 Hz, C2-THP), 70.82 (d, $J_{C,P}$ = 169.4 Hz, C7), 68.22 (d, $J_{C,P}$ = 177.0 Hz, C7), 62.79 (C6-THP), 61.94 (C6-THP), 30.50 (CH₂-THP), 25.57 (CH₂-THP), 25.48 (CH₂-THP), 19.46 (CH₂-THP), 18.81 (CH₂-THP)

³¹P-NMR: δ [ppm] (202 MHz, C₆D₆) = 12.07 (d, J = 17.3 Hz), 11.99 (d, J = 13.4 Hz)

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (KBr) = 2945, 2360, 2344, 1685, 1654, 1637, 1590, 1560, 1529, 1490, 1457, 1348, 1185, 1162, 1118, 1025, 940, 903, 763, 688

UV: λ_{max} [nm](MeCN) = 260



Wird die Reaktion ohne Ultraschallbedingungen durchgeführt und durch Zugabe von Triethylamin abgebrochen, so wird ausschließlich die Umlagerung zum Phosphattriester **34** beobachtet.

DC: R_f (PE/EE) = 0.37

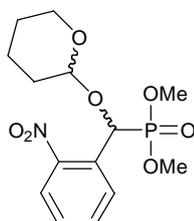
MS: ESI⁺ (m/z + Na⁺) = 408.061 (C₁₉H₁₆NNaO₆P 408.0613)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, C₆D₆) = 7.68-7.66 (m, 1H, H3), 7.45-7.43 (m, 1H, H6), 7.38-7.33 (m, 4H, Ph), 7.06-6.98 (m, 4H, Ph), 6.92-6.83 (m, 3H, H5, Ph), 6.70-6.66 (m, 1H, NO₂Ar), 5.62 (d, 2H, ³J_{H,P} = 7.7 Hz, α H).

¹³C-NMR: δ [ppm] (113 MHz, C₆D₆) = 134.68 (C3), 130.49 (C5), 130.13 (C4), 129.70 (C6), 129.45 (Ph), 126.08 (Ph), 125.36 (Ph), 120.27 (d, J_{C,P} = 4.6 Hz, Ph), 129.41 (d, J_{C,P} = 2.4 Hz, C4), 125.86 (d, Ph), 125.69 (Ph), 125.40 (d, J_{C,P} = 2.4 Hz, C3), 120.80 (d, J_{C,P} = 3.6 Hz, Ph), 115.58 (Ph), 67.20 (d, J_{C,P} = 4.6 Hz, C7).

³¹P-NMR: δ [ppm] (202 MHz, C₆D₆) = -10.84 (t, J_{P,H} = 7.7 Hz).

6.5.3 Synthese von [(2-Nitrophenyl)-(tetrahydropyran-2-yloxy)-methyl]-phosphonsäuredimethylester **8e**



Die Reaktion wurde mit wasserfreien Lösungsmitteln und in einer Inertgasatmosphäre unter Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt. 72 mg (0.153 mmol) [(2-Nitrophenyl)-(tetrahydropyran-2-yloxy)-methyl]-phosphonsäurediphenylester **8a** wurden in 6 mL Methanol gelöst und 89 mg (1.53 mmol) Kaliumfluorid und eine Spatelspitze [18]-Krone-6 hinzugegeben. Die Lösung wurde zum Sieden erhitzt und anschließend

unter Ultraschall für 18 h bei Raumtemperatur zur Reaktion gebracht. Das Rohprodukt wurde direkt säulenchromatographisch an Kieselgel mit Petrolether/Ethylacetat (1:2 v/v) gereinigt.

Ausbeute: 20 mg (58 μ mol, 38 %) eines farblosen Öls.

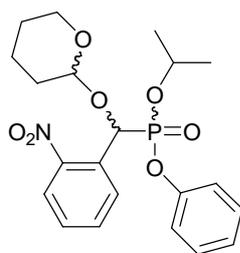
DC: R_f (PE/EE 1:2) = 0.15

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, C_6D_6) = 8.18 (m, 1H, H3), 7.99 (m, 1H, H3), 7.64 (m, 2H, H6), 7.13 (m, 2H, H4), 6.78 (m, 3H, H5), 6.76 (d, 1H, J = 18.6 Hz, H7), 6.66 (d, 1H, J = 14.5 Hz, H7), 5.27 (t, 1H, J = 3.1 Hz, H2-THP), 4.57 (t, 1H, J = 3.5 Hz, H2-THP) 3.59-3.39 (m, 12H, OMe), 3.28-3.21 (m, 1H, H6-THP), 1.90-1.20 (m, 12H, CH_2 -THP).

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (100 MHz, C_6D_6) = 132.96 (d, J = 2.5 Hz, C3), 132.93 (d, J = 3.1 Hz, C3), 131.58 (d, J = 2.0 Hz, C1), 130.35 (d, J = 4.6 Hz, C5), 130.05 (d, J = 4.1 Hz, C5), 128.95 (d, J = 3.1 Hz, C4), 125.10 (d, J = 2.0 Hz, C6), 124.88 (d, J = 2.0 Hz, C6), 100.65 (d, J = 5.6 Hz, C2-THP), 96.81 (d, J = 11.7 Hz, C2-THP), 70.08 (d, J = 165.3 Hz, C7), 67.89 (d, J = 170.4 Hz, C7), 62.67 (C6-THP), 61.96 (C6-THP), 53.66 (d, J = 6.6 Hz, OMe), 53.41 (d, J = 6.6 Hz, OMe), 53.39 (d, J = 7.1 Hz, OMe), 53.24 (d, J = 6.6 Hz, OMe), 30.67 (CH_2 -THP), 30.66 (CH_2 -THP) 25.72 (CH_2 -THP), 25.58 (CH_2 -THP), 19.56 (CH_2 -THP), 19.09 (CH_2 -THP)

$^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, C_6D_6) = 22.02, 21.87

6.5.4 Synthese von [(2-Nitrophenyl)-(tetrahydropyran-2-yloxy)-methyl]-phosphonsäure-*iso*-propylphenylester **38b**



Die Reaktion wurde mit wasserfreien Lösungsmitteln und in einer Inertgasatmosphäre unter Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt. 50 mg (0.106 mmol) [(2-Nitrophenyl)-

(tetrahydropyran-2-yloxy)-methyl]-phosphonsäurediphenylester **8a** wurden in 4 mL *iso*-Propanol gelöst und 61 mg (1.06 mmol) Kaliumfluorid und eine kleine Spatelspitze [18]-Krone-6 hinzugegeben. Die Lösung wurde zum Sieden erhitzt und anschließend unter Ultraschall für 18 h bei Raumtemperatur zur Reaktion gebracht. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit Petrolether/Ethylacetat (30 % v/v) gereinigt.

Ausbeute: 11 mg (25 μ mol, 16 %) eines farblosen Öls.

DC: R_f (PE/EE 1:2 v/v) = 0.38

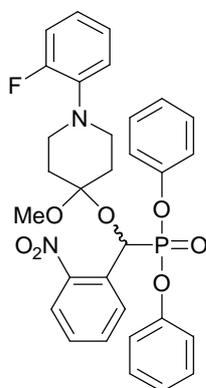
$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, C_6D_6) = 8.28-8.26 (m, 2H, H3), 8.08-8.04 (m, 2H, H3), 7.70-6.78 (m, 2H, H6), 7.66-7.64 (m, 2H, H6), 7.49-7.47 (m, 4H, Ar.), 7.43-7.40 (m, 4H, Ar.), 7.16-7.02 (m, 14H, Ar.), 6.99-6.88 (m, 6H, Ar.+H7), 6.96 (d, 1H, J = 18.8 Hz, H7), 6.95 (d, 1H, J = 15.5 Hz, H7), 6.86 (d, J = 14.8 Hz, H7), 6.82-6.75 (m, 5H, Ar.), 5.36 (dd, 1H, J = 3.1 Hz, J = 3.1 Hz, H2-THP), 5.22 (dd, 1H, J = 3.2 Hz, J = 3.2 Hz, H2-THP), 4.93-4.74 (m, 4H, CH-*i*Pr), 4.66-4.62 (m, 2H, H2-THP), 4.33-4.28 (m, 1H, H6-THP), 4.18-4.11 (m, 2H, H6-THP), 3.68-3.64 (m, 1H, H6-THP), 3.55-3.49 (m, 2H, H6-THP), 3.45-3.39 (m, 2H, H6-THP), 3.26-3.21 (m, 2H, H6-THP), 1.85-1.20 (m, 24H, CH_2 -THP), 1.07-0.92 (m, 24H, CH_3 -*i*Pr)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (100 MHz, C_6D_6) = 133.00 (d, J = 2.5 Hz, C3), 132.97 (d, J = 3.1 Hz, C3), 132.94 (d, J = 2.5 Hz, C3), 130.85 (d, J = 4.6 Hz, C5), 130.59 (d, J = 4.6 Hz, C5), 130.42 (d, J = 4.6 Hz, C5), 130.25 (d, J = 4.1 Hz, C4), 130.00 (d, J = 4.1 Hz, C4), 129.93 (d, J = 5.6 Hz, C4), 129.08 (d, J = 2.5 Hz, C), 128.69 (d, J = 3.1 Hz, C), 128.66 (d, J = 3.6 Hz, C), 125.24 (d, J = 2.0 Hz, C6), 125.09 (d, J = 1.5 Hz, C6), 125.03 (d, J = 2.0 Hz, C6), 124.88 (d, J = 2.0 Hz, C6), 121.29 (d, J = 4.1 Hz, C), 121.15 (d, J = 4.1 Hz, C), 121.11 (d, J = 3.6 Hz, C), 101.08 (d, J = 5.1 Hz, C2-THP), 101.01 (d, J = 4.6 Hz, C2-THP), 96.65 (d, J = 12.2 Hz, C2-THP), 73.41 (d, J = 7.1 Hz, CH-*i*Pr), 73.39 (d, J = 7.6 Hz, CH-*i*Pr), 73.25 (d, J = 5.6 Hz, CH-*i*Pr), 73.18 (d, J = 5.6 Hz, CH-*i*Pr), 70.70 (d, J = 168.9 Hz, C7), 70.66 (d, J = 168.9 Hz, C7), 68.27 (d, J = 175.0 Hz, C7), 62.72 (C6-THP), 62.67 (C6-THP), 61.98 (C6-THP), 61.87 (C6-THP), 30.63 (CH_2 -THP), 30.58 (CH_2 -

THP), 30.55 (CH₂-THP), 25.69 (CH₂-THP), 25.66 (CH₂-THP), 25.57 (CH₂-THP), 24.01, 23.99, 23.95, 23.90, 23.86, 23.83, 23.79, 23.74, 23.60, 23.56, 23.51 (8xCH₃-iPr), 19.56 (CH₂-THP), 19.49 (CH₂-THP), 18.96 (CH₂-THP), 18.88 (CH₂-THP)

³¹P-NMR: δ[ppm] (202 MHz, C₆D₆)= 15.85 (dd, *J*_{PH}= 14.4 Hz, *J*_{PH}= 6.7 Hz), 15.69 (dd, *J*_{PH}= 19.2 Hz, *J*_{PH}= 7.6 Hz), 14.91, 14.89

6.5.5 Synthese von {[1-(2-Fluorphenyl)-4-methoxypiperidin-4-yloxy]-(2-nitrophenyl)-methyl}-phosphonsäurediphenylester **7a**



Die Reaktion wurde mit wasserfreien Lösungsmitteln und in einer Inertgasatmosphäre unter Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt. 1.04 g (2.70 mmol) [Hydroxy-(2-nitrophenyl)-methyl]-phosphonigsäurediphenylester **6a** wurden in 50 mL Dichlormethan gelöst, 35 mg (0.31 mmol) Trifluoressigsäure und 888 mg (4.28 mmol) Fpmp-Enolether **15** hinzugegeben und für 15 h im Ultraschallbad zur Reaktion gebracht. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel mit Petrolether und einem Essigestergradienten (20 %-50 % v/v) gereinigt.

Ausbeute: 1.12 g (1.89 mmol, 70 %) eines blassgelben Öls.

DC: R_f (PE/EE 2:1 v/v) = 0.27

MS: ESI⁺ (m/z + Na⁺) = 615.1684 (calc. C₃₁H₃₀FN₂NaO₇P 615.1672)

¹H-NMR: δ[ppm] (400 MHz, C₆D₆)= 8.19-8.16 (m, 1H, Ar.), 7.68-7.66 (m, 1H, Ar.), 7.32-7.28 (m, 4H, Ar.), 7.08-6.69 (m, 13H, Ar. + αH + Fpmp-Ar.), 3.28-3.19 (m, 1H, H₂), 3.20 (s, 3H, OMe), 3.02-2.97 (m, 1H, H₂), 2.88-2.82 (m, 1H, H₂),

2.78-2.72 (m, 1H, H2), 2.19-2.16 (m, 2H, H3), 1.89-1.86 (m, 1H, H3), 1.77-1.74 (m, 1H, H3)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (113 MHz, C_6D_6)= 156.56 (d, $J=245.2$ Hz, NO_2Ar), 133.30 (NO_2Ar), 133.11 (d, $J_{\text{C,P}}= 3.6$ Hz, NO_2Ar), 131.23 (d, $J_{\text{C,P}}= 4.1$ Hz, NO_2Ar), 130.11+130.01 (s, Ph), 129.09 (d, $J_{\text{C,P}}= 3.6$ Hz, NO_2Ar), 125.55+125.38 (s, Ph), 125.13 (d, $J= 2.0$ Hz, NO_2Ar), 124.85 (d, $J=3.5$ Hz, Fpmp-Ar.), 122.80 (d, $J_{\text{C,P}}= 7.6$ Hz, Fpmp-Ar.), 121.10 (d, $J_{\text{C,P}}= 4.6$ Hz, Ph), 121.00 (d, $J_{\text{C,P}}= 4.6$ Hz, Ph), 120.14 (d, $J_{\text{C,P}}= 3.1$ Hz, Fpmp-Ar.), 116.51 (d, $J= 20.8$ Hz, Fpmp-Ar.), 102.89+102.78 (s, $\text{C}_{\text{quart}}\text{Ph}$), 65.09 (s, $J= 176.49$ Hz, αC), 49.42 (OMe), 48.46 (d, $J_{\text{C,P}}= 3.1$ Hz, C2), 48.26 (d, $J_{\text{C,P}}= 3.1$ Hz, C2), 35.77+33.41 (C3)

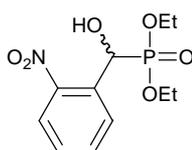
$^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, C_6D_6)= 12.36 (d, $J_{\text{P,H}}= 19.2$ Hz)

$^{19}\text{F-NMR}$: δ [ppm] (470 MHz, C_6D_6)= -122.97

IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (KBr)= 3069, 2964, 2848, 1609, 1590, 1528, 1500, 1490, 1466, 1456, 1349, 1286, 1273, 1230, 1209, 1185, 1161, 1135, 1085, 1035, 1008, 940, 892, 787, 754, 716, 688

UV: λ_{max} [nm](MeCN)= 247

6.5.6 Synthese von (Hydroxy-2-nitrophenyl-methyl)-phosphonsäurediethylester **6b**



Die Reaktion wurde mit wasserfreien Lösungsmitteln und in einer Inertgasatmosphäre unter Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt. 2.23 g (14.7 mmol) 2-Nitrobenzaldehyd **13** wurden mit Toluol kodestilliert, in 10 mL Dichlormethan aufgenommen. Der Lösung wurden 1.00 g (7.24 mmol) Diethylphosphit **33b** und 3 Tropfen Triethylamin hinzugefügt. Nach 19 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 Tropfen Essigsäure abgebrochen, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand aus Petrolether/Ethylacetat 1:1 umkristallisiert.

Ausbeute: 1.82 g (6.30 mmol, 87 %) eines farblosen Feststoffes

DC: R_f (PE/EE 1:1) = 0.09

MS: FAB ($m/z + H^+$) = 290.0812 (calc. $C_{11}H_{16}NO_6P$ 290.0793)

1H -NMR: δ [ppm] (400 MHz, $CDCl_3$) = 7.99-7.97 (m, 2H, H3+H6), 7.68-7.64 (m, 1H, H4), 7.47-7.42 (m, 1H, H5), 6.24 (d, 1H, α H), 4.15-4.02 (m, 4H, PCH_2), 1.26 (t, 3H, $^3J_{H,H}$ = 7.12 Hz, Me), 1.19 (t, 3H, $^3J_{H,H}$ = 7.12 Hz, Me)

^{13}C -NMR: δ [ppm] (113 MHz, $CDCl_3$) = 133.73 (d, J = 3.1 Hz, C3), 133.30 (d, J = 2.0 Hz, C1), 129.27 (d, J = 4.6 Hz, C4), 128.80 (d, J = 3.6 Hz, C5), 125.12 (d, J = 2.5 Hz, C6), 66.05 (d, J = 159.2 Hz, α C), 64.47 (d, J = 7.0 Hz, $POCH_2$), 63.76 (d, J = 7.0 Hz, $POCH_2$), 16.66 (d, J = 5.6 Hz, Me), 15.57 (d, J = 6.1 Hz, Me)

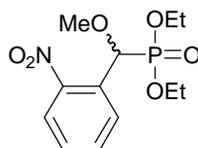
^{31}P -NMR: δ [ppm] (202 MHz, $CDCl_3$) = 21.31 (d quin, J_{PH} = 14.8 Hz, J_{PCH_2Et} = 7.4 Hz)

IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (KBr) = 3242, 2982, 2938, 2911, 2846, 1609, 1577, 1530, 1477, 1443, 1394, 1368, 1349, 1311, 1266, 1232, 1204, 1161, 1089, 1059, 1039, 1017, 966, 863, 843, 786, 739, 703, 667, 559, 519

UV: λ_{max} [nm](MeCN) = 262

T_m : 127.2

6.5.7 Synthese von (Methoxy-2-nitrophenyl-methyl)-phosphonsäurediethylester **57**



Die Reaktion wurde mit wasserfreien Lösungsmitteln und in einer Inertgasatmosphäre unter Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt. 200 mg (0.69 mmol) (Hydroxy-(2-nitrophenyl)-methyl)-phosphonsäurediethylester **6b** wurden mit DMF kdestilliert und in 1 mL DMF gelöst. Dazu wurden Dimethylsulfat gegeben und 20 mg (0.828 mmol) Natriumhydrid in 1 mL DMF bei der Temperatur T langsam hinzugesetzt. Nach Erwärmung auf Raumtemperatur wurde mit Dichlormethan verdünnt, mit Wasser und ges. NaCl gewaschen, über $NaSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit Petrolether/Ethylacetat (1:1 v/v) gereinigt.

Es wurde stets ein Produktgemisch aus (Methoxy-2-nitrophenyl-methyl)-phosphonsäurediethylester und dem Umlagerungsprodukt 2-Nitrobenzyl-diethylphosphat triester erhalten. Mit Variante C konnte die Ausbeute optimiert werden

A) T= 0 °C, 78 μ L (104.4 mg, 0.828 mmol) Dimethylsulfat
6b : **57** : **58** = 31.7 : 51.7 : 16.6

B) T= Rt., 1.2 äquiv. Dimethylsulfat, NaH in DMF über 30 Min. hinzutropfen

C) T= -40 °C, 4 äquiv. Dimethylsulfat, NaH in DMF über 30 Min. hinzutropfen
6b : **57** : **58** = 6.3 : 88.2 : 5.5

D) T= -50 °C, 4 äquiv. Dimethylsulfat, NaH in DMF über 30 Min. hinzutropfen

Ausbeute: (Variante C) 120 mg (0.39 mmol, 57 %) eines gelblichen Öles

DC: R_f (PE/EE 1:1 v/v) = 0.35

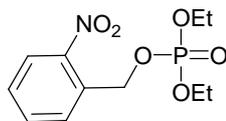
MS: ESI⁺ (m/z + Na⁺) = 326.078 (calc. C₁₂H₁₈NNaO₆P 326.0769)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃) = 7.96-7.94 (m, 1H, H3), 7.86-7.83 (m, 1H, H6), 7.66-7.63 (m, 1H, H5), 7.47-7.42 (m, 1H, H4), 5.70 (d, 1H, J_{HP} = 17.0 Hz, H7), 4.16-3.92 (m, 4H, CH₂-Et), 3.47 (s, 3H, OMe), 1.23 (t, 3H, J_{HH} = 7.0 Hz, CH₃-Et), 1.16 (t, 3H, J_{HH} = 7.0 Hz, CH₃-Et)

¹³C-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃) = 149.24 (d, J = 6.1 Hz, C2), 133.70 (d, J = 3.1 Hz, C3), 131.11 (d, J = 1.5 Hz, C1), 129.45 (d, J = 4.5 Hz, C5), 129.23 (d, J = 3.1 Hz, C6), 125.28 (d, J = 2.5 Hz, C3), 75.32 (d, J = 168.9 Hz, C7), 63.77 (d, J = 7.1 Hz, CH₂-Et), 63.53 (d, J = 6.6 Hz, CH₂-Et), 60.04 (d, J = 13.7 Hz, OMe), 16.71 (d, J = 6.1 Hz, CH₃-Et), 16.61 (d, J = 5.6 Hz, CH₃-Et)

³¹P-NMR: δ [ppm] (202 MHz, CDCl₃) = 18.45 (dtt, J = 16.9 Hz, J = 8.34 Hz, J = 8.34 Hz)

Umlagerungsprodukt 2-Nitrobenzyl-diethylphosphat triester **58**



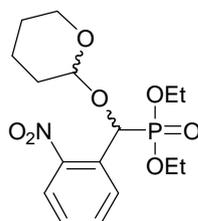
DC: R_f (PE/EE 1:1 v/v) = 0.4

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3)= 8.14-8.12 (m, 1H, H3), 7.82-7.78 (m, 1H, H6), 7.70-7.66 (m, 1H, H5), 7.51-7.47 (m, 1H, H4), 5.48 (d, 2H, $J_{\text{HP}} = 7.1$ Hz, H7), 4.15 (dq, 4H, $J = 7.12$, $J = 7.12$, $\text{CH}_2\text{-Et}$), 1.23 (t, 6H, $J_{\text{HH}} = 7.0$ Hz, $\text{CH}_3\text{-Et}$)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3)= 147.1 (C2), 134.48 (C3), 133.23 (d, $J = 8.4$ Hz, C1), 129.15 (C5), 128.81 (C4), 125.38 (C6), 66.05 (d, $J = 3.8$ Hz, C7), 64.63 (d, $J = 5.8$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Et}$), 16.55 (d, $J = 6.5$ Hz, $\text{CH}_3\text{-Et}$)

$^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, CDCl_3)= -0.8

6.5.8 Synthese von (2-Nitrophenyl-(tetrahydropyran-2-yloxy)-methyl)-phosphonsäurediethylester **8b**



Die Reaktion wurde mit wasserfreien Lösungsmitteln und in einer Inertgasatmosphäre unter Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt. 567 mg (1.96 mmol) (Hydroxy-2-nitrophenylmethyl)-phosphonsäurediethylester **6b** wurden in 8 mL THF gelöst, 517 mg (6.78 mmol) 3,4-Dihydro-2H-pyran **35** und 4 Tropfen Trifluoressigsäure hinzugefügt. Das Gemisch wurde für 16 h im Ultraschallbad bei Raumtemperatur zur Reaktion gebracht, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel mit Petrolether/Ethylacetat (1:2) gereinigt.

Ausbeute: 699 mg (1.87 mmol, 95 %) eines gelblichen Öls

DC: R_f (PE/EE 1:2 v/v)= 0.23

MS: ESI^+ ($m/z + \text{Na}^+$)= 396.1189 (calc. $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{NNaO}_7\text{P}$ 396.1188)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, C_6D_6)= 8.23-8.20 (m, 1H, H3Ar), 8.04-8.01 (m, 1.75H, H3Ar*), 7.68-7.64 (m, 2.75H, H6Ar+H6Ar*), 7.18-7.11 (m, 3H, Ar.), 6.83-6.77 (m, 2.5H, Ar.), 6.78 (d, 1.75H, $J = 18.8$ Hz, H7*), 6.70 (d, 1H, $J = 14.24$ Hz, H7), 5.34-5.33 (m, 1H, H1THP), 4.62-4.61 (m, 1.75H, H1THP*), 4.29-4.23 (m, 1.75H, THP*), 4.12 (dq, 3.5H, $J = 8.3$ Hz, $J = 7.1$ Hz, CH_2Et),

4.07-3.96 (m, 7.5H, CH₂Et), 3.56-3.51 (m, 1.75H, THP*), 3.46 (ddd, 1H, $J=11.4$ Hz, $J=8.8$ Hz, $J=3.0$ Hz, THP), 3.29-3.24 (m, 1H, THP), 1.92-1.25 (m, 20H, THP), 1.12 (t, 5.5H, $J=7.0$ Hz, CH₃*), 1.08 (t, 3H, $J=7.1$ Hz, CH₃), 1.06 (t, 5.5H, $J=7.1$ Hz, CH₃*), 1.05 (t, 3H, $J=7.1$ Hz, CH₃)

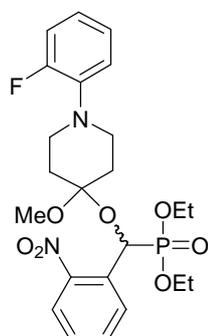
¹³C-NMR: δ [ppm] (100 MHz, C₆D₆)= 130.42 (d, $J_{C,P}=4.1$ Hz, C3-NO₂Ar.), 130.14 (d, $J_{C,P}=4.1$ Hz, C3-NO₂Ar.), 128.85 (d, $J_{C,P}=3.1$ Hz, C6-NO₂Ar.), 125.06 (d, $J_{C,P}=2.0$ Hz, C4-NO₂Ar.), 124.85 (d, $J_{C,P}=2.0$ Hz, C4-NO₂Ar.), 100.66 (d, $J_{C,P}=6.1$ Hz, C5-NO₂Ar.), 96.84 (C2-THP), 96.73 (C2-THP), 70.20 (d, $J_{C,P}=165.8$ Hz, C7), 68.09 (d, $J_{C,P}=171.4$ Hz, C7), 63.37 (d, $J_{C,P}=6.6$ Hz, CH₂-OEt), 63.26 (d, $J_{C,P}=6.6$ Hz, CH₂-OEt), 63.16 (d, $J_{C,P}=6.6$ Hz, CH₂-OEt), 63.10 (d, $J_{C,P}=6.6$ Hz, CH₂-OEt), 62.65 (C6-THP), 61.98 (C6-THP), 30.72 (THP), 25.76 (THP), 19.59 (THP), 19.15 (THP), 16.68 (CH₃), 16.63 (CH₃), 16.58 (CH₃), 16.53 (CH₃)

³¹P-NMR: δ [ppm] (202 MHz, C₆D₆)= 19.83 (d quin., $J=7.8$ Hz, $J=7.8$ Hz), 19.65 (d quin., $J=8.8$ Hz, $J=8.8$ Hz)

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (NaCl)= 2943, 2870, 1608, 1577, 1531, 1470, 1454, 1442, 1391, 1351, 1273, 1254, 1203, 1184, 1164, 1118, 1077, 1031, 959, 905, 864, 847, 816, 804, 788, 720, 677, 623, 556, 510, 482, 431

UV: λ_{\max} [nm](MeCN)= 261

6.5.9 Synthese von {[1-(2-Fluorphenyl)-4-methoxypiperidin-4-yloxy]-(2-nitrophenyl)-methyl}-phosphonsäurediethylester **7b**



Die Reaktion wurde mit wasserfreien Lösungsmitteln und in einer Inertgasatmosphäre unter Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt. 560 mg (1.93 mmol) (Hydroxy-2-nitrophenyl-

methyl)-diethylphosphonat **6b** wurden in 20 mL Dichlormethan gelöst, 360 mg (1.74 mmol) Fpmp-Enolether **15** und 40 mg (0.35 mmol) Trifluoressigsäure hinzugefügt. Das Gemisch wurde für 16 h im Ultraschallbad bei Raumtemperatur zur Reaktion gebracht, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel mit Petrolether/Ethylacetat (1:1 v/v) gereinigt.

Ausbeute: 623 mg (1.26 mmol, 72 %) eines gelblichen Öles

DC: R_f (PE/EE 1:2 v/v) = 0.3

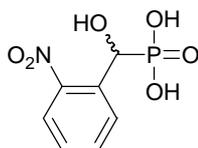
MS: ESI⁺ (m/z + Na⁺) = 519.1689 (calc. C₂₃H₃₀FN₂NaO₇P 519.1672)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, C₆D₆) = 8.08-8.07 (m, 1H, H3 NO₂Ar.), 7.78-7.66 (m, 1H, H6 NO₂Ar.), 7.12-7.09 (m, 1H, H4 NO₂Ar.), 7.00-6.96 (m, 1H, NO₂Ar.), 6.95-6.91 (m, 1H, F-Ar.), 6.87 (d, 1H, J_{HP} = 18.9 Hz, H7), 6.79-6.75 (m, 3H, F-Ar.), 4.05 (dq, 2H, J_{HP} = 8.3 Hz, J_{HH} = 6.9 Hz, CH₂-Et), 4.03 (dq, 2H, J_{HP} = 9.2 Hz, J_{HH} = 7.1 Hz, CH₂-Et), 2.91 (td, 1H, J_{HH} = 11.1 Hz, J_{HH} = 2.8 Hz, H2a-Fpmp), 2.83 (ddd, 1H, J_{HH} = 11.8 Hz, J_{HH} = 8.7 Hz, J_{HH} = 4.7 Hz, H2b-Fpmp), 1.10 (t, 3H, J_{HH} = 6.9 Hz, CH₃), 1.08 (t, 3H, J_{HH} = 6.9 Hz, CH₃)

¹³C-NMR: δ [ppm] (100 MHz, C₆D₆) = 156.58 (d, $J_{C,F}$ = 245.7 Hz, C2 F-Ar.), 132.66 (d, $J_{C,P}$ = 3.1 Hz, C NO₂Ar.), 130.96 (d, $J_{C,P}$ = 4.1 Hz, C NO₂Ar.), 128.44 (d, $J_{C,P}$ = 3.0 Hz, C NO₂Ar.), 124.85 (d, $J_{C,P}$ = 3.5 Hz, C NO₂Ar.), 124.83 (d, $J_{C,F}$ = 2.0 Hz, C F-Ar.), 122.74 (d, $J_{C,F}$ = 7.6 Hz, C F-Ar.), 120.11 (d, $J_{C,F}$ = 7.6 Hz, C F-Ar.), 116.50 (d, $J_{C,F}$ = 20.8 Hz, C F-Ar.), 102.17 (d, $J_{C,P}$ = 9.7 Hz, C4-Fpmp), 64.64 (d, $J_{C,P}$ = 170.9 Hz, C7), 63.31 (d, $J_{C,P}$ = 6.6 Hz, CH₂-Et), 62.97 (d, $J_{C,P}$ = 7.1 Hz, CH₂-Et), 49.24 (OMe), 48.53 (d, $J_{C,F}$ = 3.1 Hz, C2-Fpmp), 48.37 (d, $J_{C,F}$ = 3.6 Hz, C2-Fpmp), 35.79 (C3-Fpmp), 33.45 (C3-Fpmp), 16.68 (d, $J_{C,P}$ = 5.1 Hz, CH₃), 16.51 (d, $J_{C,P}$ = 5.6 Hz, CH₃)

³¹P-NMR: δ [ppm] (202 MHz, C₆D₆) = 20.01 (d quin., J_{PH} = 17.9 Hz, J_{PCH_2Et} = 8.9 Hz)

¹⁹F-NMR: δ [ppm] (470 MHz, C₆D₆) = -122.9

6.5.10 Synthese von Hydroxy-2-nitrophenylmethyl-phosphonsäure **6c**

Die Reaktion wurde mit wasserfreien Lösungsmitteln und in einer Inertgasatmosphäre unter Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt. 5.0 g (33.1 mmol) 2-Nitrobenzaldehyd **13** und 2.71 g (33.1 mmol) Phosphorige Säure **33c** wurden in 50 mL Dioxan gelöst und für 3 Tage unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 50 mL Diethylether hinzugegeben, die beginnende Kristallisation im Kühlschrank vervollständigt. Der Niederschlag wurde filtriert und mit Diethylether gewaschen

Ausbeute: 4.24 g (18.2 mmol, 55 %) eines farblosen Feststoffes

DC: $R_f(\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH } 30\% \text{ v/v}) = 0.2$

MS: FAB ($m/z + \text{H}^+$) = 234.0169 (calc. $\text{C}_7\text{H}_8\text{NO}_6\text{P}$ 234.0167)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, DMSO-d_6) = 7.73-7.71 (m, 2H, H3+H6), 7.59-7.53 (m, 1H, H5), 7.35-7.30 (m, 1H, H4), 5.59 (d, 1H, $J = 16.3$ Hz, H7)

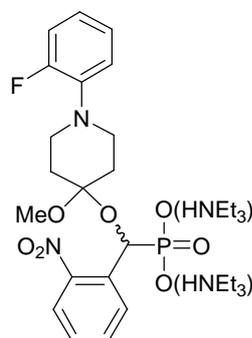
$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (100 MHz, DMSO-d_6) = 148.20 (d, $J = 5.5$ Hz, C2), 135.32 (C1), 133.11 (d, $J = 2.5$ Hz, C3), 129.45 (d, $J = 4.1$ Hz, C5), 128.14 (d, $J = 3.1$ Hz, C4), 124.39 (d, $J = 2.0$ Hz, C6), 64.98 (d, $J = 159.2$ Hz, C7)

$^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, DMSO-d_6) = 17.80 (d, $J = 15.5$ Hz)

IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (KBr) = 3331, 2730, 2284, 1522, 1349, 1256, 1218, 1178, 1169, 1140, 1103, 1086, 1077, 1053, 1037, 1023, 948, 857, 789, 723, 680, 545, 471

UV: λ_{max} [nm](MeCN) = 248

6.5.11 Synthese von {[1-(2-Fluorphenyl)-4-methoxypiperidin-4-yloxy]-(2-nitrophenyl)-methyl}-bis-(triethylammonium)-phosphonat **7c**



Die Reaktion wurde mit wasserfreien Lösungsmitteln und in einer Inertgasatmosphäre unter Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt. 200 mg (0.861 mmol) Hydroxy-2-nitrophenylmethyl-phosphonsäure **6c** wurden mit THF kdestilliert, in 5 mL THF gelöst und 267 mg (1.29 mmol) Fpmp-Enolether **15** hinzugegeben. Nach Zugabe von 6 μ l TFA (10 % n/n) wurde das Gemisch über Nacht im Ultraschallbad bei Raumtemperatur zur Reaktion gebracht und durch Zugabe von 100 μ l Triethylamin die Reaktion abgebrochen. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan (+ 1 % NEt₃) und einem Methanolgradienten (5-10 % v/v) gereinigt und die produkthaltigen Fraktionen mit Toluol kdestilliert.

Ausbeute: 106 mg (0.241 mmol, 28 %) eines gelblichen Feststoffes

MS: ESI⁺ (m/z + Na⁺) = 441.1229 (calc. C₁₉H₂₃FN₂O₇P 441.1227)

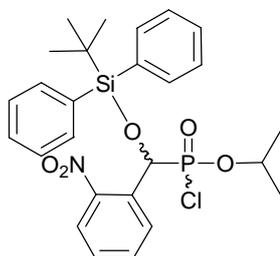
DC: R_f(CH₂Cl₂/MeOH 30 % v/v) = 0.5

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃) = 7.92-7.88 (m, 1H, H3), 7.72-7.70 (m, 1H, H6), 7.49-7.45 (m, 1H, NO₂-Ar.), 7.23-7.17 (m, 1H, NO₂-Ar.), 6.97-6.75 (m, 4H, Fpmp-Ar.), 5.99 (d, 1H, J = 16.8 Hz, H7), 3.19 (s, 3H, OMe), 2.93 (q, 6H, CH₂-NEt₃), 2.76-2.69 (m, 2H, CH₂-Fpmp), 2.17-2.10 (m, 1H, CH₂-Fpmp), 2.01-1.95 (m, 1H, CH₂-Fpmp), 1.71-1.66 (m, 1H, CH₂-Fpmp), 1.54-1.49 (m, 1H, CH₂-Fpmp), 1.21 (t, 9H, J = 7.1 Hz, CH₃-NEt₃),

³¹P-NMR: δ [ppm] (202 MHz, CDCl₃) = 16.45

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (KBr) = 3391, 2964, 2837, 1685, 1610, 1577, 1527, 1501, 1453, 1351, 1303, 1191, 1139, 1088, 920, 862, 841, 789, 755, 723, 697, 683, 562, 467

6.5.12 Synthese von (*tert*-Butyldiphenylsilyloxy-2-nitrophenylmethyl)-phosphonsäure-*iso*-propylester-chloridat **53**



240 mg (0.48 mmol) (NO₂BnTBDPSO)-phosphonigsäure-*iso*-propylester **52** wurden in 2 mL Toluol gelöst und mit 47 μ L (0.48 mmol) Tetrachlorkohlenstoff versetzt. Unter Rühren wurden 134 μ L (0.96 mmol) Triethylamin langsam hinzuge tropft. Die Reaktionslösung wurde für eine Stunde gerührt, eingengt und säulenchromatographisch an Kieselgel mit Petrolether und einem Ethylacetatgradienten (20 %-50 % v/v) gereinigt. Durch säulenchromatographische Reinigung konnten die beiden Diastereomere getrennt voneinander erhalten werden

Ausbeute: 150 mg (0.28 mmol, 59 %) eines farblosen Feststoffes

DC: $R_f(\text{PE/EE } 1:1 \text{ v/v}) = 0.5$

MS: ESI⁺ (m/z + Na⁺) = 554.1311 (calc. C₂₆H₃₁ClNNaO₅PSi 554.1295)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃) = 8.02-8.00 (m, 1H, H3), 7.83-7.81 (m, 1H, H6), 7.69-7.69 (m, 2H, Ar.), 7.57-7.54 (m, 1H, Ar.), 7.49-7.47 (m, 2H, Ar.), 7.42-7.28 (m, 5H, Ar.), 7.21-7.17 (m, 2H, Ar.), 6.43 (d, $J = 11.2$ Hz, H7), 4.80 (d sep., 1H, $J = 8.8$ Hz, $J = 6.2$ Hz, CH-*i*Pr), 1.16+1.15 (d, 2*3H, $J = 4.5$ Hz, CH₃-*i*Pr), 1.13 (s, 9H, *t*Bu)

¹³C-NMR: δ [ppm] (100 MHz, CDCl₃) = 136.45+136.15 (Ar. TBDPS), 133.48 (d, $J = 3.6$ Hz, C5), 132.43 (d, $J = 15.0$ Hz, C1), 131.74 (C1 TBDPS), 130.90 (d, $J = 5.1$ Hz, C6), 130.63+130.51 (Ar. TBDPS), 129.42 (d, $J = 4.1$ Hz, C4), 128.09+128.02 (Ar. TBDPS), 125.00 (d, $J = 2.5$ Hz, C3), 75.37 (d, $J = 9.2$ Hz, CH-*i*Pr), 71.57 (d, $J = 156.2$ Hz, C7), 27.29 (*t*Bu), 23.86+23.64 (d, $J = 5.1$ Hz, CH₃-*i*Pr), 19.95 (*t*Bu-quart)

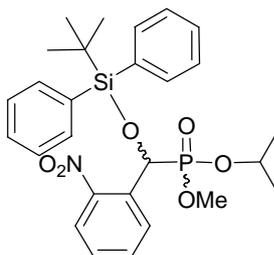
³¹P-NMR: δ [ppm] (202 MHz, CDCl₃) = 33.28 (dd, $J = 10.6$ Hz, $J = 9.6$ Hz)

UV: $\lambda_{\max}[\text{nm}](\text{MeCN}) = 263$

Diastereomer 2

^{31}P -NMR: $\delta[\text{ppm}]$ (202 MHz, CDCl_3) = 35.97 (dd, $J = 10.6$ Hz, $J = 9.6$ Hz)

6.5.13 Synthese von (*tert*-Butyldiphenylsilyloxy-2-nitrophenylmethyl)-phosphonsäuremethyl-*iso*-propylester **54**



300 mg (0.60 mmol) (*tert*-Butyldiphenylsilyloxy-2-nitrophenylmethyl)-phosphonigsäure-*iso*-propylester **52** wurden in 2 mL Toluol gelöst und mit 57 μL (1.5 mmol) Methanol und 58 μL (0.60 mmol) Tetrachlorkohlenstoff versetzt. 167 μL (1.21 mmol) Triethylamin wurden unter Rühren langsam zugetropft und die Reaktionslösung zwei Tage mit Ultraschall behandelt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde das Rohgemisch säulenchromatographisch an Kieselgel mit Petrolether und einem Ethylacetatgradienten (25 %-50 % v/v) gereinigt. Ein Diastereomer konnte angereichert werden (1: 0.65)

Ausbeute: 201 mg (0.38 mmol, 63 %) eines gelblichen Öles

DC: R_f (PE/EE 1:1 v/v) = 0.3

MS: ESI⁺ ($m/z + \text{Na}^+$) = 550.1787 (calc. $\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{NNaO}_6\text{PSi}$ 550.1791)

^1H -NMR: $\delta[\text{ppm}]$ (400 MHz, CDCl_3) = 8.01 (m, 1H, H3), 7.89 (m, 1H, H5), 7.76-7.70 (m, 2H, Ar. TBDPS), 7.72 (m, 1H, H4), 7.54 (m, 1H, H6), 7.46-7.38 (m, 3H, Ar. TBDPS), 7.35-7.26 (m, 4H, Ar. TBDPS), 7.18-7.14 (m, 2H, Ar. TBDPS), 6.24 (d, 1H, $J = 12.7$ Hz, H7), 6.21 (d, 1H, $J = 12.7$ Hz, H7), 4.63 (d sep., 1H, $J = 8.3$ Hz, $J = 6.4$ Hz, CH-*i*Pr), 4.62 (d sep., 1H, $J = 8.3$ Hz, $J = 6.4$ Hz, CH-*i*Pr), 3.59 (d, 1H, $J = 10.4$ Hz, OMe), 3.57 (d, 1H, $J = 10.7$ Hz, OMe), 1.21 (d, 6H, $J = 6.4$ Hz, CH_3 -*i*Pr), 1.17 (d, 6H, $J = 6.1$ Hz, CH_3 -*i*Pr), 1.15 (d, 6H, $J = 6.1$ Hz, CH_3 -*i*Pr), 1.12 (s, 9H, *t*Bu), 1.11 (s, 9H, *t*Bu), 1.06 (d, 6H, $J = 6.4$ Hz, CH_3 -*i*Pr)

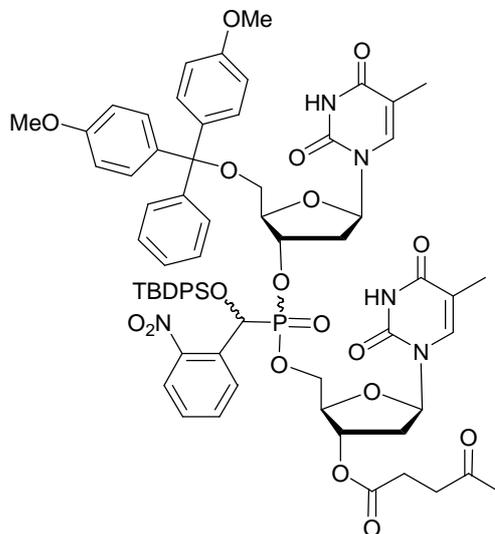
^{13}C -NMR: δ [ppm] (100 MHz, CDCl_3)= 136.42 (TBDPS), 136.18 (TBDPS), 136.12 (C), 133.99 (C), 133.24 (d, J = 3.1 Hz, C5), 133.15 (d, J = 3.6 Hz, C5), 132.71 (C1), 132.38 (C1), 130.83 (d, J = 4.6 Hz, C3), 130.52 (d, J = 4.6 Hz, C3), 130.40 (TBDPS), 130.35 (TBDPS), 128.64 (d, J = 3.1 Hz, C6), 128.60 (d, J = 3.6 Hz, C6), 128.01 (TBDPS), 127.93 (TBDPS), 124.79 (d, J = 2.0 Hz, C4), 124.70 (d, J = 2.0 Hz, C4), 72.44 (d, J = 7.6 Hz, CH-*i*Pr), 72.34 (d, J = 7.6 Hz, CH-*i*Pr), 67.60 (d, J = 170.9 Hz, C7), 67.33 (d, J = 171.9 Hz, C7), 54.20 (d, J = 6.6 Hz, OMe), 53.59 (d, J = 7.1 Hz, OMe), 27.39 (*t*Bu), 24.45 (d, J = 3.6 Hz, CH_3 -*i*Pr), 24.34 (d, J = 3.6 Hz, CH_3 -*i*Pr), 24.04 (d, J = 5.6 Hz, CH_3 -*i*Pr), 23.83 (d, J = 5.6 Hz, CH_3 -*i*Pr), 19.85 (TBDPS C_{quart})

^{31}P -NMR: δ [ppm] (202 MHz, CDCl_3)= 20.19, 19.94 (1: 0.65)

UV: λ_{max} [nm](MeCN)= 262

IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (KBr)= 3134, 3072, 3050, 2953, 2931, 2895, 2857, 2738, 2709, 1608, 1588, 1577, 1527, 1487, 1471, 1446, 1428, 1388, 1375, 1346, 1303, 1278, 1253, 1205, 1181, 1143, 1112, 1046, 992, 939, 864, 843, 824, 816, 807, 769, 740, 707, 699, 679, 612, 567, 501, 484

6.5.14 Synthese von (*tert*-Butyldiphenylsilyloxy-2-nitrophenylmethyl)-phosphonsäure-(5'-
O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-thymid-3'-yl)-(3'-O-levulinylthymid-5'-yl)-ester
32b



100 mg (0.10 mmol) (NO₂BnTBDPSO)-(5'-O-DMTr-dT)-Phosphonigsäureester **51b** wurden mit 70 mg (0.20 mmol) 3'-O-Levulinylthymidin **16** in 4 mL Toluol gelöst und mit 10 µL Tetrachlorkohlenstoff versetzt. unter Rühren wurden langsam 28 µL (0.20 mmol) Triethylamin hinzugefügt. Nach 24 h Rühren bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel entfernt und das Rohgemisch säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan und einem Methanolgradienten (2 %-5 % v/v) gereinigt.

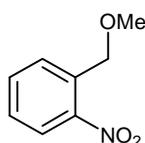
Ausbeute: 35 mg (0.02 mmol, 29 %) eines farblosen Feststoffes

MS: ESI⁺ (m/z + Na⁺-TBDPS) = 1104.32 (calc. C₅₃H₅₆N₅NaO₁₈P 1104.3256)

³¹P-NMR: δ[ppm] (202 MHz, CD₂Cl₂) = 21.99, 21.62, 21.19, 21.11

6.6 Synthese modifizierter [Hydroxy-(2-nitrobenzyl)-methyl]-nucleosyl-phosphonamidit-Bausteine

6.6.1 Synthese von Methyl-(2-nitrobenzyl)-ether **61d**



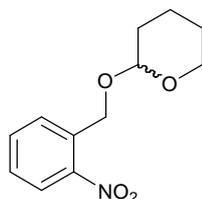
2.00 g (13.1 mmol) 2-Nitrobenzylalkohol **61a** wurden in 20 mL THF gelöst und 313 mg (13 mmol) NaH in 10 mL THF suspendiert langsam hinzugeben. Nach 1 h Rühren bei Raumtemperatur wurden 3.70 g (26.1 mmol) Methyljodid hinzugetropft, für 16 h bei Raumtemperatur wurden 5 mL Methanol hinzugegeben und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit Petrolether/Essigester (10 % v/v) gereinigt.

Ausbeute: 1.86 g (11.2 mmol, 86 %)

DC: R_f (PE/EE 4:1 v/v) = 0.51

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3) = 8.07-8.05 (m, 1H, H3), 7.78-7.76 (m, 1H, H5), 7.66-7.62 (m, 1H, H4), 7.44-7.40 (m, 1H, H6), 4.83 (s, 2H, CH_2), 3.48 (s, 3H, OMe)

6.6.2 Synthese von 2-(2-Nitrobenzyloxy)-tetrahydro-2H-pyran **61c**



5.00 g (32.6 mmol) 2-Nitrobenzylalkohol **61a** wurden in 50 mL Dichlormethan gelöst, 743 mg (6.52 mmol) Trifluoressigsäure hinzugegeben und 5.50 g (65.2 mmol) 3,4-Dihydro-2H-pyran **35** langsam hinzugetropft. Nach 20 h Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung mit konz. NaHCO_3 -Lsg. und Wasser (+1 % Triethylamin) gewaschen, die organische Phase über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit Petrolether/Ethylacetat (0-4 % v/v) gereinigt.

Ausbeute: 7.51 g (31.6 mmol, 97 %) eines gelben Öles

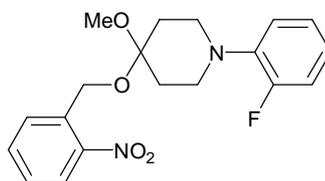
DC: R_f (PE/EE 4:1 v/v) = 0.4

MS: ESI^+ ($m/z + \text{Na}^+$) = 260.09 (calc. $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{NNaO}_4$ 260.0899)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3) = 7.99-7.97 (m, 1H, H3), 7.76-7.74 (m, 1H, H6), 7.59-7.55 (m, 1H, H5), 7.38-7.34 (m, 1H, H4), 5.07 (d, J = 15.3 Hz, H7a), 4.85 (d, J = 15.3 Hz, H7b), 4.69 (dd, 1H, J = 3.50 Hz, J = 3.50 Hz, H2-THP), 3.81

(ddd, $J= 11.3$ Hz, $J= 8.6$ Hz, $J= 3.3$ Hz, H6a-THP), 3.49 (dddd, $J= 11.4$ Hz, $J= 5.0$ Hz, $J= 3.7$ Hz, $J= 1.4$ Hz, H6b-THP), 1.85-1.46 (m, 6H, H3-H5-THP)

6.6.3 Synthese von 4-(2-Nitrobenzyloxy)-1-(2-fluorphenyl)-4-methoxypiperidin **61b**



200 mg (1.31 mmol) 2-Nitrobenzylalkohol **61a** und 45 mg (0.26 mmol) *p*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat wurden in 5 mL Dichlormethan gelöst, langsam 538 mg (2.61 mmol) Fpmp-Enolether **15** in 2 mL Dichlormethan gelöst hinzugegeben. Nach 5-stündigem Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung mit 5%iger NaHCO₃-Lsg. gewaschen, die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit Petrolether (60-70) und Ethylacetat (0-4 % v/v) gereinigt.

Ausbeute: 316 mg (0.88 mmol, 67 %)

DC: R_f (PE/EE 4:1 v/v) = 0.35

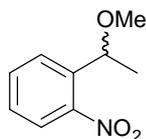
MS: ESI⁺ (m/z + Na⁺) = 383.1374 (calc. C₁₉H₂₁FN₂NaO₄ 383.1383)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃) = 8.02-7.99 (m, 1H, H3-NO₂-Ar.), 7.85-7.83 (m, 1H, H6-NO₂-Ar.), 7.61-7.57 (m, 1H, H5-NO₂-Ar.), 7.39-7.35 (m, 1H, H4-NO₂-Ar.), 7.00-6.82 (m, 4H, F-Ar.), 4.85 (s, 2H, H7), 3.17 (s, 3H, OMe), 3.08-3.04 (m, 4H, H2-Fpmp), 2.01-1.98 (m, 4H, H3-Fpmp)

¹³C-NMR: δ [ppm] (100 MHz, CDCl₃) = 134.02 (NO₂-Ar.), 129.08 (NO₂-Ar.), 128.19 (NO₂-Ar.), 125.06 (NO₂-Ar.), 124.78 (d, ³J_{C,F} = 4.1 Hz, F-Ar.), 122.79 (d, ³J_{C,F} = 7.1 Hz, F-Ar.), 119.83 (d, ³J_{C,F} = 3.1 Hz, F-Ar.), 116.47 (d, ³J_{C,F} = 21.3 Hz, F-Ar.), 59.32 (Bn-C), 48.44 (OMe), 48.36 (d, ⁴J_{C,F} = 3.1 Hz, C2), 33.68 (C3)

¹⁹F-NMR: δ [ppm] (470 MHz, CDCl₃) = -123.4

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (KBr) = 2958, 2832, 1716, 1525, 1501, 1465, 1453, 1340, 1304, 1269, 1230, 1206, 1192, 1174, 1133, 1112, 1096, 1054, 1041, 975, 946, 931, 906, 893, 858, 810, 790, 752, 728, 676, 758, 640, 544, 518, 495, 485, 468, 156

6.6.4 Versuch der Synthese von 1-(1-Methoxyethyl)-2-nitrobenzol **67**

Die Reaktionen wurden mit wasserfreien Lösungsmitteln und in einer Inertgasatmosphäre unter Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt.

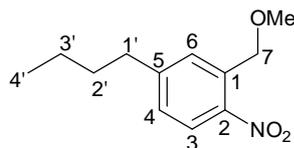
50 mg (0.3 mmol) 2-Nitrobenzylmethylether **61d** wurden in 2 mL THF gelöst und bei verschiedenen Temperaturen (T_1) mit einer Base versetzt. Nach 1 h Rühren wurden bei T_2 212 mg (1.5 mmol) Methyljodid hinzugegeben und nach einer weiteren Stunde Rühren wurde die Reaktion mit Methanol abgebrochen, das Lösungsmittel entfernt und in Dichlormethan aufgenommen. Nach Waschen mit 0.01 M HCl wurde über Na_2SO_4 getrocknet, das Lösungsmittel entfernt und ein $^1\text{H-NMR}$ aufgenommen.

- A) $T_1=T_2= \text{Rt.}$, 36 mg (1.5 mmol) NaH in 0.5 mL THF
- B) $T_1=-78\text{ }^\circ\text{C}$ bis $-40\text{ }^\circ\text{C}$, $T_2= -40\text{ }^\circ\text{C}$, 36 mg (1.5 mmol) NaH in 0.5 mL THF
- C) $T_1=T_2=-20\text{ }^\circ\text{C}$, 0.7 mL (0.7 mmol) 1 M NaHMDS in THF
- D) $T_1=T_2= \text{Rt.}$, (0.3 mmol) LDA
- E) $T_1=T_2= \text{Rt.}$, 206 mg (0.9 mmol) Ag_2O

Bei diesen Versuchen wurde kein Umsatz beobachtet, lediglich das Edukt konnte mittels $^1\text{H-NMR}$ nachgewiesen werden.

170 mg (1.02 mmol) 2-Nitrobenzylmethylether **61d** wurden in 2 mL THF gelöst und auf $-40\text{ }^\circ\text{C}$ abgekühlt. Zu dieser Reaktionsmischung wurden 0.7 mL (1.1 mmol, $c= 1.6\text{ M}$) *n*-Butyllithium in Hexan gegeben. Nach 2 h Rühren wurden bei $-40\text{ }^\circ\text{C}$ 212 mg (1.5 mmol) Methyljodid gelöst in 0.5 mL THF zugetropft und für 20 Min. gerührt. Bei $0\text{ }^\circ\text{C}$ wurde die Reaktion mit Wasser abgebrochen, mit Diethylether extrahiert, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wurde am Chromatotron mit Hexan und einem Essigestergradienten (0 % bis 10 % v/v) gereinigt. Als einziges Reaktionsprodukt konnte 5-*n*Butyl-2-nitrobenzylmethylether **68** identifiziert und das Edukt reisoliert werden.

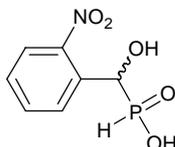
Ausbeute: 13 mg (58 μmol , 6 %) eines gelben Öls



DC: R_f (Hexan/Essigester 3:1 v/v) = 0.37

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3) = 7.63 (d, 1H, J = 8.2 Hz, H3), 7.39 (s, 1H, H6), 6.46 (d, 1H, J = 8.3 Hz, H4), 4.49 (s, 1H, H7), 2.93 (s, 3H, OMe), 2.11 (t, 2H, J = 7.6 Hz, H1'), 1.15 (tt, 2H, J = 7.3 Hz, J = 7.6 Hz, H2'), 0.95 (qt, 2H, J = 7.3 Hz, J = 7.3 Hz, H3'), 0.61 (t, 3H, J = 7.3 Hz, H4')

6.6.5 Synthese von [Hydroxy-(2-nitrophenyl)-methyl]-phosphonigsäure **60a**



10.1 g (67 mmol) 2-Nitrobenzaldehyd **13** wurden in 50 mL Dioxan gelöst und 1.3 mL konzentrierte Salzsäure hinzugegeben. Nach Zugabe von 12.0 g (90.1 mmol) 50 %iger Phosphonigsäure **63** wurde das Gemisch für 20 h im Ultraschallbad bei Raumtemperatur zur Reaktion gebracht. Das Dioxan wurde im Vakuum entfernt und der ölige Rückstand in Dichlormethan aufgenommen. Der gelbliche Niederschlag wurde filtriert und aus Dichlormethan/Dioxan umkristallisiert.

Ausbeute: 9.30 g (43.1 mmol, 67 %) eines farblosen Feststoffes

DC: R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 30 % v/v) = 0.25

MS: FAB ($m/z + \text{H}^+$) = 218.0224 (calc. $\text{C}_7\text{H}_9\text{NO}_5\text{P}$ 218.0218)

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, DMSO) = 8.03-8.01 (m, 1H, H3), 7.82-7.75 (m, 2H, H4+H6), 7.57-7.52 (m, 1H, H5), 6.69 (dd, 1H, $^1J_{\text{HH}} = 546.8$ Hz, $J_{\text{HH}} = 0.8$ Hz, PH), 5.68 (d, 1H, J = 8.1 Hz, H7)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (100 MHz, CDCl_3) = 147.62 (d, $J_{\text{C,P}} = 5.1$ Hz, C2), 133.95 (d, $J_{\text{C,P}} = 3.0$ Hz, C5), 133.79 (C1), 128.98 (d, $J_{\text{C,P}} = 4.5$ Hz, C6), 128.80 (d, $J_{\text{C,P}} = 2.6$ Hz, C4), 124.92 (d, $J_{\text{C,P}} = 2.0$ Hz, C3), 67.77 (d, $J_{\text{C,P}} = 108.9$ Hz, C7)

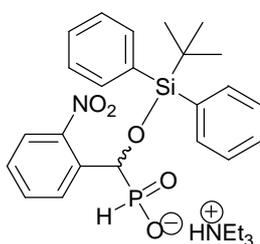
$^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, CDCl_3) = 29.31 (dd, $J = 546.6$ Hz, $J = 13.2$ Hz)

IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] (KBr)= 3256, 2788, 2424, 1610, 1576, 1530, 1401, 1343, 1311, 1297, 1220, 1189, 1159, 1150, 1140, 1108, 1082, 1054, 1039, 1024, 987, 970, 961, 859, 794, 720, 692, 681, 518, 501

UV: λ_{\max} [nm](MeCN)= 264

T_m: 127° C

6.6.6 Synthese von [(*tert*-Butyldiphenylsilyloxy)-(2-nitrophenyl)-methyl]-triethylammonium-phosphinat **60c**



4.14 g (19.1 mmol) [Hydroxy-(2-nitrophenyl)-methyl]-phosphonigsäure **60a** wurden mit THF kodestilliert, in 20 mL THF aufgenommen, 6.40 g (23 mmol) TBDPSCl und anschließend 4.2 mL Triethylamin hinzuge tropft. Nach einer Stunde Rühren bei Raumtemperatur wurden 5 mL Methanol hinzugegeben und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in 50 mL Dichlormethan aufgenommen, dreimal mit Wasser gewaschen, die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan (+1 % Triethylamin) und einem Methanolgradienten (5-20 %) gereinigt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurden 6.97 g (12.5 mmol, 66 %) eines gelben Feststoffs erhalten.

DC: R_f (CH₂Cl₂/MeOH 30 % v/v)= 0.45

MS: FAB (m/z +H⁺)= 557.2607 (calc. C₂₃H₂₆NO₅PSi 557.2601)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃)= 7.98-7.94 (m, 1H, H₃), 7.83-7.79 (m, 2H, H₄+H₆), 7.74-7.70 (m, 1H, H₅), 7.56-7.53 (m, 2H, TBDPS), 7.39-7.25 (m, 5H, TBDPS), 7.23-7.15 (m, 3H, TBDPS), 6.97 (d, 1H, J = 519.8 Hz, PH), 5.93 (d, 1H, J = 10.7 Hz, α -H), 2.88 (q, 7H, CH₂-NEt₃), 1.15 (t, 11H, J = 7.4 Hz, CH₃-NEt₃), 1.15 (s, 9H, CH₃-*t*Bu)

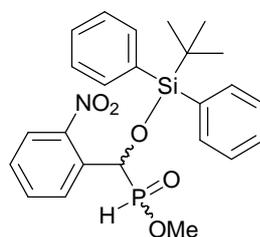
^{13}C -NMR: δ [ppm] (100 MHz, CDCl_3)= 152.8 (d, $J_{\text{C,P}}$ = 75.3 Hz, C2), 136.70+136.26 (TBDPS-Ar.), 133.95+133.61 (TBDPS-Ar.), 132.90 (d, $J_{\text{C,P}}$ = 2.6 Hz, C3), 130.17 (d, $J_{\text{C,P}}$ = 4.1 Hz, C6), 129.91 (d, $J_{\text{C,P}}$ = 4.6 Hz, C4), 127.96 (TBDPS-Ar.), 127.79+127.71 (TBDPS-Ar.), 126.91 (d, $J_{\text{C,P}}$ = 2.0 Hz, C5), 124.33 (TBDPS-Ar.), 71.83 (d, $J_{\text{C,P}}$ = 101.7 Hz, αC), 45.61 ($\text{CH}_2\text{-NEt}_3$), 27.56 ($\text{CH}_3\text{-}t\text{Bu}$), 19.90 ($t\text{Bu}$ -quart.), 8.90 ($\text{CH}_3\text{-NEt}_3$)

^{31}P -NMR: δ [ppm] (202 MHz, CDCl_3)= 23.10 (dd, J = 522.3 Hz, J = 9.7 Hz)

IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (KBr)= 3403, 2999, 2979, 2958, 2940, 2892, 2857, 2603, 2496, 2282, 1526, 1470, 1443, 1428, 1390, 1353, 1215, 1166, 1108, 1052, 1012, 999, 964, 954, 863, 835, 814, 788, 741, 717, 708, 699, 677, 604, 529, 513, 486, 478, 470

T_m : 110° C

6.6.7 Synthese von [(*tert*-Butyldiphenylsilanyloxy)-(2-nitrophenyl)-methyl]-phosphonigsäuremethylester **76a**



Die Reaktion wurde mit wasserfreien Lösungsmitteln und in einer Inertgasatmosphäre unter Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt. 387 mg (0.85 mmol) ($\text{NO}_2\text{BnTBDPSO}$)-Triethylammonium-phosphinat **60c** wurden mit Pyridin kodestilliert, anschließend in 20 mL Pyridin gelöst und 40 mg (1.28 mmol) Methanol hinzugefügt. Nach schneller Zugabe von 310 mg (2.50 mmol) Pivaloylchlorid ließ man 10 Min. bei Raumtemperatur rühren. Das Reaktionsgemisch wurde mit 60 mL Dichlormethan verdünnt und sofort mit 60 mL 5 %iger NaHCO_3 -Lsg gewaschen. Die organische Phase wurde mit gesättigter NaCl -Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan und einem Methanolgradienten von 0-3 % gereinigt.

Ausbeute 257 mg (0.55 mmol, 64 %) eines gelben Öls

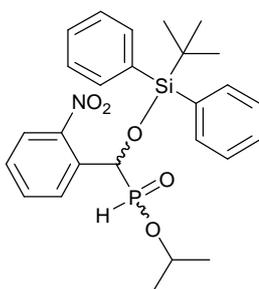
DC: R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 5 % v/v)= 0.92

$^1\text{H-NMR}$: δ [ppm] (400 MHz, CDCl_3)=7.82-7.77 (m, 1H, H3), 7.62-7.59 (m, 2H, H4+H6), 7.55-7.51 (m, 1H, H5), 7.39-7.22 (m, 8H, TBDPS), 7.15-7.11 (m, 2H, TBDPS), 6.12 (s, 0.5H, PH), 5.90 (d, $J= 10.7$ Hz, αH), 3.57 (d, $J= 11.2$ Hz, OMe), 1.06 (s, CH_3 -*t*Bu)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (100 MHz, CDCl_3)= 136.322, 136.05, 136.01, 133.99, 133.96, 133.91, 132.97, 132.80, 132.37, 132.25, 132.09, 130.74, 130.68, 130.64, 130.59, 130.44, 130.37, 130.18, 130.13, 129.15, 129.12, 128.34, 128.27, 128.21, 128.14, 128.12, 128.12, 127.99, 125.27, 125.25, 125.04, 125.02, 69.94 (d, $J_{\text{C,P}}= 112.4$ Hz, C7), 53.49 (d, $J_{\text{C,P}}= 7.6$ Hz, OMe), 27.36 (CH_3 /*t*Bu), 19.84 (*t*Bu-quart.)

$^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, CDCl_3)= 34.50 (ddq, $J= 569.6$ Hz, $J= 11.0$ Hz, $J= 11.0$ Hz)

6.6.8 Synthese von [(*tert*-Butyldiphenylsilanyloxy)-(2-nitrophenyl)-methyl]-phosphonigsäure-*iso*-propylester **76b**



Die Reaktion wurde mit wasserfreien Lösungsmitteln und in einer Inertgasatmosphäre unter Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt. 3 g (5.4 mmol) ($\text{NO}_2\text{BnTBDPSO}$)-Triethylammonium-phosphinat **60c** wurden mit Pyridin kdestilliert, anschließend in 50 mL Pyridin gelöst und 494 μL (6.47 mmol) *iso*-Propanol hinzugefügt. Nach schneller Zugabe von 1.35 mL (10.7 mmol) Pivaloylchlorid ließ man 15 Min. bei Raumtemperatur rühren. Das Reaktionsgemisch wurde mit 150 mL Dichlormethan verdünnt und sofort mit 60 mL 5 %iger NaHCO_3 -Lsg. gewaschen. Die organische Phase wurde drei mal mit 5 %iger NaHCO_3 -Lsg. und mit gesättigter NaCl -Lsg. gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit Petrolether und einem Ethylacetatgradienten von 25-50 % gereinigt. Durch mehrfache chromatographische Reinigung konnte ein Diastereomer bis zu einem Verhältnis von 4:1 angereichert werden.

Ausbeute: 1.6 g (3.2 mmol, 60 %) eines gelben Öls.

DC: R_f (PE:EE 1:1 v/v)=0.28

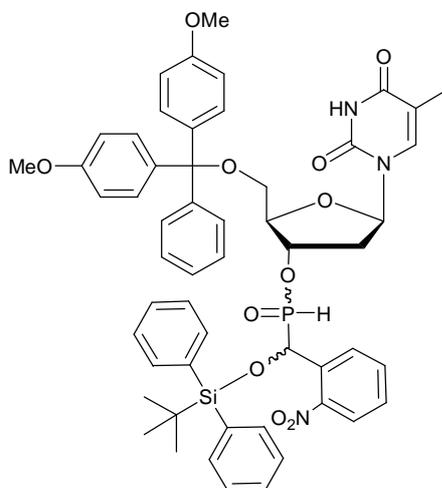
MS: FAB (m/z +H⁺)= 498.1850 (calc. C₂₆H₃₃NO₅PSi 498.1866)

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃)= 7.93 (d, 1H, J = 7.88 Hz, H3), 7.86-7.81 (m, 1H, H5), 7.69-7.66 (m, 2H, Ar. TBDPS), 7.60-7.56 (m, 1H, H6), 7.45-7.40 (m, 3H, Ar. TBDPS), 7.37-7.28 (m, 3H, Ar. TBDPS, H4), 7.21-7.17 (m, 2H, Ar. TBDPS), 6.94 (d, 1H, $J_{P,H}$ =559.0 Hz, PH), 5.96 (d, 1H, $J_{P,H}$ = 11.2 Hz, H7), 4.36 (m, 1H, CH-*i*Pr), 1.21 (s, 9H, *t*Bu), 0.98 (d, 3H, $^3J_{H,H}$ =4.76 Hz, CH₃-*i*Pr), 0.83 (d, 3H, $^3J_{H,H}$ =4.76 Hz, CH₃-*i*Pr)

¹³C-NMR: δ [ppm] (100 MHz, CDCl₃)= 136.42 (TBDPS), 136.18 (TBDPS), 136.12, 136.99, 133.24 (d, J_{CP} = 3.1 Hz, C5), 133.15 (d, J_{CP} = 3.6 Hz, C5), 132.71 (C1), 132.38 (C1), 130.38 (d, J_{CP} = 4.6 Hz, C6), 130.52 (d, J_{CP} = 4.6 Hz, C6), 130.37 (d, J_{CP} = 4.6 Hz, C4), 128.66 (TBDPS), 128.63 (TBDPS), 128.59 (TBDPS), 128.02 (TBDPS), 127.93 (TBDPS), 124.79 (d, J_{CP} = 2.0 Hz, C3), 124.70 (d, J_{CP} = 2.0 Hz, C3), 72.44 (d, J_{CP} = 7.6 Hz, CH-*i*Pr), 72.34 (d, J_{CP} = 7.6 Hz, CH-*i*Pr), 67.60 (d, J_{CP} = 170.9 Hz, C7), 67.33 (d, J_{CP} = 171.9 Hz, C7), 54.20 (d, J_{CP} = 6.6 Hz, OMe), 53.59 (d, J_{CP} = 7.1 Hz, OMe), 27.39 (CH₃-*t*Bu), 24.45 (d, J_{CP} = 3.6 Hz, CH₃-*i*Pr), 24.34 (d, J_{CP} = 3.6 Hz, CH₃-*i*Pr), 23.83 (d, J_{CP} = 5.6 Hz, CH₃-*i*Pr), 23.04 (d, J_{CP} = 3.6 Hz, CH₃-*i*Pr), 19.85 (C_{quart} *t*Bu)

³¹P-NMR: δ [ppm] (202 MHz, CDCl₃)= 29.51 (d, $^1J_{PH}$ = 558.5 Hz), 28.65 (dd, $J_{P,H}$ = 11.52 Hz, $^1J_{PH}$ =554.7 Hz)

6.6.9 Synthese von [(*tert*-Butyldiphenylsilyloxy)-(2-nitrophenyl)-methyl]-phosphonigsäure-[5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-thymidin-3'-yl]-ester **51b**



Die Reaktion wurde mit wasserfreien Lösungsmitteln und in einer Inertgasatmosphäre unter Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt. 500 mg (0.92 mmol) (NO₂BnTBDSO)-Triethylammonium-phosphinat **60c** und 601 mg (1.1 mmol) 5'-*O*-DMTr-dT **20** wurden mit Pyridin kdestilliert, anschließend in 20 mL Pyridin gelöst und 340 mg (2.5 mmol) Pivaloylchlorid zugegeben. Nach 10 Min. Rühren bei Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch mit 60 mL Dichlormethan verdünnt und sofort mit 60 mL gesättigter NaHCO₃-Lsg gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel mit Ethylacetat/Petrolether 60-70 (7:3 v/v) gereinigt.

Ausbeute: 451 mg (0.46 mmol, 50 %) eines blassgelben Feststoffs.

DC: R_f (PE:EE 1:1 v/v) = 0.7

MS: FAB (m/z +H⁺) = 982.3 (calc. C₅₄H₅₆N₃O₁₁PSi 982.34)

¹H-NMR: δ[ppm] (400 MHz, C₆D₆) = 9.61 (s, 2H, NH-Thy), 9.58 (s, 1H, NH-Thy), 9.54 (s, 2H, NH-Thy), 7.94-7.80 (m, 12H, Ar.), 7.58-7.46 (m, 22H, Ar. + 4×½PH), 7.41-7.21 (m, 36H, Ar.), 7.14-7.02 (m, 20H, Ar.), 6.78-6.71 (m, 20H, Ar.), 6.55 (dd, 1H, J = 6.3 Hz, J = 8.8 Hz, H1'), 6.47 (dd, 1H, J = 6.3 Hz, J = 8.2 Hz, H1'), 6.42-6.21 (m, 8H, 2×H1', 4×½ PH, H7), 5.38-5.36 (m, 1H, H3'), 5.20-5.17 (m, 2H, H3'), 5.06-5.03 (m, 1H, H3'), 4.42-4.40 (m, 1H, H4'), 4.17-4.14 (m, 1H, H4'), 4.01-3.99 (m, 1H, H4'), 3.94-3.93 (m, 1H, H4'), 3.53 (dd, 1H, J =

2.5 Hz, $J= 10.7$ Hz, H5'a), 3.42 (dd, 1H, $J= 2.5$ Hz, $J= 10.7$ Hz, H5'b), 3.40-3.34 (m, 6H, $3\times$ H5'a+b), 3.31 (s, 24H, $8\times$ OMe), 2.41-1.96 (m, 8H, H2'a+b), 1.50 (s, 12H, $\text{CH}_3\text{-Thy}$), 1.22 (s, 18H, $t\text{Bu}$), 1.18 (s, 9H, $t\text{Bu}$), 1.17 (s, 9H, $t\text{Bu}$)

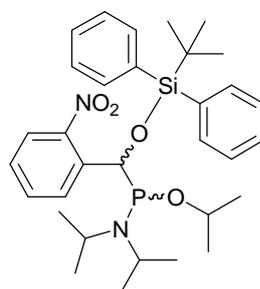
$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (100 MHz, C_6D_6)= 159.66, 151.12, 136.65, 136.60, 136.57, 136.35, 136.30, 136.28, 135.32, 135.25, 133.88, 133.86, 133.77, 133.73, 133.69, 133.66, 131.16, 131.13, 131.03, 121.01, 130.90, 130.84, 130.82, 130.81, 130.22, 130.18, 129.98, 129.35, 129.28, 129.25, 129.20, 128.90, 128.87, 128.68, 128.59, 128.51, 128.50, 128.44, 128.28, 127.65, 127.40, 125.28, 125.23, 125.20, 125.17, 125.13, 114.00, 113.72, 88.73, 85.70, 85.54, 85.50, 84.99, 84.94, 84.90, 84.83, 84.59, 84.55, 80.78, 80.76, 78.50, 78.43, 78.10, 78.06, 78.01, 77.54, 77.46, 77.39, 77.36, 77.33, 77.29, 76.81, 76.79

$^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, C_6D_6)= 31.67 (ddd, $J= 566.2$ Hz, $J= 11.0$ Hz, $J= 6.7$ Hz), 31.38 (ddd, $J= 568.1$ Hz, $J= 10.3$ Hz, $J= 6.2$ Hz)

IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (KBr)= 3069, 2957, 2931, 2858, 1692, 1607, 1578, 1528, 1508, 1464, 1445, 1427, 1349, 1294, 1274, 1251, 1177, 1112, 1067, 1033, 945, 862, 826, 792, 741, 725, 702, 608, 584, 563, 510, 480, 472, 461

UV: λ_{max} [nm](MeCN)= 235 (1), 266 (0.6)

6.6.10 Synthese von [(*tert*-Butyldiphenylsilanyloxy)-(2-nitrophenyl)-methyl]-*iso*-propyloxy-di-*iso*-propyl-phosphonamidit **85b**



Variante A:

Die Reaktion wurde mit wasser- und sauerstofffreien Lösungsmitteln und in einer Inertgasatmosphäre unter Feuchtigkeits- und Sauerstoffausschluss durchgeführt. 1.21 g (2.42 mmol) ($\text{NO}_2\text{BnTBDSO}$)-Phosphonigsäure-*iso*-propylester **76b** wurden mit Pyridin

kodestilliert und in 0.8 mL Pyridin und 20 ml Dichlormethan gelöst. 783 mg (2.64 mmol) Triphosgen wurden in 8 mL Dichlormethan gelöst und bei 0 °C 2.01 g (7.6 mmol) Triphenylphosphin in 12 mL Dichlormethan hinzugegeben, anschließend 0.9 mL Pyridin. Die Lösung von **76b** wurde bei 0 °C hinzugegeben. Nach Auftauen auf Raumtemperatur wurde für 3 h gerührt und bei -40 °C 1.41 g (13.9 mmol) Di-*iso*-propylamin langsam hinzugegeben. Nach Auftauen auf Raumtemperatur wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit Petrolether (+0.5 % NEt₃)/Ethylacetat 50 % (v/v) gereinigt.

Mit dieser Methode konnte kein sauberes Produkt erhalten werden.

Variante B:

Die Reaktion wurde mit wasserfreien und sauerstofffreien Lösungsmitteln und in einer Inertgasatmosphäre unter Feuchtigkeits- und Sauerstoffausschluss durchgeführt. 775 mg (1.56 mmol) (NO₂BnTBDPSO)-Phosphonigsäure-*iso*-propylester **76b** wurden mit Pyridin kodestilliert und in 0.6 mL Pyridin gelöst. 1.04 g (3.1 mmol) Triphenylphosphindichlorid wurden mit Pyridin codestilliert, in 0.6 mL Pyridin gelöst und bei 0 °C langsam hinzugegeben. Nach 4 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wurden langsam bei -40 °C 120 µL (86 mg, 8.6 mmol) Di-*iso*-propylamin hinzugegeben und nach Auftauen weitere 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das Rohgemisch säulenchromatographisch an Kieselgel mit Petrolether (+0.5 % NEt₃)/Ethylacetat (50 % v/v) gereinigt.

Ausbeute: 420 mg (0.72 mmol, 46 %)

DC: R_f (Petrolether/Essigester 1:1) = 0.7

MS FAB (m/z + H⁺) = 831.30 (calc. C₃₂H₄₆N₂O₄PSi 831.2964)

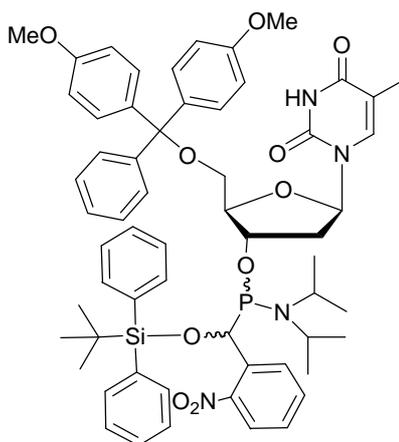
¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz), C₆D₆) = 8.1 (dd, 1H, ³J_{H,H} = 1.6 Hz, H3), 7.99 (dd, 1H, ³J_{H,H} = 1.6 Hz, ³J_{H,H} = 7.6 Hz, H5), 7.73 (dd, 1H, ³J_{H,H} = 7.6 Hz, ³J_{H,H} = 1.3 Hz, H4), 7.57 (dd, 1H, ³J_{H,H} = 1.3 Hz, H6), 7.39-7.12 (m, 10H, TBDPS), 6.78 (d, 1H, H7), 4.13 (sept., 1H, ³J_{H,H} = 6.0 Hz, CH-O-*i*-Pr), 3.77 (sept., 2H, ³J_{H,H} = 6.0 Hz, CH-N-*i*-Pr), 1.53 (d, 3H, ³J_{H,H} = 6.0 Hz, CH₃-O-*i*-Pr), 1.38 (d, 3H, ³J_{H,H} = 6.0 Hz, CH₃-O-*i*-Pr), 1.36+1.32 (2xs, 9H, CH₃-*t*Bu), 1.14 (d, 6H, ³J_{H,H} = 6.0 Hz, CH₃-N-*i*-Pr), 0.8 (d, 6H, ³J_{H,H} = 6.0 Hz, CH₃-N-*i*-Pr).

^{13}C -NMR: δ [ppm] (100 MHz, C_6D_6)= 136.86 (d, J_{CP} = 4.1 Hz), 136.64 (d, J_{CP} = 4.6 Hz), 135.54 (TBDPS), 132.5, 132.42, 130.57, 130.49, 130.20, 130.12, 130.02, 129.95, 129.57, 128.80, 128.59, 127.80, 127.09, 124.68, 124.47, 73.45 (d, J_{CP} = 131.2 Hz, C7), 73.43 (d, J_{CP} = 129.2 Hz, C7), 70.43 (d, J_{CP} = 19.8 Hz, CH-*i*Pr), 69.95 (d, J_{CP} = 17.3 Hz, CH-*i*Pr), 27.85 (CH_3 -*t*Bu), 27.80 (CH_3 -*t*Bu), 24.75 (CH_3 -*i*Pr), 24.70 (CH_3 -*i*Pr), 24.55 (CH_3 -*i*Pr), 24.51 (CH_3 -*i*Pr), 24.32 (CH_3 -*i*Pr), 24.26 (CH_3 -*i*Pr), 20.01 ($\text{C}_{\text{quar.}}$ *t*Bu)

^{31}P -NMR: δ [ppm] (202 MHz, C_6D_6)= 123.08 (ddd, $3 \times J$ = 9.1 Hz), 122.43 (ddd, $3 \times J$ = 8.6 Hz)

UV: λ_{max} [nm](MeCN)= 258

6.6.11 Versuch der Synthese von [(*tert*-Butyldiphenylsilyloxy)-(2-nitrophenyl)-methyl]-[5'-*O*-(4,4'-dimethoxytriphenylmethylthymid-3'-yl)-di-*iso*-propylphosphonamidit **5c**



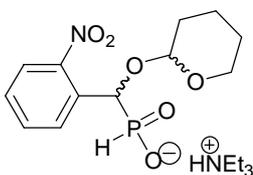
Die Reaktion wurde mit wasserfreien und sauerstofffreien Lösungsmitteln und in einer Inertgasatmosphäre unter Feuchtigkeits- und Sauerstoffausschluss durchgeführt. 0.6 g (0.6 mmol) ($\text{NO}_2\text{BnTBDPSO}$)-Phosphonigsäure-(5'-*O*-DMTr-dT)-ester **51b** wurden mit Pyridin codestilliert und in 0.22 mL Pyridin und 10 mL Dichlormethan gelöst. 446 mg (1.34 mmol) Triphenylphosphindichlorid wurden mit Pyridin codestilliert und in 2.2 mL Dichlormethan und 0.25 mL Pyridin gelöst, bei 0 °C hinzugegeben und für 4 h gerührt. Bei -40 °C wurden 553 μL Di-*iso*-propylamin hinzugegeben. Nach Auftauen auf Raumtemperatur wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit Petrolether/Ethylacetat 0 %-50 % (+0.5 % NEt_3) (v/v) gereinigt.

Ausbeute: 100 mg (92 μmol , 15 %) eines u.a. mit Triphenylphosphinoxid verunreinigten Produktes

^{31}P -NMR: δ [ppm] (202 MHz, C_6D_6) = 125.77, 124.32, 124.27, 124.15, 26.48 (Ph_3PO)

Bei der zweiten Aufreinigung zersetzte sich das $(\text{NO}_2\text{BnTBDPSO})$ -(5'-*O*-DMTr-dT)-*Di*-*iso*-propyl-phosphonamidit **5c**.

6.6.12 Synthese von [(2-Nitrophenyl)-(tetrahydropyran-2-yloxy)-methyl]-triethylammonium-phosphinat **60d**



Die Reaktion wurde mit wasserfreien Lösungsmitteln und in einer Inertgasatmosphäre unter Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt. 1.66 g (7.65 mmol) [Hydroxy-(2-nitrophenyl)-methyl]-phosphonigsäure **60a** und 300 mg (1.7 mmol) *p*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat wurden mit THF kodestilliert und anschließend in 30 mL THF suspendiert. Zu dieser Suspension wurden 3.6 mL (3.3 g, 39.2 mmol) 3,4-Dihydro-2H-pyran gegeben und für 1.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abbruch der Reaktion mit 1.6 mL Triethylamin wurde das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan (+1 % NEt_3) und einem Methanolgradienten (10-20 % v/v) gereinigt.

Ausbeute: 3.01 g (7.48 mmol, 97 %) eines gelblichen Feststoffes

DC: R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 30 % v/v) = 0.20

^1H -NMR: δ [ppm] (400 MHz), CDCl_3) = 7.98 (dd, 1H, $^3J_{\text{H,H}}=8.14$ Hz, $^4J_{\text{H,H}}=1.0$ Hz, H3), 7.92 (dd, 1H, $^3J_{\text{H,H}}=1.01$ Hz, H3), 7.89 (dt, 1H, $^3J_{\text{H,H}}=7.88$ Hz, $^4J_{\text{H,H}}=1.27$ Hz, H6), 7.79 (dt, 1H, $^3J_{\text{H,H}}=7.88$ Hz, $^4J_{\text{H,H}}=1.27$ Hz, H6), 7.58 (dd, 1H, $^3J_{\text{H,H}}=7.38$ Hz, $^4J_{\text{H,H}}=0.5$ Hz, H5), 7.33 (ddt, 1H, $^3J_{4a+b,3a+b}=8.14$ Hz, $^4J_{\text{H,H}}=1.27$ Hz, H4), 7.02 (d, 0.5H, $^2J_{\text{PHa,P}}=526.94$ Hz, PH), 6.80 (d, 0.5H, $^2J_{\text{HPb,P}}=521.34$ Hz, PH), 5.90 (d, 1H, $^2J_{\text{H,P}}=14.75$ Hz, H7), 5.88 (d, 1H, $^2J_{\alpha\text{-CHb,P}}=14.75$ Hz, H7), 4.60 (t, 1H, $^3J_{\text{H,H}}=$ Hz, H2-THP), 3.64-3.40 (m, 2H, H6-

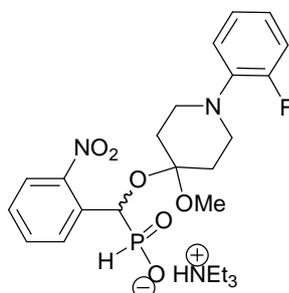
THP), 2.98 (q, 6H, $^3J_{\text{H,H}}=7.37$ Hz, $\text{CH}_2\text{-NEt}_3$) 2.08-1.45 (m, 6H, $\text{CH}_2\text{-THP}$),
1.23 (t, 9H, $^3J_{\text{H,H}}=7.37$ Hz, $\text{CH}_3\text{-NEt}_3$)

$^{13}\text{C-NMR}$: δ [ppm] (100 MHz, CDCl_3)= 133.46 (C5), 133.29 (C5), 129.20 (C6), 128.85 (C6), 127.51 (C4), 127.17 (C4), 125.05 (C3), 124.98 (C3), 96.93 (C2-THP), 96.83 (C2-THP), 74.62 (C7), 72.99 (C7), 62.91 (C6-THP), 61.89 (C6-THP), 45.60 ($\text{CH}_2\text{-NEt}_3$), 30.94 ($\text{CH}_2\text{-THP}$), 30.88 ($\text{CH}_2\text{-THP}$), 25.86 ($\text{CH}_2\text{-THP}$), 19.79 ($\text{CH}_2\text{-THP}$), 18.94 ($\text{CH}_2\text{-THP}$), 8.80 ($\text{CH}_3\text{-NEt}_3$)

$^{31}\text{P-NMR}$: δ [ppm] (202 MHz, CDCl_3)= 26.95 (dd, $^3J_{\text{P,H}}=13.44$ Hz, $^1J_{\text{PH}}=520.15$ Hz), 22.58 (dd, $^3J_{\text{P,H}}=14.4$ Hz, $^1J_{\text{PH}}=526.86$ Hz)

IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] (KBr)= 3224, 2945, 2865, 2329, 1701, 1653, 1608, 1576, 1527, 1496, 1467, 1455, 1442, 1394, 1350, 1286, 1201, 1117, 1060, 1023, 977, 961, 905, 886, 860, 814, 792, 728, 695, 546, 504, 488, 481, 472, 464

6.6.13 Synthese von {[1-(2-Fluorphenyl)-4-methoxypiperidin-4-yloxy]-(2-nitrophenyl)-methyl}-triethylammonium-phosphinat **60b**



Die Reaktion wurde mit wasserfreien Lösungsmitteln und in einer Inertgasatmosphäre unter Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt. 1.00 g (4.60 mmol) [Hydroxy-(2-nitrophenyl)-methyl]-phosphonigsäure **60a** wurden mit THF kdestilliert, anschließend in 30 mL THF gelöst und 50 mg (0.46 mmol) TFA hinzugegeben. Zu dieser Lösung wurden über eine Stunde 1.91 g (9.20 mmol) Fpmp-Enolether **15** getropft und für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. 5 mL Triethylamin wurden hinzugegeben, mit 100 mL Dichlormethan verdünnt, mit 5 % NaHCO_3 -Lsg. gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan (+1 % Triethylamin) und einem Methanolgradienten (5 %-20 % v/v) gereinigt.

Ausbeute: 1.68 g (3.96 mmol, 86 %) eines gelblichen Feststoffes

DC: R_f (CH₂Cl₂/MeOH 7:3) = 0.3

MS: ESI⁺ (m/z + Na⁺) = 447.1095 (calc. C₁₉H₂₂FN₂NaO₆P 447.1092)

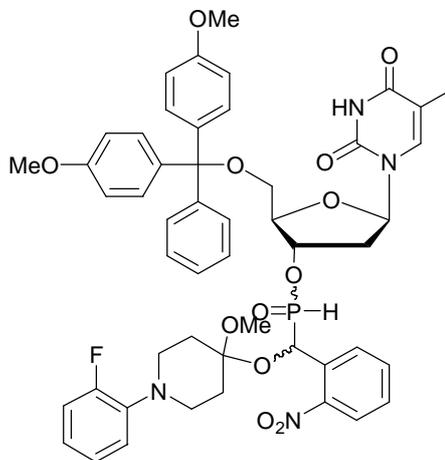
¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃) = 12.29 (bs, NH), 7.90-7.86 (m, 2H, H₂+H₆ NO₂Ar.), 7.58-7.54 (m, 1H, NO₂Ar.), 7.33-7.29 (m, 1H, NO₂Ar.), 7.01-6.84 (m, 4H, Fpmp-Ar.), 6.97 (d, 1H, $J = 527.2$ Hz, PH), 5.96 (d, 1H, $J = 14.5$ Hz, α H), 3.51-3.46 (m, 1H, CH₂ Fpmp), 3.32 (s, 3H, OMe), 3.25-3.19 (m, 1H, CH₂ Fpmp), 3.14 (dq, 6H, $J = 4.2$ Hz, $J = 7.3$ Hz, CH₂-NEt₃), 3.06 (dt, 1H, $J = 10.9$ Hz, $J = 3.3$ Hz, $J = 3.3$ Hz, CH₂ Fpmp), 3.03 (dt, 1H, $J = 11.4$ Hz, CH₂ Fpmp), 2.42 (ddt, 1H, $J = 13.8$ Hz, $J = 5.0$ Hz, $J = 2.6$ Hz, CH₂ Fpmp), 2.28 (ddd, 1H, $J = 14.1$ Hz, CH₂ Fpmp), 1.98 (ddt, 1H, $J = 12.8$ Hz, $J = 5.0$ Hz, $J = 2.7$ Hz, CH₂Fpmp), 1.84 (ddd, 1H, $J = 13.3$ Hz, $J = 10.5$ Hz, $J = 4.2$ Hz, CH₂ Fpmp), 1.41 (t, 9H, $J = 7.3$ Hz, CH₃ NEt₃)

¹³C-NMR: δ [ppm] (100 MHz, CDCl₃) = 156.09 (d, $J = 245.2$ Hz, C₂-F-Ar.), 148.25 (d, $J = 5.1$ Hz, C₂-NO₂Ar.), 140.77 (d, $J = 8.6$ Hz, C₁-F-Ar.), 135.45, 133.13 (d, $J = 2.5$ Hz, NO₂Ar.), 130.52 (d, $J = 4.5$ Hz, NO₂Ar.), 127.50 (d, $J = 2.5$ Hz, Ar.), 124.76 (d, $J = 3.6$ Hz, Ar.), 124.73 (d, $J = 2.5$ Hz, Ar.), 122.68 (d, $J = 8.1$ Hz, Ar.), 119.77 (d, $J = 2.5$ Hz, Ar.), 116.37 (d, $J = 20.9$ Hz, Ar.), 101.07 (d, $J = 8.1$ Hz, C₄-Fpmp), 68.37 (d, $J = 104.8$ Hz, C₇), 49.08 (OMe), 48.59 (d, $J = 3.1$ Hz, C₂-Fpmp), 48.46 (d, $J = 3.1$ Hz, C₂-Fpmp), 45.75 (CH₂-NEt₃), 35.52 (C₃-Fpmp), 33.23 (C₃-Fpmp), 8.84 (CH₃-NEt₃)

³¹P-NMR: δ [ppm] (202 MHz, CDCl₃) = 23.13 (dd, $J = 528.8$ Hz, $J = 12.5$ Hz)

¹⁹F-NMR: δ [ppm] (470 MHz, CDCl₃) = -123.22

6.6.14 Synthese von {[1-(2-Fluorphenyl)-4-methoxypiperidin-4-yloxy]-(2-nitrophenyl)-methyl}-phosphonigsäure-[5'-O-(4,4'-dimethoxytriphenylmethyl)-thymidin-3'-yl]-ester **51a**



600 mg (1.41 mmol) (NO₂BnFmpO)-Triethylammonium-phosphinat **60b** und 1.02 g (1.87 mmol) 5'-O-DMTr-dT **20** wurden mit Pyridin codestilliert und in 30 mL Pyridin gelöst. 520 mg (3.8 mmol) Pivaloylchlorid wurden schnell hinzugegeben. Nach 15 Min. Rühren bei Raumtemperatur wurde mit 60 mL Dichlormethan verdünnt und sofort mit 40 mL 5 %iger NaHCO₃-Lsg. gewaschen. Nach Trocknen über Na₂SO₄ wurde das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan (+0.1 % AcOH) und einem Methanolgradienten (0 %-3 % v/v) gereinigt.

Ausbeute: 900 mg (0.95 mmol, 67 %) eines gelblichen Feststoffes

DC: R_f (CH₂Cl₂/MeOH 2 % v/v) = 0.4

MS: ESI⁺ (m/z + Na⁺) = 973.3199 (calc. C₅₀H₅₂FN₄NaO₁₂P 973.3201)

³¹P-NMR: δ[ppm] (202 MHz, CDCl₃) = 32.66, 32.29, 32.14, 31.82

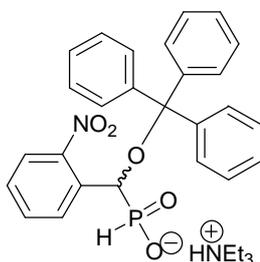
¹⁹F-NMR: δ[ppm] (470 MHz, CDCl₃) = -122.76, -122.86, -122.95, -122.99

¹H-NMR: nicht interpretierbar

¹³C-NMR: nicht interpretierbar

UV: λ_{max}[nm](MeCN) = 237(1), 268(0.55), 315(0.15)

6.6.15 Synthese von [(2-nitrophenyl)-(triphenylmethoxy)-methyl]-triethylammonium-phosphinat **60e**



Die Reaktion wurde mit wasserfreien Lösungsmitteln und in einer Inertgasatmosphäre unter Feuchtigkeitsausschluss durchgeführt. 3.00 g (13.8 mmol) [Hydroxy-(2-nitrophenyl)-methyl]-phosphonigsäure **60a** wurden mit Pyridin kdestilliert, in 50 mL Pyridin gelöst, 5.79 g (20.8 mmol) Triphenylmethylchlorid und 2.02 g (16 mmol) DMAP hinzugegeben. Nach 24 h Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von 150 mL 5 % NaHCO₃-Lsg. abgebrochen, mit Dichlormethan extrahiert, die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan und einem Methanolgradienten (0 %-5 % v/v) gereinigt.

Ausbeute: 6.19 g (11.0 mmol, 80 %) eines gelblichen Feststoffes

DC: R_f (CH₂Cl₂/MeOH 30 % v/v) = 0.5

¹H-NMR: δ [ppm] (400 MHz, CDCl₃) = 7.55-7.50 (m, 7H, Ar.), 7.11-7.05 (m, 7H, Ar.), 7.02-6.99 (m, 3H, Ar.), 6.92-6.89 (m, 1H, Ar.), 7.13 (d, 1H, J_{HP} = 524.6 Hz, PH), 5.87 (d, 1H, J_{HP} = 13.87, H7), 2.81 (q, 6H, J = 7.3 Hz, CH₂-NEt₃), 1.07 (t, 9H, J = 7.3 Hz, CH₃-NEt₃)

¹³C-NMR: δ [ppm] (100 MHz, CDCl₃) = 144.36 (C1-Tr), 135.85 (C1), 132.20 (d, J = 2.5 Hz, C3), 131.13 (d, J = 4.1 Hz, C5), 129.76 (C3-Tr), 127.92 (C2-Tr), 127.32 (C4-Tr), 126.03 (d, J = 2.5 Hz, C4), 124.02 (d, J = 1.5 Hz, C6), 88.95 (d, J = 10.1 Hz), 72.59 (d, J = 99.7 Hz, C7), 45.61 (CH₂-NEt₃), 8.97 (CH₃-NEt₃)

³¹P-NMR: δ [ppm] (202 MHz, CDCl₃) = 22.33 (dd, J = 524.0 Hz, J = 13.4 Hz)

6.7 Synthese der Oligonucleotide

6.7.1 Verwendete Reagenzien

Sämtliche Reagenzien wurden in der vom jeweils genannten Hersteller gelieferten Reinheit (DNA synthesis grade) verwendet.

Amidite

5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-nucleosyl-3'-O-(β -cyanoethylphosphor-(*N,N*-di-*iso*-propylamidit) (Thymidyl, *N*⁶-Benzoyl-2'-desoxyadenosyl, *N*⁴-Benzyol-2'-desoxycytosyl, *N*²-*iso*-Butyryl-2'-desoxyguanosyl) der Firma GlenResearch.

Die modifizierten Phosphoramidite wurden wie beschrieben synthetisiert.

Trägermaterialien

5'-O-(4,4'-Dimethoxytriphenylmethyl)-nucleosyl-3'-O-bernsteinsäureamidopropyl-CPG (controlled pored glass) (1 μ mol) der Firma GlenResearch.

Die modifizierten festphasengebundene Dimere wurden wie beschrieben synthetisiert.

Reagenzien der Firma Proligo, Hamburg:

Acetonitril (DNA grade)

Aktivator (0.25 M Dicyanoimidazol in Acetonitril)

Cap A (10 % Essigsäureanhydrid in THF)

Cap B (1-Methylimidazol, Pyridin in THF)

Deblock (0.1 M Trichloressigsäure in Dichlormethan)

Oxidizer (Iod in Pyridin und THF)

Puffer und Lösungen

0.1 M Toluolsulfonsäure : 9.5 g (50 mmol Toluol-4-sulfonsäure), 500 mL Acetonitril

Fpmp-Entschützung: 81 mL einer 0.5 M Glycin/NaCl-Lösung (3.75 g Glycin, 2.92 g NaCl, 100 mL Wasser) und 19 mL 0.5 M Salzsäure (4.17 mL 37 %ige HCl, 95.83 mL Wasser)

T_m -Wert-Bestimmung: 818 mg NaCl, 85 mg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 69 mg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
37 mg Na_2EDTA , 100 mL Wasser, pH 6.8

Nucleasepuffer: 100 mM TRIS/HCl, pH 6.5

HPLC

0.1 M TEAA: 950 mL Wasser, 13.8 mL NEt_3 , 5.6 mL AcOH, mit AcOH auf pH 6.7 und auf 1 l mit Wasser auffüllen und über Schleicher Schuell Mikrofilter (2 μm) filtrieren

Mobile Phase A (5 %MeCN)= 5 % Acetonitril, 95 % 0.1 M TEAA pH 6.7

Mobile Phase B (15 %MeCN)= 15 % Acetonitril, 85 % 0.1 M TEAA pH 6.7

Mobile Phase C (30 %MeCN)= 30 % Acetonitril, 70 % 0.1 M TEAA pH 6.7

Mobile Phase D (MeCN)= Acetonitril HPLC grade

6.7.2 Bestimmung der Trägerbeladung

Ca. 1 mg des beladenen CPG-Trägers wurde mit 10 mL 0.1 M *p*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat versetzt und die Lösung UV-spektroskopisch bei 498 nm untersucht. Die Beladung ergibt sich nach:

$$\frac{\text{Abs.}(498\text{nm}) \cdot 10\text{ml}}{\text{Einwaage}[\text{mg}]} \cdot 14.5 = \text{Beladung} \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{g}} \right]$$

6.7.3 Festphasensynthese von Oligonucleotiden

Die Festphasensynthese der Oligonucleotide erfolgte am Eppendorf/Biotronik DNA 300+ Synthesizer nach der Phosphoramiditmethode. Dafür wurden die mit den 5'-O-geschützten Nucleosiden, bzw. modifizierten Dinucleotiden beladenen CPG-Festphasen (Standardbaustein 1 μmol) in dem Synthesizer folgendem Synthesezyklus unterworfen (Anhang A)

Syntheseschritt	unmodifizierte ODN	modifizierte ODN
Entschützung	detr02	detr02
Waschen	wash02	wash02
Kuppeln	coupop02	coupop02/cofpmp
Capping	-	capfpmp
Oxidieren	oxid02	oxifpmp
Capping	cap02	capfpmp
Waschen	wash02	wash02

6.7.3.1 Trityl Assay

Zur Reaktionskontrolle wurde beim Entschützungsschritt die Lösung aufgefangen, mit 0.1 N *p*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat (TsOH) auf 10 mL aufgefüllt und davon 50 μ L mit 950 μ L 0.1 N TsOH verdünnt und UV-spektroskopisch bei 498 nm untersucht. Die Kupplungsausbeute ergibt sich aus $\frac{\text{Abs.}(1.\text{Entschützung})}{\text{Abs.}(\text{Trityl-off})}$. Die durchschnittliche

Kupplungsausbeute ergibt sich aus

$$\left(\frac{\text{Abs.}(1.\text{Entschützung})}{\text{Abs.}(\text{Trityl-off})} \right)^{\left(\frac{1}{n-1} \right)} \text{ mit } n-1 = \text{Anzahl der Kupplungen.}$$

6.7.3.2 Abspaltung vom Träger, Entschützung und Probenvorbereitung

Nach der Synthese und Abspaltung der DMTr-Schutzgruppe (Trityl-off) wurde das Trägermaterial in ein verschraubbares Eppendorf Cap überführt, 1 mL 32 % ammoniakalische wässrige Lösung hinzugegeben und 20 Min. bei 55 °C im Thermomixer geschüttelt. Das Trägermaterial wurde kurz zentrifugiert, der Überstand in ein neues Cap überführt, erneut mit 1 mL Ammoniak versetzt und für 20 Min. bei 55 °C behandelt. Die Überstände (Spaltung & Nachspaltung) wurden für 20 h im Thermomixer bei 55 °C geschüttelt, eingefroren und am Vakuum-Probenkonzentrator bei 30 °C bis zur Trockene eingengt. Beide Fraktionen wurden in 600 μ L Wasser aufgenommen, vereinigt, über Spritzenfilter (Schleicher & Schuell Spartan 13/0,2 RC) filtriert und dieser mit 400 μ L Wasser nachgespült. Sephadex-Entsalzersäulen (Amersham Pharmacia Biotech NAP-10 Sephadex g-25 DNA grade) wurden auf Wasser konditioniert. 1 mL Oligonucleotidlösung wurden auf die Säule gegeben und in 1 mL-Fractionen aufgefangen. Von den Fractionen wurde der OD₂₆₀ bestimmt. In den ersten beiden Millilitern befand sich in der Regel das entsalzte Roholigonucleotid, in dem dritten ein Gemisch aus Oligonucleotid und den abgespaltenen Schutzgruppen. Die Oligonucleotidlösungen wurden eingefroren und das Wasser am Vakuum-Probenkonzentrator entfernt. Salze wurden mit 20 mL Wasser von der Säule gewaschen und die Säule wurde erneut verwendet.

Um die in Kapitel 4.4.3 angesprochenen Spaltungsreaktionen zu unterdrücken wurden bei weiteren Synthesen die modifizierten Oligonucleotide wie folgt entschützt:

Nach Abspaltung der modifizierten Oligonucleotide vom Träger mit 25 % wässriger Ammoniak Lösung bei Raumtemperatur für 2x 15 Min. wurde die Lösung direkt am Vakuum-Probenkonzentrator bei Raumtemperatur eingengt und mit Ethanol kodestilliert. Der Rückstand wurde mit 600 µl eines Gemisches aus Ethylendiamin : Ethanol : Acetonitril : Wasser (50 : 23.75 : 23.75 : 2.5 v/v/v/v) versetzt und für 6 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Das Lösungsmittel wurde am Vakuum-Probenkonzentrator im Ölpumpenvakuum entfernt und mehrfach mit Ethanol kodestilliert.

Die Fraktionen wurden vereinigt, in 200 µl Wasser aufgenommen und die Menge an Roh-Oligonucleotid bestimmt (Kapitel 6.7.3.3)

6.7.3.3 Quantifizierung

Die Konzentration an DNA wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm bestimmt. Um die OD_{260} -Menge zu bestimmen wurde das Oligonucleotid in 200 µl Wasser aufgenommen, hiervon 20 µl mit 980 µl Wasser verdünnt und die Extinktion bei 260 nm gemessen.

Die Extinktionskoeffizienten von Oligonucleotiden wurden mit folgenden Inkrementen berechnet: g= 11.7, A= 15.4, T= 8.8 und C= 7.3 $\text{cm}^2/\mu\text{mol}$. Der Extinktionskoeffizient der Oligonucleotide ergibt sich zu $\epsilon_{\text{ODN}} = (a \cdot 15.4 + g \cdot 11.7 + t \cdot 8.8 + c \cdot 7.3) \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$ mit a, g, t, c= Anzahl der entsprechenden Basen. Bei modifizierten Oligonucleotiden wurde der berechnete Extinktionskoeffizient des unmodifizierten Oligonucleotides als Näherungswert verwendet.

Die Menge an Oligonucleotid ergibt sich nach $n[\text{nmol}] = \frac{E_{260} \cdot 1000}{e_{260} \cdot l} \cdot 1 \text{ cm}^3 \cdot 10$

Die molare Masse der Oligonucleotide ergibt sich näherungsweise zu:
 $M_{\text{ODN}} = a \cdot 312.2 + g \cdot 328.2 + c \cdot 288.2 + t \cdot 303.2 - 61 + n \cdot 135.0 + f \cdot 207.1$

mit a,g,c,t= Anzahl der entsprechenden Basen, n= Anzahl der Modifikationen, f= Anzahl der Fpmp-Schutzgruppen

6.7.3.4 Analytische HPLC

0.05 -0.1 OD der Oligonucleotidlösung wurden an einer Waters XTerra (2.5 μm , 4.6x50 mm) Umkehrphasen Ionen-Paarungssäule mit einem Triethylammoniumacetat-Puffer und einem Acetonitrilgradienten (5 %-15 % für unmodifizierte ODN, 5 %-30 % für modifizierte, Fpmp-ge- und entschützte ODN, 7 % - 11 % für Fpmp-entschützte ODN) mit einem Fluss von 1 mL/Min. über 15 Min. getrennt. hierbei wurde die HPLC-Säule auf 60°C geheizt. Die Detektion erfolgte bei 260 nm, ein DAD-Spektrum (200 bis 500 nm) wurde aufgenommen.

6.7.3.5 Reinigung der Oligonucleotide mittels HPLC

100 μl der Oligonucleotidlösung (1 μM Ansatz) wurden an einer Waters XTerra (2.5 μm , 4.6x50 mm) Umkehrphasen Ionen-Paarungssäule mit einem Triethylammoniumacetat-Puffer und einem Acetonitrilgradienten (je nach Oligonucleotid) mit einem Fluss von 1 mL/Min. über 15 Min. getrennt. Das gewünschte Oligonucleotid wurde in 1 mL Fraktionen aufgefangen und die Reinheit mittels analytischer HPLC (Kapitel 6.7.3.4) bestimmt. Die Fraktionen wurden am Vakuum-Probenkonzentrator eingengt und vereinigt. Verunreinigte Fraktionen wurden vereinigt und erneut an der HPLC gereinigt.

6.7.3.6 Abspaltung der Fpmp-Schutzgruppe

Das gereinigte Oligonucleotid wurde in 700 μl 0.5 M Glycin/HCl-Puffer pH 3.0 aufgenommen und für 36 h bei 37 °C im Thermomixer inkubiert.

Die Lösung wurde auf Sephadex-Entsalzersäulen (Amersham Pharmacia Biotech NAP-10 Sephadex g-25 DNA grade) entsalzt (Kapitel 6.7.3.2), die Reinheit mittels analytischer HPLC bestimmt. (Kapitel 6.7.3.4) und erneut gereinigt (Kapitel 6.7.3.5).

6.7.3.7 T_m -Wert Bestimmung

Je 1 nmol der komplementären Oligonucleotide wurden vereinigt, die Lösung am Vakuum-Probenkonzentrator bis zur Trockene eingengt und in 1 mL eines 140mM NaCl, 0.1 M Phosphatpuffers aufgenommen. Die Bestimmung der UV-Absorption wurde an einem UV-Spektrometer der Marke Varian Cary E1 bestimmt. Hierfür wurde zunächst zur Denaturierung zweimal ein Temperaturgradient von 10 °C pro Minute von 25 °C bis

70 °C durchlaufen. Ein Temperaturverlauf von 5 °C bis 70 °C und 70 °C bis 5 °C mit einem Temperaturgradienten von 0.5 °C pro Minute wurde fünfmal durchlaufen, die Kurven geglättet und gemittelt. Die thermodynamischen Parameter wurden über die Van't Hoff Kurvenanalyse bestimmt (Kapitel 4.4.4).

6.7.3.8 Bestimmung der Nucleasestabilität

1 nmol des Oligonucleotides wurden in 980 μ L Nucleasepuffer (100mM Tris/HCl pH 6.5) gelöst und in eine Quarzküvette gegeben. 20 μ L einer Stammlösung aus 0.8 u Exonuclease I (EC 3.1.4.1) wurden hinzugegeben (Enkonzentration 0.016 u pro mL), schnell vermischt und die Absorption bei $\lambda = 260$ nm verfolgt. Hierfür wurde in den ersten 30 Minuten jede 10 Sekunden ein Datenpunkt aufgenommen, zwischen 30 und 60 Minuten jede Minute und ab 60 Minuten alle zwei Minuten. Um ein starkes Rauschen zu verhindern wurde jeder Datenpunkt über eine Sekunde gemessen und gemittelt. In der Regel waren die ersten beiden Minuten aufgrund der Mischungseffekte nicht aussagekräftig, daher wurden die Daten erst ab diesen Zeitpunkt verwertet.

7 LITERATUR

- [1] M. Barbacid, *ras* Genes, *Ann. Rev. Biochem.*, **1987**, *56*, 779-827
- [2] M. Malumbres, M. Barbacid, Ras Oncogenes: The First 30 Years, *Nature Reviews Cancer*, **2003**, *3*, 459 -465
- [3] A. Rait, K. Pirollo, D. W. Will, A. Peyman, V. Rait, E. Uhlmann, E. H. Chang, 3'-End Conjugates of Minimally Phosphorothioate-Protected Oligonucleotides with 1-O-Hexadecylglycerol: Synthesis and Anti-*ras* Activity in Radiation-Resistant Cells, *Bioconjug. Chem.*, **2000**, *11*, 153-160
- [4] V. Benoit, B. Relic, X. de Leval, A. Chariot, M. -P. Merville, V. Bours, Regulation of HER-2 oncogene expression by cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2, *Oncogene*, **2004**, *23*, 1631-1635
- [5] C. R. Harwood, A. Wipat, Bacterial Protein Synthesis, *Mol. Med. Microbiol.*, **2002**, *1*, 321-338
- [6] O. T. Avery, C. M. MacLeod, M. McCarty, Chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus Type III, *J. Exp. Med.*, **1944**, *79*, 137-58
- [7] M. McCarty, O. T. Avery, Chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. II. Effect of desoxyribonuclease on the biological activity of the transforming substance, *J. Exp. Med.*, **1946**, *83*, 89-96
- [8] M. McCarty, O. T. Avery, Chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. III. Improved method for the isolation of the transforming substance and its application to *Pneumococcus* types II, III, and VI, *J. Exp. Med.*, **1946**, *83*, 97-104
- [9] J. B. Watson, F. H. C. Crick, Molecular Structure of Nucleic Acids, *Nature*, **1953**, *171*, 737-738
- [10] F. Nagatsugi, S. Sasaki, Chemical tools for targeted mutagenesis of DNA based on triple helix formation, *Biol. Pharm. Bull.*, **2004**, *27(4)*, 463-467

- [11] L. E. Xodo, S. Cogo, V. Rapozzi, Anti-gene strategies to down-regulate gene expression in mammalian cells, *Curr. Pharm. Des.*, **2004**, *10*(7), 805-819
- [12] S. Buchini, C. J. Leumann, Recent improvements in antigene technology, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2003**, *7*(6), 717-726
- [13] P. C. Zamecnik, M. L. Stephenson, Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1978**, *75*, 280-284.
- [14] M. L. Stephenson, P. C. Zamecnik, Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxynucleotide, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1978**, *75*, 285-288.
- [15] K. F. Pirollo, A. Rait, L. S. Sleer, E. H. Chang, Antisense therapeutics: from theory to clinical practice, *Pharmacol. Ther.*, **2003**, *99*, 55-77.
- [16] <http://www.clinicaltrials.gov>
- [17] C. M. Perry, J. A. Balfour, Formivirsen, *Drugs*, **1999**, *57*(3), 375-380
- [18] C. Marvick, First 'antisense' drug will treat CMV retinitis, *J. Am. Med. Assoc.*, **1998**, *280*, 871.
- [19] E. Nüiler, Analysts: Isis-Lilly deal validates antisense, *Nat. Biotechnol.*, **2001**, *19*, 898-899.
- [20] A. Dove, Isis and antisense face crucial test without Novartis, *Nat. Biotechnol.*, **2000**, *18*, 19.
- [21] I. Tamm, B. Dörken, G. Hartmann, Antisense therapy in oncology: new hope for an old idea?, *Lancet*, **2001**, *358*, 489-497.
- [22] A. Sandrasagra, S. A. Leonard, L. Tang, K. Teng, Y. Li, H. B. Ball, J. C. Mannion, J. W. Nyce, Discovery and development of respirable antisense therapeutics for asthma, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, **2002**, *12*, 177-181.
- [23] G. R. Devi, Prostate cancer: status of current treatments and emerging antisense therapies, *Curr. Opin. Mol. Ther.*, **2002**, *4*, 138-148.

- [24] <http://www.fda.gov/cder/foi/label/1998/20961lbl.pdf>.
- [25] <http://www.isispharm.com>
- [26] J. Kurreck, Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications, *Eur. J. Biochem.*, **2003**, 270, 1628-1644.
- [27] A. M. Belikova, V. F. Zarytova, N. I. Grineva, Synthesis of ribonucleosides and diribonucleoside phosphates containing 2-chloroethylamine and nitrogen mustard residues, *Tetrahedron Lett.*, **1967**, 37, 3557-3562.
- [28] B. M. Paterson B. E. Roberts, E. L. Kuff, Structural gene identification and mapping by DNA-mRNA hybrid-arrested cell-free translation, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **1977**, 74, 4370-4374.
- [29] S. T. Crooke, Progress in Antisense Technology, *Annu. Rev. Med.*, **2004**, 55, 61-95
- [30] S. T. Crooke, B. Lebleu, Antisense Research and Applications, **1993**, CRC Press Boca, FL
- [31] M. Sohail, E. M. Southern, Selecting optimal antisense reagents, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2000**, 44, 23-34.
- [32] W. F. Lima, V. Brown-Driver, M. Fox, R. Hanecak, T. W. Bruice, Combinatorial screening and rational optimization for hybridisation to folded hepatitis C virus RNA of oligonucleotides with biological antisense activity, *J. Biol. Chem.*, **1997**, 272, 626-638.
- [33] S. P. Ho, D. H. Britton, B. A. Stone, D. L. Behrens, L. M. Leffet, F. W. Hobbs, J. A. Miller, G. L. Trainor, Potent antisense oligonucleotides to the human multidrug resistance-1 mRNA are rationally selected by mapping RNA-accessible sites with oligonucleotide libraries, *Nucleic Acids Res.*, **1996**, 24, 1901-1907.
- [34] N. Milner, K. U. Mir, E. M. Southern, Selecting effective antisense reagents on combinatorial oligonucleotide arrays, *Nature Biotechnol.*, **1997**, 15, 537-541.
- [35] J. Kurreck, B. Bieber, R. Jahnel, V. A. Erdmann, Comparative study of DNA enzymes and ribozymes against the same full-length messenger RNA of the vanilloid receptor subtype I, *J. Biol. Chem.*, **2002**, 277, 7099-7107.

- [36] C. A. Stein, The experimental use of antisense oligonucleotides: a guide for the perplexed, *J. Clin. Invest.*, **2001**, *108*, 641-644
- [37] J. Kundo, W. Adachi, S. Umeda, T. Sunami, A. Takenaka, Crystal structures of a DNA octaplex with I-motif of G-quartets and its splitting into two quadruplexes suggest a folding mechanism of eight tandem repeats, *Nucleic Acids Res.*, **2004**, *32(8)*, 2541-2549
- [38] A. Dalpke, S. Zimmermann, K. Keeg, Immunopharmacology of CpG DNA, *Biol. Chem.*, **2004**, *32(8)*, 2541-2549
- [39] J. W. Engels, E. Uhlmann, Gensynthese, *Angew. Chem.*, **1989**, *101*, 733-752, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1989**, *28(6)*, 716-734
- [40] S. V. Vinogradov, T. K. Bronich, A. V. Kabanov, Self Assembly of Polyamine-Poly(ethylene glycol) Copolymers with Phosphorothioate Oligonucleotides, *Bioconjugate Chem.*, **1998**, *9(6)*, 805-812
- [41] D. A. Brown, S.-H. Kang, S. M. Gryaznov, L. DeDionisio, O. Heidenreich, S. Sullivan, X. Xu, A. I. Nerenberg, Effect of Phosphorothioate Modification of Oligodeoxynucleotides on Specific Preprotein Binding, *J. Biol. Chem.*, **1994**, *269(43)*, 26801-26805
- [42] M. A. Guvakova, L. A. Yakubov, I. Vlodayvsky, J. L. Tonkinson, C. A. Stein, Phosphorothioate Oligodeoxynucleotides Bind to Basic Fibroblast Growth Factor, Inhibit its Binding to Cell Surface Receptors, and Remove it from Low Affinity Binding Sites on Extracellular Matrix, *J. Biol. Chem.*, **1995**, *270(6)*, 2620-2627
- [43] J.-C. Wang, G. Just, Indolyl-oxazaphosphorine Precursors for Stereoselective Synthesis of Phosphite Triesters and Dithymidyl Phosphorothioates, *J. Org. Chem.*, **1999**, *64*, 8090-8097
- [44] Y. Lu, G. Just, Stereoselektive Synthesis of R_P-and S_P-Dithymidin Phosphorothioates via Chiral Indolooxazaphosphorine Intermediates Derives from Tryptophan, *Angew. Chem.*, **2000**, *112(24)*, 4695-4698, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**, *39(24)*, 4521-4524

- [45] S. M. Freier, K. -H. Altmann, The ups and downs of nucleic acid duplex stability: Structure-stability studies on chemically modified DNA:RNA duplexes, *Nucleic Acids Res.*, **1997**, *25*, 4429-4443
- [46] A. A. Koshkin, S. K. Singh, P. Nielsen, V. K. Rajwanshi, R. Kumar, M. Meldgaard, C. E. Olsen, J. Wengel, LNA (locked nucleic acids): Synthesis of the adenine, cytosine, guanine, 5-methylcytosine, thymine and uracil binucleoside monomers, oligomerization, and unprecedented nucleic acid recognition, *Tetrahedron*, **1998**, *54*, 3607-3630
- [47] V. K. Rajwanshi, A. E. Häkansson, R. Kumar, J. Wengel, High affinity nucleic acid recognition using 'LNA' (locked nucleic acid, (β -D-ribo configured LNA), 'xylo-LNA' (β -D-xylo configured LNA) or ' α -L-ribo configured LNA), *Chem. Comm.*, **1999**, *1999*, 2073-2074
- [48] G. Schmajuk, H. Sierakowska, R. Kole, Antisense oligonucleotides with different backbones. Modification of splicing pathways and efficacy of uptake, *J. Biol. Chem.*, **1999**, *274*, 21783-21789
- [49] N. Dias, S. Deheur, P. E. Nielsen, S. Granznov, A. van Aerschot, P. Herdewijn, C. Helene, T. E. Saison-Behmoaras, Antisense PNA tridecamers targetet to the coding region of Ha-*ras* mRNA arrest polypeptide chain elongation, *J. Mol. Biol.*, **1999**, *294*, 403-416
- [50] R. Schlingensiepen, W. Brysch, K. -H. Schlingensiepen, Antisense – From Technology to Therapy, Lab Manual and Textbook, *Blackwell Wissenschaftsverlag, Berlin*, **1997**, *Vol. 6*
- [51] S. T. Crooke, M. J. Graham, J. E. Zuckerman, D. Brooks, B. S. Conklin, L. L. Cummins, M. J. Greig, C. J. Guinasso, D. Kornburst, M. Manoharan, H. M. Sasmor, T. Schleich, K. L. Tivel, R. H. Griffey, Pharmacokinetic properties of several novel oligonucleotides analogs in mice, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1996**, *277*, 923-937

- [52] I. Barber, B. Rayner, J. L. Imbach, The Prooligonucleotide Approach. I: Esterase-Mediated Reversibility of Dithymidine S-Alkyl-Phosphorothioates to Dithymidine Phosphorothioates, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1995**, *6*, 563-568.
- [53] I. Barber, G. Tosquellas, F. Morvan, B. Rayner, J. L. Imbach, The Prooligonucleotide Approach. II: Synthesis and Stability Studies of Chimeric Oligonucleotide Models, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1995**, *6(5)*, 1441-1444.
- [54] G. Tosquellas, I. Barber, F. Morvan, B. Rayner, J. L. Imbach, The Prooligonucleotide Approach. III: Synthesis and Bioreversibility of a Chimeric Phosphorothioate Prooligonucleotide, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1996**, *6*, 457-462.
- [55] G. Tosquellas, F. Morvan, B. Rayner, J. L. Imbach, The Prooligonucleotide Approach. IV: Synthesis of Chimeric Prooligonucleotides with 6 Enzymolabile Masking Groups and Unexpected Desulfurization Side Reaction, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1997**, *7*, 263-268.
- [56] N. Mignet, F. Morvan, B. Rayner, J. L. Imbach, The Prooligonucleotide Approach. V: Influence of the Phosphorous Atom Environment on the Hydrolysis of Enzymolabile Dinucleosid Phosphotriesters, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1997**, *7*, 851-854.
- [57] G. Tosquellas, K. Alvarez, C. Dell'Aquila, F. Morvan, J. J. Vasseur, J. L. Imbach, B. Rayner, The pro-oligonucleotide approach: solid phase synthesis and preliminary evaluation of model pro-dodecathymidylates, *Nucleic Acids Res.*, **1998**, *26(9)*, 2096-2074.
- [58] J. L. Imbach, C. Périgaud, G. Gosselin, I. Lefebvre, J. L. Giradet, S. Benzaria, I. Barber, Rational Design for cytosolic delivery of nucleoside monophosphates, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1993**, *3*, 2521-2529.
- [59] C. Périgaud, G. Gosselin, J. L. Imbach, Minireview: From the pronucleotide concept to the SATE phosphate protecting groups, *Curr. Topics in Med. Chem.*, **1996**, *2*, 15-19.

- [60] S. Benzaria, H. Pélicano, R. J. Johnson, G. Maury, J. L. Imbach, A. M. Aubertin, G. Obert, G. Gosselin, Synthesis, *in vitro* Antiviral Evaluation and Stability Studies of Bis(*S*-acyl-2-thioethyl) Ester Derivatives of 9-(2-Phosphono-methoxyethyl)adenine (PMEA) as Potential PMEA Prodrugs with Improved Oral Bioavailability, *J. Med. Chem.*, **1996**, *39*, 4958-4965.
- [61] S. Peyrottes, D. Egron, I. Lefebvre, G. Gosselin, J. -L. Imbach, C. Perigaud, SATE pronucleotide approaches: an overview, *Mini Rev. Med. Chem.*, **2004**, *4(4)*, 395-408
- [62] E. Vivès, C. Dell'Aquila, J. C. Bologna, F. Morvan, B. Rayner, J. L. Imbach, Lipophilic pro-oligonucleotides are rapidly and efficiently internalized in HeLa cells, *Nucleic Acids Res.*, **1999**, *27(20)*, 4071-4076.
- [63] V. P. Pugaeva, S. I. Klochkeva, F. D. Mashbits, R. S. Eizengart, *Gig. Tr. Prof. Zabol*, **1969**, *13*, 47-48 (*Chem. Abstract* **72**, 6050z).
- [64] J. Temsamani, M. Kubert, J. Tang, A. Padmapriya, S. Agrawal, *Antisense Res. Dev.*, **1994**, *4*, 35-42.
- [65] R. P. Iyer, D. Yu, S. Agrawal, Prodrugs of Oligonucleotides: The Acyloxyalkyl Esters of Oligodeoxyribose Phosphorothioates, *Bioorganic Chemistry*, **1995**, *23*, 1-21.
- [66] R. P. Iyer, D. Yu, T. Devlin, N. Ho, S. Agrawal, Acyloxyaryl Prodrugs of Oligonucleotide Phosphorothioates, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1996**, *6(16)*, 1917-1922.
- [67] C. Meier, L. W. Habel, J. Balzarini, E. De Clercq, Lipophilic α -Hydroxybenzylphosphonates as Prodrugs of 2'-Azido-2',3'-dideoxythymidine (AZT), *Liebigs Ann.*, **1995**, 2195-2202.
- [68] C. Meier, 5',5'-O-Dinucleosid- α -hydroxybenzylphosphonsäureester als lipophile potentielle Prodrugs von 2',3'-Dideoxythymidin (ddT), *Angew. Chem.*, **1993**, *105(12)*, 1854-1856, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1994**, *33(12)*, 1704-1706
- [69] C. Meier, L. W. Habel, WHG. Laux, E. De Clercq, J. Balzarini, Homo Dinucleoside- α -Hydroxyphosphonate Diesters as Prodrugs of the Antiviral Nucleoside Analogues 2',3'-Dideoxythymidine and 3'-Azido-2',3'-dideoxythymidin, *Nucleosides Nucleotides*, **1995**, *14(3-5)*, 759-762.

- [70] C. Meier, L. W. Habel, J. Balzarini, E. De Clercq, 5',5'-Di-*O*-benzylphosphotriesters as Potential Prodrugs of 3'-Azido-2',3'-dideoxythymidine-5'-monophosphate, *Liebigs Ann.*, **1995**, 2203-2208.
- [71] C. Meier, R. P. Mauritz, Synthesis of Protected 3',5'-Di-2'-desoxythymidine-(α -hydroxy-2-nitrobenzyl)-phosphonate Diesters as Dimer Building Blocks for Oligonucleotides, *Nucleosides Nucleotides*, **1995**, *14*, 803-804.
- [72] R. P. Mauritz, Synthese und Eigenschaften von α -Hydroxybenzylphosphonat- und Phtalidyl-modifizierten Antisense-Oligonucleotiden, *Dissertation Universität-Würzburg*, **2000**.
- [73] R. P. Mauritz, C. Meier, Fmp-Protected α -Hydroxyphosphonate Diesters for the Synthesis of Pro-Oligonucleotides, *Nucleosides Nucleotides*, **1997**, *16*(5-6), 675-678.
- [74] R. P. Mauritz, C. Meier, E. Uhlmann, Synthesis of 3',5'-Dithymidyl- α -Hydroxyphosphonate Dimer Building Blocks for Oligonucleotide Synthesis - A new Pro-Oligonucleotide Approach, *Nucleosides Nucleotides*, **1997**, *16*(7-9), 1209-1212.
- [75] T. Saison-Behmoaras, B. Tocquo, I. Rey, M. Chassignol, N. T. Thuong, C. Hilone, Short Modified Antisense Oligonucleotides Directed Against Ha-*ras* Point Mutation Induce Selective Cleavage of the mRNA and Inhibit T24 Cells Proliferation, *EMBO J.*, **1991**, *10*, 1111-1118
- [76] T. Abe, T. Mizuta, T. Hatta, N. Miyano-Kurosaki, M. Fujiwara, K. Takai, S. Shigeta, T. Yokota, H. Takaku, Antisense therapy of influenza, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2001**, *13*(1), 61-69
- [77] A. Hohlfeld, C. Meier, α -Hydroxybenzylphosphonate Modified Oligonucleotides: Synthesis, Properties and A Novel Route via Monomer Building Blocks, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **2003**, *5-8*, 1123-1125
- [78] A. Hohlfeld, Synthese, Charakterisierung und Eigenschaften von Bausteinen zur Synthese α -Hydroxybenzylphosphonat-modifizierter Oligonucleotide, *Diplomarbeit Universität Würzburg*, **2000**

- [79] H. Takaku, K. Morita, T. Sumiuchi, Selective removal of terminal dimethoxytrityl groups, *Chem. Lett.*, **1983**, *11*, 1661-1664
- [80] M. V. Rao, C. B. Reese, V. Schehlmann, P. S. Yu, Use of the 1-(2-Fluorophenyl)-4-methoxypiperidin-4-yl (Fpmp) Protecting Group in the Solid-Phase Synthesis of Oligo- and Polyribonucleotides, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, **1993**, 43-55.
- [81] D. C. Capaldi, C. B. Reese, Use of the the 1-(2-Fluorophenyl)-4-methoxypiperidin-4-yl (Fpmp) and related protecting groups in oligoribonucleotide synthesis: stability of internucleotide linkages to aqueous acid, *Nucleic Acids Res.*, **1994**, *22(12)*, 2209-2216.
- [82] M. V. Rao, K. Macfarlane, Improvements to the chemical synthesis of biologically active RNA using 2'-O-Fpmp chemistry, *Nucleosides Nucleotides*, **1995**, *14(3-5)*, 911-915.
- [83] X. Liu, C. B. Reese, Preparation and cleavage reactions of 3'-thiouridyl-(3'→5')-uridine, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **2000**, 2227-2236
- [84] J. H. van Boom, P. M. J. Burgers, Use of levulinic acid in the protection of oligonucleotides via the modified phosphotriester method: Synthesis of decaribonucleotide U-A-U-A-U-A-U-A-U-A, *Tetrahedron Lett.*, **1976**, *52*, 4875-4878.
- [85] S. Iwai, E. Ohtsuka, 5'-Levulinyl and 2'-tetrahydrofuranyl protection for the synthesis of oligoribonucleotides by the phosphoramidite approach, *Nucleic Acids Res.*, **1988**, *16(20)*, 9443-9456.
- [86] J. C. Dearden, M. T. D. Cronin, T. W. Schultz, D. T. Lin, QSAR study of the toxicity of nitrobenzenes to *Tetrahymena pyriformis*, *Quant. Struct.-Act. Relat.*, **1995**, *14*, 427-432
- [87] A. K. Debnath, R. L. L. de Compadre, G. Denath, A. J. Schustermann, C. Hansch, Structure-activity relationship of mutagenic aromatic and heteroaromatic nitro compounds. Correlation with molecular orbital energies and hydrophobicity, *J. Med. Chem.*, **1991**, *34*, 786-797
- [88] D. W. Roberts, Linear free energy relationships for reactions of electrophilic halo- and pseudohalobenzenes, and their application in prediction of skin sensitization potential for S_NAr electrophiles, *Chem. Res. Toxicol.*, **1995**, *8*, 545-551

- [89] O. Mekenyan, D. W. Roberts, W. Karcher, Molecular orbital parameters as predictors of skin sensitization potential for S_NAr electrophiles, *Chem. Res. Toxicol.*, **1997**, *10*, 994-1000
- [90] V. K. Agrawal, P. V. Khadikar, QSAR Prediction of Toxicity of Nitrobenzenes, *Bioorg. Med. Chem.*, **2001**, *9*, 2035-3040
- [91] R. E. Ireland, D. M. Obrecht, *Helv. Chim. Acta.*, **1986**, *69*, 1273
- [92] D. M. Clode, W. A. Laurie, D. McHale, J. B. Scheridan, *Carbohydr. Res.*, **1985**, *139*, 161
- [93] S. Hanessian, P. Lavallee, *Can. J. Chem.*, **1975**, *53*, 2975
- [94] S. Hanessian, P. Lavallee, *Can. J. Chem.*, **1977**, *55*, 562
- [95] P. J. Garegg, T. Regberg, J. Stawinski, R. Strömberg, Formation of Internucleotidic Bonds via Phosphonate Intermediates, *Chem. Scripta*, **1985**, *25*, 280-282.
- [96] P. J. Garegg, J. Stawinski, R. Strömberg, Nucleoside Hydrogenphosphonates in Oligonucleotide Synthesis, *Chemica Scripta*, **1986**, *26*, 59-62.
- [97] P. J. Garegg, I. Lindh, T. Regberg, J. Stawinski, R. Stroemberg, C. Henrichson, Nucleoside H-Phosphonates. III. Chemical Synthesis of Oligodeoxyribo-nucleotides by the Hydrogenphosphonate Approach, *Tetrahedron Lett.* , **1986**, *27(34)*, 4051-4054.
- [98] P. J. Garegg, I. Lindh, T. Regberg, J. Stawinski, R. Stroemberg, C. Henrichson, Nucleoside H-Phosphonates. IV. Automated Solid Phase Synthesis of Oligodeoxyribonucleotides by the Hydrogenphosphonate Approach, *Tetrahedron Lett.* , **1986**, *27(34)*, 4055-4058.
- [99] A. Kers, I. Kers, A. Kraszewski, M. Sobkowski, T. Szabó, M. Thelin, R. Zain, J. Stawinski, Nucleoside Phosphonates. Development of Synthetic Methods and Reagents, *Nucleosides Nucleotides*, **1996**, *15(1-3)*, 361-378.
- [100] P. J. Garegg, J. Stawinski, R. Stroemberg, Nucleoside H-Phosphonates. 8. Activation of Hydrogen Phosphonate Monoesters by Chlorophosphates and Arensulfonyl Derivatives, *J. Org. Chem.* , **1987**, *52(2)*, 284-287.

- [101] J. Stawinski, A. Kraszewski, How to get out of two Phosphorous Chemistries. Studies on H-Phosphonates, *Acc. Chem. Res.*, **2002**, *35*, 952-960
- [102] D. E. Bergstrom, P. W. Shum, Synthesis and Characterization of a New Fluorine Substituted Nonionic Dinucleoside Phosphonate Analogue, *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, *25*, 3953-3958
- [103] G. S. Ti, L. Gaffney, R. A. Jones, Transient Protection: Efficient One-Flask Synthesis of Protected Deoxynucleosides, *J. Am. Chem. Soc.*, **1982**, *104*, 1316-1319.
- [104] H. Rosemeyer, M. Kreemerova, F. Seela, 9-(2'-Deoxy- β -D-xylofuranosyl)-adenine Building Blocks for Solid-Phase Synthesis and Properties of Oligo(2'-deoxy-xylo-nucleotides), *Helv. Chim. Acta*, **1991**, *74*, 2054-2067.
- [105] J. Jankowska, M. Sobowski, J. Stawinski, A. Kraszewski, Studies on aryl H-Phosphonates. I Efficient method for the preparation of deoxyribo- and ribonucleoside 3'-H-Phosphonate monoesters by transesterification of Diphenyl-H-phosphonate, *Tetrahedron Lett.*, **1994**, *35*, 3355-3358
- [106] A. Kers, I. Kers, J. Stawinski, M. Sobkowski, A. Kraszewski, Studies on Aryl H-Phosphonates. 3. Mechanistic Investigations Related to the Disproportionation of Diphenyl H-Phosphonate Under Anhydrous Basic Conditions, *Tetrahedron*, **1996**, *52(29)*, 9931-9944.
- [107] K. Troev, E. Georgiev, D. M. Roundhill, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1990**, *63*, 1284-1285
- [108] K. Troev, Dialkyl Hydrogen Phosphonates 1. Structure of Dialkyl Hydrogen Phosphonates, *Rev. Heteroatom Chem.*, **1993**, *8*, 165-181
- [109] K. Troev, Dialkyl Hydrogen Phosphonates 2. Substitution Reactions at Phosphorous Atom, *Rev. Heteroatom Chem.*, **1994**, *10*, 91-121
- [110] S. Sigurdsson, R. Strömberg, Side Reaction in the H-Phosphonate Approach to Oligonucleotide Synthesis : A Kinetic Investigation on Bisacylphosphite Formation and 5'-O-Acylation, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **2003**, *22(1)*, 1-12

- [111] F.Seela, U.Kretschmer, Stereochemistry of Oxidation of Diastereomeric d(TpA) Phosphonates with Sulphur and Iodine-[18O] Water, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1990**, 1154-1159.
- [112] F.Seela, U.Kretschmer, Diastereomerically Pure Rp and Sp Dinucleoside H-Phosphonates: The Stereochemical Course of Their Conversion into P-Methylphosphonates, Phosphorothioates, and [18O] Chiral Phosphates, *J.Org.Chem.*, **1991**, 56, 3861-3869.
- [113] W. Fendrich, **2000**, *Diplomarbeit Universität Hamburg*
- [114] W. Fendrich, C. Meier, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **2003**, 5-8, 1127-1129
- [115] D. V. Patel, K. Rielly-Ganuin, D. E. Ryono, Preparation of Peptidic α -Hydroxy Phosphonates. A New Class of Transition State Analog Renin inhibitors, *Tetrahedron Lett.*, **1990**, 31, 5587.
- [116] D. V. Patel, K. Rielly-Gauvin, D. E. Ryono, Peptidic α -Hydroxy Phosphinyls C-Termial Modification Methodology, *Tetrahedron Lett.*, **1990**, 31, 5591-5594
- [117] V. S. Abramov, Reaction of Aldehydes with Phosphites, *Dokl. Akad. Nauk. SSSR*, **1954**, 95, 991-992.
- [118] F. Hammerschmidt, E. Schneyder, E. Zbiral, Neuartige synthetische Aspekte der Phosphonat-Phosphat-Umlagerung. Ein allgemeiner Zugang zu 1,2-Propadienylphosphaten, *Chem. Ber.*, **1980**, 113, 3891-3897.
- [119] S. Bühler, I. Lagoja, H. Giegrich, K.-P. Stengele, W. Pfeleiderer, New Types of very Efficient Photolabile Protecting Groups Based upon the [2-(2-Nitrophenyl)propoxy]carbonyl (NPPOC) Moiety, *Helv. Chim. Acta*, **2004**, 87, 620-659
- [120] S. Saxena, M.Sharma, Purnanand, One Pot Synthesis of Diastereomeric Phosphonates, *Phosphorus Sulfur Silicon*, **2000**, 167, 259-266
- [121] R. M. Moriarty, A. Tao, C. Condeiu, R. Gilardi, Diphenyl methylphosphonate as a phosphorylation reagent with high diastereoselectivity at phosphorus, *Tetrahedron Lett.*, **1997**, 38(15), 2597-2600

- [122] J. Szevczyk, B. Lejczak, P. Kafarski, Transesterferication of Diphenyl Phosphonates using the Potassium Fluoride/Crown Ether/Alkohol System; Part 1. Transesterferication of Diphenyl 1-(Benzyloxycarbonylamino)-alkanephosphonates, *Synthesis*, **1982**, 5, 409-412
- [123] B. Lejczak, P. Kafarski, J. Szevczyk, Transesterification of diphenyl phosphonates using the potassium fluoride/crown ether/alcohol system. Part 2. The use of diphenyl 1-aminoalkanephosphonates in phosphonopeptide synthesis, *Synthesis*, **1982**, 5, 412-414
- [124] A. Mucha, P. Kafarski, Transesterferication of monophenyl phosphonamidates – chemical modelling of serine protease inhibition, *Tetrahedron*, **2002**, 58, 5855-5863
- [125] R. Neidlein, H. Keller, R. Boese, Mild Preparation of 1-Benzyloxy-iminoalkylphosphonic Dichlorides: Application to the Synthesis of Cyclic Phosphonic Diesters and Cyclic Monoester Amides, *Heterocycles*, **1993**, 35(2), 1185-1203
- [126] K. Taira, D. G. Gorenstein, Stereoelectronic Effects on the Basicity and Nucleophilicity of Phosphites and Phosphates. Ab Initio Molecular Orbital Calculations and the α -Effect, *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, 106, 7825-7831
- [127] Noch nicht veröffentlichte Ergebnisse
- [128] F. R. Atherton, A. T. Openshaw, A. R. Todd, *J. Chem. Soc.*, **1945**, 660-663
- [129] F. R. Atherton, A. R. Todd, *J. Chem. Soc.*, **1947**, 674-678
- [130] Y. Ding, Z. Liu, H. Zhou, W. Wang, The Nucleophile-Catalyzed Atherton-Todd Reaction, *Phosphorus Sulfur and Silicon*, **1998**, 134/135, 531-536
- [131] L. Liu, G. Li, X. Zeng, L. Fu, R. Cao, The Atherton-Todd Reaction of Hydridophosphoranes, *Heteroatom Chem.*, **1996**, 7(2), 131-136
- [132] E. M. Georgiev, J. Kaneti, K. Troev, D. M. Roundhill, An ab Initio Study of the Mechanism of the Atherton-Todd Reaction between Dimethyl Phosphonate and Chloro-and Fluoro-Substituted Methanes, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 10964-10973

- [133] J. W. Perich, P. F. Alewood, R. B. Johns, ^{31}P NMR spectroscopy studies on the diorganyl phosphorochloridate/pyridine phosphorylation procedure, *Phosphorus Sulfur and Silicon*, **1995**, *105*, 1-10
- [134] J. Nielsson, Studies on Oxidative Couplings in H-Phosphonate Chemistry, *Doctoral Dissertation, Stockholm University*, **2004**
- [135] N. T. Thuong, M. Cassagnol, *Tetrahedron Lett.*, **1980**, *21*, 2063-2066
- [136] W. R. Purdum, K. D. Berlin, S. J. Kelly, L. G. Butler, Synthesis of monoesters of aryl- (or alkyl-) phosphonic acids of selected arenols. Study of the effect of dimethylformamide on the preparation of 2-naphthylphenylphosphonic acid via proton and phosphorus-31 nuclear magnetic resonance analysis. *J. Org. Chem.*, **1976**, *41*, 1160-1165
- [137] A. Dunger, H. H. Limbach, K. Weisz, Geometry and Strength of Hydrogen Bonds in Complexes of 2'-Deoxyadenosine with 2'-Deoxyuridine, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 10109-10114
- [138] E. M. B. Janke, A. Dunger, H. H. Limbach, K. Weisz, Hydrogen bonding in complexes of adenosine and 4-thiouridine: a low-temperature NMR study, *Magn. Res. Chem.*, **2001**, *39*, 177-188
- [139] M. G. M. Purwanto, K. Weisz, Non-Natural Nucleosides for the Specific Recognition of Watson-Crick Base Pairs, *Curr. Org. Chem.*, **2003**, *7*, 427-446
- [140] S. Amberg, J. W. Engels, Synthesis and Properties of Nonpolar DNA (Arylalkyl)phosphonates, *Helv. Chim. Acta*, **2002**, *85*, 2503-2517
- [141] D. Albouy, G. Etemad-Moghadam, M. König, Phosphorylating Power of Red Phosphorous towards Aldehydes in Basic and in Acidic Media, *Eur. J. Org. Chem.*, **1999**, 861-868
- [142] A. Brun, D. Albouy, E. Perez, I. Rico-Lattes, G. Etemad-Moghadam, Self-Assembly and Phase Behavior of New (α -Hydroxyalkyl)phosphorus Amphiphiles, *Langmuir*, **2001**, *17*, 5208-5215

- [143] T. Wada, R. Kato, T. Hata, Nonoxidative Chlorination of Dialkyl Phosphonates to Dialkyl Phosphorodichloridites. A new Approach to Oligonucleotide Synthesis, *J. Org. Chem.*, **1991**, *56*, 1243-1250
- [144] M. de Fernandez, C. P. Vlaar, H. Fan, Y.-H. Liu, F. R. Fonczek, R. P. Hammer, Synthesis of Phosphonate and Thiophosphonate Esters and Amides from Hydrogen-Phosphinates by a Novel One-Pot Activation-Coupling-Oxidation Procedure, *J. Org. Chem.*, **1995**, *60*, 7390-7391
- [145] M. Faja, C. B. Reese, Q. Song, P.-Z. Zhang, Facile preparation of acetals and enols derived from 1-arylpiperidin-4-ones, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, **1997**, 191-194
- [146] R. L. Letsinger, W. B. Lunsford, *J. Am. Chem. Soc.*, **1976**, *98(12)*, 3655-3661
- [147] H. Köster, H. Blocker, R. Frank, S. Geussenhainer, W. Kaiser, Total synthesis of a structural gene for the human peptide hormone angiotensin, *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.*, **1975**, *356(10)*, 1585-1593
- [148] S. L. Beaucage, M. H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.*, **1981**, *22(20)*, 1859-1862
- [149] J. Biernat, H. Hasselmann, B. Hofer, N. Kennedy, H. Köster, *Protein Eng.*, **1987**, *1(4)*, 345-351
- [150] H. Köster, N. D. Sinha, Process for the preparation of oligonucleotides, US Patent No. 4725677, **1984**
- [151] N. D. Sinha, J. Biernat, J. McManus, H. Köster, Betacyanoethyl-*N,N*-dialkylamino/*N*-morpholino monochloro phosphoramidites: new phosphitylating agents facilitating ease of deprotection and work-up of synthesized oligonucleotides, *Tetrahedron Lett.*, **1983**, *24*, 5843
- [152] N. D. Sinha, J. Biernat, J. McManus, H. Köster, Polymer support oligonucleotide synthesis: XVIII. Use of betacyanoethyl-*N,N*-dialkylamino phosphoramidite of deoxynucleosides for the synthesis of DNA fragments simplifying deprotection and isolation of the final product, *Nucleic Acids Res.*, **1984**, *12 (11)*, 4539
- [153] <http://www.glenres.com> Produktinformationen von GlenResearch

- [154] R. H. Alul, C. N. Singman, G. Zhang, R. L. Letsinger, Oxaryl-CPG: a labile support for synthesis of sensitive oligonucleotide derivatives, *Nucleic Acids Res.*, **1991**, *19*, 1527-1532
- [155] E. Anderson, T. Brown, D. Picken, Novel Photocleavable Universal Support for Oligonucleotide Synthesis, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **2003**, *22(5-8)*, 1403-1406
- [156] J. Muth, Antisense Oigonucleotide: Synthese, Charakterisierung und ihre biologische Anwendung, *Dissertation Universität Frankfurt*, **1993**
- [157] W. Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structur*, Springer-Verlag, **1984**, 141-149
- [158] N. Sugimoto, S. Nakano, M. Katoh, A. Matsumura, H. Nakamuta, T. Ohmichi, M. Yoneyama, M. Sasaki, Thermodynamic parameters to predict stability of RNA/DNA hybrid duplexes, *Biochemistry*, **1995**, *34*, 11211–11216
- [159] N. Sugimoto, S. Nakano, M. Yoneyama, K. Honda, Improved thermodynamic parameters and helix initiation factor to predict stability of DNA duplexes, *Nucleic Acids Res.*, **1996**, *24*, 4501–4505
- [160] P. Wu, S. Nakano, N. Sugimoto, Temperature dependence of thermodynamic properties for DNA/DNA and RNA/DNA duplex formation, *Eur. J. Biochem.*, **2002**, *269*, 2821–2830
- [161] R. Owczarzy, P. M. Vallone, F. J. Gallo, T. M. Paner, M. J. Lane, A. S. Benight, Predicting Sequence-Dependent Melting Stability of Short Duplex DNA Oligomers, *Biopolymers*, **1997**, *44*, 217-239
- [162] H. Wynberg, A. A. Smaardijk, *Tetrahedron Lett.*, **1983**, *24*, 5899
- [163] A. A. Smaardijk, S. Noorda, F. van Bolhulis, H. Wynberg, *Tetrahedron Lett.*, **1985**, *26*, 493
- [164] T. Yokomatsu, T. Yamagishi, S. Shibuya, Enantioselective synthesis of α -hydroxyphosphonates through asymmetric Pudovic reaktionen with chiral lanthanoid and titanium alkoxides, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1997**, 1527-1533

8 GEFAHRSTOFFVERZEICHNIS

Chemikalien	R-Sätze	S-Sätze	Gef.- Symbole
1,1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazan	11-20/21/22-34	16-36/37/39-45	F, C
18-Krone-6	22	24/25	Xn
2'-Desoxyadenosin	-	22-24/25	-
2-Fluoranilin	22-36/38	26	Xn
2-Nitrobenzaldehyd	-	24/25	-
2-Nitrobenzylalkohol	-	-	-
3,4-Dihydro-2H-pyran	11-19-36/38-20	9-16-29-43.3	F, Xn
3-Chlorpropionylchlorid	14-22-26-34	23-26-36/37/39-45	T+
4-(Dimethylmino)-pyridin	24/25-36/38	22-36/37-45	T
4,4'-Dimethoxytriphenyl- methylchlorid	-	22-24/25	-
Aceton	11-36-66-67	9-16-26	F, Xi
Acetonitril	11-20/21/22-36	16-36/37	F, Xn
Acetylchlorid	11-14-34	9-16-26-45	F, C
Aluminiumchlorid	34	7/8-28.1-45	C
Aluminiumoxid	-	22	-
Ammoniaklösung 25%	34-50	26-36/37/39-45-61	C, N
Anisaldehyd	36/38		Xi
Benzol +	45-11-E48/23/24/25	53-45	T, F
Benzol d ₆			
Benzotriazol-1-yl- <i>N,N,N',N'</i> - tetramethylharnstoff- tetrafluoroborat	2-36/37/38	15	E, Xi
Benzoylchlorid	34	26-45	C
Bernsteinsäureanhydrid	36/37	25	Xi
Calciumchlorid	36	22-24	Xi
Calciumhydrid	15	7/8-24/25-43.6	F
Chloroform +	22-38-40-48/20/22	36/37	Xn
Chloroform d ₁			
Dichlormethan +	40	23.2-24/25-36/37	Xn
Dichlormethan d ₂			
Dicyanoimidazol	37/38-41	26-39	Xi
Diethylether	12-19-22-66-67	9-16-29-33	F+, Xn
Diethylphosphit	36/37/38	26-36/37/39	Xi
Diisopropylether	11-19-66-67	9-16-29-33	F
Dimethylformamid	61-E20/21-36	53-45	T
Dimethylsulfat	45-E25-E26-34-43-68	53-45	T+

Dimethylsulfoxid+	-	24/25	-
Dimethylsulfoxid d ₆			
Dioxan	11-19-36/37-40-66	9-16-36/37-46	F, Xn
Diphenylphosphit	36/37/38	26-36	Xi
Essigsäure	10-35	23.2-26-36/37/39-45	C
Ethanol	11	7-16	F
Ethen	12	9-16-33	F+
Ethylacetat	11-36-66-67	16-26-33	F, Xi
Hydrazinhydrat	45-E23/24/25-34-43-50/53	53-26-36/37/39-45- 60-61	T, N
Imidazol	22-34-63	22-26-36/37/39-45	C
Iod	20/21-50	23.2-25-61	Xn, N
Iodmethan	21-23/25-37/38-40	36/37-38-45	T
<i>iso</i> Propanol	11-36-67	7-16-24/25-26	F, Xi
Kalium	14/15-34	5.3-8-43.6-45	F, C
Kaliumcarbonat	36/37/38	22-26	Xi
Kaliumfluorid	23/24/25	26-45	T
Kieselgel	-	22	-
Levulinsäure	22-36/37/38	22-26	Xn
Methanol +	11-23/24/25-39/23/24/25	7-16-36/37-45	F, T
Methanol d ₄			
N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid	22-24-41-43	24-26-37/39-45	T
N,N-Di <i>iso</i> propylamin	11-20/22-34	16-26-36/37/39-45	F, C
N,N-Di <i>iso</i> propylethylamin	11-22-34-52/53	16-26-36/37/39-45- 61	F, C
Natrium	14/15-34	5.3-8-43.7-45	F, C
Natriumborhydrid	15-25-34	14.2-26-36/37/39- 43.6-45	F, T
Natriumcarbonat	36	22-26	Xi
Natriumhydrid	15-34	7/8-26-36/37/39- 43.6-45	F, C
Natriumhydrogencarbonat	-	-	-
Natriumhydroxid	35	26-37/39-45	C
Natriummethanolat	11-14-34	8-16-26-43.6-45	F, C
Natriumsulfat	-	-	-
<i>n</i> -Butyllithium	14/15-17-34-48/20-62	6.1-26-33-36/37/39- 45	F, C, N
Oxalylchlorid	14-23-29-34-37	26-36/37/39-45	T
Petrolether	11-38-48/20-51/53-62-65-67	16-23.2-24-33-36/37- 61-62	F, Xn, N
Phosphorige Säure	22-35	26-36/37/39-45	C
Phosphorpentachlorid	14-22-26-34-48/20	7/8-26-36/37/39-45	T+

Phosphorpentoxid	35	22-26-45	C
Phosphortrichlorid	14-26/28-35-48/20	7/8-26-36/37/39-45	T+, C
Phosphorylchlorid	14-22-26-35-48/23	7/8-26-36/37/39-45	T+, C
Pivalinsäurechlorid	11-22-23-34-37	16-26-36/37/39-45	F, T
Pyridin +	11-20/21/22	11-20/21/22	F, Xn
Pyridin d ₅			
Salzsäure 37%	34-37	26-36/37/39-45	C
Schwefelsäure	35	26-30-45	C
Silberoxid	8-34-44	26-36/37/39-45	O, C
<i>tert</i> Butyldiphenylchlorsilan	14-34-37	26-36/37/39-45	C
Tetrachlorkohlenstoff	23/24/25-40-48/23-52/53-59	23.2-36/37-45-59-61	T, N
Tetrahydrofuran	11-19-36/37	16-29-33	F, Xi
Thionylchlorid	14-20/22-29-35	26-36/37/39-45	C
Thymidin	-	22-24/25	-
Toluol	11-20	16-25-29-33	F, Xn
Toluol-4-sulfonsäure Monohydrat	36/37/38	26-37	Xi
Triethylamin	11-20/21/22-35	3-16-26-29-36/37/39-45	F, C
Triethylamin Trihydrofluorid	26/27/28-35	7/9-26-36/37/39-45	T+, C
Trifluoressigsäure	20-35-52/53	9-26-27-28.1-45-61	C
Trimethylbromsilan	10-14-34-37	7/9-26-36/37/39-45	C
Trimethylchlorsilan	11-14-35-37	7/9-16-26-36/37/39-45	F, C
Trimethylorthoformiat	11-36	16-23.2-24-26	F, Xi
Triphenylmethylchlorid	38	22-25	Xi
Unterphosphorige Säure	34	26-36/37/39-45	C

9 ANHANG

Anhang A DNA-Synthesizerprotokolle

Abkürzungen:

Acetonitril (ACN), manifested waste (mw), ct (column top), cb (column bottom), Amidit (AMD), TET (Aktivator Dicyanoimidazol), Adenosin-phosphoramidit (A), Thymidin-PA (T), Cytosin-PA (C), Guanodin-PA (G), Modifiziertes-PA (Z), Trichloressigsäure (TCA), Cap A (CPA), Cap B (CPB), dmt (Ausgang f. Tritylassay), Oxidizer Lösung (OXI)

Programme:

Entschützen	detr02	detr02
Waschen	wash02	wash02
Kuppeln	coupop02	coupop02
Capping	cap02	capfmp
Oxidieren	oxi02	oxifmp
Capping	--	capfmp
Waschen	wash02	wash02

coupop02:

Step	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Vol	10	20	1	1	80		80	1	10
Source	ACN	GAS	GAS	GAS	GAS	ACN	GAS	GAS	GAS
Mix									
Dest	mw	mw	mw	mw	ct	cb	ct	mw	mw
Opto						y			
Delay/s				60					
Table			1					4	

table:

Nr. / AMD	A	T	C	G	Z
1	cobrstla	cobrstla	cobrstla	cobrstla	cofmp

cobrstla

Step	1	2	3	4	5	6
Vol		10		20	10	20
Source	AMD	AMD	AMD	GAS	ACN	GAS
Mix	TET	TET	TET			
Dest	cb	cb	cd	mw	mw	mw
Opto	y		y			
Delay/s	15		15			

cofmp

Step	1	2	3	4	5	6	7	8
Vol		10		10		20	10	20
Source	AMD	AMD	AMD	AMD	AMD	GAS	ACN	GAS
Mix	TET	TET	TET	TET	TET			
Dest	cb	cb	cb	cb	cb	mw	mw	mw
Opto	y		y		y			
Delay/s	60		60		60			

detr02

Step	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Vol	20		60	20		60	20		60	20		150	10
Source	TCA	TCA	GAS	GAS									
Mix													
Dest	dmt	mw											
Opto		y			y			y			y		
Delay/s		6			6			6			6		

wash02

Step	1	2	3	4	5	6	7
Vol	20		80	20		80	10
Source	ACN	ACN	GAS	ACN	ACN	GAS	GAS
Mix							
Dest	cb	cb	cb	cb	cb	cb	mw
Opto		y			y		
Delay/s							

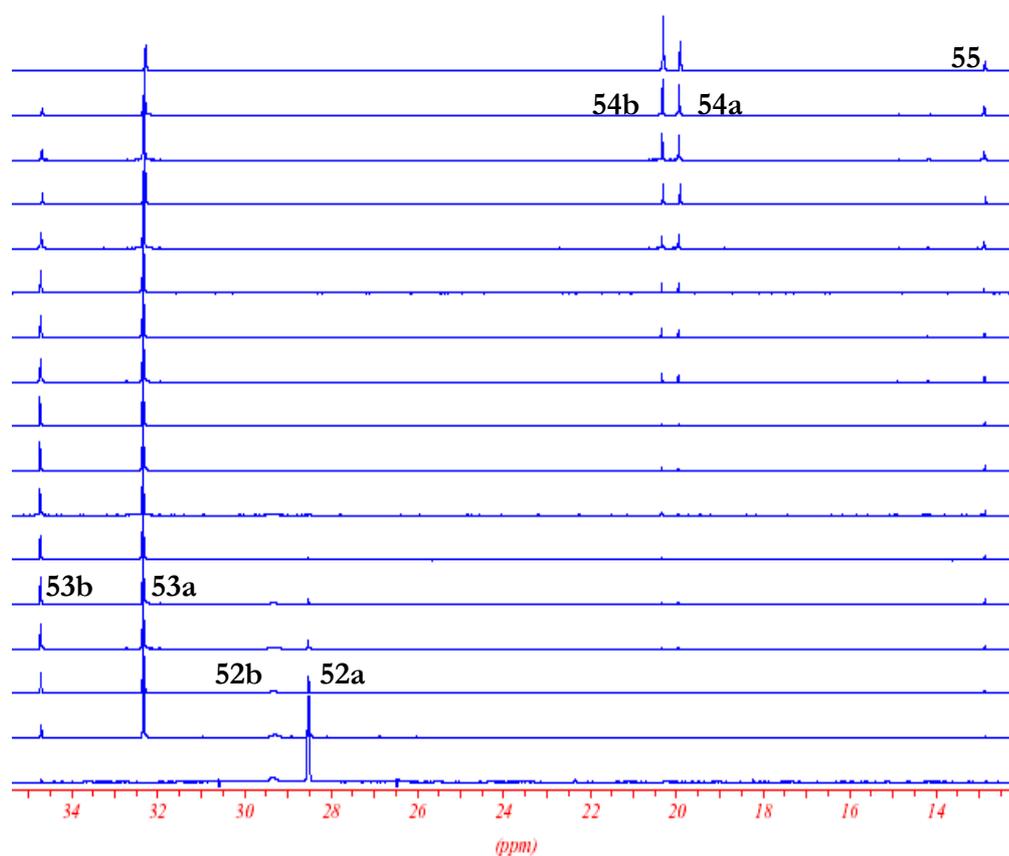
cap02

Step	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Vol	20		3		80	20		80	10
Source	CPA	CPA	CPA	CPA	GAS	ACN	ACN	GAS	GAS
Mix	CPB	CPB	CPB	CPB					
Dest	cb	mw							
Opto		y		y			y		
Delay/s		3	3	8					

oxi02

Step	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Vol	15		3		80	20		80	10
Source	OXI	OXI	GAS	OXI	GAS	ACN	ACN	GAS	GAS
Mix	CPB	CPB	CPB	CPB					
Dest	cb	mw							
Opto		y		y			y		
Delay/s		2	2	6					

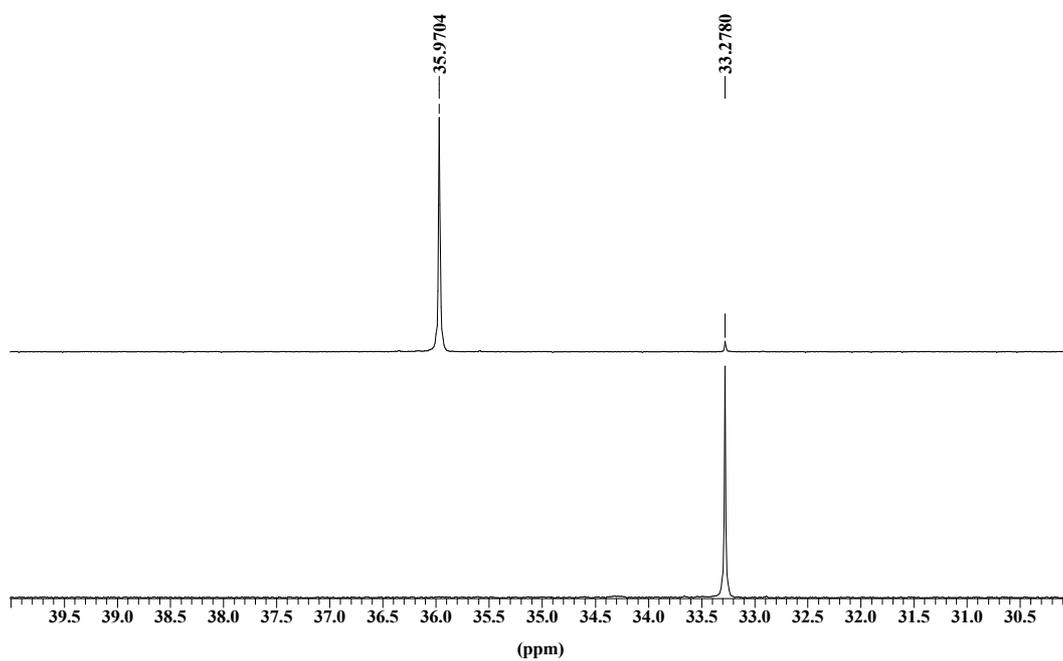
ANHANG D ATHERTON-TODD REAKTIONSKINETIK



Daten:

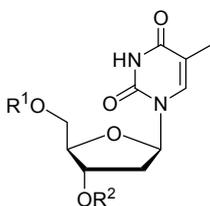
t[Min.]	55	54a	54b	52a	52b	53a	53b
0	0	0	0	78,12	21,88	0	0
2	0,33	0	0	32,56	17,04	43,6	6,32
4	1,13	0	0,21	12,91	12,09	61,31	12,03
6	1,33	0,25	0,27	5,67	9,22	67,71	14,87
8	1,8	0,43	0,55	3,09	6,28	70,75	16,46
10	1,94	0,44	0,86	1,35	4,71	72,35	17,76
12	1,98	0,82	1,08	0,78	3,19	72,44	19,04
14	2,02	1,12	1,3	0,41	2,28	73,03	19,17
16	2,15	1,28	1,38	0,19	1,74	72,98	19,51
44	2,99	3,9	3,89	0	0	69,9	18,6
50	3,02	4,6	4,54	0	0	68,86	18,32
57	3,27	5,2	5,2	0	0	68,31	17,35
116	4,37	9,38	9,34	0	0	62,99	13,24
176	5,04	12,39	13,02	0	0	58,71	10,26
236	5,61	15,65	15,8	0	0	54,79	7,48
388	6,5	17,74		0	0	46,97	4,6
1369	8,53	23,48	23,68	0	0	23,66	0,2

ANHANG E SEPARIERUNG DER DIASTEREOMERE 53A & 53B

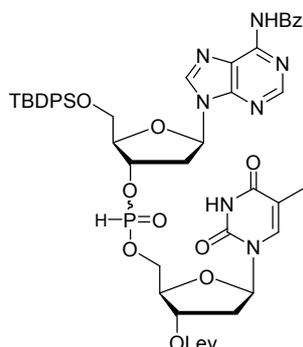


^{31}P -NMR-Spektren der getrennten, diastereomeren Phosphonchloridate **53a&b** aus der Phosphinat-Atherton-Todd-Reaktion

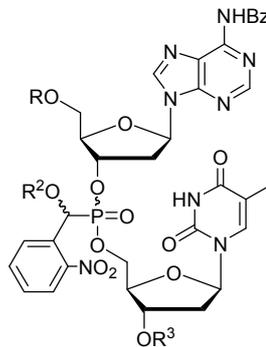
10 VERBINDUNGSLISTE



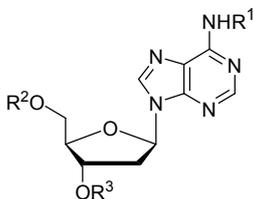
- 18 R¹ = H, R² = H
 20 R¹ = DMTr, R² = H
 16 R¹ = H, R² = Lev



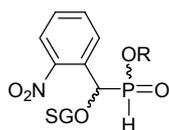
12



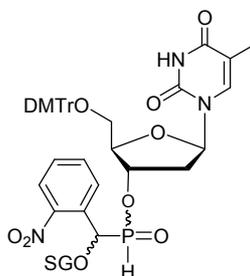
- 27 R = TBDPS, R² = H, R³ = Lev
 28 R = TBDPS, R² = Fmp, R³ = Lev
 30 R = H, R² = Fmp, R³ = Lev
 1 R = DMTr, R² = Fmp, R³ = Lev
 2 R = DMTr, R² = Fmp, R³ = H
 3 R = DMTr, R² = Fmp, R³ = P(C₂H₄CN)(NiPr)₂
 4 R = DMTr, R² = Fmp, R³ = succNnPr-CPG
 31 R = DMTr, R² = Fmp, R³ = succ
 56 R = TBDPS, R² = Me, R³ = Lev



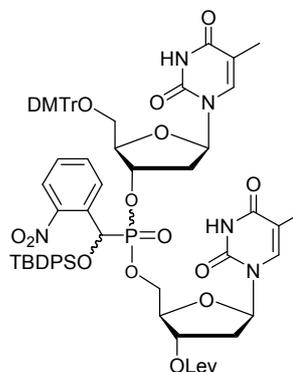
- 24 R¹ = H, R² = H, R³ = H
 24b R¹ = Bz, R² = H, R³ = H
 25 R¹ = Bz, R² = TBDPS, R³ = H
 17 R¹ = Bz, R² = TBDPS, R³ = PH(O)OPh
 15 R¹ = Bz, R² = TBDPS, R³ = PHO₂(HNEt₃)
 26 R¹ = H, R² = TBDPS, R³ = PHO₂(HNEt₃)



- 60a SG = H, R = H
 60b SG = Fmp, R = HNEt₃
 60c SG = TBDPS, R = HNEt₃
 60d SG = THP, R = HNEt₃
 60e SG = Tr, R = HNEt₃
 76a SG = TBDPS, R = OMe
 76b SG = TBDPS, R = O/Pr



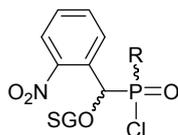
- 51a SG = Fmp
 51b SG = TBDPS
 51c SG = THP
 51d SG = Tr



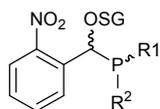
32



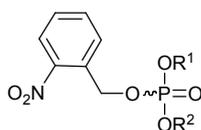
- 33a** R= OPh
33b R= OEt
33c R= OH



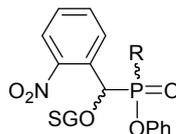
- 50a** SG=Fmpmp, R=O^{DMTr}dT
50b SG=TBDPS, R=O^{DMTr}dT
53 SG=TBDPS, R=OiPr
74a SG=Fmpmp, R=O⁻
74a SG=Fmpmp, R=Cl



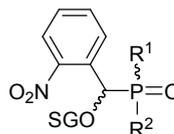
- 5a** SG= Fmpmp, R¹= ODMTrdT, R²= N(*i*Pr)₂
5b SG= THP, R¹= ODMTrdT, R²= N(*i*Pr)₂
5c SG= TBDPS, R¹= ODMTrdT, R²= N(*i*Pr)₂
66a SG= Fmpmp, R¹= R²= N(*i*Pr)₂
66b SG=THP, R¹= R²= N(*i*Pr)₂
72a SG=Fmpmp, R¹= R²= Cl
72b SG=THP, R¹= R²= Cl
73a SG= Fmpmp, R¹= R²= OMe
73b SG=THP, R¹= R²= OMe
84a SG=TBDPS, R¹= OMe, R²= Cl
85a SG=TBDPS, R¹= OMe, R²= N(*i*Pr)₂
84b SG=TBDPS, R¹= O*i*Pr, R²= Cl
85b SG=TBDPS, R¹= O*i*Pr, R²= N(*i*Pr)₂



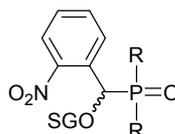
- 34** R¹=R²= Ph
58 R¹=R²= Et
29 R¹=TBDPS^{dA^{Bz}}, R²= dT_{Lev}



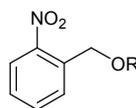
- 37a** SG= Fmpmp, R=OMe
37b SG= Fmpmp, R=O*i*Pr
38a SG= THP, R=OMe
38b SG= THP, R=O*i*Pr
36 SG= THP, R=^{DMTr}dT



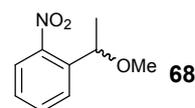
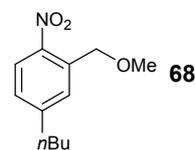
- 49** SG=Fmpmp, R¹=OHNEt₃, R²=OMe
54 SG=TBDPS, R¹=O*i*Pr, R²=OMe
55 SG=TBDPS, R¹=O*i*Pr, R²= OH
75a SG=Fmpmp, R¹=O⁻, R²= N(*i*Pr)₂
75a SG=Fmpmp, R¹= R²= N(*i*Pr)₂



- 6a** SG= H, R= OPh
6b SG= H, R= OEt
6c SG= H, R= OH
7a SG= Fmpmp, R=OPh
7b SG= Fmpmp, R=OEt
7c SG= Fmpmp, R=OH(NEt₃)
7d SG= Fmpmp, R=Cl
7e SG= Fmpmp, R=OMe
7f SG= Fmpmp, R=OTMS
8a SG= THP, R=OPh
8b SG= THP, R=OEt
8c SG= THP, R=OH(NEt₃)
8d SG= THP, R=Cl
8e SG= THP, R=OMe
8f SG= THP, R=OTMS
57 SG= Me, R=OEt



- 61a** R= H
61b R= Fmpmp
61c R= THP
61d R= Me



Publikationen in wissenschaftlichen Zeitschriften

A. Hohlfeld, C. Meier, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **2003**, 5-8, 1223-1225

Weitere in Bearbeitung

Posterveröffentlichungen

A. Hohlfeld, R. P. Mauritz, C. Meier, α -Hydroxybenzylphosphonate modified Oligonucleotides as potential new Antisense Pro-Oligonucleotides,
20th International Carbohydrate Symposium, Hamburg, 2000

A. Hohlfeld, R. P. Mauritz, C. Meier, α -Hydroxybenzylphosphonate modified Oligonucleotides as potential new Antisense Pro-Oligonucleotides,
GDCh Jungchemikerforum, Hamburg, 2000

A. Hohlfeld, W. Fendrich, R. P. Mauritz, C. Meier, α -Hydroxybenzylphosphonat modifizierte Oligonucleotide als potentielle neuartige Antisense-Pro-Oligonucleotide,
GDCh Gesamttagung, Würzburg, 2001

A. Hohlfeld, C. Meier, α -Hydroxybenzylphosphonate Modified Oligonucleotides: Synthesis, Properties and a novel Route via Monomer Building Blocks,
XV. International Round Table of the international Society of Nucleosides Nucleotides and Nucleic Acids, Leuven, Belgien, 2002

A. Hohlfeld, C. Meier, α -Hydroxybenzylphosphonate modified Oligonucleotides: Synthesis, Properties and a novel Route via Monomeric Building Blocks,
GDCh-RSC European Postgraduate Industry Tour, London/ Frankfurt, 2003

Lebenslauf

Andreas Hohlfeld

geb. 19.09.1972, Oldenburg (Oldb.)

Aktuelle Tätigkeit

seit 18.10.2004 Laborleiter bei Girindus AG, Künsebeck, Halle-Westfalen.
Scale-Up-Verfahren zur Oligonucleotidsynthese

Studium

- 05/ 2000 - 12/ 2004 Promotion bei Prof. Dr. Chris Meier am Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg.
„ α -Hydroxy-2-nitrobenzylphosphonat modifizierte Oligonucleotide. Synthese, Eigenschaften und neue Synthesekonzepte.“
- 08/ 1999 - 03/ 2000 Diplomarbeit bei Prof. Dr. Chris Meier am am Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg.
„Synthese, Charakterisierung und Eigenschaften von Bausteinen zur Synthese α -Hydroxybenzylphosphonat modifizierter Oligonucleotide.“
- 11/ 1996 - 03/ 2000 Studium der Chemie an der Universität Würzburg.
Abschluss: Diplom mit der Gesamtnote Sehr Gut
- 03/ 1998 - 07/ 1998 Forschungspraktikum an der Heriot-Watt-University, Edinburg.
„Synthesis and DOSY Spectroscopy of Azacrown Ammonium Host Guest Systems“
- 01/ 1999 - 02/ 1999 Forschungspraktikum am Theodor-Boverie-Institut für Biochemie, Würzburg.
„Präparative Isolierung des Fanconie Anämie Proteins FAG“
- 10/ 1994 - 10/ 1996 Studium der Chemie an der Universität Tübingen.
Abschluss: Vordiplom mit der Gesamtnote Sehr Gut

Tätigkeiten

- 04/ 2001 - 09/ 2004 Betreuung des Organisch-Chemischen Grundpraktikums und des Integrierten Synthesepraktikums, Universität Hamburg.
- 08/ 1999 - 03/ 2000 Betreuung des Organisch-Chemischen Praktikums für Mediziner, Universität Hamburg.
- 11/ 1998 - 07/ 1999 Betreuung des Tutoriums zum Organisch-Chemischen Praktikum für Biologen, Universität Würzburg.

Ausbildung

- 10/ 1992 - 12/ 1993 Zivildienst an der Werkstatt für Behinderte Oldenburg e.V., Diakonie.
- 08/ 1979 - 05/ 1992 Besuch der Grundschule, Orientierungstufe und Gymnasium in Oldenburg.
Abschluss: Abitur mit der Gesamtnote Gut

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation “ α -Hydroxy-2-nitrobenzylphosphonat modifizierte Oligonucleotide. Synthese, Eigenschaften und neue Synthesekonzepte“ selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwandt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsversuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Hamburg, November 2004

